

# 生体高分子構造解析装置

右田耕人\*

## Instrument for Determining Solution Structures of Biopolymers

Kouto Migita\*

1. はじめに
2. 装置の構成
3. 構成装置の性能の概要
4. 核磁気共鳴装置の原理
5. 核磁気共鳴スペクトルから得られる情報
6. 利用上の注意
7. おわりに

### 1. はじめに

このたび機器分析センター102号室に生体高分子構造解析装置が設置されました。この装置は核磁気共鳴(NMR)装置と分子構造解析プログラムから構成されています。核磁気共鳴装置は水素核などの磁性をもつ核の共鳴現象を利用して分子構造などを明らかにする装置です。この装置を用いると、水溶液中の生体高分子の核間距離の情報が得られます。この核間距離のデータを分子構造解析プログラムで処理すると溶液中の分子構造を反映した立体モデルをつくりあげることができます。現時点ではこの方法が、生理的条件下のタンパク質分子、核酸分子などの立体構造を実験的に明らかにする唯一の手段です。設置された装置は、分子構造決定のために最も有効であると考えられている2次元NMR法、3次元NMR法、多核種NMR法、インバース測定法などの各種測定方法をすべて実行できます。また、この装置は極めて汎用性の高い測定機器ですから、溶液試料をつくることさえ可能ならば、生体高分子のみならず、ほとんどすべての有機・無機化合物の構造決定に利用できます。

本装置は現段階では調整中であり、本装置を用いて実際に測定したデータはわずかですから、本

稿で示すデータは文献や資料から転載したものです。

### 2. 装置の構成

今回導入された生体高分子構造解析装置の構成は以下の通りです。

- (1) 生体高分子測定装置 (500MHz フーリエ変換核磁気共鳴装置)  
独ブルカー社 AVANCE 500 S
- (2) 低分子量生体分子・薬物測定装置 (400MHz フーリエ変換核磁気共鳴装置)  
独ブルカー社 AVANCE 400 S
- (3) 生体高分子構造解析用計算システム  
株式会社LAシステムズ LA-3028型

生体高分子構造解析装置 (102号)

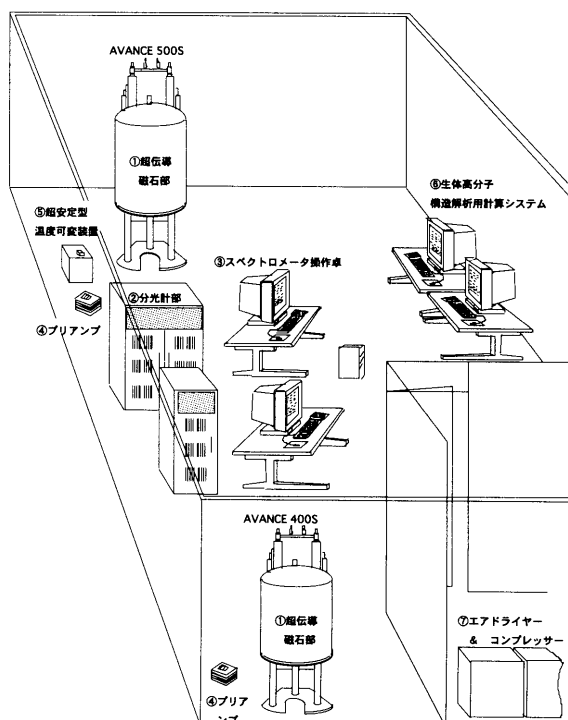
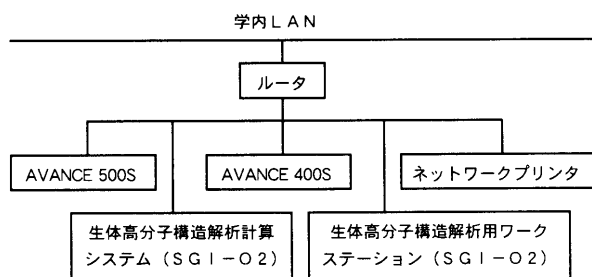


図1. 生体高分子構造解析装置の各構成機器の配置

### 3. 構成装置の性能の概要

生体高分子構造解析装置は2台の核磁気共鳴装置と2台のワークステーションをイーサネットにて接続し、ルーターを経由して学内LANに接続しています。したがって、学内LANに負担をかけずに構成機器間で大容量のデータのやりとりが可能です。生体高分子構造解析装置を構成する各装置は、いろいろなオプションを含むため、詳細については管理者に質問して下さい。以下に基本構成について概説します。



