

機関番号：12608

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750022

研究課題名 (和文) 生体系カルシウム 43 固体 NMR 法の開発

研究課題名 (英文) Development of solid-state calcium-43 NMR

研究代表者

山田 和彦 (YAMADA KAZUHIKO)

東京工業大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：80373380

研究成果の概要 (和文)：

生体分子中のカルシウムイオンの動的挙動観測を目指した新規実験手法として、固体カルシウム核磁気共鳴 (NMR) 法を提案する。カルシウムは人体内において、最も多く含まれるミネラルのひとつであり、種々の生理作用に深く関与している。しかしながら、カルシウムを測定対象とした NMR 法はほとんど使用されていない。本研究の目的は、カルシウム 43 を含む半整数四極子核固体 NMR の基礎データを収集してスペクトル解析法の基盤を築くことである。

研究成果の概要 (英文)：

A solid-state calcium-43 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is proposed for investigation of the molecular dynamics of calcium atoms and ions in biological compounds. Although ^1H , ^{13}C , and ^{15}N NMR spectroscopy has made a tremendous impact on the development of biological sciences, much less is known about calcium-43 NMR of biological compounds. In this work, I try to develop the fundamental of spectral analysis for half-integer quadrupole nuclei and possibly the unexplored field of solid-state ^{43}Ca NMR for applications to biological molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：物理化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：カルシウム、NMR、生物物理、

1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴 (NMR) 法は化学や物理のみならず生物の分野においても、標準的な実験手法として幅広く普及している。これは、NMR 法を使用することで、研究者が望む詳細な電子および分子情報を容易に得ることができ

ることに起因している。残念ながら、従来の研究では主に ^1H , ^{13}C , ^{15}N などスピン数 (I) が $1/2$ である双極子核にほぼ限定されている。しかしながら、測定対象の原子に核スピンの存在すれば ($I > 0$)、その NMR 測定が可能であることはあまり知られていない。原子の周期表から、アルゴンを除けばほとんど全ての

原子が核スピンを持っていることが分かる。つまり、ほとんどすべての原子を対象にした NMR 測定は理論上可能と言える。ところで、 $I > 1/2$ の核を四極子核と呼ぶが、四極子核を対象にした NMR 法はほとんど普及していない。その原因の一つに、核四極子相互作用の存在がある。これは四極子核スピンとその原子を含む分子が形成する電場勾配との静電的相互作用であり、双極子核には存在しない新たな緩和経路を生み出すことになる。例えば、溶液状態の試料を対象にした四極子核 NMR では、ほとんどの場合、この四極子核緩和の影響で NMR スペクトルの線幅が極端に広くなり、シグナル検出自体が困難になる。一方、試料を固体状態にして NMR 測定することで、この核四極子相互作用の問題を解決することができる。さらに、溶液 NMR で通常得られるパラメータは、スカラー量（例えば、 J 結合定数や等方的化学シフトなど）であるが、固体 NMR 法を駆使すると、テンソル量（例えば、 δ_{11} 、 δ_{22} 、 δ_{33} などの化学遮蔽テンソルの主値）として NMR パラメータを得ることが可能となる。つまり、固体 NMR 法を選択することで、従来 NMR 測定が不可能であった核種の測定が実現され、さらに、電子状態をより詳細に反映した NMR テンソル量の取得が可能となる。

概して、全原子のおよそ 2/3 は四極子核であり、代表的な四極子核のひとつにカルシウムが挙げられる。生体分子の研究において重要な原子であるカルシウムは、 ^{43}Ca ($I=7/2$ 、天然存在比 = 0.145%、核磁気回転比 = $-1.8025 \times 10^{-7} \text{ rad/Ts}$) を有しており、カルシウム NMR 法は理論上可能である。しかしながら、これまでタンパク質を対象にしたカルシウム NMR の研究報告は皆無である。

2. 研究の目的

これまでに培ってきた固体 NMR 法の知識と経験を活かして、タンパク質を対象としたカルシウム NMR 法の開発を目指す。そのためには、低分子有機化合物などのモデル化合物を使用して、固体 NMR 法の測定手法と解析技術を確立しなければならない。本研究では半整数四極子核固体 NMR 法の基盤研究となるスペクトル解析手法について検討を行った。

3. 研究の方法

カルシウム含有ペプチド中のカルシウムイオンをカルシウム 43 標識体へ交換する目的で合成実験を試みた。水酸化カルシウムをカルシウム 43 NMR の標準試料とした。また、カルシウム NMR の代替測定として、スピン数

がそれぞれ 5/2 と 3/2 である酸素 17 安定同位体とホウ素 11 安定同位体を含有する低分子有機化合物を使用した。独立行政法人物質・材料研究機構強磁場 NMR センターの ECA500 並びに 930MHz 装置で多核固体 NMR 測定を実施した。スペクトル解析には MATLAB を使用して著者が開発したプログラムを用いた。

