

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26708019

研究課題名(和文) 生体系固体NMRの高感度化-光を使った汎用法の確立

研究課題名(英文) High-sensitivity biological solid-state NMR utilizing general photo-chemically induced transient polarization

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) 8,100,000円

研究成果の概要(和文)：固体核磁気共鳴(NMR)法は膜蛋白質など医学生理学的な重要性にも関わらず研究が遅れている非結晶性、不溶性分子系の解析を得意とするユニークな分光法であるが、低感度が最大の弱点である。電子スピンの分極を利用する感度向上法は複数知られるが欠点も多い。本研究では従来あまり利用されてこなかった、光化学的に誘起される過渡的な電子偏極を核に移す光CIDNP法に着目、従来のように蛋白質という足場に頼らない、合成や保存、取り扱いが容易な、ありふれた小分子の組み合わせだけで実現する「汎用CIDNP分極剤」の創出に成功した。また局所的に発生した高偏極を試料全体に配るための硬度の高い新しい有機マトリクスも開発した。

研究成果の概要(英文)：Magic-angle spinning solid-state NMR is a valid technique for structural and dynamical studies of non-crystalline/insoluble molecular systems such as membrane proteins at atomic resolution, but suffers from its low sensitivity. A number of nuclear hyper-polarization techniques using the high electron polarization is known, but limited by their own limitations. This work focuses on the so-far under-exploited "solid-state CIDNP" phenomenon based on the photo-chemically induced transient electron polarization, and has developed a novel polarizing agents that do not rely on the protein scaffold required for the conventional solid-state CIDNP experiments. This would be the basis for the first generic and chemically pure polarizing agent for solid-state CIDNP that only uses ordinary small organic molecules, which is easy to store/handle. In addition, a novel organic glass matrix that is hard and efficient for distribution of the local polarization to the bulk sample has also been developed.

研究分野：生物物理

キーワード：固体NMR 動的核分極 光CIDNP 感度向上

1. 研究開始当初の背景

マジック角試料回転(MAS)固体核磁気共鳴(NMR)法は細胞膜に埋まって外界との信号や物質の移動を担う膜蛋白質や、アルツハイマー病などの発症に関わるアミロイド線維(蛋白質の巨大重合体)など、結晶になりにくく、水にも溶けない分子の構造、運動性の知見を原子分解能で得ることができる。現在ほぼ唯一の分光法である。固体NMRはこの20年で装置と方法論の両輪で大きく発展したが、最大の弱点である低感度が、発展的な解析の多くの場面でその応用可能性を強く制限してきた。一般的に、NMRの感度向上を実現するには、電子スピンの高分極を核スピンの移し超偏極させる方法がもっとも利得が大きい。たとえば電子スピンの熱平衡偏極は水素核=プロトン(^1H)の660倍大きく、これをマイクロ波照射で核に移す動的核分極(Dynamic Nuclear Polarization)法(以下「熱偏極DNP法」)は、1993年以降、装置と分極剤の発展で劇的な進展を見せたが、電子源として常磁性のラジカル分極剤を試料に混入するので、常磁性緩和でスペクトル分解能が悪化するなど、幾つかの重大な問題があった。

2. 研究の目的

本研究では、これまであまり利用されてこなかった、電子スピンの光化学的に誘起された過渡的な偏極が核スピンの移る photo-Chemically Induced DNP(光CIDNP)現象に着目する。NMR信号の取り込み中に光照射を打ち切れば分極剤の常磁性は消滅するので、従来の熱偏極DNP法が抱える信号ブロードニングの問題を克服する代替法になる可能性があるからである。しかし、固体NMRの条件でこれまでにCIDNP現象が観測された例は少なく、光合成中心(RC)蛋白質のスペシャルペアと、ある種の光受容体蛋白質(LOV)の活性中心付近で、一部の信号が強く増強されるいわば「特殊光CIDNP」現象が数例報告されているのみである。このような現象はそれ自体興味深く、特に光合成機構の解明に重要な知見を与えるなど重要な成果ではあるが、応用の裾野は狭い。一方、これを望んだ分子はなんでも、その全信号を一律に増強できるような一般法に発展できるとインパクトは大きい。本研究では、この特殊光CIDNP現象をより多くの研究者が恩恵に預かれるよう、一般光CIDNP法に脱皮させるための基盤作りを主たる目的とする。

