

Title	動的核分極(DNP)法による超高感度固体核磁気共鳴(NMR)
Author(s)	松木, 陽
Citation	大阪大学低温センターだより. 149 P.3-P.8
Issue Date	2010-01
Text Version	publisher
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/10671">http://hdl.handle.net/11094/10671</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

# 動的核分極(DNP)法による 超高感度固体核磁気共鳴(NMR)

蛋白質研究所 松木 陽 (内線 8598)

E-mail: yoh@protein.osaka-u.ac.jp

## 0 . はじめに

本稿では始めに構造生物学において固体NMRが重要な寄与をなす点に触れ、一方で最大の弱点としてその低感度を指摘する。続いて、試料を極低温に維持することと、動的核分極(DNP)法によって固体NMRの感度を飛躍的に改善する技術を概観する。後半では筆者の最近の研究例を紹介し、最後に蛋白質研究所における世界最高磁場条件でのDNP-NMR装置開発の現況も報告する。

## 1 . 構造生物学と固体NMR

生命活動のほとんどの場面で重要な実働部隊となる蛋白質。光を視覚に変え、筋肉を動かし、エネルギーを産生運搬、また2 mにもなるDNAを直径10  $\mu$ mの核に効率よく巻き取り格納し、必要ときには取り出して複製したり修復したりする。魔法の様だが、物質(蛋白質)が物質(DNAや他の蛋白質など)に働きかけてこれらの現象が起こる以上その仕事は、歯車が噛み合い回り、隣の歯車に力を伝えると言った一般的な物理に乗っ取って行われているはずである。そこでこの精巧な分子機械の作動原理をその立体構造や化学的、静電的な性質を原子の解像度で緻密に知る事から解明しようとするのが構造生物学の立場である。それは生命の運行原理に迫る深淵な学問であると同時に、疾病の機構の解明、治療法の提案につながり、実際的な利益も大きい。

固体NMR法は構造生物学に特別ユニークな貢献をする。一つには非常に広範囲の試料系を解析でき、対象の分子量に原理的な上限も無いからである。これは有効な別の二つの方法、即ちX線結晶回折法が単結晶を、溶液NMR法が水溶性で、かつ分子量だいたい20 kDa以下の蛋白質を要求するのに対する強みである。これによって脳神経疾患をおこすアミロイド繊維や細胞膜中で外界とのインターフェイスとして信号や物質の移動に関与する膜タンパク質など、結晶にならず、水にも溶けないものを研究対象にできる。これらは生理的、病的に重要なのはわかっているが解析手段の欠如のために構造研究が遅れているものばかりである。

当然固体NMRが担う役割と期待はとても大きい重大な弱点がある。すなわち一般にラジオ波分光が低感度である事に加え、溶液系NMRでは分子運動によって平均化される強いスピン間相互

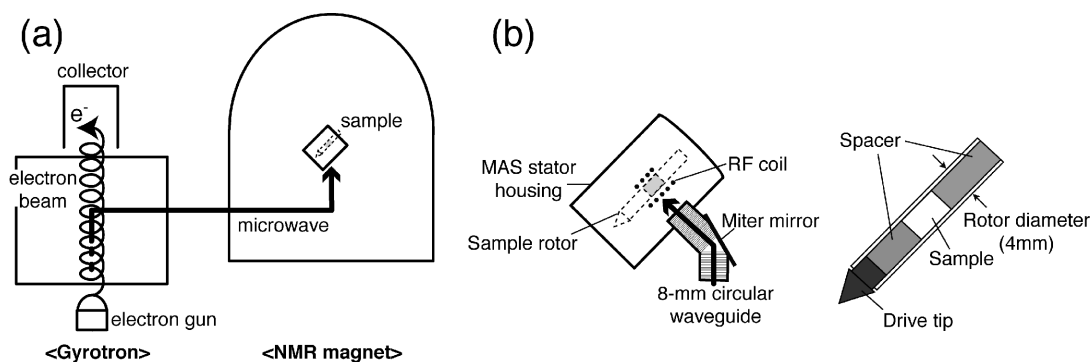


図1 . 高磁場DNP-NMR装置の概要。(a) ジャイロトロンで発生したマイクロ波は導波管とミラーなどを使い、NMR磁石中の試料まで伝送される。(b) 試料周辺にマイクロ波の共振構造は無く、マイクロ波は試料方向の自由空間に向けて放射される。

作用がそのまま残っているため信号が広幅化すること、またこれに起因する低分解能、低感度である。研究対象の分子が大きくなれば一定の容積の試料管に詰まる分子数は比例して減るから、分子量の大きな膜タンパク質などの固体NMR研究は常に感度との戦いになり、長らく多くの研究者の頭痛の種になってきた。

