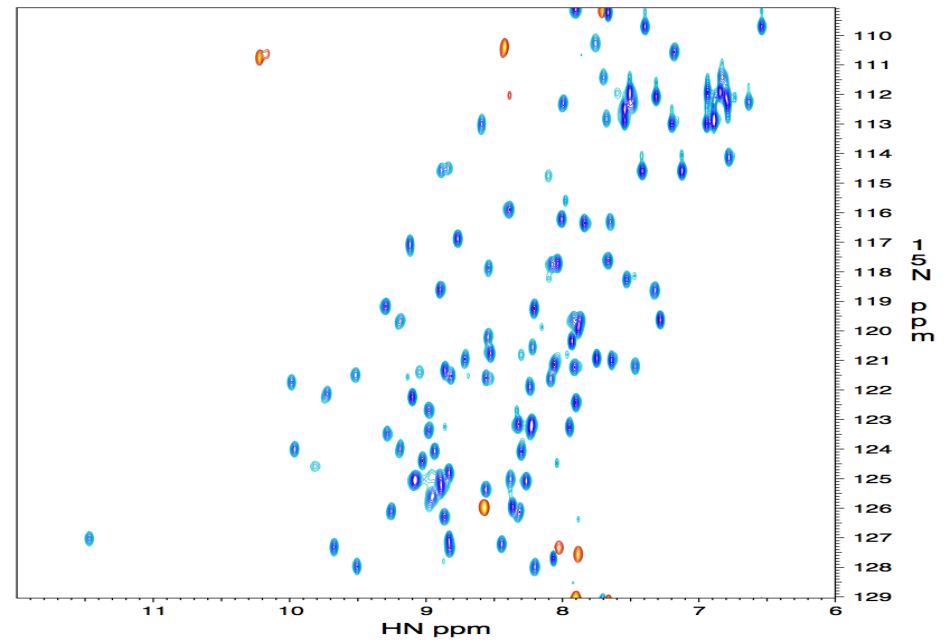
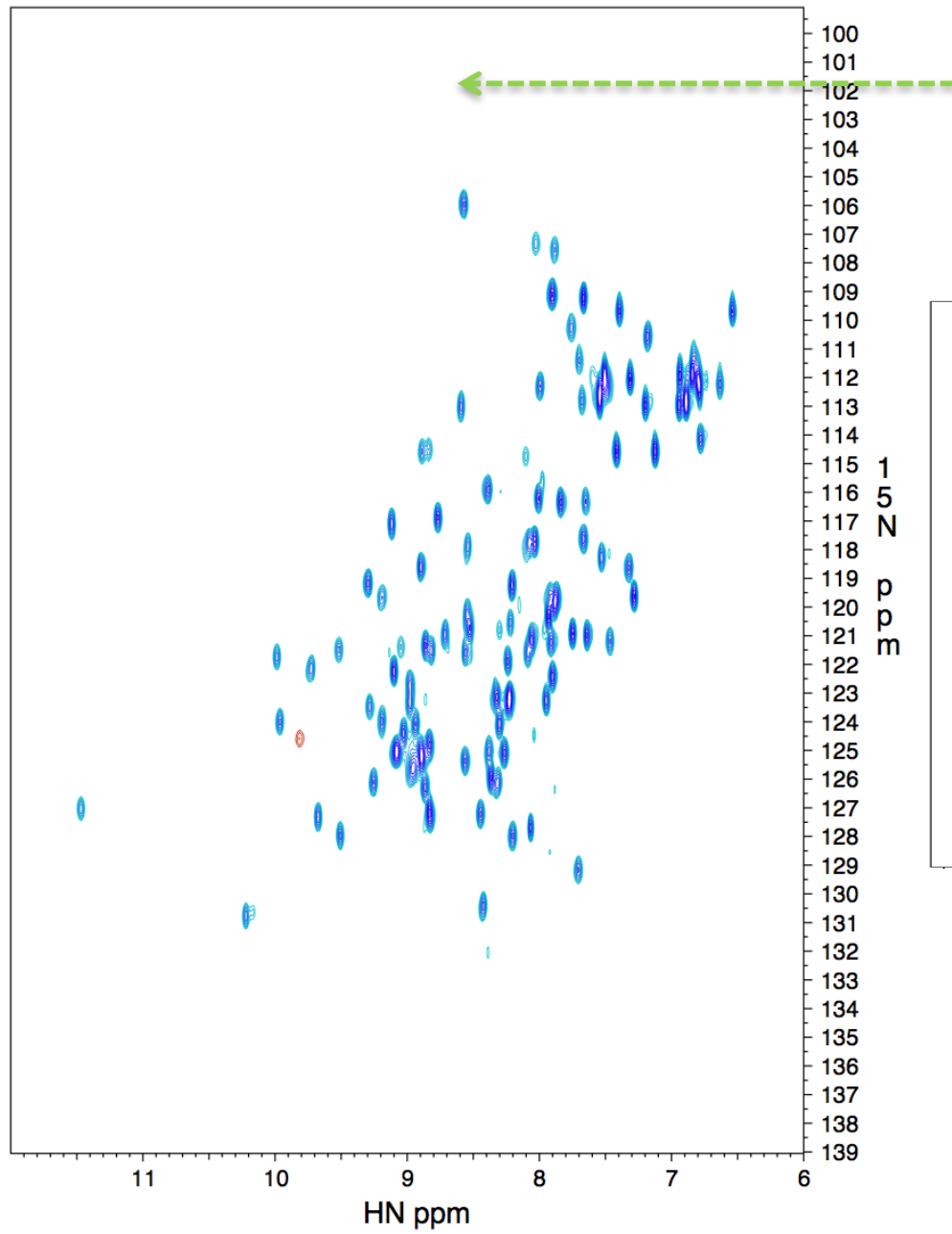


**有機低分子, 生体高分子 NMR の測定
およびデータ処理において
留意したいパラメータ**

**第 15 回 若手 NMR 研究会
2014 年 7 月 11-13 日
7/11 (金) 14:00 ~ 16:30
生命の森リゾート (千葉)**

**横浜市立大学
生命医科学研究科
構造エピゲノム科学
池上貴久**

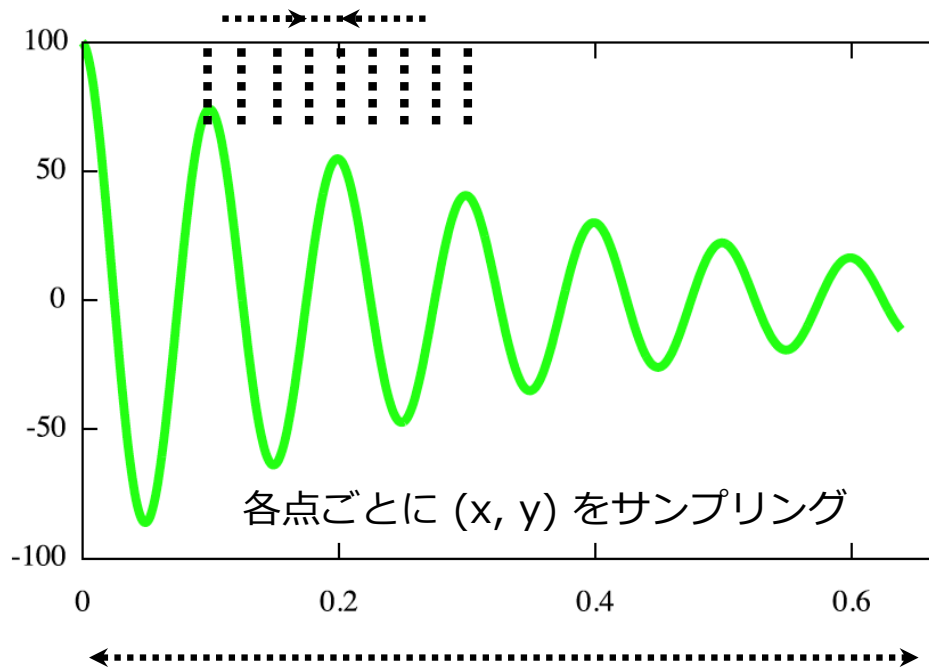
この領域を観測するのは
かなり時間を無駄にしない？



観測時間、スペクトル幅、分解能、サンプリング間隔とは???

$$1/\text{sw}h_1 = \text{inf}_1 = \text{nd}0 * \text{in}0$$

1 / スペクトル幅 = サンプリング間隔 Δt



観測時間 = 1 / 分解能

スペクトル幅を狭めると ...

サンプリング間隔が広がる。
観測時間が長くなる。
分解能が up ↑

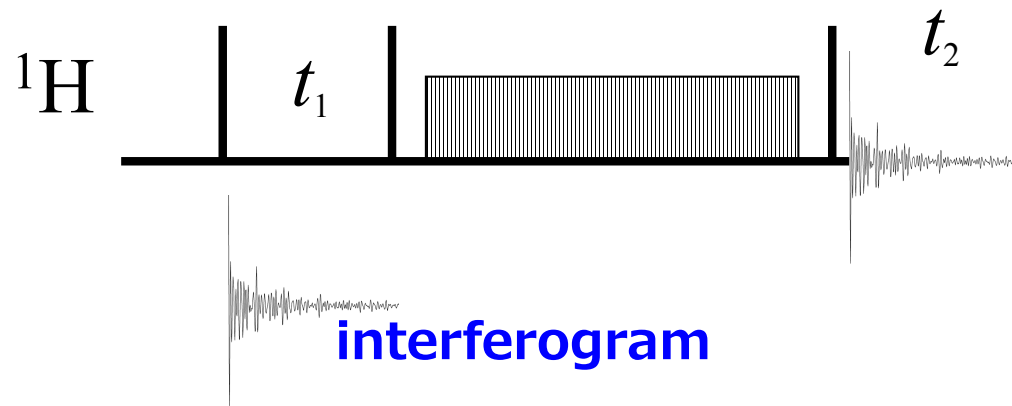
しかし、測定時間は同じ。

$$aq_1 \text{ (間接測定軸)} = \text{inf}_1 * \text{td}_1/2$$

$$aq_2 \text{ (直接測定軸)} = \text{dw} * 2 * \text{td}_2/2$$

直接測定軸のスペクトル幅はむやみに狭くしてはいけない

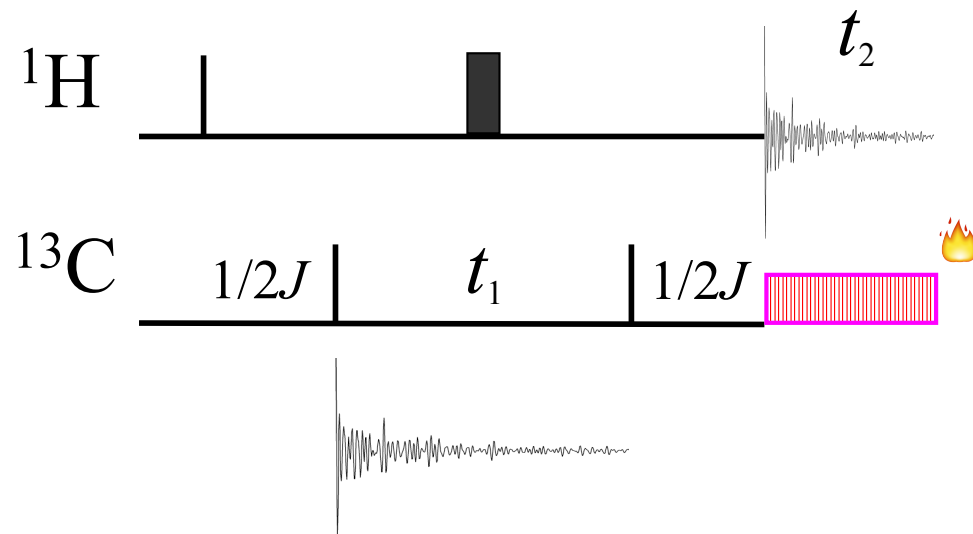
free induction decay (FID)



FID が長くなり過ぎると

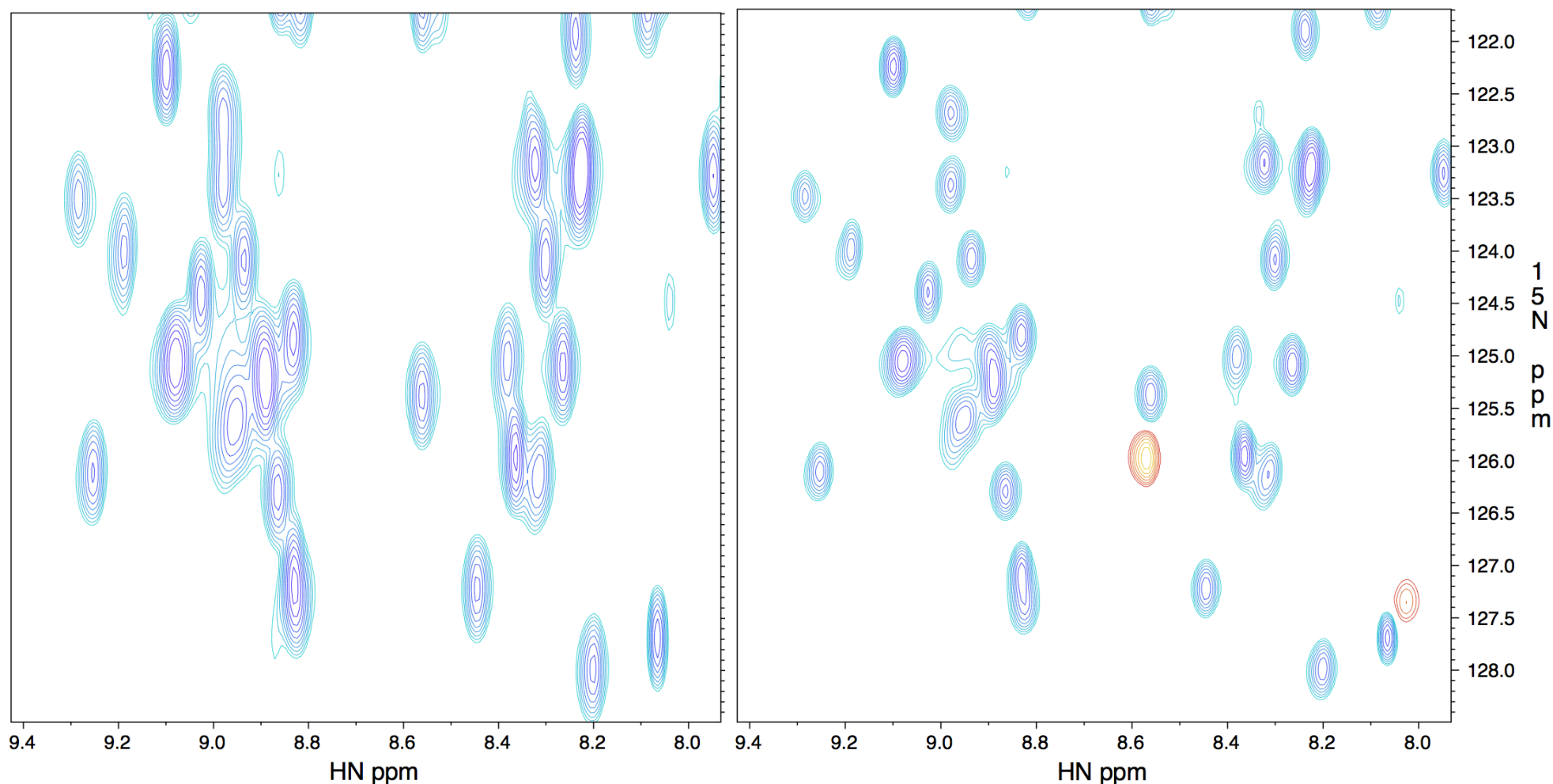
- ・ 発熱
- ・ プローブの故障

Decoupling がなければ
問題なし (TROSY, 2D ^1H)



