

Title	Development of high-resolution solid-state NMR using ¹ H nuclear spins for structural biology
Author(s)	高橋, 大樹
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49741
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	高橋大樹
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 22563 号
学位授与年月日	平成20年12月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	Development of high-resolution solid-state NMR using ^1H nuclear spins for structural biology (水素核スピンをを用いた高分解能固体 NMR による生体分子構造解析法)
論文審査委員	(主査) 教授 藤原 敏道 (副査) 教授 江口 太郎 教授 中村 春木 招へい教授 阿久津秀雄

論文内容の要旨

近年、溶液状態における NOESY 法のような ^1H 間距離情報を得る方法が固体状態においても盛んに研究されてきている。しかし、複雑に絡み合った双極子結合が存在するため、 ^1H 間距離測定は現象論的な議論にとどまっている。本論文では、マジック角試料回転(MAS)下における ^{13}C 標識固体試料に対して、 ^1H 間の直接的な磁化移動から距離を定量的に求める方法を述べる。 ^1H - ^1H 間磁化移動は4スピン系 (^1H - ^{13}C - ^{13}C - ^1H) において、化学シフト、同種核及び異種核双極子相互作用、マジック角試料回転の効果を考慮に入れて議論した。平均ハミルトニアンによる解析から、 ^1H - ^1H 双極子相互作用は化学シフトや ^{13}C - ^1H 双極子相互作用によってマジック角試料回転条件で有効に作用することが導かれた。この理論は上記の相互作用を直接的に考慮に入れていない速度方程式を用いる解析法とは異なり、ビルドアップ曲線の初期過程をより正確に記述できる。この解析法を用いて ^{13}C 、 ^{15}N で均一標識されたバリン及びアデノシンの ^1H - ^1H 間距離を求めた。比較的短い距離 (3.0 Å 以内) では 5-10% の誤差で求められたが、より長い距離 (3.0 Å 以上) では誤差が 30% ほどとなった。この理論では、 ^1H - ^1H 間の直接的な磁化移動を対象にしており、長距離ではリレー機構が働くために、解析の誤差が大きくなる。

^1H は固体状態では大きな ^1H - ^1H 双極子相互作用に比べて化学シフトによる分散が狭いために、高分解能な ^1H -NMR スペクトルを得ることは難しい。したがって、上記の実験は ^1H - ^1H 間磁化移動を ^1H 直接観測によって得られたものではなく、分解能の高い ^{13}C による間接的な観測によるものである。しかし、 ^1H は感度が良く天然にも多く存在するため有用である。よって、次に ^1H 直接観測により ^1H - ^1H 相関を測定する手法を開発した。 ^1H 観測を行うためにまず、 ^1H -NMR の分解能を向上させる必要がある。30kHz 程度の高速 MAS と構造情報を失わずに重水素標識を行う SAIL 法を組み合わせることで、高い分解能の ^1H -NMR スペクトルを得ることができた。次に、 ^{13}C - ^1H 相関スペクトルを測定することで、高感度に ^1H - ^1H 相関を観測することができ、さらに ^{13}C 観測では得ることのできなかった相関も観測することができた。

最後に、この2つの方法は小さな分子で示されただけであるが、たんぱく質などの大きな分子にも以下の点を考慮に入れば応用できると考える。 ^1H - ^1H 間の相関実験では ^1H 密度が大きく影響する。それはリレー機構による磁化移動や双極子トランケーションと呼ばれるものである。これらの影響を弱めるためには重水素化が重要となってくる。この意味でも、固体 NMR による構造決定において SAIL 法は特に有用な手段である。

論文審査の結果の要旨

近年、溶液状態におけるNOESY法のような¹H間距離情報を得る方法が固体状態においても盛んに研究されてきている。しかし、複雑に絡み合った双極子結合が存在するため、¹H間距離測定は現象論的な議論にとどまっている。申請者は、マジック角試料回転(MAS)下における¹³C標識固体試料に対して、¹H間の直接的な磁化移動から距離を定量的に求める方法を理論的に研究し、その方法の有効性を実験的に検証した。最初に、¹H-¹H間磁化移動は4スピン系(¹H-¹³C-¹³C-¹H)において、化学シフト、同種核及び異種核双極子相互作用、マジック角試料回転の効果を理論的に調べた。平均ハミルトニアン理論による解析から、¹H-¹H双極子相互作用は化学シフトや¹³C-¹H双極子相互作用によってマジック角試料回転条件で有効に作用することを証明した。この相互作用のコヒーレンスを考慮した理論は、上記の相互作用を直接的に考慮に入れていない確率論的な速度方程式を用いる解析法とは異なり、磁化移動のビルドアップ曲線の初期過程をより正確に記述できる。この解析法を用いて¹³C、¹⁵Nで均一標識されたバリン及びアデノシンの¹H-¹H間距離を求めた。比較的短い距離(3.0 Å以内)では5-10%の誤差で求められたが、より長い距離(3.0 Å以上)では誤差が30%ほどとなった。この理論では、¹H-¹H間の直接的な磁化移動を対象にしており、長距離ではリレー機構が働くために、解析の誤差が大きくなる。

¹Hは固体状態では大きな¹H-¹H双極子相互作用に比べて化学シフトによる分散が狭いために、高分解能な¹H-NMRスペクトルを得ることは難しい。したがって、上記の実験は¹H-¹H間磁化移動を¹H直接観測によって得られたものではなく、分解能の高い¹³Cによる間接的な観測によった。しかし、¹Hは感度が良く天然存在比も高いため有用である。よって、次に¹H直接観測により¹H-¹H相関を測定する手法を開発した。¹H観測を行うためには、¹H-NMRの分解能を向上させる必要がある。30kHz程度の高速MASと構造情報を失わずに重水素標識を行うSAIL法を組み合わせることで、高い分解能の¹Hスペクトルを得ることができた。次に、¹³C-¹H相関スペクトルを測定することで、高感度に¹H-¹H相関を観測することができ、さらに¹³C観測では得ることのできなかった相関も観測することができた。

この2つの方法は低分子に適用したが、タンパク質などの大きな分子の構造解析にも応用可能なものである。上記のように申請者の論文は、¹H-固体NMRによる分子構造解析を発展させた。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。