

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K17850

研究課題名(和文)非晶質試料の構造解析のための固体NMRによる炭素間距離決定法の開発

研究課題名(英文) Investigation of a method to determine distances between carbon atoms using solid-state NMR for structural analysis of amorphous samples

研究代表者

大橋 竜太郎 (OHASHI, Ryutaro)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・先端材料解析研究拠点・NIMS特別研究員

研究者番号：50533577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、固体NMRによる非晶性物質の構造解析を可能とするため、炭素13原子間の距離情報の精度向上を目的として研究を行った。成果の概要は以下のようになる。(1)炭素間の交換速度の数式を導出し、直接結合している炭素間で3%以下の精度で原子間距離を求めた。(2)1つの炭素のみを標識したアミノ酸において、12%以下の精度で炭素原子間距離が求められることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非晶物質を測定できる固体核磁気共鳴で同種原子間の距離測定が可能であることを示したことで、今後非晶物質のナノスケールでの構造解析が進めやすくなる。また、1つの炭素のみを標識した試料での成果は、今後構造解析にどのような試料が向いているかの指針となる。

研究成果の概要(英文)：In this project, in order to enable the structural analysis of amorphous materials using solid-state NMR, methods for determination of distances between carbon atoms (C-C distance) have been investigated for the purpose of improving distance information. Summary of the results obtained in this project is shown in the following, (1) Analytical formula to calculate exchange rates between carbon-13 atoms in 2D exchange NMR, which is applied for the C-C distance determination, was derived. Using the formula, C-C distances could be obtained with an accuracy of 3% or less of the corresponding distances obtained by X-ray diffraction (X-ray distance) in two carbon-13 atoms directly bonded to each other. (2) In Valine whose one carbon atom was labeled on carbon-13, the four C-C distances between a carboxy carbon and other carbons were obtained with an accuracy of 12% or less of the corresponding X-ray distances.

研究分野：物理化学

キーワード：固体NMR 原子間距離 構造解析 分子構造 非晶 交換NMR 同種核相関 アミノ酸

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、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造は、その機能とも大きく関わっている。そのため、生命現象の解明、および創薬への応用や生体分子の工学的な応用にはタンパク質の構造情報が不可欠であり、回折データから直接結晶構造を計算できるX線結晶構造解析、 ^1H - ^1H 間の多数の距離情報から構造を計算する溶液NMR (Nuclear Magnetic Resonance) などの方法を用いた構造解析が盛んに行われている。しかし、難溶性で結晶化が困難な繊維状タンパク質などの解析は、これらの手法では困難であった。固体NMRは非晶質の粉末試料でも測定を行えるため、固体NMRを用いた非晶質タンパク質の構造解析法が希求されている。

微結晶化された粉末タンパク質試料では既に固体NMRによる炭素原子核間(以下、炭素間)の距離情報を用いた構造解析が行われており、 α -spectrin SH3 [1], kalitoxin [2], ubiquitin [3,4], YadA [5] などの微結晶化されたタンパク質や膜配向している膜タンパク質(ASR)[6]の構造解析例が報告されている。このような配向性の高い試料では、図1左のように ^{13}C NMR スペクトルのピークを分離しやすくピークの本数が多いため、多数の炭素原子の情報が得られる。このため、炭素間の距離情報も多くなり、従来の解析法の精度でも炭素原子の位置を限定することができ、構造解析が可能であった。しかし、繊維状タンパク質などの非晶質の試料では、図1右のようにピークを分離しにくいために情報が得られる炭素原子が少ない。このため距離情報も少なくなり、従来の方法で得られる距離情報の精度では、構造解析が困難であった。