FID に decoupling がある場合は
< 100 ms ぐらい? に抑えておく。

同じ測定時間でも分解能がかなり異なる



3次元測定では二つの間接測定軸 (t_1, t_2) のスペクトル幅を半分ずつにすれば測定時間は $1/4$ になる (濃度を二倍に濃くしたのと同じ)。

クイズ1

昨日 24 hr かけて野生体の HNCACB を測りました。NS=8 でしたので、何とか解析できるぎりぎりの感度でした。今日は変異体の HNCACB を測るつもりです。

ところが、濃縮の最中にアミコンが倒れて試料をこぼしてしまい、変異体の濃度が 1/3 になってしまいました。なんとか同じ質の HNCACB を得るには、NS をいくらにすればよいでしょうか？

クイズ2

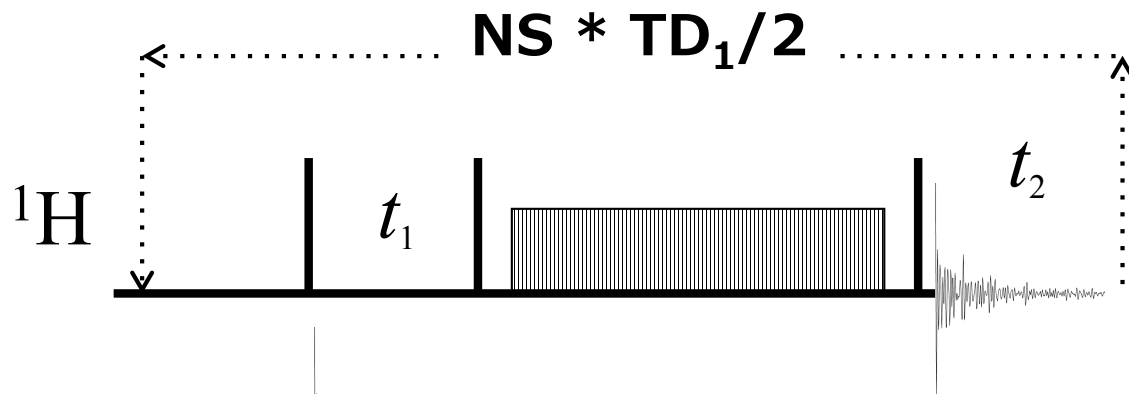
変異体の 2D-COSY をやっと測り終わりました。後は野生体の reference を測るだけです。ところが、500MHz-NMR のプローブが知らない間に折角の inverse から異種核用 BBO に交換されてしまいました。業者に ^1H の感度を尋ねてみたところ、inverse は 600 なのに対して、異種核用は 300 とのことでした。今からプローブを元に戻しても良いのですが、交換の仕方をよく知りません（もう 11 pm だし）。それでは、NS を何倍にすれば、同じ質のデータが得られるのでしょうか？

感度 sensitivity とは？

感度 (S/N) $\propto \sqrt{N_s} \propto \sqrt{T_d} \propto \sqrt{\text{測定時間}} \propto \text{試料濃度}$

積算回数だけを2倍にしても、感度は $\sqrt{2}$ 倍にしかない。
しかし、測定時間は2倍になってしまう。

測定時間が同じであれば、感度は一定である（ただし、緩和を無視）。



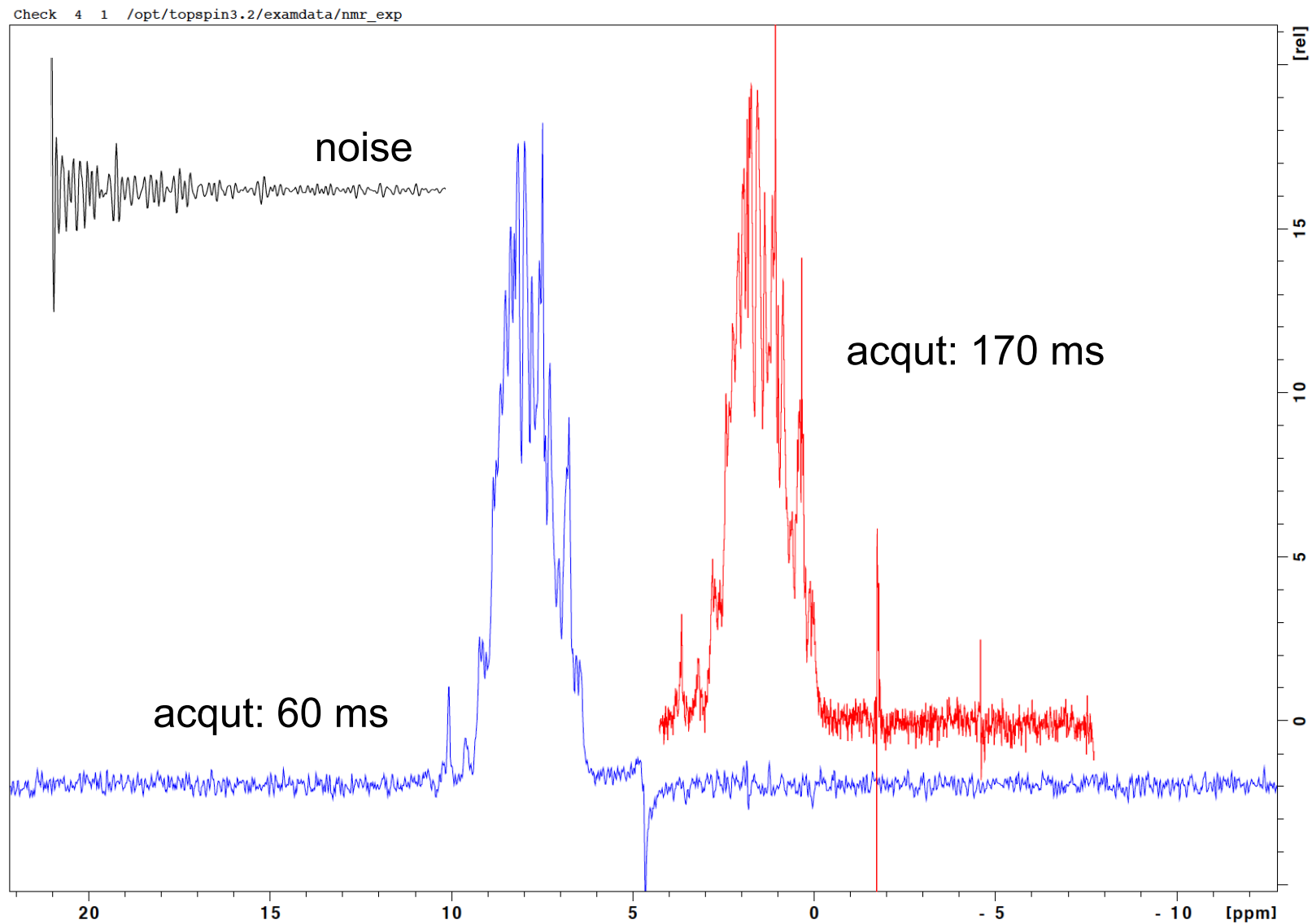
$$N_s = 4$$
$$T_{D1} (\text{間接}) = 512$$

$$N_s = 16$$
$$T_{D1} (\text{間接}) = 128$$

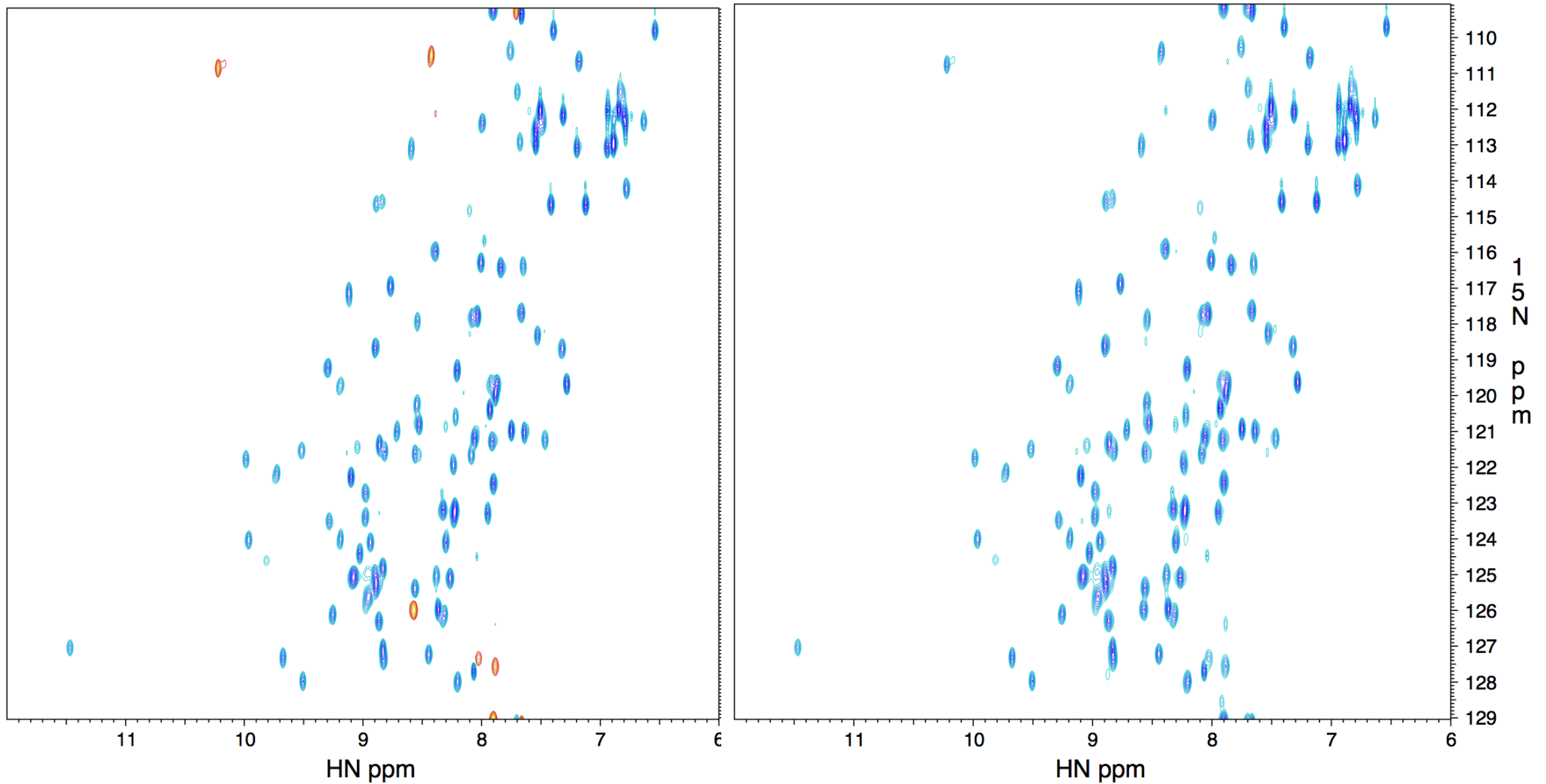
間接測定軸の TD_1 は
測定時間に比例する。

直接測定軸の TD_2 を
増やしても測定時間
はほとんど同じ。

信号が速く緩和する場合は観測時間を長くするほど感度は落ちる。



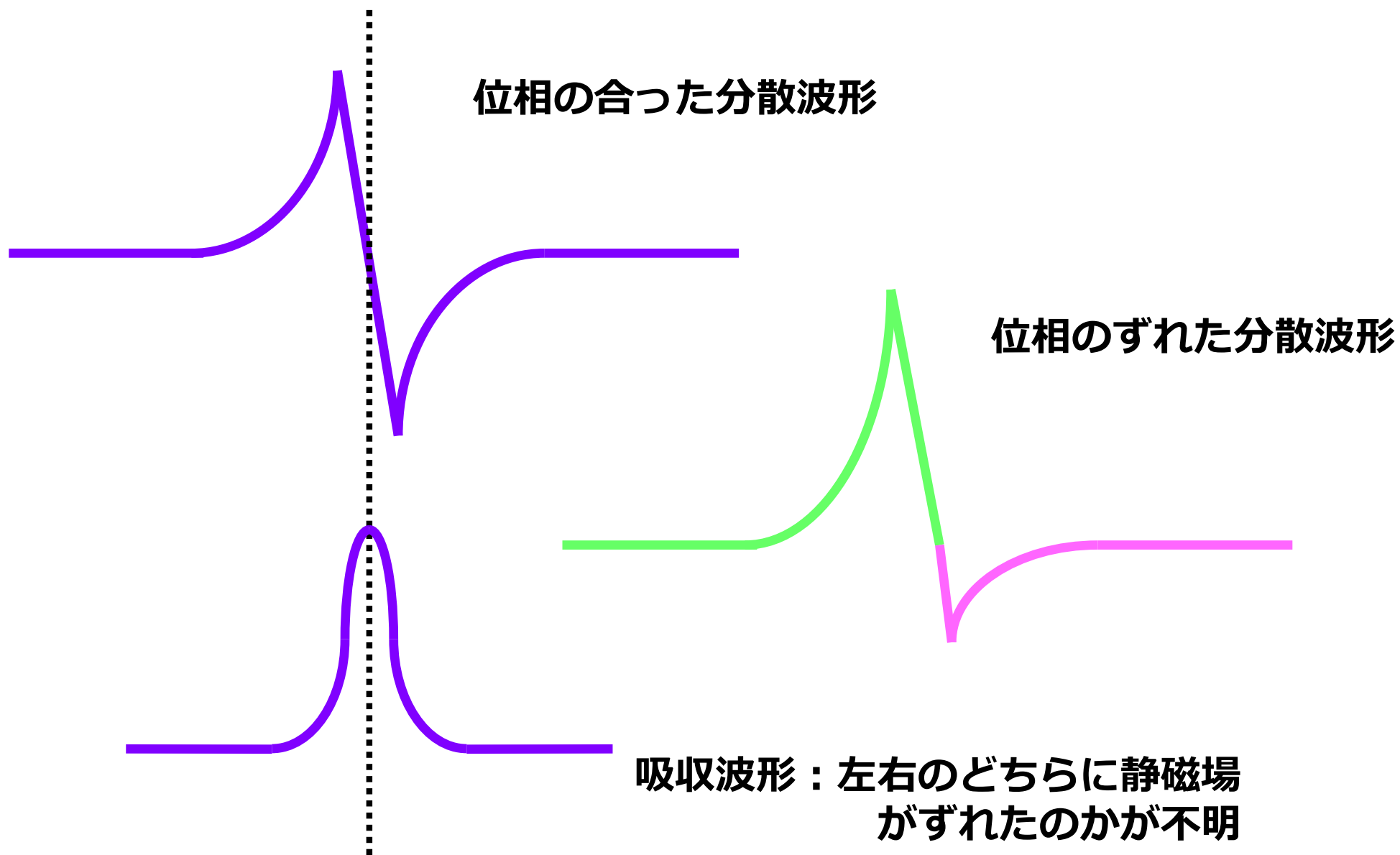
分子量が大きい時は FID を短めにする (or window で FID を絞る) 。