4. 研究成果

カルシウム 43 はラーモア周波数が低いため試料を安定同位体標識する必要がある。種々の条件で標識実験を試みたが、安定同位体と Surrogate したことを確認できなかった。低分子化合物(非標識体)の固体 NMR 測定では、カルシウム 43 の FID 信号を観測したが、SN 比が低いため四極子相互作用に起因する NMR パラメータを取得することができなかった。そこで、本実験ではカルシウム (スピン数 7/2) の代替測定として、半整数四極子核である酸素やホウ素の測定を行い、そのスペクトルから四極子核に関連する NMR パラメータの算出を試みた。

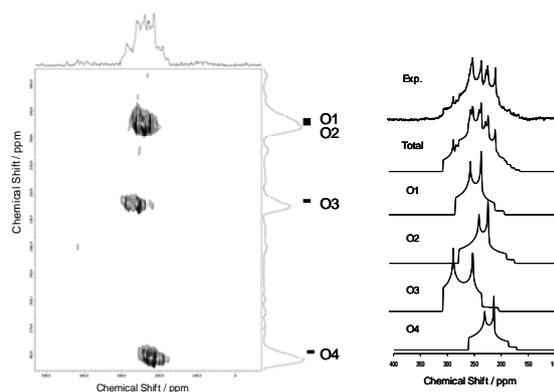


図1 スピン数 5/2 の MQMAS (左) と 1D MAS (右) スペクトル

図1にスピン数が 5/2 の Multiple-Quantum Magic-Angle Spinning (MQMAS) と 1D MAS のスペクトルを示す。この試料の結晶構造から 4 つの異なるサイトが存在することがわかった。従って 1D MAS スペクトルは線形が重なりスペクトル解析が困難である。しかしながら、例えば MQMAS 法を用いれば f_1 投影軸方向に等方的なスペクトルを得ることができ、それぞれのサイトの等方的化学シフト値 (δ_{iso})、核四極結合定数 (C_Q)、そして、非対称因子 (η_Q) を得ることができる。図1のような複雑な線形解析に力を発揮するので、四極子核固体 NMR の研究では必要不可欠なツールと言える。

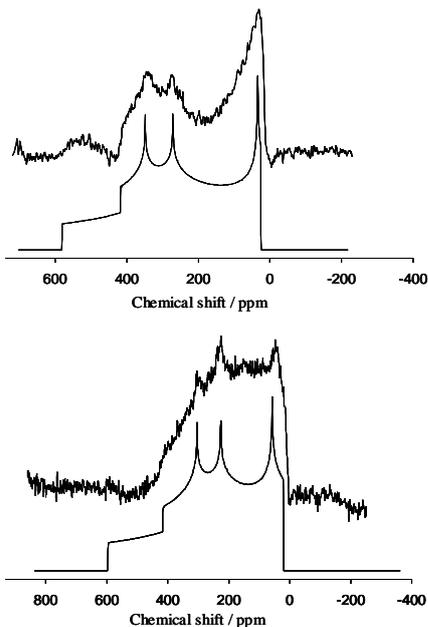


図2 半整数四極子核の静止状態における固体 NMR スペクトル

しかしながら、この測定方法では残念なことに CS テンソルの情報は失ってしまう。これまでにいくつかの CS テンソル量を取得する実験手法が発表されているが、著者が考える最も単純な手法は静止状態の粉末パターンを解析することである。例として、図2に半整数四極子核の固体 NMR 粉末パターンを示す。著者が開発したシュミレーションプログラムを活用して以下の NMR パラメータを得ることができた： $\delta_{\text{iso}} = 297 \pm 4$ ppm, $\delta_{11} = 535 \pm 9$ ppm, $\delta_{22} = 500 \pm 9$ ppm, $\delta_{33} = -44 \pm 9$ ppm, $C_Q = 8.4 \pm 0.1$ MHz, $\eta_Q = 0.24 \pm 0.04$, $\alpha = 0 \pm 6^\circ$, $\beta = 90 \pm 6^\circ$, $\gamma = 108 \pm 6^\circ$ 。生体分子における固体 NMR スペクトルは複雑な線形を示すことが多いので、図2に示した通り、複数の磁場で測定した実験スペクトルに対して最適化の結果を確認する方が無難である。 (α, β, γ) は CS と EFG テンソルの相対的な座標関係を表すオイラー角度である。例えば、 $(\alpha, \beta, \gamma) = (0^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$ であれば、CS テンソルと EFG テンソルが一致していることを、また、 $(\alpha, \beta, \gamma) = (0^\circ, 90^\circ, 90^\circ)$ であれば、 V_{IT} (EFG テンソルの主値の中間値) と δ_{11} が重なっていることを意味する。注意すべきことは、粉末パターンからの解析で得られる情報は CS テンソルと EFG テンソルの相対的な座標関係だけであり、分子座標上にこれら NMR テンソルを配置できなければ、物理的な意味は全くないことである。実験的に分子座標上の NMR テンソルを得るためには、単結晶 NMR 法が最も有効な手法として挙げられる。しかしながら、生

