

Title	Development of Multinuclear Multidimensional NMR Measurements
Author(s)	根本, 鴨明
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46514
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	ねもと のぶ あき 根 本 暢 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 19684 号
学位授与年月日	平成 17 年 4 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Development of Multinuclear Multidimensional NMR Measurements (多核多次元 NMR の測定法開発)
論文審査委員	(主査) 教授 小林 祐次 (副査) 教授 田中 徹明 教授 小林 資正 教授 高木 達也

論 文 内 容 の 要 旨

一般に、多核多次元 NMR (核磁気共鳴分光法) 測定においては、測定する試料の同位体標識、複数の RF チャンネルを同時にコントロールすることが可能な高度な NMR 分光計が必須であり、また多核 NMR 実験のパラメータ設定は複雑かつ煩雑である。そのような多核多次元 NMR に関する諸問題を解決することを目的とし、申請者は生理活性ペプチドとタンパク質の多核多次元 NMR における様々な測定技術を開発した。

通常、天然に微量しか存在しないペプチドは化学合成により大量に得られている。しかし、化学合成によりペプチドの安定同位体標識を行うには、原材料である安定同位体標識したアミノ酸が非常に高価なため、大量に得るのは非現実的である。一方、大腸菌によるペプチドの直接大量発現系においては、短いペプチド及び mRNA は細胞内で短時間のうちに分解されるため、やはり大量の試料を得るのは困難である。そこで申請者は、チオレオドキシシン遺伝子融合システムによる生理活性ペプチドの大量発現系を構築した。この方法においては、分子量約 1 万 2 千の蛋白質チオレオドキシシンとペプチドからなる融合タンパク質を大腸菌内で発現させ、菌体内での分解を防ぐ。その後、チオレオドキシシン-ペプチドの連結部位を基質特異性の高いタンパク質分解酵素で切断することで目的のペプチドを得る。申請者は、この方法を副腎皮質刺激ホルモンフラグメント ACTH-(1-24) に応用し、すべてのアミノ酸を ^{15}N で安定同位体標識した ACTH-(1-24) を培養液 1 L あたり 6 mg 得ることに成功した。

^{13}C や ^{15}N で安定同位体標識した試料に対する多核多次元 NMR 実験において、 ^{13}C 核は、しばしば、異なる複数の領域をあたかも別の核種であるかのように選択励起されている。従来は周波数シンセサイザの周波数を実験の間ひとつの周波数に固定し、オフレゾナンス励起の手法を使用して選択励起していた。しかし、この方法では、必要とするパルス長を周波数シンセサイザの周波数オフセットと励起対象となる領域との周波数の差の逆数より長くする必要があるので、パルス長に制限がかかってしまう。かつてこの問題に対処するには、複数の周波数の異なる周波数シンセサイザを用意するか、パルスプログラム中で設定周波数を切り替えるしかなかったが、どちらの方法でも異なる複数の領域をコヒーレントに励起することができない。他方、Direct Digital Synthesizer (DDS) は、出力の周波数、位相、強度を短時間に変化させることが可能であるため、DDS を NMR 分光計の周波数源として使用することで、複数の領域をコヒーレントに励起することが可能である。加えて、複数の DDS を NMR 分光計に搭載することで、1 回の測定を通じて DDS の設定周波数を変更することなく搭載した DDS の個数だけ異なる周波数を使用し続けることも可能となり、パルスプログラミングが容易になる。ところで、従来 1 台の NMR 分光計には 1 台のパルスシーケン

サのみが搭載されていて、すべての RF チャンネルのすべての時間イベントを制御している。一般に実験を行う際のパルスプログラムがチャンネル数やパルス数の増大に伴って複雑になればなるほど、設定ミスなどにより長時間の測定を失敗することも多い。申請者は、以上の問題に対し、マルチ DDS システム (DDS により 1 つの励起帯域に対し個別の中間周波数を発生させ、共通の発信器からの周波数とミキシングすることで異なる周波数を発生させる) 及びマルチシーケンサシステム (パルスシーケンサを複数使用する) を有する NMR 分光計上で、タンパク質溶液 NMR 測定における代表的な測定である CBCA(CO)NH に適用して、オフレゾナンス成形パルスを使用せずにその 3 次元 NMR スペクトルを得ることに成功した。簡潔なパルスプログラムで従来と同様の S/N 比、分解能を持つスペクトルを得ることができた。

パルス NMR 測定において、適切に調整されていない測定パラメータは、最終的に得られる信号強度に対して深刻な影響を及ぼす。特に、多数のパルスを用いてスペクトルを編集するマルチパルス NMR 実験においては、個々のパルス長の不正確さが小さくても、それらが蓄積されることによって、最終的に得られる信号の強度が大きく低下するため、マルチパルス NMR の測定前には正確な 90° パルス長を決定する必要がある。例えば、 ^1H の 90° パルス長を決定するには、緩和時間や放射減衰の影響を取り除くために 360° パルス長を求め、4 分の 1 を 90° パルス長とする。具体的には、パルス長を段階的に変化させる nutation 実験を行い、信号の強度変化から 360° パルス長を求める。正確に求めるには、 360° パルス長付近でパルス長を変えて詳細に測定する必要がある。 360° パルス長では信号が消失するため、その近傍では信号対ノイズ比の小さいスペクトルを用いて判定しなくてはならず、正確な 360° パルス長を決定するためには長時間の積算を必要とする。そこで申請者は 90° パルス長などの最適パラメータの決定に適切なモデル式を仮定した上で、非線形最小自乗カーブフィッティング計算を適用することにより必要な測定データ点を大幅に削減し、従来法より正確な最適パラメータの算出を迅速に可能とする方法を開発した。パルス長の算出では、正弦関数と減衰する指数関数の積を含むモデル式を選択した。nutation 実験で得られたスペクトルの信号領域の積分値をパルス長に対してプロットした曲線とモデル式によって描かれる曲線が一致するように、非線形最小自乗カーブフィッティング計算を行い、式に含まれる未定数の最適値を求め、その結果から 90° パルス長を得る。この方法では、10~20 回程度の 1 次元スペクトル測定から、 90° パルスを自動的に決めることができる。また本ツールは ^{13}C や ^{15}N の 90° パルス長決定にも利用できるため、従来手作業であったタンパク質の溶液測定における実験パラメータの自動設定が可能となった。

論文審査の結果の要旨

根本暢明君は蛋白質の構造解析を行う手法として、NMR の重要性を早くから認識し、多核多次元 NMR の現実的な応用と言った面に興味を示してきた。まずそのために必要な試料の調整方法として、従来困難であった比較的分子量の小さい生理活性ペプチドの同位体標識の手法を改良した。次に、非常にパルス系列が複雑となってきた近年の多核多次元 NMR の測定を実行する装置の改良を試みた。その結果、マルチ DDS システムとマルチシーケンサシステムの併用により、S/N 比や分解能を低下させることなくパルスプログラムを簡略化することに成功し、ユーザーフレンドリーな分光器の実現に道を開いた。さらに、NMR 測定に必須な 90° パルスの設定を、 90° パルス長の最適パラメータ決定のモデル式を提唱し、数少ない測定から、非線形最小二乗法によりパラメータを決定できることを示し、 90° パルスを従来法より正確に設定できる完全自動化法を実現した。これらのユーザーフレンドリーな分光器の実現は、必ずしも分光学に習熟していない研究者を含む非常に多くの薬学分野における研究者に広く NMR の恩恵に浴する機会を与えることになる。このように根本君の本論文は、分光学的な知見を得たのみでなく、分析手段の改良に大きく貢献していて、博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認められる。