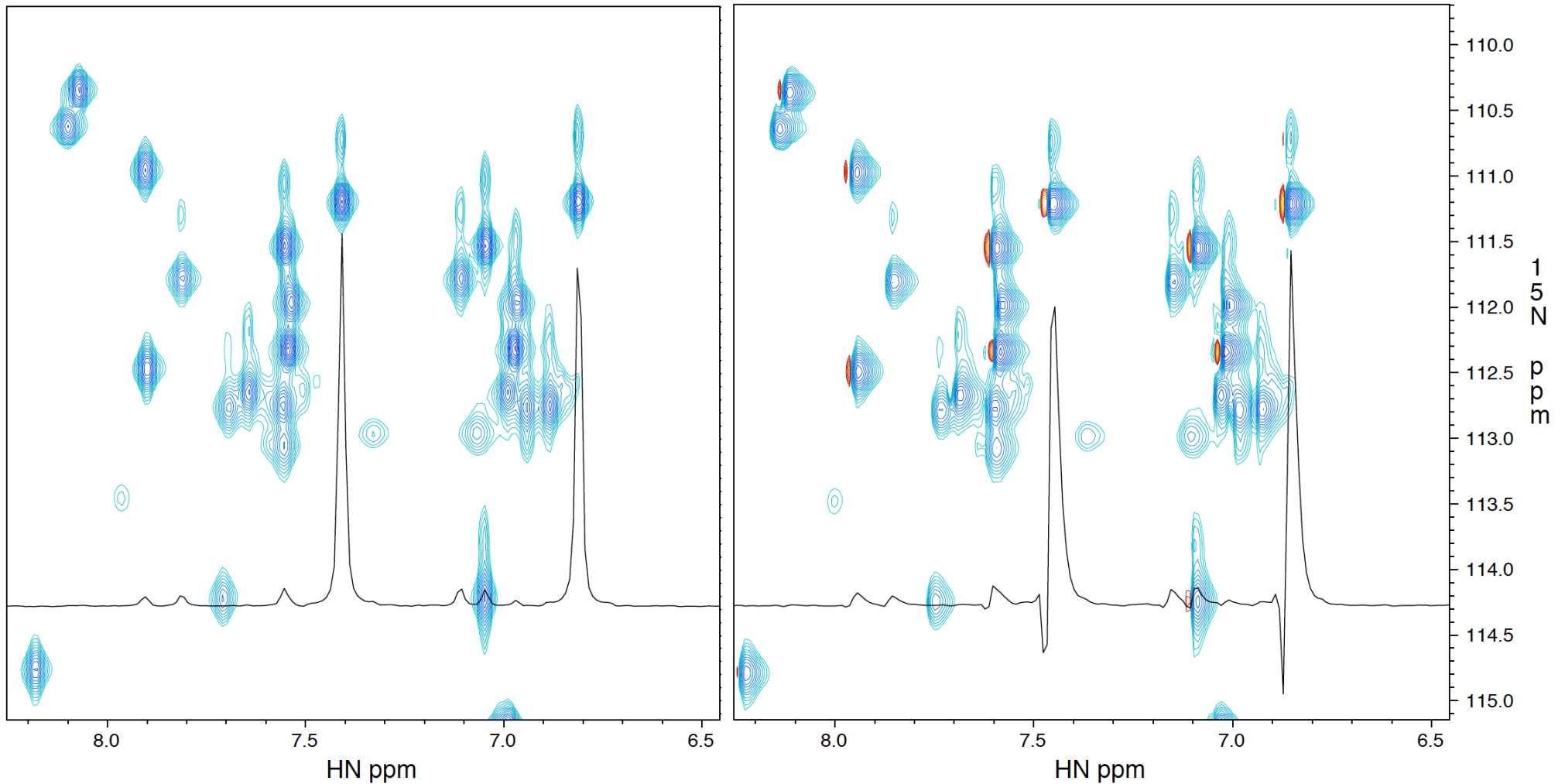
t_1 の初期値を $\Delta t_1/2$ に設定すると 折り返ったピークは負となるので
分かり易い。また スペクトル幅を少しだけ変えて測定してもよい。

(注) 中心周波数をずらしても判らない。。。

重水素ロックの設定



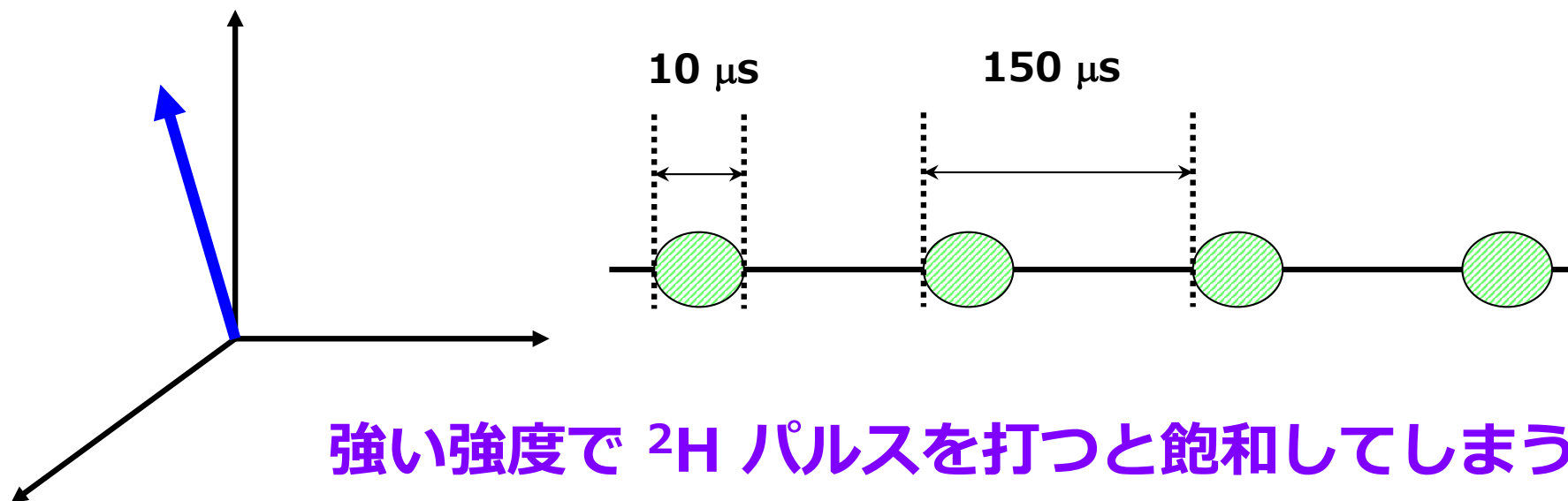
重水素ロックの位相が大切



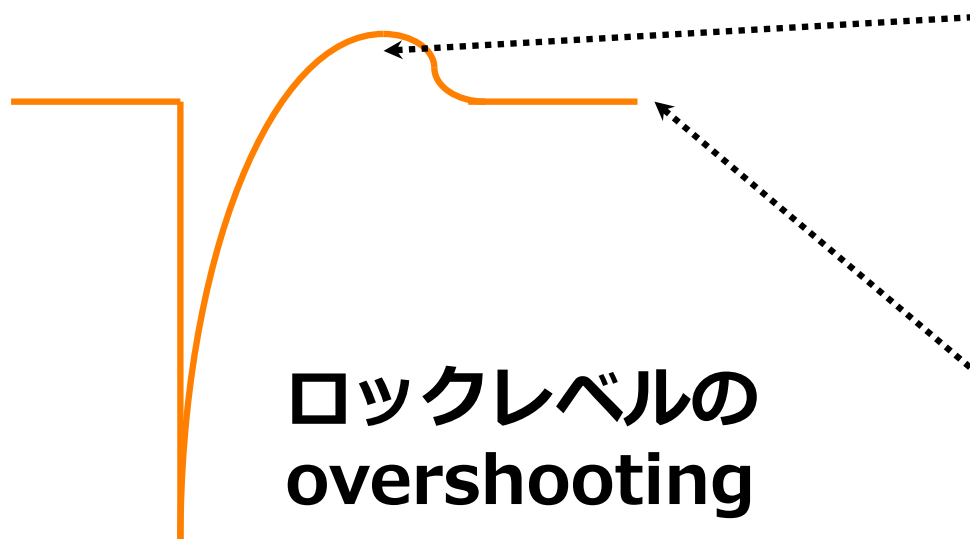
D₂O ロックの位相を 76° ずらすと ...

重水素のチューニング・マッチングは？ B₀ ドリフト値は登録されている？

重水素ロックのパルス強度 -- 強すぎず弱すぎず --



強い強度で ^2H パルスを打つと飽和してしまう。



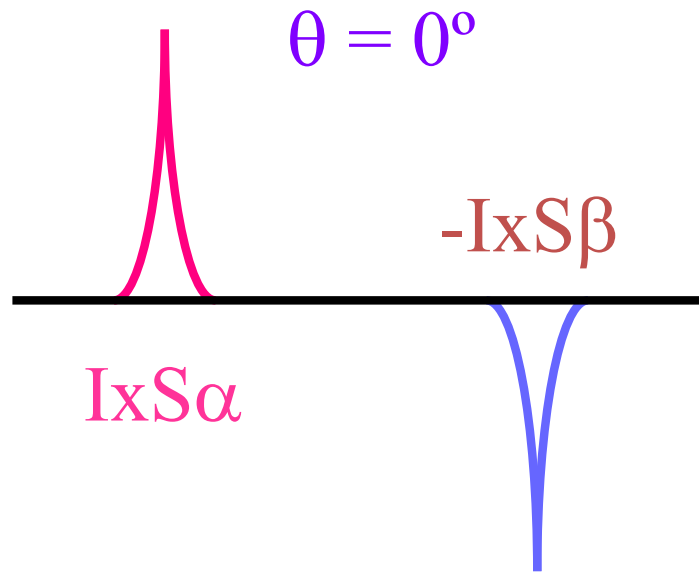
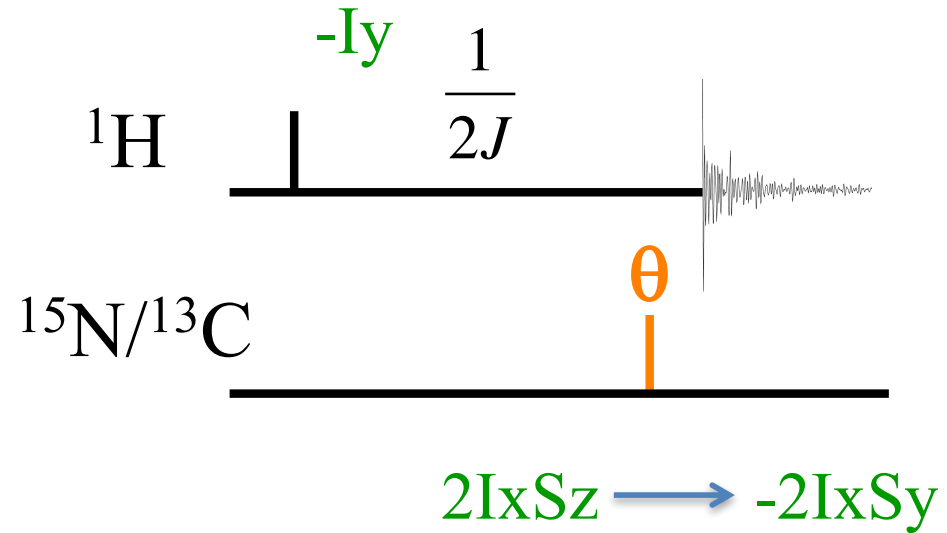
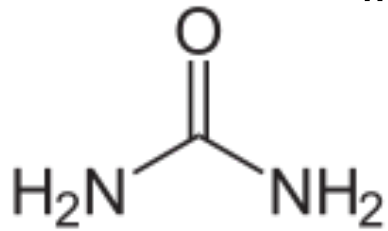
ロックレベルの
overshooting

Gradient によりスペクトル幅が広がり、選択パルスを打ったような感じとなる。そのため、パルスの影響を受けなかった外側の周波数領域の ^2H が飽和状態から脱し、強度が上がった。