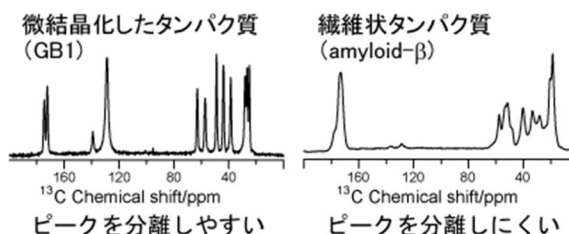


図1 微結晶タンパク質と非晶(繊維状)タンパク質の固体 ^{13}C NMR スペクトル

2. 研究の目的

1の背景で示したように、繊維状タンパク質などの難溶性で結晶化が困難な非晶質の試料は、X線回折、溶液NMRなどの方法では解析が困難であり、固体NMRによる解析法が希求されているが、非晶質では得られる距離情報が少なく、従来の解析法で得られる距離の精度では構造解析は困難であった。研究代表者は本研究開始までに、固体2次元交換NMRと別の固体NMR測定を組み合わせた解析法を考案し、モデル試料を用いた予備的検討により、高精度な炭素間距離の解析が可能であることを示すことに成功している。この解析法をさらに複数のモデル試料に適用して本手法の距離の精度を評価すること、及び距離情報が未知の非晶質の試料に適用できる汎用的な解析法の開発が本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究課題では研究代表者が考案した数式（図2）を用いた解析を行う。まず、図2の数式の有用性を示すために2つの炭素原子を炭素13標識したアミノ酸試料を用いて既知の距離の解析を行い、得られた距離の精度を検証する。次に1つの炭素のみを炭素13標識したアミノ酸（バリン）を用いて標識炭素とそれ以外の炭素との距離の解析を行う。2つの炭素を標識した試料では標識炭素原子間の1つの距離のみが得られるが、1つの炭素のみを標識する方法では、複数の距離が得られることが期待される。

4. 研究成果

【研究の主な成果】

図2で示した数式を用いて4種のアミノ酸（アラニン、ロイシン、セリン、グリシン）の微結晶の直接結合の距離を求めた。その結果、X線回折で得られた距離（全試料1.51Å）に対して、±3%以下の高い精度で距離を求めることが出来た（表1）。

また、カルボキシ基の炭素のみを炭素13標識したバリンにより、カルボキシ基とそれ以外の炭素間距離を12%以下の精度で求める事ができた（図3）。

3つ以上の炭素を炭素13標識した試料での交換速度を数式化したところ、2つの炭素13にはない3つの炭素13による項（3スピン項）が存在することが分かった。図4のように図2で示した交換速度 $k^{(2)}$ の組み合わせにより表される。3スピン以上になると図4の破線の枠で囲まれた項が加わるため、2スピンのみで計算した交換速度よりも大きい値となる。この枠で囲まれた項が本研究で新たに存在が示された3スピン項である。

$$k_{AB}^{(2)} \propto \frac{1}{R_{C-C}^6} \cdot \frac{T_R}{1 + [T_R(D_{C-H} + A)]^2}$$

$k_{AB}^{(2)}$: A,B間の交換速度 T_R : ゼロ量子緩和時間
(2スピンの状態変化の時定数)
 R_{C-C} : 炭素間距離 D_{C-H} : 炭素-水素間の
磁気双極子相互作用
A: 構造情報を含まない定数項

図2 2つの炭素13原子 A,B のみ存在する場合のAB間の交換速度の式

表1 各アミノ酸の直接結合に対して得られた距離の範囲

試料	距離の下限 / Å	距離の上限 / Å
2,3- ¹³ C-L-アラニン	1.53	1.57
1,2- ¹³ C-L-ロイシン	1.49	1.58
2,3- ¹³ C-L-セリン	1.52	1.56
1,2- ¹³ C-L-グリシン	1.51	1.57

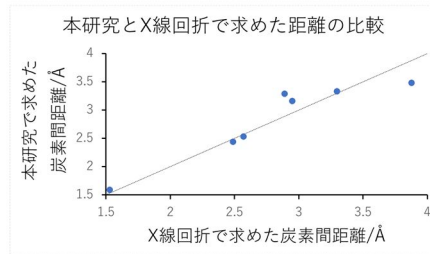


図3 本研究で得られた距離とX線距離の比較 $y=x$ の直線上に近いほど、得られた距離の精度が高い。

$$k_{AB}^{(N)} = k_{AB}^{(2)} + \frac{1}{4} \left(\sum_{i \neq A,B} k_{A,i}^{(2)} + \sum_{j \neq A,B} k_{B,j}^{(2)} \right)$$

