

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：63903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410158

研究課題名(和文)非標識固体試料解析のための固体NMR新規測定法開発

研究課題名(英文)Solid state NMR techniques for the analyses of unlabeled solid samples

研究代表者

西村 勝之(NISHIMURA, Katsuyuki)

分子科学研究所・物質分子科学研究領域・准教授

研究者番号：00334631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、固体核磁気共鳴法を研究手段として、解析試料の分子中に天然に存在する安定同位体を観測することにより、非破壊、無加工で当該試料の分子構造などの詳細な分子情報を取得することを目指し、この実現に資する測定法、および解析法の開発を試みた。さらに、これらの手法を複数の解析試料に適用し、信号帰属や詳細な分子構造の取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, methodology developments for solid state nuclear magnetic resonance to obtain molecular information precisely through the observation of naturally abundant isotopes in intact samples have been explored. Those approaches have been successfully applied to various samples to achieve signal assignments and structural characterizations.

研究分野：固体核磁気共鳴法

キーワード：固体NMR 測定法 開発 安定同位体 天然存在比

### 1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴法(NMR)は、非破壊で分子の詳細な構造情報などを得ることが可能な手法であり、有機化合物の同定、および解析に溶液NMRが広く用いられている。しかし、有機溶媒に不要な化合物、および固体状態での分子構造、および物性の同定が必要な試料は数多く存在する。このため、固体NMRを用いた有機化合物の測定法、および解析法の開発は極めて重要である。しかし、固体試料では、溶液状態と異なり分子運動が抑制されているため異方的相互作用間が支配的であり、特に磁気双極子相互作用などの空間を通じた相互作用により多スピン系であることが一般的である。このためスペクトルは複数の相互作用に起因する複雑な線形のスペクトルを示す。静磁場から54.7度傾けたmagic angleで試料管を高速回転させることにより、異方的相互作用の空間依存性を時間平均して消去することにより、溶液NMRと同様に等方化学シフトに基づく、比較的高分解能なスペクトルを得ることが可能であるが、溶液NMRのスペクトルに比べ10倍以上広幅であり、検出感度も低い。これらの理由により、信号重複の回避、さらに特定スピン間相互作用の分離観測、スペクトル感度向上を目的として、これまで部位特異的安定同位体標識した試料の観測が広く行われてきた。このため、これまで開発されてきた測定法は、安定同位体標識した試料の観測を前提としているものが多い。しかし、近年の高磁場化や試料回転技術の向上に代表される技術開発により、固体NMRスペクトルの検出感度は著しく向上してきた。さらに、天然存在同位体の観測では、原理的に多スピン系の問題を回避し易い利点が存在する。このため、天然存在同位体観測に基づく固体NMRを用いた分子構造解析が一部の試料で有効になりつつある。

### 2. 研究の目的

精密な構造情報などが必要な解析対象となる重要な固体試料は、一般的に試料量が限定され、かつ安定同位体標識などの試料調製は困難である場合が多い。このため、特別な試料調製などを行わず解析試料の分子中に存在する天然存在同位体を観測することにより、分子の詳細な構造情報を取得する手法の開発は極めて重要である。このような観点から、本研究では固体状態の解析試料で天然存在同位体を観測し、信号帰属、および構造情報取得など当該試料の解析に資する固体NMR測定法、および解析法の開発を試みた。さらに、これらの手法を複数の新規合成有機化合物や生体分子の解析に適用し、その有効性を検証した。

### 3. 研究の方法

本研究では、固体NMR実験は主にBruker社製 Avand 600分光器、および2.5mm O.D.  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  3重共鳴 magic angle spinning (MAS) プローブを用いて行った。測定法の検討

には、複数の参照試料を用いた。複数の共同研究者より試料の提供を受けた新規に化学合成された有機化合物、および生合成された生体分子の解析を行った。

(1) 有機化合物は主に炭素骨格により構成されており、天然に存在する $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 安定同位体のみを観測核として、高感度で有効な $^1\text{H}$ 、および $^{13}\text{C}$ 信号の連鎖帰属法の検討を行った。

(2) 検討した信号帰属法を新規化学合成された有機化合物の構造解析に適用し、その有効性を検証した。

(3) 解析対象の試料に、安定同位体標識した分子を含有させ、標識同位体からの磁気双極子相互作用を解析対象の分子の天然存在同位体で観測することにより、分子構造情報を取得することを目的とした有効な測定法を開発を試みた。

(4) 安定同位体全標識分子と非標識分子の混合試料で、非標識試料由来の信号を消去して、安定同位体全標識分子からの信号のみを選択的に観測するための有効な関連NMR法を開発を行った。