## 2 . 動的核分極 (DNP)

そこで動的核分極 (DNP) 法である。DNPは、不対電子スピンの高いボルツマン分極 (プロトン ( $^1\text{H}$ ) の約660倍) を強いマイクロ波照射によって核に移し、NMR信号を増強、感度向上につなげる方法である。ここで試料を極低温に保つことで、電子スピンの分極が熱溜めに緩和するのを極力抑え、可能な限り核スピンの仕向ける必要がある。ところでボルツマン分極は温度に反比例して向上するので、例えば30 Kまで冷却できれば室温 (300 K) の10倍の核分極が自動的に得られる事になる。DNPによる増強を加味すると感度は従来の室温NMRと比べて  $660 \times 10 = 6600$  倍となる。ただし電子の分極を100%核に移動する事は電子スピンの緩和がゼロでない事を考えると現実には不可能に近い。そこで我々は実現可能な目標としてDNPで100~300倍程度、上記冷却因子と合わせて1000~3000倍の感度向上を掲げる事にする。

DNPの現象自体は1953年にOverhauserが「不対電子のEPR遷移をマイクロ波で飽和すると、電子の分極が核に移動できる」と理論的に指摘して発見され、すぐに金属試料で実証された。これがOverhauser Effectである。ちなみに核スピン同士におこる同じ現象は現在でも溶液NMRで核間距離の測定に必須のツールとなっている。1960年代には金属でない固体でおこる電子-核間の分極移動機構としてSolid EffectとCross Effect (CE) が発見され、現在知られる主な三つのDNP機構が既に出そろった。しかし応用としては、その後長らく1.5テスラ以下の低磁場、低分解能条件 ( $\nu_{\text{H}} = 60 \text{ MHz}$ ,  $\nu_{\text{e}} = 40 \text{ GHz}$ ) における高分子材料などの測定に限られた。高周波、高出力マイクロ波の発生源が無かったのがその理由で、MITのGriffinのグループが比較的高磁場の条件 ( $\nu_{\text{H}} = 212 \text{ MHz}$ ,  $\nu_{\text{e}} = 140 \text{ GHz}$ ) でDNP-NMRの実験を初めて成功させたのはCEの理論が発表されてから実に30年後の1993年であった。これによりDNPを使った蛋白質など生体高分子の高感度、高分解能解析に初めて道が開かれたことになる。

ここでブレークスルーになったのは高周波数、高出力のマイクロ波発生源として核融合や電波天文学などの分野で使われ発展してきていた、ジャイロトロンを導入した事だった。ジャイロトロンは電子銃と高電圧電極によって加速した電子ビームを、磁場中の真空キャビティに打ち込み、旋回運動する電子が相互作用している電磁場に、その運動エネルギーの一部を渡して生じるマイクロ波を取り出す真空管デバイス的一种である。マイクロ

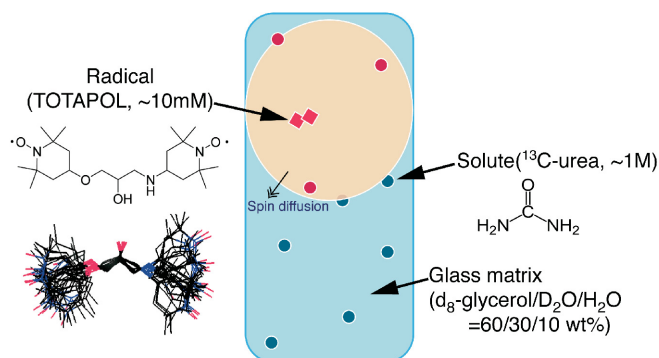


図2 . 試料の概要。標準試料としては溶解度の高い尿素などが用いられる。スピン拡散を維持し、かつ溶質に伝わる分極を最大にするため、マトリクスは大部分重水素化されている。

波はミラーなどで反射して磁石の外へ取り出され、電子ビームの残余エネルギーはコレクタで熱に変換されて吸収される(図1a)。マイクロ波は導波管を伝ってNMR磁石まで運ばれ、固体NMRスペクトルの高分解能化のために外部磁場方向に対していわゆるマジック角で高速回転している(magic-angle spinning; MAS) 試料に向かって照射される(図1b)。試料には不對電子源になる安定フリーラジカル分子と溶質(蛋白質など)が、低温でガラス状態に転移するグリセロール-水マトリクス等に分散されている。マイクロ波を照射するとDNPによってラジカル分子近隣のプロトンに分極が移動し、その後プロトン間のスピン拡散によって試料全体に配られるという仕組みである(図2)。