#### 3-1. 生体高分子測定装置

生体高分子測定装置は3核3次元測定が可能な超伝導核磁気共鳴装置で、各構成機器は次のような性能を有しています。

##### (A) 超伝導磁石部

液体ヘリウムで冷却した超伝導コイルによって高い磁場を発生させる装置です。この装置の中央に検出器であるプローブが挿入され、その中に測定試料がセットされます。磁場強度は11.7テスラで、プロトン ( $^1\text{H}$ ) 核の共鳴周波数で表しますと500MHzです。これまでの超伝導磁石は周辺に漏れる磁場強度が高いことが問題でした。例えば5ガウスの漏洩磁場があると、自動車、モノクロCRT、心臓ペースメーカー、神経刺激器及び生体刺激器などに悪影響を及ぼします。今回設置された超伝導磁石はセルフシールド型ですので、5ガウスラインは磁石のすぐ周辺の半径1 m30cm程度の狭い領域に下げられています。したがって心臓ペースメーカーを使っている人が建物周辺を通行しても安全です。

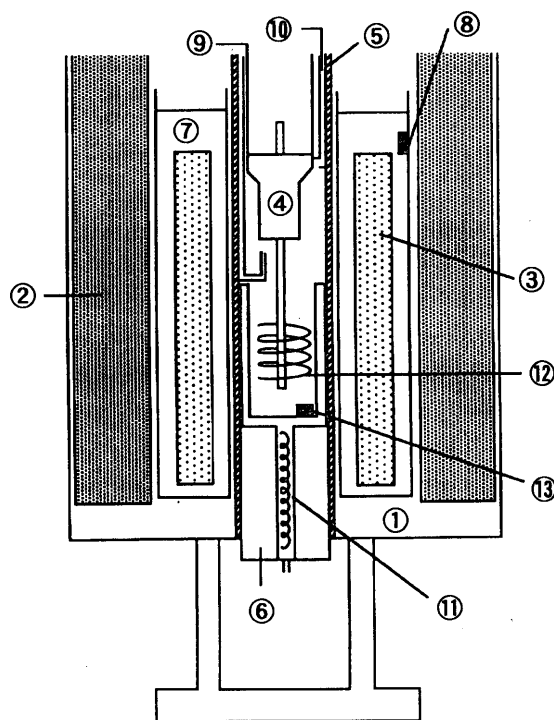


図2. 超伝導磁石断面図

##### (B) 分光計部

高周波の電磁波を発生させてプローブに送り、プローブから返って来る信号を処理する装置です。デジタルロック、シム、オーバーサンプリング、デジタルフィルターなどの測定器制御と信号処理の回路が組み込まれている核磁気共鳴装置の心臓に相当する部分です。

##### (C) プローブ

この装置は超伝導磁石の中に設置され、中央部分に測定試料が挿入されます。分光計から出た高周波の観測用電磁波とデカップリング用電磁波を試料に伝えるコイルが巻いてあり、試料中の核スピンから出る応答信号を受信する装置です。生体高分子測定装置には(a)多核測定用プローブ、(b)タンパク質測定用プローブ及び(c)核酸測定用プローブが付属しています。

##### (a) 多核測定用プローブ

$^1\text{H}$ 及び $^{15}\text{N}$ ~ $^{31}\text{P}$ 核測定用で、 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{31}\text{P}$ などの45種類の元素(核種では62種)の核の信号を直接観測することが原理的には可能です。グラジエントパルスの照射に

より溶媒などの不要な信号を消去できる多機能な汎用プローブです。

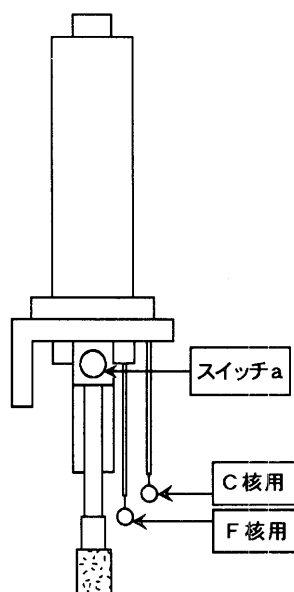


図3. プローブの概略図

(b) タンパク質測定用プローブ

タンパク質分子中の $^1\text{H}$ 核を観測核とし、 $^{13}\text{C}$ 核及び $^{15}\text{N}$ 核の照射によって核磁化の位相を変化させて3核3次元測定を行い、グラジェントパルスの照射によって不要な信号を消去する機能をもつプローブです。このプローブを使用すると水溶液中のタンパク質分子の核間距離の情報が得られます。

