

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06533

研究課題名（和文）選択励起パルスを用いる高感度多次元NMR測定法の開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of multi-dimensional sensitive NMR measurements using selective pulses

研究代表者

葛西 卓磨（KASAI, Takuma）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専門技術員

研究者番号：70446516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：核磁気共鳴(NMR)法によりタンパク質等の分子を解析する際、大きな分子の測定は磁化が速く減衰してしまうことで困難であった。本研究は、周波数の範囲を選んで磁化を制御する選択励起パルスの活用により、この問題の解決を目指すものである。研究期間には、主に、この目的のための要素技術として、これまでに測定されたデータの情報を活用し、次にどのような設定で測定をおこなえばより多くの情報を得られるかを自律的に決定する適応的測定法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、主に、過去の測定データから現時点で持っている情報を分析し、「次の測定をどのような条件でおこなえばより多くの情報が得られる可能性が高まるか」を統計学的に分析する実験計画の手法を開発し、核磁気共鳴(NMR)法に適用した。複雑な結果を返す測定に対して、統計的に最も有意義な測定条件を人力で決めるのは容易ではなく、このような手法は科学・産業におけるさまざまな測定に活用できる。

研究成果の概要（英文）：In general, it is difficult to measure large molecules by NMR due to fast relaxation of magnetizations. This research aims improvement of sensitivities in such cases using band selective excitation pulses. In this research period, I developed an autonomous adaptive experimental design as an underlying technology for this purpose. It automatically determines next experimental conditions to extract large expected information content depending on the past measurements.

研究分野：構造生物学

キーワード：核磁気共鳴法 選択励起パルス タンパク質 ベイズ推定 マルコフ連鎖モンテカルロ法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴 (NMR) 法は、高磁場中に置かれた試料内の原子核を電磁波で励起して巨視的な磁化を作成し、適切な電磁波パルスとそれらの間の待ち時間により、他の原子核との相関や原子核が感じる化学的環境を反映する共鳴周波数 (化学シフト) の情報を磁化に載せ、最終的に磁化の時間発展をコイルで読み出すことにより、原子・分子の情報を得る測定手法である。タンパク質など生体分子の解析にも広く使われているが、高分子量の場合ほど、磁化の緩和時間が短く、情報を載せるために必要な待ち時間の間に減衰してしまって感度が低下する問題があった。

2. 研究の目的

化学シフトで信号を分離する多次元 NMR 測定においては、磁化の時間発展を観測してフーリエ変換により直接シグナルの共鳴周波数を得られる直接観測軸と呼ばれる 1 つの次元以外のすべての次元は、間接観測軸と呼ばれ、パルスシーケンス中の待ち時間を変えた複数のデータをフーリエ変換することによって共鳴周波数を得る。この間接観測軸の共鳴周波数を得るための待ち時間を短縮するため、フーリエ変換以外の方法で共鳴周波数に関する情報を得るのが本研究の目的である。この方法は、高分子量などに由来する速い緩和に対応するために開発されてきたさまざまな NMR 手法と組み合わせ、相加的な効果が得られると期待される。本研究期間においては、この目的に必要な要素技術を開発することを目指した。

3. 研究の方法

選択励起パルスによって周波数特異的に磁化を反転等して周波数に関する情報を得る手法として、Hadamard NMR が知られている [1]。この手法では、分離すべきシグナルの位置やその共鳴周波数について、ある程度の事前知識が必要である。とはいえ、間接観測軸方向にどのようなシグナル分布であっても対応すべきとなれば、共鳴周波数がわずかでも異なれば違う励起プロファイルとなるような多数の選択励起パルスの組み合わせを用意せざるを得ず、実験数が増え、かつ、わずかな励起プロファイルの差異を弁別しなければならなくなり、感度の問題も生じる。そのため、ある時点までに得られた実験データをもとに、今後どのような設定で測定をおこなわなければならないか、また、どのような設定の測定は不要であるかを考え、自律的かつ適応的に次の測定の設定を決定する実験計画法はこのような手法において極めて重要な要素技術のひとつである。そもそも感度に問題のある系に対処したいという経緯より、高 S/N 比のデータが得られる状況以外をも想定すべきであるから、決定論的な判断と実験計画ではなく、確率論的に推論をおこなうべきであり、ベイズ統計の意味で最適な実験条件を選ぶことが望ましい。

Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) 法は、平衡にある分子の化学状態のうち、直接観測できない程度少ない状態 (マイナー状態) に関する情報を、多い状態 (メジャー状態) のシグナルを通じて観測できる手法のひとつである (図 1)。タンパク質においても、 ^{15}N -CEST などの形でアミノ酸残基ごとの情報を得る形をはじめ、広く使われている。この方法では、マイナー状態の化学シフトに相当する共鳴周波数の摂動パルスを与えた場合にのみメジャー状態のシグナルが変化することから、マイナー状態の共鳴周波数を事前に知らない状況では、さまざまな共鳴周波数の摂動パルスを多く試すということが一般的である。このため、高濃度のタンパク質試料を用い、1 回の測定で十分な感度が得られることを前提としている。低濃度の試料からでも情報を得られるようにするには、マイナー状態の情報が得られることが期待される測定条件を繰り返し選んで測定することが必要であり、マイナー状態の共鳴周波数が事前にわからない以上、

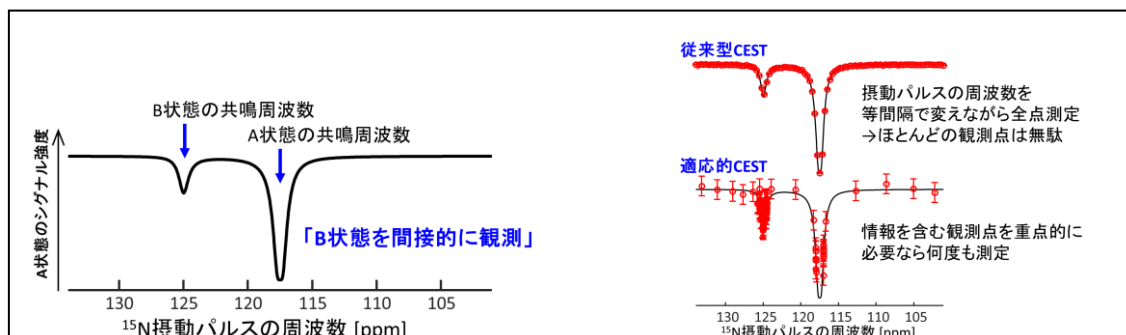


図 1 ^{15}N -CEST における適応的測定法。左: ^{15}N -CEST の説明。摂動パルスの周波数を変えてメジャー状態 (A 状態) を観測すると、マイナー状態 (B 状態) の共鳴周波数において A 状態のシグナル強度への影響がみられる。このカーブを理論式にフィットすると、B 状態の化学シフト・割合・緩和速度などのパラメータが得られる。右: 従来型 CEST 測定と適応的 CEST 測定の違い。適応的測定では、情報量が多い観測点を繰り返し測定することで感度の問題を緩和する。

これは、ある時点までに得られた実験データをもとに次の実験条件を決める自律的・適応的な実験計画の問題となり、本法が必要としている要素技術と同じである (図 1)。なお、1 回の測定で十分な感度を得られることを前提に、狭い帯域への摂動パルスではなく周波数依存的に異なる励起プロファイルを示す摂動パルスを用いることで測定数を削減する CEST の手法が提案されている [2][3] が、適応的測定は、感度が低い場合に、これらの手法と組み合わせて、こうした特殊なパルスと従来型の狭い帯域へのパルスのどちらがよいかを選ぶ用途にも用いることができると考えられる。そこで、タンパク質の ^{15}N -CEST を題材に、適応的測定法を開発することとした。