最も一般的なニトロキソラジカルTEMPOを二つ化学結合したバイラジカルTOTAPOL(図2)を使ってNMRの感度を最大 =170倍向上できる事が示されている<sup>[1]</sup>。試料は安価な蒸発液体N<sub>2</sub>を使い、多くの場合100 K程度に保たれている。よって冷却因子も含めると感度増強は従来の室温(300K) NMRに比して170×3=510倍に達する。Griffinのグループは同様の技術基盤をより高磁場の  $\nu_{H}=380$  MHz,  $\nu_{e}=250$  GHzの条件にも拡張し、非凡な感度を利用して7回貫通膜蛋白質、バクテリオロドプシンの微量励起中間体の解析を成功させた<sup>[2]</sup>。

### 3 . もっと良いラジカルを

DNPはまだまだ発展途上の技術であり、色々なアプローチで改良が試みられている。最近まで筆者はより効率の高いラジカル分子を目指した設計開発に関わったので紹介する<sup>[3]</sup>。2006年までに得られた種々の、TEMPOを使用するバイラジカルの結果を見て興味深いのは、観測される感度増強因子  $\eta$  がTEMPOをつなぐ化学鎖の長さや運動性によって大きく上下する事であった<sup>[4]</sup>。高磁場条件で唯一よく働く分極移動機構であるCEは電子-電子-核の3スピン系で説明され、二つの重要な条件が存在する。すなわち i) 関与する二電子間の双極子結合が大きい事(結合条件) ii) その二電子の共鳴周波数差が核の共鳴周波数と一致すること ( $\nu_{e1} - \nu_{e2} = \nu_n$ , 周波数適合条件) である。そもそもバイラジカルは二つの電子源(TEMPO)を物理的につなぐ事で空間的に近づけ、上記結合条件を効果的に満たそうとする試みであったが、周波数適合が同時に得られるとは限らない。

これは充分短い電子間距離を持つにも関わらず効率の良くないバイラジカルがあることから明らかだった。そこで我々は両条件を同時に満たすバイラジカルをどう実現するか考え始めた。

電子の共鳴周波数は一般にg-tensorと外部磁場の相対向きで決まる。ならば周波数差はつながれた二つのTEMPOのg-tensorの相対向きで決まる。g-tensorの相対向きは大まかに言ってTEMPO環の相対向きであるから、これをうまく制御すれば周波数適合を制御できると考えた。TEMPOのg-tensorは特別大きく、微妙な向きの変化が周波数差を大きく変えるので、向きがしっかり定義されるような硬い化学結合を利用する事を考えた。また定性的に言ってg-tensorがx軸に関して90度ねじれているときに周波数差が大きくなる事に着目(図3a)、スピロ結合を利用した硬い架橋のバイラジカルbis-TEMPO-bis-ketal (bTbk) を合成した(図3b)。

それまで最も効率が高かったTOTAPOLはTEMPOを柔軟な鎖で繋いでいる為、実験を行う100 K付近ではテンソル配向は広い範囲に分布して凍結されており(図2)、一部の分子だけが結合条件、適合条件を同時に満たしていると考えられる。これに対してbTbkでは硬い架橋を使い、いわゆる「良い配向」に固定される様に設計した事で、試料中に分散したラジカル全員が効率の良いDNPに寄与すると期待できる。これによって増強因子の改善と同時に、分極が試料全体に行き渡るのにかかる時間も短縮できると考えられた。