目標の達成にむけ、(A)過渡的な電子の高偏極を蛋白質という足場を使わず、合成や保存、取り扱いが容易な、ありふれた小分子の組み合わせだけで実現する「汎用CIDNP分極剤」の創出、(B)発生した局所的な高偏極を巨視的な試料全体に配る方法を確認し、広汎な試料を一律に偏極できる様にする方法の探索、この2点が重要課題になる。

3. 研究の方法

(1)装置と方法の開発

①高出力LED

先行研究で有望と見出したフラビン誘導体色素の励起には460nm青色光が要る。本研究では、これまでに実績のある400mW光源に比して格段に高輝度の10W光源を利用することを考える。10Wレベルの青色光をNMRプローブ内に伝送するための適切な新規経路を確保するため、プローブの再改造を行う。

②高輝度白色ゼノンランプ

フラビン系以外の電子供与体の探索には、単色光源をそれぞれの色素の最大吸収に合わせて導入しても良いが、コストがかさむ。そこでゼノンアークを利用する高輝度(500W)白色光源を導入する。光源の選定を慎重に進める。また、これにもNMRプローブの進歩的な改造が要る。NMRコンソールからラジオ波パルスに同期した、高時間分解能のパルス制御法も確立する。

(2)固体NMR測定法の開発

CIDNP-NMR実験の概略は一般に、短い光照射に続くTHz波パルス列による超微細結合を通じた分極移動、これに続くラジオ波照射とNMR信号取り込みである。可視光、THz光、ラジオ波光と全体で波長が100万倍異なる3種の光を一つのパルススキーム中で正確に打ち分ける固体CIDNP-NMRスキームを開発する。

(3)分極剤の開発

①三重項フラビン

まずは極低温においてフラビンが比較的寿命の長い三重項状態に光励起されることを利用して、その間に電子-核間の分極移動を試みる。つづいて励起寿命を延長することを目指し、励起電子を励起直後に色素から引き離す努力をする。これには電子供与体-受容体を共有結合した化合物の合成や、分子の自己集合能(ミセル化)を利用することを考える。ポリエチレングリコール(PEG)などの水溶性鎖状分子の一端に疎水性の電子供与体・受容体分子をそれぞれ結合し、ミセルを構築する事で両者を空間的に近づける。PEGと色素などの結合は比較的容易であるから、種々のPEG誘導体でライブラリを作って置き、多くの組み合わせをハイスループットに探索することを考える。

②共有結合型分極剤

ミセル型分極剤を用いる一連の実験から、有力な電子供与体・受容体候補を絞り、計画の発展段階ではこれらを単純な炭化水素鎖などを介して共有結合する「結合型分極剤」の合成に進む。

(4)マトリックスの開発

分極剤分子周辺に増強された核スピン分極を巨視的な試料全体($\sim 100\mu\text{L}$)に分配するには、目的の溶質(有機分子、蛋白質など)と分極剤を、プロトン(^1H)を多く含むガラス状態に硬化する何らかの有機マトリックスに埋め込んでおくと、 ^1H 間のスピン拡散を使ってこれを実現できる。本研究ではこの過程を最適化するガラスマトリックスを、可

