

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 18 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23710273

研究課題名(和文) 相互作用解析による創薬スクリーニングのための微量試料用差検出NMRプローブの開発

研究課題名(英文) NMR difference spectroscopy using microcoils for high-throughput screening in drug discovery

研究代表者

高橋 雅人(Takahashi, Masato)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・上級研究員

研究者番号：60392015

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)：本研究の目的は二つの微量試料の差スペクトルを高感度にNMRで測定することである。NMR以外の分光法ではハードウェア的に差スペクトルをとることが広く行われている。たとえば基準セルを使う分光光度計などである。これにより変化したスペクトル成分だけを鋭敏に取得できる。しかし、NMR法においてはこれまで行われて来なかった。これは差スペクトルを得ることがNMRでは磁場の均一度などに依存しており難しかったためである。本研究では、この問題に着目し、差スペクトルを得るために必要な磁場均一度を試料空間中に得る方法を考案した。

研究成果の概要(英文)：The method for NMR difference spectroscopy using microcoils has been investigated. Other spectroscopy offers difference spectroscopy to acquire high signal-noise ratio spectra. However, NMR, suffered from its lowest sensitivity at any time, didn't use difference spectroscopy, because NMR spectra are strongly affected by the homogeneity of a magnetic field. Microcoil NMR is better method to acquire good NMR signals from the small amount of samples. It offers very high signal-noise ratio per sample mass and is very effective for an application using precious samples such as Fragment-Based Drug Discovery. These two methods are combined and the problem of field homogeneity mentioned above was solved in this project.

研究分野：NMR装置開発

キーワード：マイクロコイルNMR 差スペクトル 磁場均一度

1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロコイル NMR

NMR は有用な分析機器であるが、他の分析方法に比べ感度が低いという問題がある。また、近年、高価な安定同位体を使う、微量しか入手できないなどの理由で、微量試料の測定に対する需要も高まっている。そこで、5mm の試料管 (約 220 μ l) ではなく、試料の量にあわせて NMR 信号の検出コイルを小型化する手法が行われるようになってきた (マイクロコイル NMR)。マイクロコイル NMR は検出コイルを試料の量にあわせて小型化することで、コイルと試料の距離が近づきフィリングファクターも大きくなる。このため、試料の単位質量当たりの感度で考えると劇的 (10 倍から 100 倍) に向上する。

(2) NMR の差スペクトル

二つの NMR スペクトルの差をとる方法は、様々な形で広く行われている。たとえば、差 NOE やタンパク質-リガンドの分子間相互作用解析などである。通常、一つの試料で条件を変えて測定を行い差をとるか (差 NOE) か、二つの試料をそれぞれ NMR 測定を行い差をとるかである。これらは、取得した NMR スペクトルをコンピュータ上でソフトウェア的に差をとることで実現している。そのため、非常に大きな信号に埋もれたわずかな差を見ることがになる。

(3) NMR 差スペクトル検出プローブ

差スペクトル分の NMR 信号だけをハードウェア的に検出可能な方法として、二つの NMR 信号が互いに打ち消し合わせる方法がある。これにより、従来の手法にくらべてアナログ信号の段階で信号を大きく増幅でき、それをアナログ-デジタル変換でコンピュータに取り込むことができる。たとえば、水などの溶媒信号は最初から除去されることになり、水消しのパルスシーケンスは不必要になるほか、そのような強い信号にあわせて設定した検出感度 (レシーバゲイン) をより高感度に行うことができる。そのため、従来よりも微量の試料での測定が可能である。Daniel Raftery のグループはスイッチングダイオードをマイクロコイル近傍で用いることで、核磁化励起時には二つのコイルが並列に接続、観測時には二つのコイルが直列に接続されるプローブを開発している。二つのコイルの NMR 信号の位相が 180 度異なるため、差スペクトルをハードウェア的に得ることができる。しかし、以下のような問題がある。差スペクトルを得る二つのコイルの相対的な信号強度を調整する手段がない。そのため、差スペクトルが完全に打ち消しあうまでは調整できず、最大で 96% までしか除去できない。

2. 研究の目的

(1) 溶液用マイクロコイル NMR は微量試料

の測定に有用であるが、試料空間が小さいために室温シムでは磁場均一度調整を行うことができない。そのため、マイクロコイル近傍の素材の磁化率が重要である。また、使用する素材はテフロンなど水素を含まない素材に限定される。水素を含まない液体を使う方法もあるが揮発性があるため、安定した運用が難しい。これらのことを考慮して、マイクロコイル NMR に適した素材や構造を検討する。