### 4. 研究成果

(1)  $^1\text{H}$ 、および $^{13}\text{C}$ 核天然存在同位体観測に基づく信号帰属法の開発

INADEQUATE法、およびCOSY法による安定同位体非標識試料の解析では、天然に1.1%存在する天然存在 $^{13}\text{C}$ 同位体間の $^{13}\text{C}$ 同種核相関スペクトルを測定する。これに対して $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核相関スペクトルでは、 $^1\text{H}$ の天然存在比が $^{13}\text{C}$ の100倍近くになるため、より高感度なスペクトルが得られる。

本研究では、2種の初期磁化準備期を適用した $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核相関NMRスペクトルの組み合わせに基づき、 $^1\text{H}$ 化学シフト経由で $^{13}\text{C}$ 信号の信号帰属を行う手法を検討した。FSLG法により $^1\text{H}$ 同種核間磁気双極子相互作用を消去し、 $^1\text{H}$ の化学シフトを展開した。LG-CPMAS法により、 $^1\text{H}$ 同種核間磁気双極子相互作用を消去しながら、数十 $\mu\text{s}$ の短い接触時間を用いて、 $^1\text{H}$ から直接化学結合した $^{13}\text{C}$ 核にのみ磁化移動させ、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核相関スペクトルを得た。本スペクトルの解析から、 $^1\text{H}$ から直接化学結合した $^{13}\text{C}$ 核の信号相関を得た。 $^{13}\text{C}$ 核の種をdipolar dephasingなどのスペクトル編集技術を用いて判別し、大まかな信号帰属を行った。次に中・長距離の異種核相関を得るNMR法の一種、MELODI異種核相関NMR法を適用した。本測定法を用いて、MAS条件下で $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核間磁気双極子相互作用を復活させ、天然存在同位体の $^{13}\text{C}$ 核に化学結合した $^1\text{H}$ 磁化をdephasingさせる。同 $^1\text{H}$ 磁化がゼロになるdephasing条件下で、 $^{12}\text{C}$ に化学結合した $^1\text{H}$ 磁化を $^1\text{H}$ 化学シフトで時間発展させた。200数十 $\mu\text{s}$ 程度のLG-CPMASの接触時間を設定し、 $^{12}\text{C}$ と化学結合している $^1\text{H}$ から化学結合していない隣接の $^{13}\text{C}$ 核へ磁化移動を生じさせ、中距離 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核相関スペクトルを得た。上述2種の異種核相関スペクトルで得られた相関情報を $^1\text{H}$ の化学シフト値を

介して解析し、化学結合により隣接する炭素間の信号の連鎖帰属が可能であることを検証した。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核相関スペクトルにおいて $^1\text{H}$ 側で十分な分解能が得られない場合、本測定のみで一義的な信号帰属は困難となる。このため、本解析手法は比較的小分子に有効であると考えられる。

#### (2) 合成有機化合物の分子構造解析

検討した上述の一連の手法を、新規に化学合成された有機化合物1,1',9,9'-bicarbazole (BC)の酸性条件下で結晶化された試料に適用し、信号帰属、および構造解析を試みた。 $^{13}\text{C}$ 核のスペクトルでは、全炭素数より多い信号が観測された。これらの信号の一部は、信号強度がほぼ等価な2対の信号であり、当該分子中央の対称軸に対して芳香環構造が非対称な構造、または2種のわずかに構造の異なる分子の混合状態が考えられるが、後者は信号強度がほぼ等価であることから、可能性が低いと考えられた。上述の2種の $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核相関スペクトル、および $^1\text{H}$  dephased中距離 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核相関スペクトルの測定を行い、 $^1\text{H}$ を介した信号帰属法を用いて $^1\text{H}$ 、および $^{13}\text{C}$ の全ての信号帰属に成功した。またその後、本分子のX線結晶解析から分子中央の対称軸に対して、左右の芳香環の配座が非対称な構造であることが判明した。これは、NMRの解析により得られた、本分子が固体状態で閉環構造であり、わずかな分子の非対称性を示す2対の炭素信号の結果と完全に一致し、固体NMRの正確な解析結果が裏付けられた。

この他、スペクトル編集技術などを用いて、新規合成高分子の各合成過程の純度の検証解析、天然物の分解過程の解析、さらに複数の異なる条件で得られた $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核相関スペクトルの解析に基づき、2種の合成化合物の複合状態の分子配座解析などを行った。

