

図で見る新しいNMR手法の原理

ISNMR 2011
チュートリアルコース
2011年11月15日(火)
横浜大榎橋ホール

池上貴久
大阪大学蛋白質研究所

要旨

この15年間に、さまざまな NMR の手法が開発され、解析に使われてきた。
例えば、

残余双極子相互作用 RDC (残余化学シフト異方性)

常磁性緩和 PRE

常磁性シフト(pseudo-)contact-shift

アミドや~~メチル~~TROSY

交差相関緩和 CCR

緩和分散法 relaxation-dispersion

高速測定法 (~~non-uniform-sampling, projection-NMR~~, single-scan-NMR)

MEMなどのプロセス法

動的核分極法 DNP

saturation-transfer 法

などが挙げられる。その中には、もはや新規とは思えない程に日常の解析に多用されている方法もあるが、日頃の忙しさに邪魔され、その物理的な原理までをも勉強するのはなかなか難しい。ここでは、出来るだけ数式を使わずに、「イメージ」でその原理をとらえ、今後のより深い理解の端緒となるようにしたい。

DNP-NMR 法

Dynamic Nuclear Polarization

動的核偏極 (動的核分極) 法

Blazina, D. *et al.* (2007) *Nature Physics* 3, 415-419.

阿部孝政 (2011) *化学と生物* 49, 492-496.

松木陽 (2010) *大阪大学低温センターだより* 149, 3-8.

藤原敏道 (2008) *大阪大学低温センターだより* 142, 12-18.

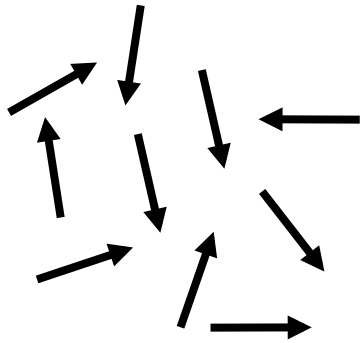
L12 (Fumitaka Horii)

L15 (Yoh Matsuki)

L19 (Makoto Negoro)

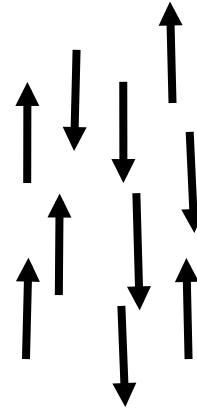
核磁気モーメント

核スピン



静磁場 B_0

N



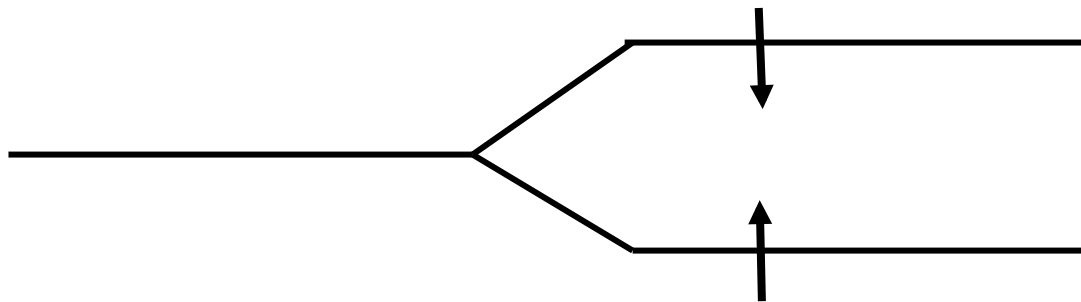
S



エネルギー



Zeeman energy



β 状態

α 状態

$$\Delta E = h\nu = \hbar\omega$$

NMR の高磁場化に伴う感度の上昇

感度の上昇 $\propto B_0^{3/2}$

磁気モーメント $\propto B_0$

ラーモア周波数 $\propto B_0$

ノイズレベル $\propto B_0^{1/2}$

$$\bar{M}_z = \frac{N\gamma^2\hbar^2 I(I+1)}{3kT} B_0$$

$$\omega_0 = -\gamma B_0$$

$$\left[\frac{S}{N} \right]_{950} : \left[\frac{S}{N} \right]_{600} = 2 : 1$$

Boltzmann 分布

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} = e^{\frac{h\nu}{kT}}$$

$$\frac{N_{\alpha} - N_{\beta}}{N_{\alpha} + N_{\beta}}$$

$$\nu = 500\text{MHz}, T = 303\text{K}, \frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = 1.000079 \quad \text{0.004 \% の偏極}$$

$$\frac{\gamma_{\text{electron}}}{\gamma_{1H}} \approx 665$$

3.35T = 142MHz (^1H) の磁石でも 94GHz (e^-) となる。

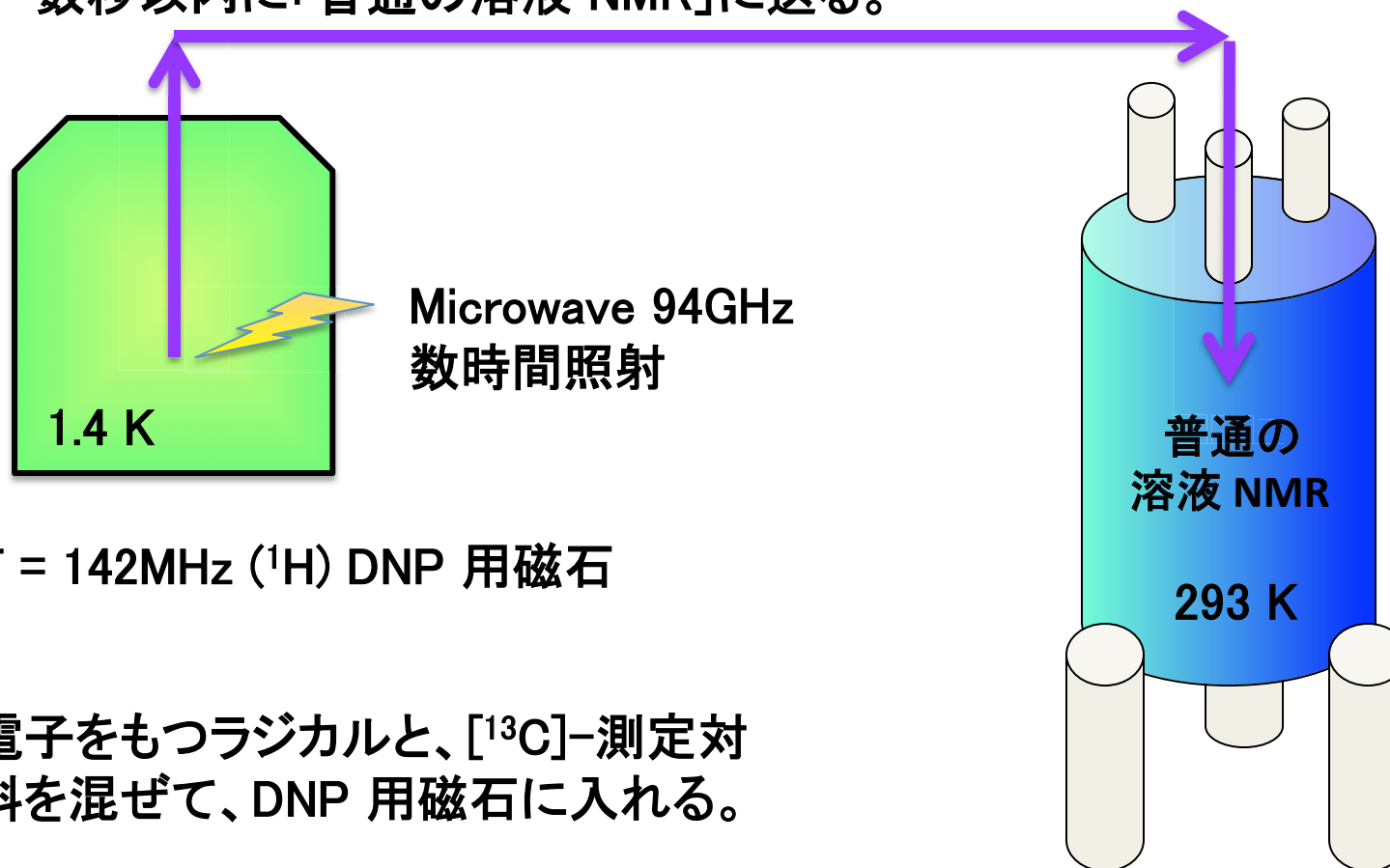
$$\nu = 94\text{GHz}, T = 1.4\text{K}, \frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = 25.1 \quad \text{92 \% の偏極}$$

14.1T = 600MHz (^1H) の磁石では 399GHz (e^-) となる。

$$\nu = 399\text{GHz}, T = 30\text{K}, \frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = 2 \quad \text{31 \% の偏極}$$

DNP-NMR の溶液での応用

加熱した溶媒 (177°C d_4 -methanol) を入れて試料を溶かし、数秒以内に「普通の溶液 NMR」に送る。



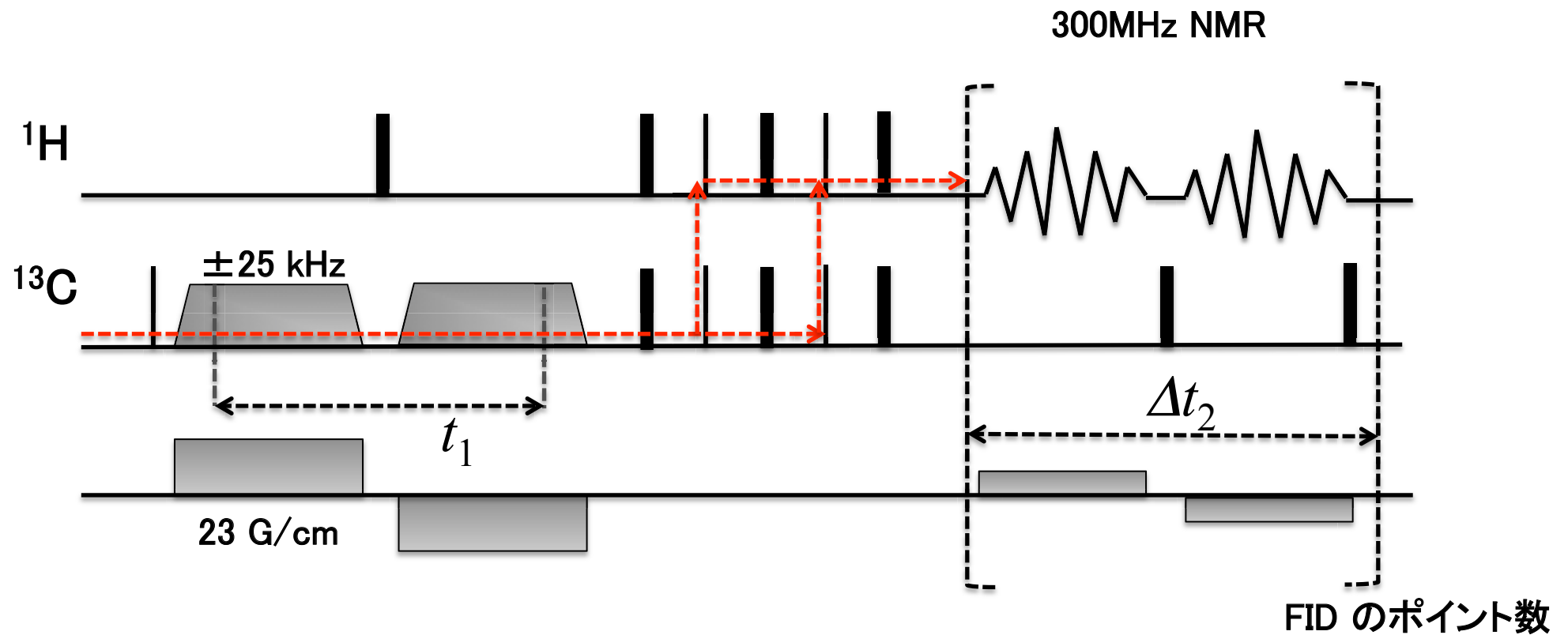
(例) 3.35T = 142MHz (^1H) DNP 用磁石

不対電子をもつラジカルと、 ^{13}C -測定対象試料を混ぜて、DNP 用磁石に入れる。

→ 偏極を電子から ^{13}C 核へ移動

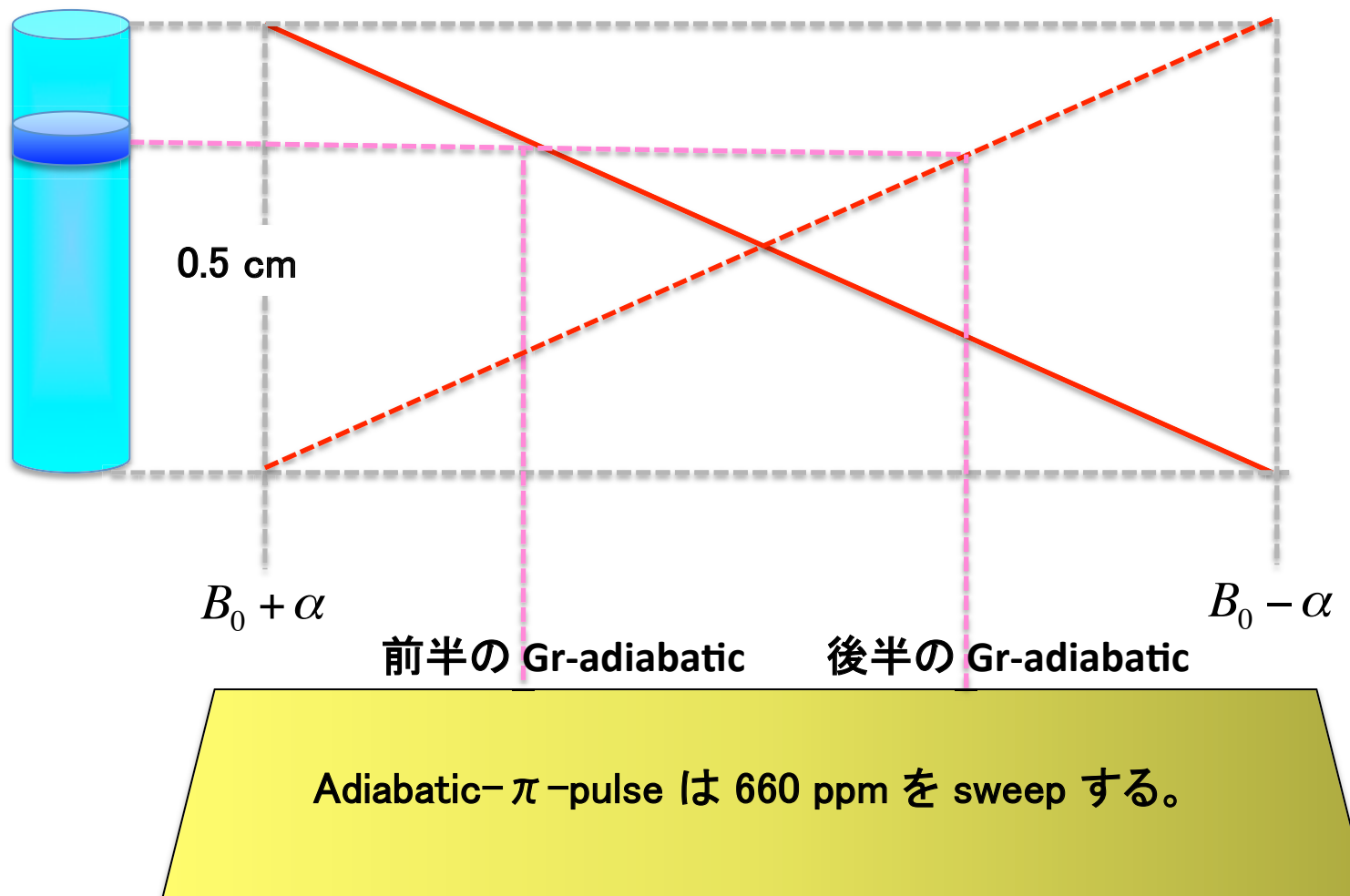
Single-scan 2D experiment

溶液 DNP では一回しかパルス系列を実行できない(積算不可)

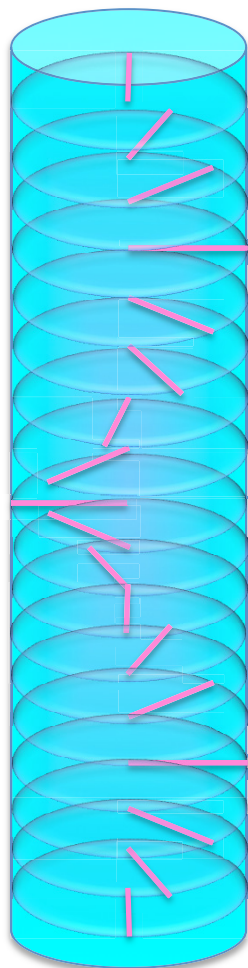


Lucio Frydman

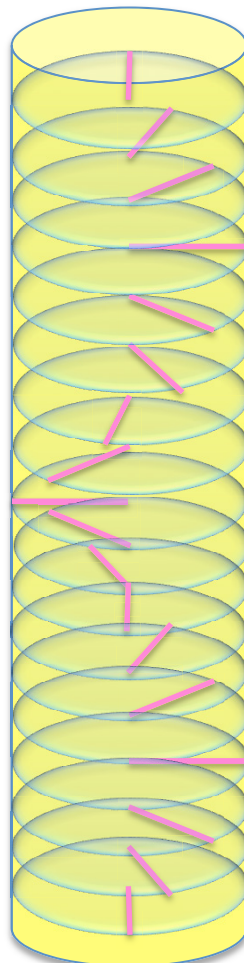
Field-gradient の最中に adiabatic-pulse (断熱パルス) を打つ。



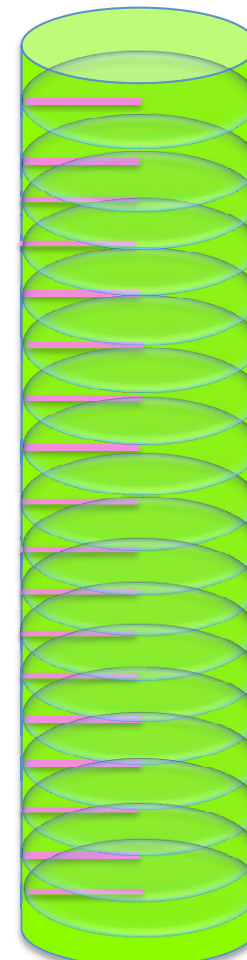
Gr により 1cm につき 0.03% 程静磁場の大きさが変わる
= ^{13}C の化学シフトでは 1,300 ppm/cm ($B_0 = 300\text{MHz}$)



