

氏 名	野 村 薫
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2072 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Development of a Selective Homonuclear Dipolar Recoupling Method in Magic-Angle Spinning Solid-State NMR and Its Application to the Structural Analysis of a Molecule
	(マジック角度回転固体 NMR における同種核間双極子相互作用の選択的復活法の開発と分子の構造解析への応用)
	(主査)
論 文 調 査 委 員	助教授 竹腰清乃理 教 授 郷 信 広 教 授 寺 尾 武 彦

論 文 内 容 の 要 旨

固体NMR法では、核スピンの異方的化学シフト相互作用や核スピン関の双極子相互作用の大きさ、および、これらのテンソルの方向を測定することで、分子の構造情報を得ることができる。これまでに開発された固体NMR法では、ある単独の相互作用の大きさや方向のみを決定することしかできないために、分子の特定の炭素や窒素のペアをスピン量子数1/2の ^{13}C や ^{15}N でラベルした試料を用いる必要があった。したがって、分子全体の構造を決定するためには ^{13}C や ^{15}N で選択的にラベルした試料を多数用意しなければならなかった。

申請者は多くのスピンを含む試料において、いったん全ての異方的相互作用を消去し、特定やスピンペア間の双極子相互作用のみをラジオ波照射により選択的に復活し測定できる手法(傾斜回転系における回転共鳴法:R2TR法)の開発を行った。これは、ラジオ波照射により双極子相互作用のスピン部を振動させることでMASによる空間部の平均化を阻害するという方法であり、申請者は平均ハミルトニアン理論に摂動理論を組み合わせた理論を展開することで、ラジオ波照射の効果を詳細に解析した。その結果、双極子相互作用の復活条件はある特定のペアのスピンの有効磁場の強度をそれぞれ ω_{a1} 、 ω_{a2} とすると、DQ(2量子)条件($\omega_{a1} + \omega_{a2} = n\omega_R$)、2つのSQ(1量子)条件($\omega_{a1} = n\omega_R$ または $\omega_{a2} = n\omega_R$)、そして、ZQ(0量子)条件($\omega_{a1} - \omega_{a2} = n\omega_R$)の4つで与えられることを示した。このように多くの復活条件を持つことと共に、ラジオ波磁場の照射位置 ω_0 と強度 ω_1 、及びMASの回転周波数 ω_R という3つの実験的に調整可能なパラメーターをもつことはR2TR法の大きな利点である。申請者は、化学シフト差や回転周波数などの状況に応じてこれらの条件を適切に選ぶことにより、双極子相互作用を消去するのに十分な速さの回転速度下で任意の化学シフト差を持った特定のスピンペアの間に働く双極子相互作用のみを選択的に復活できる可能性を示し、3つの炭素核をすべて ^{13}C でラベルしたL-アラニンを用いて、これらの理論の結果に対する実験的な検討を行った。まず、DQ、SQ、ZQ条件の下で、双極子相互作用の復活を試み、それぞれの条件下で双極子相互作用が選択的に復活することを示した。特に、従来の回転共鳴法では化学シフト差が小さくて選択的に復活することが困難だったメチン炭素-メチル炭素間の双極子相互作用も、R2TR法では選択的に復活させることができることを示した。また、R2TR法では回転周波数に対する制限が少ないために、回転周波数を大きくすることによって化学シフトの影響を少なくできることも明らかにした。

R2TR法による深極子相互作用の復活は、ラジオ波のON/OFFで制御することができるために、ラジオ波の照射位置や強度を切り替えることで、任意のペアの間の双極子相互作用を次々に選択的に復活させて、それらの相関を測定する多次元NMRへの応用を可能にする。そこで申請者は、R2TR法による双極子多次元相関NMRを用いて、二面角などの重要な角度情報が測定できるのではないかと考え、そのような相関実験に必要なR2TR法による選択的な磁化移動を有効に行うた

めの条件等をまず検討した。測定試料には3つの炭素核をすべて ^{13}C でラベルしたL-アラニンを用い、R2TR法のDQ, ZQどちらの条件下でも選択的に磁化を移動できることを示した。また、磁化移動に必要な混合時間は、核間距離が約1.5 Åであるメチン炭素-メチル炭素間では約0.5msであり、核間距離が約2.1 Åであるカルボキシル炭素-メチル炭素間では約5 msであることを明らかにした。さらに、磁化を有効磁場の方向に向ける工夫をすることで、効率よく磁化が移動することを示した。また、選択的な磁化移動のためには注目している核スピンペアの一方とそれ以外の核スピンの化学シフト差が1 kHz以上あることが必要であることも明らかにした。

申請者は、以上のような理論的な考察と実験的な検証を行った後に、すべての炭素、窒素を ^{13}C と ^{15}N でラベルしたグリシロイソロイシンの粉末試料を用い、R2TR法によりその3次元構造を決定することを試みた。ペプチド分子の3次元構造は、結合長と結合角に標準値を仮定すると、限られた数の二面角により記述できる。二面角は、4つの核A, B, C, Dが結合したA-B-C-D系においては、A-D間の核間距離を測定することで決定できる。申請者は、注目する二面角のA-Dに対応する間の双極子相互作用をR2TR法を用いて選択的に復活し、双極子相互作用による磁化移動の時間依存を観測した。得られた磁化移動曲線に対しシミュレーションを行った結果、片方の核スピンの化学シフトが小さい場合には、磁化移動曲線は核間距離のみに依存するが、両方の化学シフトが大きい場合には、双方の核スピンの化学シフト異方性と核間ベクトルの相対方向にも依存することがわかった。したがって、後者の場合には、磁化移動曲線を核間距離と相対方向の2つのパラメータでフィッティングし、二面角を求めた。また、多次元相関NMRスペクトルからも二面角を決定した。このようにして、5種のスピンペアに対するR2TR実験から6つの二面角を決定し、3次元構造を決定した。得られた構造は、X線構造解析で得られた構造とよい一致を示した。これは、単一の粉末試料を用いた固体NMR法による初めての3次元分子構造の完全決定であり、この方法により蛋白質などの生体高分子における活性部位等の重要な局所構造を決定できる可能性を示すことができた。

