



Title	生体分子複合体構造解析のためのラジオ波テラヘルツ波固体磁気共鳴分光法の発展
Author(s)	藤原, 敏道
Citation	大阪大学低温センターだより. 2008, 142, p. 12-18
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/5522
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

生体分子複合体構造解析のためのラジオ波 テラヘルツ波固体磁気共鳴分光法の発展

蛋白質研究所 藤原 敏道（内線8598）

1. 生体分子の構造解析と核磁気共鳴法

生体分子の立体構造の解明は、生物の機能を理解し応用する上で重要である。1953年のワトソン・クリックによる二重らせん立体構造モデルの提唱は、分子生物学の出発点になった。また、疾病に関する蛋白質、食物や化成品の生産に関する酵素、エネルギー変換に関連する蛋白質は、生物科学だけでなく医学、工業、農業でも重要であり、立体構造の解明は蛋白質の高機能化につながり、社会的にも強い要請がある。

この生体高分子の立体構造を原子分解能で決定する方法は、X線結晶構造解析と溶液NMR法がある。生体高分子の原子座標など立体構造データベースPDB（Protein Data Bank）では、85%がX線法により、残り約15%がNMR法によるものである。この構造解析用の大規模設備としては、西播磨のSpring 8、高エネルギー研のPFなど放射光設備、NMRでは約50台の超伝導磁石と分光計が集積している理研横浜NMRパークがある。また、蛋白研では、Spring 8のビームラインや約10台の超伝導磁石とNMR装置を運用し、構造解析の応用だけでなく方法の開発研究も行っている。

これまでに設備が整備され構造解析法も進んだが、それですべての生体物質の構造解析ができるわけではない。これは、解析法に試料についての制約があるからである。X線回折法で構造決定するには、試料を単結晶にする必要がある。溶液NMRでは、運動性を高くするため分子量は数万以下である必要がある。X線回折や溶液NMR法に対して、固体NMR法は非結晶状態の固体試料について構造決定ができる。よって、結晶化がむずかしく従来法では解析が困難である膜蛋白質複合体や纖維状の蛋白質、クロロフィル集合体など生体分子複合体の解析では有利である^[1,2]。現在の生物科学や社会の要求に応えて構造解析を行うためには、膜蛋白質複合体などさらに複雑な複合体の構造解析を行う必要がある。NMR法は、テラヘルツ波技術など新しい科学技術を取り入れて、さらに発展しようとしている。本稿では、歴史的な観点もまじえて、生体系固体NMR法の技術と発展を紹介する。

2. 生体分子構造解析法としての多次元高分解能固体NMR分光法への発展

ラジオ波分光学として核磁気共鳴は1945年に初めて観測された。これには第二次世界大戦のころ

開発された超短波技術によることが大きい。現在の高分解能NMRにつながる次の大きな発展は、コンピュータなどエレクトロニクスの発展による。パルスラジオ波で観測帯域全体にわたり核スピノンを励起して時間領域の信号を観測し、これをフーリエ変換してスペクトルを得る。これにより、磁場掃引などの必要がなくなり、短時間で高感度な測定をもたらした。これは、1960年代後半に研究室内でコンピュータを利用できるようになったことと、高速フーリエ変換アルゴリズムが開発されたことによる。また、エレクトロニクスの発達は、マイクロ秒より短い時間分解能で、任意に多重ラジオ波パルスを発生させて、核磁気相互作用を時間領域で制御することを可能にした。これらラジオ波多重パルス法が、高分解能固体NMRの実現に大きく寄与した。また、1980年頃には、約1MBのデータをフーリエ変換して表示できるようなハードウェア技術に支えられて多次元NMR分光法が登場した。これで生体分子を構成する原子の座標を決定するのに必要な多くの信号を系統的に扱えるようになった。また、用いる磁場強度はマグネットが電磁石から超伝導磁石、さらに超伝導線材の開発によりこの30年間に、約10倍増加して感度分解能の向上に寄与した。次に、このような技術に基づく、多次元高分解能固体NMR法について述べよう。

2 . 1 生体系固体NMR実験法^[1,2]

固体¹³C-NMRで高分解能高感度測定をもたらすCP/MAS法の原理を説明する。この測定法は、交差分極法 (Cross Polarization: CP) 双極子相互作用のラジオ波 (RF) デカップリング、マジック角高速試料回転法 (Magic Angle Spinning: MAS) からなる。交差分極では、静磁場中でもっとも高い遷移エネルギーを持つ¹Hの大きい分極を¹³Cに移動させ、¹³C分極を約4倍増大する方法である。これは、¹³Cと¹Hに共鳴する周波数でラジオ波を照射する二重共鳴法である。また、デカップリングでは、双極子磁場より強いラジオ波磁場で核スピンを駆動し双極子結合による線幅の広幅化を除