(c) 核酸測定用プローブ

核酸分子中の $^1\text{H}$ 核を観測核とし、 $^{13}\text{C}$ 核及び $^{31}\text{P}$ 核の照射によって核磁化の位相を変化させて3核3次元測定を行い、グラジェントパルスの照射によって不要な信号を消去する機能をもつプローブです。このプローブを使用すると、水溶液中の核酸分子や核酸-薬物複合体中の $^1\text{H}$ 核、 $^{13}\text{C}$ 核及び $^{31}\text{P}$ 核などの核間距離の情報が得られます。

(D) 超安定型温度可変装置

生体高分子の水溶液試料の温度が変化しますと、軽水( $\text{H}_2\text{O}$ )による強い信号の化学シフトが変化して、水信号のデカップリングや2次元測定で不要信号の除去が困難になります。水

分子による巨大な信号が消去できないと、もともと生体高分子の信号は微弱ですからノイズに隠れ観測が困難になります。したがって、生体高分子の測定には、試料温度の変動を長時間にわたって $0.01^\circ\text{C}$ 以内に制御する超安定型温度可変装置が不可欠となります。この装置の使用により、生体試料の良好なスペクトルの測定が可能となります。

3-2. 低分子量生体分子・薬物測定装置

低分子量生体分子・薬物測定装置は磁場強度9.4テスラの超伝導磁石を備えた核磁気共鳴装置で、 $^1\text{H}$ 核の共鳴周波数に直すと400MHzとなります。この磁石もセルフシールド型であり、5ガウスインは約1mとなっています。磁場の均一度を20軸のシムにより向上させています。プローブは $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{19}\text{F}$ 及び $^{31}\text{P}$ 核の直接観測とインバース測定が可能なるもので、2次元測定などの自動測定も可能です。

3-3. 生体高分子構造解析用計算システム

生体高分子構造解析用計算システムは、核磁気共鳴装置によって得られた1次元から3次元のスペクトルデータを解析し、半自動的アサインメントと構造計算を行ってタンパク質、核酸、糖質の生体高分子や低分子化合物の構造決定を行うシステムです。核磁気共鳴装置で得られた結果を計算化学的手法により検証することもできます。このシステムは、SGI社のO2ワークステーション2台で構成され、以下のソフトウェアが組み込まれています。

(E) Insight II

生体高分子の分子モデルを構築し、その3次元表示と回転・並進・拡大などの操作を行い、インターフェースを通してDiscoverなどの各種計算に移って実行するソフトウェアです。

(F) Biopolymer

3次元構造フラグメントライブラリーを備えていて、タンパク質、核酸、糖質の生体高分子の3次元構造を構築するソフトウェアです。

## (G) Discover

精度の高いポテンシャル関数を使用した分子力学計算と分子動力学計算を行うソフトウェアで、振動解析やエネルギー計算が可能です。

## (H) Affinity

生体高分子などの受容体と薬物などのリガンド分子のドッキングシミュレーションを行うソフトウェアです。

## (I) CFF

Discoverで生体高分子のモデルを組むときに必要な力場パラメーターです。

## (J) NMR Pipe/PIPP

NMR Pipeは核磁気共鳴装置で観測された多次元スペクトルのデータ処理を高速に行うプログラムです。PIPPはNMR Pipeを用いた処理で得られたスペクトルから信号の帰属を行う解析プログラムです。

## 4. 核磁気共鳴装置の原理

0ではない核スピンをもつ原子核を静磁場中におくと、核スピンに由来する磁気モーメントが磁場と相互作用して核スピン状態がエネルギー分裂を起こします。このエネルギー分裂はゼーマン分裂と呼ばれています。ゼーマン分裂のようすは核スピンによって異なります。たとえば、核スピン  $I = 1/2$  の核1個が磁場中に存在するとき、 $\alpha$  スピンと  $\beta$  スピンの2つのエネルギー準位が生じます。エネルギー分裂した核スピンが集団として存在する巨視的な系では、熱平衡時には個々の核はボルツマン分布則にしたがって  $\alpha$  スピンあるいは  $\beta$  スピンとなり、系全体でみると低エネルギーの  $\alpha$  スピンを占有する核の方がわずかに多数となります。このような系に外部から電磁波を当てると、電磁波のエネルギーとゼーマン分裂のエネルギー差が一致した場合にはエネルギーの吸収や放出が起こります。これが磁気共鳴という現象です。ボルツマン分布則によって  $\alpha$  スピンと  $\beta$  スピンの占有数に差があるため、系全体では正味のエネルギー吸収が起こります。このエネルギー吸収とそれに

