

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770114

研究課題名(和文) 難関試料に立ち向かう生体系固体核磁気共鳴法—光を使った高感度化

研究課題名(英文) Biological Solid-State NMR for Challenging Samples - Sensitivity Enhancement using Visible Light

研究代表者

松木 陽 (Matsuki, Yoh)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：70551498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：光CIDNP現象を利用した固体NMRの汎用感度向上法の開発を目指して、装置と方法論の基礎を作った。フラビン誘導体を用いた「分極剤」の開発過程では、当初計画に無かった分子の自己集合能を利用した新しいプロトコルも開発した。ありふれた水溶性小分子(電子供与体と受容体)の組み合わせだけで、正味の核分極増強が実現できる事を初めて示した。また、光励起常磁性種が巨視的磁化の縦緩和を大きく増進することも見出し、信号積算の高速化で時間感度を向上できることも見いだした。これら光を使った方法は信号取り込み中には常磁性種を失活でき、信号分解能が一切低下しない点で従来の緩和促進法、常磁性DNP法より優れている。

研究成果の概要(英文)：Instruments and fundamental techniques have been developed toward establishing a general way for enhancing sensitivity of solid-state NMR via nuclear hyperpolarization based on photo excited dye molecules: photo-chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP). Using newly developed photo-sensitizer system using flavin derivatives and imidazole embedded in a micelle, enhancement of net nuclear polarization via photo-CIDNP has been observed. It was also found that paramagnetic relaxation enhancement (PRE) effect of the photo-excited dye molecules significantly accelerates the longitudinal relaxation rate of bulk nuclear polarization, enabling rapid signal accumulation or unit-time sensitivity enhancement. The above methods based on light-excited dye overcome a major drawbacks of conventional DNP and PRE techniques: paramagnetic signal broadening, because the paramagnetic species can be quenched by turning the light illumination off during signal acquisition.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：固体NMR 感度向上 光化学誘起動的核分極

1. 研究開始当初の背景

固体NMR法は不溶性、非晶性試料の原子分解能の立体構造解析ができる現在唯一の手法と言っているが、他の分光法と比して飛び抜けて感度が悪く、大きな蛋白質複合体などへの応用は強く制限されている。感度の革新的な改善には、積極的に核スピンを超分極するアプローチがもっとも効果が高い。試料に薄く常磁性分極剤を混入し、その電子を使って核を超分極する「常磁性-動的核分極(pDNP)法」は必要なマイクロ波発信源の技術的な進歩にあわせ発展し、安定ラジカル分極剤やDNP装置が市販されたこともあって平成23年の時点で欧米の複数の研究拠点に導入され始めた。一方、このpDNP方には極低温設備が要る事、常磁性ラジカル分極剤の常磁性緩和のせいでスペクトル分解能が悪化するなどの問題もあった。

常磁性分極剤を使わないDNP現象も知られている。光化学反応で過渡的に誘起される電子の超分極が核に移る光化学誘起DNP (CIDNP)現象である。CIDNPでは、光励起された色素分子から、近隣の電子受容体分子に向かって電子が移動、ラジカル対が発生する過程で核スピンの高分極が生まれる。分極源として電子の熱分極に頼らないので、極低温設備も必須ではなく、この点でもpDNPと対照的である。CIDNPでNMR信号強度が増大する現象は、ヒスチジンやトリプトファンと色素分子の混合水溶液で古くから知られていたし(R. Kaptein, *JMR* 31, 171-, 1978)、固体試料でも最近になって、やはり色素を結合する光合成蛋白質(RC)などの活性部位付近の核で信号が100~1000倍増強される現象として数例観測されたが(M. G. Zysmilich, *JACS* 116, 8362-, 1994; S. Surendran, *JACS* 132, 15542-, 2010)、それで全てであった。もちろん、この様に蛋白質の特定部位の信号だけを浮き出して観測できる、いわゆる「特殊」CIDNP現象は、蛋白質中の電子移動経路や光合成機構の研究などに寄与したが、マトリクス中のどんな分子も、その全体を等しく分極できる汎用CIDNPの技術はより応用の裾野が広い。そこで、本研究ではその様な「一般」CIDNP法をめざし、固体NMR法の汎用的な高感度化技術を創る事を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)RCを持つ特殊な蛋白質などを直接利用する事なく、取扱いや合成が容易な小分子の組み合わせだけから成る、固体NMR用CIDNP分極剤を探し出す、あるいは創り出すこと、(2)どんな分子も、その全体を等しく分極できる様に、試料保持用の最適なマトリクスを開発する事により、汎用CIDNPの技術の基礎を作る事にある。特に蛋白質構造解析への応用をにらみ、水溶性の高い分極剤とマトリクスを確立することを目指している。

