

固体 2 次元交換 NMR を用いた炭素間距離の解析法の開発

(金沢大院・自然) ○瀧澤直樹, 大橋竜太郎, 井田朋智, 水野元博

Development for determination of C-C distance using solid-state two-dimensional exchange NMR

(Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa Univ.)

○Naoki Takizawa, Ryutaro Ohashi, Tomonori Ida, Motohiro Mizuno

【序】

タンパク質の立体構造はその機能と大きく関わっており、生命科学や創薬といった分野においてはタンパク質の構造決定が不可欠となる。構造解析には X 線結晶構造解析や溶液 NMR などの方法が用いられているが、難溶性で結晶化が困難な膜タンパク質や繊維状タンパク質等の解析はこれらの手法では困難であった。そのため、結晶ではない粉末試料での測定が可能である固体 NMR を用いたタンパク質の構造解析法が現在求められている。

溶液 NMR では $^1\text{H} - ^1\text{H}$ 間の距離情報から構造を解析する NOESY 法が確立されているが、固体 NMR では ^1H の高分解能での観測は困難であることや、固体では核オーバーハウザー効果 (NOE) による交換が起こりにくいことから $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ 間の距離情報を用いた解析が行われている。しかし、交換 NMR における交換速度は炭素間の距離以外にゼロ量子状態の緩和にも依存するため、距離を解析的に求めることは困難であった。

本実験では分子内の炭素を全て ^{13}C 標識したアミノ酸を試料とし、固体交換 NMR 実験において炭素間の相関を起こす手法として DARR 法^[1]を用いた。DARR 法は多スピン系で遠い炭素間の相関を得ることができる手法であり、他の手法では現れない遠い核種間の交差ピークを観測することができる。従来、DARR 法のような 2 次元交換 NMR の手法を用いて得られた交差ピークの強度を用いて距離の解析が行われる。しかし、今までの解析法は交差ピークの有無から経験的に距離を見積もるものであったため、精度のよい距離情報は得られなかった。本研究では交換 NMR スペクトルのピーク強度時間変化から炭素間距離を解析的に求め、距離情報の精度の向上を試みた。

【実験】

今回、すべての炭素核を ^{13}C 標識したアミノ酸の粉末試料を用いて DARR 法による固体 2 次元交換 NMR 測定を行った。試料は標識試料と天然存在比の試料を 1:9 で混合し、水中で再結晶化することで調製した。NMR 測定は 6.9 T の磁場 (^{13}C : 74.175 MHz, ^1H : 294.99 MHz) で JEOL ECA-300 を用いて行った。4 mm 試料管に試料を入れ、10 kHz のマジック角回転 (MAS) の下で測定を行った。磁化の交換時間 τ_m は 5, 10, 20, 50, 100, 200 ms とした。また、天然存在比の試料を用い ^{13}C の T_1 測定を行った。2 次元交換 NMR 測定によって得られる交差ピーク強度、及び T_1 測定の結果を用いることで変数の最適値を求めた。

