

高磁場 NMR の利用
 ^{13}C 検出への期待

2012 年 1 月 25-26 日
首都大学東京秋葉原サテライトキャンパス
第 13 回 RRR-workshop 2011/12

核磁気共鳴装置



大阪大学蛋白質研究所
構造プロテオミクス研究系
池上貴久

NMR の高磁場化に伴う利点

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 $\propto B_0^{1/2}$

$$(S/N)_{950\text{MHz}} / (S/N)_{600\text{MHz}} = 2$$

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

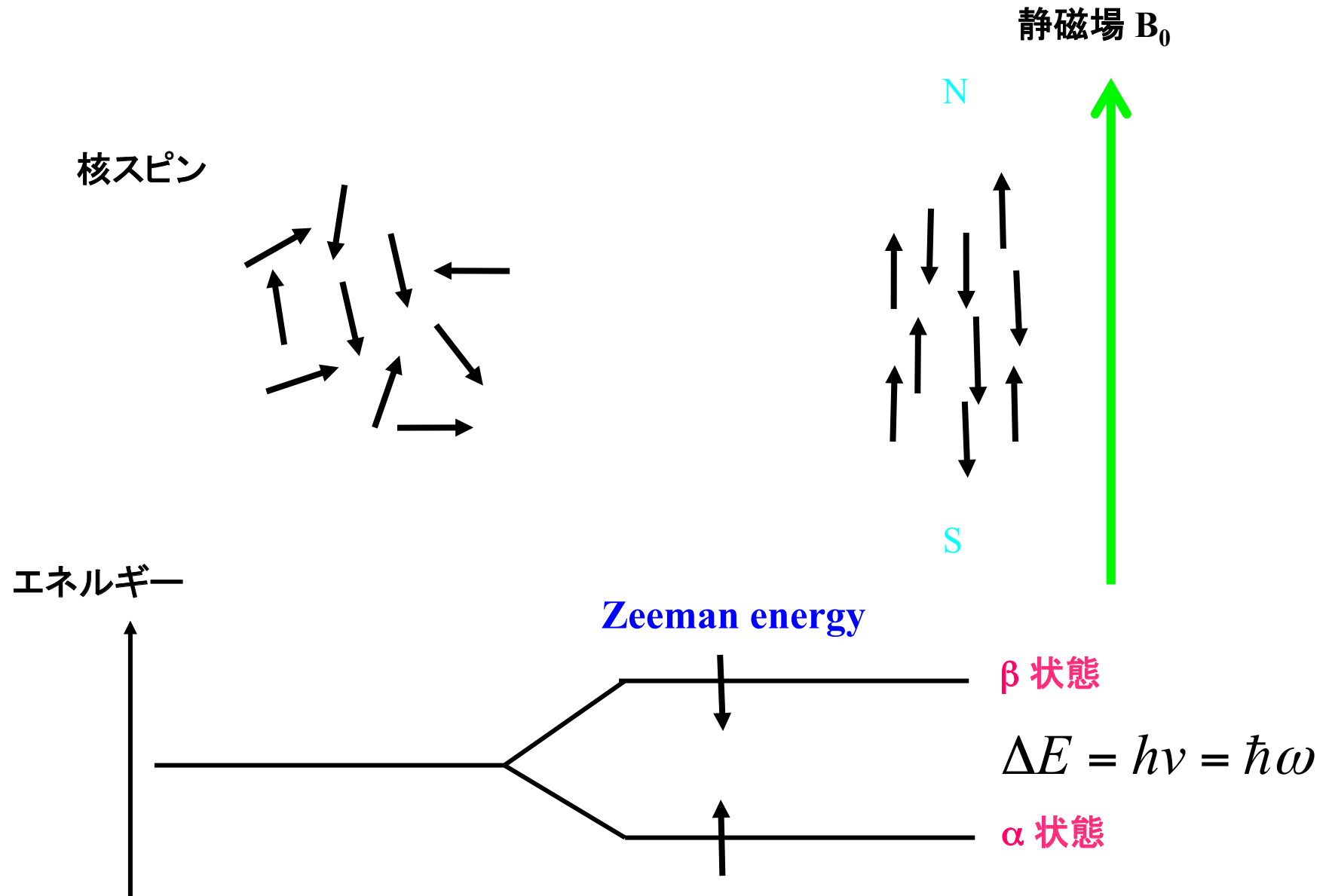
$$\omega_0 = -\gamma B_0$$

直接測定軸(FID)における分解能の増加

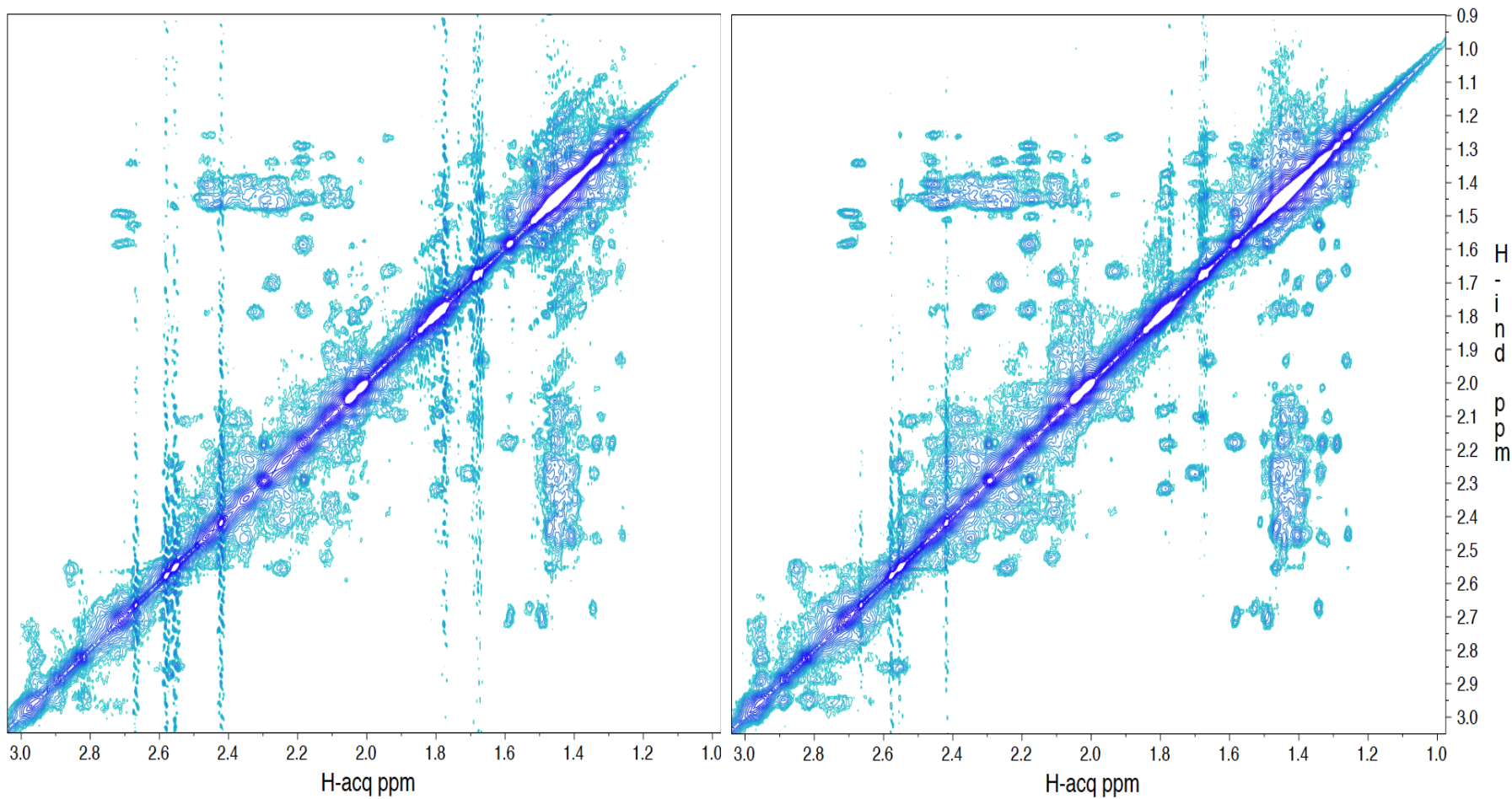
交差相関緩和による $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY 効果

磁化率の異方性による磁場配向の増加

核磁気モーメント

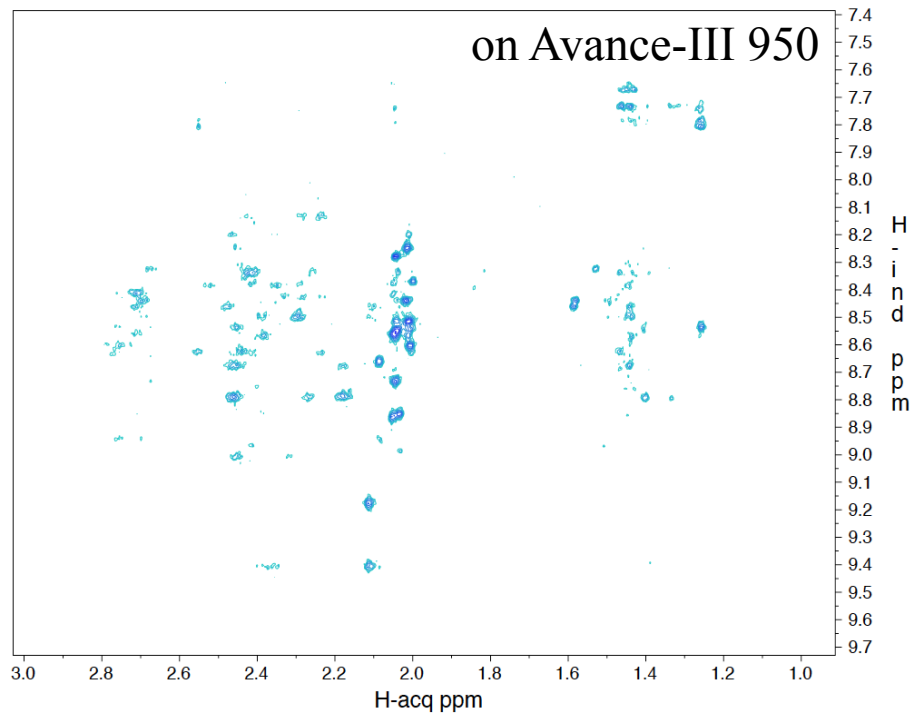
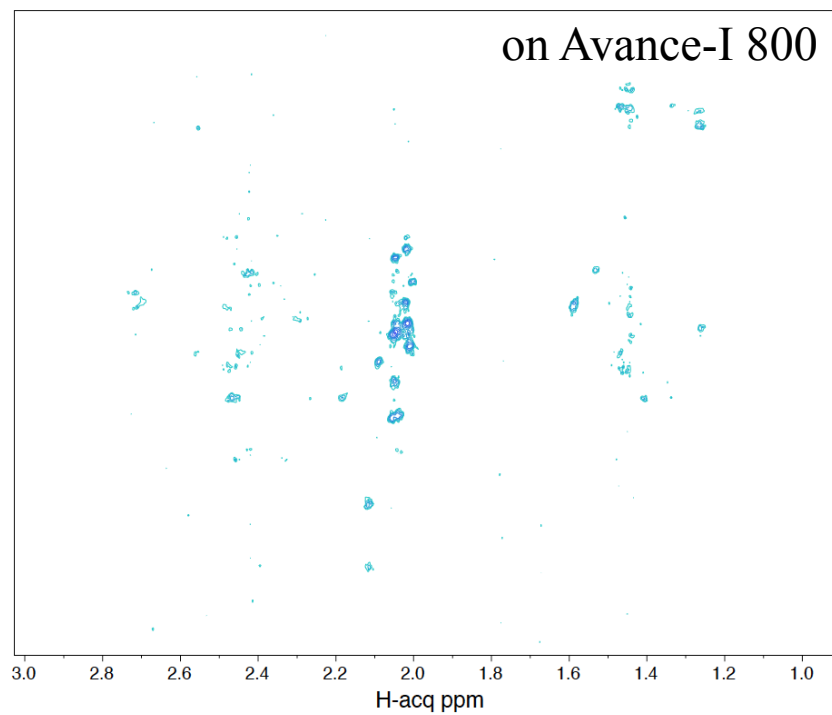
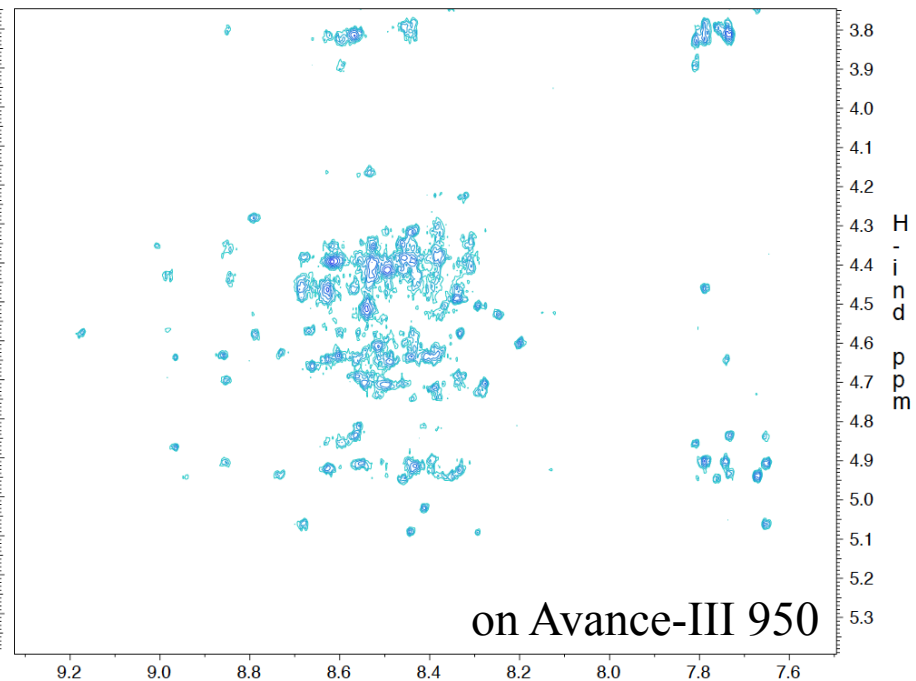
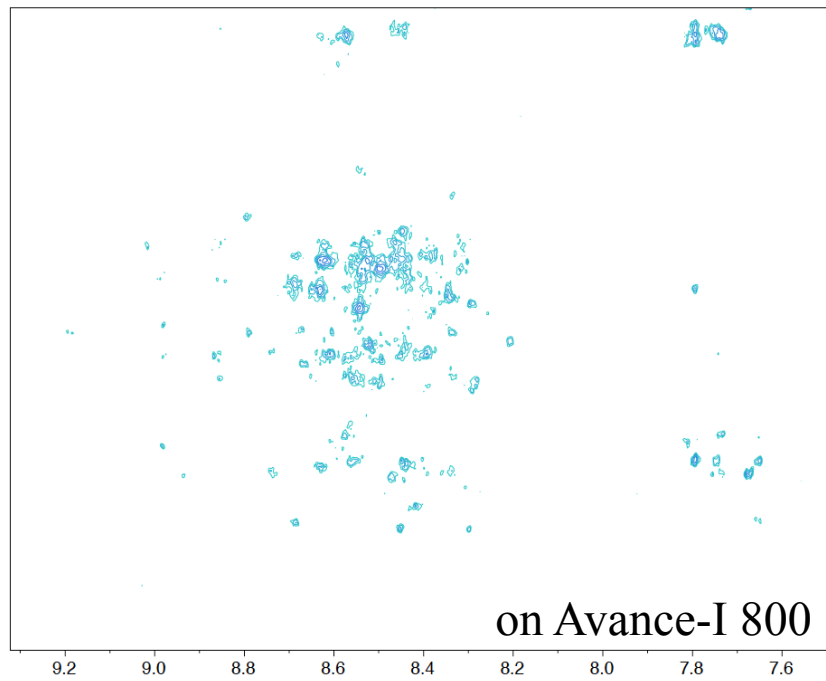