CCOS
PEP
Grad-echo
SE



グラジエント

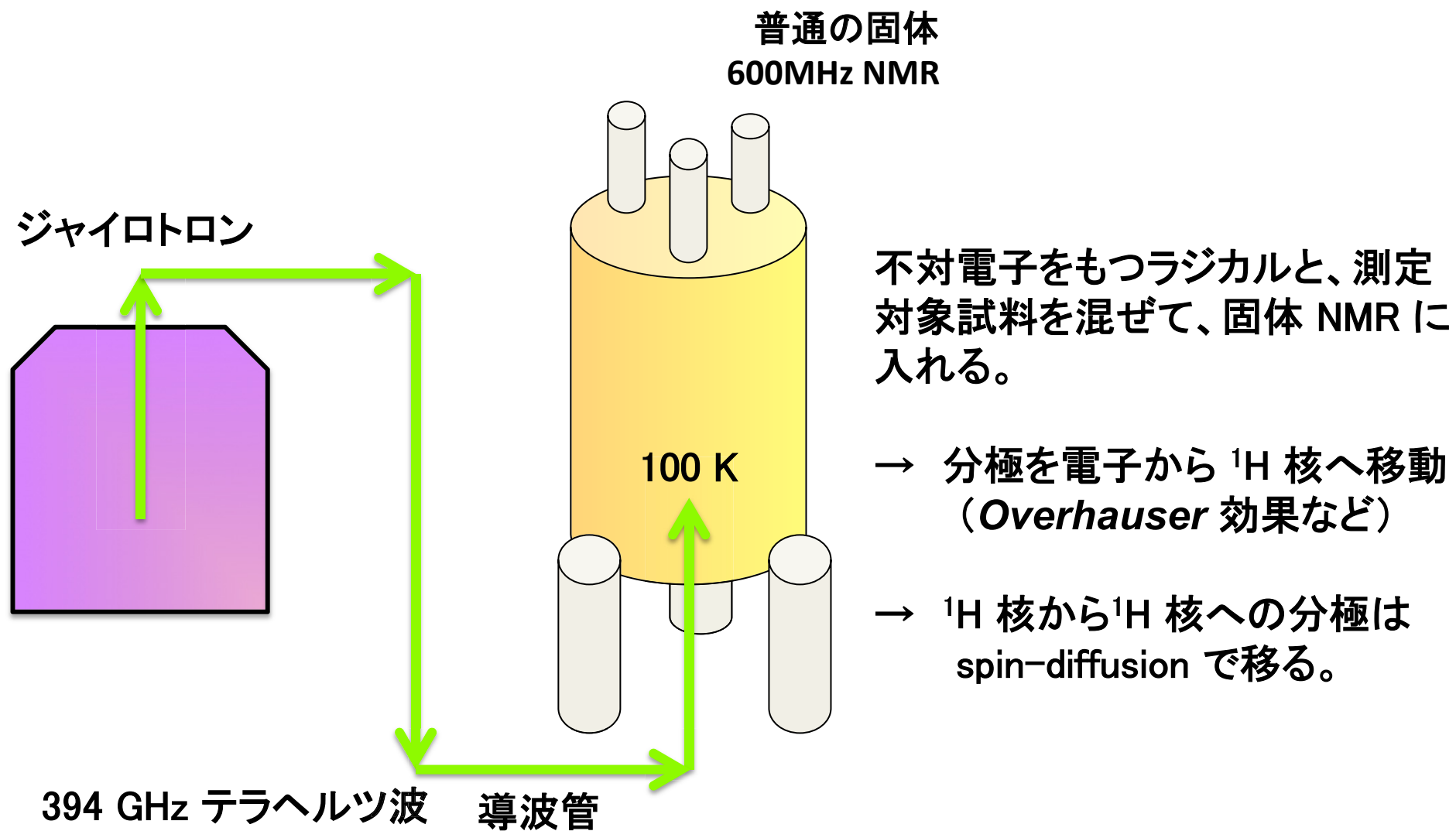


グラジエントによるのではなく、 ^{13}C 化学シフトによって磁化ベクトルの螺旋が生じている。

^{13}C 化学シフトの螺旋が、ほとんどそのまま ^1H 化学シフトの磁化ベクトルの螺旋に転写される。

グラジエントをかけていくにつれ、 ^{13}C 化学シフトの小さい磁化ベクトルから順に螺旋が解かれて揃い、翻訳される。

DNP-NMR の固体での応用



Transferred cross-saturation 法 転移交差飽和法

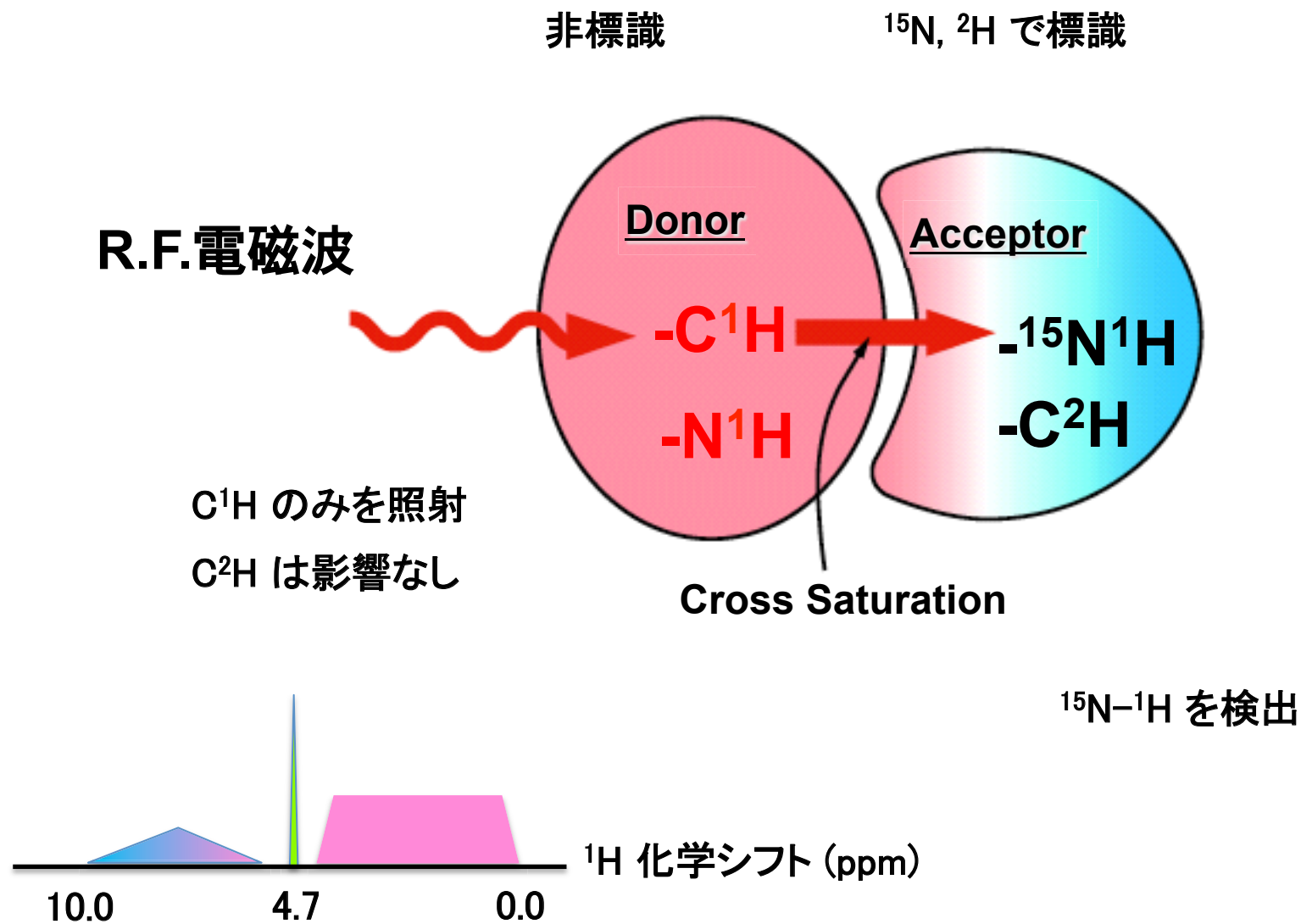
Takahashi, H. *et al.* (2000) *Nat. Struct. Biol.* 7, 220-223.

Matsumoto, M. *et al.* (2010) *J. Magn. Reson.* 205, 114-124.

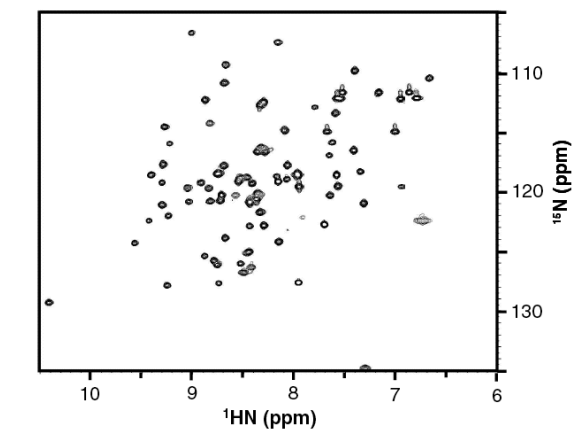
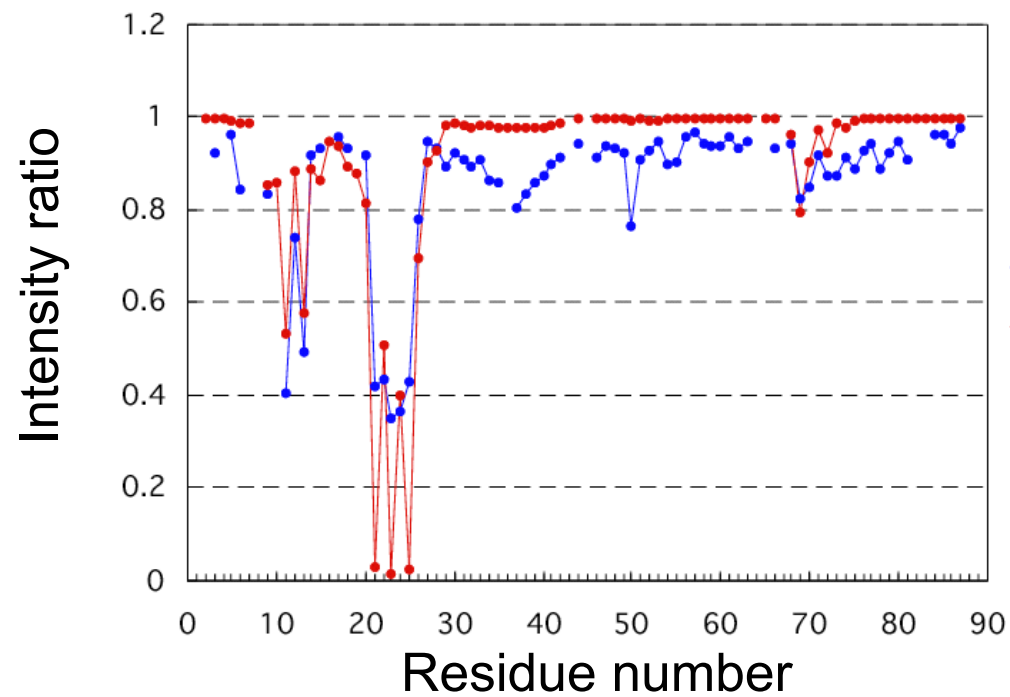
この方法の原理を数式で説明した論文です。それに基づいてシミュレーションソフトを開発し、実験結果と一致することを報告しています。一連の論文は、こちらの reference より辿っていくと良いでしょう。

P136 (Takumi Ueda)
P047 (Teppei Kanaba)

Saturation transfer method 飽和転移法

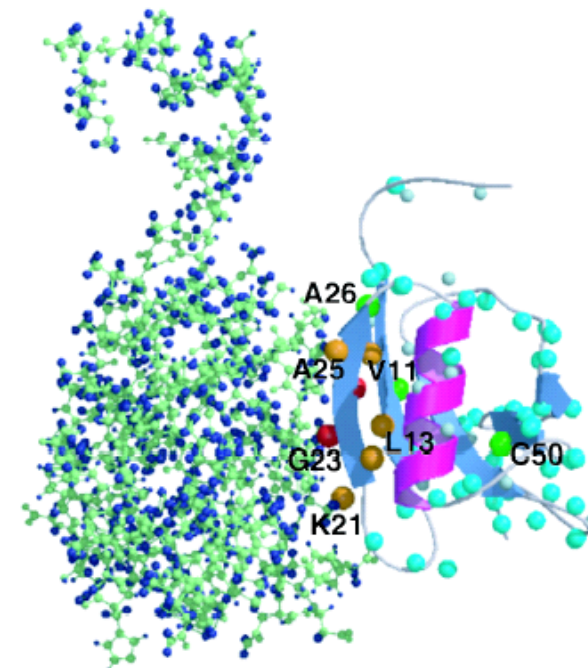


^{15}N , ^2H で標識した蛋白質のアミド基のうち、相互作用部位の強度が下がる



2D (^{15}N , ^1H) HSQC spectrum

—●— experiment
—●— simulation

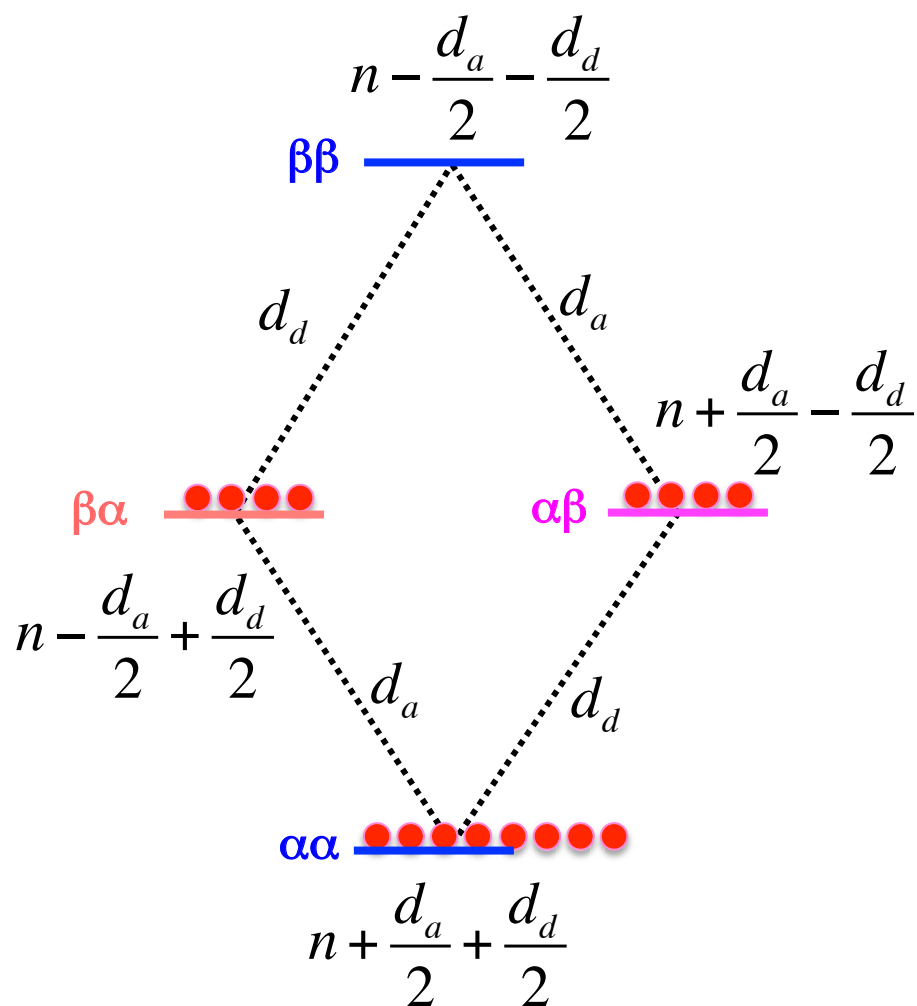


R.F. → ICAD → CAD

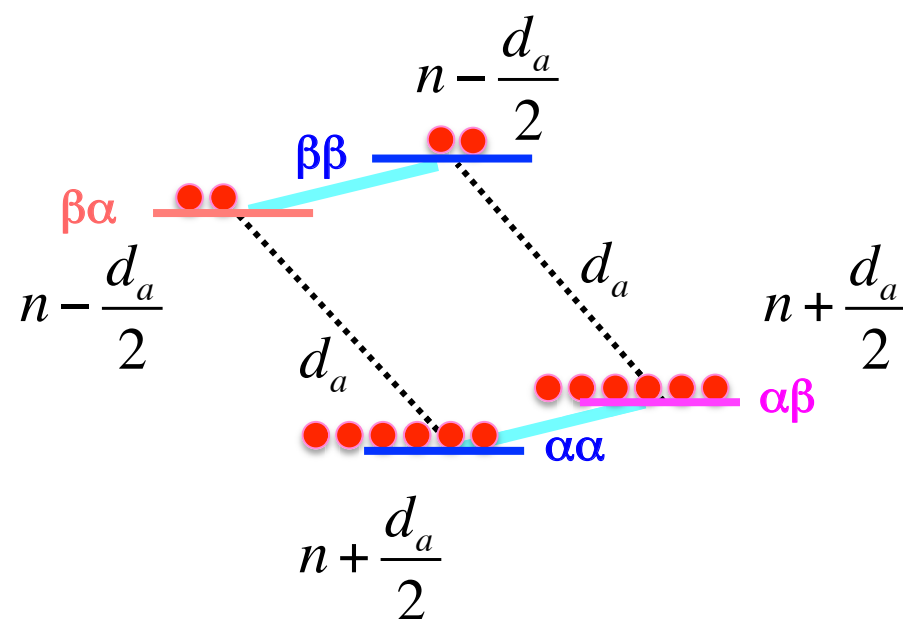
CAD-ICAD complex (1F2R.pdb)

Saturation transfer (NOE の原理とよく似ている)