(2) 二つの流路に 1 μ リットル以下の微量試料測定用の NMR マイクロコイルがそれぞれ取り付けられ、二つの微量試料の差スペクトルを高感度に測定する NMR プローブを開発し、医薬品開発標的タンパク質と化合物の分子間相互作用解析 (特に解離定数が mM から μ M の弱い相互作用) に有用かを調べる。

3. 研究の方法

(1) 二つの NMR スペクトルの差をとるため、二つのマイクロコイルが同じ磁場強度中に存在し高分解能であることが重要になる。これを実現するために、マイクロコイル NMR プローブを構成する部材において、水素を含まない素材による磁化率調整の手法を検討する。

(2) (1) で得られた知見をもとにフロー型のマイクロコイル NMR プローブを開発する。二つの測定試料について差スペクトルを測定する。標的タンパク質と化合物の分子間相互作用解析に使用できるかを調べる。

4. 研究成果

(1) 微小試料周囲の素材の磁化率が、マイクロコイル NMR のスペクトルにどのような影響を与えるかを調べた。良好な差スペクトル測定を行うことができるようにするために、サンプル空間内の磁場が均一になることが重要である。つまり、微小な溶液試料そのものとそれを保持している容器、周囲の素材の磁化率が近い値である必要がある。従来からの溶液 NMR では、シムコイル (超伝導シム、室温シム) などの電磁石により磁場を均一に調整することが可能である。しかし、マイクロコイル NMR では、測定試料が微小であるため、従来からの室温シムなどは機能しない (室温シムを大きく変化させても、共鳴周波数が変化するだけで、線形は変化しない)。したがって、NMR スペクトルの線形を周辺物質の磁化率だけでどこまで調整できるかを調べる必要がある。

(2) 周辺物質の磁化率が NMR スペクトルに与える影響を調べるために、テフロンチューブに測定試料として純水 (メルクミリポア社、Milli-Q Advantage) を充てんしたサンプルチューブを用意した。その周囲にマイクロコイルとして直径 0.1mm のテフロン被覆の銅

線を巻き共振回路を接続した。さらにその周囲に体積磁化率を0から -9.8×10^{-6} の間に調整した磁化率調整用グリスを塗布し、NMR測定を行った。磁化率調整用グリスはテフロングリス(体積磁化率 $= -7.26 \times 10^{-6}$ 、ダイキン工業社)に塩化リチウムと酸化チタン粉末を均一に混ぜ、それぞれ磁化率を0、 -5×10^{-6} 、 -6×10^{-6} 、 -7×10^{-6} 、 -7.26×10^{-6} 、 -7.85×10^{-6} 、 -8.5×10^{-6} 、 -9.15×10^{-6} になるように調整した。

(3)NMR測定を行い、そこで得られた半値幅と磁化率との関係を図1に示す。磁化率を -7×10^{-6} に調整したときがもっとも半値幅が小さくなったものの、溶液NMRを行うには不十分な結果であった。この理由として、使用したテフロンチューブとマイクロコイルに用いた銅線の磁化率が測定試料の磁化率と合っていない点と測定試料ごとに緻密な磁化率調整が必要になってしまう点が考えられる。また、試料の充てん方法によって結果にばらつきが発生した。これは、測定試料の溶存酸素量や純水を精製する装置のフィルタの汚れ具合によっても測定試料自体の磁化率が変化してしまうからと考えている。このため、周囲の素材の磁化率をどの値を中心に調整するかも重要な要素であることがわかった。