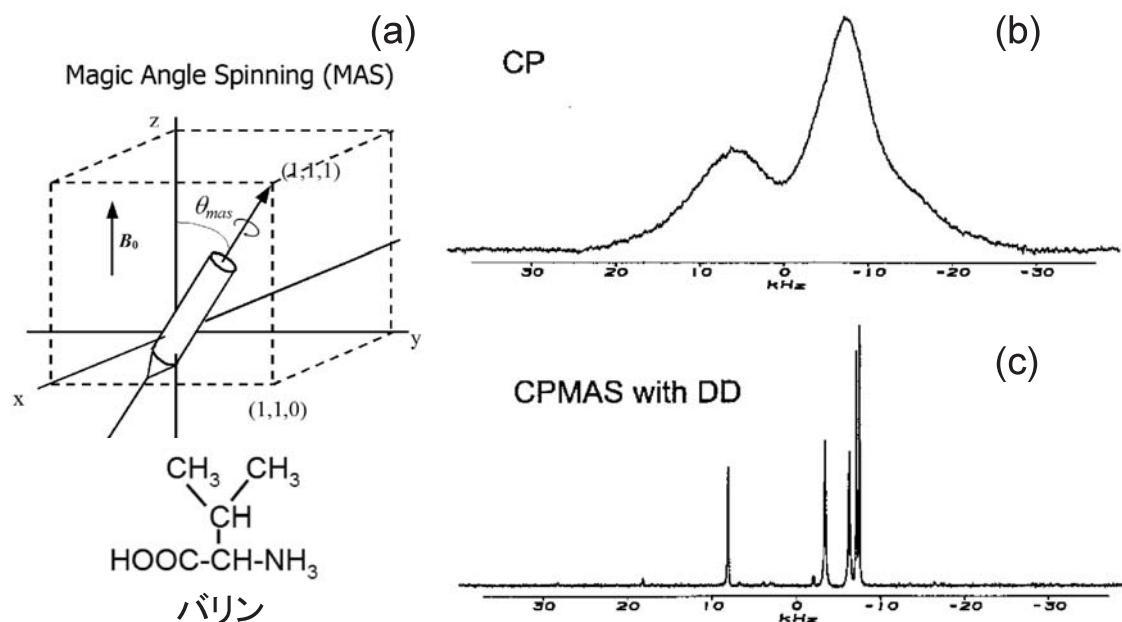


図1 マジック角試料回転と固体NMRスペクトル。(a) 静磁場に対してマジック角 θ_{mas} 傾けて試料ローターを回転させる。(b) バリンの静的な状態での¹³C-NMRスペクトル。(c) CP/MAS法と¹H双極子デカップリング (DD) で測定したバリンの高分解能固体NMRスペクトル。5つの¹³C-NMR信号が分離している。

く。マジック角回転を図 1 aに示す。約3mmの直径のローターに試料を約10mg入れて、静磁場に対して54.7°傾けて毎秒約1万回で回転させる精密機械技術である。気体ベアリングで回転させ、ローター外周では超音速にも達する。これにより、角度に依存する化学シフト異方性などによる線幅を除けて、信号強度が増大して感度も向上する。

生体系固体NMR法では上記のような方法を時間領域で切り換えて、多次元測定を実現する。図 2 に2次元パルス系列と得られたスペクトルを示す。時間領域の信号は、パルス系列の(t_1, t_2)の関数として得る。 (t_1, t_2) はフーリエ変換することで図 2 bのスペクトルの周波数軸(f_1, f_2)となる。スペクトル上で(f_a, f_b)に現れる信号は、共鳴周波数 f_a と f_b を持つスピニが、パルス系列の混合期を通じて相関を持つことを示す。例えば、図 2 の方法では、混合期に双極子相互作用によって、共有結合で結ばれた核スピン間で分極が移動する。この場合は、Ca-N-C'-Caという共有結合で結ばれている隣接アミノ酸間の信号が現れている^[3]。

