固体 NMR を利用した生物固体試料内小分子化合物の構造研究

松岡 茂†

Structural Study on Small Molecules in Biological Solid Samples
by Using Solid State NMR

Shigeru Matsuoka†

*The University of Tokyo, Graduate School of Pharmaceutical Sciences;
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.*

(Received May 18, 2012)

Many small molecule drugs have molecular targets that are non-crystalline and insoluble biological matrices, such as proteins embedded in lipid membrane, cell membranes, and cell walls. To understand the action mechanisms, it is essential to determine the binding structure with atomic-level resolution. Although solution nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray crystallography have been used to determine molecular structures of cell membrane and membrane proteins, these methods are unable to reproduce the complexity of biological systems because either solubilization or crystallization of target molecules is requisite. For structural studies of insoluble non-crystalline biological samples, so-called “biological solids”, high resolution distance measurements using solid-state NMR are indispensable techniques, of which rotational-echo double-resonance (REDOR) is one of the most widely used methods. In this paper, a brief introduction to REDOR NMR and its applications to structural studies on the antifungal amphotericin B-membrane phospholipid complex and a structural elucidation of photorespiration metabolites in plant cells without extraction or isolation is provided.

Key words——solid state NMR; small molecule; biologically active structure

1. はじめに

理論的医薬分子設計において、作用標的部位の3次元構造は不可欠な情報である。現在、タンパク質などの生体分子の高分解能構造は、主にX線結晶解析、溶液NMRにより得られている。これらの手法は、単離・精製したタンパク質を用いて、それぞれ結晶化、可溶化して測定試料とする。しかし、医薬の標的の約半分を占める膜タンパク質や、薬剤が細胞上で最初に接触する細胞膜、細胞壁は、単分子ではなく分子集合体として構造・機能を有するため、単離せずに直接分子構造解析するのが理想であ

る。

固体NMRは、結晶化・可溶化のできない固体試料の構造研究手段として、高分子科学、材料化学の分野で長年活用されてきた。薬学では、主に製剤の結晶多形分析に用いられている。近年、試料状態にかかわらずNMR情報を得られる特徴を活かし、細胞膜や膜タンパク質などの生物固体試料への応用研究も増えている。¹⁻⁶⁾特に原子間距離測定法は、非晶質固体の分子構造を直接与えるため、重要な研究手法となっている。

細胞や生物組織を試料として、その中に含まれる分子構造を、単離精製、化学修飾せずに直接知ることができるのは固体NMRの最大の利点である。しかし、その固有の有用性にもかかわらず、生体分子構造研究における固体NMRの地位は、溶液NMR、X線結晶解析に大きく水をあけられている。この理由には、感度が低いためスループットが低いことと、実験手順の定型化が進んでいないため、NMRの理論とハードに精通する必要があることが挙げら

The author declares no conflict of interest.

東京大学大学院薬学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

現所属：†大阪大学大学院理学研究科化学専攻、JST-ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト (〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1)

e-mail: matsuokas11@chem.sci.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成23年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

れる。前者については、動的核分極などの技術開発⁷⁾と高速 MAS 回転などの装置改良⁸⁾が進められている。後者に関しては、生命科学分野での応用研究を増やし、実験手順を洗練、簡略化していく必要があると思われる。

筆者は固体 NMR の原子間距離測定法の 1 つである回転エコー二重共鳴法 (Rotational-Echo DOuble-Resonance: REDOR) を応用して、生物固体試料、特に小分子が生物環境下で形成する複合体の構造研究を行ってきた。⁹⁻¹⁶⁾ 本稿では、筆者らが行ってきた応用研究を固体 NMR 法の基礎と交えて紹介する。

2. 固体 NMR の背景

2-1. 固体試料の NMR 通常の溶液 NMR の装置では、固体試料は測定できない。溶解度が低い化合物で、不溶物となった試料から NMR が観測できなかった経験を、多くの方がお持ちだと思われる。高分解能固体 NMR では、この不溶性部分の NMR を測定するための工夫がなされている。