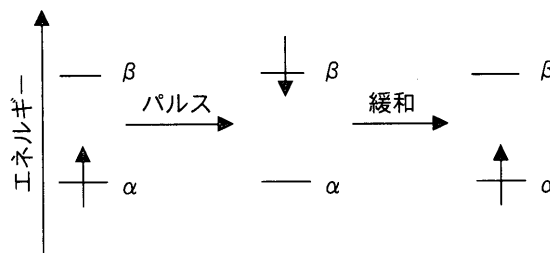


図4. 磁場中に置かれた  $I = 1/2$  の核のエネルギー分裂とスピンの占有の変化

続くエネルギー放出を電気的信号として取り出すとNMR信号が得られます。

実際の測定試料は核スピンの集団ですから、核磁気共鳴の現象を理解するためには、個々の核磁気モーメントのベクトル和をとった磁化ベクトルの挙動を考えるのが便利です。最近の核磁気共鳴装置では、試料に電磁場パルス照射してこの磁化ベクトルを任意の方向に倒し、その磁化ベクトルの時間応答を測定する方法がとられています。熱平衡には核スピン系の磁化ベクトルは静磁場方向を向いていますが、電磁場パルス照射すると磁化ベクトルは照射パルスの強度と長さの2つの条件で方向を変化させます。照射パルスがなくなった後には、磁化ベクトルは熱平衡状態である元の方向に戻ろうとする緩和現象を引き起こします。この過程で核スピン系の挙動を電気的信号として取り出すと自由減衰 (FID) 信号が得られます。このFID信号をフーリエ変換すると核磁気共鳴スペクトルとして示すことができます。核磁気共鳴スペクトルを解析すると有機化合物などの化学物質の分子構造を明らかにすることができます。

核磁気共鳴スペクトルは、一般に静磁場を高くすればするほど感度が上昇し、信号の分離もよくなります (分解能が高くなります)。核磁気共鳴装置の超伝導磁石は絶えず改良され続けていて、現在では18.79テスラ (187,900ガウス) もの高磁場が達成され、その超伝導磁石を備えた核磁気共鳴装置が既に市販されています。今回導入された核磁気共鳴装置には中程度の高磁場 (11.74テスラと9.4テスラ) の超伝導磁石が用いられています。測定する原子核の共鳴周波数は核によって異なり、磁場強度によっても変化します。水素核 ( $^1\text{H}$ , プロトン) を例にとると、11.74テスラの磁石の場合には共鳴周波数は500MHzですが、9.4

テスラの磁石では400MHzとなります。炭素核 ( $^{13}\text{C}$ ) の共鳴周波数は11.74テスラで125MHzですが、9.4テスラの磁石では100MHzです。

一方、パルスフーリエ変換法も絶えざる進歩が続いています。単純な1次元測定法から始まり、現在では多重パルスを試料に照射して核スピンの応答信号に化学シフト、スピンスピン結合、核オーバーハウザー効果などのさまざまな情報を盛り込み、コンピュータ処理によってこれらの有用な情報を引き出す2次元測定法や3次元測定法などの多次元測定法が考え出されています。多重パルスも次々と新しい高性能なものが考え出されています。

## 5. 核磁気共鳴スペクトルから得られる情報

### 5-1. 基本的な情報

次に、核磁気共鳴装置でどのような情報が得られるかという点を簡単な例についてご紹介いたします。磁場が決まり、測定核が決まるとおおよその共鳴周波数は400MHzとか500MHzというように核固有の値になりますが、その核の化学的環境によってその共鳴周波数が変わってきます。図5はエタノールの水素核についての核磁気共鳴スペクトルです。