常に飽和してしまっているために、正常時よりも弱い ^2H 信号強度となっている。

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$ 90° パルス幅は 更新されている？

$^{13}\text{C}-^1\text{H}_3-\text{OH}$ メタノール
 ^{15}N -尿素
 in *d*-DMSO

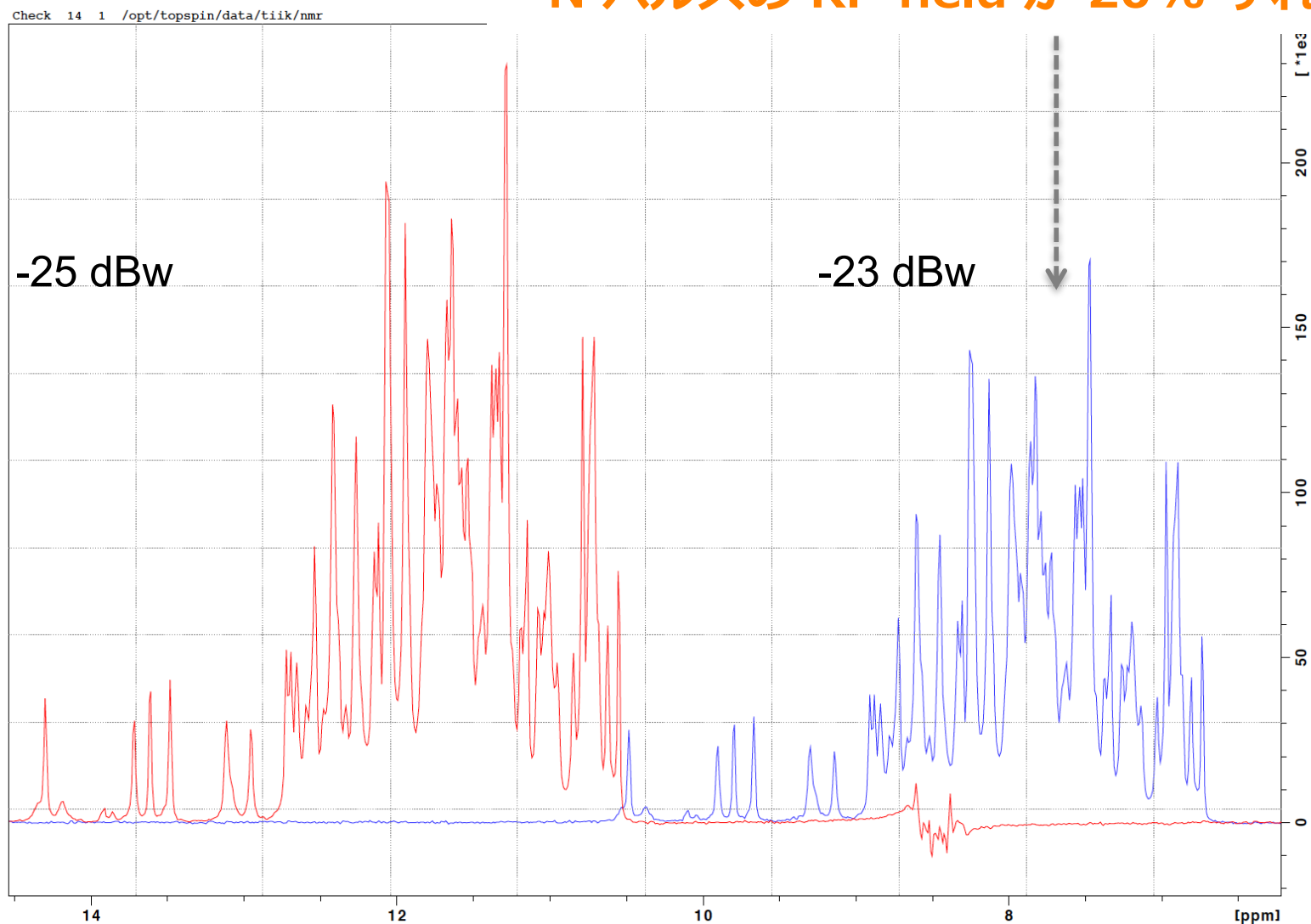


Amp の Linearity が調整されていれば

$$dB_1 - dB_2 = -20 \cdot \log_{10} \frac{P_1^{RF}}{P_2^{RF}}$$

本当は位相も調整されていないといけない

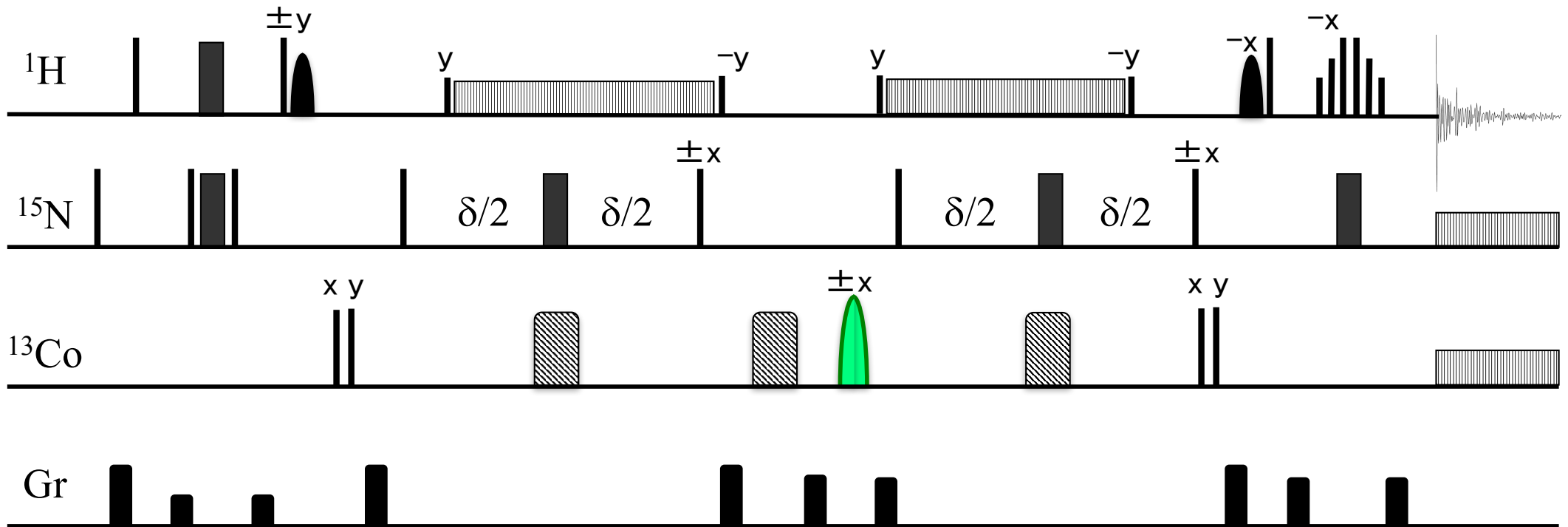
^{15}N パルスの RF-field が 20% ずれると ...



CPMG 実験や多重共鳴パルス実験では きちんと tune-up されたより低い静磁場での感度に負けてしまう。

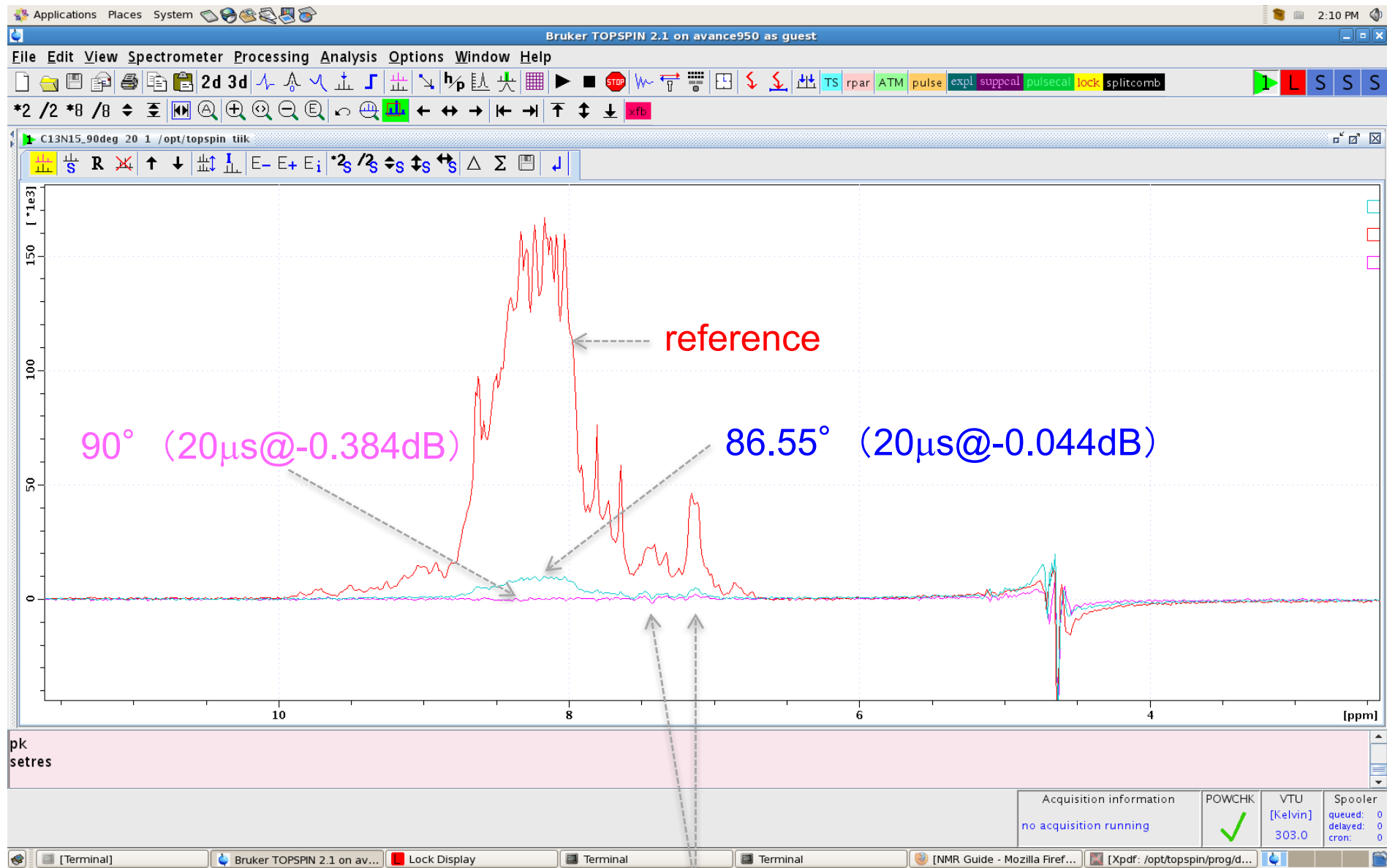
1D HNC0 を使ったの蛋白質試料の ^{13}C 90° パルス幅の決定

塩濃度によって τ_{90} が異なるため 蛋白質試料ごとに微調整すると良い？



^{13}Co は感度が高い。化学シフトの分布が狭いので off-resonance 効果が小さい。→ $\pm 1^\circ$ 未満の差を検出できる。

A sample containing 20mM Na-acetate buffer and no salt

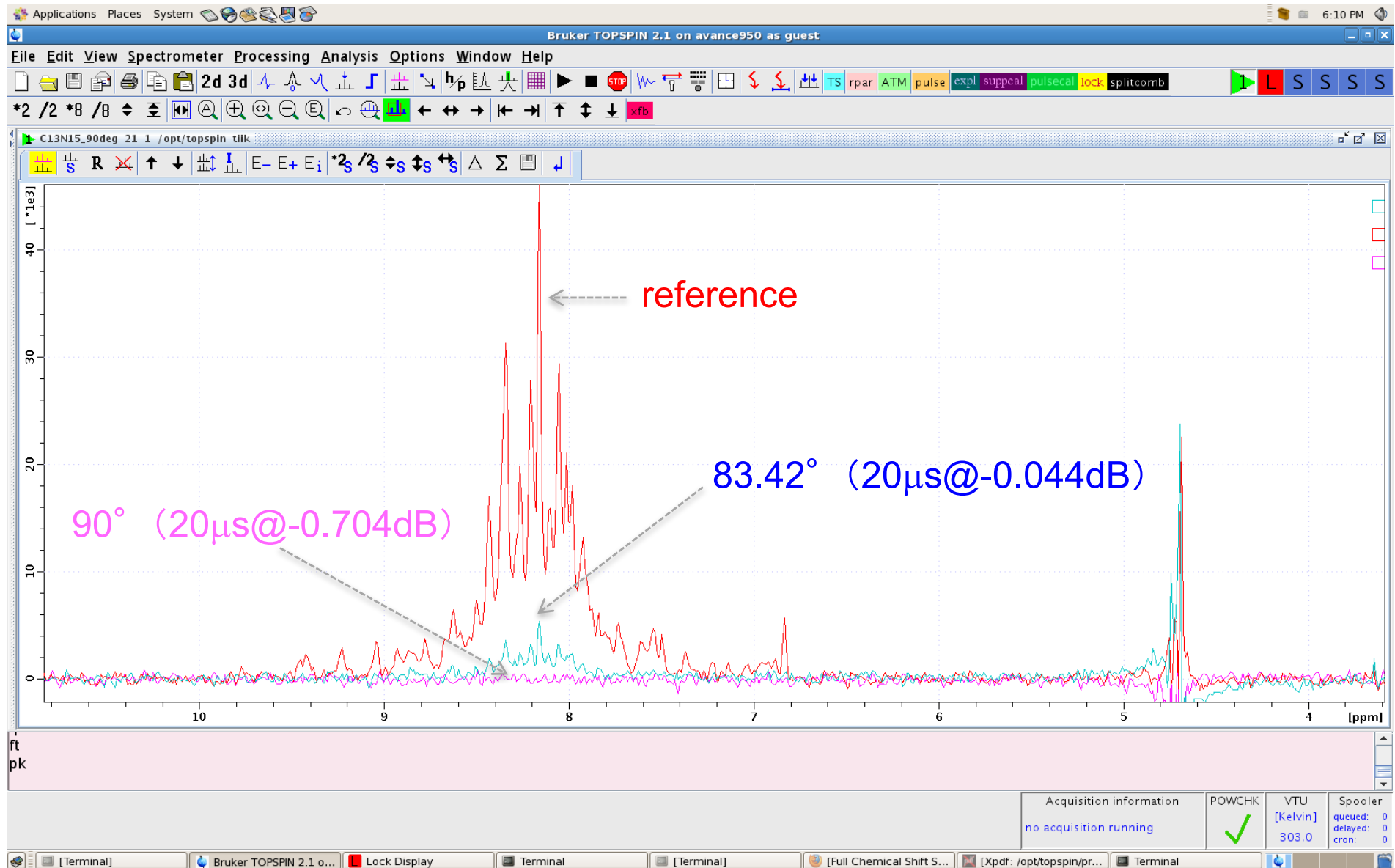


Arg $H\epsilon N\epsilon C\zeta$: $N\epsilon$, $C\zeta$ (160.11ppm) の off-resonance 効果によるアーティファクト

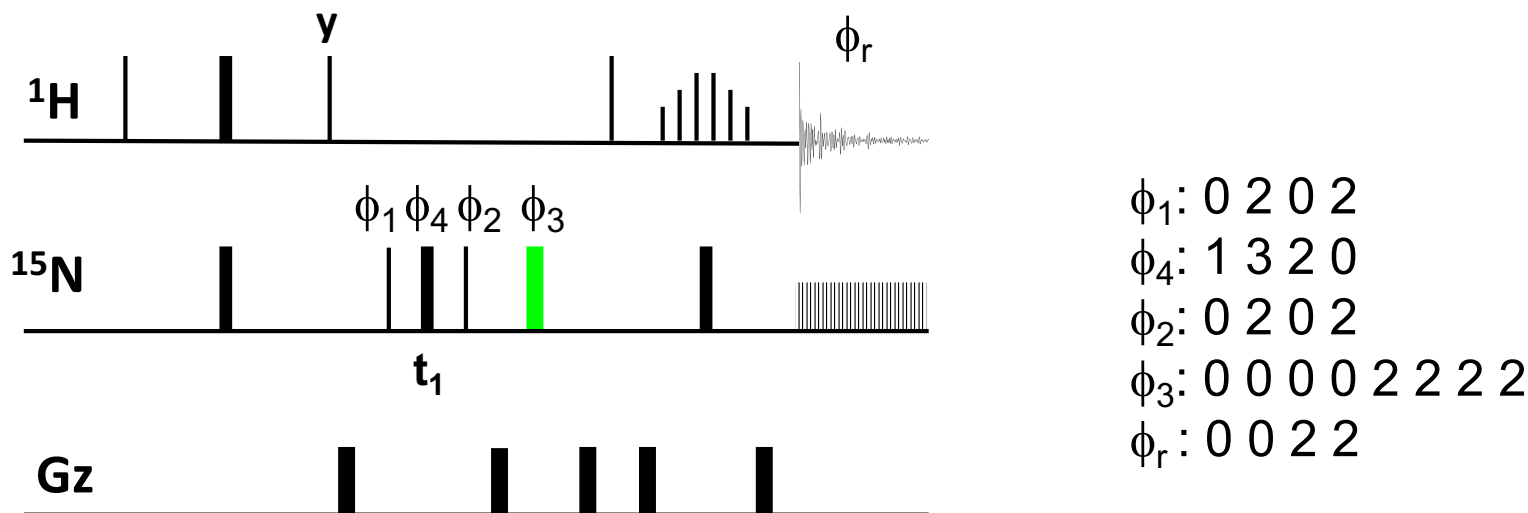
A sample containing 100 mM KCl

The power for the exact 90 deg (db_{90}) can be calculated from the power of trial (db_{trial}) and the peak ratio.