3. 研究の方法

(1)装置の改造

光照射構造の開発

CIDNPのために必要な400~800nmの波長の光をNMRプローブ中の試料に導入するため、固体NMRプローブを改造する。試料直前までの光の伝送にはフレキシブルな光ファイバが使えるので容易であるが、マジック角試料回転モジュール内は空間的な制限が強く、最終段の試料照射構造には特別な工夫が要る。

低温試料回転システムの構築

CIDNP現象には必ずしも極低温を必要としないが、ラジカルペアの寿命を延ばすため、スピン分極能を向上するため、分極を試料全体に配るのに利用するスピン拡散の効率を高めるために、低温でマジック角試料回転を実現する装置の整備も行う。

(2)色素の探索

安価なLED光源(出力~0.1W)でも高い効率で励起できる色素を見つけるとコストを削減でき、方法論自体の価値は上がる。上記した「特殊」CIDNP現象が観測される光受容体蛋白質の活性中心にはフラビンモノヌクレオチドが結合しており、電子供与体としてフラビン類は有望と考えられる。プロフラビン、リボフラビン、フラビンヌクレオチドなどから検討を始め、キノン類も視野に入れる。

(3)マトリクスの探索

分極剤分子周辺に発生した核スピンの超分極を巨視的な試料全体(~100 μ L)に配るには、マトリクス中の 1 H間のスピン拡散を利用する。スピン拡散を効率化するには、目的の溶質(蛋白質など)と分極剤を、ガラス転移温度で硬化する何らかのマトリクスに埋め込んでおく必要がある。

候補マトリクスとして、種々の糖、糖アルコール類の単体、あるいは水溶液を検討するが、次のような性質を要求項目にする。比較的高温でガラス転移する事(極低温設備が要らなくなる)、可視光に透明である事(弱い光源でもよく励起できる)、生体試料を常温で溶解できる水溶性がある事(高温で蛋白質は変性するため、加熱による融解が必要だと使えない)。

(4)「分極剤」候補分子(電子供与体(色素)、受容体分子)対の探索

電子受容体にはヒスチジン、トリプトファン、タイロシンなどのアミノ酸とそれぞれのアセチル化体、側鎖のイミダゾール、インドールなどを検討する。電子供与体、受容体の候補分子をあらゆる組み合わせでマトリクスに溶解、標準試料も共に溶解し、CIDNPによる信号強度の増強度を検査する。電子供与体、受容体の濃度を変える事で両者の平均分子間距離を制御し、最適距離を推定する。両者は電

子の移動のためには近い程良いが、近づきすぎると電子-核の超微細結合が電子-電子の微細結合をかき消し、電子の分極が核に移行できなくなるので、最適距離があるはずである。

(5) 「分極剤」の高効率化

最適な電子受容体、供与体の組み合わせに見当をつけたら、両者を(4)で推定した最適距離になる様なリンカーを設計して共有結合してしまう。つまり汎用CIDNP「分極剤」分子の創出である。