視光に透明であること、生体試料を溶解できるような融点が室温以下であること、できるだけ高い温度でガラス転移を起こす事などの条件を付して系統的に探求する。

4. 研究成果

(1)装置と方法の開発

①高出力 LED

従来の光源よりも格段に高輝度(最大 10W)の460nm 青色光 LED(特注品、島津製作所)を製作した。同時に ^1H - ^{13}C 二重共鳴固体 MAS-NMR プローブに光伝送経路を新規に設ける改造を施した。MAS モジュールへの光ファイバーの導入法は複数の経路で試行錯誤を繰り返し、溶液 CIDNP 現象による NMR 信号増強度を指標にして光の導入効率の最適化を行った。また NMR 分光計からの光源の制御法も確立した。NMR 用のラジオ波パルス列のタイミングは μ 秒分解能で制御することが必要で、これと同期する光パルスを自由にプログラムできる様、TTL デジタル信号制御による信号伝送システムを作成した。このシステムでフラビン誘導体の固体 CIDNP 実験が可能になった。

②高輝度白色ゼノンランプ

高輝度白色光で各波長に十分な輝度を得るためには光ファイバーへの効率の高い集光が必須で、青色光よりもかなり大口径の石英ファイバーを利用した。反面、固体 NMR プローブ内の高度な空間制約から、大口径ファイバーの取り回しが困難で、新規に光伝送経路を開発、再度の改造を要した。やはり TTL 信号で外部制御可能な高速シャッターを利用し、NMR 分光計からミリ秒オーダー分解能の制御法を確立した。

(2)固体 NMR 測定法の開発

計画初期では最も単純なパルススキーム、すなわち分極剤から伝わる電子の分極を巨視的な試料に、マトリクスを通して拡散させたのちにバルクマトリクスの NMR 信号を見る「マクロ CIDNP 測定」を設計した。この測定は高い時間分解能は必要とせず、観測感度も高い反面、固体 CIDNP 現象の発生を原子分解能で捉えるのには不向きである。計画の後期では分極剤分子近隣に発生する分極をラジオ波・可視光の短パルス群を利用して特異的に見る「マイクロ CIDNP 測定」法を開発した。

(3)分極剤の開発

①三重項フラビン

はじめに、長寿命光励起フラビン三重項状態からの直接的なスピン分極移動を試みた。この場

合、試料の構成は有機マトリクスに観測対象の有機分子とフラビン誘導体を溶解させるだけで、至って単純である。また、NMR 測定も基本的な上記「マクロ測定」を行った。三重項フラビン誘導体からの直接分極移動は、極低磁場条件($\sim 0.3\text{T}$)で報告があるものの、高分解能分光に必要な高磁場条件($\sim 14\text{T}$)では、THz 波パルスの出力と時間分解能が不足し、同様の分極移動を観測することができなかった。このことから、励起寿命を引き延ばす何らかの工夫が必須であると再確認された。これに基づき、より高度な分極剤の創出に向け以下の様に複数のアプローチを実行した。

②自己会合型分極剤(ミセル型分極剤)

光励起電子の高いスピン分極を核に移すには励起寿命を延ばす何らかの策が必要で、これには一般的に電子を励起直後に元の軌道から空間的に引き離すと良い。これは植物が持つ光合成活性中心蛋白質内や、それを模倣する色素ベースの太陽電池と同じ戦略である。具体的には電子供与体の近隣に、より還元電位の高い受容体分子を配置することが必要になる。例えば電子供与体-受容体のペアを何らかのスペーサ分子を介して共有結合するのが最も直截的である。しかし、個々の連結化合物の設計、合成を繰り返すとスループットが上がらない。そこで、分子の自己集合能(ミセル化)を利用する試料調整法を開発した。この方法で候補を広く探索し、有望なものだけは後述の様に有機合成的につなぐ作業を実行した。