$$db_{90} = 20 \cdot \log_{10}(2 \cdot \cos(\text{ratio}) / \pi) + db_{trial}$$



180° パルスで測長しては駄目！ off-resonance 効果

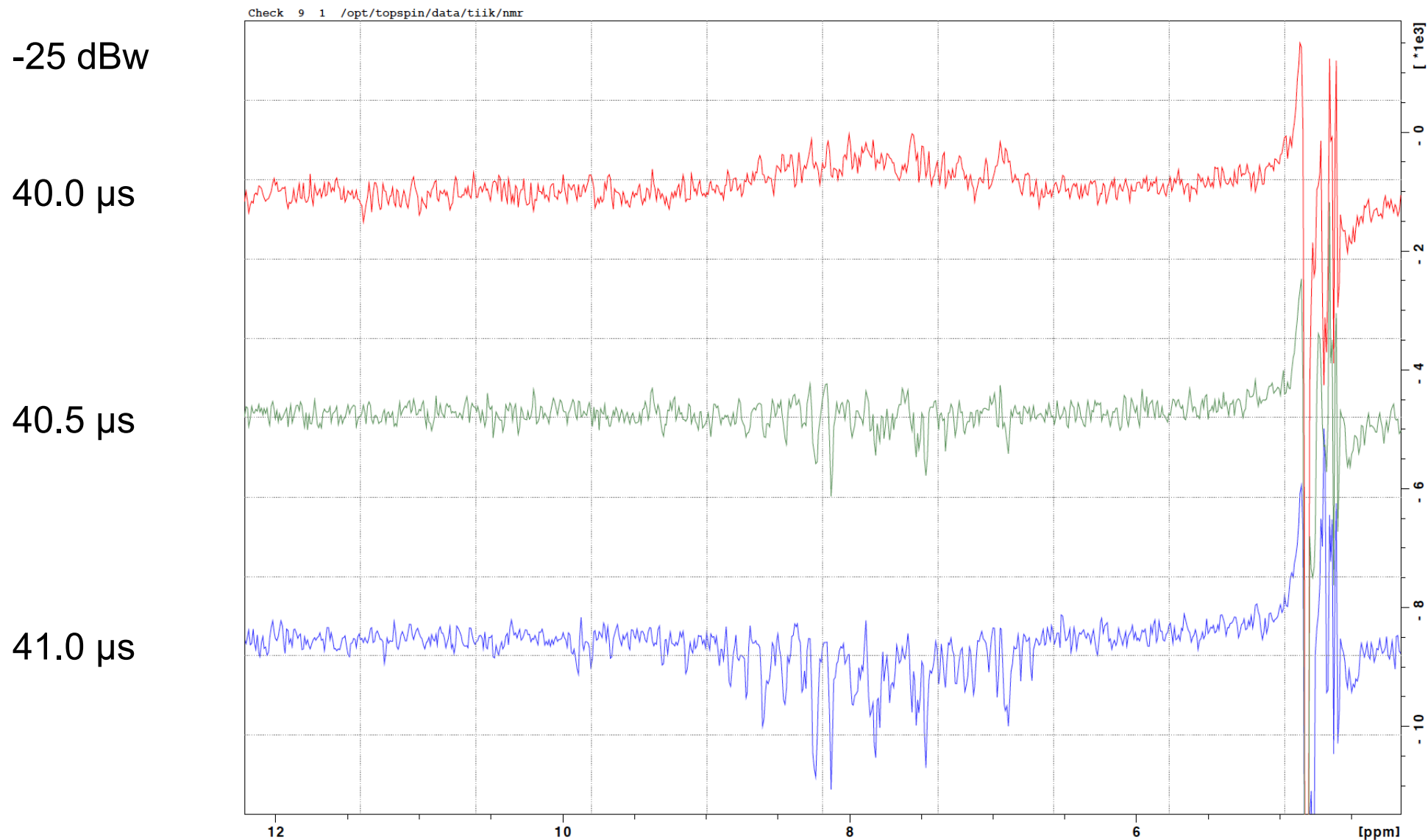


The magnetization that has never passed ^{15}N is eliminated by the combination of phase-cyclings. Furthermore, the off-resonance effect of ϕ_1 and ϕ_2 90 deg pulses and chemical shift evolution during the short t_1 can also be removed by application of ϕ_4 π pulse.

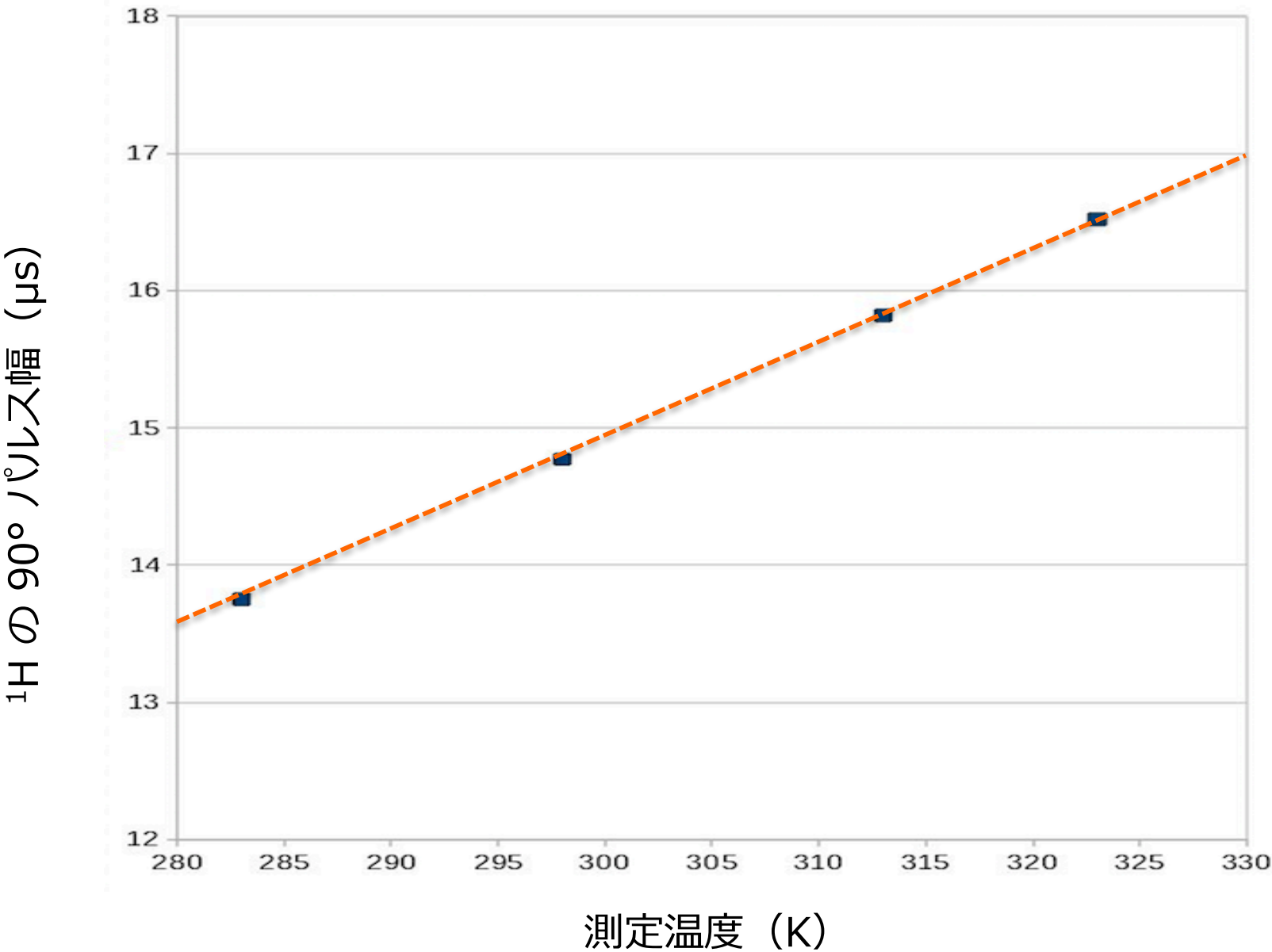
The 90x-180y-90x composite pulse has a similar effect to a π pulse with a less off-resonance effect.

1D ^1H - ^{15}N HSQC を使った ^{15}N 90° パルス幅の微調整

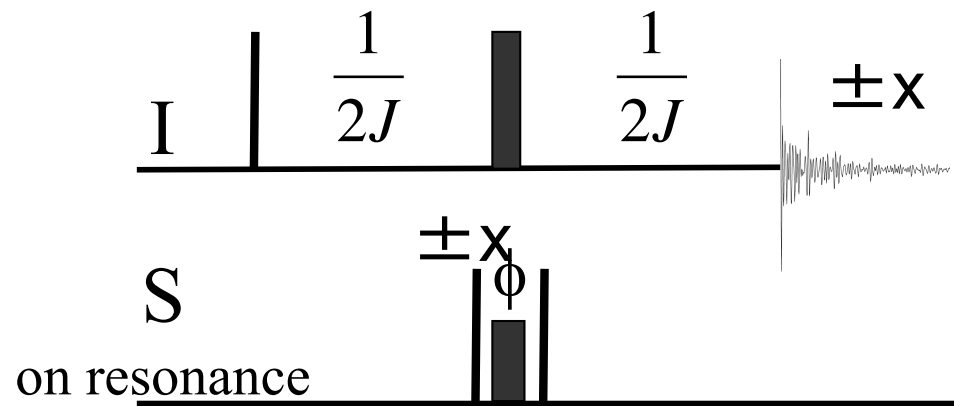
最高感度のマシンでは $\pm 0.1 \mu\text{s}$ でもスペクトルに差が出る
位相回しが少ないとアーティファクトが生じることがある



測定温度を変えるだけで 90° パルス幅も少し変わる

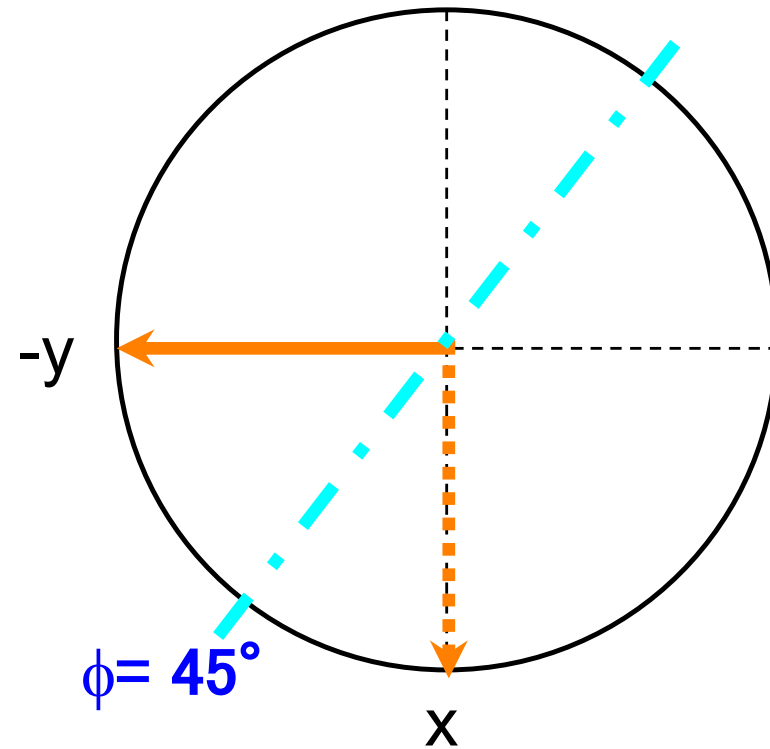
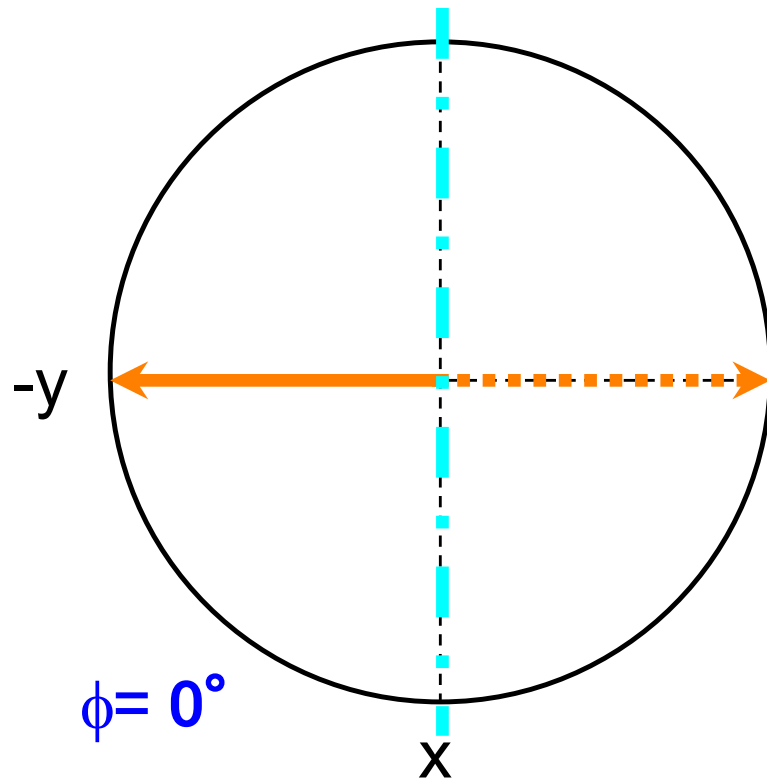