メチル基 ( $\text{CH}_3$ )、メチレン基 ( $\text{CH}_2$ ) 及び水酸基 ( $\text{OH}$ ) というように、同じ水素核であっても原子団によって共鳴周波数が異なります。これは、原子核が受ける磁場は単に超伝導磁石の磁場ばかりではなく、分子中の電子によって引き起こされる局所磁場の影響も受けるからです。この局所場は核の周りの化学的環境を反映しており、メチル基であれば低周波数側に、メチレン基ならば相対的に高周波数側に信号を示します。このような化学的環境によって生じる共鳴周波数の変化を化学シフトと呼びます。

エタノールのメチル基とメチレン基の信号は、それぞれ3本及び4本に分裂しています。この分裂は、化学結合に関係する電子対を介して核スピンの相互作用があるために生じます。この相互作用はスピンスピン結合と呼ばれています。このスピンスピン結合を利用して2次元NMRの測定が可能になります。

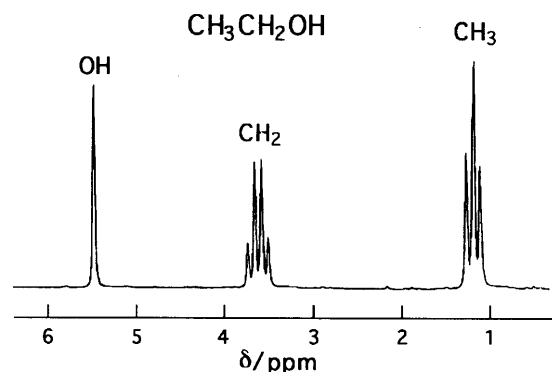


図5. エタノールの $^1\text{H}$  NMRスペクトル

核磁気共鳴スペクトルの測定を注意深く行うと、各信号の相対的な面積強度比から分子中の核の数を決定することができます。

### 5-2. 高度な測定方法から得られる情報

500MHzの生体高分子測定装置に付属する3本のプローブはグラジエントパルス照射用のコイルがついているので、この機能を使って溶媒などの不要な信号を消去することができます。この装置には、後で出てきますCOSY, NOESY, TOCSY, HMQC, HMBCなどの測定のためには、グラジエントパルスを用いた測定方法が標準プログラムとして用意されています。

#### (A) グラジエントパルスを用いた軽水信号の除去

生体高分子の核磁気共鳴スペクトルを生理的条件下で測定するためには、水溶液試料を用いなければなりません。しかし、アミノ基や水酸基などのプロトンは溶媒のプロトンと容易に交換するプロトンの信号は、通常用いられる重水 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) の溶液では、プロトン (水素核) が重水素核に交換するために検出できません。そこで、90%軽水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) と重水の混合溶媒に溶解した試料を用いますが、こんどは軽水の信号が余りにも強くて、目的とする生体高分子の信号が小さくて検出できなくなります。グラジエントパルスを用いるとこの問題を解決することができます。図6はリゾチームの90%軽水溶液の核磁気共鳴スペクトルですが、本来は観測困難な信号が十分な強度で観測されています。

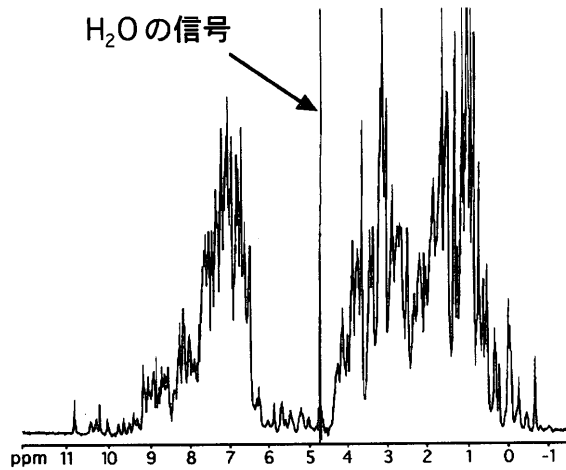


図6. グラジエントデレイ法による軽水除去を行った2mmolリゾチーム90%軽水溶液のプロトン核磁気共鳴スペクトル。

(A) DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer)

スピンスピン結合している水素核と炭素核の両方にパルス当てて両方の核の位相を変えますと、水素核のゼーマン準位の分布が変化するのに伴って炭素核のゼーマン準位の分布も変化する分極移動という現象が起こります。水素核に当てる3番目のパルスの長さを変えて磁化ベクトルをそれぞれ $45^\circ$ 、 $90^\circ$ 、 $135^\circ$ の3種類の角度に倒すことにより、 $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル上で一級炭素、二級炭素、あるいは三級炭素を区別することができます。