4. 研究成果

(1) 理論

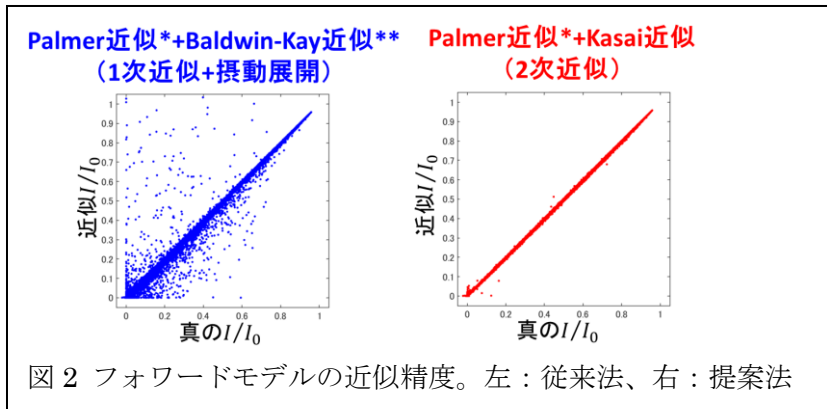
^{15}N -CEST によってアミノ酸残基ごとに得られる情報は、B 状態 (マイナー状態) の割合 p_B 、A 状態 (メジャー状態) と B 状態の交換速度 k_{ex} 、B 状態の化学シフト ω_B 、(A 状態と B 状態で同一と仮定する) 縦緩和速度 R_1 、A 状態の横緩和速度 R_{2A} 、B 状態の横緩和速度 R_{2B} である。CEST 測定では通常、摂動パルスなしの強度 I_0 を 1 回のみ測定し、摂動パルスありで観測された強度 I との比 I/I_0 を解析することが多い。感度が良い場合はそれでよいが、 I だけでなく I_0 にも一定の観測ノイズ (感度が低い場合には熱ノイズが優位と考えられる) が加わることを考えると、ベイズ推定としては、 I の観測値 $\cdot I_0$ の観測値双方から直接尤度を計算し、適応的測定としては必要があれば I_0 に関する情報も複数回の測定から積極的に得ることが必要である。そうすると、アミノ酸残基あたりの未知パラメータ数は 7 であり、アミノ酸総数を K とすると、 $7K$ 次元のパラメータ空間における推定の問題となる。

パラメータの推定精度を高めるために情報学的にどのような実験条件を選ぶべきかは多くの研究がある。過去の情報を参考に適応的に実験計画をおこなうなら、実験の繰り返し単位 1 回ごとに、現時点で得られているデータをすべて用いて、1 回分だけ実験を加えたとしたときに最も良いものを選ぶ、という作業を繰り返す、逐次法が理論的にシンプルで、かつ、計算しやすい。繰り返した場合の最適性についても一定の条件のもと検証されている。ベイズ推定の文脈では、実験の繰り返し単位 1 回ごとに、パラメータの事後確率分布を求め、これを事前確率として次の 1 回の実験を考える。次の 1 回の実験で増える情報量の指標として、カルバック-ライブラー (KL) 情報量を用いることとした。次の実験はまだおこなっていないので、KL 情報量の期待値をとる。期待値の計算のため、次の実験の観測値を予想しなければならないが、これは、事前分布から予想ができる。すると、この期待値は、次の実験の観測値の確率分布と、パラメータの事前分布の相互情報量となる [4]。この相互情報量をもっとも大きくなる実験条件を選べばよいということになる。

具体的な計算としては、パラメータの確率分布の推定にマルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) 法を用いる。MCMC サンプルがパラメータの確率分布を近似するとともに、各サンプルに、パラメータから観測値を求める理論式 (フォワードモデル) を適用すると、観測値の分布の推定にも用いることができる。なお、NMR の測定対象となるタンパク質においては K は数百程度にもものぼると考えておいたほうが良く、そのような高次元空間から効率的にサンプルすることは困難である。タンパク質は、その化学構造から、アミノ酸残基ごとにパラメータ間の相関がある場合が多い。特に、 p_B や k_{ex} はドメイン内で一定であることも多い。しかし、CEST においては、まず保守的に、相関がないと仮定して解析し、一定であると判断できた後にその仮定のもと再解析することも多い。適応的測定においては、実験設計の段階では、相関がないと保守的に仮定しておくことが重要であろう (相関があるとの思い込みのもと実験計画すると、相関が低いことを示す情報を得ることを軽視することになり、危険である)。この仮定のもとでは、タンパク質全体の相互情報量は各残基の相互情報量の和となる。 $7K$ 次元パラメータ空間の探索ではなく、 7 次元パラメータ空間の探索を K 回おこなって結果として得られる相互情報量を足し合わせればよく、実用的な時間でサンプリングが可能である。