4. 研究成果

(1) 装置の改造

光照射構造の開発

市販の500MHz, 600MHz二重共鳴固体NMRプローブを改造し、試料空間まで可視光の伝送経路を確立した。マジック角試料回転モジュール内に於ける試料の光照射構造については大きく次の二法を検討した。すなわち、試料管の横からRFコイルの隙間を通して照射する「横照射法」と、試料管の軸に沿って試料管頭部から照射する「縦照射法」である。横照射法は光ファイバの終端から試料までの距離が短い利点があるが、可視光に透明で、しかも高速の試料回転の機械的な応力に耐えるサファイア試料管が必要である。また、RFコイルが光の入射を制限する欠点がある。縦照射法はコイルに邪魔をされないし、強靱なセラミクス試料管(可視光に不透明)を使える利点があるが、試料位置からファイバの終端が遠くなる欠点がある。縦照射法、横照射法による光の導入効率、古くから知られるヒスチジンとフラビン混合水溶液試料を用いて溶液CIDNP現象の強度を観測して比べた。

横照射法はRFコイルによる反射が予想以上に大きく、照射効率は縦照射法に大きく及ばなかった。コイルの巻き数を変えたり、部分的にコイルを広げたりすると、RF磁場の均一性を損ね、高度な核スピンの制御を妨げるので、以後の実験は全て縦照射法で行う事にした。縦照射法でファイバ終端が試料から遠い問題は、試料管の頭部キャップに光ファイバを埋設する新しい照射構造を開発して克服した。これにより光ファイバ終端を試料管中央まで差し込んだ時と同程度の高い光照射効率を実現した。

低温試料回転システムの構築

当面は100K程度で高速のマジック角試料回転ができるシステムの開発を目指した。固体NMRプローブ内部の試料回転用ガス配管を、エアロゲルブランケットと二軸延伸boPETフィルムで断熱した。ドライヤで乾燥した室温圧縮空気は多段メンブレンフィルタとN₂ガスセパ

レータを組み合わせ、露点を可能な限り下げたから液体窒素と熱交換した。液体窒素タンクと、試料回転用ドライバガス、ベアリングガスを独立に冷却する二チャンネル熱交換器も製作した。液体窒素消費量を抑えるために、熱交換器直前に電気冷凍機を挿入し、-80℃まで予冷してから熱交換器に導入した。これにより、12時間以上にわたって安定に低温試料回転固体NMR測定が可能になった。

(2) 色素の探索

安価なLED光源(出力~0.1W)でも高い効率で励起できる適切な電子受容/供与体の組み合わせ(ラジカルペア)を選出することが方法論の基礎を作る。

候補物質として(ヒスチジン、トリプトファン、タイロシンとそれぞれのアセチル化体)/ (リボフラビン、フラビンモノヌクレオチド、カンファーキノン)の全組み合わせを探索し、溶液CIDNP強度から励起状態の光学収量やスピン分極能を推定した結果、電子供与体としてはフラビンヌクレオチドがその高いモル吸光係数と水溶性から、最適と結論づけた。受容体にはヒスチジン、トリプトファンがよいと決定した。

(3) マトリクスの探索

マトリクスの候補として、炭素数の違う種々の糖、糖アルコールと水の二元溶液を探索した。候補には同位体標識物が入手可能なエリスリトール、キシリトール、マニトール、ソルビトール、フルクトース、シュクロース、マルトース、マルチトール、トレハロースを用いた。

100K、重量比6(糖):4(水)以上において、マニトール以外は透明で硬いガラスマトリクスを形成する事を見出した。いずれの系も室温で液状であり、水溶性なので、任意の生体物質を溶解、保持する事ができるが、硬化後の硬さには差があり、保持される分子の運動性には差があると考えられた。

マトリクス中の有機分子のスピン縦緩和率を100Kで測定すると、マトリクスの分子レベルでの硬さを推定できる。糖マトリクス中では、低温マトリクスとして従来から広く用いられるグリセロールマトリクス中に比べて、有意に長い緩和時間が観測された(図1(上)(下)で青線の比較)。これは糖マトリクス中では、局所的な分子運動がより強く抑えられている事を示している。スピンの緩和源の減少はより寿命の長いスピン相関ラジカルペアの生成につながるし、発生した核分極がマトリクスに蓄積しやすくなるので、より高いCIDNP感度向上が期待できる。