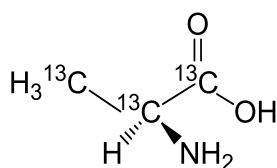


Fig. 1 $^{13}\text{C}_3\text{-L-Ala}$ の構造式

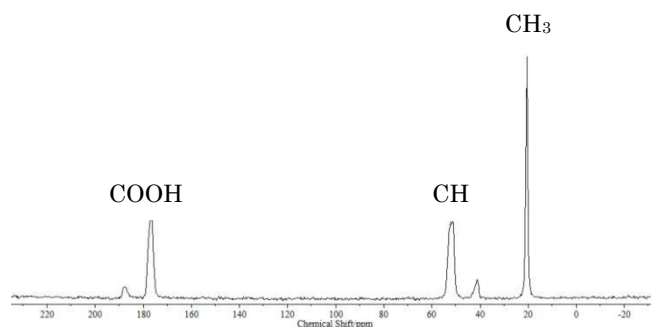


Fig. 2 $^{13}\text{C}_3\text{-L-Ala}$ の ^{13}C -MAS-NMR スペクトル

【結果・考察】

分子内の3つの炭素を ^{13}C 標識した $^{13}\text{C}_3\text{-L-Ala}$ の構造式(Fig. 1)と粉末試料を測定して得られた ^{13}C -MAS-NMR スペクトル(Fig. 2)、及び2次元交換NMR スペクトル(Fig. 3)を示す。直接結合したCOOH基とCH基、CH基と CH_3 基、及び空間的に近接しているCOOH基と CH_3 基の間で磁化の交換が起こり、2次元交換NMR スペクトル上で交差ピークが観測される。COOH基とCH基、CH基と CH_3 基の直接結合しているスピンペアについて、それぞれの炭素間の結合距離は $1.5\text{\AA}$ であることがX線結晶構造解析から明らかになっている^[2]。これらのスピン間の相関によって観測される交差ピーク強度について炭素間の距離を固定して実測と計算の比較を行い、距離以外の変数の最適値を決定した。これによって求められた変数を用い、Fig. 3の丸で示されたCOOH基と CH_3 基間の長距離の炭素間相関によって観測される交差ピーク強度の混合時間変化について解析し、距離制限の決定を行った。実測値と計算値の比較によって距離の最適値を求めた結果、COOH基と CH_3 基間の炭素間距離の取り得る値の範囲は $2.26\text{\AA} < r_{AB} < 2.29\text{\AA}$ となり、X線結晶構造解析から求められた文献値($2.5\text{\AA}$)に近い値を得ることができた。得られた炭素間距離は文献値と比較すると短い値であるが、これはCOOH基と CH_3 基間の直接の磁化移動だけでなく、CH基を介した磁化の移動も起こっていることが原因ではないかと考えられる。その点については今後検討する。

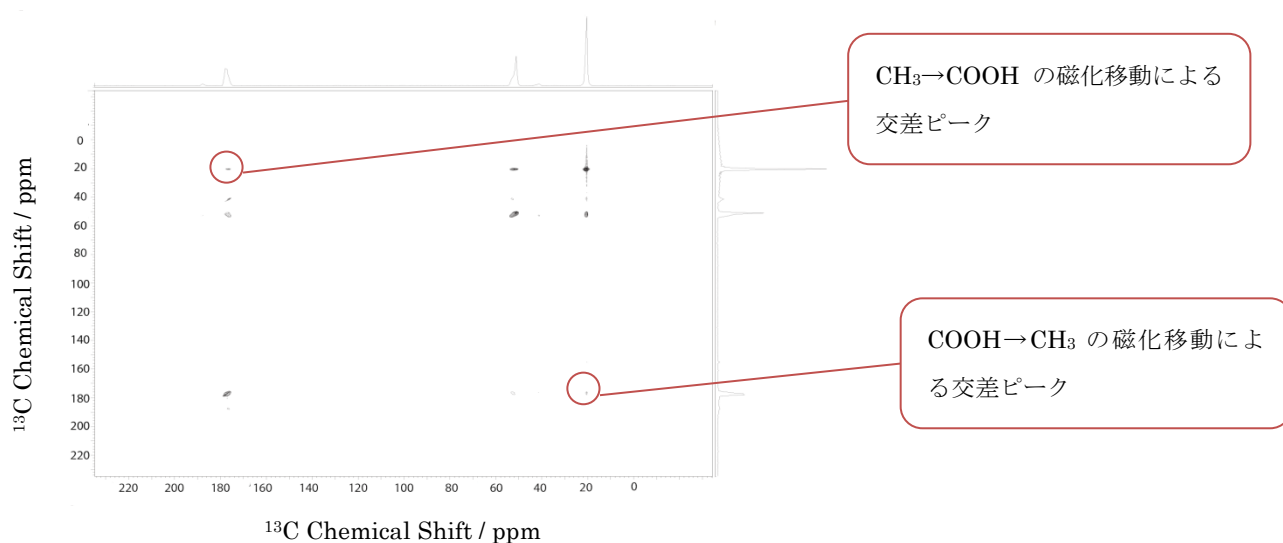


Fig. 3 $^{13}\text{C}_3\text{-L-Ala}$ の2次元交換NMR スペクトル (DARR 照射強度 10kHz 交換時間 $\tau_m=5\text{ms}$)

参考文献

- [1] K. Takegoshi, Shinji Nakamura, Takehiko Terao, *J. Chem. Phys.* **118**, 2325 (2003)
- [2] H. J. Simpson Jr, R. E. Marsh, *Acta Cryst.* **20**, 550 (1966)