既知である化学構造式と、赤線で示した信号のつながり方や共鳴周波数を比べて、信号を各原子に当てはめていく。この信号帰属を通じて核スピンの化学シフトを決める。この化学シフトから化学結合軸についての回転角を予測できる。タンパク質のNMRでは、これまでの多数の構造決定結果がデータベースとして蓄積されており、この回転角と化学シフトの相関が明らかになっている。距離は、核スピン間の双極子相互作用が核間距離の-3乗に比例することから求める。多くの場合は、双極子結合による混合期がある多次元NMR法で、信号強度から核間距離を求める。

2 . 2 データ解析法

タンパク質など、共有結合で決まる化学構造は既知であることが多い、これとNMRから得られる構造情報を用いて分子の原子座標を算出する。この計算では制約付き分子動力学法を用いる。この方法では、化学結合などのポテンシャルエネルギー項とともに、角度および距離など実験で得ら

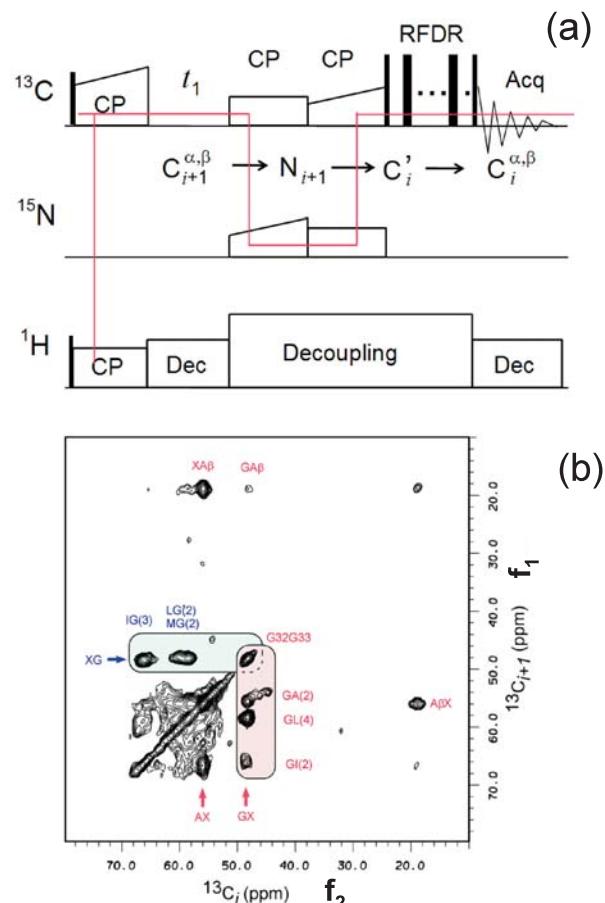


図 2 2 次元NMRパルス系列 (a) と連鎖帰属を行うためのH⁺-ATP合成酵素サブユニットcの2次元NMRスペクトル (b)。(a) 赤線で示したのは磁化の移動経路。主に初期磁化¹Hからはじまる。 t_1 は化学シフトの展開期、Acqは観測期を示す。両者の間の混合期にCP法で¹³Cから¹⁵N、CP法で¹⁵Nから¹³Cに、RFDR (Radio-Frequency Driven Recoupling) 法で¹³C間をペプチド結合に沿って分極移動する。(b) アミノ酸残基間の連鎖的C相関が示されている。

れる制約が満たされると低下する擬エネルギー項の和としてエネルギー関数を作る。運動方程式を解いて高い温度状態からゆっくり温度を下げる、局所的なエネルギー最小にトラップされずに、実験的制約を満たす安定な立体構造を求める。その正確さは、エネルギーの低さと得られた構造の一義性から評価する。この方法は、1980年代のワークステーションによる計算の高速化やそれを利用する計算法が開発されて可能になった。

2 . 3 試料調製法

炭素原子は天然では99%が¹²Cから成るがNMR測定できない。このため生体系NMRでは、測定しやすい¹³Cや¹⁵Nなどの安定同位体で標識した試料を用いる。標識により、¹³C存在比を増加させ約100倍感度を向上でき、また¹³C, ¹⁵Nに関する相互作用を導入できる。複雑な生体系の試料調製では、微生物を用いて蛋白質などを大量発現させる。この時、¹³C源として安価なグルコースを、¹⁵N源として¹⁵NH₄Clを含む培地を用いて標識する。これは遺伝子工学等の進歩によるもので、1990年頃から始められた。また、分子量の小さいペプチドでは有機化学合成をすることもある。