Comparison of particular regions in the 2D NOESY spectra

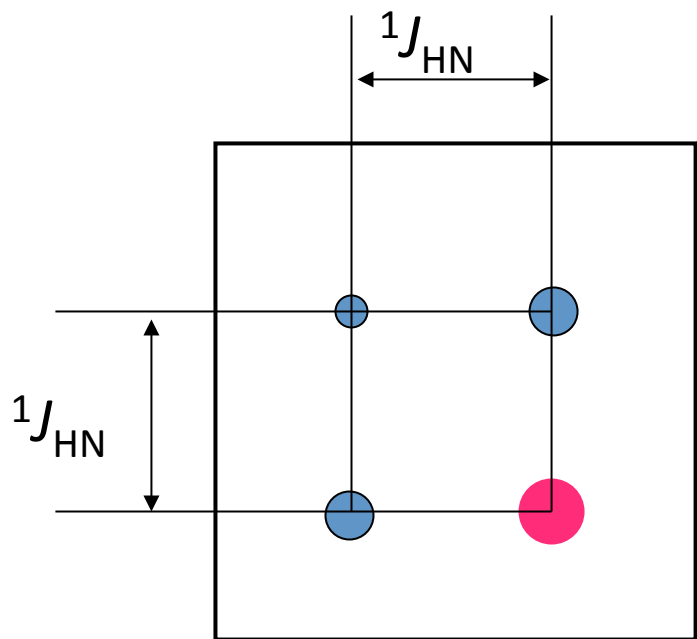


on Avance-I 800
116.7ms (t_1) \times 239.6ms (t_2)
Ns = 16

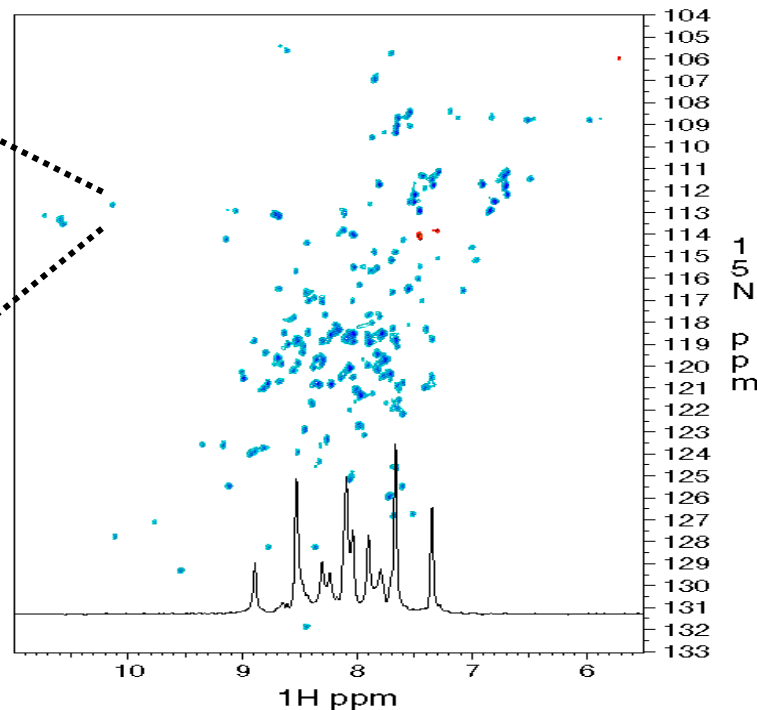
on Avance-III 950
98.3ms (t_1) \times 240.3ms (t_2)
Ns = 16



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

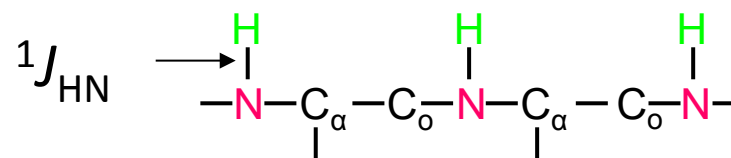


15N 化学シフト値 (ppm)

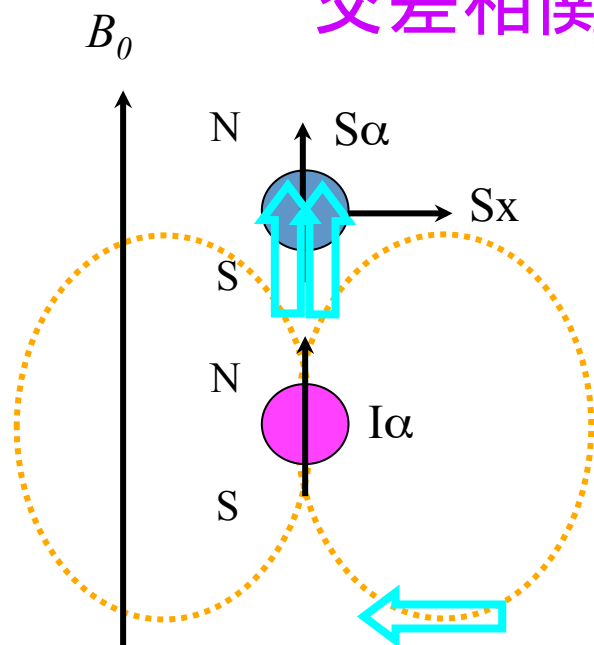
800 kDa 高分子量でも観測可？
1 GHz NMR が理想的？

^1H 化学シフト値 (ppm)

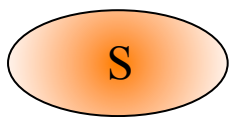
アミド基、メチル基、芳香環に適用可



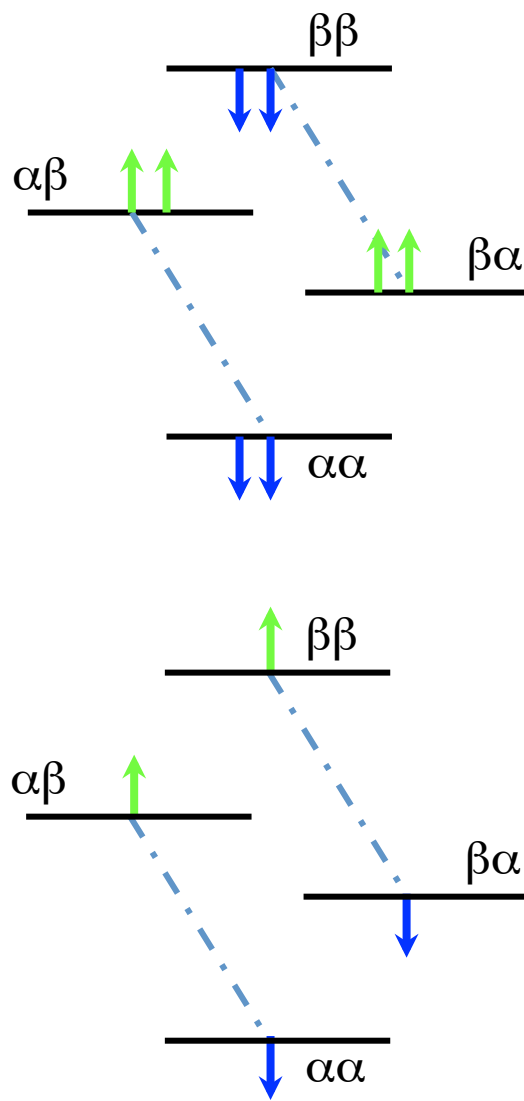
交差相関 cross-correlation between DD and CSA



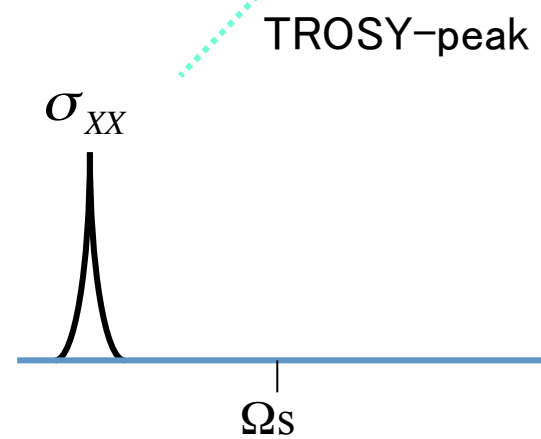
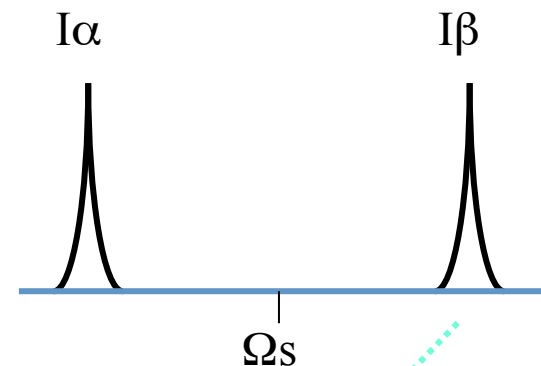
遮蔽が小さい



$\sigma_{XX} (\theta = 90^\circ)$



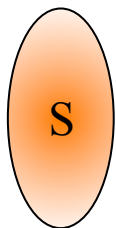
J ではなく dd



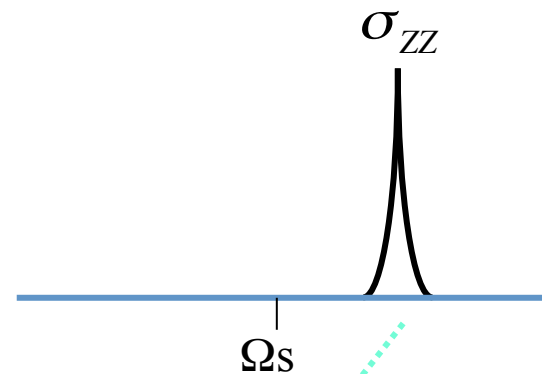
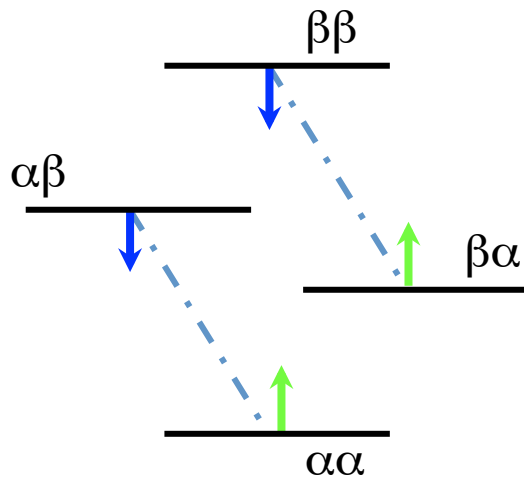
分子が 90° 回転して I-S 結合が横を向くと ...

B_0

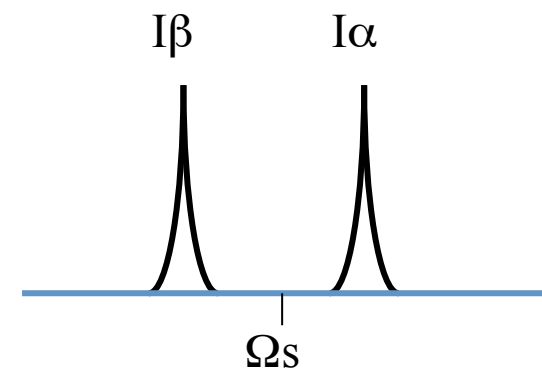
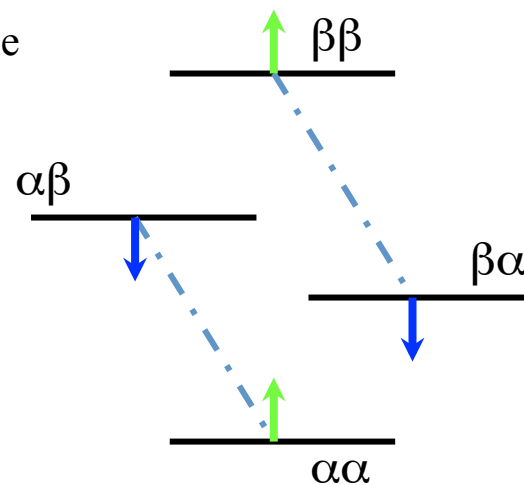
遮蔽が大きい