まず、水溶性鎖状分子ポリエチレングリコール(PEG)の一端に疎水性の強い電子供与体(リボフラビン=Rf)、あるいは受容体分子(トリプトファン)を比較的容易に、有機合成的に結合した。これら二種のPEG化受容体・供与体のペアを水中で混合しミセルを構築、疎水性コアで両分子が空間的に近づく様にした。マクロCIDNP測定の結果、光励起による過渡的常磁性効果によってマクロな試料全体でスピン緩和が大きく促進された。反面、正味の核スピン分極増大は観測されなかった。原因として、励起分子がミセル中で密集しすぎるために三重項状態が自己消光している可能性が考えられた。そこで、SDS, CTAB, Triton-X100など一般的な界面活性剤で大きめの「基盤ミセル」を形成し、そこに非PEG化、あるいはPEG化電子供与体・受容体分子を低濃度で埋め込む新コンストラクトを考案した。また、供与体-受容体の空間的な近接を蛍光クエンチングと溶液CIDNP-NMR法で直接的に確かめることにした。

まず、各種基盤ミセルに非PEG化の電子供与体(Rf)と受容体(N-アセチルトリプトファン=Nac-Trpや、インドール-3-アセタミド=Indo-3ac)を組み合わせて埋め込んだ一連のミセル型分極

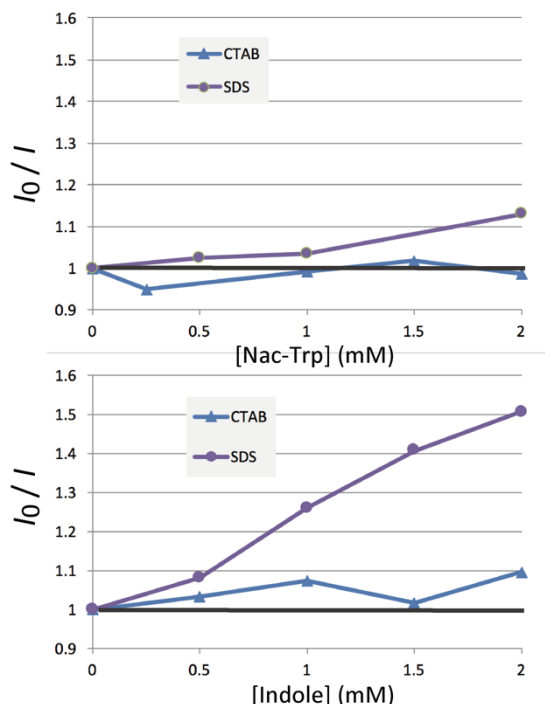


図1 Rfの蛍光クエンチング強度 (I_0/I) のクエンチャー濃度依存性。クエンチャーはNac-Trp(上)とIndo-3ac(下)で、それぞれにSDSとCTABで形成される基盤ミセルを用いた。

剤を作成した。図1はCTABあるいはSDS基盤ミセルと共存するRfの蛍光を、Nac-TrpあるいはIndo-3acでクエンチングした結果である。いずれの場合も自己消光は見られず、励起色素分子はミセル内で適度に分散できている事が確かめられた。Nac-Trpによる消光(図1上)はIndo-3acのもの(図1下)に比べて優位に低く、電子供与体-受容体分子は近接共存できていないことが示唆される。Nac-TrpもSDSミセルも負電荷を持つことからNac-Trpはミセル外に局在しており、Rfは励起状態で正電荷を持つことからSDSミセル内にとどまると考えられる。一方、Nac-Trpは正電荷を持つCTABミセル内に局在、Rfは励起の瞬間に静電反発で射出されると考えられるので、これも有効なクエンチングを起こさないのだろう。Indo-3acによる消光はSDSミセルでのみはっきり観測された(図1下)。Indo-3acは無電荷、高疎水性でどちらの基盤ミセルにも内在すると考えられる。励起RfはCTABからは射出され、SDSミセルには留まるので、SDSでのみ優位なクエンチングが観測されたのだろう。低温における凍結試料ではRfの射出は無視できることから「Rf + Indo-3ac in SDS/CTAB基盤(“分極剤1”)」が一つ、有望なコンストラクトであると結論できる。“分極剤1”には溶液CIDNP現象も観測され、電子供与体-受容体分子が適度に近接していることを裏付けている。また基盤ミセル内部を互いに接触や離反を繰り返しつつ運動していることも示唆される。