体分子の場合、NMR 測定が可能な大きい単結晶をつくるにはしばしば困難な場合が多い。代替の方法として粉末パターン解析で得られたオイラー角度と量子化学計算の結果を利用することがある。まず高度な非経験的分子軌道法などで EFG テンソル量を計算し、分子座標上の EFG テンソルの向きを正しいと仮定する。そして、実験で得られたオイラー角度を使って、CS テンソルを分子座標上に配置させることができる。以上のことから、半整数四極子核の固体 NMR スペクトル解析では、一つのサイトから八個の独立した NMR パラメータを取得することができ、更に分子座標におけるテンソルの配向に関する情報も取得出来ることが判明した。この豊富なパラメータを核周辺の局所的な分子構造や電子状態と相関づけることで、タンパク質の機能および構造解析の研究に応用できると期待される。

本研究の成果は、上述した通り、半整数四極子核固体 NMR スペクトルの解析法を確立したことである。カルシウムイオンもしくは原子が分子内で動いているシステム（例えば 3 回軸回転運動等）を想定して、相関時間を解析できる動的挙動解析のツールも開発した。粉末パターン的高速計算化と併せて、今後のタンパク質機能解析用のツールとして活用したい。生体分子を対象としたカルシウム 43 固体 NMR 法の今後の課題として、カルシウム 43 安定同位体標識方法の確立が挙げられる。カルシウム 43 は比較的高価なため、少量の標識体で確実に標識方法が求められる。NMR 測定法やスペクトル解析法の開発に目途がついたので、今後の安定同位体標識手法の発展に期待したい。

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 8 件)

- ① 山田和彦、橋爪大輔、清水禎、*N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-aspartic acid 4-*tert*-butyl ester, Acta Cryst. E65, o2606-o2607, 2009、査読有
- ② 山田和彦、橋爪大輔、清水禎、出口健三、*N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-isoleucine, Acta Cryst., E64, o1533, 2008、査読有
- ③ 山田和彦、橋爪大輔、清水禎、*N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-leucine, Acta Cryst., E64, o1112, 2008、査読有

有

- ④ 山田和彦、清水禎、山崎俊夫、大木忍、Determination of the orientations for the ^{17}O NMR tensors in a polycrystalline L-alanine hydrochloride、Solid State Nuclear Magnetic Resonance、33、88-94、2008、査読有
- ⑤ 山田和彦、清水禎、山崎俊夫、佐藤明、A solid-state ^{17}O NMR study of β -glycine: High sensitivity of ^{17}O NMR parameters to H-bonding interactions、Chemistry Letters、37、472-473、2008、査読有
- ⑥ 山田和彦、橋爪大輔、清水禎、大木忍、横山茂之、A solid-state ^{17}O NMR, X-ray, and quantum chemical study of *N*- α -Fmoc-protected amino acids、Journal of Molecular Structure、888、187-196、2008、査読有
- ⑦ 山田和彦、清水禎、大木忍、山崎俊夫、A solid-state ^{17}O NMR study of L-phenylalanine and L-valine hydrochlorides、Magnetic Resonance in Chemistry、46、226-234、2008、査読有
- ⑧ 山田和彦、清水禎、浅沼美和子、山崎俊夫、横山茂之、Experimental determination of orientations for ^{17}O electric-field-gradient and chemical shielding tensors in L-alanine、Solid State Nuclear Magnetic Resonance、33、25-30、2008、査読有

[学会発表] (計 4件)

- ① 山田和彦、Understanding of ^{17}O NMR tensors in biological solids、International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems、2008年8月24-29日、米国サンディエゴ
- ② 山田和彦、清水禎、横山茂之、大木忍、Both experimental and theoretical investigations of ^{17}O NMR tensors in biological solids、Gordon Research Conference Computational Aspects -biomolecular NMR、2008年5月17-24日、イタリア・バーガ
- ③ 山田和彦、生体分子系固体 NMR 法の開発、第 43 回固体 NMR・材料フォーラム、2008年5月12日、東京大学山上会館
- ④ 山田和彦、清水禎、山崎俊夫、大木忍、A

solid-state NMR study of small biological compounds、Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference、2008年3月9-14日、米国カリフォルニア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 和彦 (YAMADA KAZUHIKO)
東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：80373380