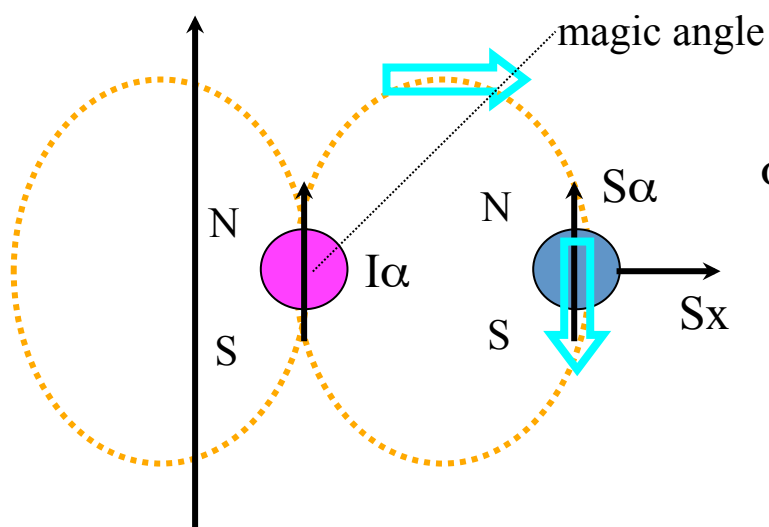
$\sigma_{ZZ}(\theta = 0)$



TROSY-peak

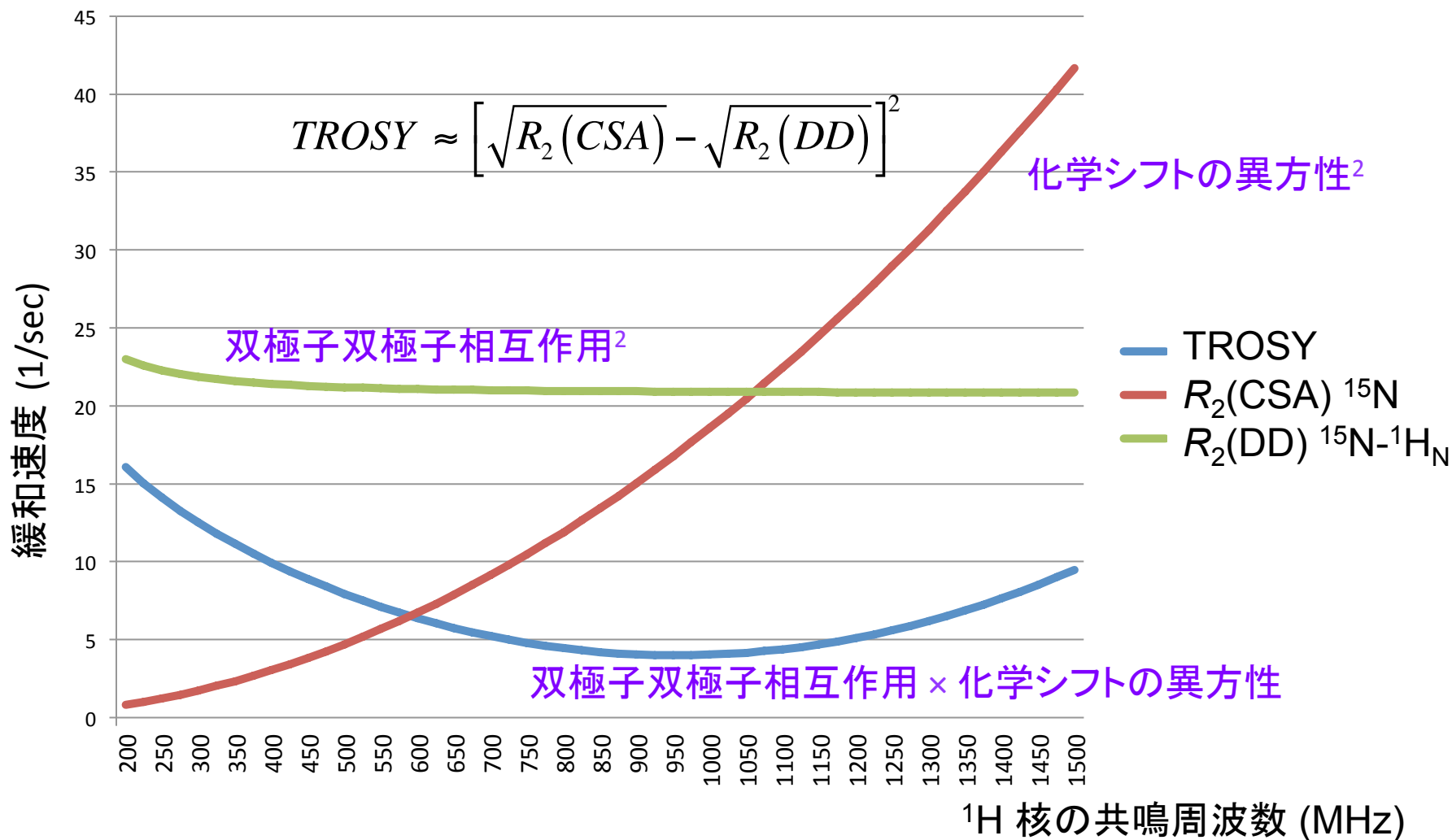


J ではなく dd



核磁気の永年項 (B_0 方向成分)

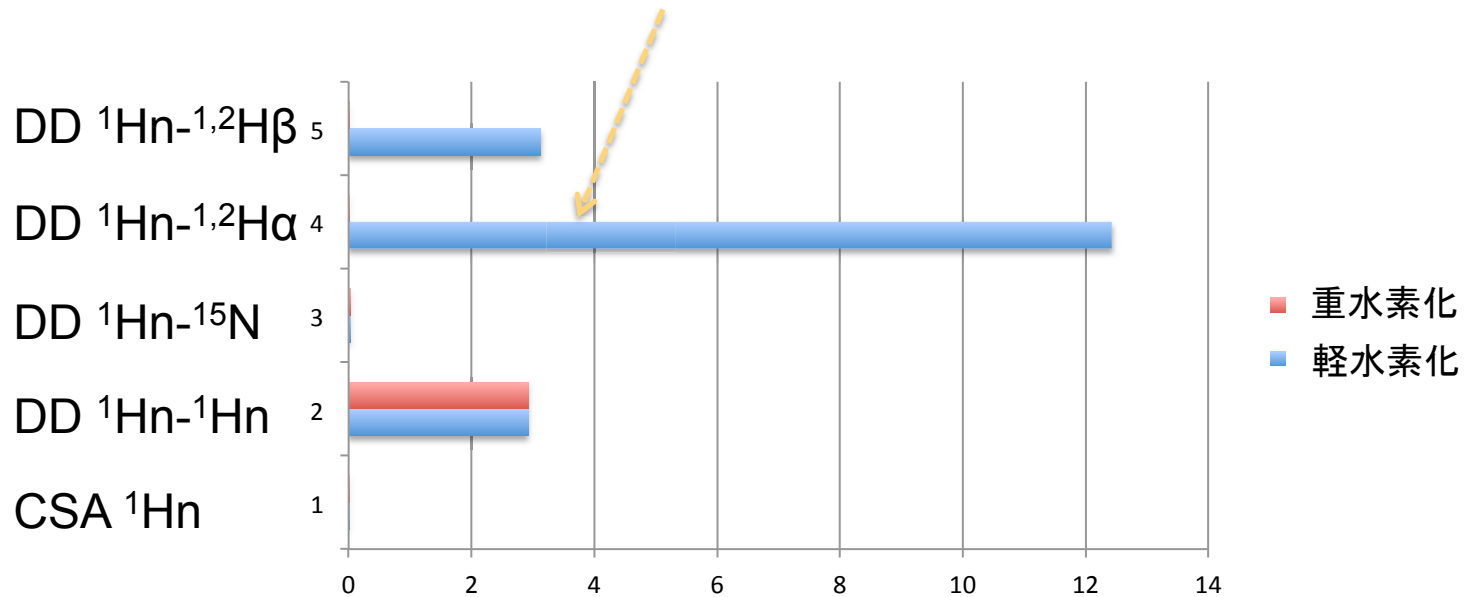
$^{15}\text{N}-^1\text{H}$ の DD/CSA TROSY 効果は静磁場強度 B_0 に依存する



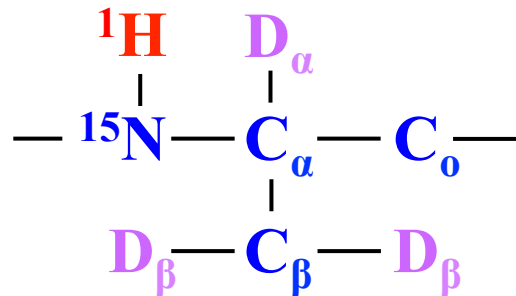
$\tau_r = 20 \text{ ns}$ ($\sim 50 \text{ kDa}$), $\theta_{\text{csa-dd}} = 15^\circ$

重水素化により $^1\text{H}_\text{N}$ 核の縦緩和が遅くなる

$\text{H}\alpha$ との dd 縦緩和速度が $1/7000$ になる？
 (欠点) repetition-delay を長くしないとイケない



自己縦緩和速度 ρ_1 (1/sec)
 (ただし、SOFAST-HMQC のように交差緩和は無視)
 (500 MHz ^1H) $\tau_r=20$ ns (~ 50 kDa)



^{15}N の展開時間を 50ms とすると
 $\exp(-18 \times 0.05) = 0.41$, $\exp(-3 \times 0.05) = 0.86$
 の割合で $^1\text{H}_\text{N}(\alpha)$ と $^1\text{H}_\text{N}(\beta)$ が維持される

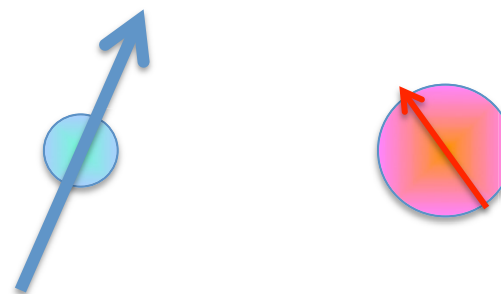
^{13}C 核の直接測定 (FID) の長所と短所

$$\gamma_{1H} = 26.75 \times 10^7 \left(\frac{1}{\text{T} \cdot \text{s}} \right)$$

$$\gamma_{13C} = 6.73 \times 10^7 \left(\frac{1}{\text{T} \cdot \text{s}} \right)$$

$$\mu_{1H} : 2.79 \mu_N$$

$$\mu_{13C} : 0.70 \mu_N$$



磁気回転比 γ_{13C} は γ_{1H} の 1/4

$$\mu_N : \text{the nuclear magneton} = 5.05 \times 10^{-27} \left(\frac{\text{J}}{\text{T}} \right)$$

(核ボア磁子)

長所 → 双極子相互作用による T_2 緩和が遅い (特に ^2H が付いている場合)。したがって、線幅が狭く、高分子や常磁性金属を配位した蛋白質に適している。

$$R(dd) \propto \gamma_I^2 \cdot \gamma_S^2 \cdot S(S+1)$$

短所 → 感度が小さい。

→ T_1 緩和も遅いので、repetition-delay を長く待つ必要がある。

^{13}C 核の化学シフト値の広い分布により、線形が先鋭に見える

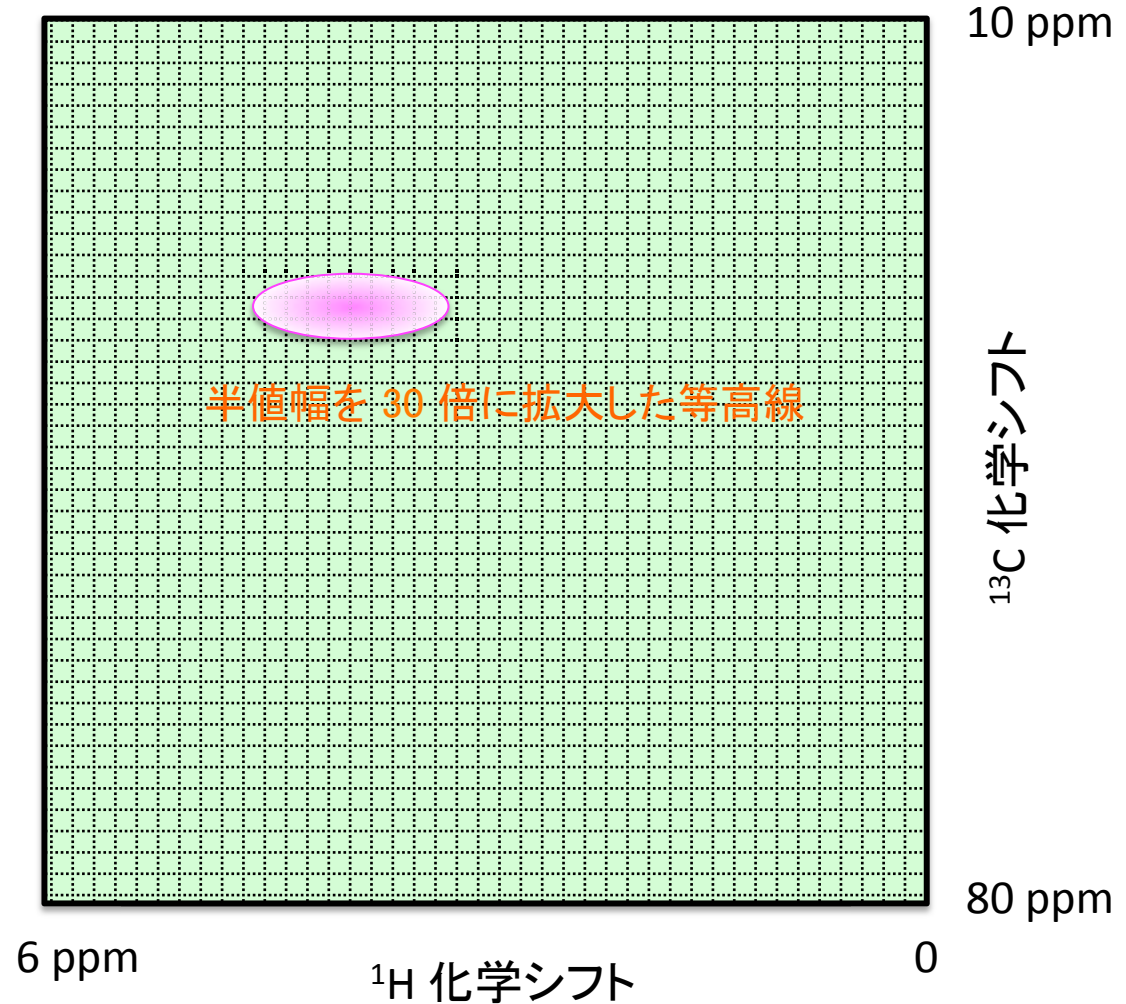
^{13}C - ^1H の双極子双極子 ^{13}C 横緩和
半値幅 27 Hz = 0.18 ppm
aliphatic ^{13}C : 10~80ppm とすると、0.0026

^{13}C - ^1H の双極子双極子 ^1H 横緩和
半値幅 27 Hz = 0.046 ppm
aliphatic ^1H : 0~6ppm とすると、0.0077

化学シフト分布の広がりを考慮すると、 ^{13}C よりも ^1H のピークの方が3倍幅が広く見える。

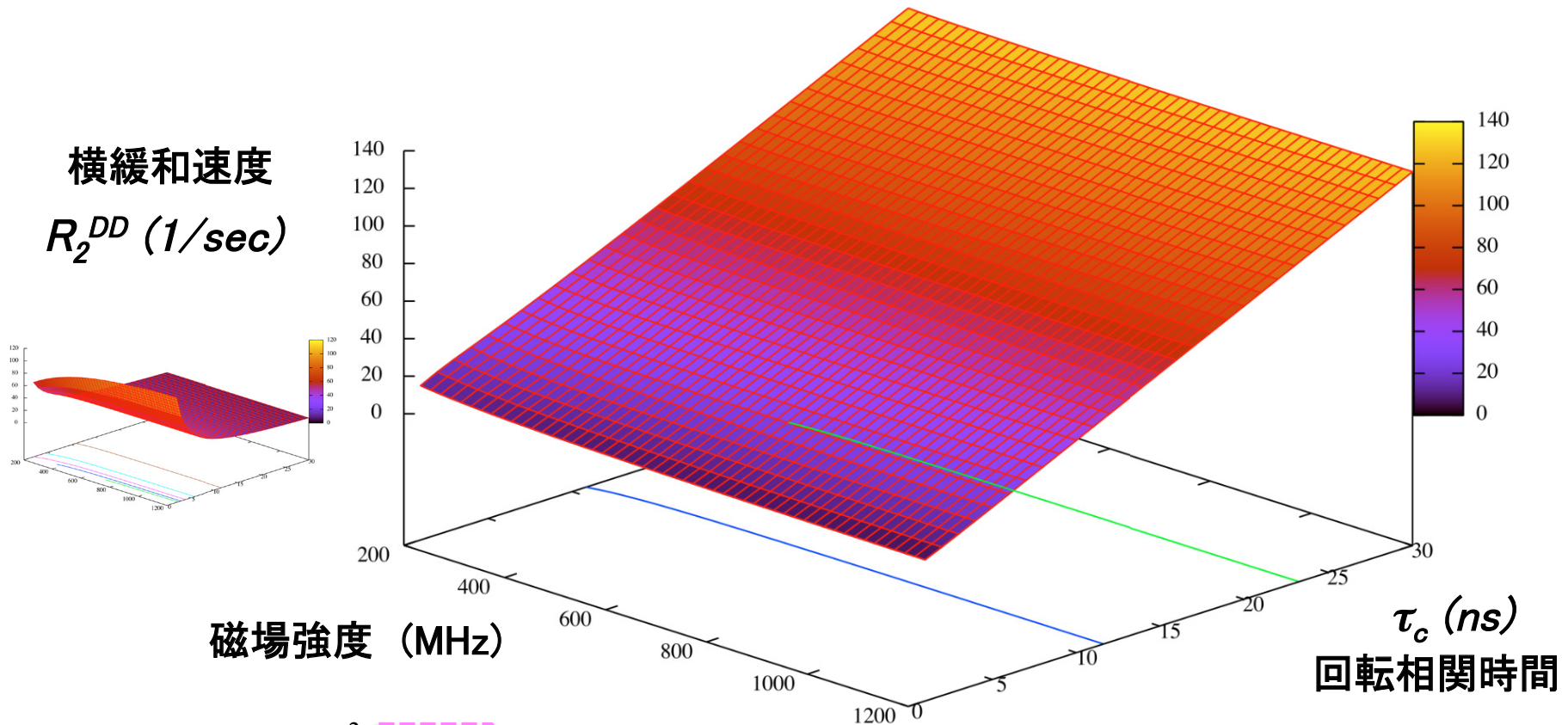
^{13}C - ^2H の双極子双極子 ^{13}C 横緩和
半値幅 2 Hz = 0.015 ppm
aliphatic ^{13}C : 10~80ppm とすると、0.0002