図4 3スピン項を含む交換速度の式。ここで $k_{i,j}^{(2)}$ は2つの炭素のみの交換速度の式（図2）から得られるi番目、j番目の炭素原子間の交換速度を示す。また $k_{AB}^{(N)}$ はN個(N>2)の炭素13がある場合の炭素A,B間の交換速度を示す。

のカルボキシ基の炭素のみを炭素 1 3 標識したバリンの結果から、解析に用いる最長の相関時間（および用いるデータポイント数）を変えると、得られる距離が変わってしまうことが分かった。バリンのカルボキシ基とメチン基の解析結果を表 2 に示す。

表 2 のように、短い相関時間までで解析した場合より、長い相関時間までで解析する方が得られる距離が長くなっている。これは解析に用いたモデルでは分子内の 1 つの炭素間距離による相関を想定しているのに対し、実際には分子間の相関も影響していることが原因と考えられる。このデータポイント数を変えた解析により、複数の距離の解析を行えることが示唆された。

表 2 解析に用いた最長の相関時間、データポイント数と各解析で得られたバリンのカルボキシ基とメチン基の距離(文献値 1.51Å)

最長の相関時間/s	データポイント数	得られた距離/Å
0.006	3	1.52
0.0125	4	1.57
0.025	5	1.59
0.05	6	1.59
0.075	7	1.6
0.1	8	1.61
0.15	9	1.63
0.2	10	1.64
0.3	11	1.66
0.4	12	1.67
0.6	13	1.69
0.8	14	1.71

【本研究で得られた新たな知見】

主な研究成果 により、図 2 で示した交換速度の式を用いて実際に炭素原子間の距離を求められることが分かった。

主な研究成果 により、3 つ以上の炭素 1 3 が近傍に存在する試料では、「3 スピン項」と名付けた項が交換速度の式に加わることが分かった。

主な研究成果 により、解析に用いる最長の相関時間(及びそれに伴うデータポイント数)を変えながら解析を行うことで、複数の距離を分離して解析出来る可能性が示された。

【今後の展望】

上記の本研究で得られた新たな知見、
、
を用いることで、複数の炭素原子に対する高精度な距離解析が行えることが期待される。

< 引用文献 >

- [1] F. Castellani, et al., Nature **420**, 99 (2002)
- [2] A. Lange, et al., Angew. Chem. Int. Ed. **44**, 2089 (2005)
- [3] T. Manolikas, et al., J. Am. Chem. Soc. **130**, 3959 (2008)
- [4] M. Huber, et al., ChemPhysChem **12**, 915 (2011)
- [5] K. Iwata, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**, 18119 (2006)
- [6] S. Wang, et al., Nat. Methods **10**, 1007 (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大橋 竜太郎, 大木 忍, 出口 健三, 最上 祐貴, 丹所 正孝, 清水 禎, 水野 元博
2. 発表標題 1 スピンラベル試料を用いたDARR交換 1次元NMRによる炭素間距離解析
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋 竜太郎, 大木 忍, 出口 健三, 最上 祐貴, 丹所 正孝, 清水 禎, 水野 元博
2. 発表標題 1 スピンラベル試料を用いたDARR交換 1次元NMRによる炭素間距離解析
3. 学会等名 第64回固体NMR・材料フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋 竜太郎
2. 発表標題 13C標識アミノ酸を用いた炭素間の距離決定法の開発
3. 学会等名 金沢NMRセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋 竜太郎, 水野 元博
2. 発表標題 2次元交換NMRの交換速度に対する3スピンドリフープフロップの影響
3. 学会等名 第55回NMR討論会
4. 発表年 2016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
研究協力者	水野 元博 (MIZUNO Motohiro)		