(B) COSY (correlation spectroscopy)

スピンスピン結合している核間に相関ピークを得る最も簡単な2次元NMR法です。水素核どうしの2次元NMRスペクトルからはプロトン間の結合の存在とスピンスピン結合している相手のプロトンを明らかにできますので、スペクトルの各信号の帰属とプロトン間のつながりを決定することができます。

(C) TOCSY (total correlation spectroscopy, homonuclear-Hartman-Hahn)

水素核どうしがスピンスピン結合している系で、パルス照射によってスピンロックという状態を実現させます。スピンロックしている間は、スピン間でエネルギーの交換が容易ですから、磁化

移動を有効に起こすことができます。このようにして相関ピークを出させると測定条件がよければ化学結合を5つ経由したプロトン間の相関ピークも検出可能となります。相関ピークの強度がスピンスピン結合の強さに対応しています。この測定で互いにスピンスピン結合しているプロトンを決定することができます。次のDQF-COSYの結果と組み合わせると隣の炭素に結合したプロトンの帰属ができます。

(D) DQF-COSY (double quantum filtered-COSY)

COSYのパルス系列にプロトンの $90^\circ$ パルスを付け加えた測定法で、二量子遷移を一量子遷移に変えて2次元スペクトルを観測します。COSYの場合には対角ピークが分散波形になって信号の重なりが大きくなり2次元スペクトルの信号分離が十分ではありませんが、この方法は対角ピークが吸収波形として観測される点が優れています。また、スピンスピン結合をしていないプロトンは二量子遷移に関係していませんので信号として観測されません。したがって、最も近い位置のスピンスピン結合の相関ピークのみ観測されることと溶媒である軽水信号の除去ができる点からも生体高分子の信号帰属に有用です。図7はDQF-COSYを用いた2次元スペクトルの一例です。

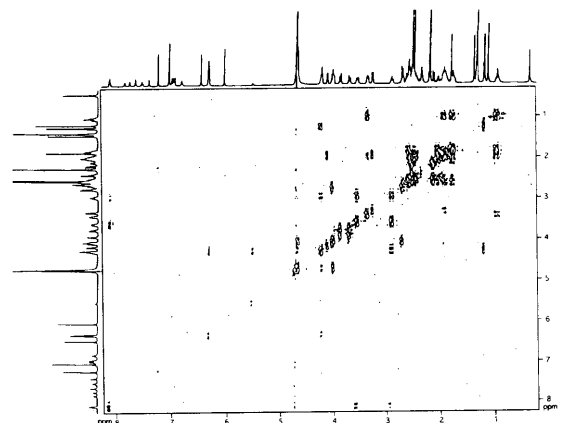


図7. グラジエントDQF-COSY法によるビタミンB<sub>12</sub>の90%水溶液の2次元核磁気共鳴スペクトル

(E) NOESY (nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy)

スペクトル中の特定の核の信号を飽和させ、こ

の核と空間的に近い核が双極子相互作用によって緩和現象を起こすと、核スピン準位がボルツマン分布から大きくずれた分布になって信号強度が増加あるいは減少する場合があります。このような信号強度の変化を核オーバーハウザー効果と呼び、この現象を2次元スペクトルとして取り出す方法がNOESYです。核どうしは化学結合でつながっている必要はなく空間的に2~5 Å程度であれば相関ピークを示します。核間距離が近い場合には信号強度が高く観測されます。

(F) ROESY (rotating frame Overhauser effect spectroscopy)

NOESYの信号の観測が困難な分子量1000~2000程度の化合物に対して用いられる方法で、スピンロックさせて2次元相関スペクトルを得る方法です。

(G) HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence)

インバース型のプローブで検出核をプロトンにして、直接スピンスピン結合している $^{13}\text{C}$ と $^1\text{H}$ の相関ピークを観測する測定方法です。

(H) HMBC (heteronuclear multiple bond coherence)

インバース型のプローブで検出核をプロトンにして、たくさんの結合を経由してスピンスピン結合している $^{13}\text{C}$ と $^1\text{H}$ の相関ピークを観測する測定方法です。

## 6. 利用上の注意

### (A) 試料管

試料管は通常市販されている製品で十分ですが、曲がった試料管でスピニングしますと、プローブ内のインサートガラスを破損する可能性があります。また、傷のついた試料管はプローブ内で破損して汚染する可能性がありますから試料調製前に試料管をよく観察して疑わしい試料管の使用は避けて下さい。良好なスペクトルを得るためには、AVANCE400Sで測定する場合には、WILMAD社製の528-PP-7 or -8を、AVANCE500Sには