3 . 生体分子構造解析への応用の例

固体NMR法で求めたアミロイド^[4]、クロロゾーム^[5]の構造を図5に示す。アミロイドは、蛋白質が分子間の水素結合などで重合して、図5aに示すような纖維状の会合体を作る。このアミロイド纖維は人体に蓄積して、アルツハイマー病など疾病を引き起こす。これはβミクログロブリンによる構造であるが、アミノ酸配列が全く異なる蛋白質でもアミロイド形成状態ではこの立体構

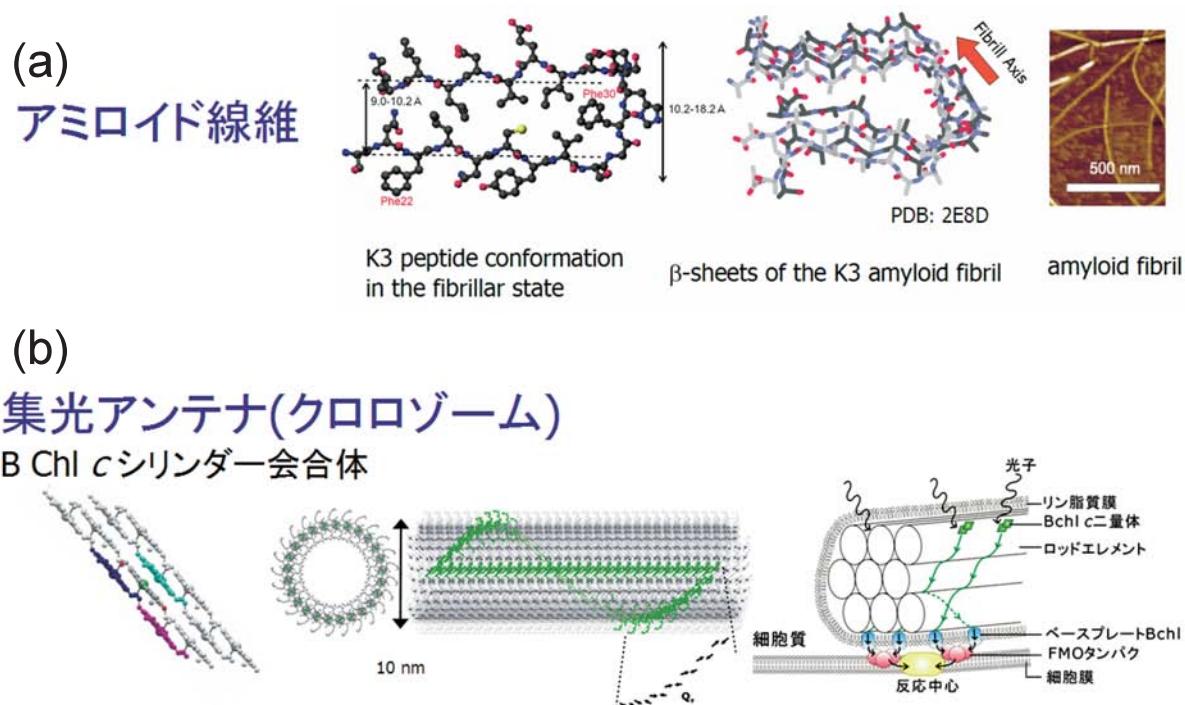


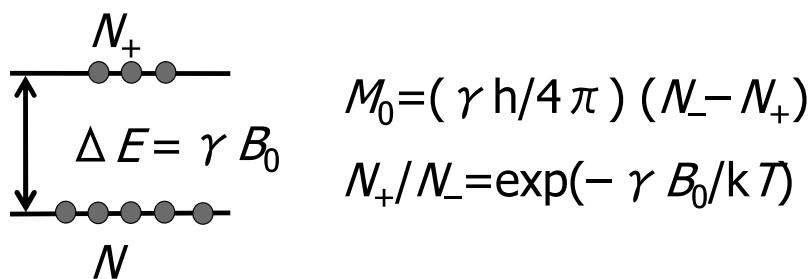
図3 アミロイド(a) クロロゾーム(b)。(a) 単分子ペプチドとペプチド複合体の立体構造、アミロイド纖維の原子間力顕微鏡像を左から順に示した。(b) スタッキングしたバクテリオ・クロロフィルC分子。それより成る円柱状会合体、会合体より作られた光合成器官クロロゾーム。