実際には、固体 NMR の方が溶液 NMR より多くの構造情報を含み、そのために観測できないほどシグナルが広幅化する。¹H, ¹³C などのスピン 1/2 核の NMR で観測される相互作用は、外部磁場-核スピン間の相互作用 (ゼーマン相互作用), 周辺電子による遮蔽効果 (化学シフト), 結合電子を介した核スピン-核スピン間の間接的相互作用 (*J*カップリング), 核スピン-核スピン間の直接相互作用 (双極子相互作用) である (Fig. 1)。²H などのスピン ≥ 1 の核では、さらに核スピン-核内電場勾配の相互作用 (四極子相互作用) が加わる。これらのうち一般的な溶液 NMR スペクトルに含まれる情報は、ゼーマン相互作用, 化学シフトの等方値と *J*カップリングの 3 つである。

一方、固体 NMR では、溶液でみえる 3 つの成分に加えて、化学シフトの異方性, 双極子相互作用の 2 つ (スピン ≥ 1 では四極子相互作用も加えて 3 つ) の異方成分が観測される。異方成分は、外部磁場に対する分子の向きに依存して、大きさが変化する。例として、Fig. 2 にカルボニル炭素の化学シフト異方性を示した。¹⁷⁾ 化学シフトとは、核スピン周辺の電子による外部磁場の遮蔽効果である。sp² 炭素周囲の電子分布は均一な球状ではないため、外部磁場が作用する方向に依存して電子による遮蔽効果が異なり、大きな異方性を示す [Fig. 2(a)]. 分子運動

Fig. 1. Observable NMR Interaction in Solution and Solid Samples

Fig. 2. Chemical Shift Anisotropy

a) ¹³C Chemical shift anisotropy (CSA) tensor orientation in the molecular frame of amide carbonyl carbon ($\sigma_{xx}=249$ ppm, $\sigma_{yy}=189$ ppm, $\sigma_{zz}=88$ ppm). b) Ideal powder type ¹³C spectrum simulated with the CSA tensor of amide carbonyl carbon.

のほとんどない固体試料では、外部磁場に対して異なる向きで存在する分子が、それぞれ異なる化学シフトを示すため、広幅なスペクトルとなる [Fig. 2 (b)]. 双極子相互作用, 四極子相互作用も、化学シフトと同様に異方的であるため、固体試料の NMR スペクトルは、すべてが足し合わされて著しく広幅化する。

分子運動が速い溶液試料では、外部磁場に対する分子配向の変化が NMR の時間スケールより十分に短いため、異方成分が平均化された等方値が観測される。

2-2. 高分解能固体 NMR 固体試料を用いて高分解能 NMR を測定するには、前述の異方性相互作用を除去する技術が必要とされる。本稿では簡単なため、有機試料で重要となるスピン 1/2 核の ¹³C NMR を例として解説する。¹³C NMR で問題となる異方性相互作用は、化学シフト異方性と双極子相互作用である。これらを消去するために、ハイパ

ワー ^1H デカップリングとマジック角試料回転 (magic angle sample spinning: MAS) の 2 つの技術を併用する.¹⁸⁾

Figure 3 に、種々の条件で測定した $[\text{u-}^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}]$ Gly [Fig. 3(a)] の α 型結晶の粉末固体 ^{13}C NMR スペクトルを示した。Figure 3(b) には高分解能化技術を使わない場合の固体 NMR スペクトルを示した。化学シフト異方性と双極子相互作用によりシグナルは著しく広幅化し、ほとんどみえない。同じ試料に ^1H ハイパワーデカップリングを適用したスペクトルが Fig. 3(c) である。 ^1H - ^{13}C 双極子相互作用

Fig. 3. 150 MHz Solid State ^{13}C NMR Spectra

a) 5% $[\text{1,2-}^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}]$ Gly was crystallized from aqueous ethanol and ground into powder sample. b) ^{13}C NMR recorded without ^1H decoupling or magic angle sample spinning (MAS). c) ^{13}C NMR recorded with ^1H decoupling at 130 W. d) ^{13}C NMR recorded with ^1H decoupling at 130 W and MAS at 5000 Hz. e) ^{13}C NMR recorded with ^1H decoupling at 130 W and MAS at 9091 Hz. Cross-polarization was used in all spectra to enhance sensitivity.