(2) 近似法の開発

毎回の繰り返し単位後の MCMC によるベイズ推定および、相互情報量の計算において、パラメータから観測値を求めるフォワードモデルの計算が繰り返される。CEST の理論式としては、化学交換のある系における磁化の時間発展を直接モデリングする微分方程式である Bloch-McConnell 方程式が知られており、CEST の解析においては、この式もしくは近似式にフィッティングすることが一般的である。すべての NMR 測定が終わってから時間をかけて解析してよく、また、パラメータの確率分布を求めるのではなく局所最適解のみを求めればよいのであれば、フォワードモデル 1 回の計算量は大きな問題ではなく、Bloch-McConnell 方程式の数値積分でも十分であるが、NMR 測定の繰り返しの合間に計算をおこなう適応的測定で、かつ、確率分布を得るために MCMC をおこなうとなれば、フォワードモデルの計算負荷は小さい必要があり、Bloch-McConnell 方程式の積分による求解は現実的でない。計算の軽い近似式はこれまでも知られていたが、パラメータ空間全体に対する近似能力は高くなく、本法の目的のためにはより精度の高い近似計算が必要であった。Bloch-McConnell 方程式の緩和行列の固有値を近似的に求める手法を改良し、従来法 [5][6] が一次近似に摂動項を加えていたのに対して二次近似とすることで、近似精度と計算時間を両立することに成功した (図 2)。



(3)実装

適応的 NMR 測定のために必要なプログラムを作成した。NMR 測定において、測定したデータに応じて外部から次の測定パラメータを指定して自動で測定を繰り返すことは通常想定されており、その仕組みを新たに作成する必要があった。具体的には、Bruker 社製の NMR 装置と同社の NMR 制御ソフトウェア TopSpin を用いたが、TopSpin にはユーザーが作成した C 言語のプログラムを実行する機能があるので、この機能を用いて、ファイルからパラメータを読み出して自動的に実験を開始するプログラムを作成して動作させた。一方、NMR 制御用 PC とは別に計算用のワークステーションを用意し、NMR 制御用 PC に SSH 接続した。計算用ワークステーションでは、自作の MATLAB プログラム上で、制御用 PC から測定データをダウンロードし、MCMC や相互情報量の計算をおこない、次の測定条件を算出して、制御用 PC にパラメータが書かれたファイルをアップロードする仕組みとした。

(4)シミュレーション

70 個のシグナルを生じさせる仮想的なタンパク質の CEST データをシミュレーションによって生成することで、本法の性能を試験した。図 3 は、各残基について推定する 7 パラメータのうち、本質的な興味の対象ではないが方法論の都合上推定する I_0 を除く 6 パラメータについて、192 回の繰り返し単位が終わった後の事後確率分布を信用区間で示したものである。仮想的なタンパク質であるので、各パラメータの真値は判明している。従来型 CEST に比べ、適応的 CEST において、全体として信用区間が狭くなっていること、その信用区間が真値を含んでいることから、本法が成功し、従来型 CEST の成績を上回っていることがわかる。 R_1 は B 状態に依存しないパラメータであるにも関わらず、適応的 CEST のほうで推定精度がよいのは、適応的 CEST による実験データは I_0 を得るための測定を多く含んでおり、よりよく I_0 を推定できているためと思われる。また、適応的 CEST では、従来型 CEST に比べ、 R_{2B} の下限値をよく推定できているのも特長である。