造と高い共通性があった。図 5 b のクロロゾームは、緑色光合成菌が持つ光捕集のための分子集合体であり、光のエネルギーを分子の励起状態として捕捉して、その状態を反応中心まで効率的に伝達することが機能である。反応中心では励起状態のエネルギーが H_2O の解離などを通じて電気化学エネルギーに変換される。バクテリオ・クロロフィル c がスタッキングして、直径 10 nm 程度の円筒状の構造体を作る。この構造によって初めて光捕集の効率を理論的に評価できるようになる。膜タンパク質については、文献 3, 6 を参考にされたい。これらの分子複合体はいずれも分子がナノスケールの複合体を作り機能を持つ。これらの機能の解明には原子分解能での立体構造が必要である。しかし、いずれも単結晶を作ることは困難で、X線回折等では十分な構造情報が得られなかった。

4. 次世代NMR、テラヘルツ波を用いた高磁場DNP^[7,8]

固体NMRでは、小型の蛋白質なら構造決定できるようになった。しかし、より大きな膜蛋白質複合体の全構造を決めて生物学や社会の課題に答えるためには、固体NMRの感度を飛躍的に向上させる必要がある。感度が向上すれば、多次元分解法で分解能を上げることができ、より複雑な分子の構造解析が可能になる。感度が低いことは、NMRがラジオ波分光学であり、その光子のエネルギーが弱いことによる。

これまで、NMRの能力は、その時々の先端的な科学技術を取り込んで大きく進歩してきた。現在、高磁場NMRを高感度化する有望な技術の一つはテラヘルツ波光源である。スピンの分極は、遷移エネルギーが大きいスピンから分極移動することで増大させて、感度向上させられる（図 4）。¹H に比べて約 700 倍大きい電子スピンの遷移周波数は高磁場においてテラヘルツ波/サブミリ波領域にある。これを飽和させて、核スピン・電子スピン相互作用を通じて核スピンの分極を数百倍増大できる（動的核分極：DNP）。原理は 1953 年にオーバーハウザー効果として示された。しかし、高出力テラヘルツ波光源がなかったため、これを NMR が最高の能力を発揮して高い分解能が得ら



	v_0 at 14.1 T	T	$(N_- - N_+) / (N_- + N_+)$	Enhancement
¹ H	600 MHz	300 K	0.005%	1
¹ H	600 MHz	30 K	0.05%	10
e	394 GHz	30 K	30%	6350

図 4 磁場強度 14.1 T での ¹H と電子の共鳴周波数、30 K と 300 K での分極率、相対感度。

れる高磁場で実現することはできなかった。

この高出力テラヘルツ波光源として実験室で利用可能になってきたのは、核融合用に開発されてきたジャイロトロンである。このジャイロトロン(図5)では、静磁場中の電子スピンの歳差運動から、エネルギーを電磁波として取り出す。さらに、電子スピンの磁気緩和を抑えるとともに熱平衡分極を大きくするため液体窒素温度以下でDNP-NMR実験を行う。この低温実験ではNMR検出器の温度も低いため熱ノイズは減り、S/N比として感度は向上する。この実験は低温で高速マジック角回転を行うために、大量の低温気体を試料ローターのベアリングに用いるので、容易な実験ではない。私たちを含め、このような最先端の科学技術を利用して、最高の解析能力のある固体NMR装置を作る開発研究が進んでいる。これが次世代の生体系NMRになるであろう。