が取り除かれ、化学シフト異方性、多核間双極子相互作用 (^{13}C - ^{13}C や ^{13}C - ^{15}N) の異方性テンソルを反映した広幅スペクトルが観測される。デカップリングには、100 kHz (130 W) の B_1 磁場を用いた。小さな J カップリング ($^1J_{\text{CH}} \sim 150$ Hz) の消去を目的とする溶液 NMR のデカップリングに比べ、大きな ^1H - ^{13}C 双極子相互作用 (約 30 kHz) の消去を必要とする固体 NMR では、デカップリングにハイパワーが必要となる。^{19,20)} さらに、化学シフト異方性、多核間 (^{13}C - ^{13}C や ^{13}C - ^{15}N) 双極子相互作用を除去するために MAS が適用される。試料を回転させることで、外部磁場に対する分子配向を高速で変化させ、異方的な相互作用を平均化する。外部磁場と回転軸のなす角度がマジック角 (54.7°) のとき、異方成分の平均値が 0 になり、高分解能のスペクトルが得られる [Figs. 3(d) and (e)].^{21,22)} Figure 4 に示すように、MAS 用の NMR プローブは超電導磁石に対して試料の回転軸をマジック角分傾けた構造をしている。

さらに感度上昇を目的として交差分極法 (cross polarization: CP) が併用される。^{23,24)} Figure 3 に示したスペクトルは、すべて $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ CP により観測磁化を発生させた。CP は、磁化が大きく緩和時間の短い ^1H 核から、磁化が小さく緩和時間の長い ^{13}C 核に、 ^1H - ^{13}C 双極子相互作用を介して磁化を移す技術で、これにより測定間の待ち時間を短くし、固体 NMR の測定効率を大幅に改善する。通常、高分解能固体 NMR とは、CP, MAS, ^1H ハイパワーデカップリングを組合せた CP-MAS 法を指す [Figs.

Fig. 4. Magic Angle Sample Spinning

a) CP-MAS probe head (Chemagnetics triple resonance HXY). b) Sample spinning axis is tilted at 54.7° from the external magnetic field (B_0).

3(c) and (d)].¹⁸⁾

2-3. 原子間距離測定 (REDOR 法) 高分解能固体 NMR スペクトルで除去された異方成分のうち、双極子相互作用には原子間距離情報が含まれる。固体 NMR の原子間距離測定では、CP-MAS で異方成分を消去 (decouple) した高分解能スペクトルに、特定の核種間双極子相互作用を選択的に復活 (recouple) させて、その大きさを定量する方法がとられる。

REDOR 法は、最も広く利用されている固体 NMR 原子間距離測定法の 1 つである。²⁵⁻³¹⁾ REDOR 法では、異核 (照射核と観測核) 間の双極子相互作用を MAS 下で復活させる。先述した通り、異核間双極子相互作用は、MAS により 0 に平均化される。MAS による試料 1 回転あたりの双極子相互作用の変調と、それによる磁化ベクトルの展開角を Fig. 5 (b) に示した。REDOR 法は、MAS の試料回転に RF パルスの照射を同期させ、試料が半回転するたびに、照射核のスピンの符号を反転し、双極子相互作用の正負を反転させる。これにより、試料 1 回転毎の異種核間双極子相互作用の平均値が 0 でなくな

り、照射核-観測核間に、双極子相互作用が復活する [Fig. 5(a)]. この結果、MAS 1 回転毎に 0 に収束していた観測核の磁化ベクトルが、復活した双極子相互作用により展開する [Figs. 5(b) and (c)]. 双極子相互作用の大きさは、個々の観測核-照射核間ベクトルの外部磁場に対する配向を反映するため、分子配向の揃っていない非結晶性固体では、観測核の磁化ベクトルは位相がずれ、それらの和として観測される NMR 信号の強度が減衰する。この作用から REDOR 照射核は dephaser と呼ばれる。減衰の大きさは双極子相互作用に依存する。双極子相互作用の大きさは距離の 3 乗に反比例するため、REDOR 減衰は照射核に近い観測核で、より大きくなる (Fig. 6)。

REDOR 減衰の定量評価には、照射核パルス on と off の差スペクトルを用いる [Fig. 6(a)]. 減衰時間 (dephasing time) を変えた REDOR スペクトルを測定し、シグナル減衰の大きさを減衰時間に対してプロットする。これを理論曲線にあてはめることで、双極子相互作用の大きさを定量する [Fig. 6(b)].³²⁾ 定量された双極子相互作用から、分子運