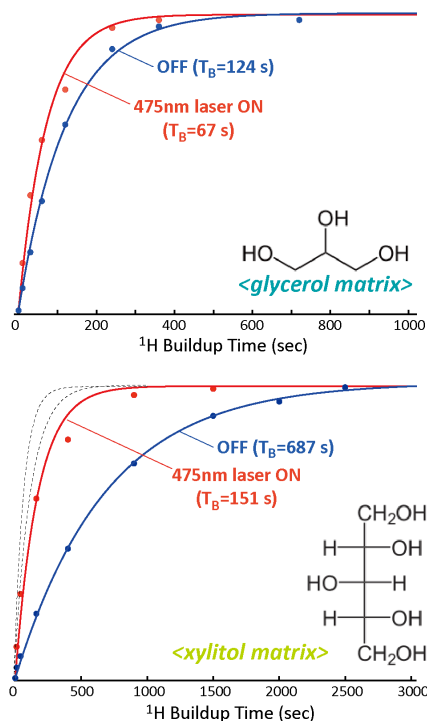


図1 ^1H 磁化の飽和回復カーブ。グリセロールマトリクス(上)に比べ、糖マトリクス(下)では縦緩和時間が4倍以上長い。赤線は460nm LED照射下での回復カーブ。

実験の結果、キシリトールやフルクトースマトリクスのガラス転移点は、グリセロールマトリクスよりも遥か高温に存在し、電気冷凍機だけで得られる200K付近でもガラス状態を保持していた。スピン拡散も有効に機能しており、液体窒素による熱交換を必要としない汎用マトリクスとしても有望である。また、ガラス転移前の蛋白質の運動性を高感度に観測できる方法論に発展できる可能性がある。糖の分子量とマトリクスの硬度の相関などを詳しく調べて発表する。

この様な「硬いマトリクス」はマイクロ波を用いるpDNP法などでも、分極移動効率を向上すると期待できる。長年ほぼ盲目的に用いられてきたグリセロールマトリクスを凌ぐ高効率マトリクスを見出した事になり、広い応用が期待できる。

(4) 電子供与体(色素)、受容体分子対の探索
(2)で選出した候補電子受容/供与体分子の組について、電子供与体、受容体間の適切な距離を推定するため、両者の濃度が異なる、つまり平均分子間距離が違うガラスマトリクスシリーズを調製、温度150K-100K、高速マジック角試料回転条件下で、光照射し、NMR信号強度の増大率を観測、最適ラジカル間距離を推定した。

結果、フラビンヌクレオチド、ヒスチジンは飽和濃度に近い100mM程度、100K付近でCIDNPによる核分極の増大を観測できた。(図2)

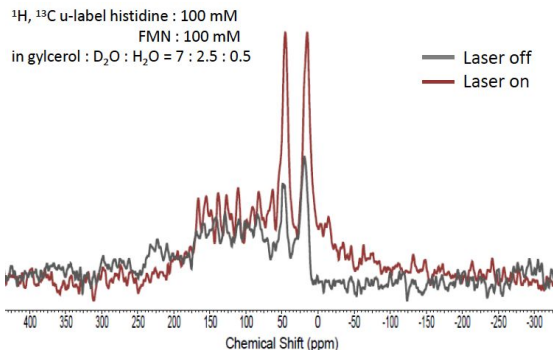


図2 フラビンモノヌクレオチドとヒスチジンを高濃度でドープしたガラスマトリクス試料で観測された核分極の増大。460nm LED光源で観測された核分極(赤線)あるいは非照射(黒線)後、交差分極で観測した ^{13}C NMR信号。T=100K, マジック角試料回転周波数=3kHz