位相は大丈夫？



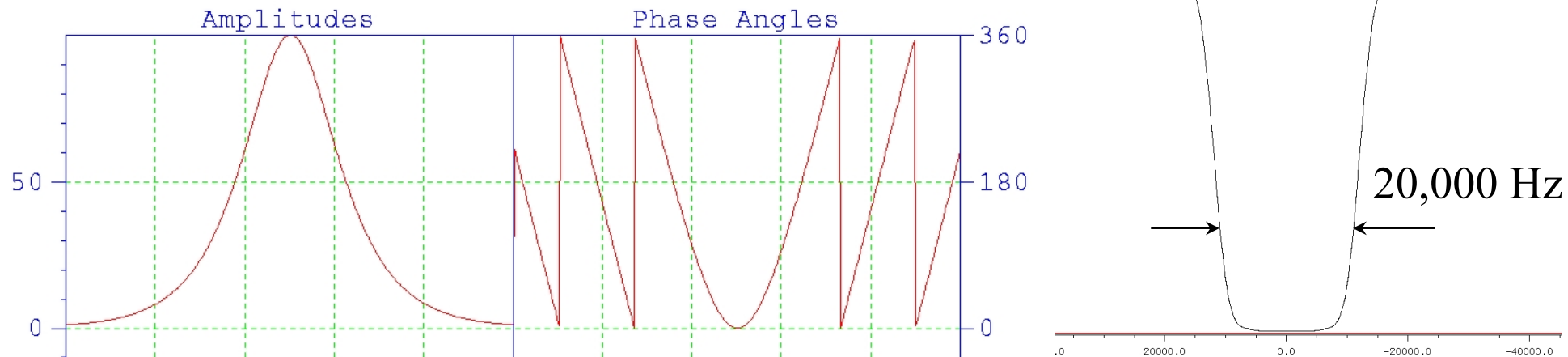
HMQC を使って
位相を調べる。

$\phi = 45^\circ$ の時、
信号が0となる。

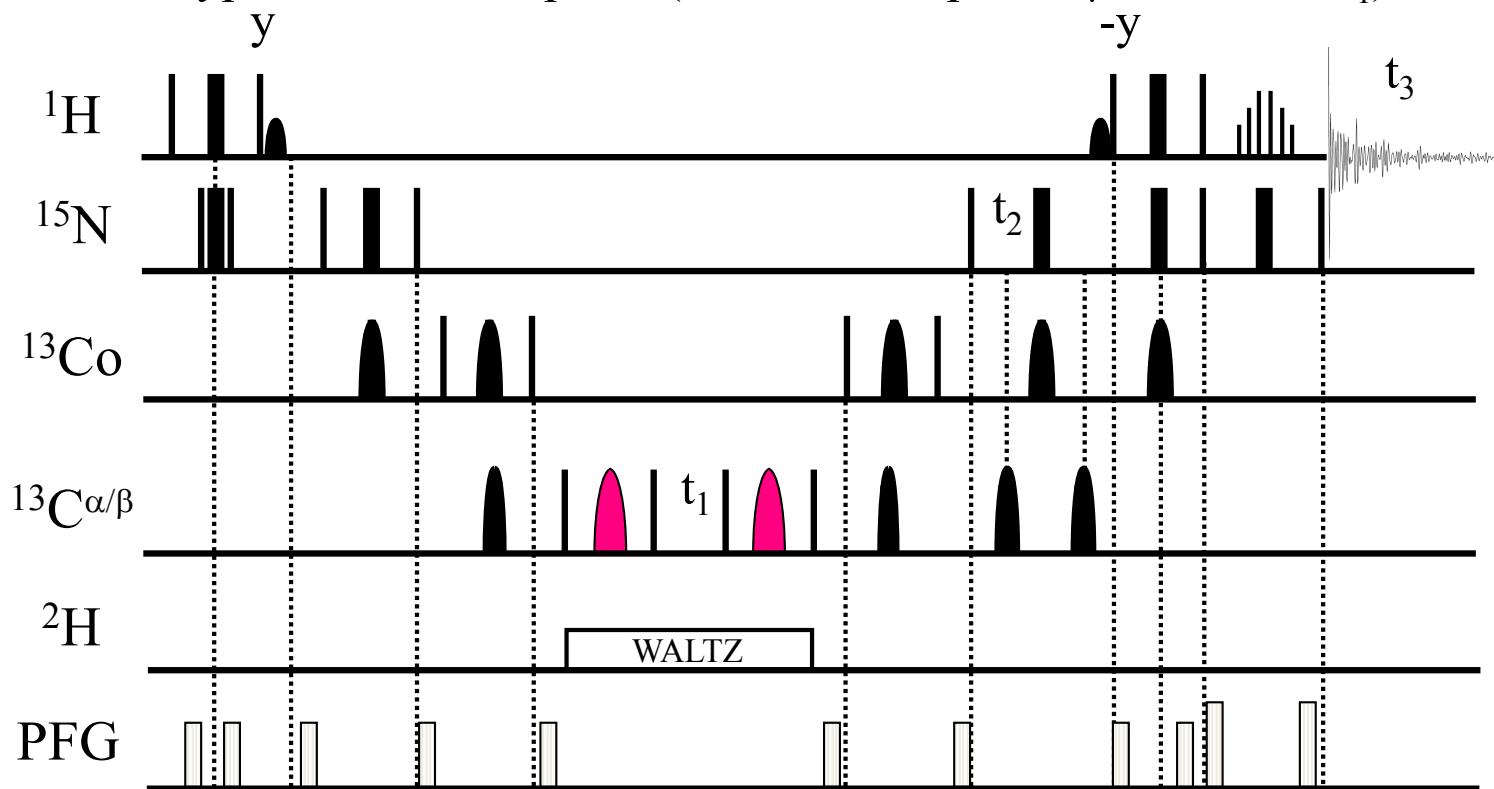


Adiabatic パルスを含んだ 3D TROSY-HN(CO)CACB

hsec24k500u

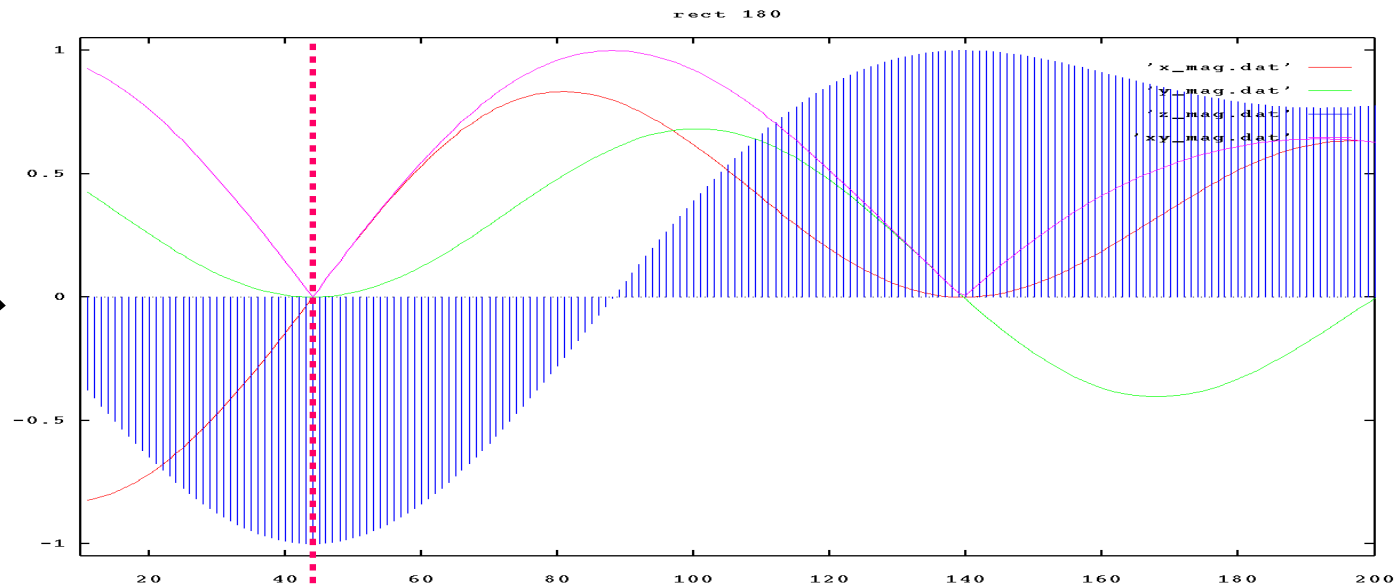


Hyperbolic-secant pulse (24 kHz-sweep, 500 μ s, 13 kHz B_1)

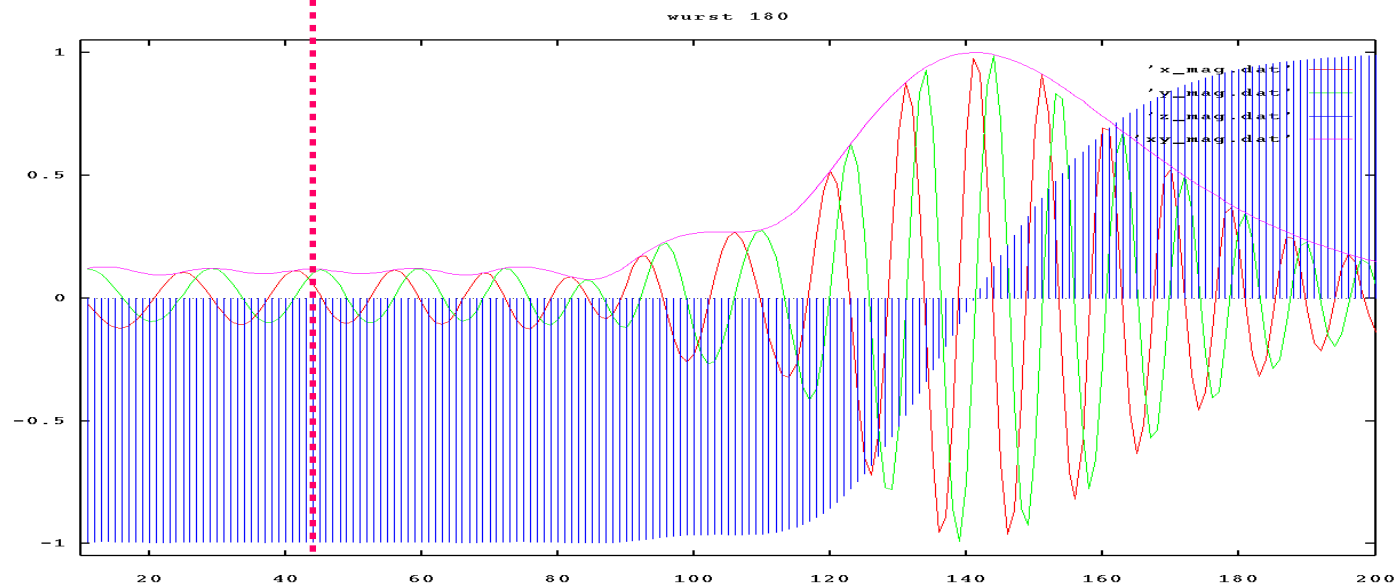


反転 π パルスの励起分布

矩形波パルス
36 μs



Wurst-20
60kHz sweep
500 μs



1GHz NMR

aliphatic

aromatic

carbonyl

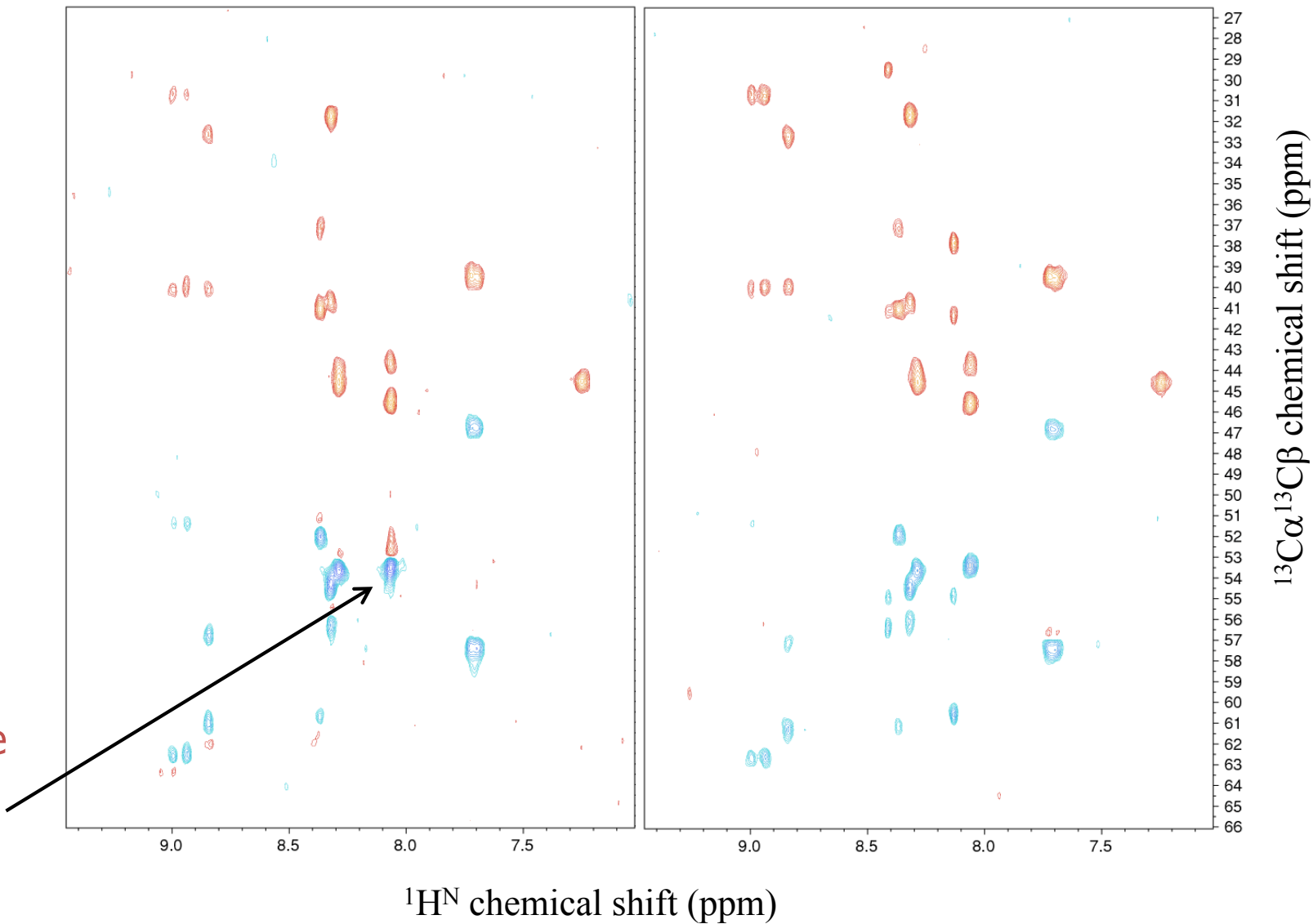
Adiabatic pulse の使用による off-resonance 効果の解消

矩形波 (rectangular)

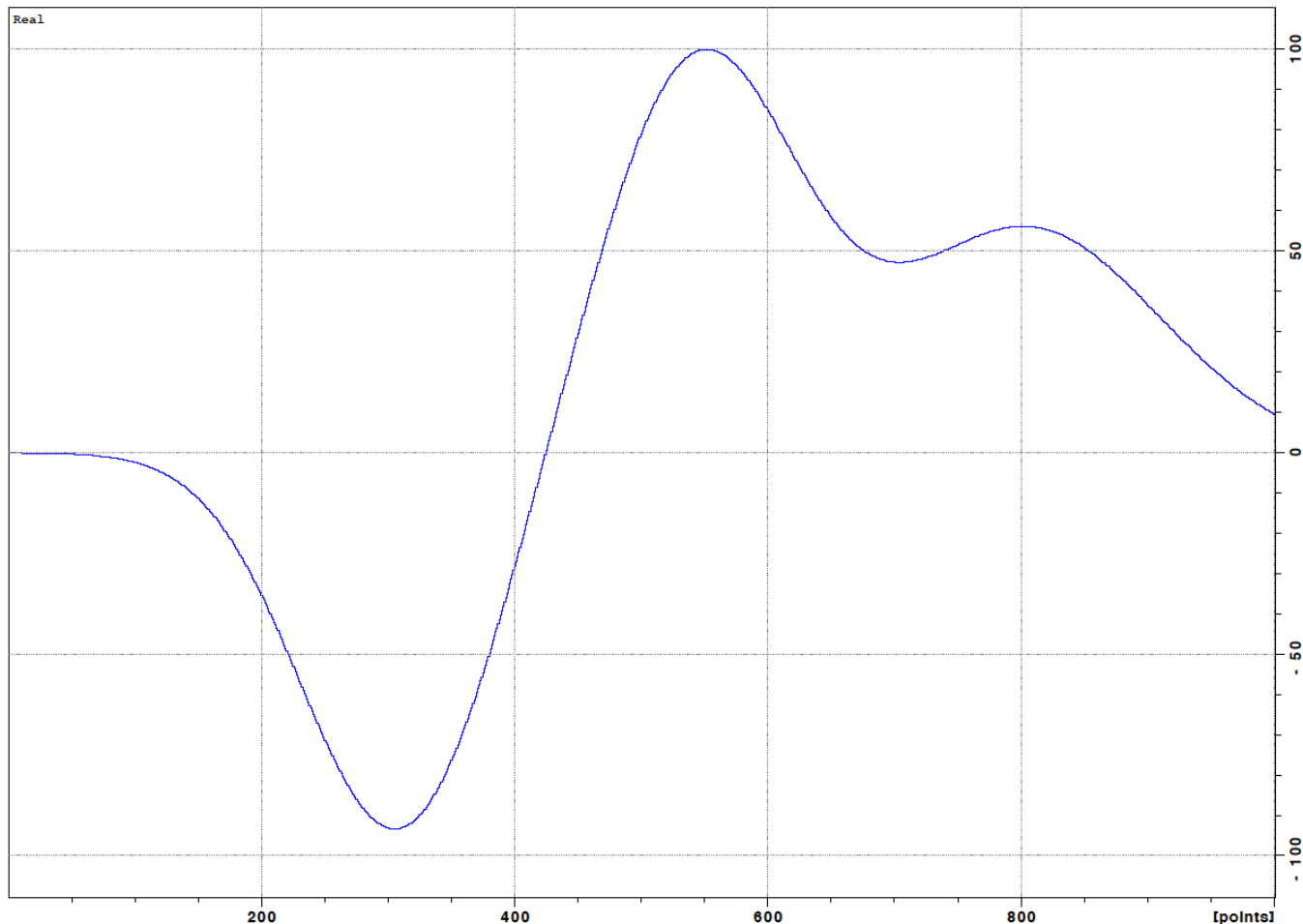
断熱波 (adiabatic)