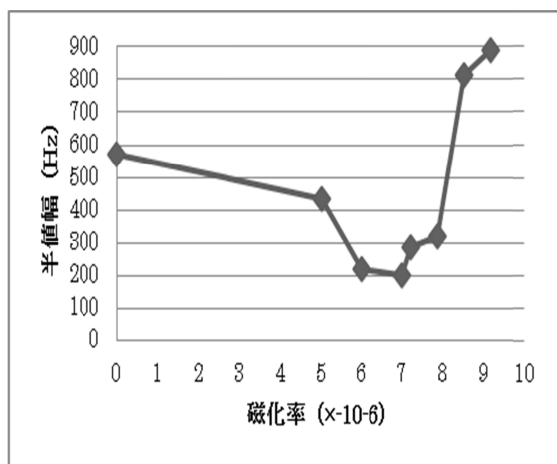


図1 磁化率調整充てん剤と半値幅の関係

(4)上記の結果を踏まえ、マイクロコイル用の銅線の影響を除去するために、銅コイルがない状態での磁化率調整を試みた。テフロンチューブなど銅コイル以外の部品を溶液用NMRの5mm管に収め、通常の溶液用NMRプローブの測定試料と同様に扱えるようにした。そのうえで、通常の溶液用NMRプローブを用意して、そのプローブから励起パルスを送信し、NMR信号もそちらから受信する。これにより、マイクロコイルがなくても測定試料からNMR信号を取得できる。この信号を解析すれば、微小試料における磁場の均一度を評価可能である。

(5)これまでの経験から、純水の磁化率はばらつきが大きいことがわかったため、測定の

基準試料として重水(99.9%、和光純薬工業(株))を用いた。NMRスペクトルの線形を確認するために測定試料には、重水にわずかにエタノール(99.5%、HPLC用、和光純薬工業(株))を添加したものとし、エタノールのNMRスペクトルで磁場の均一度を確認する。テフロンチューブの周囲は、(3)で用いた磁化率調整用グリスを用いて充てんした。この方法により得られたNMRスペクトルを図2に示す。このうちエタノールのピーク部分を拡大したものを図3に示す。半値幅は、おおよそ3 HzでありマイクロコイルNMRとして十分な性能が得られている。

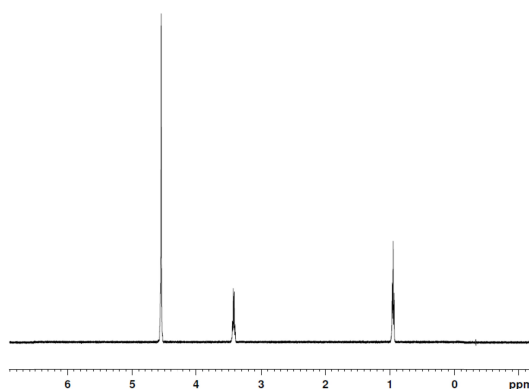


図2 テフロンチューブ内試料のNMRスペクトル

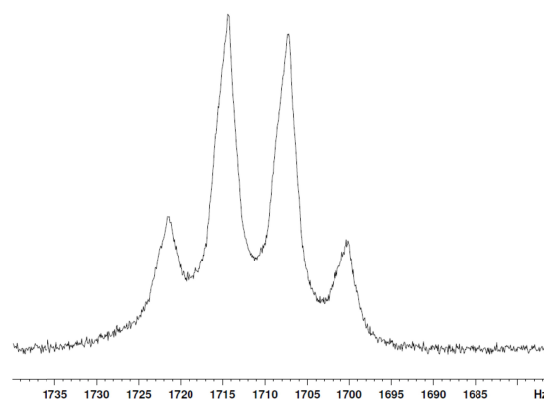


図3 テフロンチューブ内試料に含まれるエタノールのNMRスペクトル

(6)上記の(3)の結果と(5)の結果から、以下のことが考察できる。ひとつは、マイクロコイルに用いた銅線の磁化率が異なることによる影響である。銅の体積磁化率は -9.8×10^{-6} であるが、これが周囲の磁化率と一致していない可能性がある。もうひとつは、磁化率調整用グリスの粘性が高いために、銅線とテフロンチューブの間などの小さな隙間に磁化率調整用グリスが侵入していない可能性がある。侵入していない場合、磁化率0の空間が試料近傍に発生してしまうため、磁場の均一度は大きく乱れることとなる。図1における半値幅の劣化の大きさを考慮すると銅線と

テフロンチューブの間に磁化率調整用グリスが入り込んでいないことが原因であると考えられる。この問題を解決すれば、テフロンチューブを用いても高い磁場均一度が達成でき、良好な NMR スペクトルを取得することができることがわかった。

(7)上記の結果から、銅のマイクロコイルとテフロンチューブの間に発生する隙間をなくすことと、わずかな測定試料の磁化率の違いを吸収できることが、マイクロコイル NMR による差スペクトルにおいて良好な結果を得るために重要であることが判明した。これらの問題を解決する構造を持つプローブについて検討を行った。さらに差スペクトルを取得する方法についても検討を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 雅人 (TAKAHASHI, Masato)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・構造・合成生物学部門・NMR 施設・上級研究員

研究者番号：60392015

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：