ありふれた水溶性小分子の組み合わせだけを用い、固体試料でCIDNP現象によるバルク核分極の増大が実現した初めての例である。この濃度では色素分子と、直近にあるヒスチジンとの平均分子間距離は ~ 20 で、理論から予測されるラジカルペア間最適距離 ~ 10 に近かった。したがって、ラジカル間最適距離は10-20と推定した。

(5) 「分極剤」の高効率化

ここまでで、種々のアミノ酸とフラビンモノヌクレオチド(FMN)など色素分子の高濃度混合試料を使い、CIDNP現象には電子受容/供与体間の距離を小さくすることが重要だと結論した。高濃度マトリクスを用いらずに、(4)で推定した最適ラジカルペア間距離10-20を保つ系を如何に実現するかが次の焦点になる。

共結晶の作製

電子供与体、受容体分子を共結晶化できれば、両者を20以下に固定できるかも知れない。フラビンヌクレオチドとヒスチジンの混合試料と、フラビン類を分子表面に非共有結合する蛋白質(Bovine Serum Albumin, BSA)を例にとり、電子供与体、受容体分子の共結晶化を試みた。共に黄色みを帯びた単結晶を作製でき、フラビンが取り込まれている事が示唆されたが、これらの系で固体CIDNP現象を観測するには至らなかった。結晶構造解析を行い、両者の空間配置など詳しく調べる必要がある。

電子供与体(色素)、受容体を共有結合した「分極剤」の合成

リボフラビンのリビチル鎖の先端にイミダゾールカルボン酸を縮合させる事を試みたが、複数の副産物からの単離に苦しんだ。リビチル鎖を酸化開裂して短くできると、副産物の形成を抑えられ、精製段階を効率化できるし、電子供与体、受容体間距離をより短くできるなど利点が多い事に気づいた。ただし、イソアロキサジン環の部分的な酸化で、色素の

電子構造が変わる恐れがある。引き続き注意深い検討が必要と結論した。

分子の自己集合能を利用した「分極剤」の開発
共有結合体「分極剤」の設計と合成を繰り返すとどうしても時間と手間がかかりすぎる。そこで開発のスループットを向上するために、当初の開発計画には無かった新アプローチを試行した。これは、分子の自己集合能(ミセル化)を利用する新手法の開発につながった。

ポリエチレングリコール(PEG)や脂質分子などの「頭部」に、電子受容体分子を結合したものと、電子供与体を結合したものをそれぞれ合成し、それらの混合試料でミセルを作ることによって両者を空間的に近づけるアイデアである。適当な化学基で活性化されたPEG誘導体は購入できるし、それぞれの結合も比較的容易である。修飾の異なる複数の化学修飾PEG分子などを合成しておき、ミセル化させるだけで多くの受容/供与体のペアを迅速に、また簡単に探索できる新しい方法になった。(図3)

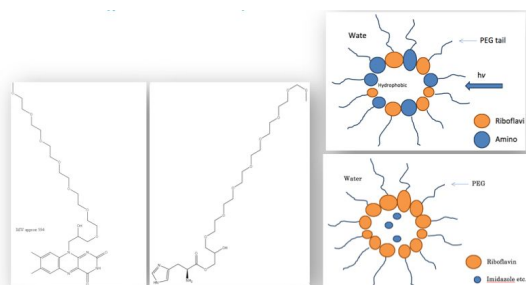


図3 リボフラビン、ヒスチジンをそれぞれPEG化しておき(左)ミセル化することで(右)、時間と手間のかかる「分極剤」の有機合成をする事無く、電子供与体、受容体を空間的に近づける事ができる。

手始めにリボフラビン-PEGとヒスチジン-PEGを合成した。複数のミセル調整法を検討し、透明度の高いミセル試料の調整プロトコルを確立した。このミセル型「分極剤」を(3)で開発した糖マトリクスに埋め込み、温度100K、高速試料回転条件において光照射し、交差分極法による¹³C NMR信号を観測した所、正味のスピンの分極の増大を信号強度の増強として観測することに成功した。(図4、上)