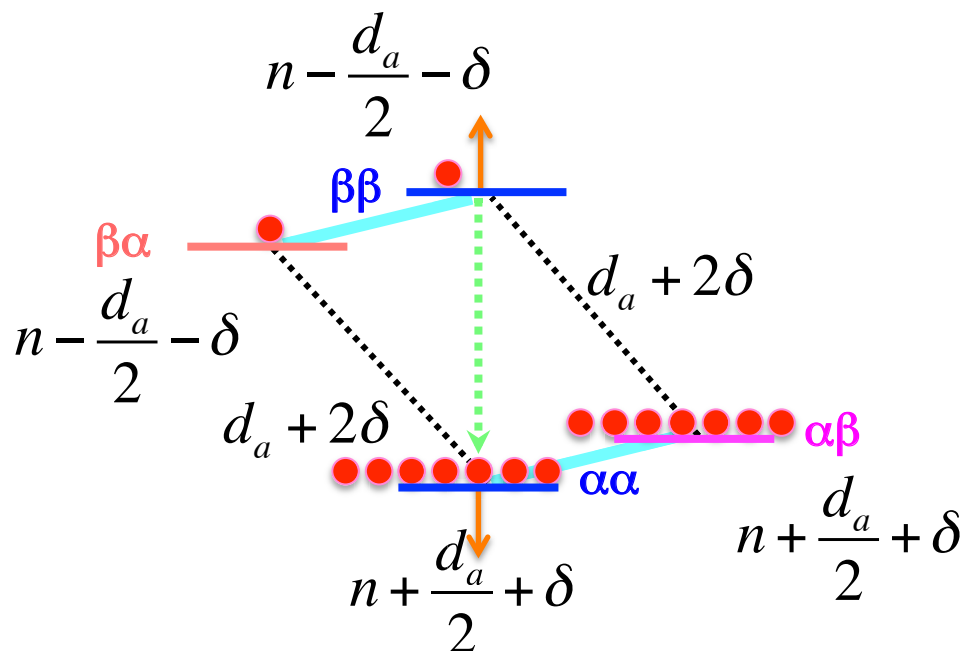
平衡状態



Donor 側の ^1H の磁化を飽和

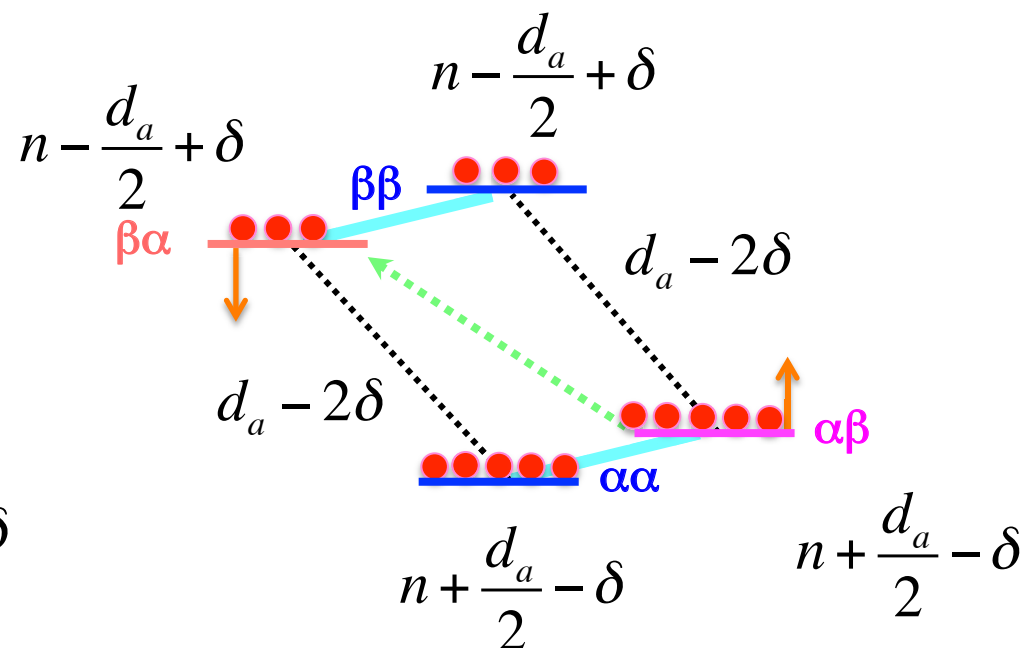


ボルツマン平衡を回復させようとする (cross-relaxation, 交差緩和)



W_2 過程: $\beta\beta \rightarrow \alpha\alpha$
 d_a 増加
 正の NOE
 (flip-flip)

運動性が高い場合 (低分子)

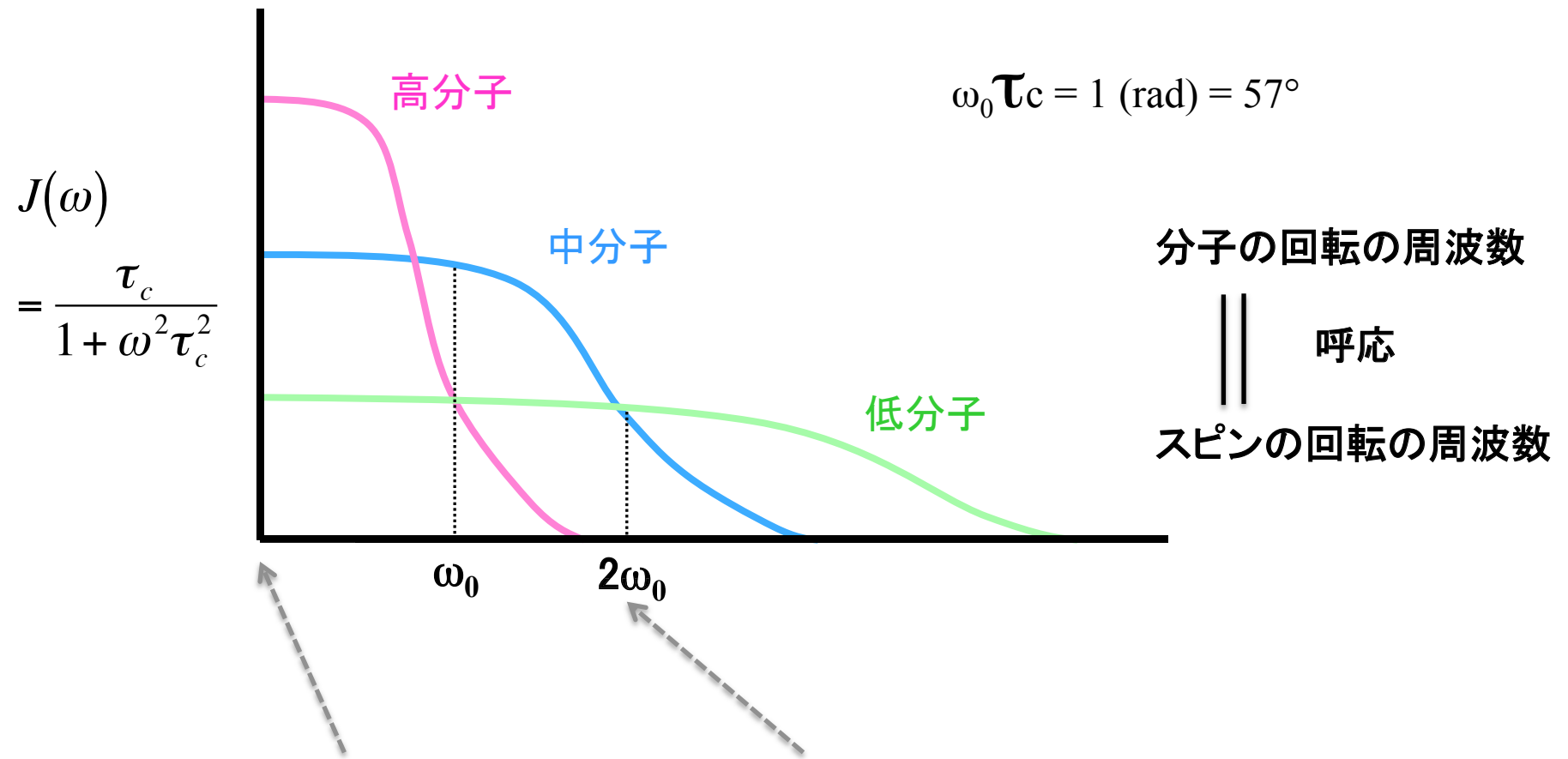


W_0 過程: $\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$
 d_a 減少
 負の NOE
 (spin-diffusion, flip-flop)

運動性が低い場合 (高分子)

分子運動の回転の速さの分布

高分子ではゆっくり回転している分子の割合が大きい



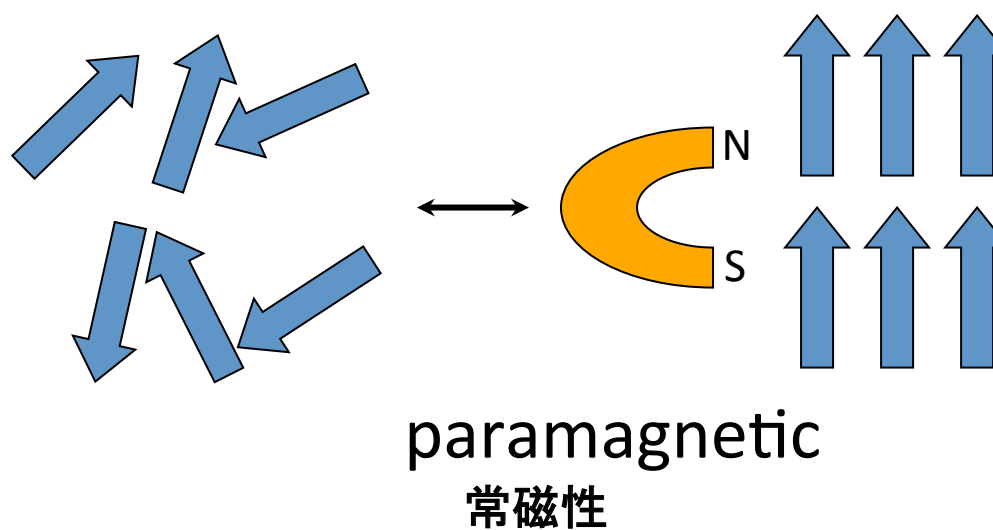
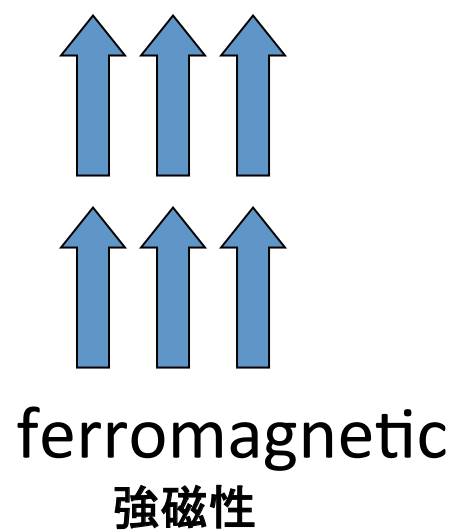
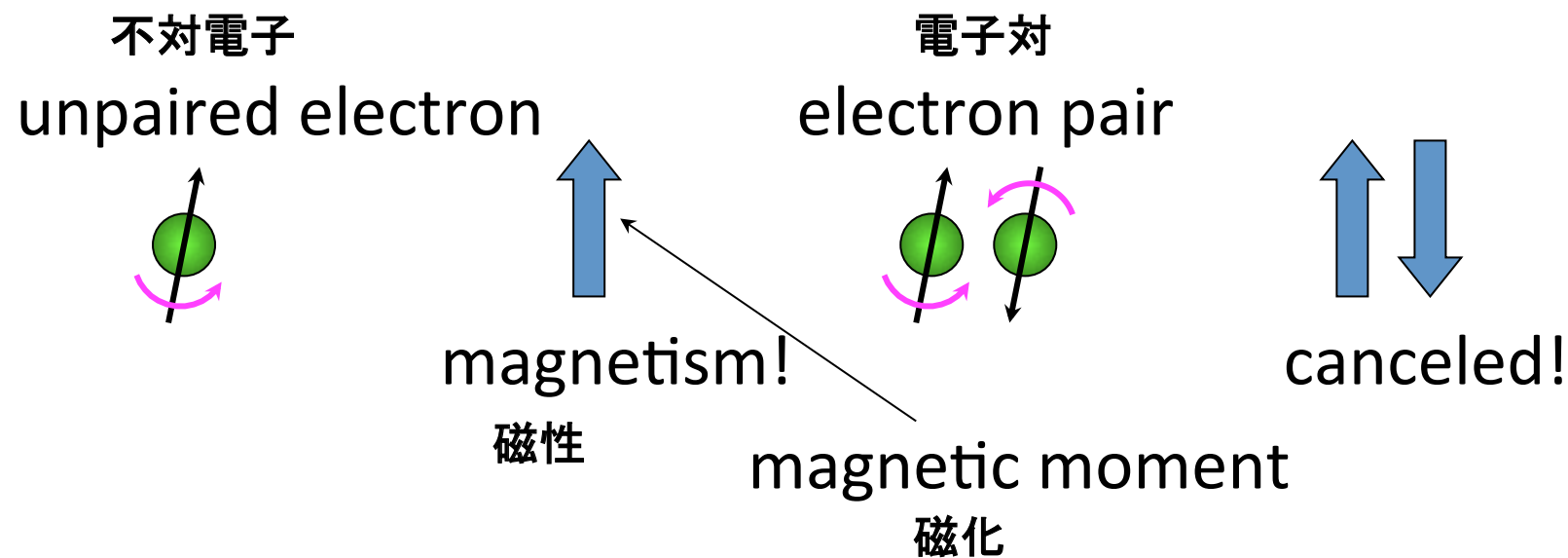
高分子では ω_0 過程 ($\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$) の方が $2\omega_0$ 過程 ($\beta\beta \rightarrow \alpha\alpha$) よりも多い。

Paramagnetic relaxation enhancement 法 常磁性緩和促進法

岩原先生が来日される良い機会ですので、興味ある方は、いろいろ尋ねてみましょう。
Iwahara J. & Clore G.M. (2006) *Nature* 440, 1227-1230.

L06 (Hiromasa Yagi)
L17 (Masaki Mishima)
P049 (Katsutaka Akiyoshi)
P058 (Takahiro Anzai)
P063 (TaeKyung Yu)
P069 (Valentin Novikov)
P071 (Takenori Shibayama)
P138 (Masashi Yokochi, Tomohide Saio)

不対電子のスピンのにより磁性が生じる。

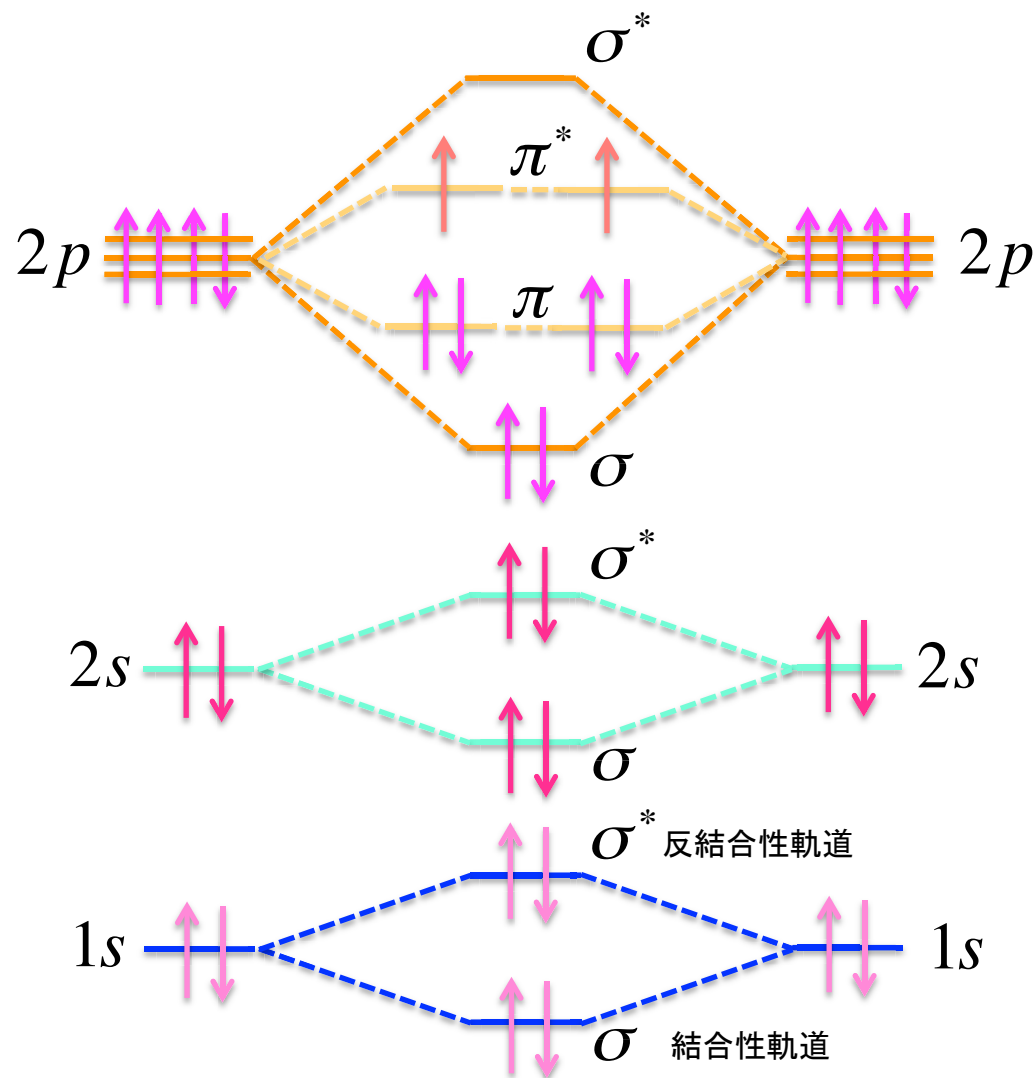


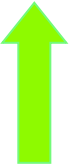
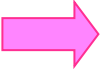
酸素分子は磁石に吸い付く。

Pauli の排他則により、一つの軌道には、逆向きスピンの電子がペアになって入る。(一重項状態)

Hund の規則により、同じエネルギーの軌道には、スピンを揃えた電子がそれぞれに入る。(三重項状態)