興味深いのは、PEG化の供与体・受容体を同様に基盤ミセルに埋め込んだ場合、受容体分子のNMR信号に有意なブロードニングが観測され、同時に高い分子運動性を基礎とする溶液CIDNP現象も観測されなくなった。これは供与体-受容体分子がミセル中で激しく運動するというよりも、より緊密に会合している証拠と考えられる。おそらく水溶性PEGによって供与体・受容体部はミセル外部の水層に向かって引っ張られ、基盤ミセル中を自由に動き回るのでなく、ミセルの外殻付近に強く拘束されているだろう。したがって、これらPEG化分子を用いるコンストラクト「PEG-Rf + Indo-3ac in SDS/CTAB基盤(“分極剤2”)」も有望な候補と位置づけた。

これに基づき、ミセル型“分極剤1”と“分極剤2”を、分極プローブとなる適当な溶質分子とともに、低温でガラスを形成する有機マトリクスに溶解し、低温(-80℃と-180℃)でMAS固体CIDNP-NMR測定を実行した。ここでは現象を原子レベルで追跡可能なマイクロCIDNP測定を中心に行った。

電気ガス冷凍機によって容易に得られる-80℃における実験(図2上)では、CTABの頭

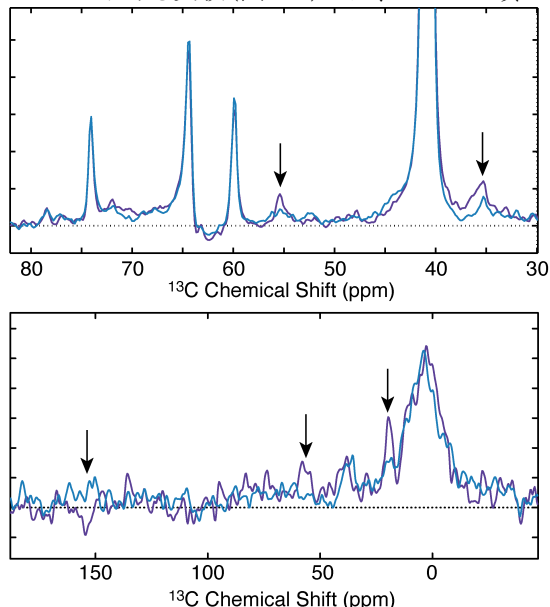


図2 固体CIDNP- ^{13}C MAS-NMRスペクトル。MAS周波数はいずれも6 kHz。データはミセル型“分極剤1”の-80℃測定(上)と、ミセル型“分極剤2”の-180℃測定(下)。青線は450nm青色光オフ、紫はオン。CIDNPで増強した信号を矢印で示す。

部、トリメチルアンモニウムのメチル炭素($\sim 55\text{ppm}$)と、主鎖メチレン炭素($\sim 35\text{ppm}$)信号が特異的に増強しており、“分極剤1”を成す基盤ミセル外殻部付近でCIDNP現象が起きていると考えられる。“分極剤2”を用いる-180℃測定(図2下)では、SDSの頭部硫酸基に近接する脂肪酸炭素($\sim 55\text{ppm}$)と、脂肪鎖末端のメチル炭素($\sim 20\text{ppm}$)の両方にはっきりとした正の信号増強が見られ、基盤ミセル内部の離れた二ヶ所で核分極の局在化が見られた。これら基盤ミセル側の信号と同時にRf(電子供与体)の信号($\sim 155\text{ppm}$)にもCIDNP現象に特有の負の信号