交差分極を行わず¹³C NMR信号を光照射下で直接観測する測定法も試みた。興味深い事に、この直接観測法では負の信号増強が観測され(図4、下)、固体CIDNP現象による核分極の正味の変化は、電子-核の微細結合定数の符号によってその効果を逆にすることがあることが分かった。光照射の有無で分極の変化は最大でも20%程度であったが、効率の良いラジカルペアをスクリーニングする指標として使うには十分である。また、光の強度やマトリクスの種類を吟味すると、分極の増強率をミセ

ル型分極剤でも大きく改善できる可能性もある。

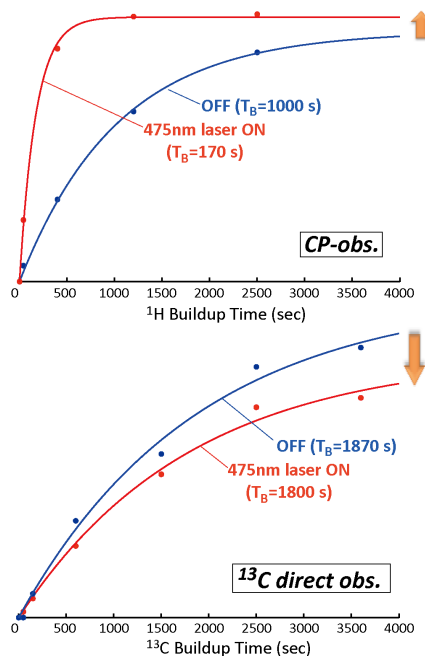


図4 光照射(赤線)、非照射(青線)条件における核分極の飽和回復カーブ。ミセル型「分極剤」を糖マトリクスに固定しておき、光照射後交差分極(上)が¹³C直接励起(下)によって¹³C信号を観測した。

(6) 光励起常磁性種による緩和促進効果(PRE)

時間感度の向上

光で励起常磁性種が発生するなら、CIDNP効果以外にも核分極の緩和促進効果を利用できるのではないかと考えた。核スピンの縦緩和が促進できるなら、信号積算の高速繰り返しによって単位時間あたりの感度を向上できるはずである。この効果はCIDNPによる正味の核分極の増大と組み合わせて感度向上効果を相乗的に増幅することができる。

当初は従来のグリセロールマトリクス、後に(3)で開発した糖マトリクスにフラビンヌクレオチドを薄く保持しておき、100K付近、試料回転条件で光照射する実験を行った。糖マトリクス中では、光照射により核スピンの緩和率を最大5倍程度増幅できる事を見出した(図1、下、赤線青線の比較)。これは単位時間当たり2倍以上の感度向上を実現した事に相当する(図5)。

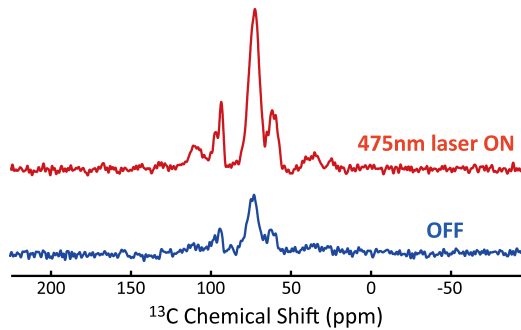


図5 光励起常磁性種による縦緩和促進効果を利用した感度向上。光照射条件(赤線)では非照射条件(青線)よりも縦緩和が約5倍速く、2倍以上の時間感度向上が実現できる。

常磁性の緩和試薬を試料に混入する従来法では(N. P. Wickramasinghe et al. *Nature Method*, 2009)、常磁性緩和で信号の分解能が悪化する欠点があった。本研究で開発した、光励起常磁性種を用いた感度向上法は、光照射を信号取り込み中に止める事で、常磁性種を消滅させ、分解能の悪化が全く起こらない点で有利である(図6)。固体CIDNP現象による