重水素化により、 ^{13}C の線幅は、さらに 1/12 程度に細く見える。



600 MHz ^1H , $\tau_r=20$ ns (~ 50 kDa) ^{13}C - $^1,^2\text{H}$ (1.08 Å)

DDによる横緩和は、静磁場強度にそれほど依存しない



$$R_2^{DD} = \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{8r^6} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \{ 4J(0) + J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_S) + 6J(\omega_I + \omega_S) \}$$

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

I ($^{13}\text{C}\alpha$) 側を観測

FIDのように、十分に長くサンプリングを行えば、Hertzで表した線幅は磁場強度によってあまり変化しないため、ppm表示での分解能が上昇する。

$^{13}\text{C}\alpha$ - $^1\text{H}\alpha$ 2スピン系 1.09 Å
双極子相互作用のみを考慮

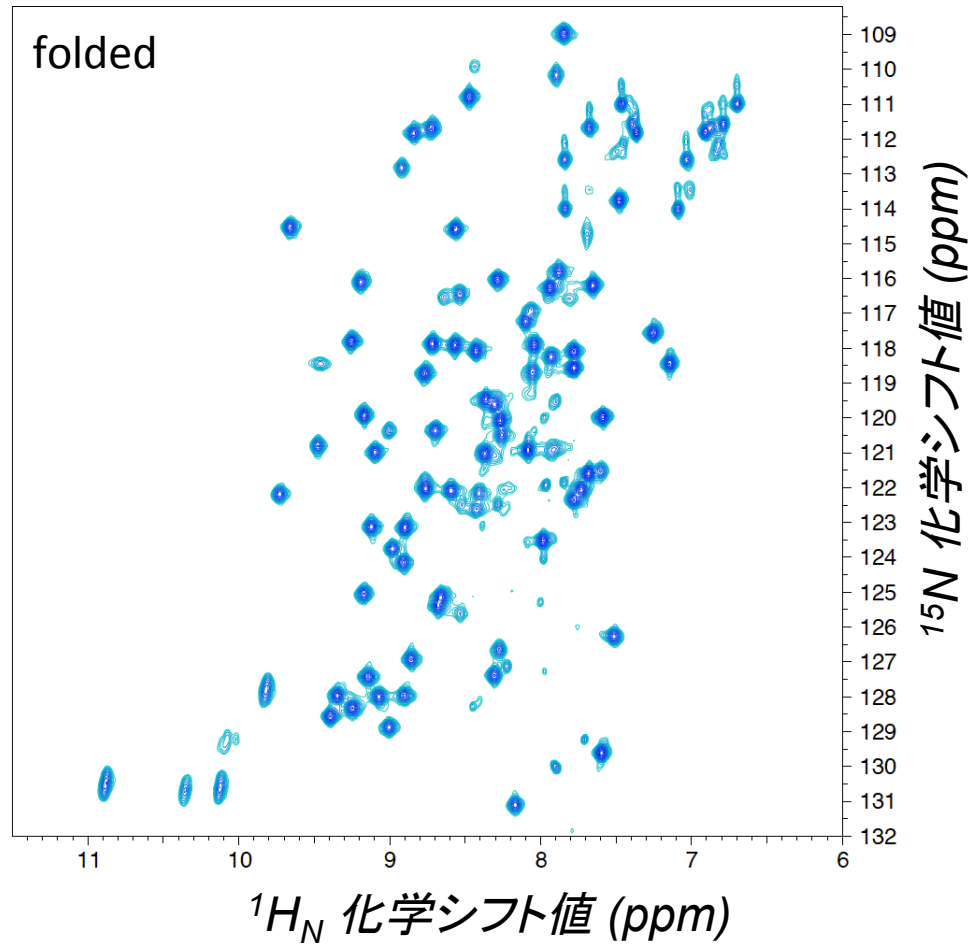
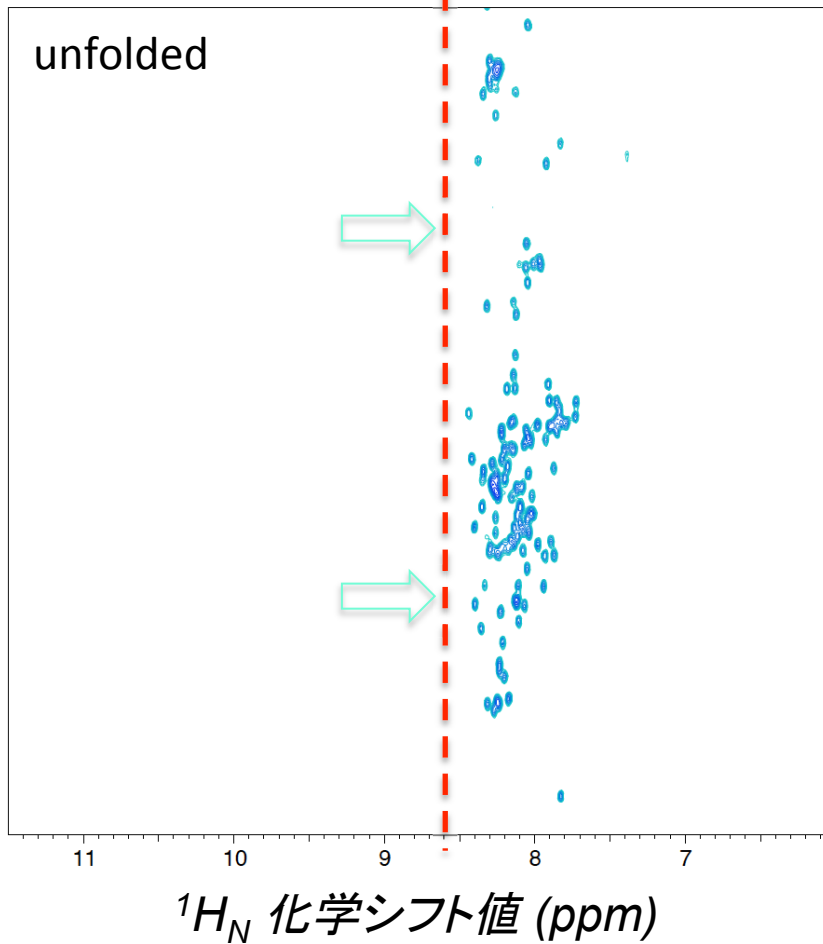


寒川作

立体構造を保持していない蛋白質では、
 $^1\text{H}_\text{N}$ の化学シフトの散らばりは小さい

2D ^1H - ^{15}N HSQC

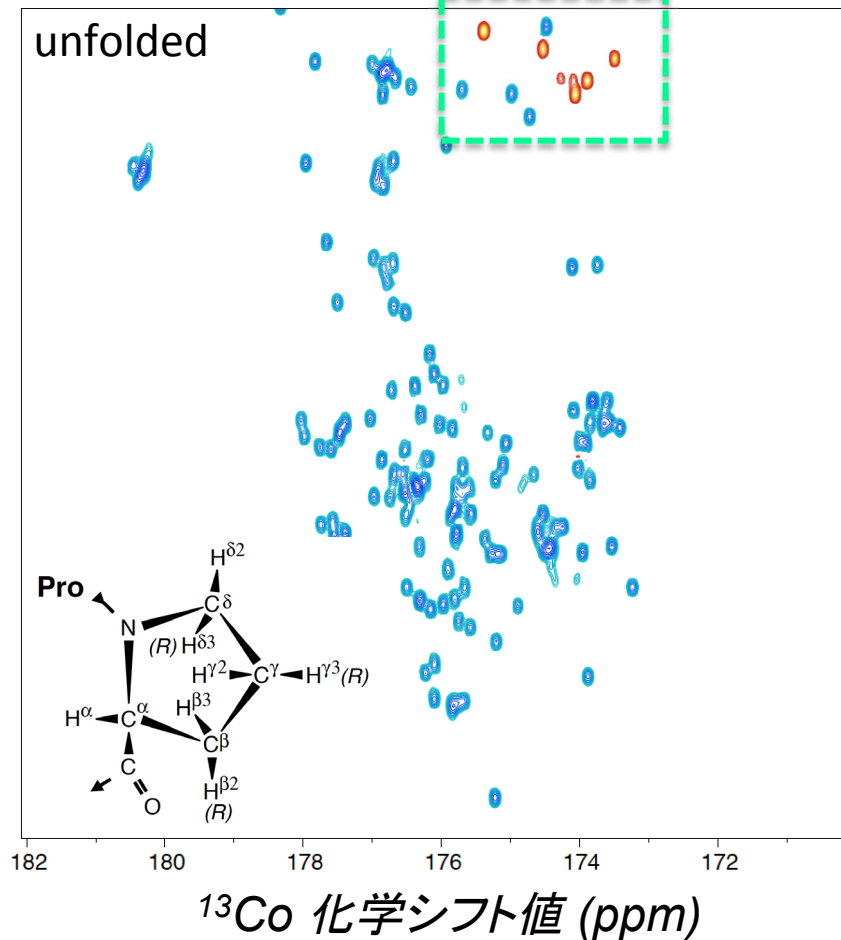
いわゆる？ハムの崖



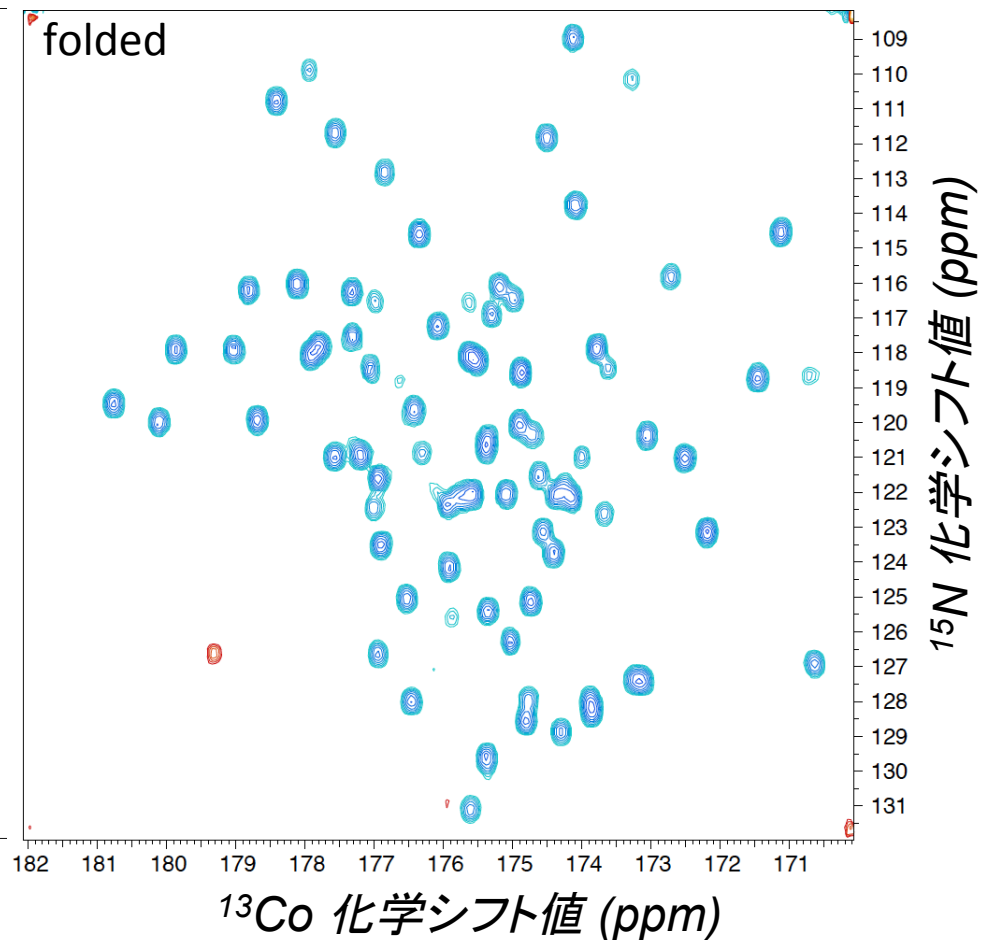
たとえ立体構造の無い蛋白質でも
 ^{15}N や ^{13}C などの異種核では、化学シフトがまだ散らばる

2D CONCO

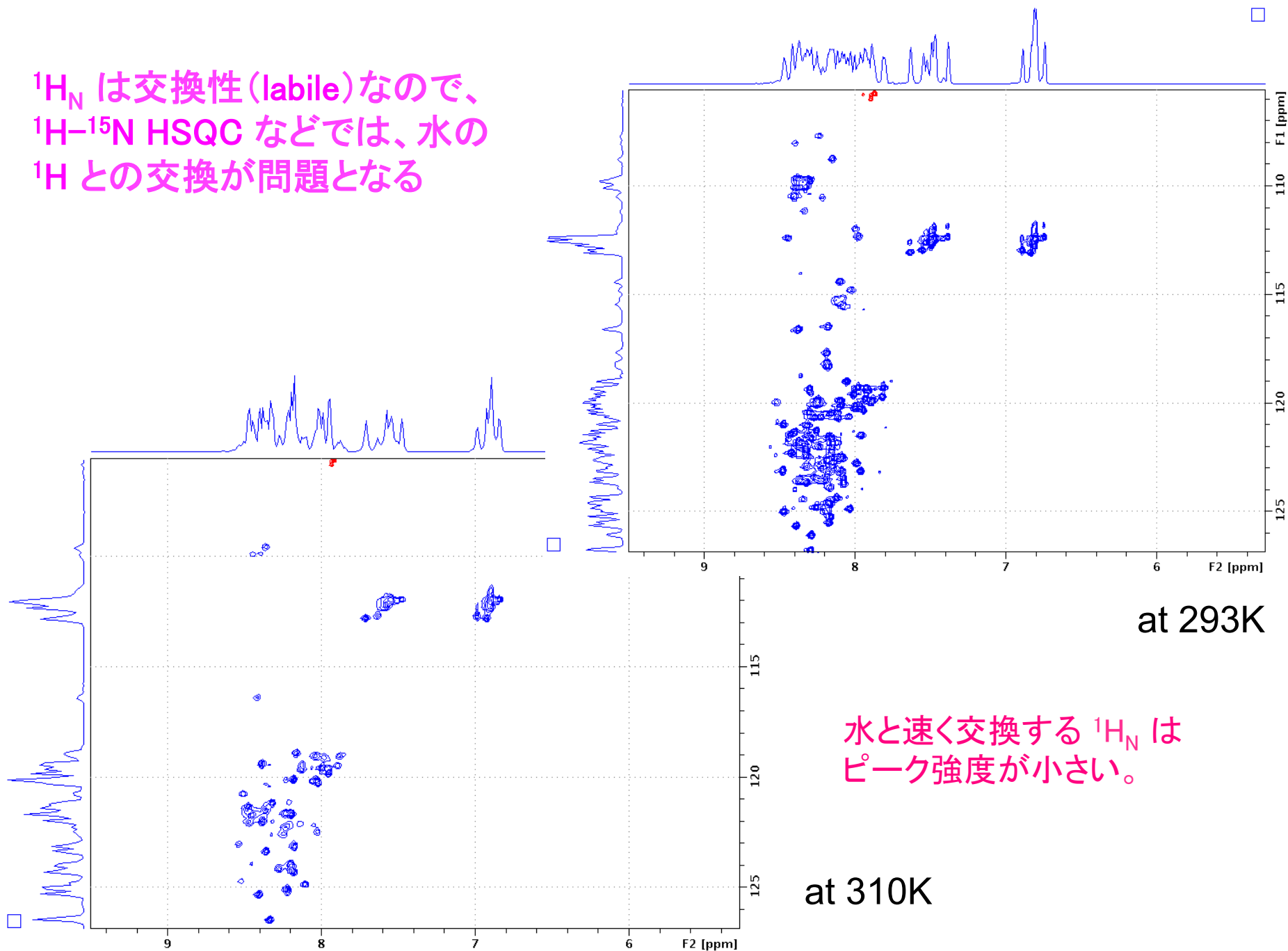
Pro (^{15}N ~134ppm)