#### (3) 天然存在同位体観測に基づく隣接安定同位体標識分子からの磁気双極子相互作用測定法の開発

$^{15}\text{N}$ 安定同位体単一標識した試料を解析対象試料に含有させる、同分子の $^{15}\text{N}$ 標識安定同位体からの磁気双極子相互作用を解析分子の天然存在同位体 $^{13}\text{C}$ で観測することにより、同 $^{15}\text{N}$ からの各 $^{13}\text{C}$ までの精密距離情報を同時に取得する手法の開発するため、MAS下で弱い $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ 異種核間磁気双極子相互作用を復活させる手法を検討した。高感度スペクトルを得るには高磁場の利用が好ましいが、高磁場では化学シフト異方性に起因するスピニングサイドバンドが生じるため、高速MASの使用が必須となる。

本目的には、Rotational Echo Double Resonance (REDOR)法が古くから用いられているが、高速MAS下ではパルス有限長効果が生じる。本問題が原理的に生じない新規手法として、標識同位体に照射するラジオ波の位相を回転周期に同期して連続的に変化させる2

種類の新規測定法の検討を行った。1つ目の測定法は、理論的には有効であるが、実験では上手く作動しないことが判明した。2つ目の測定法では、異種核間磁気双極子相互作用の復活に起因する磁化のdephasingに基づく特定周期での有意な信号強度減少の観測に成功した。しかし規格化したdephasing曲線の解析では、dephasingオフセットが観測された。これは $^1\text{H}$ デカップリングとの干渉、またはDC成分の残留が原因と考えられた。 $^1\text{H}$ デカップリング強度の増加で若干の改善が見られた。さらに複数の位相サイクルを検討してDC成分の消去を行い改善が見られたが、理論曲線との比較では、dephasing周期は一致しているが、10%程度のオフセットが残留した。本DC成分は、dephasing曲線をフーリエ変換しスペクトル線形をフィッティングする解析手法では、DC成分の寄与を除去した解析が可能であるが、比較的近距离の情報取得に制限される。

#### (4) 安定同位体標識試料での天然存在同位体に起因するバックグラウンド信号の削除法の検討

安定同位体全標識試料では、2量子コヒーレンスフィルタリングにより天然存在同位体由来のバックグラウンド信号の削除が可能であるが、天然存在同位体試料より一般的に短いスピンスピン緩和時間を示す。このため、十分なスペクトル感度の確保には、短時間の2量子コヒーレンスの励起、および1量子コヒーレンスへの変換が必要である。

本研究では、 $^{13}\text{C}$ 核間スピンスピン結合に基づき、短時間で2量子コヒーレンスを励起し、1量子コヒーレンスへ変換する固定時間磁化発展法を併用した有効な2量子フィルタリング $^{13}\text{C}$ 同種核間相関NMRを検討した。解析試料は、アルツハイマー病への関与が報告されているアミロイドベーターの内、繊維化速度が遅い40残基のアミノ酸から成るAb<sub>40</sub>を解析試料とした。既存の研究から、同ペプチドは細胞膜などの脂質膜上で繊維形成が促される可能性が示唆されており、同脂質膜上での繊維化中間体を補足、および構造解析を試みた。 $^{13}\text{C}$ 安定同位体全標識した同分子を中性脂質DMPCからなるマルチメラベシクルに結合後、直に凍結乾燥させた試料を用いた。同試料に既存のUC-DQCOSY法を適用し信号帰属を試みたが、短いスピンスピン緩和時間により十分なスペクトル感度を得ることは困難であった。上述の測定法の改変型の2量子フィルタリングを放棄し、間接軸の $^{13}\text{C}$ 化学シフトの時間発展を固定化した手法が別途提案されている。本研究では、これを改良し2量子フィルタリング能を保持し、2量子コヒーレンス、および $^{13}\text{C}$ 化学シフトの時間発展期を兼ねた固定発展時間を用いて、短いスピンスピン緩和時間でも測定が可能な手法を開発した。同一試料を用いたDipolar Assisted Rotationl Resonance (DARR)法との比較から、開発した測定法では脂質由来の信号を消去、さらにDARR法では消

失して観測できない複数の相関信号を得ることに成功した。本測定法を用いて一連の信号帰属を行い、化学シフト値の解析から2次構造を同定し、Ab<sub>40</sub>の中性脂質膜上での繊維化中間体の立体構造決定に成功した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

M. Yagi-Utsumi, K. Kato, K. Nishimura, Membrane-Induced Dichotomous Conformation of Amyloid with the Disordered N-Terminal Segment Followed by the Stable C-Terminal Structure, PlosONE、査読有、Vol.11、2016、pp.0146405 (1-10)  
DOI:10.1371/journal.pone.0146405