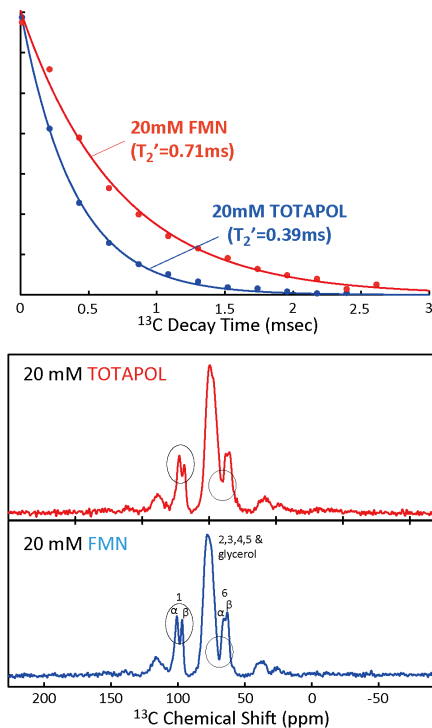


図6 エコー減衰カーブ(上)と交差分極¹³C NMR スペクトル(下)。フラビンモノヌクレオチド(赤線)と同濃度のフリーラジカルTOTAPOL(青線)をマトリクスにドーブすると、エコー減衰時間 = 横緩和時間は80%以上増進されてしまう。これは信号の常磁性ブロードニングとしても観測できる(下)。丸で囲った部分で信号のブロードニングが顕著に観察できる。

感度向上法も同様に、データの分解能を損なわない点で、従来のpDNP法より優れている。

今後の可能性

CIDNP分極剤の有機合成は、周到な合成計画を練ってもっと効率化できると考えられる。アルキンとアジ化物の対を利用する、いわゆるクリックケミストリーの手法の導入も効率化に寄与するだろう。より高出力の(>1W)レーザー発信器を導入すると、試料の励起効率を向上し、得られるスピン分極も増強できると考えている。電子の超偏極を核により高い効率で移動する技術も積極的に開発する必要があるかもしれない。これには高周波マイクロ波の照射が有望で、照射位置や照射スケジュールをよく研究する必要がある。

CIDNP分極剤の開発の過程で見いだした、光励起常磁性種による縦緩和増進効果には、さらに複数の新しい応用を展開できる可能性がある。例えば蛋白質表面に色素分子を共有結合する事で、結合残基近隣のみの縦緩和が増進されることから、蛋白質のフォールドや3次元構造の情報を得る事ができる。光励起常磁性種による緩和効果は通常利用される核間の双極子相互作用よりも長い核間距離の情報を与えるため、巨大蛋白質や蛋白質複体の構造解析に力を発揮する可能性が大きい。(6)

に記述したように信号取り込み中に常磁性緩和による信号の消失が無い為、従来のPRE法では信号が消失してしまう、修飾残基近隣の距離情報も失うことなく、少ない試料調製でより多くの距離情報を抽出できる方法に成るだろう。この応用法は既に初期的な実験を開始している。

まとめると、本研究では

1. 水溶性小分子の組み合わせだけで構成される固体CIDNP用「分極剤」の原型を開発、光による固体NMRの汎用感度向上法の基礎を確立した。
2. 水溶性、可視光に透明で、比較的高温でガラス転移するマトリクスを開発した。
3. 光励起常磁性種によるスピン緩和増進効果による感度向上法を開発した。この効果は蛋白質複体の構造解析法にも応用できる。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2件)

1.

Y. Matsuki, "NMR Signal Enhancement by Solid-State Laser Induced Paramagnetic Relaxation", 4th International DNP Symposium, August 28-31, 2013, Denmark

2.

松木 陽, "光を使った固体 NMR の汎用高感度化法の開発", 第 52 回 NMR 討論会, 11 月 12-14, 2013, 金沢

6. 研究組織

(1)研究代表者

松木 陽 (Yoh Matsuki)

研究者番号: 70551498