Fig. 5. Modulation of Effective Dipolar Coupling

a) Modulation of effective dipolar coupling under MAS condition. The calculation was performed with a spin pair which has a dipolar coupling of 100 Hz with a polar angle $\beta=45^\circ$. When the sample rotates from 0° to 360° along the MAS axis, the sign of effective dipolar coupling is modulated from positive to negative under MAS condition. Under REDOR condition, the sign of effective dipolar coupling is flipped at the middle of the rotor cycle by application of a 180° pulse on the dephaser channel. b) The phase evolution of magnetization of the observed nucleus by dipolar coupling. After 360° sample rotation, the dipolar phase evolution is averaged to 0 under MAS condition. On the other hand, the phase evolution is kept positive under REDOR condition by the sign-flip of effective dipolar coupling at the middle of the rotor period. c) Dipolar phase evolution of the observed nucleus in vector representation. Magnetization vector stays along the x-axis after a rotor cycle under MAS condition, while magnetization vector evolves under REDOR condition.

Fig. 6. REDOR Spectra and Simulation Curves

a) Reference full-echo (S_0 , bottom) and REDOR (S , top) spectra of $[1,2-^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}]$ Ala. The spectra were obtained with a dephasing time of 5.12 ms. b) Build up of REDOR difference ($\Delta S/S_0$). Dots represent the experimental data (filled square: Ca, open circle: C=O) and lines show the simulated values (solid line: Ca, dotted line: C=O).

動性などを考慮して、原子間距離を算出する。測定可能な原子間距離は、照射核－観測核の磁化の大きさに依存するが、およそ 10 Å 以内である。分子運動の抑制された粉末固体試料では、REDOR により求まる原子間距離の精度は極めて高く、適切な実験条件下では ± 0.1 Å と報告されている。^{33,34)}

3. REDOR の応用研究 1；アンフォテリシン－リン脂質二重膜会合構造

REDOR 法は、原子間距離の定量実験だけでなく、分子間の接触部位を特定する定性実験法としても利用価値は高い。REDOR スペクトルの特徴は、「照射核から空間的に近接した観測核が選択的に減衰する」ことである。筆者らはこの特徴を活かし、抗真菌剤アンフォテリシン B (amphotericin B: AmB, **1**) とリン脂質二重膜の会合体構造を明らかにした。

AmB は、放線菌 *Streptomyces nodosus* により生産されるポリエン化合物で、発見以来 50 年以上医薬として用いられている重要な抗真菌剤である。³⁵⁻³⁷⁾ AmB は細胞膜中でイオン透過チャネルを形成することで殺細胞活性を発現する。³⁸⁾ また、生物選択性は、生物間での細胞膜ステロール分子の構造差異により説明される。³⁹⁾ これらの作用機序は、長年研究されてきたが、細胞膜中で形成される作用構造は未解明であった。

AmB の選択性にはステロールが必要であるが、イオンチャネル形成自体にはステロールが必須ではない。⁴⁰⁻⁴³⁾ AmB の作用構造の基礎となるのは、イオンチャネル形成の場を提供する細胞膜の主成分リン脂質と AmB の相互作用である。そこでまず、

AmB とリン脂質の会合構造、すなわち AmB 分子のリン脂質二重膜への結合様式を知る必要があった。生理学実験の結果と分子モデリングから、一分子貫通型モデルと二分子貫通型モデルの可能性が指摘されていた [Fig. 7(b)] が、分光学的な証明はされていなかった。⁴⁴⁾ この問題に対し筆者らは、AmB とリン脂質の単純な二成分系を用いて、これらの会合構造を REDOR 実験により分光学的手法により初めて明らかにした。¹⁶⁾

AmB-リン脂質二重膜の結合構造解明には、膜表面に存在するリン脂質の ^{31}P を照射核として利用し、生合成的に多点標識した $[39,40,41-^{13}\text{C}_3]$ AmB 上の ^{13}C を観測核とした。この標識設計では、AmB 分子上で、リン脂質二重膜表面のリン酸基に近接した部位を特定できるため、一分子貫通型と二分子貫通型の区別が可能である [Fig. 7(b)]。

AmB の標識化には、生合成的手法を用いた。[3- ^{13}C] プロピオン酸を放線菌の培地に添加することで、分子両末端を選択的に ^{13}C 標識した $[39,40,41-^{13}\text{C}_3]$ AmB を調製した [Fig. 7(a)]。⁴⁵⁾ リン脂質には、アシル鎖長の異なる 2 つのフォスファチジルコリン dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC, $\text{C}_{14:0}$) と distearoylphosphatidylcholine (DSPC, $\text{C}_{18:0}$) を用いた [Fig. 7(a)]。

$[39,40,41-^{13}\text{C}_3]$ AmB とリン脂質混合物の水和試料を調製し、はじめに固体 ^{13}C NMR を測定した。DMPC, DSPC どちらの試料でも、3 カ所の AmB 分子末端標識部位と天然存在比に由来する分子中央のヘプタエン部分の ^{13}C NMR が観測された [Fig.