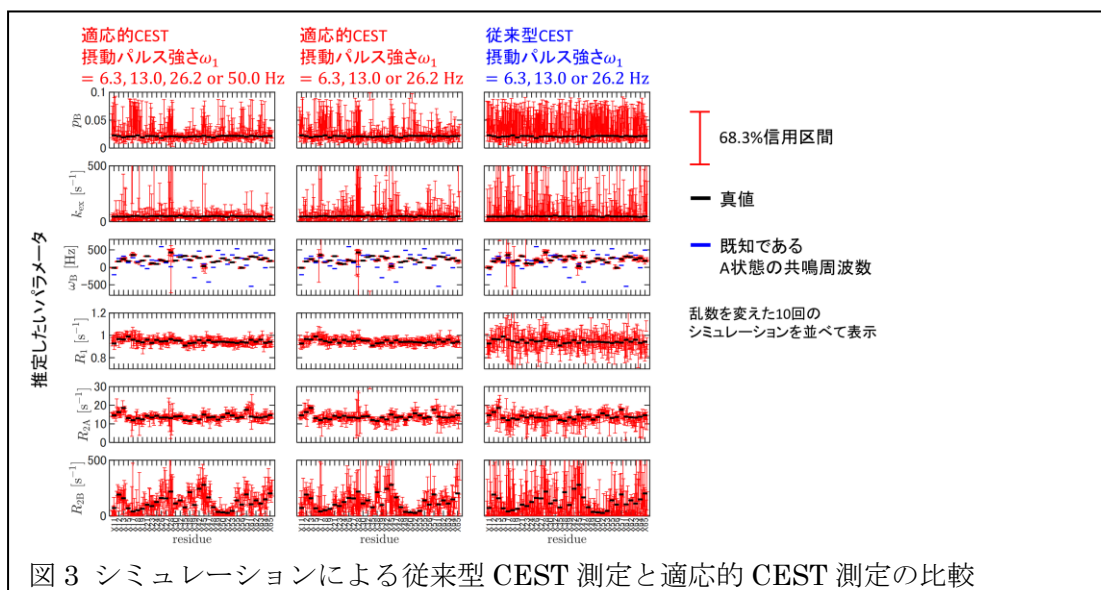
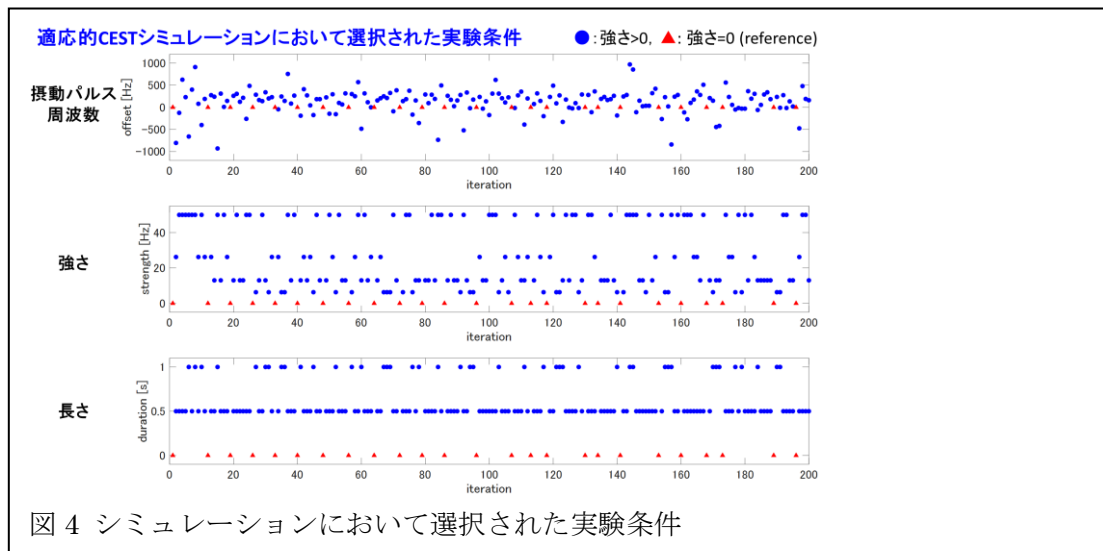


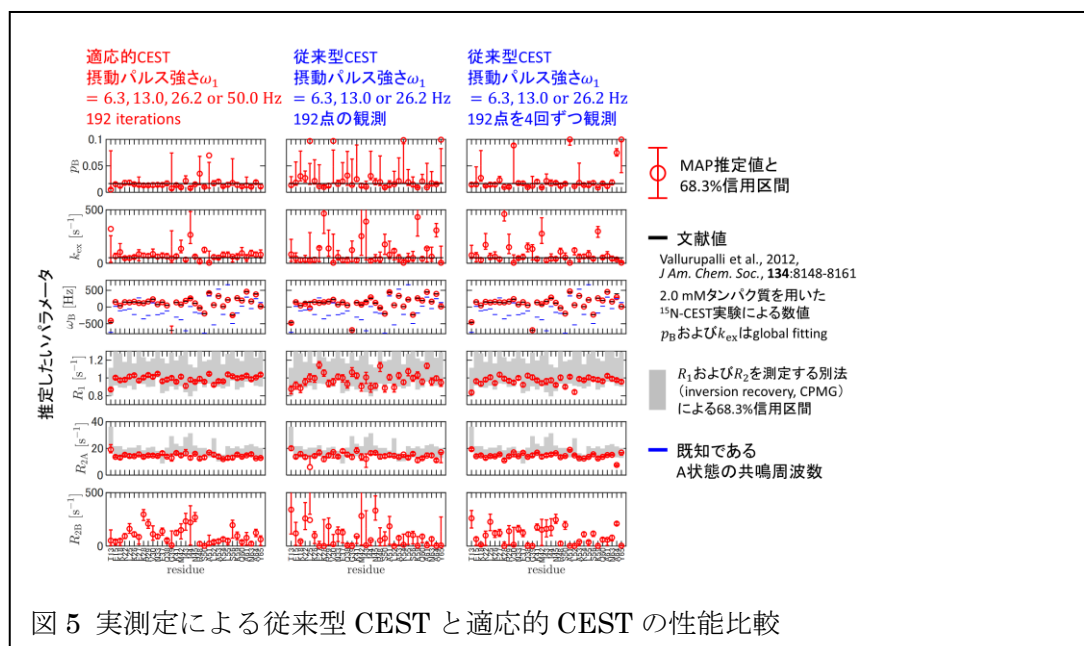
図 4 は、このシミュレーションにおいて選択された実験条件である。最初の 10~20 iterations 程度は、強い摂動パルスをもろもろな周波数で打つことで B 状態の共鳴周波数を探っていると解釈できる。その後は、強いパルスによって広い範囲の情報を得ることと、弱いパルスによって狭い範囲の情報を得ることを組み合わせ、その時点で最適な情報取得をおこなっていると考えられる。まず B 状態の共鳴周波数を探り、そののちにその情報を使ってより詳細な分析のための