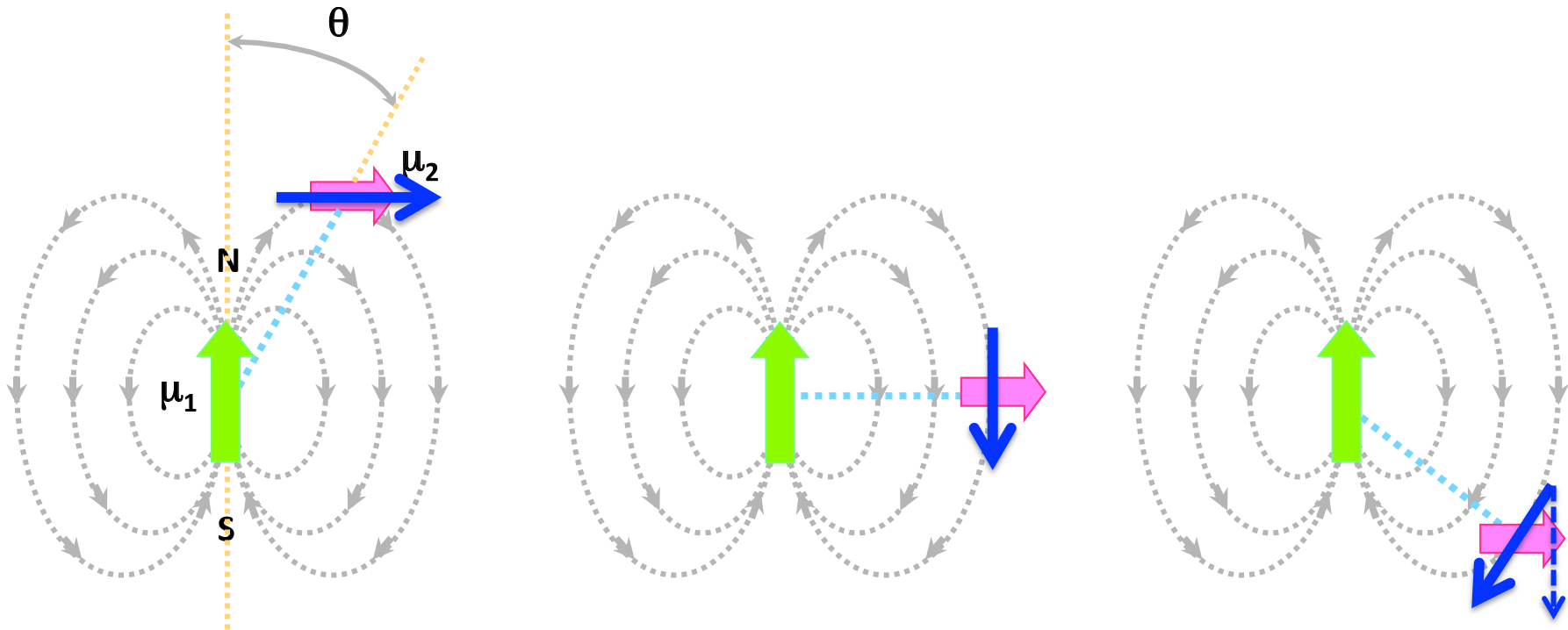
酸素分子は、 π_x^* , π_y^* の2個の
不対電子により常磁性を示す。



電子スピン μ_1  により生じた双極子磁場  により
核スピン μ_2  が影響を受ける。

核スピンの横緩和にもっとも
影響を与える双極子磁場

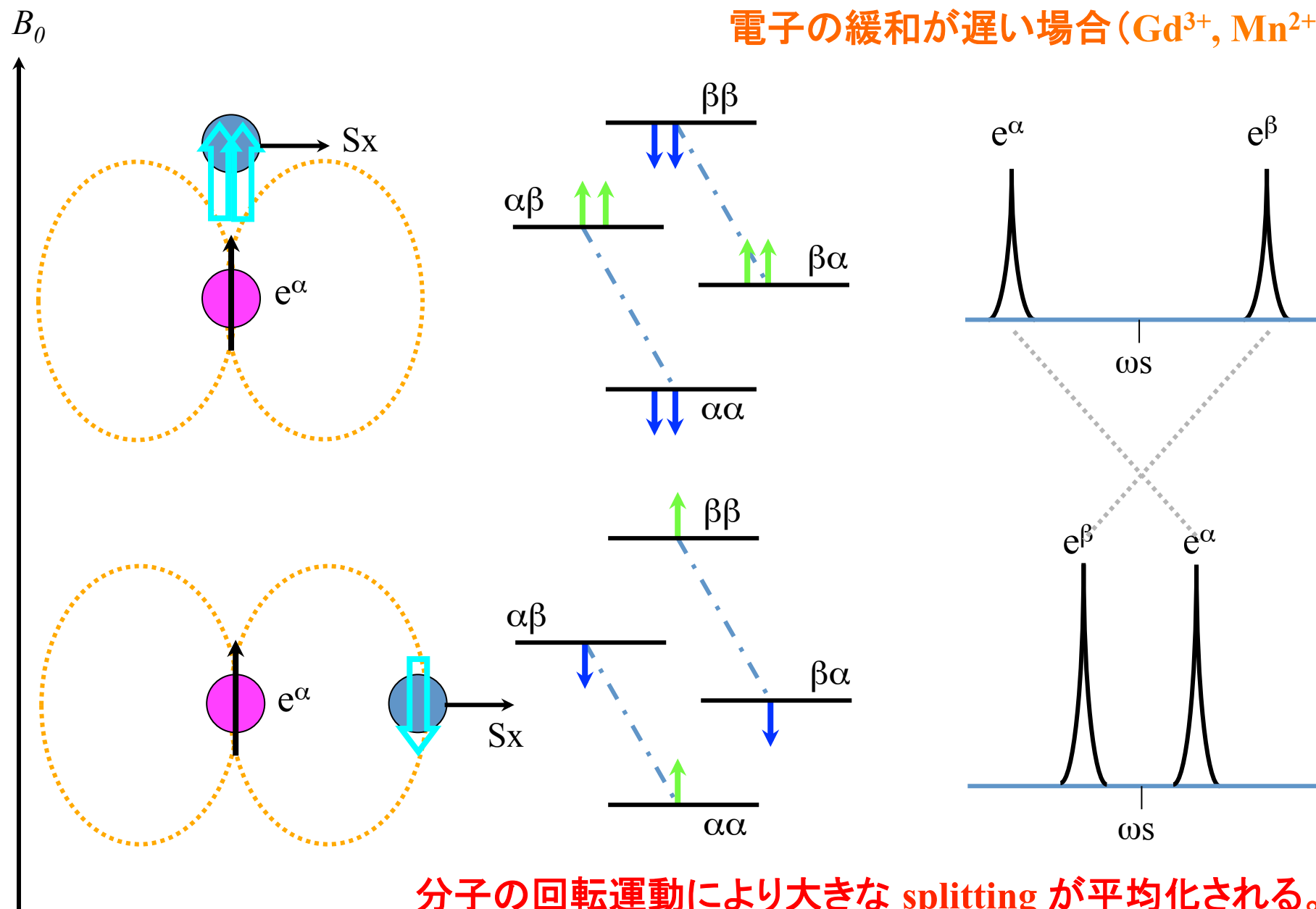
$$\propto \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$



分子の回転により、双極子磁場の向きと大きさが変化する。

双極子双極子相互作用 Dipole-dipole coupling

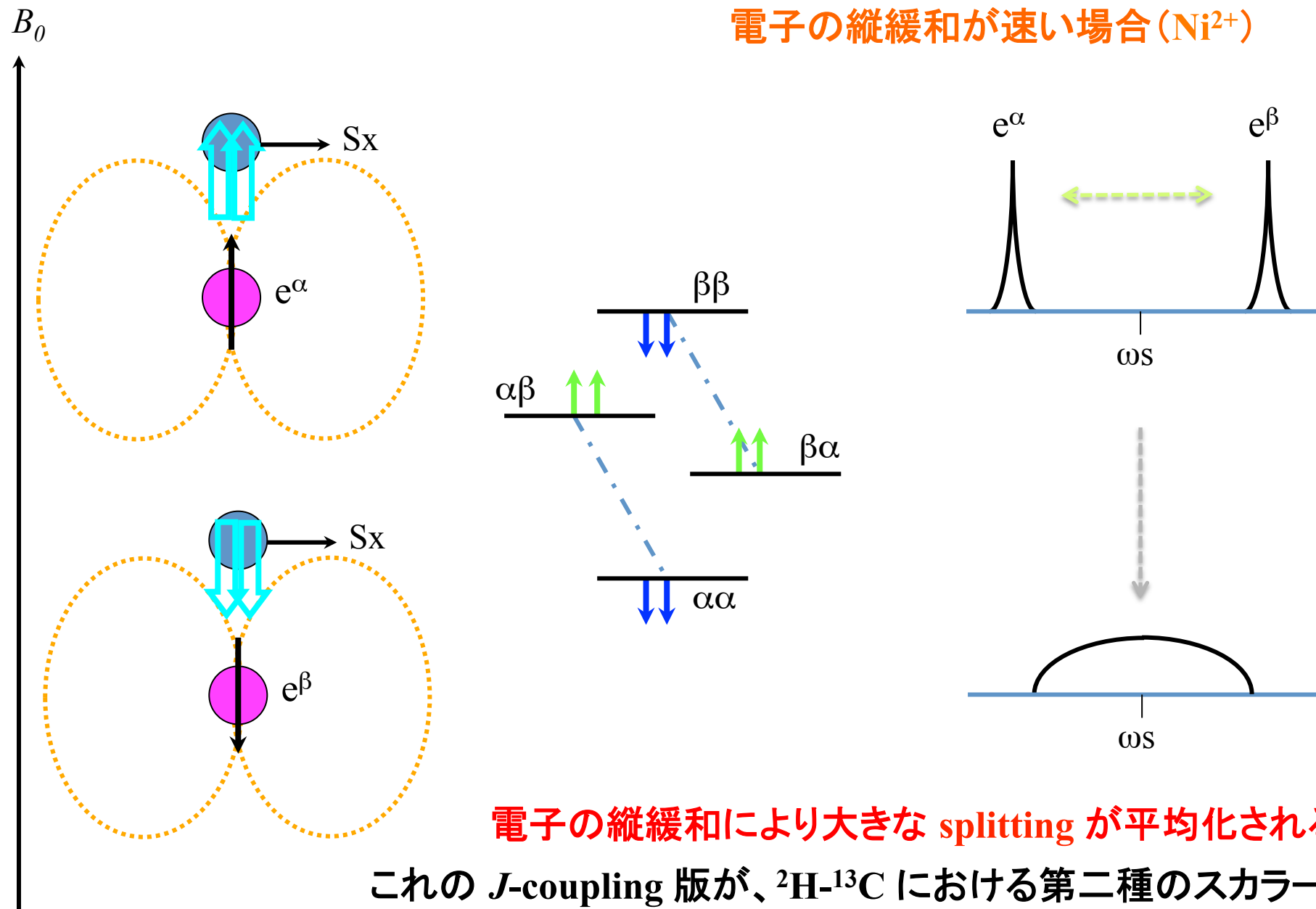
電子の緩和が遅い場合 (Gd^{3+} , Mn^{2+})



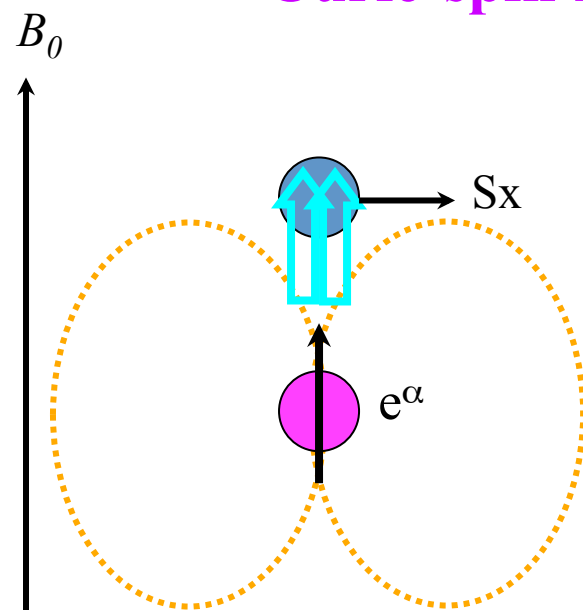
分子の回転運動により大きな splitting が平均化される。

双極子双極子相互作用 Dipole-dipole coupling

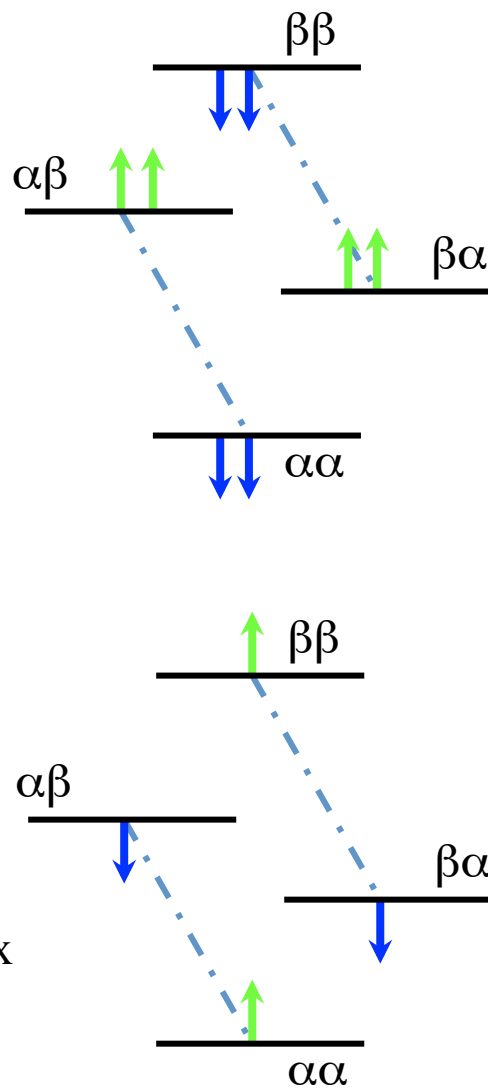
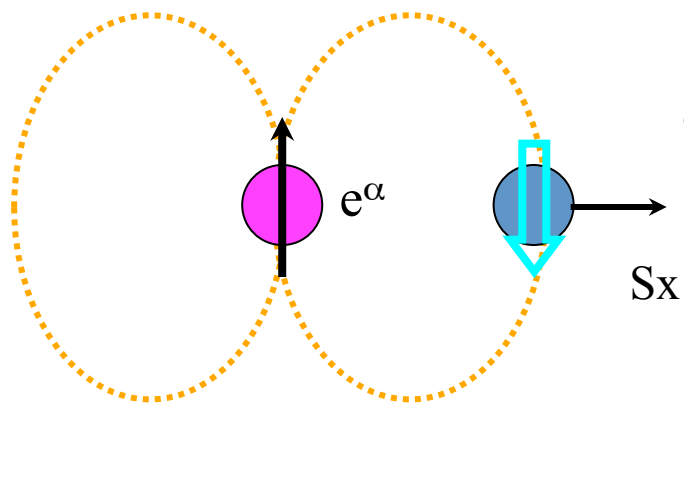
電子の縦緩和が速い場合 (Ni^{2+})



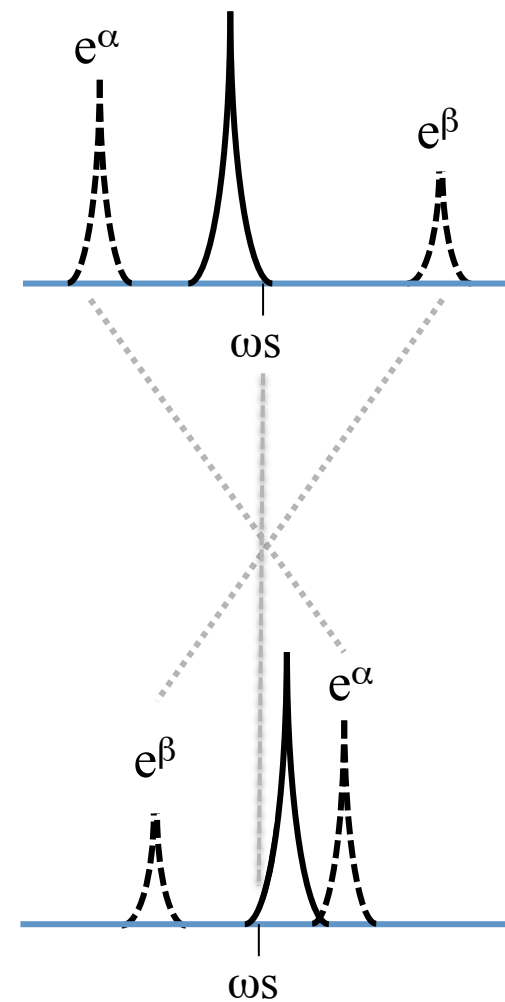
Curie-spin relaxation



α 状態 > β 状態

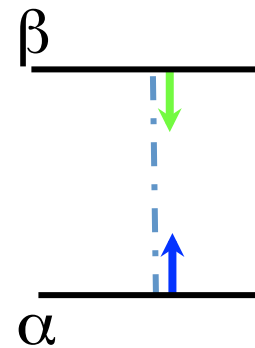
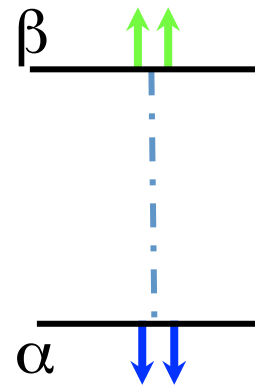
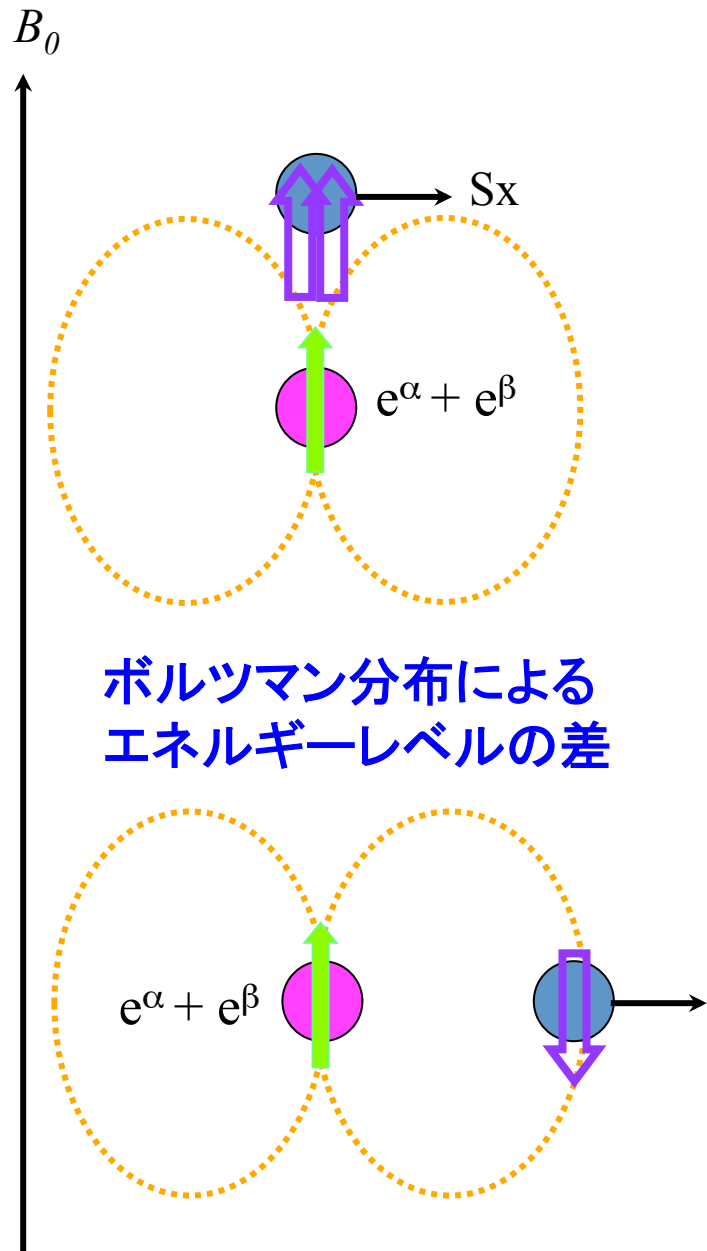


電子の緩和が速い場合

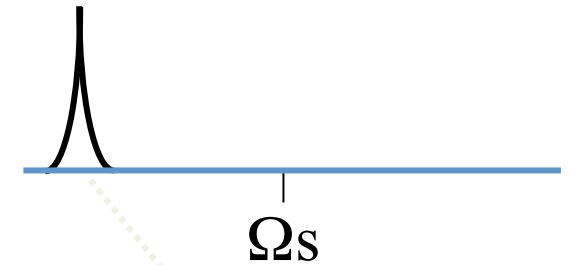


分子の回転によって平均化される。

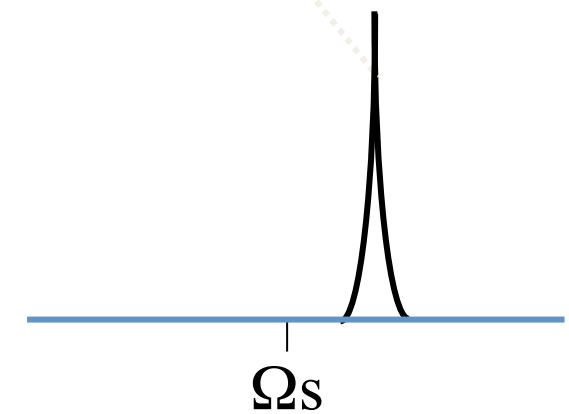
キュリースピン緩和 Curie-spin relaxation



北極 & 南極



赤道



分子の回転によって平均化される。

pseudo-contact-shift 常磁性シフト

稲垣先生の博士論文を読んでみましょう(しかし、難しい)。

Inagaki F. & Miyazawa T. (1980) *Progress in NMR Spectroscopy* 14(2) 67-111.