8(a)]. 同じ試料を用いて $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR を測定し、照射と非照射の差スペクトルを得た. Figure 8 に示したスペクトルでは REDOR の待ち時間

Fig. 7. Amphotericin B Ion Channel

a) Chemical structure of amphotericin B and phospholipids. b) Two types of proposed models for amphotericin B-phospholipid interaction: single-length interaction (left) and double-length interaction (right).

(dephasing time) を 22.8 ms とした. この条件では、隣り合う脂質分子間の平均距離約 8 Å で、観測に十分な大きさの REDOR 減衰 (～25%) が得られる. DMPC 中では、AmB 分子両端で REDOR 減衰が確認された [Fig. 8(a)]. 分子中央のヘプタエン部分では減衰がみられなかったことから、AmB 分子両端に DMPC 二重膜表面が近接し、分子中央のヘプタエン部からは遠いことが明らかになった.¹⁶⁾ これは一分子貫通型と一致する [Fig. 7(b)].

一方、より厚い膜を形成する DSPC 中では、AmB 分子のイオン性官能基を有する C41 側のみで減衰が観測された [Fig. 8(b)]. この結果は、AmB 一分子の長さでは DSPC 二重膜を貫通することができないため、分子の片側だけが膜表面に近くなる結合様式をとっていることを示している.¹⁶⁾

これらの結果は、分光法に基づいた AmB のリン脂質二重膜結合様式の初めての高分解能分子像となった. 本実験で用いた DMPC は、細胞膜と同程度の疎水領域長を有するため、⁴⁰⁾ 細胞膜中で形成される AmB チャネルは主に一分子貫通型の膜結合構造であると考えられる [Fig. 7(b)].¹⁶⁾

4. REDOR の応用研究 2；大豆葉組織内生体分子の直接構造解析

4-1. 二量子フィルターによる効率的バックグラウンド抑制法との組合せ 生物試料の NMR において最も重要な核種は炭素である. 炭素の NMR 活性核種 ^{13}C は、NMR 非活性核 ^{12}C に対して約 1% 程度天然に存在し、バックグラウンドシグナルを生

Fig. 8. Reference Full-echo Spectra (S_0 , bottom) and $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR Difference Spectra (ΔS , top) of $[39,40,41-^{13}\text{C}_3]$ AmB/DMPC (1/9 mol/mol) and $[39,40,41-^{13}\text{C}_3]$ AmB/DSPC (1/9 mol/mol)

a) $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR dephasings were observed at both ends of AmB (C39, C40, C41) in DMPC, corresponding to single-length interaction. b) On the other hand, only the polar side of AmB (C41) showed $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR dephasing in DSPC, indicating double-length interaction.

じる。すなわち、化学的に 100% ^{13}C 標識した分子は、天然のバックグラウンドに対して約 100 倍の感度を有する。しかし、実際の生物試料では、タンパク質や脂質などの大量の夾雑物が巨大なバックグラウンド信号を生じるため、100 倍の感度比では注目する分子の信号がバックグラウンドに埋もれて観測できないことが多い。複雑な分子混合物である生体組織から、特定の分子骨格を選択する新規方法論の開発は、固体 NMR の生物試料への応用において最も重要な課題の 1 つである。

この問題に対し筆者らは、 ^{13}C - ^{13}C クラスタを観測ユニットとして用いる新しい REDOR 法を考案し、効率的なバックグラウンド抑制に成功した。^{13,14)} すなわち、主に孤立した天然存在比 ^{13}C から生じる巨大なバックグラウンド（一量子コヒーレンス）下で、 ^{13}C - ^{13}C クラスタの同核 J カップリングから生じる二量子コヒーレンスを二量子フィルター（Double Quantum Filter: DQF）により選択観測し、⁴⁶⁾ REDOR の原子間距離測定に用いる方法論を開発した [Fig. 9(a)]. DQF 条件下では、隣接する天然存在比 ^{13}C - ^{13}C ペアに由来するバックグラウンドは約 0.01% となり、約 10000 倍の感度で標識部位を選択観測できる。Figure 9(b) に [1,2- $^{13}\text{C}_2$] Ala と [3- ^{13}C] Ala の 1:1 混合物の ^{13}C NMR スペクトルを示した。下段の CP-MAS スペクトルでは Ala の 3 つの炭素すべてのシグナルがみられるが、上段の DQF スペクトルでは [1,2- $^{13}\text{C}_2$] Ala の ^{13}C - ^{13}C クラスタだけが選択的に観測される。ここに