測定をおこなうことは、今回計算機がアルゴリズムに従ってとった戦略のうち、自然な戦略として人間にも理解可能な部分であると言えよう。

(5) 実際の測定での性能検証

マイナー状態が存在することが知られている HYP A/FBP11 タンパク質 FF ドメイン A39G 変異体を用いて 0.1mM という通常の CEST 測定よりも低濃度で適応的 CEST 測定をおこない、同じ濃度でおこなった従来型 CEST 測定と比較して性能を検証した(図 5)。従来型 CEST よりも適応的 CEST のほうがパラメータ推定精度がよいこと、 R_1 や R_{2B} の精度についてシミュレーションと同様の傾向であり、本法の優位性が実測定でも検証できた。



<引用文献>

- ① E. Kupče, R. Freeman, J. Magn. Reson., 2003, 162(2):300-310.
- ② M. Leninger et al., J. Biomol. NMR., 2018, 71(1):19-30.
- ③ T. Yuwen et al., J. Magn. Reson., 2018, 292:1-7.
- ④ K. Chaloner, I. Verdinelli, Stat. Sci., 1995, 10(3):273-304.
- ⑤ O. Trott, A. G. Palmer, J. Magn. Reson., 2002, 154(1):157-160.
- ⑥ A. J. Baldwin, L. E. Kay., J. Biomol. NMR. 2013, 55(2):211-218.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ikari Masaomi, Yagi Hiromasa, Kasai Takuma, Inomata Kohsuke, Ito Masahiro, Higuchi Kae, Matsuda Natsuko, Ito Yutaka, Kigawa Takanori | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Direct Observation of Membrane-Associated H-Ras in the Native Cellular Environment by In-Cell ^{<sup>19</sup>F-NMR Spectroscopy} | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 JACS Au | 6. 最初と最後の頁 1658 ~ 1669 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacsau.3c00108 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hiromasa Yagi, Takuma Kasai, Elisa Rioual, Teppei Ikeya, Takanori Kigawa | 4. 巻 118 |
| 2. 論文標題 Molecular mechanism of glycolytic flux control intrinsic to human phosphoglycerate kinase | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America | 6. 最初と最後の頁 e2112986118 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2112986118 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 葛西卓磨 | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 符号化標識法とテンソル分解を活用した重複NMRシグナルの分離と情報取得 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 NMRによる有機材料分析とその試料前処理、データ解釈 | 6. 最初と最後の頁 614-623 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 葛西卓磨、木川隆則 | 4. 巻 75(6) |
| 2. 論文標題 タンパク質の構造や動きを解析するSiPex法 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 化学 | 6. 最初と最後の頁 32-36 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 葛西卓磨 |
| 2. 発表標題 NMRにおけるデータ点フィッティングとベイズ推定 |
| 3. 学会等名 第23回若手NMR研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 葛西卓磨、木川隆則 |
| 2. 発表標題 測定中にパラメータを自律的に選択することで高精度を目指す適応的NMR測定法 |
| 3. 学会等名 第61回NMR討論会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 葛西卓磨 |
| 2. 発表標題 観測データにもとづき実験条件を自律的に選択する適応的NMR測定法 |
| 3. 学会等名 先端研究設備プラットフォームプログラム「データ駆動型・AI駆動型研究推進のための統合環境ワークショップ」（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takuma Kasai, Takanori Kigawa |
| 2. 発表標題 In-measurement T1 estimation for adaptive optimization of the excitation angles and the recycling delays to improve NMR sensitivity |
| 3. 学会等名 ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST2021（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|