3D HNCO の $^1\text{H}_\text{N}$ 軸に沿った圧縮投影



$^1\text{H}_\text{N}$ は交換性 (labile) なので、
 ^1H - ^{15}N HSQC などでは、水の
 ^1H との交換が問題となる



¹³C-検出に伴う感度の低下

$$\frac{S}{N} \propto Conc \cdot \gamma_{exc} \cdot \gamma_{obs}^{\frac{3}{2}} \cdot B_0^{\frac{3}{2}} \cdot N_{scan}^{\frac{1}{2}}$$

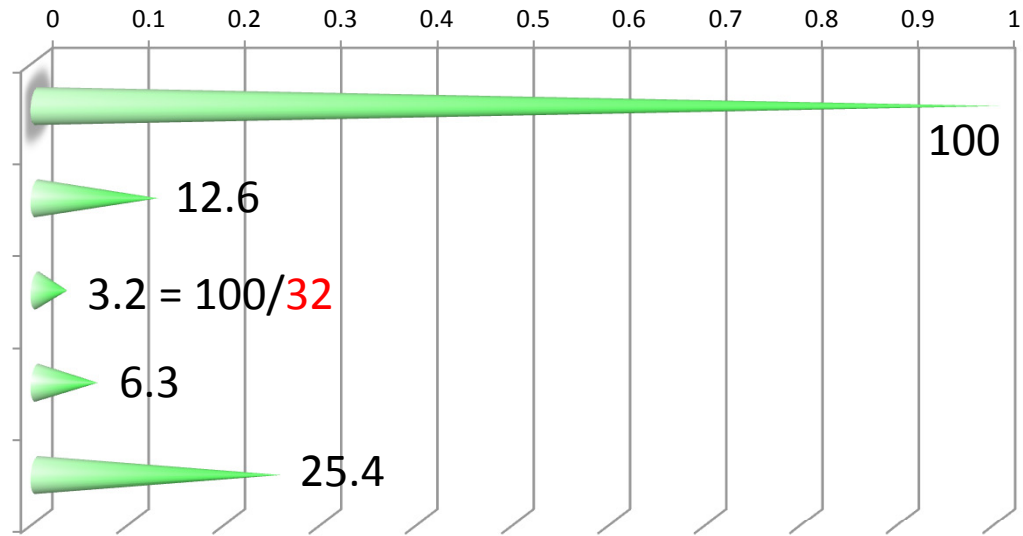
磁化移動の開始: ¹H
 FID 検出: ¹H
 B₀: 600 MHz
 プローブ: 室温

FID 検出: ¹³C

磁化移動の開始: ¹³C

B₀: 950 MHz

プローブ: 極低温
 (inverse かどうかは無視)



濃度を4倍に濃くする

or

積算時間を16倍にする

or

磁化移動を ¹H から始める (100% 重水素化では×)

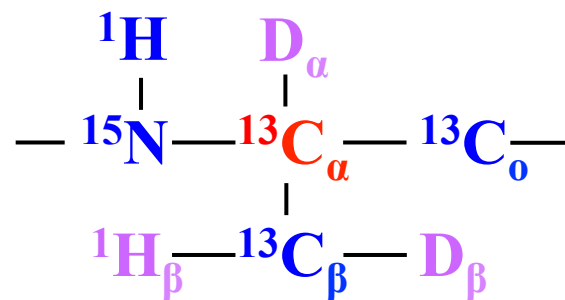
^{13}C -極低温検出器により ^{13}C -直接 FID 検出が実現可能に

→ 分解能の向上 (測定時間に支配されない)

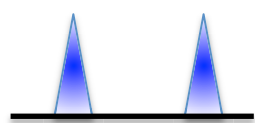
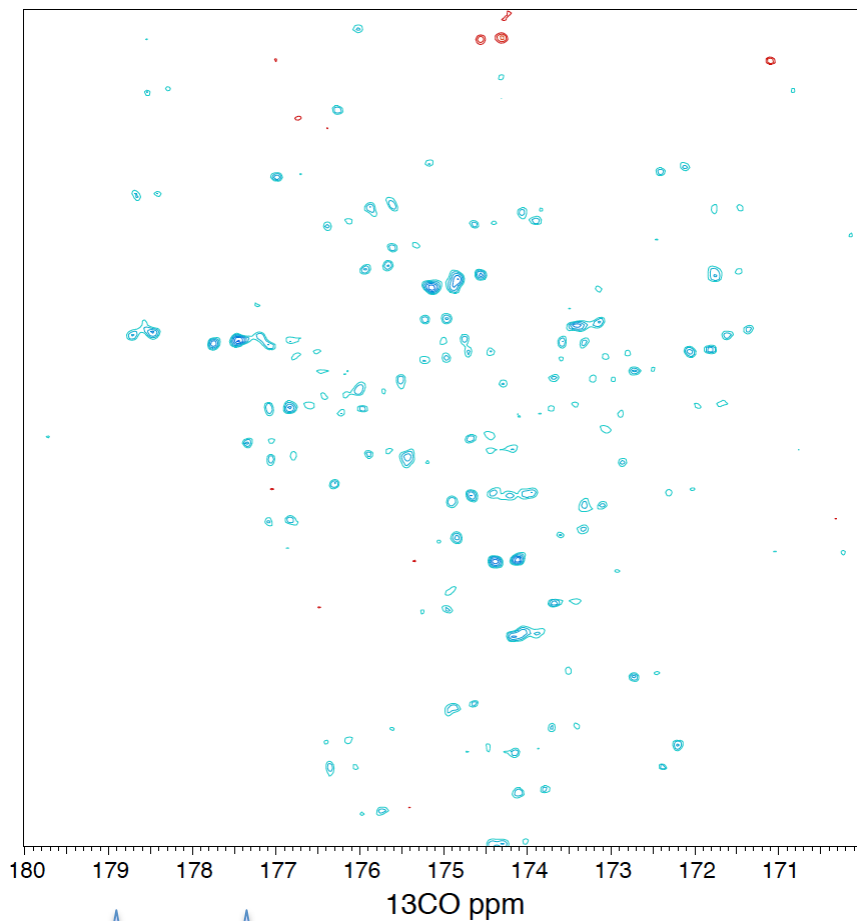
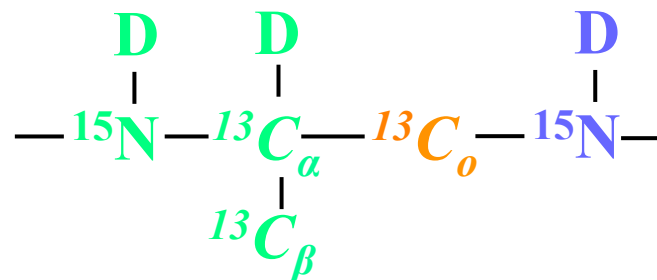
超高磁場

→ 感度の上昇
分解能 (@ppm) の向上 (磁場が高い程良い)

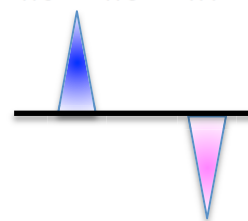
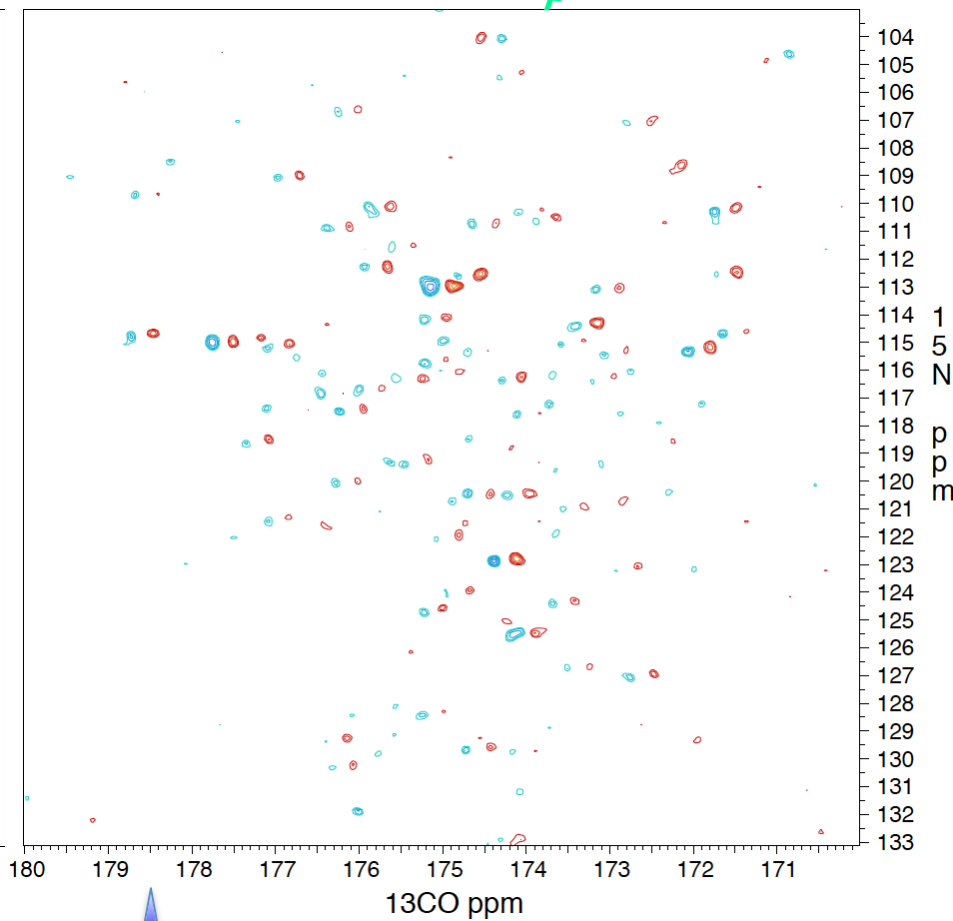
^{13}C の化学シフト値のスペクトル分布は、 ^1H よりも広いので、 ^{13}C の線幅は ^1H の線幅の 1/3 になったかのように見える。



^{13}C -検出 FID の IPAP-process



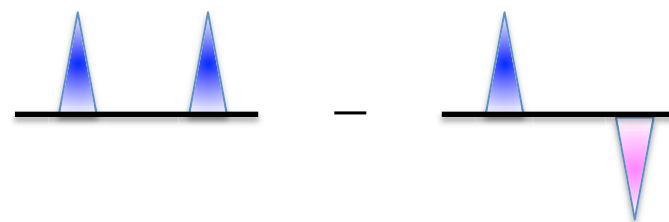
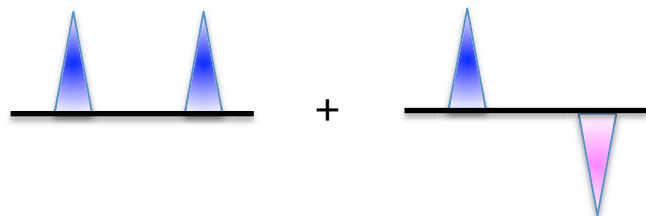
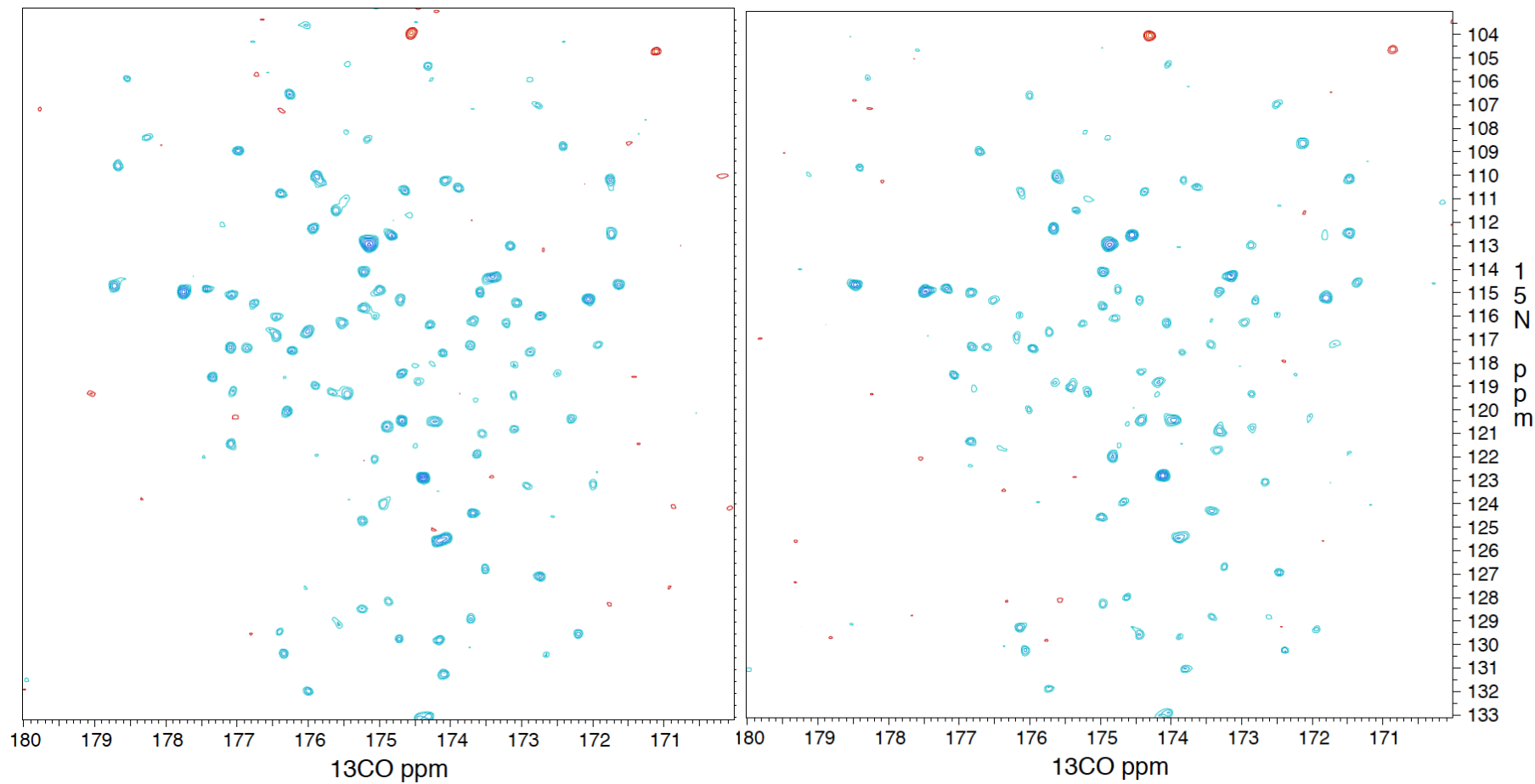
in-phase