REDOR を組合せることで、選択観測した ^{13}C - ^{13}C クラスタと照射核 (^{15}N など) の異核原子間距離測定を可能とした。¹⁴⁾

4-2. 大豆葉試料を用いた光呼吸代謝物の直接構造解析 光照射下で植物が行う光呼吸は、ATP と NADPH を消費して糖を分解するため、一見全く無駄な生合成経路であり、その存在意義はわかっていない。⁴⁷⁾ 光呼吸代謝産物の追跡、構造決定ができれば、光呼吸の真の機能を解明できると期待される。光呼吸の生産物は、膨大な分子種から形成される葉組織の中では微量成分であるため、高選択的なシグナル観測法を用いる必要があった。この問題に対し、筆者らが開発した DQF-REDOR 法を用いて ^{13}C - ^{13}C - ^{15}N スピンクラスタを選択観測し、天然存在比由来のバックグラウンドシグナルを大幅に抑制して、光呼吸代謝産物であるグリシンユニット (^{13}C - ^{13}C - ^{15}N) の追跡を試みた。¹⁴⁾

^{15}N 強化培養した大豆を、 $^{13}\text{CO}_2$ 雰囲気下で 6 分間太陽光を照射し、光合成及び光呼吸の代謝物を ^{13}C , ^{15}N で均一に標識した。^{48,49)} $^{13}\text{CO}_2$ 取り込み後、葉を直ちに液体窒素中で凍結し、凍結乾燥して、抽出・精製せずに直接固体 NMR 試料とした。まず、 ^{13}C DQF スペクトルにより、太陽光の照射中に合成された ^{13}C - ^{13}C クラスタを有する代謝物を選択観測した。DQF スペクトルでは光合成で生成した糖が最も大きな信号を与えた (Fig. 10 黒)。得られた ^{13}C DQF スペクトルに ^{13}C { ^{15}N } REDOR を適用し、 ^{15}N と隣り合う ^{13}C を減衰させた (Fig.

Fig. 9. DQF-REDOR Experiment

a) Pulse sequence of the ^{13}C { ^{15}N } DQF-REDOR experiment. ^{13}C - ^{13}C spin pairs were selectively observed by in-phase double-quantum filtering sequence on the ^{13}C channel, while REDOR dephasing pulses are applied on ^{15}N . b) Reference CPMAS spectrum (bottom) and DQF spectrum (top) of the [1,2- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N] Ala / [3- ^{13}C] Ala (1/1) mixture, 5% diluted in unlabeled Ala. Signal from single ^{13}C spin of [3- ^{13}C] Ala was filtered out in the DQF spectrum (indicated by arrow).

Fig. 10. $^{13}\text{C}\{^{15}\text{N}\}$ DQF-REDOR Spectra of a Lyophilized Soybean Leaf (150 mg) Labeled for 6 Min with 300-ppm $^{13}\text{CO}_2$

The full-echo spectrum is shown in black and the ^{15}N -dephased spectrum in gray. The double-quantum filter was optimized for 56 rotor periods. Dephasing was restricted to 12 rotor periods to extract ^{13}C signals neighboring to ^{15}N . Both S and S_0 spectra resulted from the accumulation of 480000 scans.