535-PP-7 or -8 が適しています。

WILMAD社製の試料管の問い合わせ先：(株)フレックス" <flex@intercity.or.jp>

### (B) スピナーの取り扱い

スピナーが汚れていますとスピナーの回転モニターが正しく働かないばかりではなく、プローブの汚損につながります。試料挿入の時にはスピナーよりも上に出た試料管の上部を持ってプローブへの挿入作業を行って下さい。また、試料管を持ったときにスピナーがずり落ちる場合にはそのまま使いますと回転不良や試料管の破損を招くおそれがありますので、管理者に連絡して下さい。

### (C) 試料管のプローブへの挿入

試料管を超伝導磁石内にセットする前に、必ずプローブ内に試料管が挿入されていないことを確認して下さい。試料管の入ったプローブに、そのまま2本目の試料管を挿入しますと、試料管が破損してプローブ内を汚損します。最悪の場合にはプローブを新規購入する必要性が生じる可能性があります。

試料管をスピナーに取り付けるときには必ずサンプルゲージで高さを正しく調節して下さい。試料管位置を下げすぎますと (insert bottom line より下の場合)、試料管挿入時にコイル下部のセラミック部にぶつかって破損します。逆に上げ過ぎますとシム調整が順調に進まなくなります。

### (D) 有毒試料の試料調製

核磁気共鳴室は熱交換型換気扇で換気をしておりますが、有毒ガスが試料から発生しますと危険です。危険性の高い試料の場合には封管をした試料にして下さい。

### (E) 試料の温度変化

試料温度を上げて測定したい場合には、プローブに挿入する前に、実験室で希望の測定温度よりも数度上まで加熱し、安全性を確認してからプローブに挿入して下さい。試料の温度が上がりすぎますと試料溶液が沸騰し、キャップが外れ溶液がプローブ内にこぼれ落ちる危険性があります。試料

溶液の沸点を必ず確認して下さい。また、沸騰しない場合でも試料管内で溶液の対流が激しくなると気泡が生じることがあってシム調整が困難になります。

水溶液試料の場合には、0℃付近の試料温度に設定しますと、温度可変装置がいったん0℃以下にして、その後で0℃付近で安定な温度にする場合があります。水溶液試料が凝固すると体積膨張によって試料管が破損します。0℃以下で破損しない試料で温度を安定させ、その後で目的の水溶液試料の試料管をプローブに挿入した方が安全です。

#### (F) 測定終了時のデカップラーや温度可変装置の出力

測定が終了した段階で、必ずデカップラーや温度可変装置の出力が出ていないことを確認して下さい。プローブ交換などの作業をするときの障害になります。

#### (G) 新しいパルスシーケンスの利用

この装置を用いる測定方法は絶えず改良が続いていて、日進月歩で新しいパルスシーケンスが考案されています。しかし、あまりにも強いパルスを照射しますと、プローブ内で放電が起こりコイルの焼き付きなどの故障の原因となります。装置の標準プログラム以外のパルスシーケンスを用い

る実験を行う人は必ず管理者と相談した上でそのパルスシーケンスを利用して下さい。

#### 7. おわりに

核磁気共鳴装置は汎用性の高い装置ですから、できるだけ多くの研究者に利用していただきたいと思っております。操作方法も簡易測定法から高度な測定方法まであらゆる実験が可能ですが、極めて敏感な装置ですから利用にはそれ相応の訓練を受ける必要があります。装置の据付が完了した段階で講習会を開く予定です。集団で行う講習会では不十分な方は、日本ブルカー社のつくば本社で開かれる講習会の受講をお勧めいたします。次のサイト ([http://www.bruker.co.jp/appli\\_train.html](http://www.bruker.co.jp/appli_train.html)) で講習会の日程が確認できます。近日行われる初級コースは1999年4月23日と6月25日に開かれます。無料の講習は管理者が利用する予定ですので、1日1万円の受講料が必要です。ひとたび使用方法に慣れれば、装置のソフトウェアは安定していますので楽に測定できるはずです。できるだけ早急に使用方法を修得し、この生体高分子構造解析装置が学内共同利用設備として活用されることを願っております。

#### 引用文献

日本ブルカー株式会社「NMR オペレーションマニュアル」(1997)