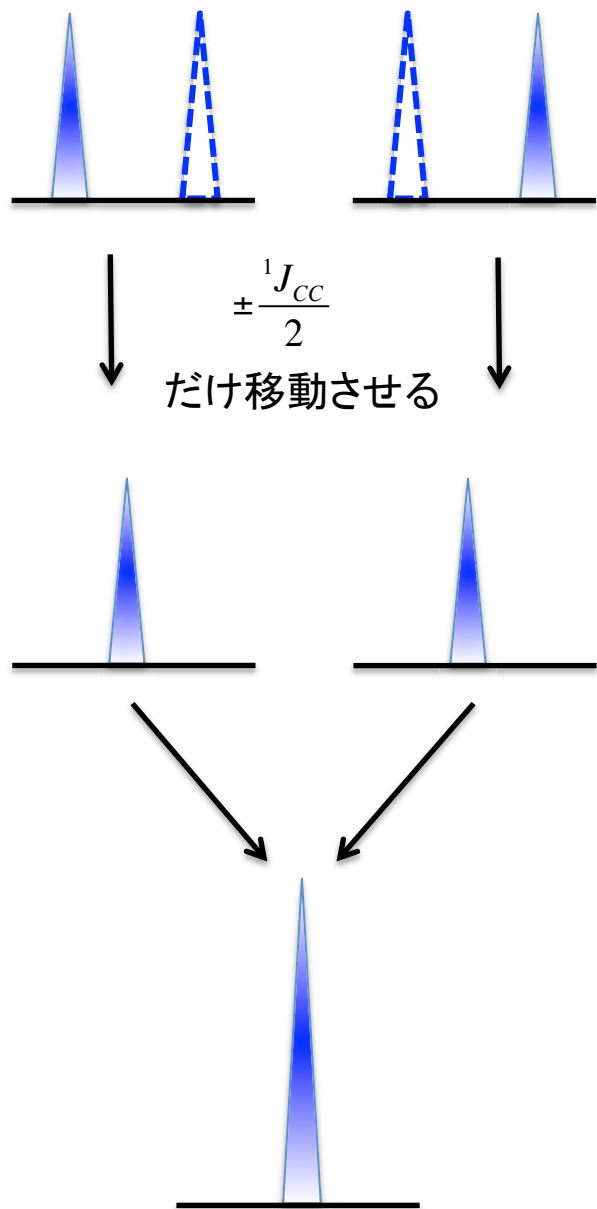


anti-phase

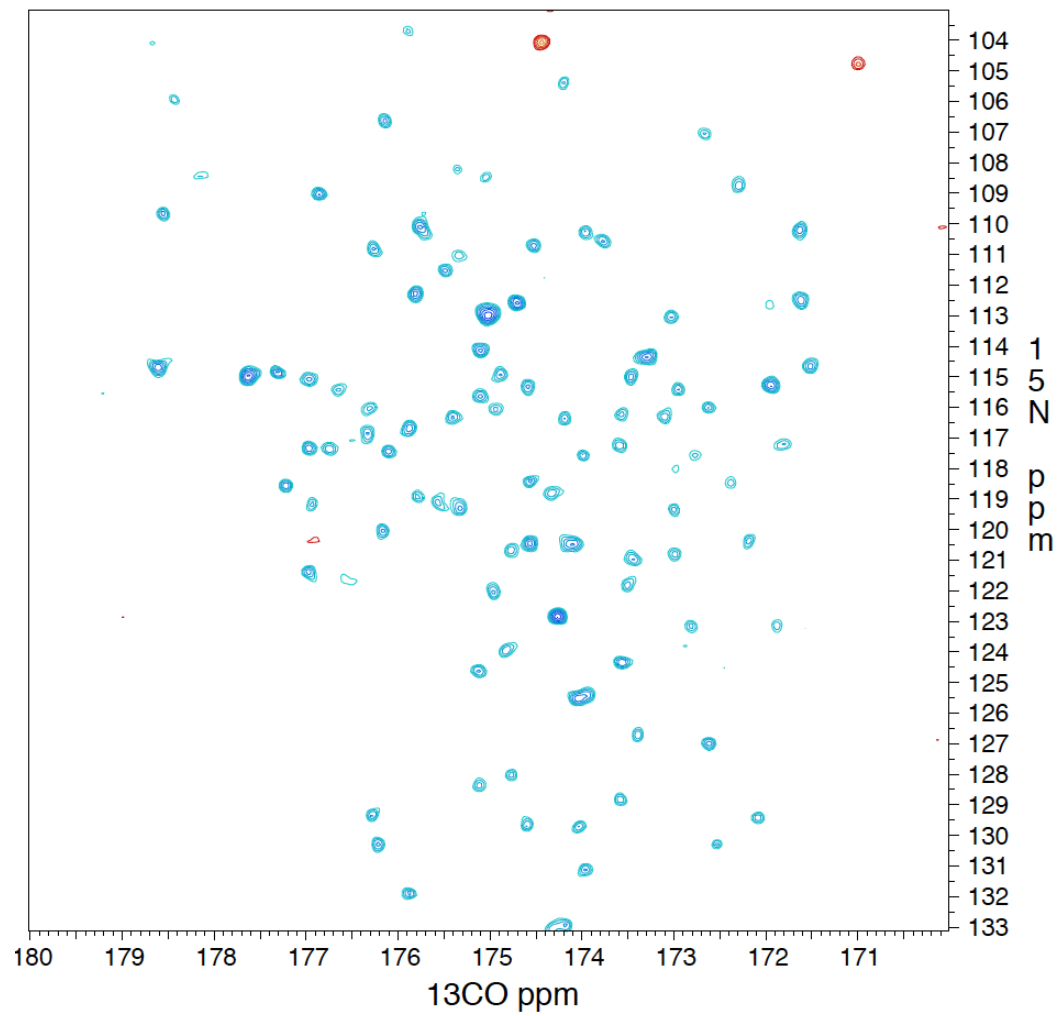
in-phase + anti-phase

in-phase - anti-phase

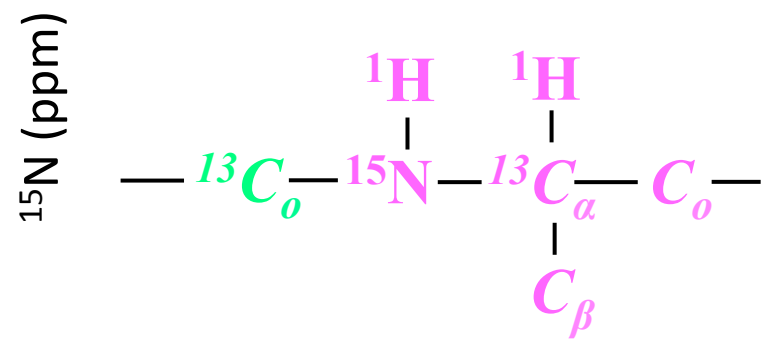
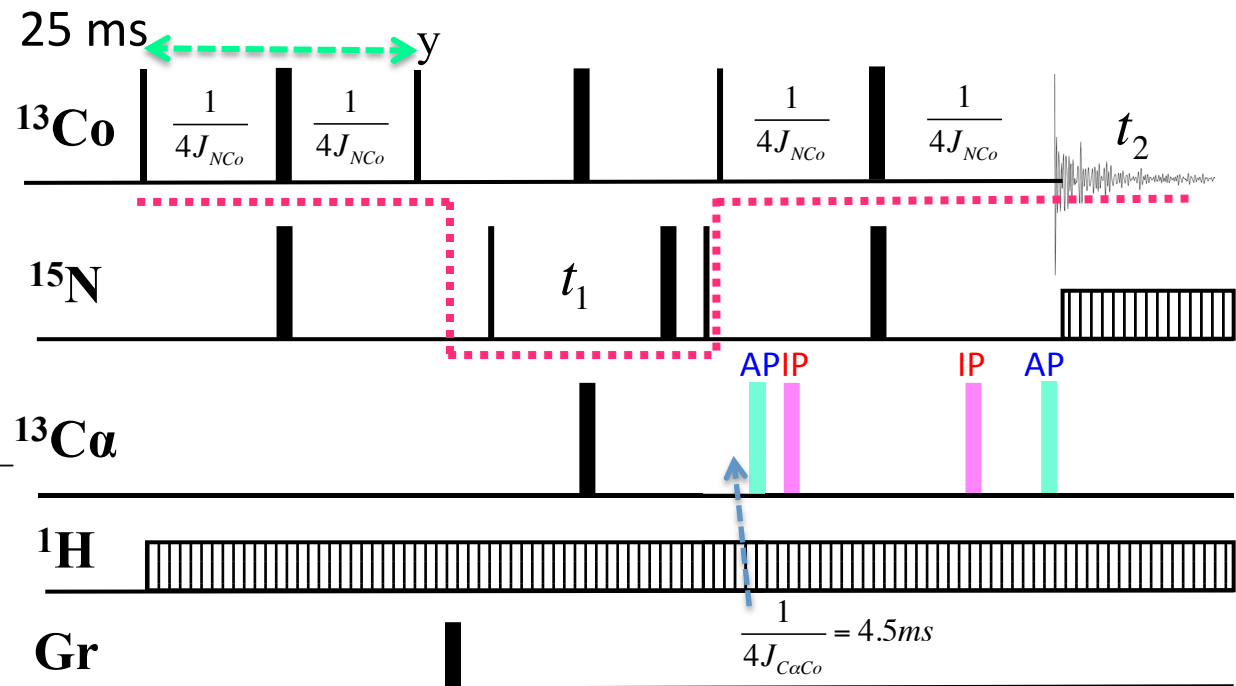
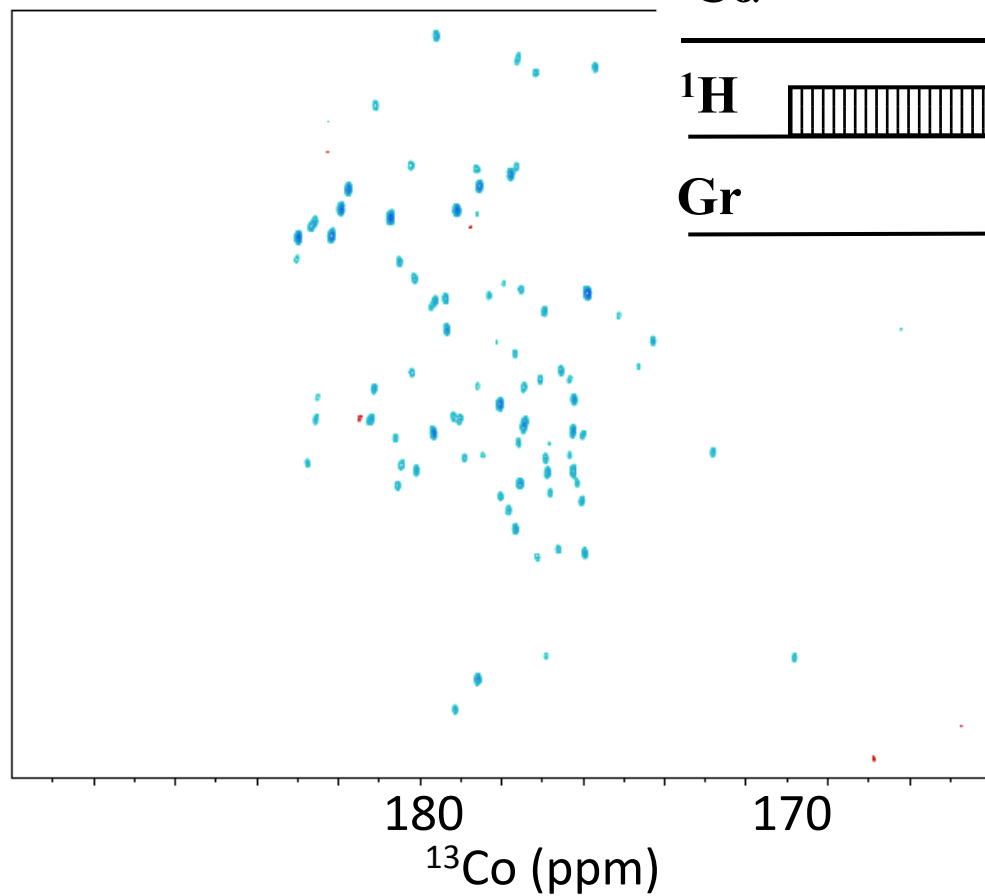




virtual decoupling

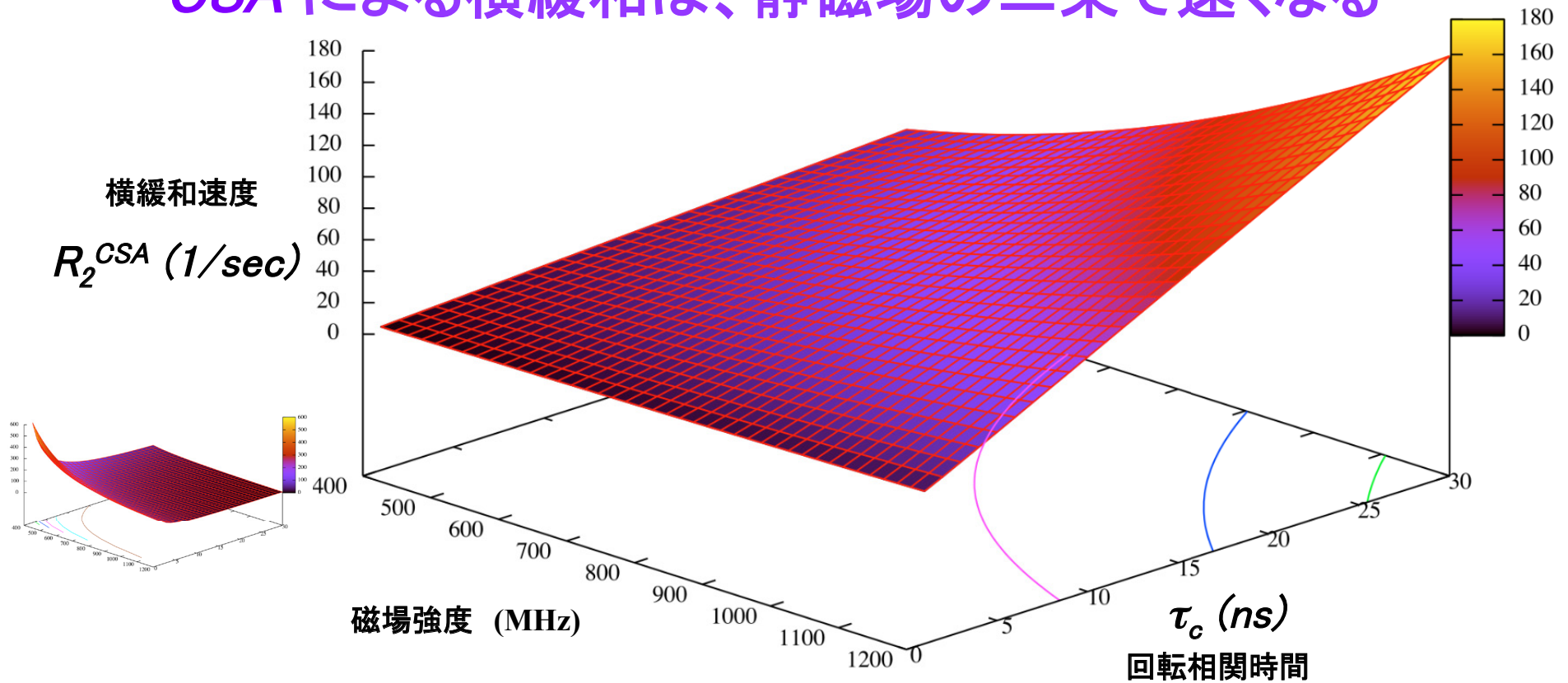


SQ CON with IPAP



1mM [^{13}C , ^{15}N]-ubiquitin

CSA による横緩和は、静磁場の二乗で速くなる



$$R_2^{CSA} = \frac{(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \gamma_I^2 B_0^2}{18} \{4J(0) + 3J(\omega_I)\}$$