3D TROSY-
HNCACB

off-resonance
効果による
artifact



^{13}C の 180° パルスによく使われる Q3 波形



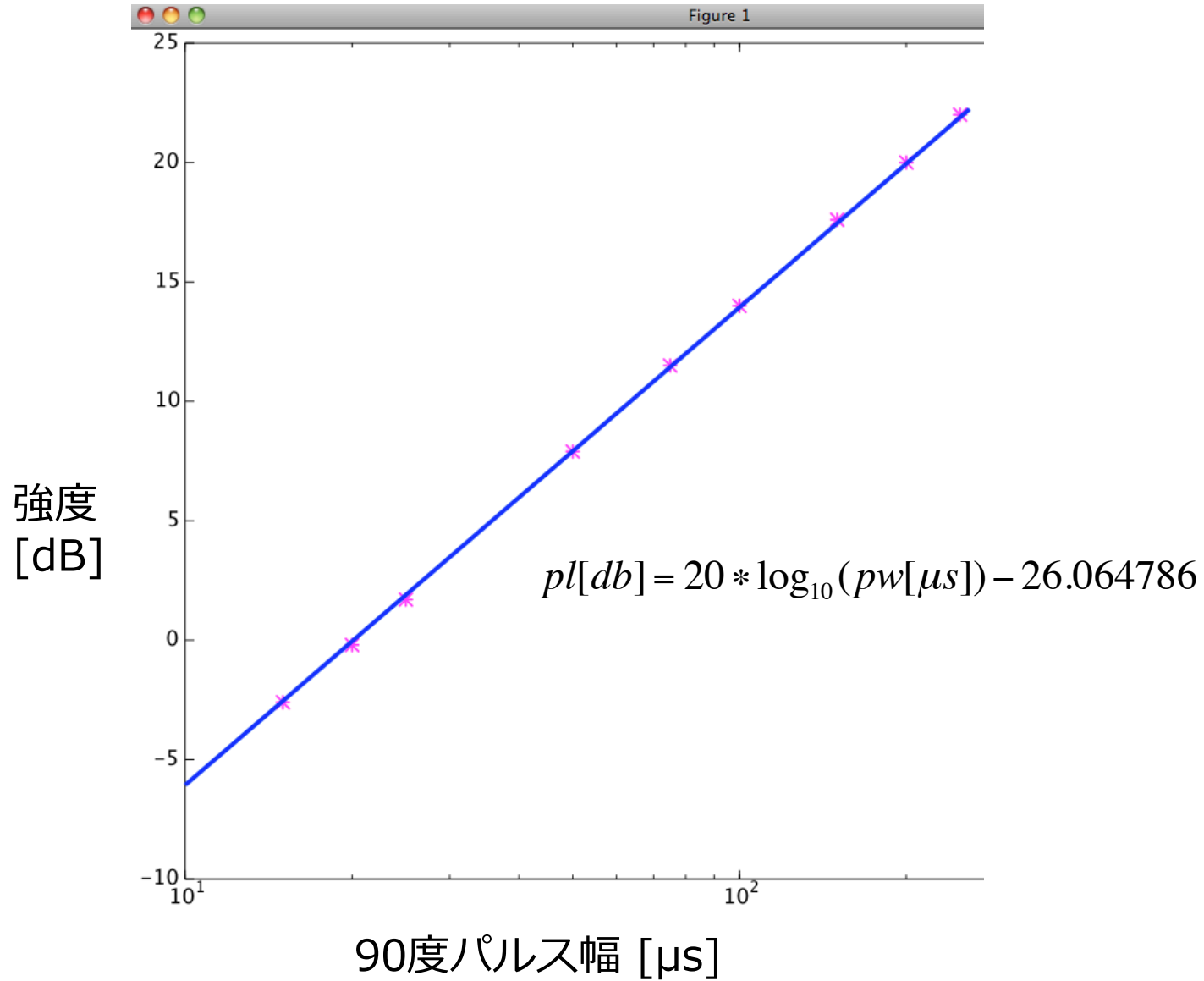
例えば 1,000 個の短冊に分けて、それぞれの時点での dB を公式に基づいて計算する。

→ 強度と位相が公式通りになっていないといけない（線形性）。

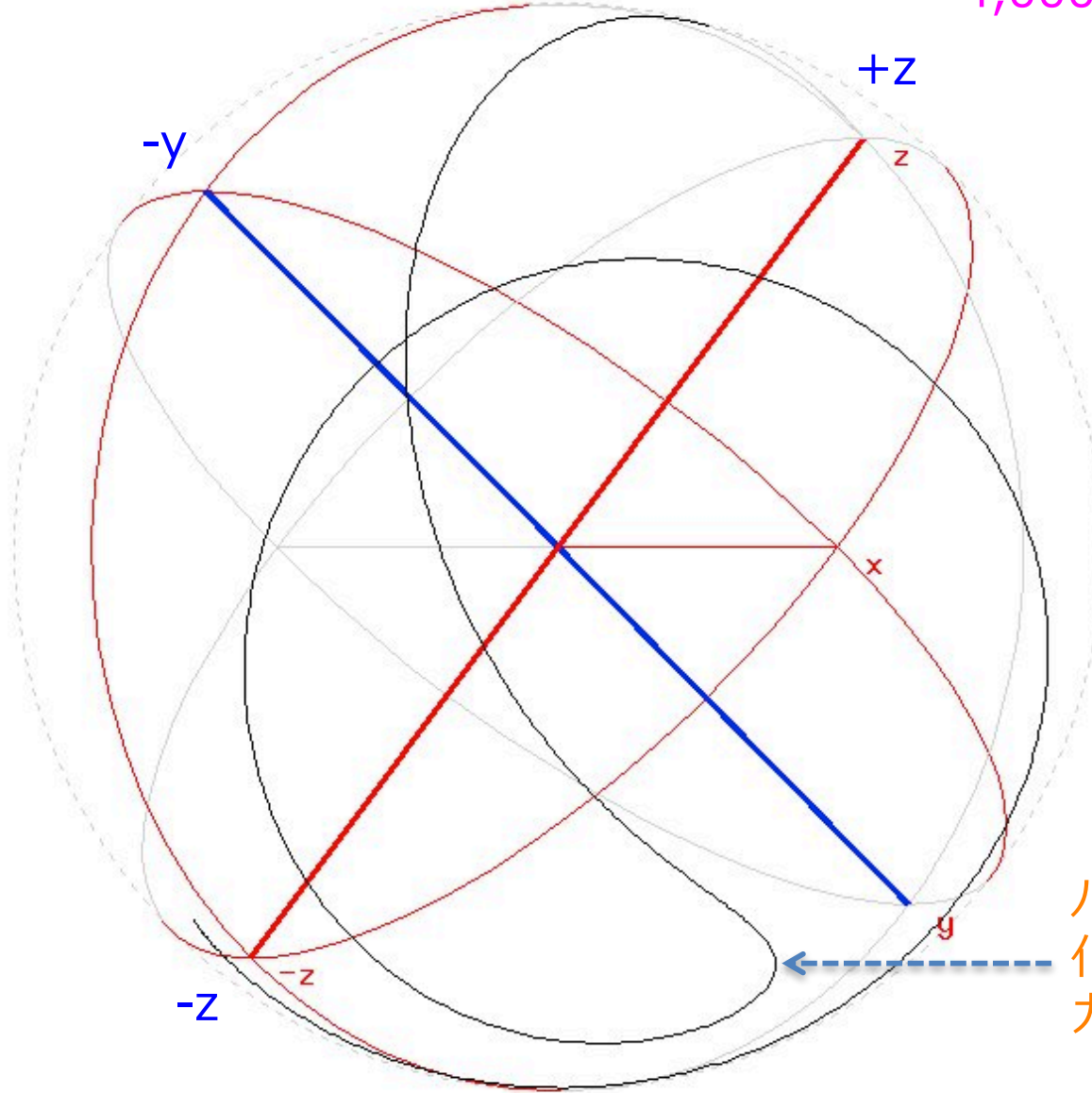
$$dB_1 - dB_2 = -20 \cdot \log_{10} \frac{P_1^{RF}}{P_2^{RF}}$$

RF-磁場強度が刻々と変化する。
正負も含めた面積から on-resonance での RF-磁場強度を決める。

Avance-III 950MHz ¹³C (f2) 90°パルス幅



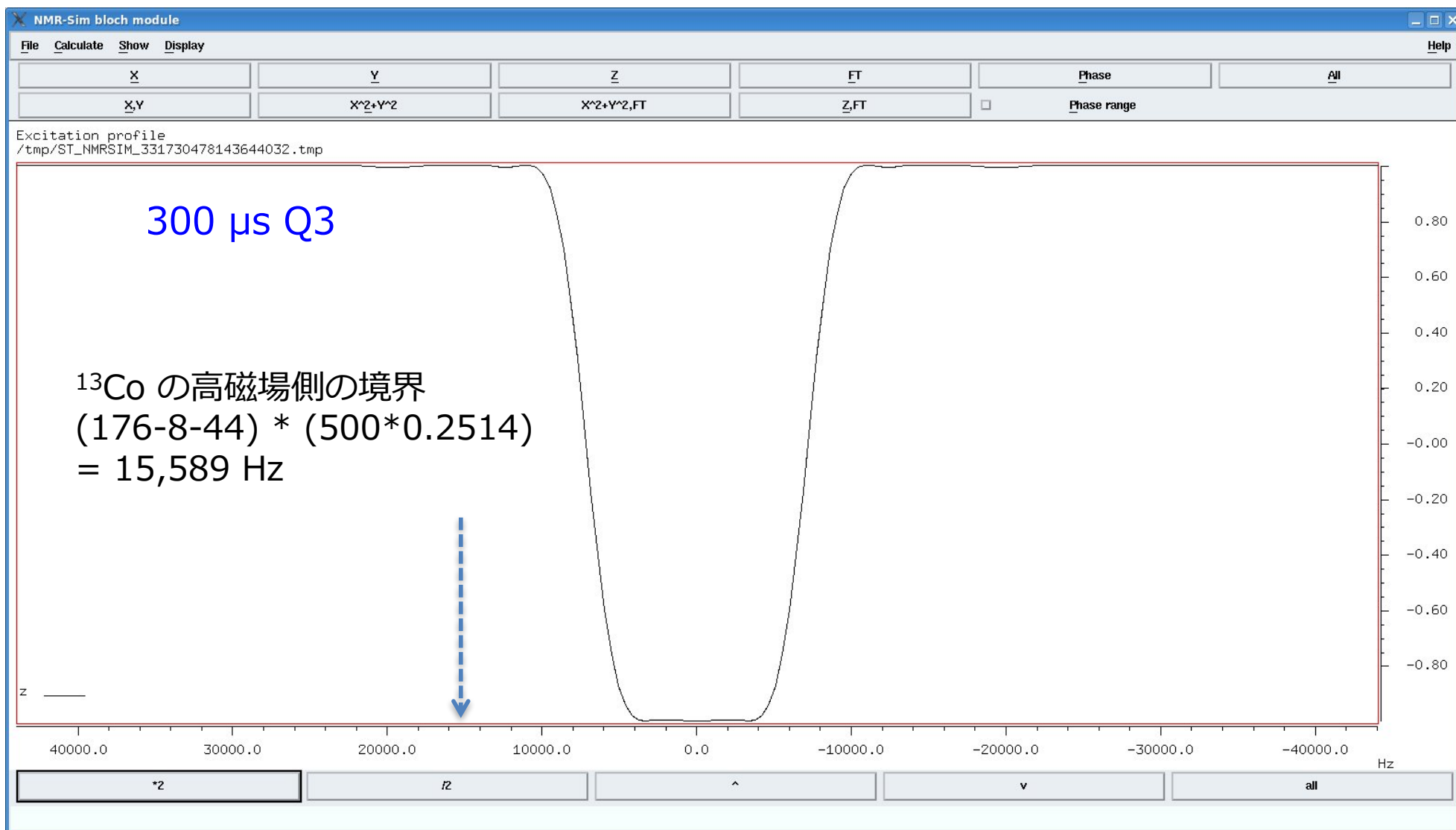
4,000 Hz off-resonance (300 μ s Q3)



パルスの位相を逆転させて、磁化ベクトルの軌跡をヘアピンカーブさせる。

On-resonance での磁化ベクトルの軌跡は y - z 線上に載る。

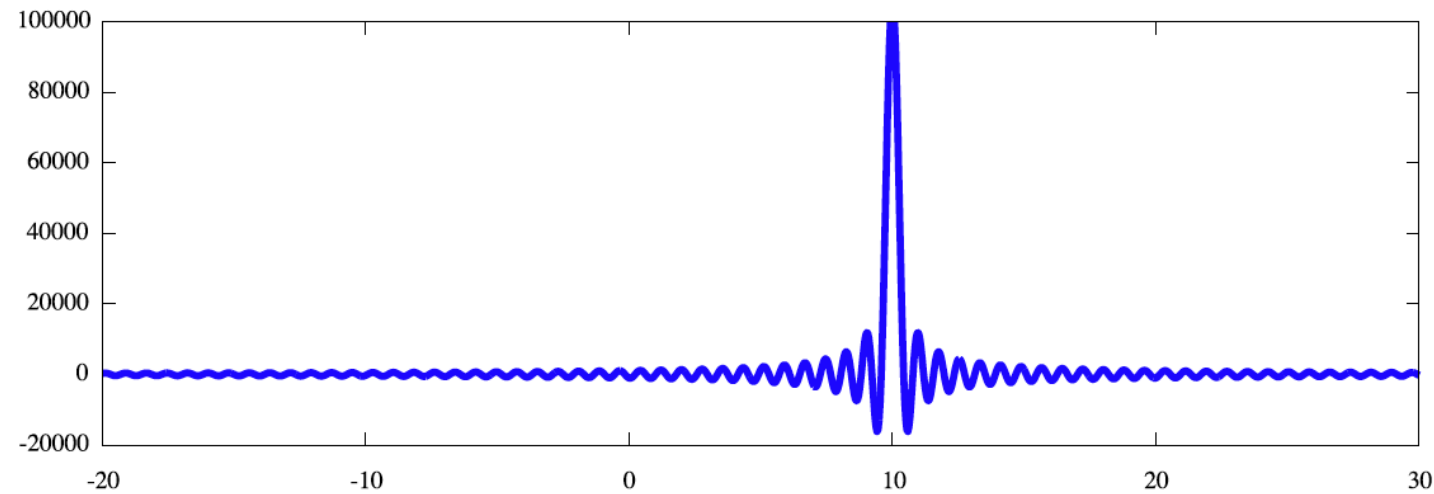
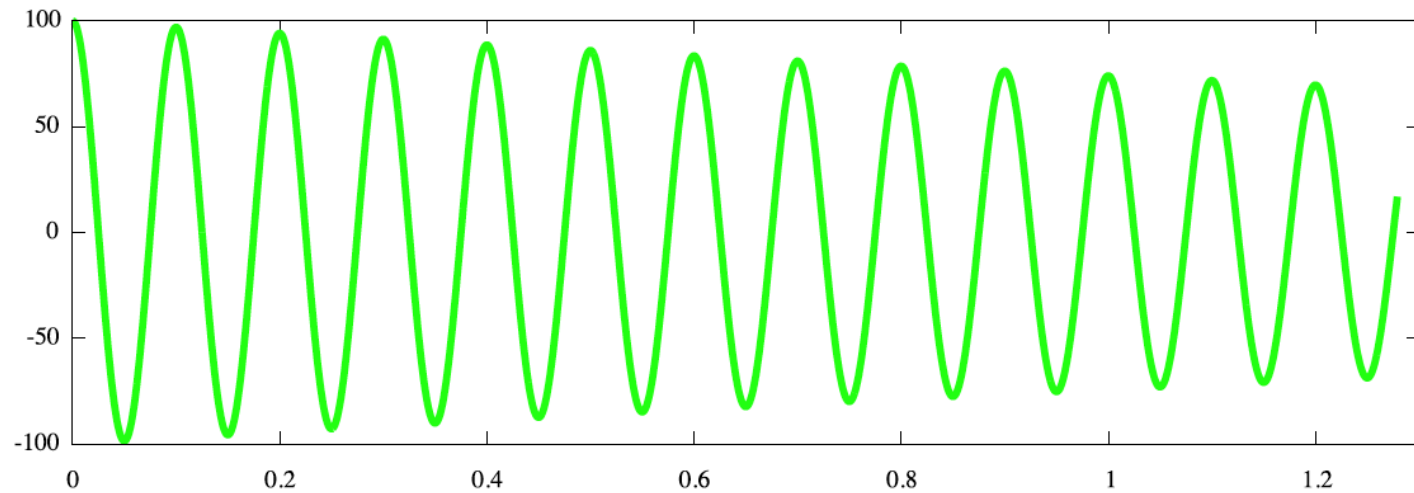
励起（反転）幅は simulator か実測で見積もる。



$8,000 \text{ Hz} / (500 \text{ MHz} * 0.2514) = 64 \text{ ppm}$
44 \pm 32 ppm 範囲の ^{13}C を反転 (aliphatic 領域はこれで十分?)