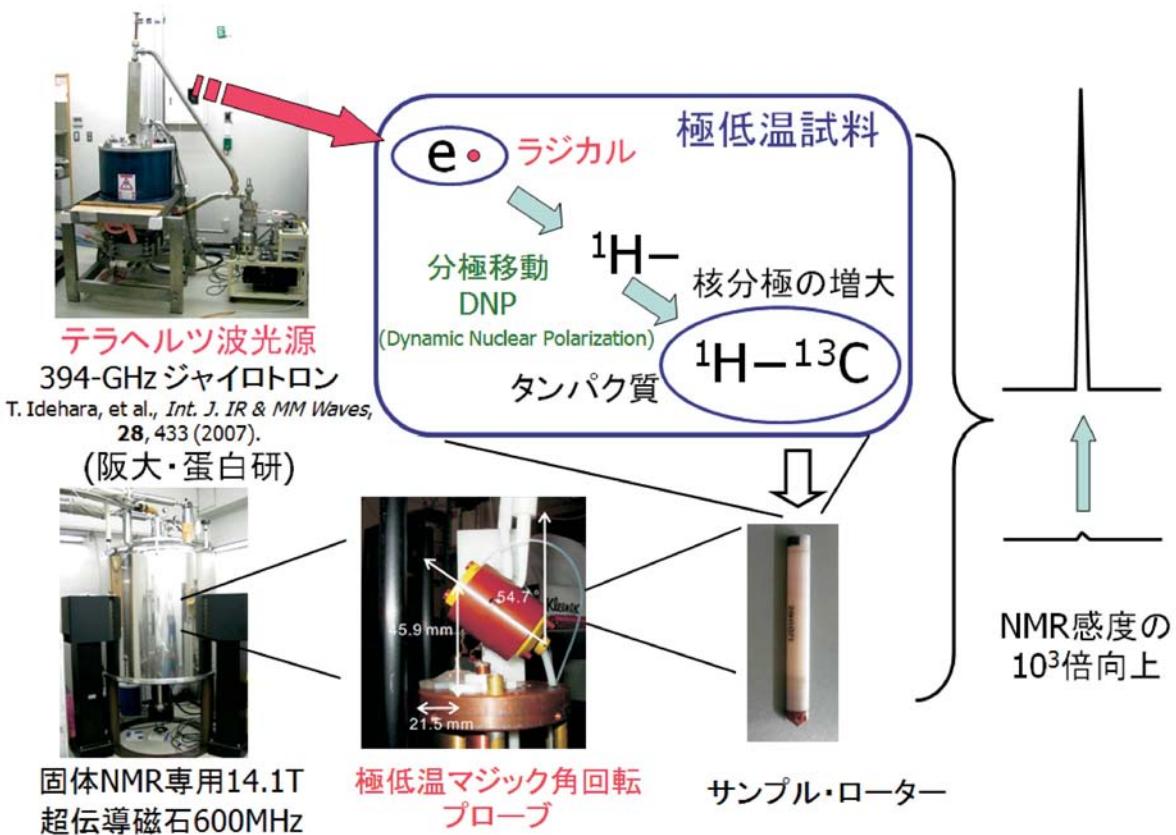


図5 高磁場DNPの原理と装置。テラヘルツ波光源ジャイロトロン^[8]、超伝導NMRマグネット、プロープ内試料ローターハウジング、ローターの写真を示した。ローター内の試料は安定ラジカルと蛋白質の混合物である。ジャイロトロンは福井大遠赤センターの出原らによって製作された。(JST先端機器開発事業による)

5. おわりに

NMRの直接観測から約60年になる。この間の科学技術の進歩、ラジオ波技術、エレクトロニクス、数値計算機、超伝導磁石、遺伝子工学などを取り入れ発展してきた。現代の高分解能固体NMRでは、ラジオ波パルスのコヒーレンスや高速試料回転を利用して大量のデータを取り出して、分子動力学計算やデータベースも用いて、生体分子複合体の構造決定を無配向状態で行えるようになった。このように生体系NMR分光学は、生物科学、計算機科学、物理工学の最先端の技術を駆

使していくため、各分野の専門家との共同研究が不可欠である。

この高磁場固体NMRの技術は、さらに高出力テラヘルツ波の発生や周波数・位相の変調など新しい科学技術の利用により、発展するだろう。例えば、テラヘルツ波発振周波数が可変になることで、DNPは、固定した静磁場強度を用いる現在の高分解能NMRと両立できるようになる。テラヘルツ波変調で電子スピンをより自由に操作できれば、電子スピンを媒介にして、レーザー光などによる電子状態の遷移とも関係づけられる。これにより、さらに大きいエネルギーを持つ光学的な遷移に基づく分極を核スピンに移動できる。これは、室温での感度増大などで有利になるだろう。今後は分光学技術の発展により、NMRの高い分解能を利点として、電子スピン共鳴や電子・振動状態の分光学と統合することができ、より詳しく巨大分子の構造が解明できるようになるだろう。

参考文献

- [1] 藤原敏道ら, 第5版 実験化学講座、第8巻「NMR・ESR」、丸善 p.329 (2006)
- [2] 阿久津秀雄ら, 生命科学のための機器分析実験ハンドブック、羊土社、p.157 (2007)
- [3] M. Kobayashi, et al., *J. Biomol. NMR*, 36, 279 (2006)
- [4] K. Iwata, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 18119 (2006)
- [5] A. Egawa, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 790 (2007)
- [6] E. Harada, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 10654 (2006)
- [7] T. Fujiwara et al., *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 58, 155 (2006)
- [8] 藤原敏道ら, 日本赤外線学会誌、16, 35 (2007)