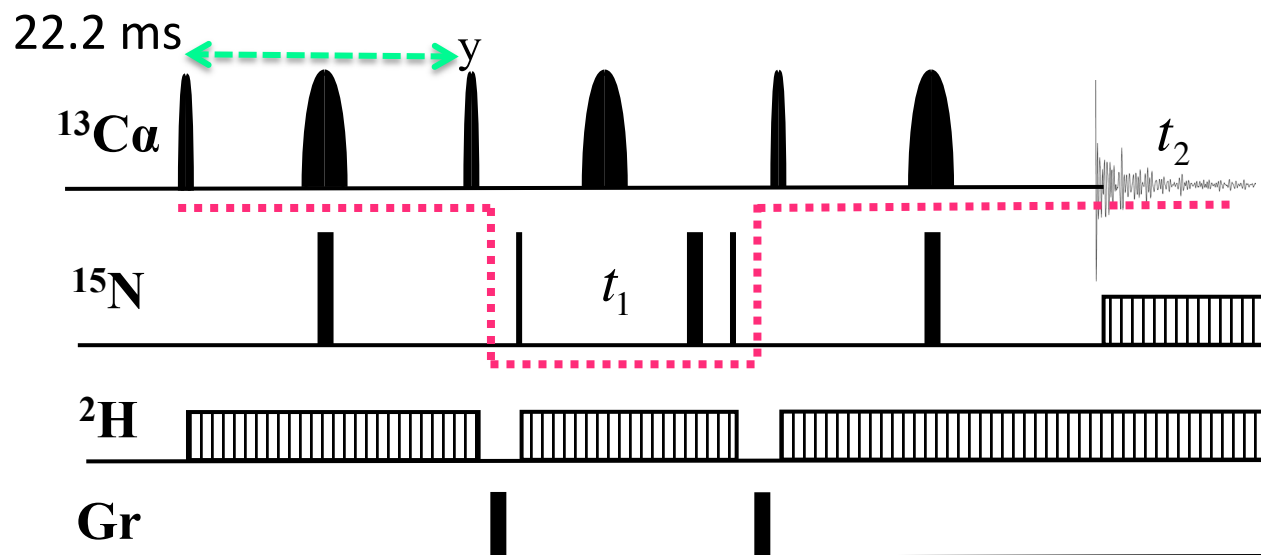
$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

Trosy 効果、方向情報など
 positive な面を逆に利用する。

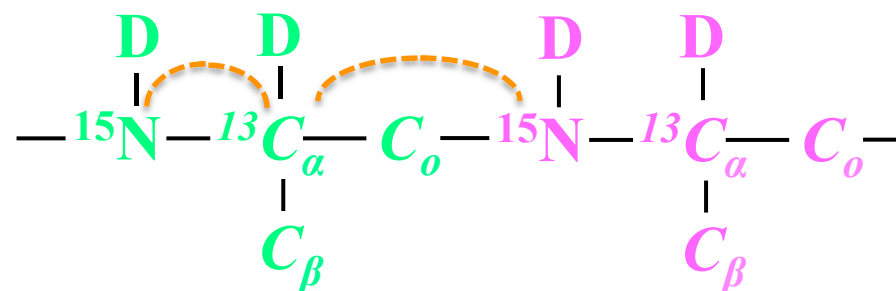
^{13}C 化学シフトの異方性のみ考慮

$$\delta_{xx} = -115.6 \text{ ppm}, \delta_{yy} = -48.6 \text{ ppm}, \delta_{zz} = 40.6 \text{ ppm}$$

2D SQ CAN



大腸菌培養のための M9-最少培地
 [2-¹³C]-glycerol (or [1,3-¹³C]-glycerol)
 NaH¹³CO₃
 D₂O



アミド ¹H の存在しない Pro でも問題無し

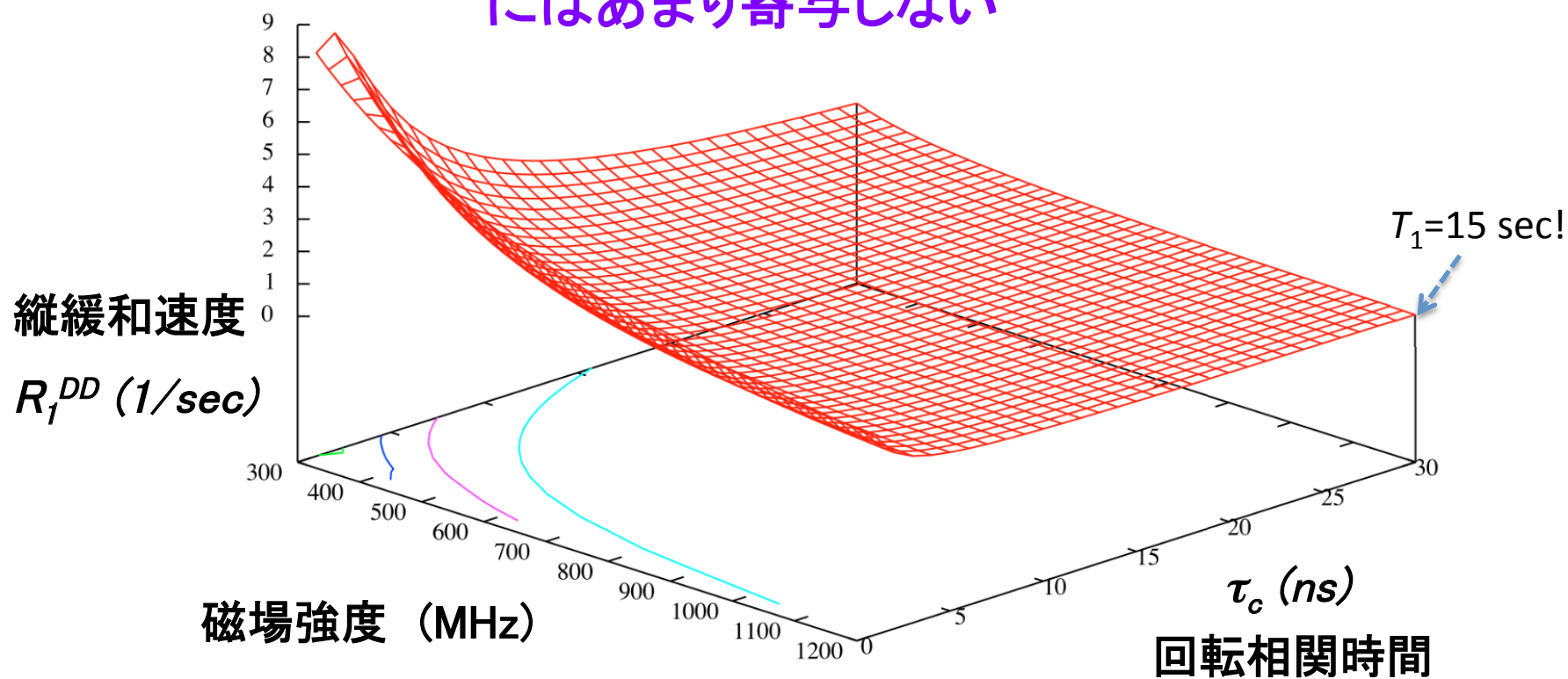
¹³C_α-FID での IPAP 不要

¹J_{C_αC_β カップリングによる損失無し}

¹³C_α の縦緩和速度を金属で促進

2D COCA と組み合わせて、主鎖の連鎖帰属が可能。

高磁場、高分子量では、 $dd(^{13}\text{C}\alpha\text{-}^1\text{H}\alpha)$ は $^{13}\text{C}\alpha$ の縦緩和にはあまり寄与しない



$$R_1^{DD} = \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{4r^6} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \{ J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S) \}$$

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

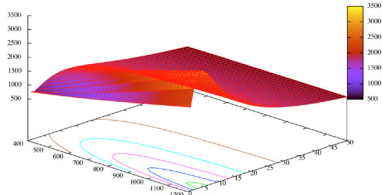
I ($^{13}\text{C}\alpha$) 側を観測

^{13}C -開始よりも、縦緩和の速い ^1H -開始測定の方が有利では？しかし、重水素化試料では駄目。

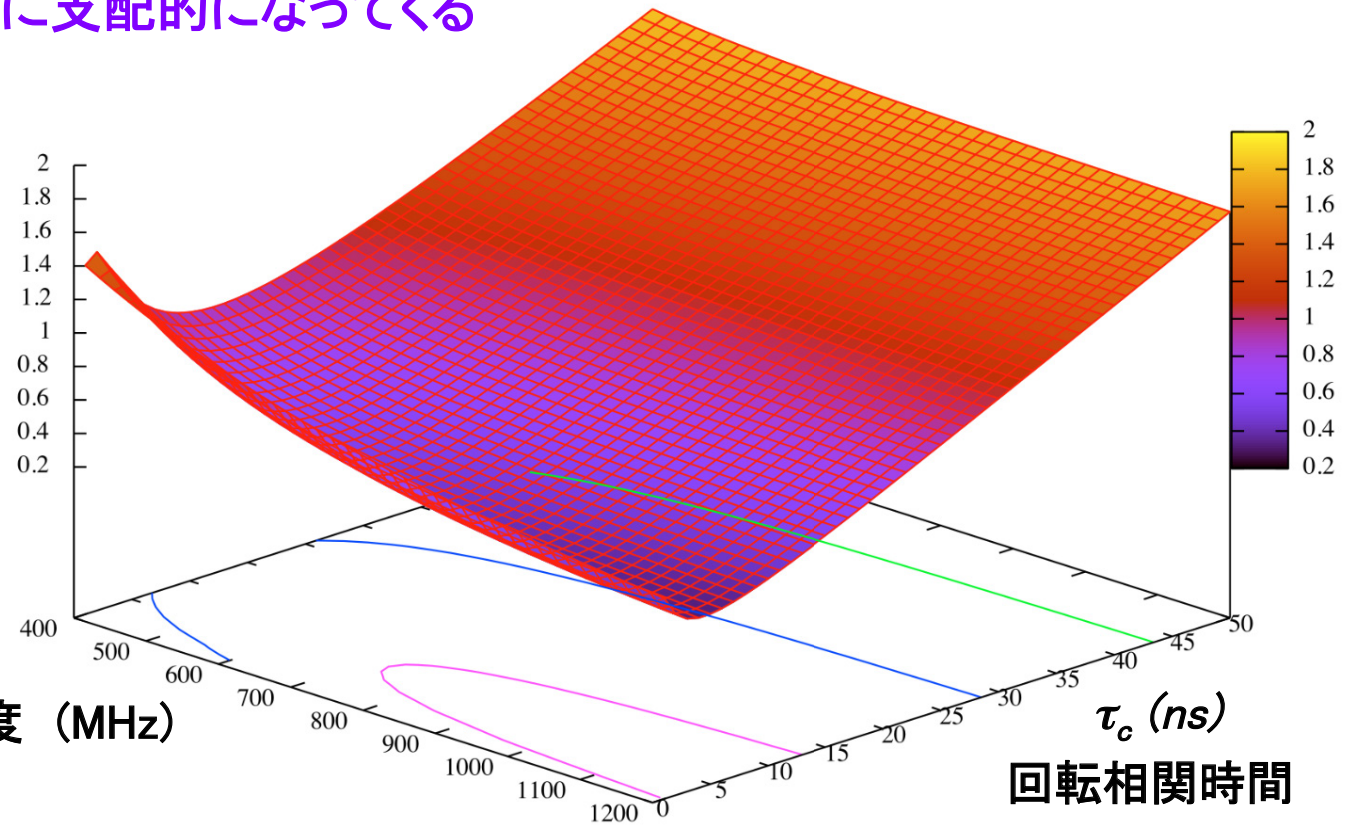
$^{13}\text{C}\alpha\text{-}^1\text{H}\alpha$ 2スピン系
双極子相互作用のみ考慮

$^{13}\text{C}\alpha$ の縦緩和では、同種核の $dd (^{13}\text{C}\alpha-^{13}\text{C}\alpha)$, $dd (^{13}\text{C}\alpha-^{13}\text{C}\beta)$ が分子量とともに支配的になってくる

縦緩和速度
 R_1 (1/sec)



磁場強度 (MHz)



回転相関時間 τ_c (ns)

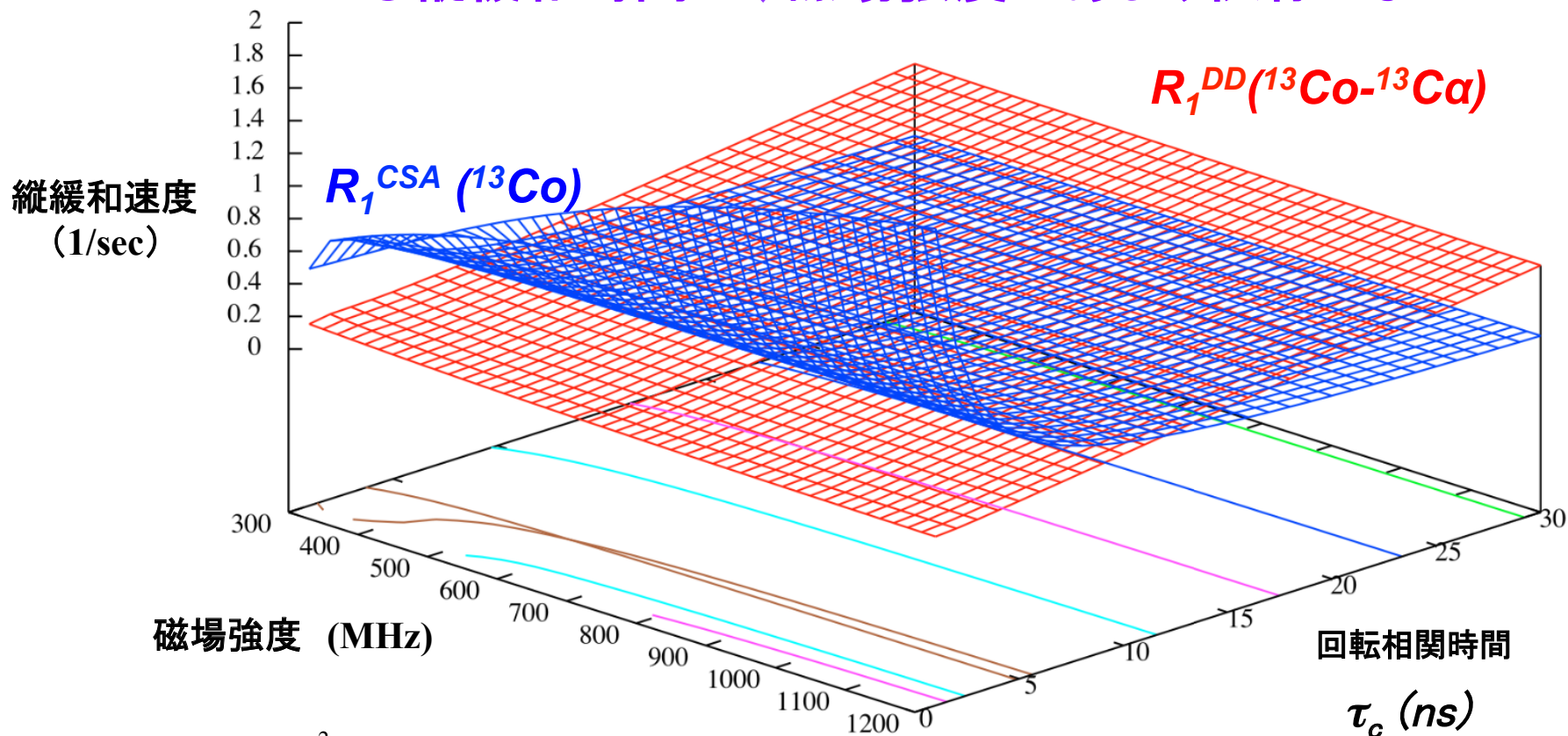
$$\rho_1^{DD} = \frac{\hbar^2 \gamma_I^4}{4r^6} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \{J(0) + 3J(\omega_I) + 6J(2\omega_I)\}$$