L06 (Hiromasa Yagi)

L17 (Masaki Mishima)

P030 (Akihiro Sugimoto)

P046 (Ayaho Kobayashi)

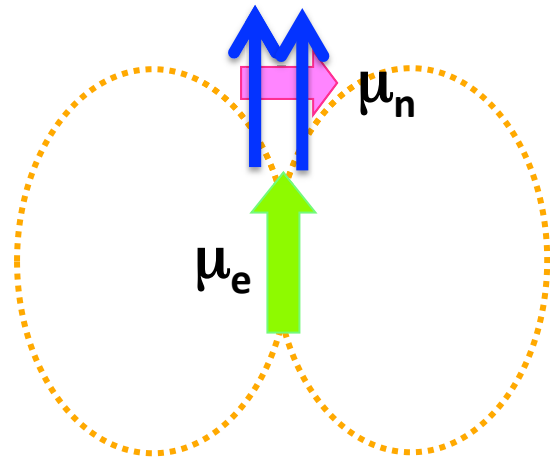
P069 (Valentin Novikov)

P075 (Sayoko Yamamoto)

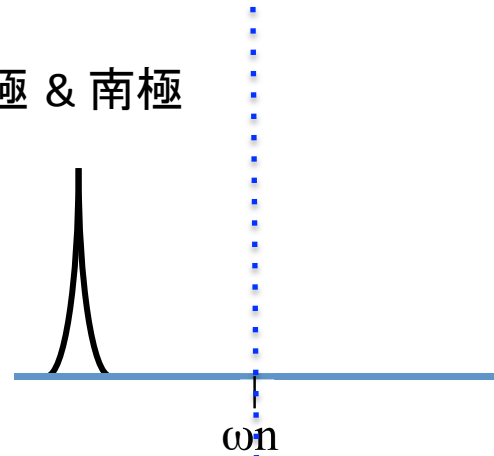
P138 (Masashi Yokochi, Tomohide Saio)

分子が回転しても電子スピンの磁化 μ_e の大きさが同じ場合

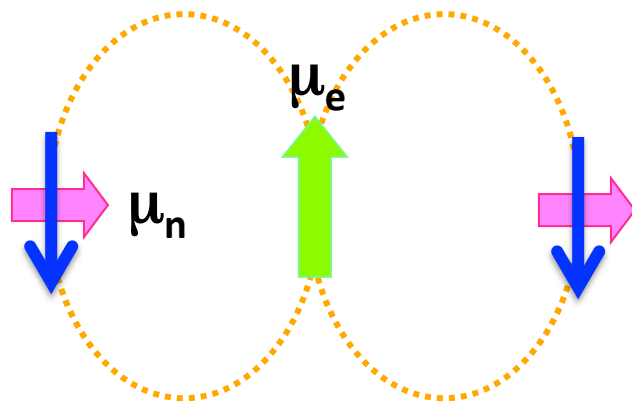
B_0



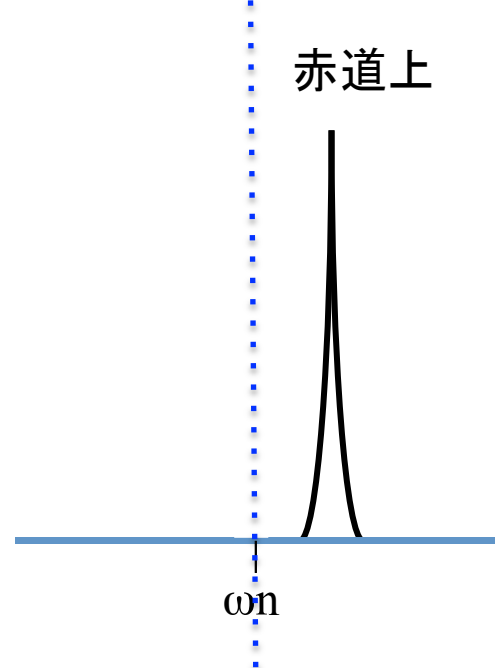
北極 & 南極



核スピンの位置に作られる双極子磁場を全て合計すると 0



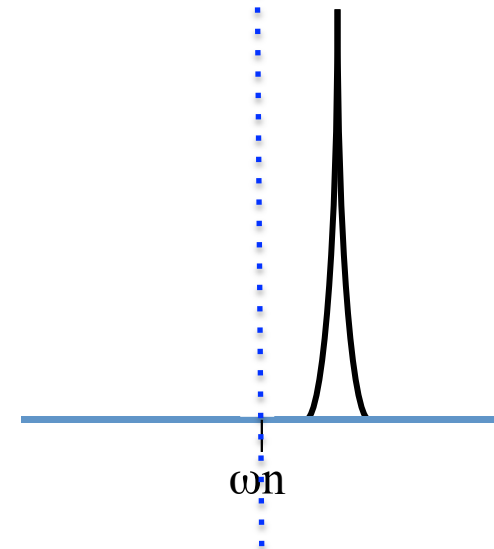
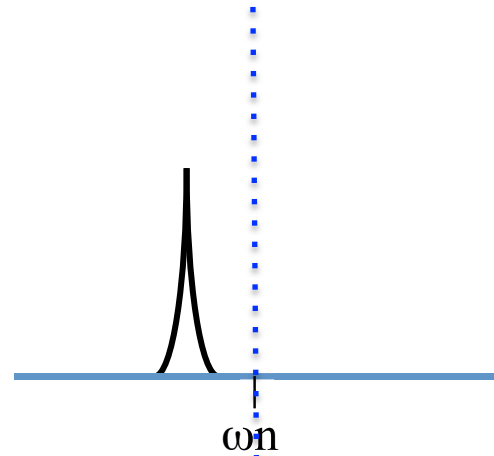
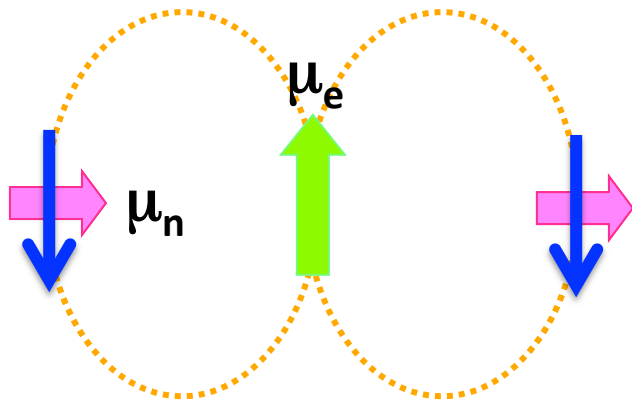
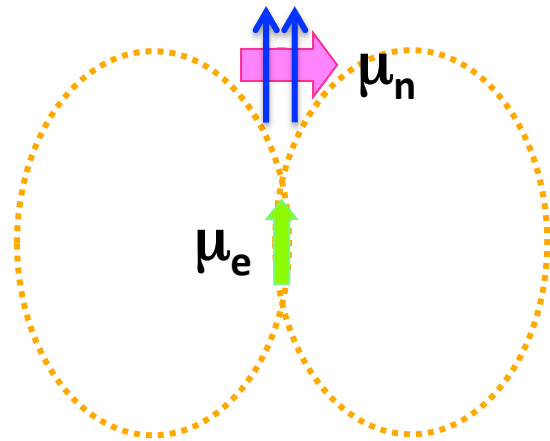
赤道



分子の回転によって PRE 緩和は起こるが、核の化学シフトの平均値は影響を受けない。

分子の回転に伴って電子スピンの磁化 μ_e の大きさが変わる場合

B_0

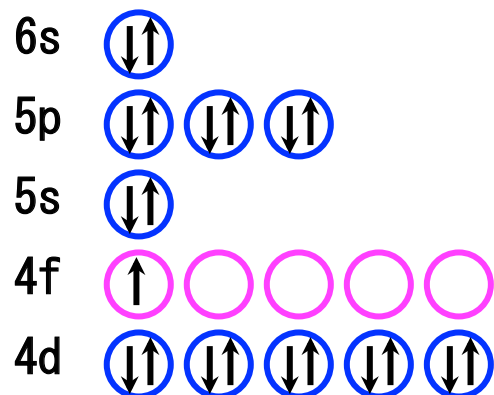


双極子双極子相互作用
が核スピンの位置に作
る双極子磁場を全て合
計しても0にならない。

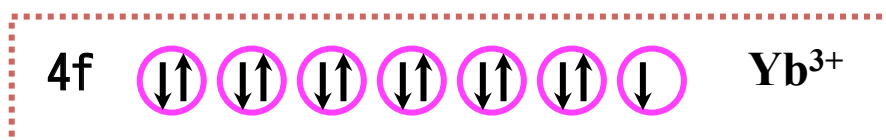
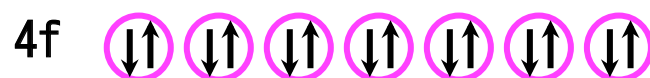
(距離)⁻³ に比例して、核
の共鳴値が変わる。

Lanthanide ions ランタノイド金属

f-block transition elements

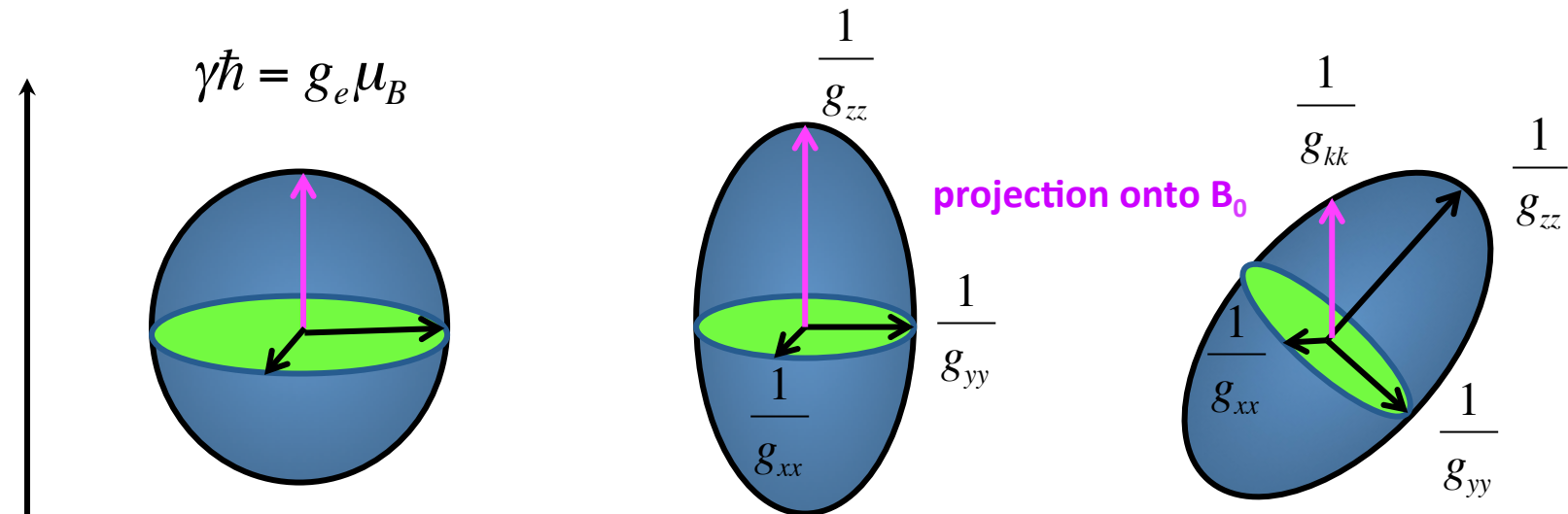
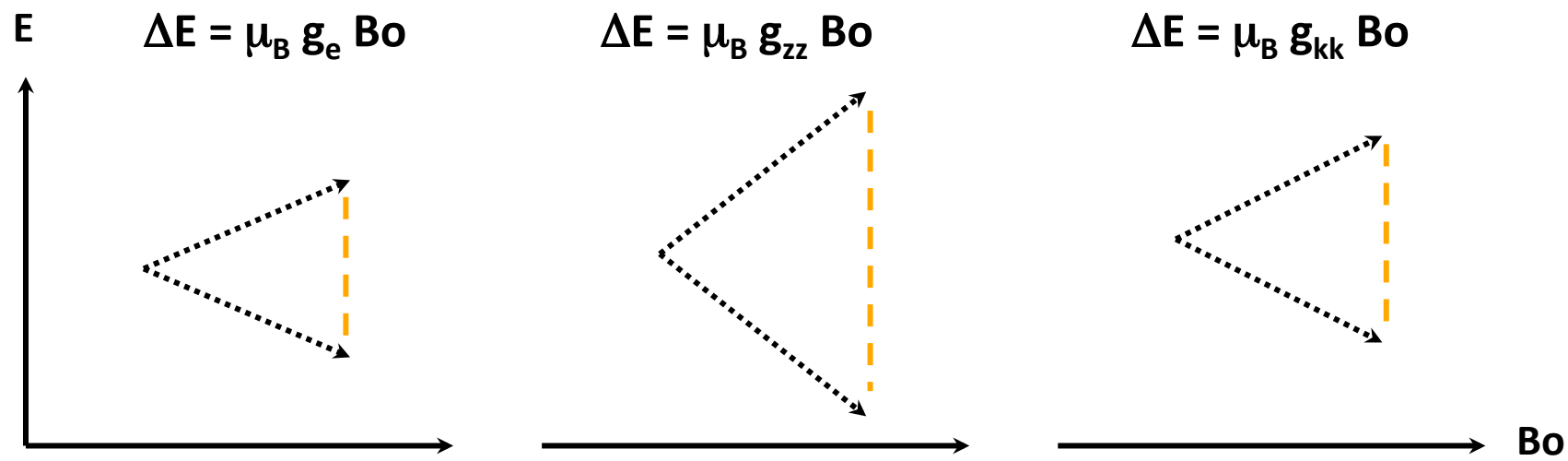


no PCS



	4f	5d	6s
57 La	0	1	2
58 Ce	1	1	2
59 Pr	3	0	2
60 Nd	4	0	2
61 Pm	5	0	2
62 Sm	6	0	2
63 Eu	7	0	2
64 Gd	7	1	2
65 Tb	9	0	2
66 Dy	10	0	2
67 Ho	11	0	2
68 Er	12	0	2
69 Tm	13	0	2
70 Yb	14	0	2
71 Lu	14	1	2

静磁場中での分子の方向によってエネルギーの大きさが変わる



isotropic g tensor

$$g_{kk}^2 = g_{xx}^2 \cos^2 \alpha + g_{yy}^2 \cos^2 \beta + g_{zz}^2 \cos^2 \gamma$$

residual dipolar coupling (RDC)

残余双極子相互作用

residual anisotropic chemical shift (RACS)

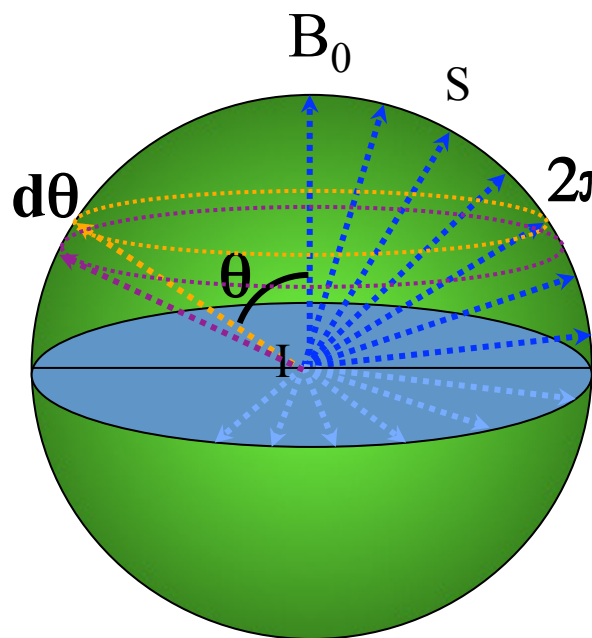
残余化学シフト異方性

液晶やゲルを使って分子を静磁場に対して配向させる方法がよく知られています。また、金属を付けて配向させることもできます。この場合、pseudo-contact-shift が観られれば、分子の磁化率に異方性があるということになり、同時に配向もします。