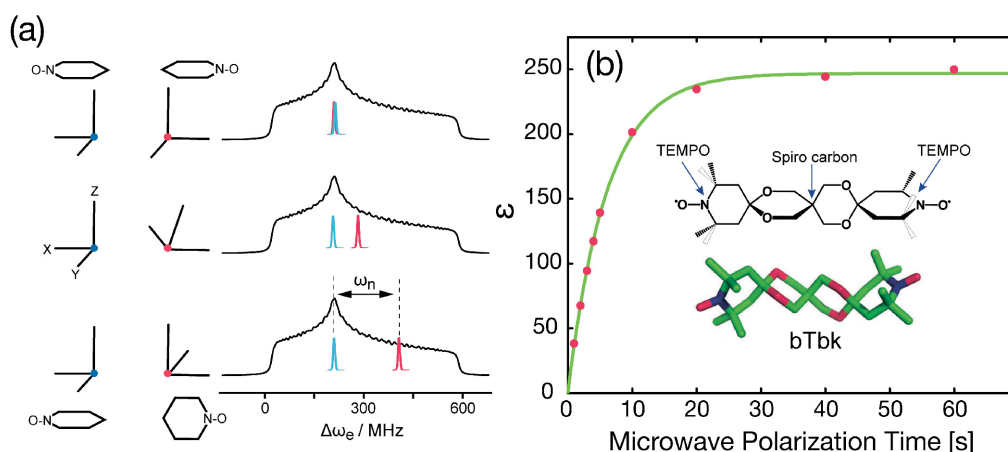


図3 (a) g-tensorの全主軸が揃っているとき、赤と青の電子に共鳴周波数差は生まれない。逆に90°ねじると周波数差を充分大きくできる。(b) bTbkの化学構造と結晶構造。プロットは のマイクロ波照射時間依存性。NMR信号はDNPで得た<sup>1</sup>H分極を交差分極(CP)法で<sup>13</sup>Cに移動してからで観測。増強因子はマイクロ波ありとなしで観測した同じ信号の強度比。

図3bに示すのは、DNPによって増強された<sup>13</sup>C NMRの信号強度をマイクロ波の照射時間の関数でプロットしたものである。信号強度は10~20秒のうちに急速に立ち上がる。試料全体を速く分極できる事は、信号の積算や多次元分光法と組み合わせるとき有利である。定常状態で観測された増強因子は =250で、TOTAPOLで得られる =170の1.4倍だった。これまで調べられた全てのラジカルを凌ぐ成果で(図4a) 我々の分子設計の理念が基本的に正しかった事を示している<sup>[3]</sup>。



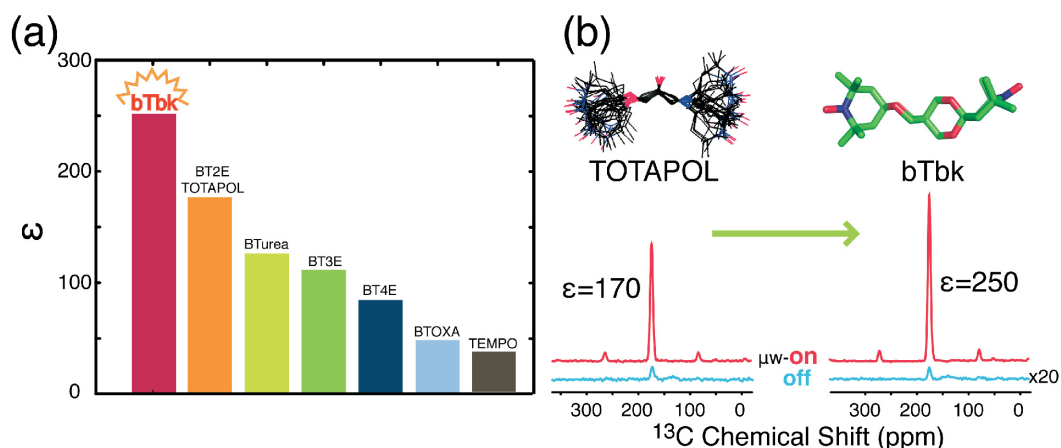


図4 .(a) bTbkと他のバイラジカルの性能比較。(b) TOTAPOLとbTbk、マイクロ波照射の有りと無しで得たスペクトル。CP後の尿素の $^{13}\text{C}$  NMR信号。

#### 4 . もっと高い磁場へ

DNP-NMR法の更なる改良には次のような事が考えられる。1) g-tensorの「ベストな相対配向」を数値計算で見つけ、それに向けてラジカルを合成する。2) もっと高磁場、高分解能条件でのDNPシステムの開発。3) 液体Heをつかった試料の超極低温化 (<30 K) による冷却因子の改善。我々の研究室ではいずれのプロジェクトも進行中であるが、ここでは2点目の世界最高磁場条件  $\nu_{\text{H}}=600$  MHz,  $\nu_{\text{e}}=395$  GHzでのDNP-NMR装置の開発近況について報告したい。これまでの最高磁場はMITの  $\nu_{\text{H}}=380$  MHzであったから相当の飛躍になるが、磁場条件としてはここまでしてやっと本格的に蛋白質の構造解析に使えるくらいのスペクトル分解能を得る。