増強が見られ、固体 CIDNP 現象の存在を裏付けている。既述の通り、固体試料における CIDNP 現象はこれまでに RC 蛋白質のスペシャルペアと LOV 蛋白質の活性中心でのみ観測されてきたが、ここに示すのは蛋白質という巧妙な足場が存在せず、界面活性剤で形成した基盤ミセル上の電子受容体・供与体という化学的にピュアなコンストラクトにおいて固体 CIDNP 現象を初めて観測した貴重なデータであり、発表の準備をすすめている。また、新規に開発した「マイクロ測定法」で基盤ミセル部位特異的に CIDNP 現象を観測しており、現象の発現機序を原子分解能で議論、理論的に解明するための今後の研究の発展においても貴重な示唆を与えるデータである。一方で、観測された分極増大は電子授受が行われた基盤ミセル内にとどまっておらず、励起電子から発生した分極をバルク試料全体に拡散させ、汎用的な高分極化法に発展させるには更なる技術開発が必要である。 ^{13}C 炭素に発生した高分極を直後に交差分極を用いて ^1H に流し込めれば、強い ^1H - ^1H ネットワークを通して試料全体に配れるかもしれない。今後はこの可能性を追求する必要がある。

③共有結合型分極剤

ミセル型分極剤を用いる一連の実験から、有力な電子受容体候補として、インドール誘導体、イミダゾール誘導体が示唆され、計画の発展段階として Rf とインドール、Rf とイミダゾールを、単純な炭化水素鎖を介して共有結合する二種の「結合型分極剤」の有機合成を進めた。ともに Rf のリビチル鎖の活性化に続いて、インドール、イミダゾールのアセトアミド体による求核付加によって合成し、濃縮と洗浄後、粗精製で取り出し、質量分析と NMR で確認した。蛍光クエンチングテストでも、予想されるとおりミセル型分極剤で得られたものを大きく上回る消光率 ($I_0/I \sim 17$) が確認でき、電子供与体・受容体が常に近隣に位置する共有結合体の特徴を示した。これらを総合し、望んだ化合物を得ていると結論した。

一方で、ここで得た結合型分極剤の水溶性が低いことがしばらく一つの問題となっていた。蛍光テストに十分な $\text{nM} \sim \mu\text{M}$ 濃度に対し、CIDNP-NMR 測定に求められる mM オーダーの濃度を得ることが困難であった。有機マトリクスとして DMSO-水系を用いると溶解度はクリアできるものの、これが形成するガラスマトリクスの低温における硬度に問題があり、励起電子の緩和を有効に抑え込むことができなかった。水溶性基の有機合成的付加による溶解も検討したが、既出の基盤ミセル化法が確立した事を受け、共有結合型分極剤についても SDS 基盤ミセルへ埋め込みコンストラクトを作成、マイクロ固体 CIDNP-NMR 測定に進んだ(測定温度は -180°C 、試料回転 6kHz)。しかしながらこのコンストラクトに、現在までに有意な固体 CIDNP 現象を観測できていない。リンカーの長さをもっとも重要なパラメータで、今後はこの最適化が必須である。また、水溶性分極剤の設計も重要な目標になるだろう。

(4)マトリクスの開発

分極剤分子周辺に増強された核スピン分極を ^1H 間のスピン拡散を使って拡散するための最適マトリクスを探索した。探索した糖、糖アルコールはリボース、キシリトール、イジトールを含む炭素数 3 から 17 からなる 21 種類で、それぞれに対して水との二元混合液を作り、 -80°C と -196°C における固化テスト、透明度テストにつづき、これをクリアしたものに対してカロリメトリ(DSC)によるガラス転移点測定を行った。最も高温でガラス転移を与えたのはキシリトール/水=6/4 (w/w) の -89.9°C 、リボース/水=6/4 の -84.1°C で、従来から広く使われているグリセロール/水=6/4 の -109.7°C とくらべて 20°C 以上高いガラス転移温