P037 (Soichiro Kitazawa)

P138 (Masashi Yokochi)

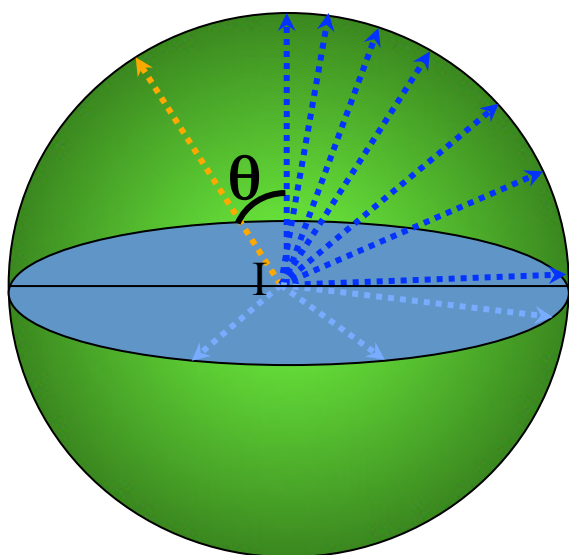
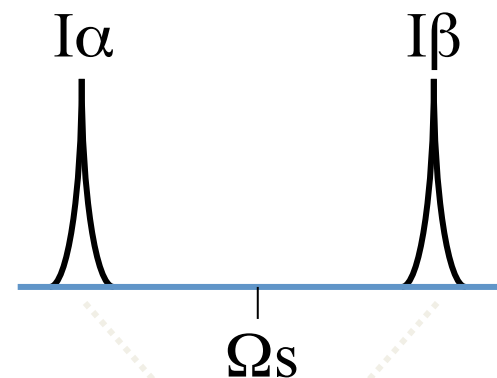
Residual dipolar coupling



nonaligned

$$\int (3\cos^2 \theta - 1)(\sin \theta) d\theta = 0$$

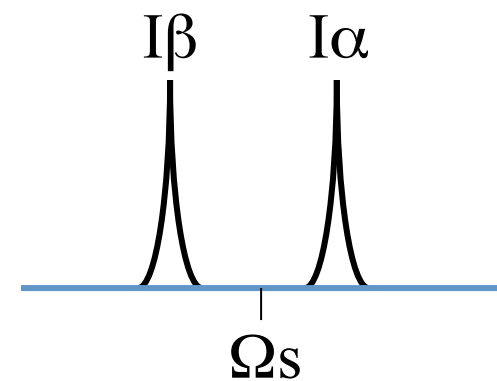
E_{dipolar} averages to 0
(no RDC observed)



$$\int (3\cos^2 \theta - 1)(\sin \theta) d\theta \neq 0$$

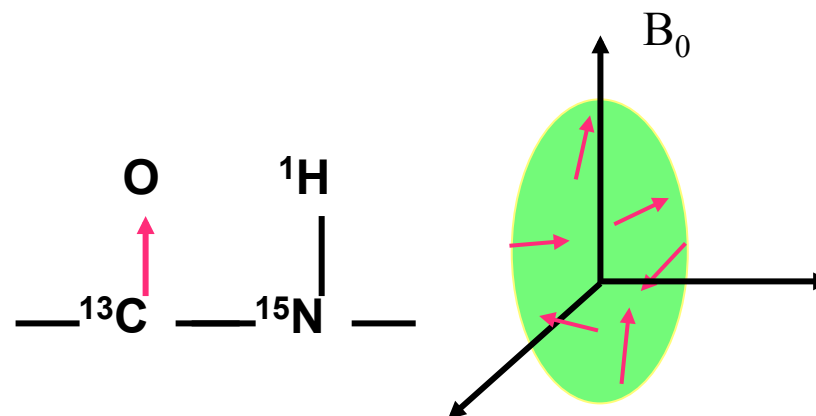
RDC observed

aligned



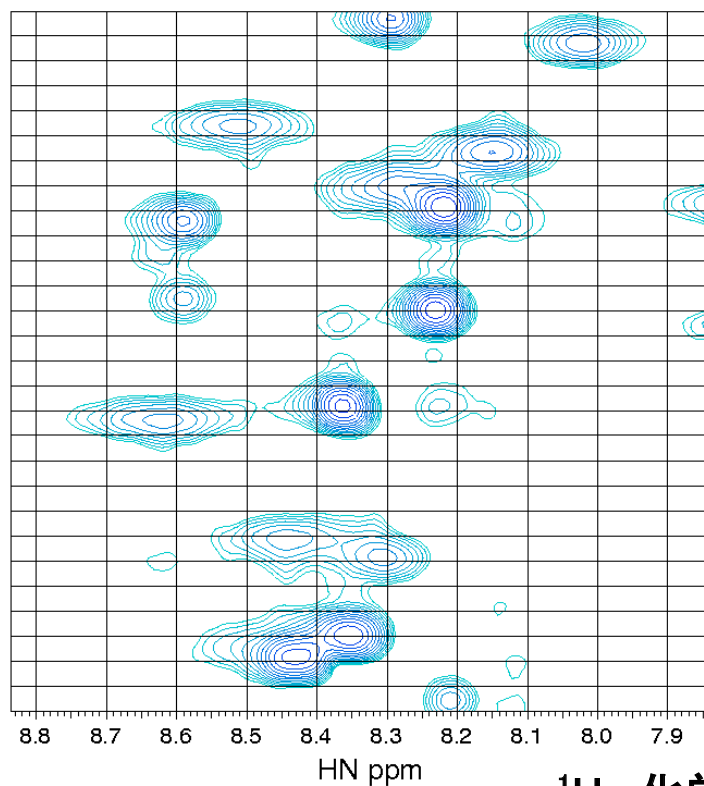
Chemical shift anisotropy (CSA)

化学シフト値の異方性



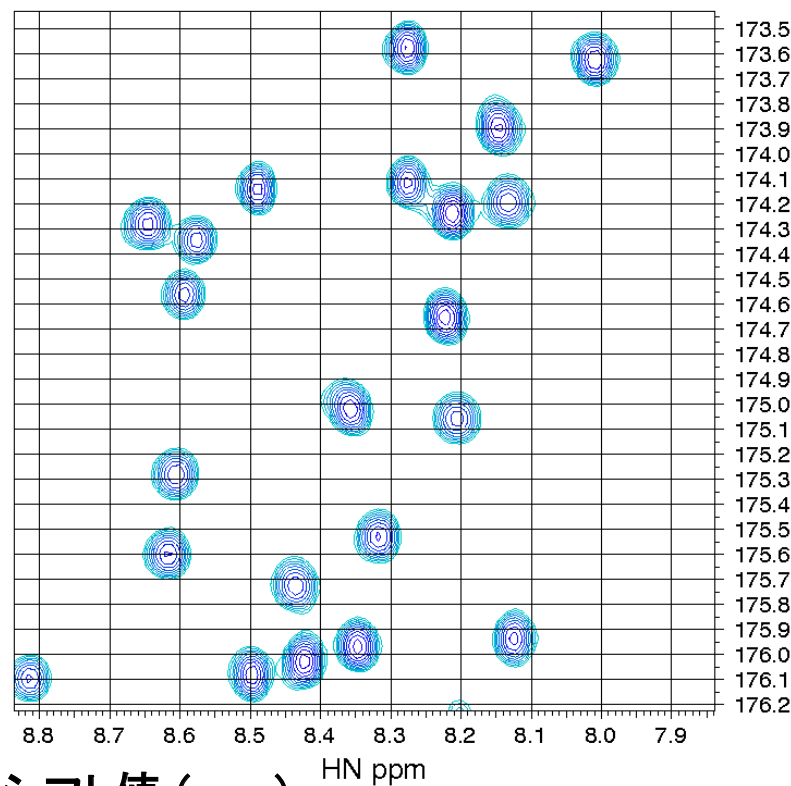
anisotropic medium (alignment)

異方的溶媒(配向)



等方的溶媒

isotropic medium



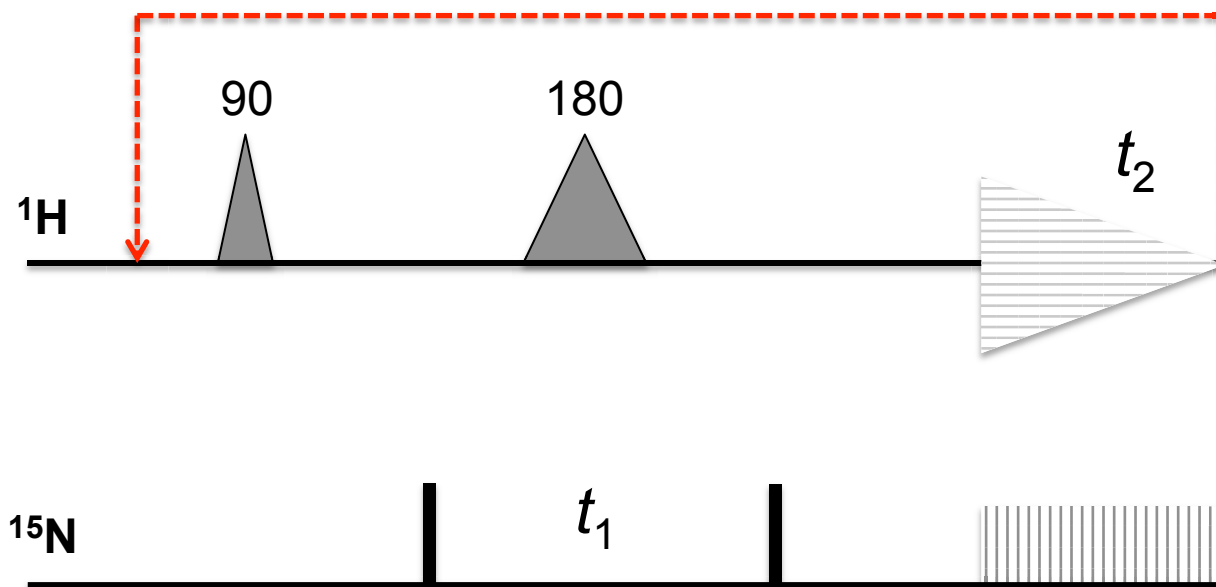
${}^{13}\text{C}_\text{O}$ 化学シフト値 (ppm)

173.5
173.6
173.7
173.8
173.9
174.0
174.1
174.2
174.3
174.4
174.5
174.6
174.7
174.8
174.9
175.0
175.1
175.2
175.3
175.4
175.5
175.6
175.7
175.8
175.9
176.0
176.1
176.2

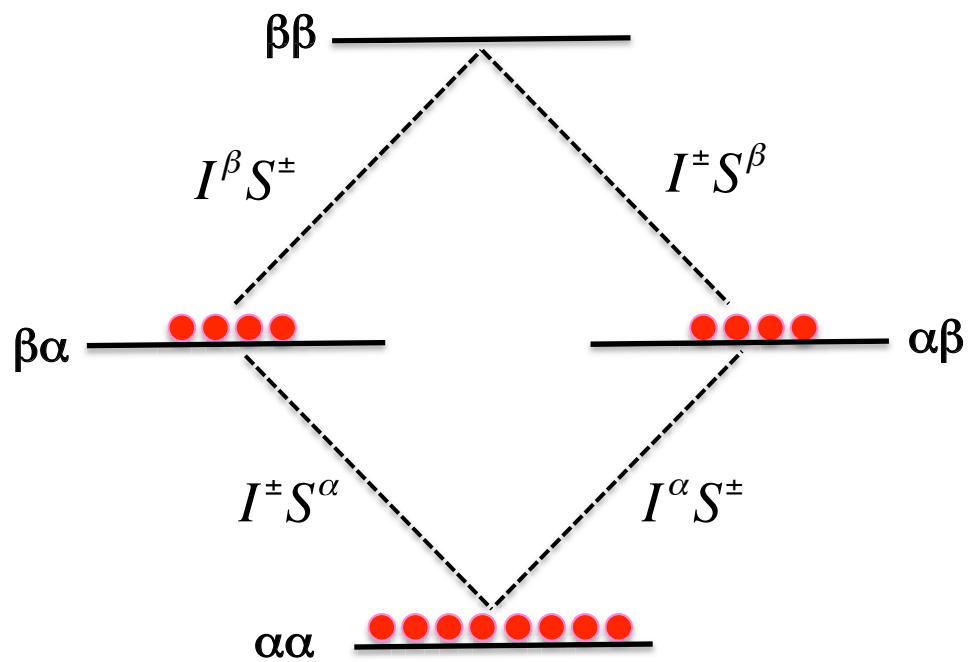
SOFAST-HMQC 法 BEST-3D 高速測定法の一つ

Brutscher, B. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* 127, 8014-8015.
に SOFAST-HMQC の名が出て来ますが、それよりも前の
Pervushin, K. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124, 12898-12902.
に LHSQC の名で、ほぼ同じ原理の測定法が報告されています。

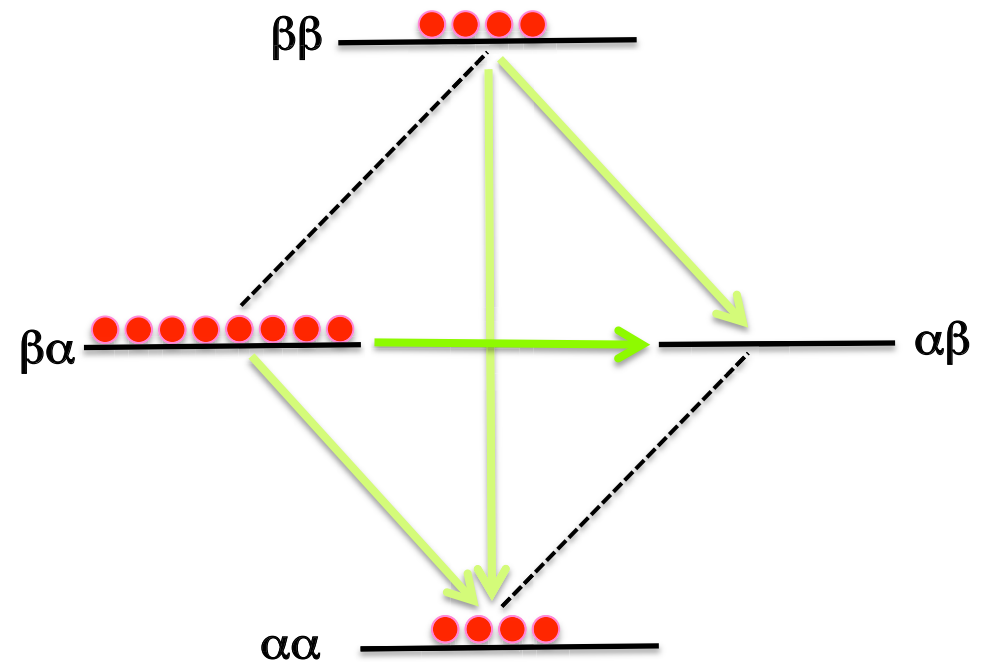
SOFAST-HMQC



平衡状態でのエネルギー準位図(同種核)