P. Pandit, K. Yamamoto, T. Nakamura, K. Nishimura, Y. Kurashige, T. Yanai, G. Nakamura, S. Masaoka, K. Furukawa, Y. Yakiyama, M. Kawano, S. Higashibayashi, Acid/Base-Regulated Reversible Electron Transfer Disproportionation of N-N Linked Bicarbazole and Biacridine Derivatives, Chemical Science、査読有、Vol.6、2015、pp.4160-4173  
DOI: 10.1039/C5SC00946D

S. Ito, W. Wang, K. Nishimura, S. Nozaki, Formal Aryne/Carbon Monoxide Copolymerization To Form Aromatic Polyketones/Polyketals, Macromolecules、査読有、Vol.48、2015、pp.1959-1962  
DOI:10.1021/acs.macromol.5b00315

T. Asakura, T. Ohata, S. Kametani, K. Okushita, K. Yazawa, Y. Nishiyama, K. Nishimura, A. Aoki, F. Suzuki, H. Kaji, A. Ulrich, M. Williamson, Intermolecular Packing in Bombyx mori Silk Fibroin: Multinuclear NMR Study of the Model Peptide (Ala-Gly)<sub>15</sub> Defines a Heterogeneous Antiparallel Antipolar Mode of Assembly in the Silk II Form, Macromolecules、査読有、Vol.48、2015、pp.28-36  
DOI:10.1021/ma502191g

T. Asakura, Y. Suzuki, K. Yazawa, A. Aoki, Y. Nishiyama, K. Nishimura, F. Suzuki, H. Kaji, Determination of Accurate <sup>1</sup>H Positions of (Ala-Gly)<sub>n</sub> as a Sequential Peptide Model of Bombyx mori Silk Fibroin before Spinning (Silk I), Macromolecules、査読有、Vol.46、2013、pp.8046-8050  
DOI:10.1021/ma401531m

[学会発表](計8件)

Maho Yagi-Utsumi, Katsuyuki Nishimura, Kaoichi Kato, "NMR characterization of conformational transition of amyloid -peptide promoted on gaglioside clusters", The 2015 international Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu USA, 2015.12.15-2015.12.20

パンディット パラッシュ、山本 浩二、中村 敏和、西村 勝之、重倉 祐輝、柳井 毅、中村 豪、正岡 重行、古川 貢、東林 修平、"酸性応答ピカルバゾール誘導体"、日本化学会第95回春季年会、日本大学理工学部船橋キャンパス、千葉県・船橋市、2015.3.26-2015.3.29

平沖 敏文、小林 哲雄、矢澤 宏次、西山 祐介、朝倉 哲郎、西村 勝之、吉田 嘉晃、馬場 康輝、田端 昌祥、"超高速<sup>1</sup>H MAS NMRによる置換ポリアセチレンの固体構造の研究"、第53回NMR討論会、大阪大学、大阪府・吹田市、2014.11.4-2014.11.6

平沖 敏文、小林 哲雄、矢澤 宏次、西山 祐介、朝倉 哲郎、西村 勝之、吉田 嘉晃、馬場 康輝、田端 昌祥、"超高速<sup>1</sup>H MAS 固体高分解能NMRによる置換ポリアセチレンの固体構造の研究"、第63回高分子討論会、長崎大学、長崎県・長崎市、2014.9.24-2014.9.26

平沖 敏文、小林 哲雄、矢澤 宏次、西山 祐介、朝倉 哲郎、西村 勝之、"超高速<sup>1</sup>H MAS NMRのラセン高分子への応用"、第63回高分子学会年次大会、名古屋市国際会議場、愛知県・名古屋市、2014.5.28-2014.5.30

新井 裕喜、大畑 卓也、瀧口 亮太、鈴木 悠、西村 勝之、朝倉 哲郎、"高分解能<sup>1</sup>H固体NMRを用いた絹モデル化合物の構造解析"、第63回高分子学会年次大会、名古屋市国際会議場、愛知県・名古屋市、2014.5.28-2014.5.30

矢澤 宏次、大畑 卓也、西山 祐介、西村 勝之、朝倉 哲郎、"高分解能<sup>1</sup>H固体NMRを用いた生体分子の分子間構造解析"、第53回固体NMR・材料フォーラム、産業技術総合研究所 臨海副都心センター別館、東京都・江東区、2013.4.16-2013.5.16

K. Ogata, S. Sasa, M. Inoue, M. Yano, and K. Nishimura, "<sup>1</sup>H solid-state NMR characterization of aqueous grown ZnO nanorods with different growth

temperatures", 16th International  
Conference on II-VI compound and  
Related Materials(II-VI 2013),  
Nagahama Royal Hotel, Nagahama, Shiga,  
2013.9.9-2013.9.13

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西村 勝之 (NISHIMURA, Katsuyuki)  
分子科学研究所・物質分子科学研究領域・  
准教授  
研究者番号：00334631