10 灰色). REDOR の on と off で差があらわれた部分が、 ^{13}C - ^{13}C - ^{15}N クラスターの真中に位置する ^{13}C に相当し、光呼吸で合成されたグリシンの α 炭素及び、ペプチド結合を形成しているグリシル基のカルボニル炭素に帰属される.⁵⁰⁾ すなわち、光呼吸によりグリシンとなった ^{13}C - ^{13}C ユニットが、短時間のうちにタンパク質合成に利用されペプチド結合を形成したことを示す。さらに中磁場領域にあらわれたシグナルの化学シフトは核酸前駆体のグリシン由来部分に相当した (Fig. 10 右下)。これらの結果から、光呼吸により生成するグリシンは、単に分解されるだけでなく、タンパク質合成や核酸合成などの細胞活動に利用されていることが判明した。本方法論により、短時間の代謝活動で生成した微量の低分子有機化合物を、生物組織から抽出せずに、直接構造解析することに成功した。¹⁴⁾

5. おわりに

本総説では固体 NMR の基礎と筆者らが行ってきた生物試料への応用研究の一部を紹介した。ここまで述べてきた通り、固体 NMR の特徴は、試料状態に依存しない NMR 観測と、精密原子間距離測定で

ある。現在、薬学における固体 NMR の役割は、CP-MAS による結晶多形の化学シフト解析が主であり、精密原子間距離測定の実用研究はほとんど行われていない。理論的には、固体 NMR を用いれば、作用標的分子と医薬分子の複合体構造を細胞内や生物組織内で直接高分解能構造解析できる。この特徴は創薬研究に極めて有用であると考えられる。固体 NMR は、高速 MAS や DNP 等による高分解能化、高感度化が進んでおり、近い将来、溶液 NMR と遜色ないデータが得られるようになると予想される。固体 NMR が創薬研究に資する重要な分光法になることを期待して、今後も薬化学分野での応用研究を続け、方法論の洗練・簡略化を目指したい。

謝辞 本研究は、大阪大学大学院理学研究科化学専攻、Washington University in St. Louis、東京大学大学院薬学系研究科で行われました。分子生物学における固体 NMR の重要性をいち早く見抜き、筆者を本研究へ導いて下さいました大阪大学大学院理学研究科教授・村田道雄先生に感謝いたします。CP-MAS 及び REDOR の開発者であり、固体 NMR 研究の基礎をご教授頂いた Washington University in St. Louis, Charles Allen Thomas Professor・Jacob Schaefer 先生に感謝いたします。固体 NMR の薬化学への応用に取り組むきっかけを与えて下さいました東京大学大学院薬学系研究科教授・井上将行先生に感謝いたします。共同研究により多大なご支援を頂きました、理化学研究所横浜研究所生命分子システム基盤研究領域 NMR 分光学研究チームリーダー・山崎俊夫先生に感謝いたします。また、阪大院理、WashU、東大院薬における同僚・共同研究者の方々に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Judge P. J., Watts A., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 690–695 (2011).
- 2) Loquet A., Gardienet C., Böckmann A., *C. R. Chim.*, **13**, 423–430 (2010).
- 3) Naito A., *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, **36**, 67–76 (2009).
- 4) Baldus M., *J. Biomol. NMR*, **39**, 73–86 (2007).
- 5) Hong M., *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10340–