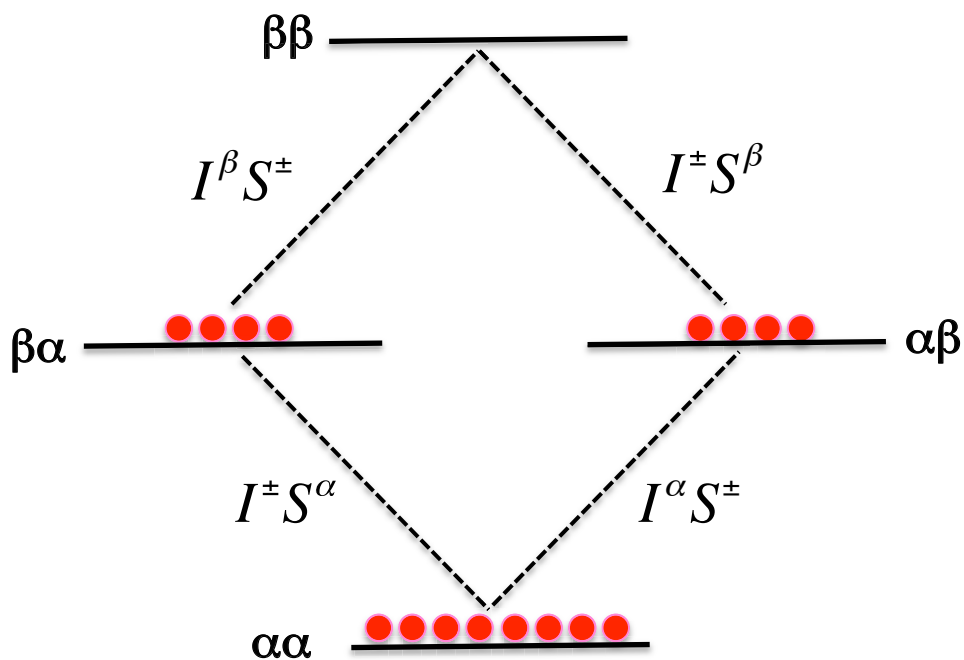


I-スピンのみを反転させた場合

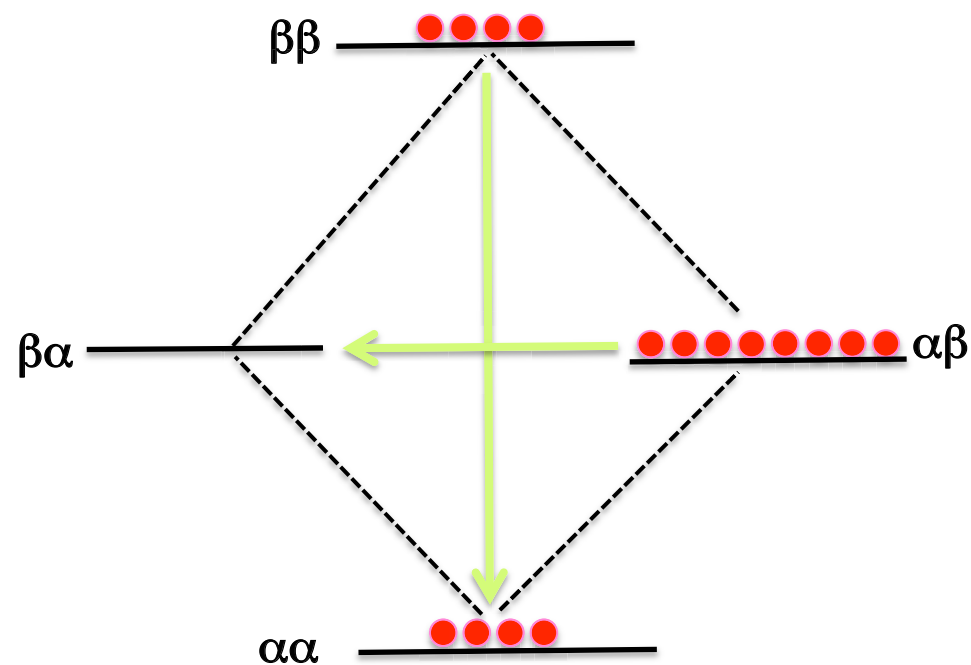


w_0 遷移が存在する

平衡状態でのエネルギー準位図



s-スピンのみを反転させた場合

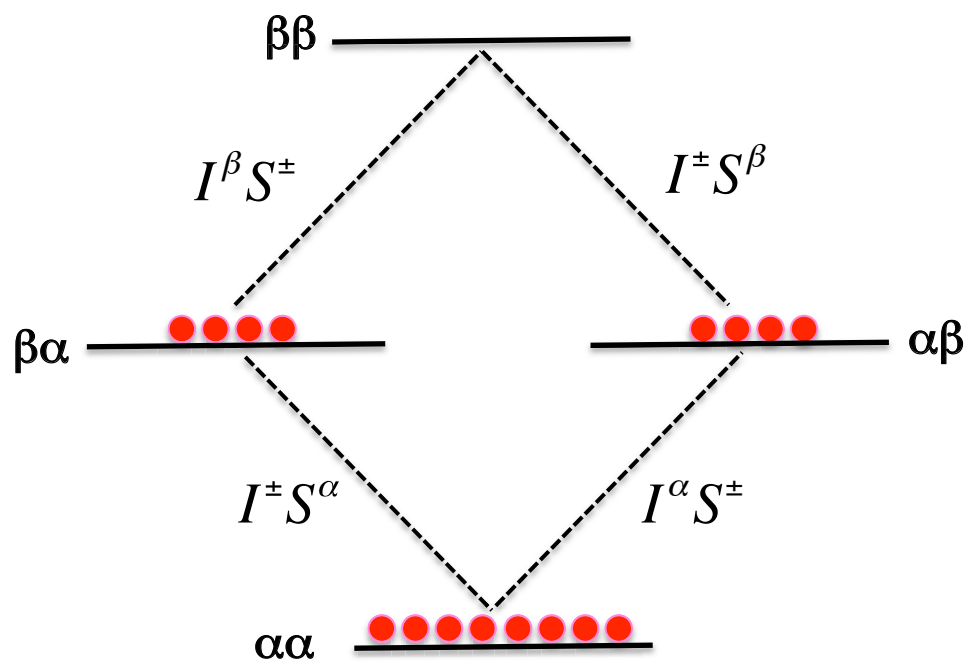


I-スピンの縦緩和に影響を及ぼす遷移
(交差緩和)のうち初期状態のみを表示

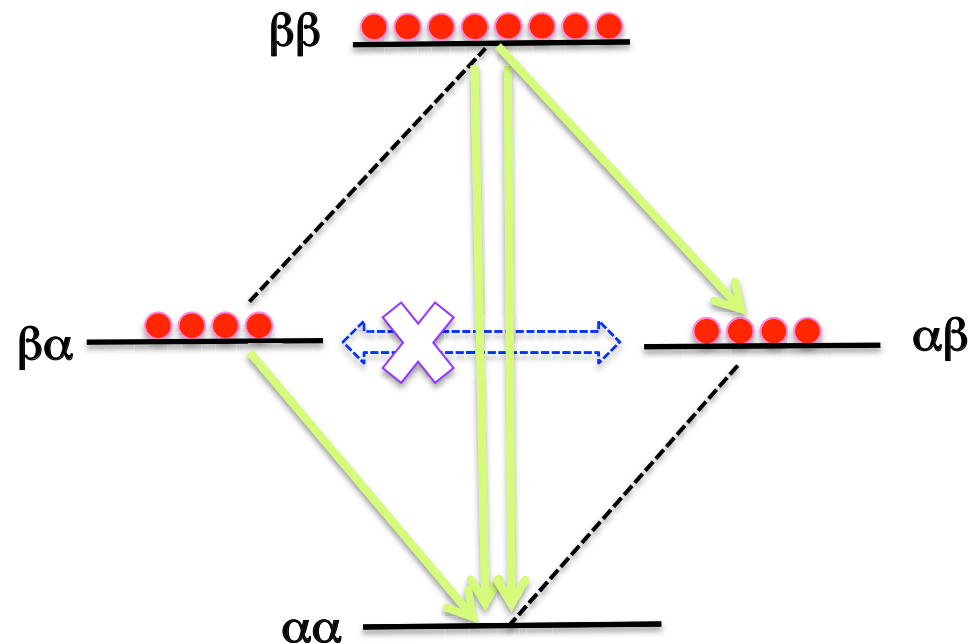
Transient-NOE (過渡的 NOE)

高分子で効率的な W_0 遷移(逆方向)が存在する
 W_0 が W_2 よりも大きい時は負の NOE

平衡状態でのエネルギー準位図



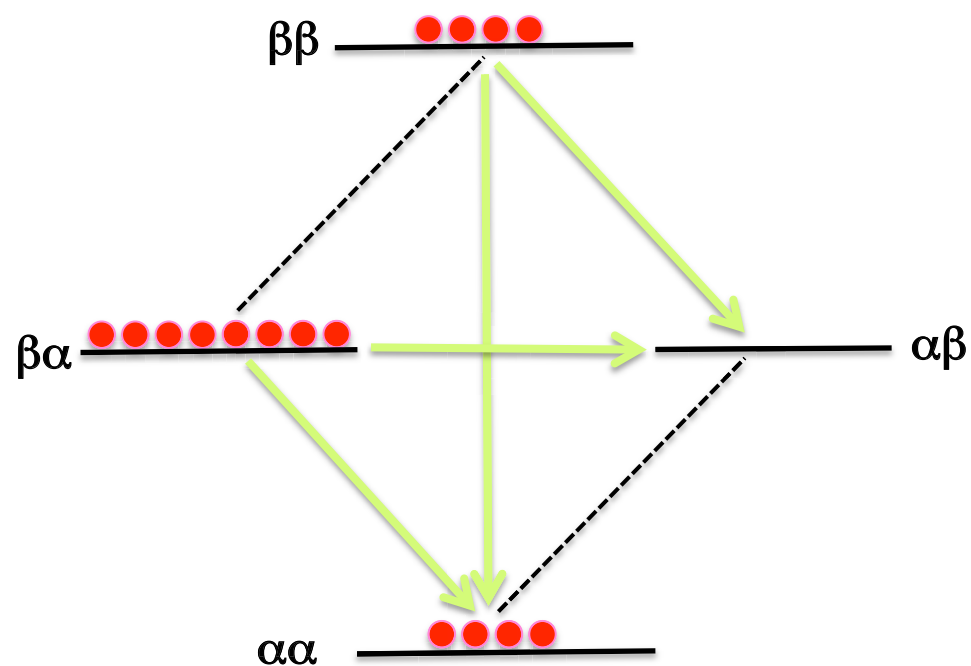
I, s-スピン両方を反転させた場合



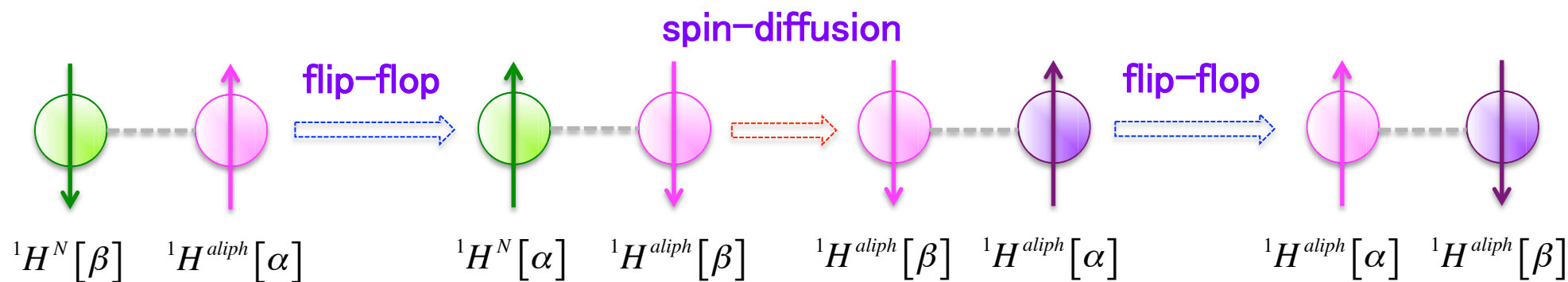
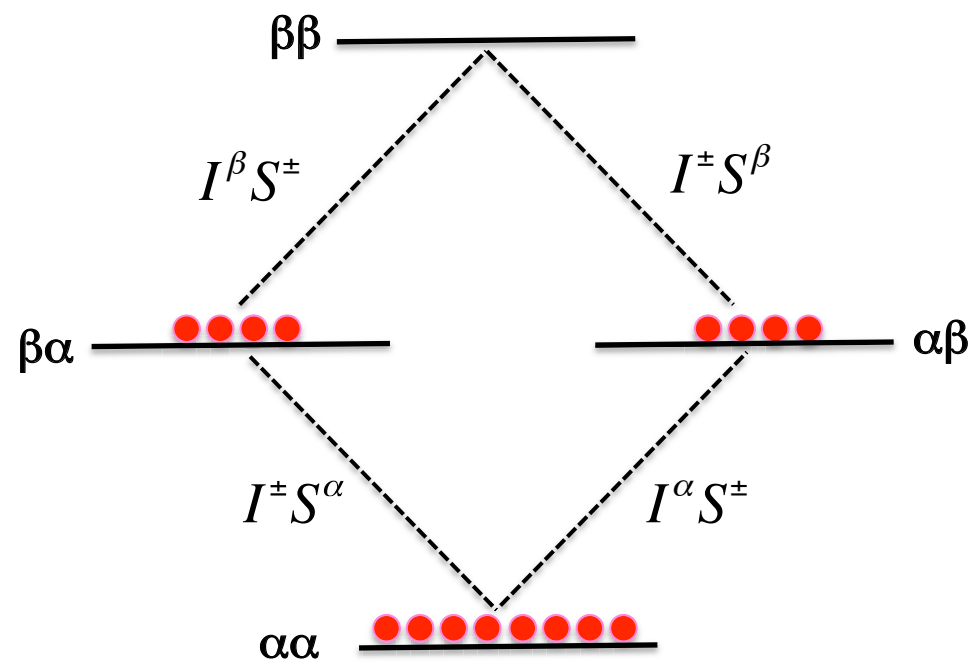
高分子でもっとも効率良く起こるはずの flip-flop の遷移が無い。

自己緩和と交差緩和の W0 同士が打ち消し合ってしまう。
β α と α β の数が同じになってしまう。

$^1\text{H}^N$ スピンのみを反転させた場合

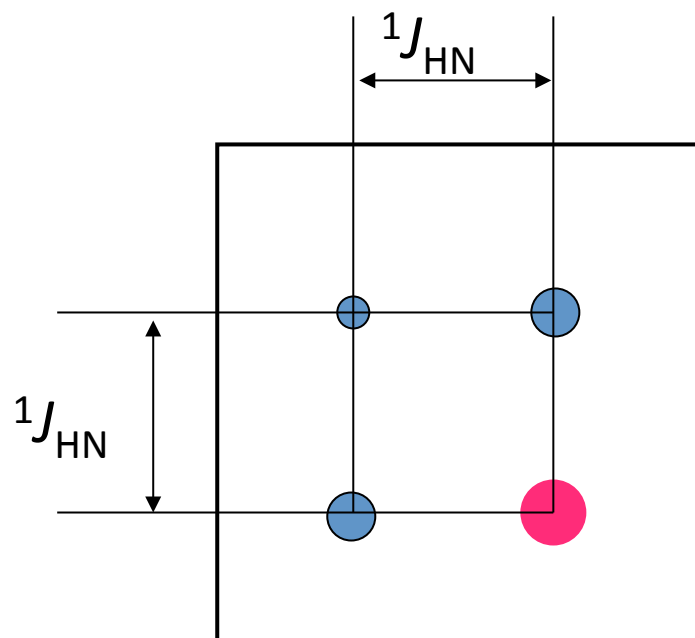


平衡状態でのエネルギー準位図

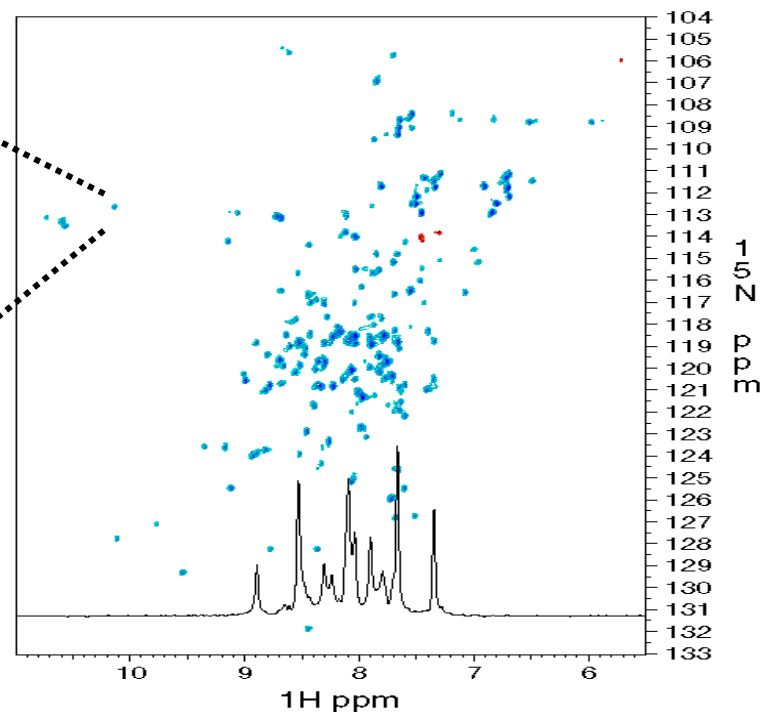


TROSY 法
交差相関緩和
(cross-correlated relaxation)

TROSY パルス系列による高分子量への挑戦



二次元 ^1H - ^{15}N 相関スペクトル

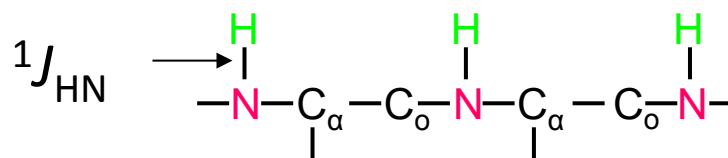


^{15}N 化学シフト値 (ppm)

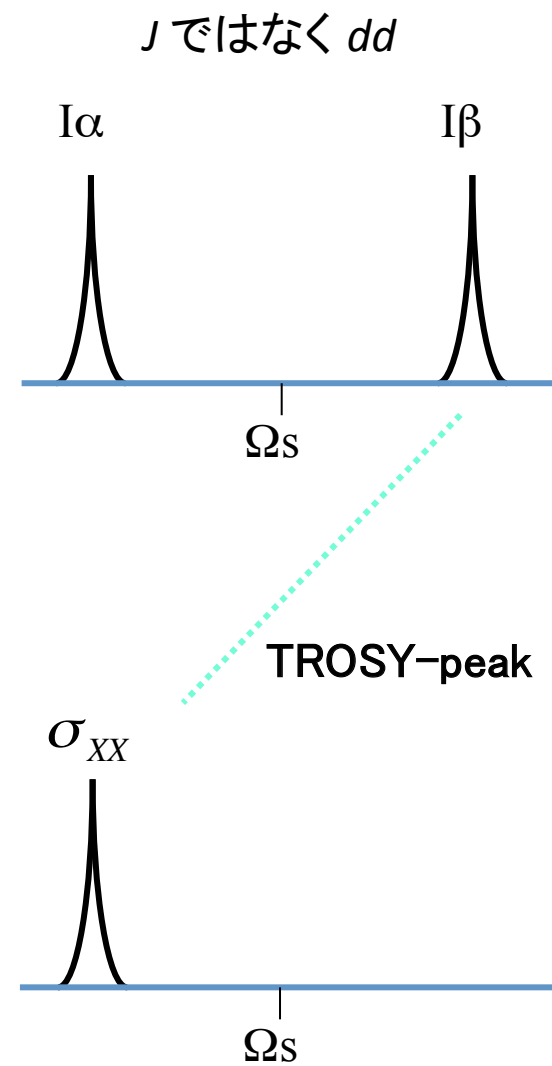
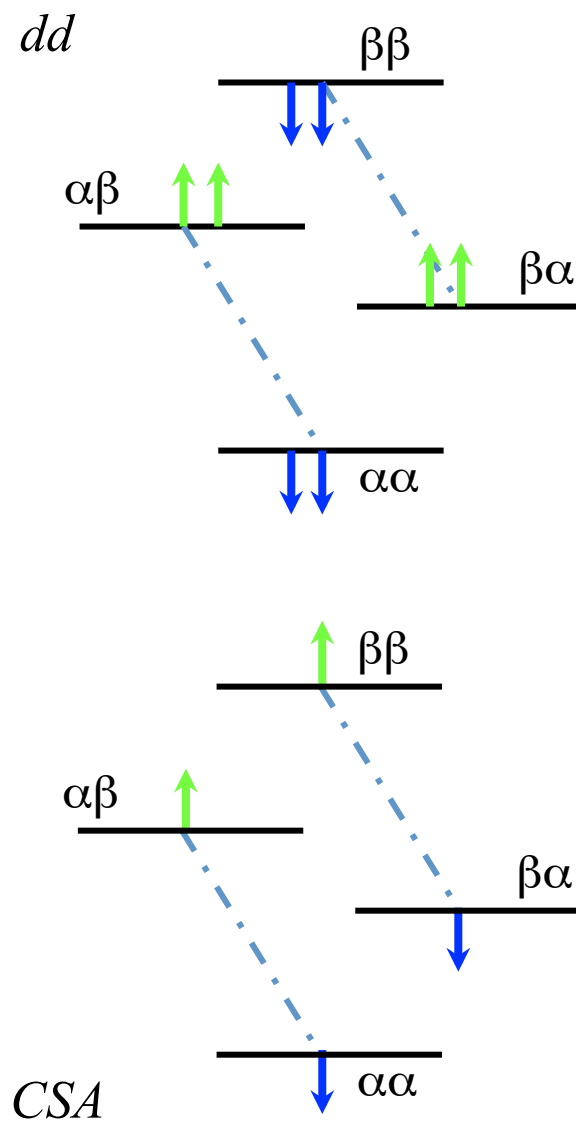
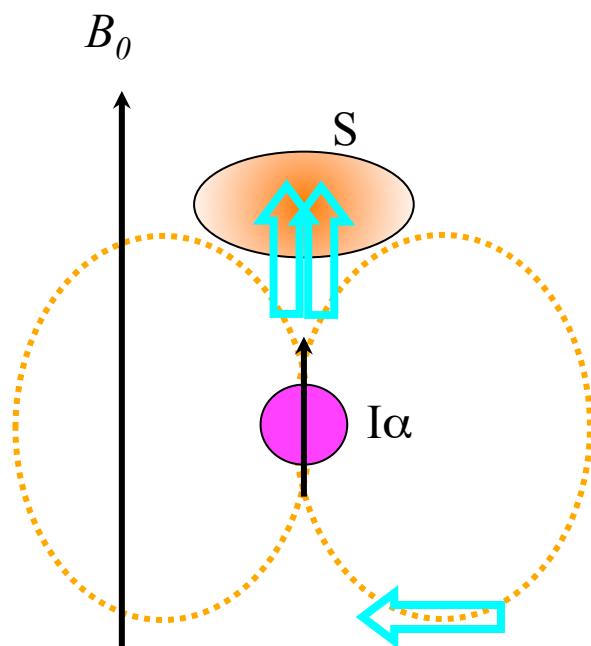
800 kDa 高分子量でも観測可