論文審査の結果の要旨

蛋白質などの生体高分子の構造決定のための方法論としては、主に、単結晶試料を用いたX線結晶構造解析と溶液試料を用いた溶液NMRがあげられる。これらはいずれも分子の全体構造を決定することのできる強力な方法であるが、活性部位などの局所構造を精密に決定することは原理的に不可能である。また、ペプチドなどの小さな生体分子、不溶性の蛋白質、非結晶の複合体など適用が難しい試料が存在する。固体NMRでは、単結晶や試料の水溶性を必要とせず、粉末状態の試料を用いることができる。また、分子の局所構造を精密に決定できるという利点をもつ。そこで現在、構造と機能の関連を究明するために活性部位などの局所構造を精密に決定出来る方法、従来の手法では決定出来なかったペプチドや不溶性蛋白質の構造決定に用いることの出来る手法として、固体のNMR法による構造決定法が希求されている。

固体NMR法では、核スピンの異方的な相互作用テンソルの大きさや、相対方向を測定することによって、分子の構造情報を得る。例えば、二つのスピン間の双極子相互作用の大きさからスピン間の距離が求められる。これまでに、スピン間の距離測定法やテンソル間の相対方向決定法が数多く提案されている。しかし、これまでに開発された殆どの構造決定法には、実用的な点から見て、一つの大きな問題がある。つまり、従来の手法は1対の相互作用するスピン、つまり、2スピン系にしか精度良く適用できない。したがって、分子の特定の炭素や窒素のペアのみをスピン量子数1/2の ^{13}C や ^{15}N でペアラベルした試料を用いる必要がある。つまり、ある程度の局所構造を決定するためには ^{13}C や ^{15}N で選択的にラベルした試料を多数用意しなければならないという欠点がある。この点に着目した申請者は、多くのスピンを含む試料において、まず高速マジック角試料回転法(MAS)を行い、いったん全ての異方的相互作用を消去し、その後、ラジオ波照射により特定のスピンペア間の双極子相互作用のみを選択的に復活できる手法が必要であると考え、傾斜回転系における回転共鳴法(R2TR法)を開発した。

申請者は平均ハミルトニアン理論に摂動理論を組み合わせた理論を展開することで、ラジオ波照射の効果を詳細に解析し、最適な照射条件や化学シフト異方性の影響を検討した。そして3つの炭素核をすべて ^{13}C でラベルしたL-アラニンを用いて、これらの理論の結果に対する実験的な検証を行い、選択性や化学シフトの影響の制御等について検討した。このような高速MAS下で同種核間双極子相互作用を選択的に復活させる方法としては、すでに回転共鳴法(R^2)法が提案されている。し

かし、 R^2 法では化学シフト差が小さいペアの場合にはMASの回転周波数を小さくする必要があり、(1)注目する相互作用以外の異方的相互作用を平均化できない、(2)多数の回転サイドバンドが現れるという欠点がある。また、周波数の差が同じペアが一つ以上ある場合にはこれらの双極子相互作用も同時に復活してしまうという欠点もある。申請者の開発した $R2TR$ 法においては、照射するラジオ波磁場の照射位置、強度、および、MASの回転周波数という3つの実験的に自在に変えるパラメーターをもつ。申請者は、これらの値を適切に設定することで、双極子相互作用を消去するのに十分な速さの回転速度下で任意の化学シフト差を持った特定のスピンペアの間に働く双極子相互作用のみを選択的に復活できることを示した。また、 $R2TR$ 法では、ラジオ波のON/OFFで双極子相互作用のON/OFFを制御することができるという R^2 法にはない特徴を持っている。申請者はこの特徴を生かして、二つの双極子相互作用テンソル間の多次元相関NMRを測定することで、二面角が測定できることも示し、そのような相関実験に必要な選択的な磁化移動をも $R2TR$ 法で行えることを示した。このように、申請者は $R2TR$ 法が多スピン系を用いた構造決定に必要な性能を持っていることを示した。

申請者は、さらにその有用性を示すために、すべての炭素、窒素を ^{13}C と ^{15}N でラベルしたグリシルイソロイシンの粉末試料を用い、 $R2TR$ 法のみを用いて、主鎖の構造を記述する4つの二面角と、側鎖の構造を決定する2つの二面角を求め、全体の3次元構造を決定した。得られた構造は、X線構造解析で得られた構造とよい一致を示した。これは、固体NMR法による単一の粉末試料を用いた初めての3次元分子構造の完全決定であり、申請者の示した手法により蛋白質などの生体高分子における活性部位等の重要な局所構造を決定できる可能性が示された。

以上、申請者の研究は、多スピン系における選択的な双極子相互作用の復活法を開発するとともに、その実用性およびその限界を示し、実際にジペプチドの三次元構造を1種の粉末試料から求めることで、固体NMR法により分子構造が決定できることを示した最初の研究である。本研究の方法では粉末試料を用いるために、長距離秩序を持たない乱れた系においても構造情報が得られる。したがって、本研究は、構造生物学に留まらず、広く構造化学全般にも貢献できるものと思われる。したがって、本申請論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について諮問した結果、合格と認めた。