- 10351 (2007).
- 6) Opella S. J., Marassi F. M., *Chem. Rev.*, **104**, 3587–3606 (2004).
- 7) Nanni E. A., Barnes A. B., Griffin R. G., Temkin R. J., *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.*, **1**, 145–163 (2011).
- 8) Samoson A., Tuherm T., Past J., Reinhold A., Anupöld T., Heinmaa I., *Top. Curr. Chem.*, **246**, 15–31 (2004).
- 9) Matsuoka S., Murai M., Yamazaki T., Inoue M., *Org. Biomol. Chem.*, doi: 10.1039/C2OB07157F (2012).
- 10) Yu T. Y., Singh M., Matsuoka S., Patti G., Potter G., Schaefer J., *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 6335–6341 (2010).
- 11) Kim S. J., Matsuoka S., Patti G. J., Schaefer J., *Biochemistry*, **47**, 3822–3831 (2008).
- 12) Kasai Y., Matsumori N., Umegawa Y., Matsuoka S., Ueno H., Ikeuchi H., Oishi T., Murata M., *Chem. Eur. J.*, **14**, 1178–1185 (2008).
- 13) Matsuoka S., Schaefer J., *Magn. Reson. Chem.*, **45**, S61–S64 (2007).
- 14) Matsuoka S., Schaefer J., *J. Magn. Reson.*, **183**, 271–277 (2006).
- 15) Matsuoka S., Ikeuchi H., Umegawa Y., Matsumori N., Murata M., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 6608–6614 (2006).
- 16) Matsuoka S., Ikeuchi H., Matsumori N., Murata M., *Biochemistry*, **44**, 704–710 (2005).
- 17) Cisnetti F., Loth K., Pelupessy P., Bodenhausen G., *ChemPhysChem*, **5**, 807–814 (2004).
- 18) Schaefer J., Stejskal E. O., *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1031–1032 (1976).
- 19) Fung B. M., Khitritin A. K., Ermolaev K., *J. Magn. Reson.*, **142**, 97–101 (2000).
- 20) Bennett A. E., Rienstra C. M., Auger M., Lakshmi K. V., Griffin R. G., *J. Chem. Phys.*, **103**, 6951–6958 (1995).
- 21) Andrew E. R., Bradbury A., Eades R. G., *Nature*, **182**, 1659 (1958).
- 22) Lowe I. J., *Phys. Rev. Lett.*, **2**, 285–287 (1959).
- 23) Hartmann S. R., Hahn E. L., *Phys. Rev.*, **128**, 2042–2053 (1962).
- 24) Pines A., Gibby M. G., Waugh J. S., *J. Chem. Phys.*, **59**, 569–590 (1973).
- 25) Gullion T., Schaefer J., *J. Magn. Reson.*, **81**, 196–200 (1989).
- 26) Gullion T., Schaefer J., *Adv. Magn. Reson.*, **13**, 58–83 (1989).
- 27) Schaefer J., “Recent Trends in Molecular Recognition,” eds. by Diederich F., Kunzer H., Springer, Berlin, 1998, pp. 26–52.
- 28) Grage S. L., Watts A., *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **60**, 191–228 (2006).
- 29) Gullion T., *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **65**, 111–137 (2009).
- 30) Matsuoka S., Inoue M., *Chem. Commun.*, 5664–5675 (2009).
- 31) Toke O., Cegelski L., “Solid-State NMR Studies of Biopolymers,” eds. by McDermott A. E., Polenova T., Wiley, New York, 2010, pp. 473–490.
- 32) Mueller K. T., Jarvie T. P., Aurentz D. J., Roberts B. W., *Chem. Phys. Lett.*, **242**, 535–542 (1995).
- 33) Naito A., Nishimura K., Kimura S., Tuzi S., Aida M., Yasuoka N., Saito H., *J. Phys. Chem.*, **100**, 14995–15004 (1996).
- 34) Naito A., Saito H., “Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance, Vol. 9, Advances in NMR,” eds. by Grant D. M., Harris R. K., John Wiley & Sons, Chichester, 2002, pp. 283–291.
- 35) Sternberg T. H., Wright E. T. Oura M., *Antibiotics Ann.*, **1955–1956**, 566–573 (1955).
- 36) Hartsel S., Bolard J., *Trends Pharmacol. Sci.*, **17**, 445–449 (1996).
- 37) Lemke A., Kiderlen A. F., Kayser O., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 151–162 (2005).
- 38) De Kfuijff B., Gerritsen W. J., Oerlemans A., Demel R. A., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **339**, 30–43 (1974).
- 39) Readio J. D., Bittman R., *Biochim. Biophys. Acta*, **685**, 219–224 (1982).
- 40) Matsuoka S., Murata M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1617**, 109–115 (2003).
- 41) Matsuoka S., Matsumori N., Murata M., *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 3882–3884 (2003).
- 42) Matsuoka S., Murata M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1564**, 429–434 (2002).
- 43) Ruckwardt T., Scott A., Scott J., Mikulecky P., Hartsel S. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1372**, 283–288 (1998).
- 44) Kleinberg M. E., Finkelstein A., *J. Membr.*

- Biol.*, **80**, 257–269 (1984).
- 45) McNamara C. M., Box S., Crawforth J. M., Hickman B. S., Norwood T. J., Rawlings B. J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 83–87 (1998).
- 46) Mueller L. J., Elliott D. W., Leskowitz G. M., Struppe J., Olsen R. A., Kim K.-C., Reed C. A., *J. Magn. Reson.*, **168**, 327–335 (2004).
- 47) Douce R., Heldt H. W., *Adv. Photosyn.*, **9**, 115–136 (2000).
- 48) Cegelski L., Schaefer J., *J. Magn. Reson.*, **178**, 1–10 (2006).
- 49) Cegelski L., Schaefer J., *J. Biol. Chem.*, **280**, 39238–39245 (2005).
- 50) Saitô H., *Magn. Reson. Chem.*, **24**, 835–852 (1986).