最初の難関はそれほどの高周波マイクロ波を作れるジャイロトロンの開発、二つ目はCEのスケールアップ問題である。CEによって得られる信号増強効率は理論的に、外部磁場強度に反比例して悪化すると言われ、これまでの観測 ( $\nu_{\text{H}}=212$  MHzで  $\epsilon=170$ 、 $\nu_{\text{H}}=380$  MHzで  $\epsilon=100$  (TOTAPOL)) とも合う。同様に比例計算すると  $\nu_{\text{H}}=600$  MHzでは  $\epsilon=60$ しか期待できず、冷却因子 ( $\times 3 - \times 10$ ) を加味しても目標の合計1000倍以上の感度向上をこの磁場条件で達成するのは容易ではない。

ジャイロトロンは福井大学、遠赤センターの出原らのグループと共同で開発した。高周波数出力は二次高調波を使って克服し、既に蛋白質研究所で稼働している。装置の概観写真は低温センタダより (vol.142, 12-18, 2008) をご覧いただきたい。

2009年4月の段階で観測された信号増強因子は  $\leq 4$  (@90 K) で、特に試料温度の不安定性、関連してNMR検出回路の不安定性から再現性が悪かった。更に試料にあたるマイクロ波が強すぎると、試料の温度上昇が電子スピンの緩和を引き起こしDNP効率が低下することを示唆するデータも得た。凍結したガラスマトリクスもマイクロ波に対して極微弱な吸収があるようで、その後の試験で試料温度が最大10 - 20 上昇している事も突き止めた。温度と回路の安定化と、マイクロ波パワーの適値を精査した結果、2009年11月の時点で最大  $\epsilon=10.4$  (冷却因子を加味して31.2) を観測した。依然として期待される  $\epsilon=60$ より小さいが、世界最高磁場における感度増強値に他ならない。

期待される値まで到達しない原因として、複数の実験データを総合して最も考えられるのは、マイクロ波の分極方向が試料全域で一定方向にそろっていないことが挙げられる。これだと電子スピンを効率よく励起できない。マイクロ波の磁場ベクトルが外部磁場と直交しているのが理想であり、これはマイクロ波ビームをいわゆるガウスビームに変換する事で最適化できる。問題の特定に時間がかかったが、もしそうならばこれは解決策の分かっているエンジニアリングの問題であり、解決は時間の問題と思われる。これで冷却因子と合わせて $10 \times 60 = 600$ 倍まで達成できることになる。

1000倍という目標点に向けて最後に与するのは再び温度の効果のようだ。最近行なった温度変化測定で、 $10\text{ K}$ 下がると約1.5倍ずつ上昇することが観測されたからである。低温にするほど電子の緩和が抑えられ、電子-核間の分極移動効率が上がると考えられる。つまり試料の冷却はボルツマン分極の増大と同時にDNP効率も改善する極めて重要な因子だと言える。我々は蒸発液体Heによる試料冷却 ( $<30\text{ K}$ ) と高速MAS ( $>5\text{ kHz}$ ) に特化した新しいNMRプローブを開発、稼働直前まで来ており、目標の1000倍を遠くない将来達成できると考えている。

## 5 . おわりに

超高感度固体NMRで何ができるだろうか。3 残基以上にわたって蛋白質の背骨を渡り歩いた分極の超微弱なNMR信号が観測できるかも知れない。そうなったら蛋白質のような多信号系で従来に無い強力な信号帰属法につながる。また30 以上の核間遠距離測定も可能になり、巨大分子の効率的な構造解析が望める。低感度がために手が出なかった3次元以上のスペクトル分解も容易になり、固体NMRの分解能は一気に向上するだろう。もちろん超微量蛋白質の検出や、膜蛋白質などを含む巨大な超分子複合体の解析も可能になるだろう。1964年、R. Ernstがpulse-Fourier Transform NMRを導入してNMRの感度を10倍向上したことが(1991年ノーベル化学賞)、その後NMRによる広範な化学、構造生物学の発展を切り拓いた事を思い返すと、DNP-NMRが与えるだろう正の効果は計り知れない。一方で解決すべき問題がいくつか残されている。極低温におけるスペクトル分解能の最適化法や膜蛋白質、アミロイド、微結晶など、広範な試料を安定に分極させる一般法の確立などである。近い将来1000倍明るい固体NMR法が、蛋白質の、そして生命の作動原理を照らし出す日がくることを願いつつ、我々はこれら諸問題の解決と更なる技術革新に向けて努力している。

## 参考文献

- [ 1 ] C. Song et al., *J. Am. Chem. Soc.* 128, 11385- ( 2006 )
- [ 2 ] V. S. Vajaj et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 9244- ( 2009 )
- [ 3 ] Y. Matsuki et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 4996- ( 2009 )
- [ 4 ] K.-N. Hu, *ph.D thesis*, Massachusetts Institute of Technology, ( 2006 )