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

重水素化された $^{13}\text{C}\alpha$ を観測
交差緩和を無視

$^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$ を z に flip-back すると、SOFAST の ^{13}C 版が可能
重水素化による影響は小さい ($dd (^{13}\text{C}\alpha-^1\text{H}\alpha)$ は R_1 緩和の $1/4$ 程度の寄与)

CSA による縦緩和時間は、磁場強度にあまり依存しない



$$R_1^{CSA} = \frac{(\sigma_{||} - \sigma_{\perp})^2 \gamma_I^2 B_0^2}{3} J(\omega_I)$$

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

^{13}Co を検出

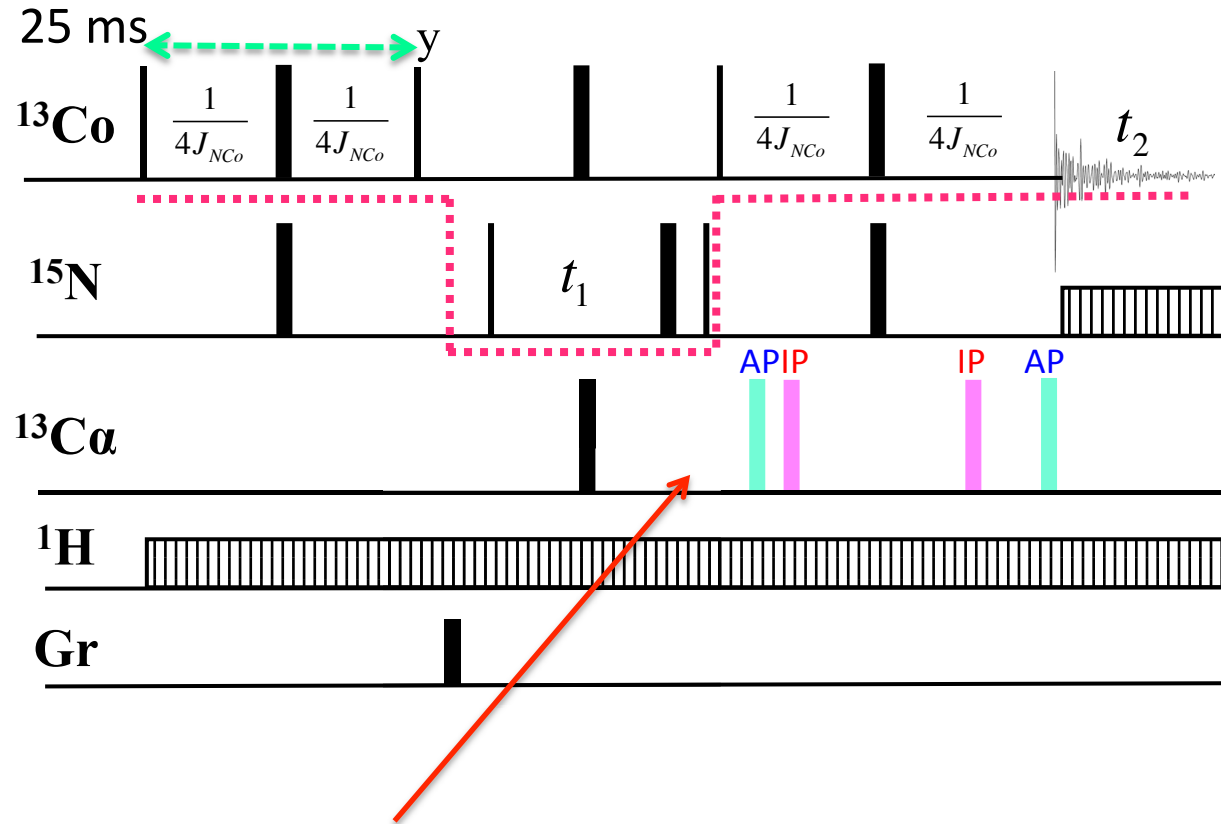
^{13}Co 化学シフトの異方性 あるいは
 $^{13}\text{Co}-^{13}\text{Ca}$ の双極子相互作用を考慮


$dd (^{13}\text{Ca}-^{13}\text{Co})$ が分子量とともに効いてくる。

$$\delta_{xx} = -115.6 \text{ ppm}, \delta_{yy} = -48.6 \text{ ppm}, \delta_{zz} = 40.6 \text{ ppm}$$

^{13}Ca を z に flip-back すると仮定

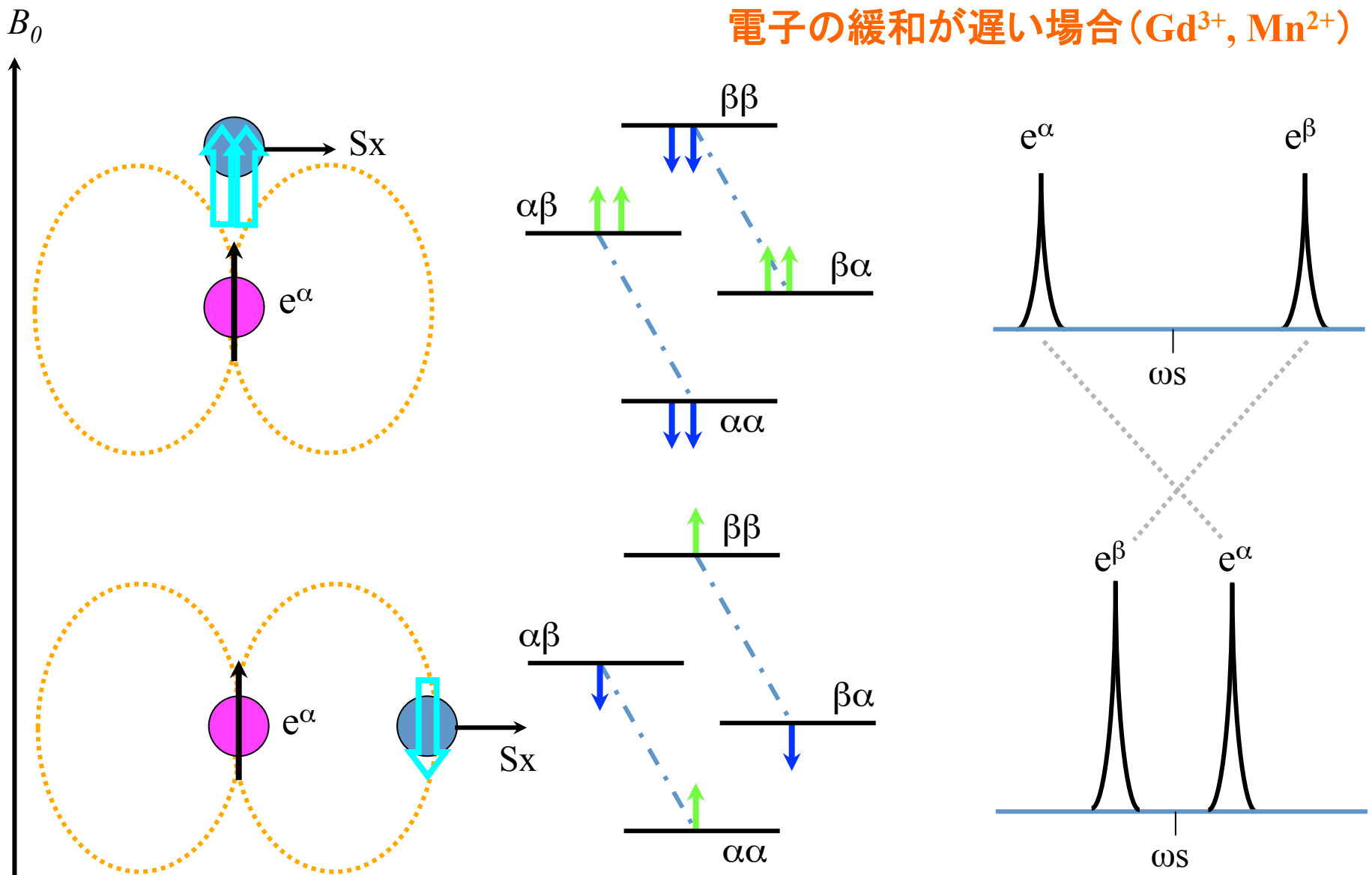
2D SOFAST CONCO ?



$^{13}\text{C}_\alpha$ 磁化を z 方向に flip-back するために、ここに  を入れると良い。

双極子双極子相互作用 Dipole-dipole coupling

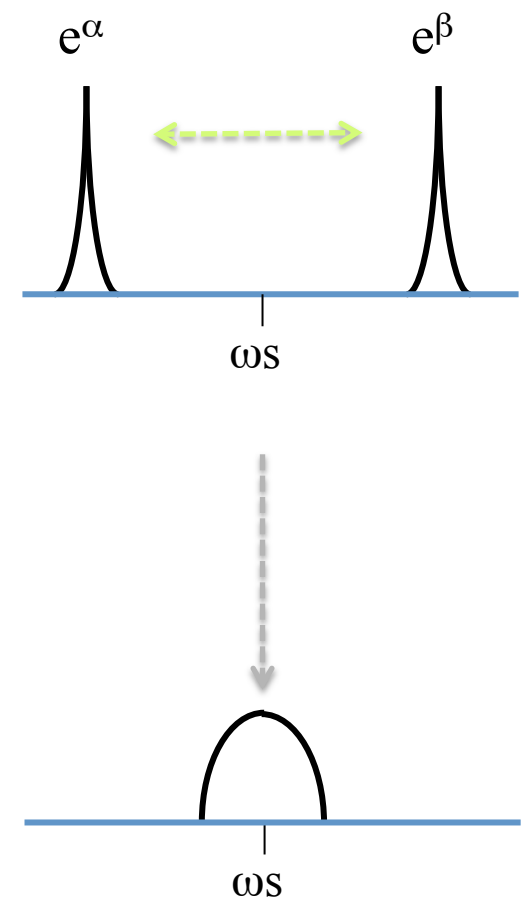
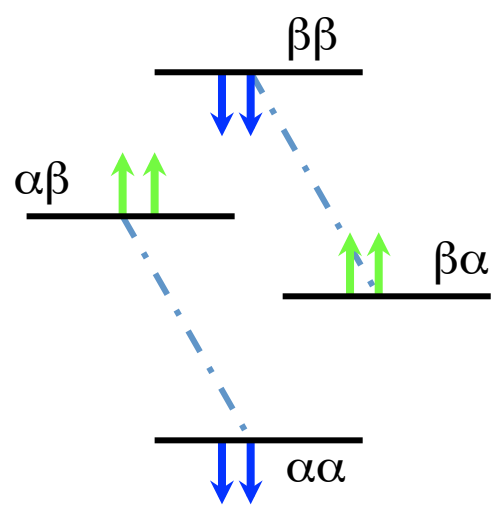
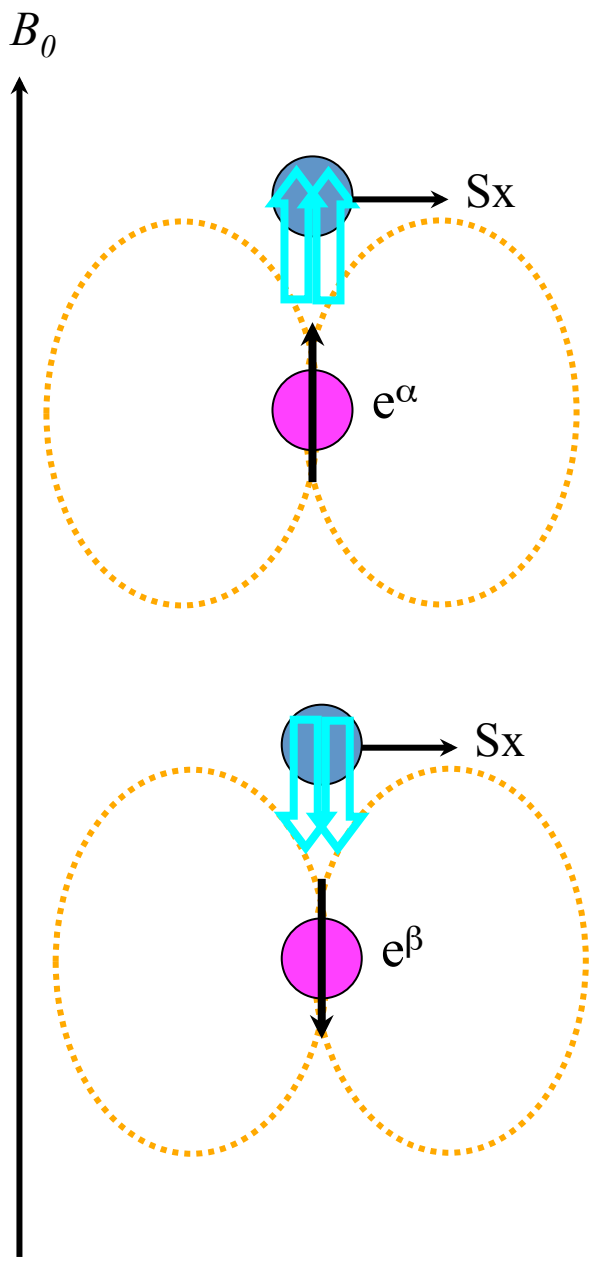
電子の緩和が遅い場合 (Gd^{3+} , Mn^{2+})



分子の遅い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+})



分子の遅い回転ではなく、電子の速い縦緩和により大きな splitting が平均化される。

^1H -NMR よりも ^{13}C -NMR が有利な場合

- ◆ $\gamma_{^1\text{H}}$ は大きいので、それに伴って双極子相互作用による緩和も大きい。 $\gamma_{^{13}\text{C}}$ は小さいので、線幅が狭く、高分子や常磁性金属を配位した蛋白質に適している。
- ◆ 重水素化した大きな蛋白質では検出すべき ^1H の数が少ない。四級炭素からも情報を得れる。
- ◆ 構造をとっていないような蛋白質においては、 ^1H の化学シフト値の散らばりが小さいのに対して、 ^{13}C ではそれほどでもない。
- ◆ 水溶液の場合、水の信号を消す努力が不要。したがって、水消しに伴うアーティファクが無い。
- ◆ ^1HN は labile なので、 ^1H - ^{15}N -HSQC などでは、水との交換が問題となる。例えば、水と速く交換する ^1HN は感度が悪い。
- ◆ 化学交換や構造交換においても、 ^1H は幅広化が顕著な場合が多い。
- ◆ 双極子相互作用による横緩和は、磁場強度にあまり依存しないので、高磁場の直接測定 (FID) による高い感度と分解能を享受できる。
- ◆ 高塩濃度による感度の低下の率が小さい。