^1H 化学シフト値 (ppm)

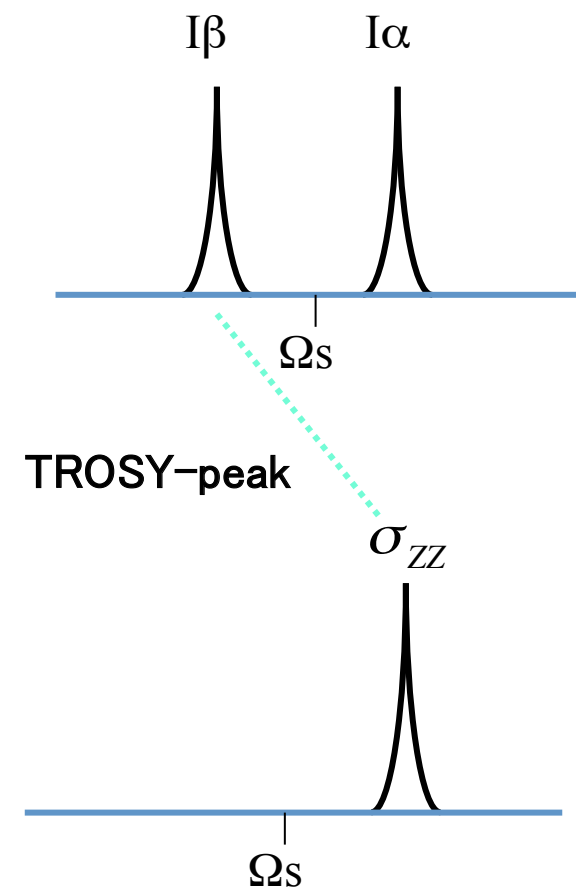
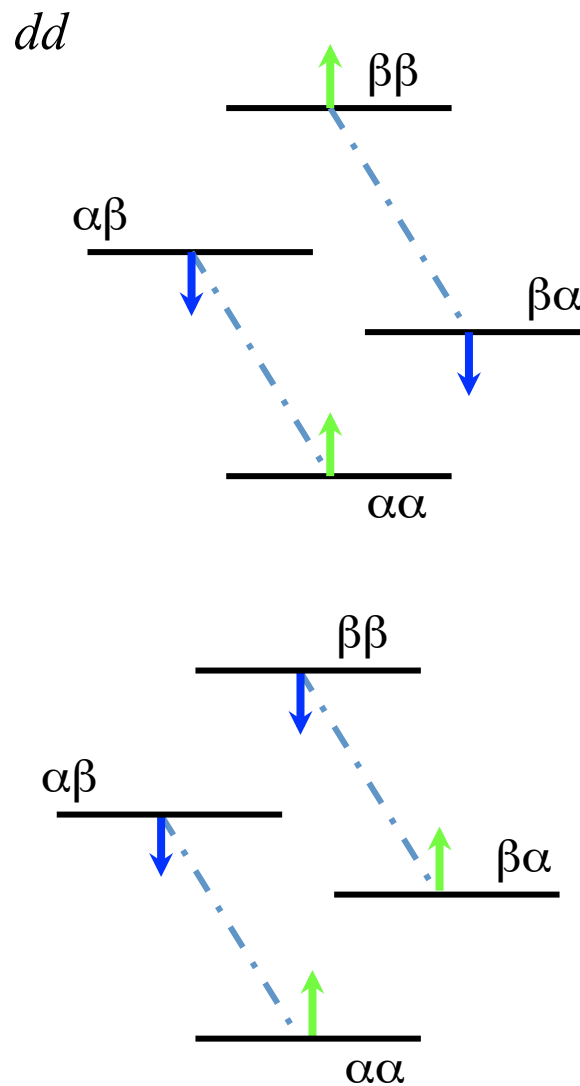
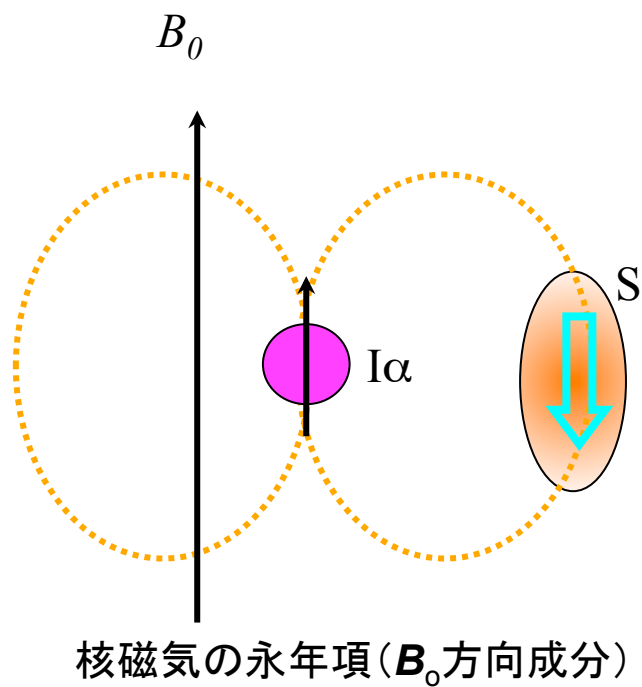
アミド基、メチル基、芳香環に適用可



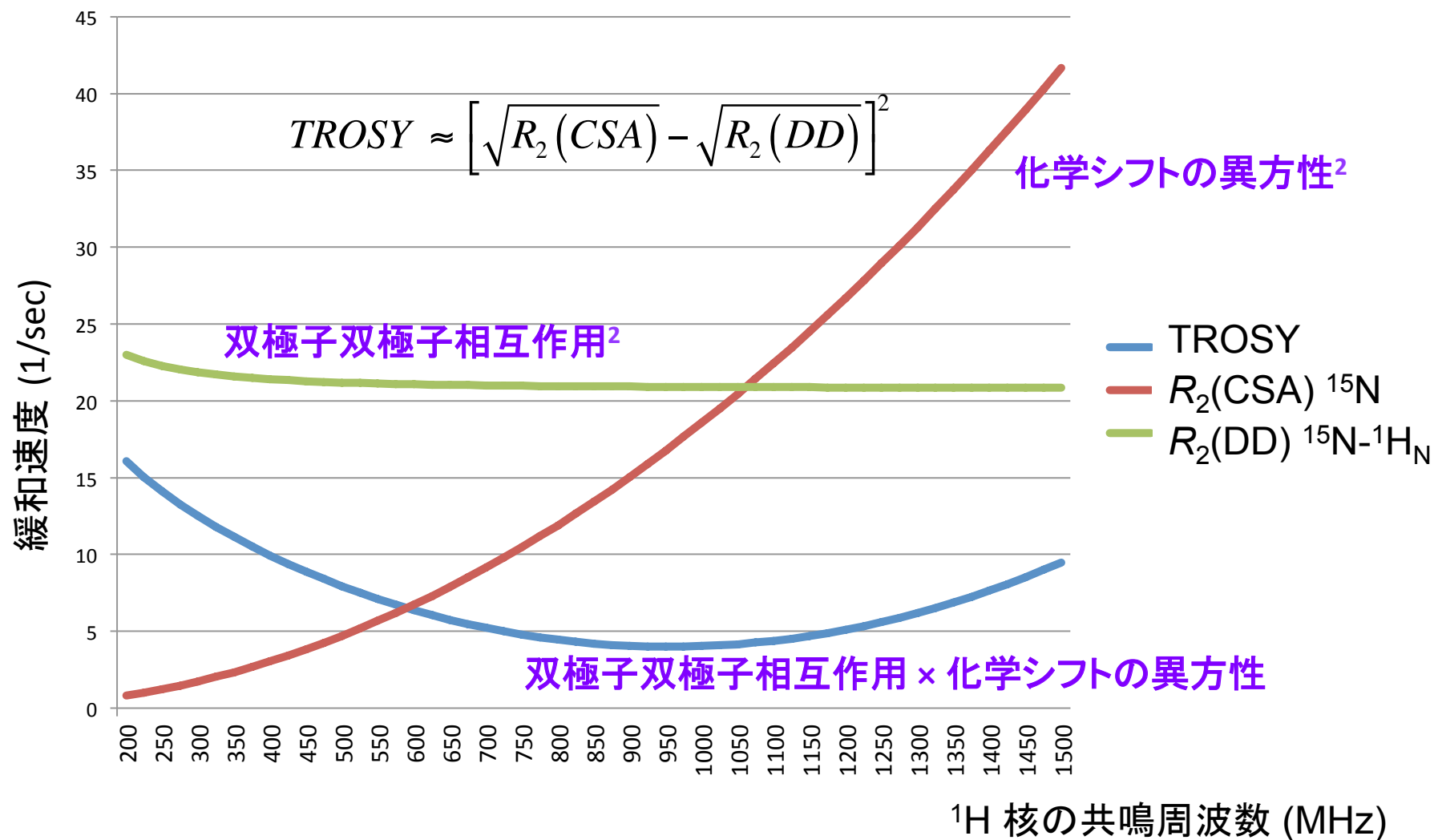
交差相関 cross-correlation between DD and CSA



分子が 90 度回転して I-S 結合が横を向くと ...



$^{15}\text{N}-^1\text{H}$ の dd/csa TROSY 効果は静磁場強度 B_0 に依存する



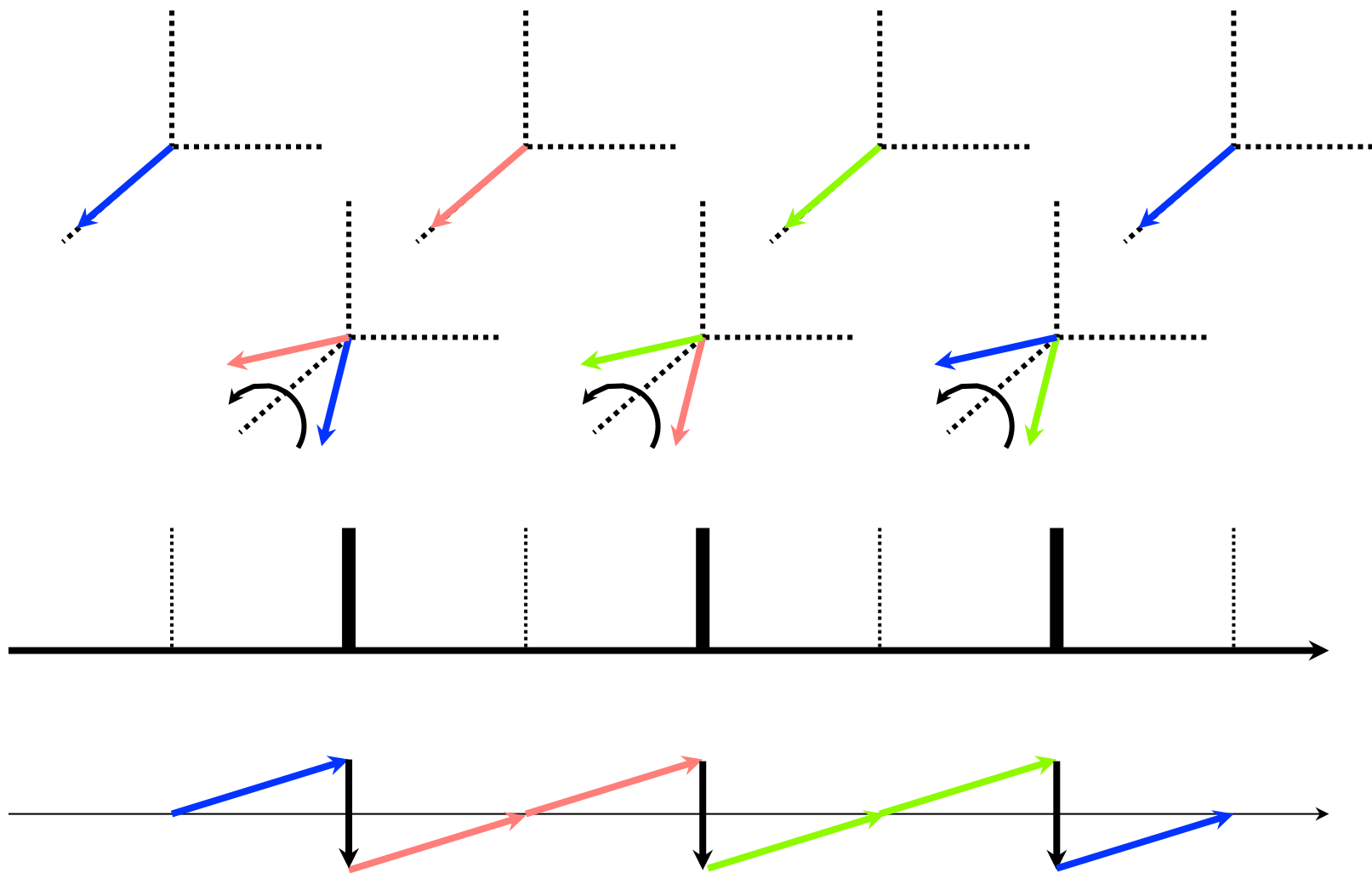
$\tau_r = 20 \text{ ns}$ ($\sim 50 \text{ kDa}$), $\vartheta_{\text{csa-dd}} = 15^\circ$

relaxation dispersion 法 緩和分散法

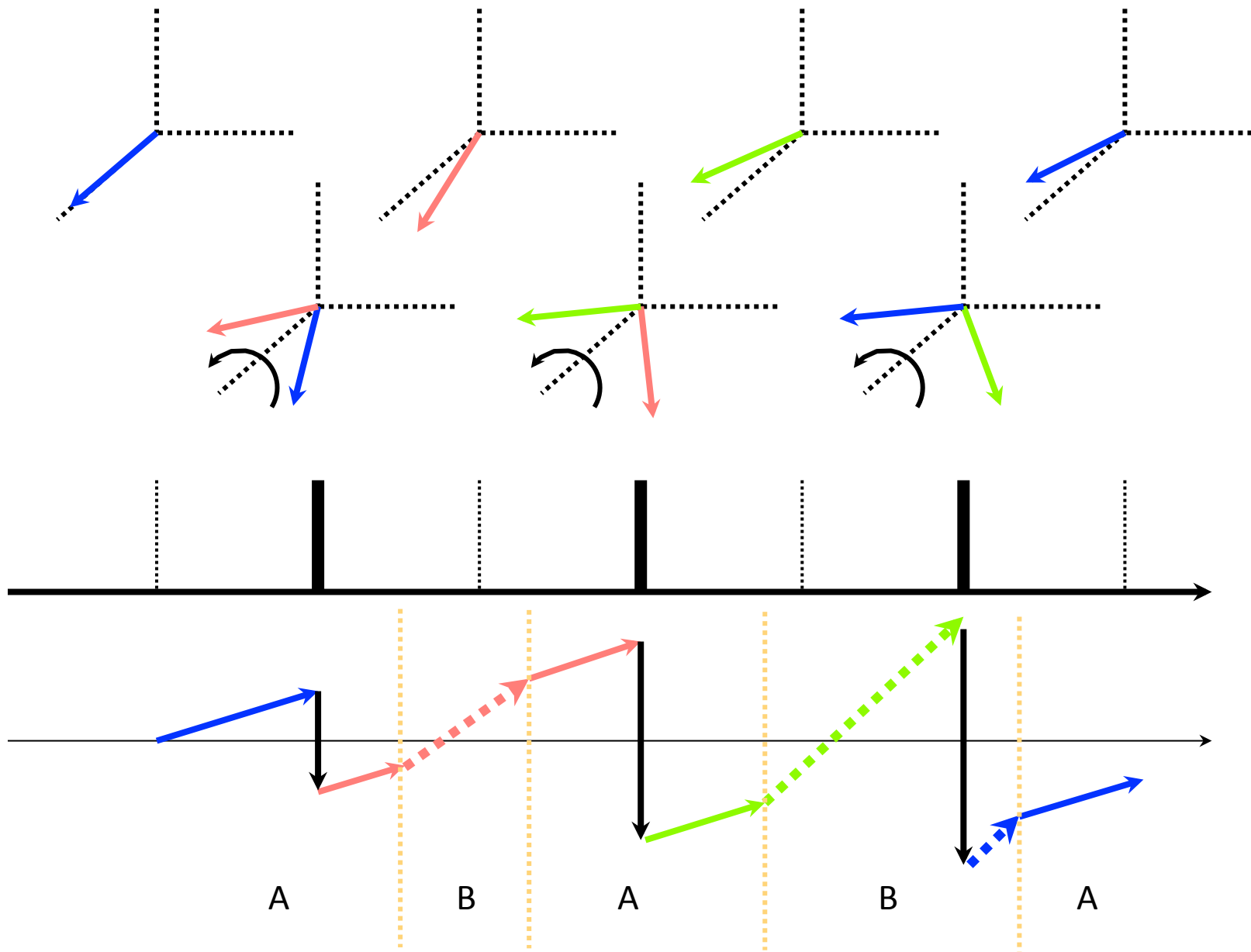
Brutscher, B. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* 127, 8014-8015.
に SOFAST-HMQC の名が出て来ますが、それよりも前の
Pervushin, K. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124, 12898-12902.
に LHSQC の名で、ほぼ同じ原理の測定法が報告されています。

L17 (Masaki Mishima)
P029 (Kenji Ogura)
P046 (Ayaho Kobayashi)

構造(化学)交換が存在しない場合の CPMG



構造(化学)交換が存在する場合の CPMG



もっと密に π パルスを試してみると...