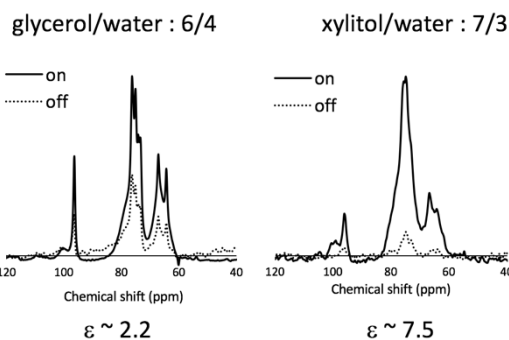


図3 ^{13}C 同位体標識グルコースの熱偏極DNP増強—固体 ^{13}C MAS-NMRスペクトル。常磁性分極剤 TOTAPOLと ^{13}C -グルコースをグリセロールマトリクス(左)、キシリトールマトリクス(右)にドープして測定した。マイクロ波照射で誘起する熱偏極DNPによる信号増強率はそれぞれ2.2、7.5倍で、キシリトールマトリクスの硬度は飛び抜けて高いことを示している。MAS周波数はいずれも6kHz、温度は -180°C 。点線はマイクロ波オフ、実線はオン。

度を記録した。もちろんいずれも可視光に透明、室温で溶液状態という要求を満たす。これら高温固化マトリクスは、従来よりも安価で単純な低温 NMR 測定施設における固体 CIDNP 実験を可能にする。キシリトールマトリクスについては熱偏極 DNP 測定を行い、効率の高いスピン拡散に重要なマトリクスの高硬度を示唆するデータも得ており(図 3)、固体 CIDNP 実験用の有機マトリクスとして最適であると結論付けた。従来から、ながらくほぼ唯一の選択肢であったグリセロールマトリクスを凌ぐ利便性の高い有機マトリクスを確立したことになり、測定のスループットや探索範囲も大きく広げる成果である。

まとめると、本研究では：

- (1) 電子供与体の励起効率を向上する目的で、高出力青色光照射装置と白色光ゼノンランプを導入、また NMR プローブを改造して試料までの有効な光伝送系を確立した。同時に NMR 分光計からの高時間分解能パルス制御系を構築した。
- (2) 「基盤ミセル」に電子授受を行う分子ペアを固定する新規の試料調製法を開発、また発生した分極を局所的に、あるいは広範囲に

- 観測可能なラジオ波パルス列を設計した。
- (3) (2)で開発したミセル型分極剤で固体試料におけるCIDNP現象の観測に成功した。蛋白質の活性部位以外の、ありふれた小分子の組み合わせからなる、化学的に単純な系では初めての観測例で、汎用分極剤の開発に向け礎となる成果である。
 - (4) 局所的に発生した核分極を効率よく拡散するための硬い有機ガラスマトリクスを系統的に探索し、従来よりも有効なマトリクスを見出した。またその効果を熱偏極 DNP 測定で実証した。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 5 件、(3)(4)(5)は口頭発表、(3)(5)は招待講演)

- (1) Yoh Matsuki, “Advanced instrumentation for DNP-enhanced MAS NMR for higher magnetic fields and lower temperatures”, EUROMAR, July 03-07, 2016, Aarhus (Denmark)
- (2) Yoh Matsuki, “Advanced instrumentation for high-field DNP for sensitivity-enhanced biological solid-state NMR”, ICMRBS, August 21-26, 2016, 京都国際会議場、京都市
- (3) 松木 陽, “Advanced instrumentation for sensitivity-enhanced biological solid-state NMR”, 第42回内藤コンファレンス、シャトレーゼガトーキングダムサッポロ、札幌市
- (4) 松木 陽, “Improving high-field DNP and its applications”, 第55回 NMR 討論会、広島国際会議場、広島市
- (5) Yoh Matsuki, “Advanced instrumentation for DNP-enhanced solid-state NMR”, The 6th International Workshop on Far-Infrared Technologies, 福井大学、福井市

6. 研究組織

(1)研究代表者

松木 陽 (Yoh Matsuki)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号:70551498