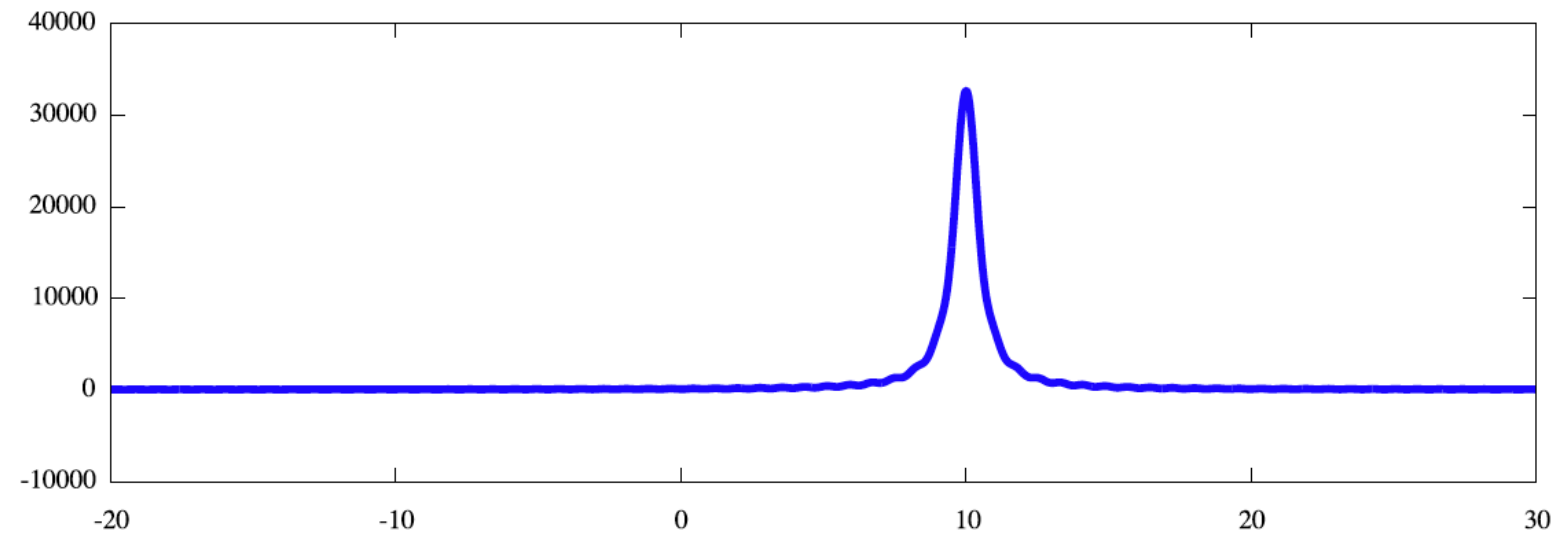
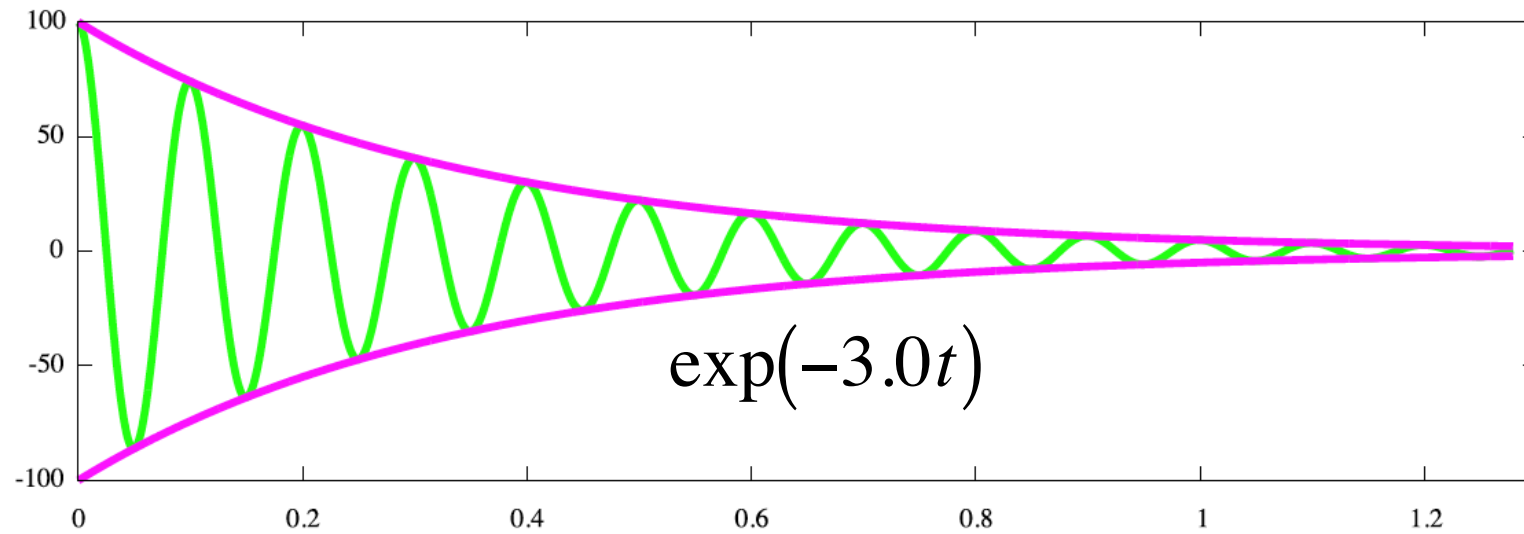
Window 関数の適用

FID の右端に値が残っていると ...



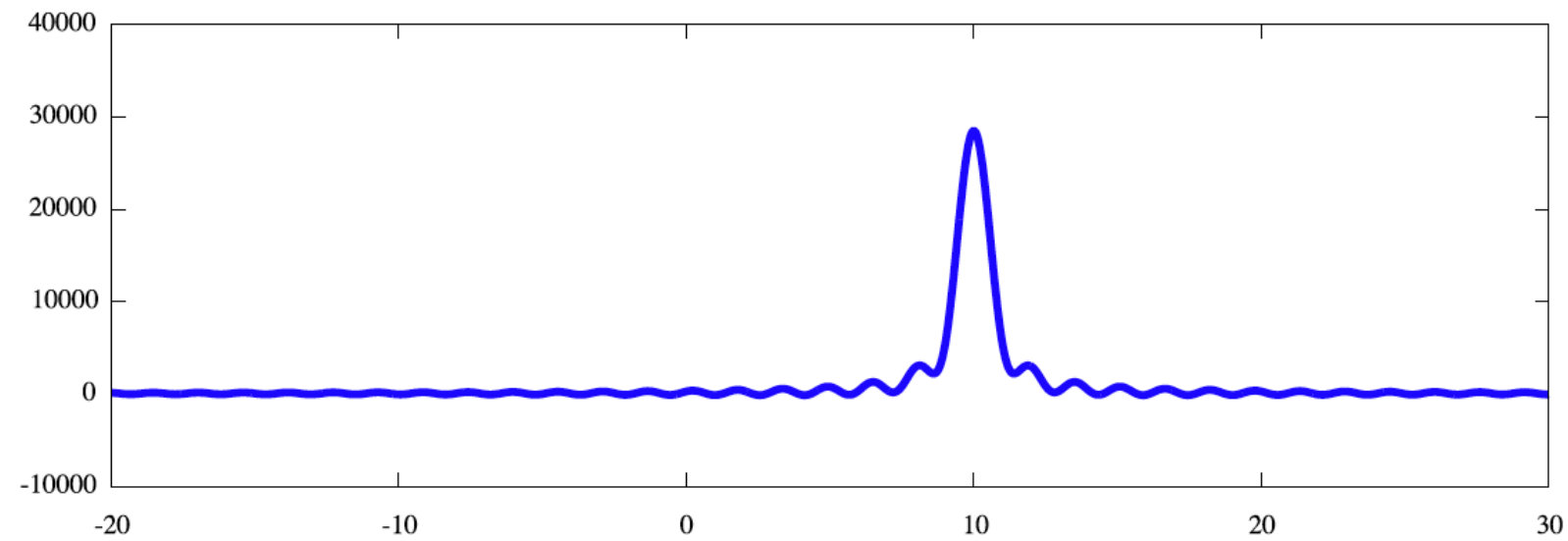
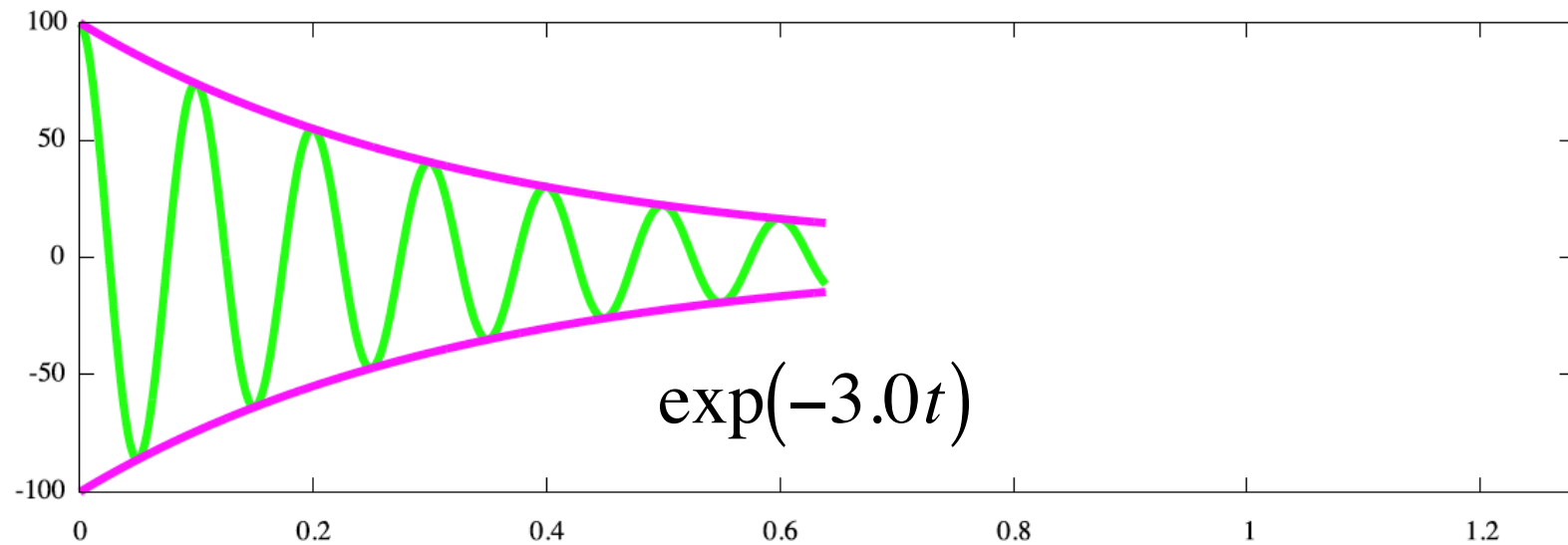
フーリエ変換後に wiggle (波) が出てしまう。

FID の右端が0になるように整形すると ...



フーリエ変換後に wiggle (波) は消える。

FID の長さを半分にして、同じ window をかけると ...

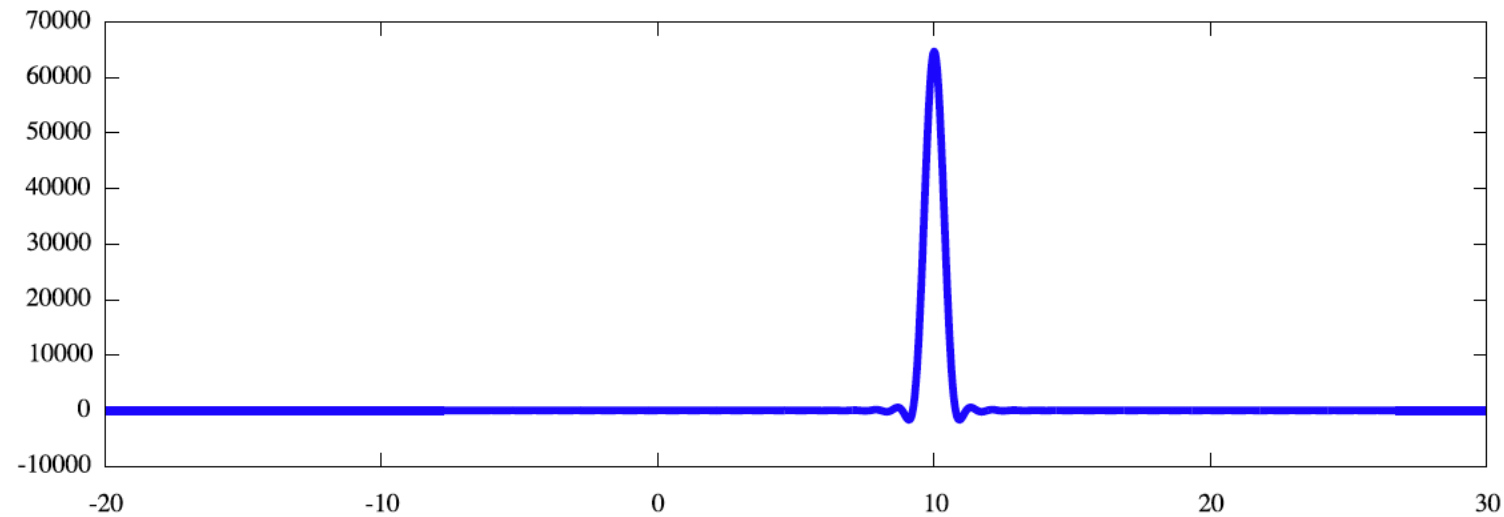
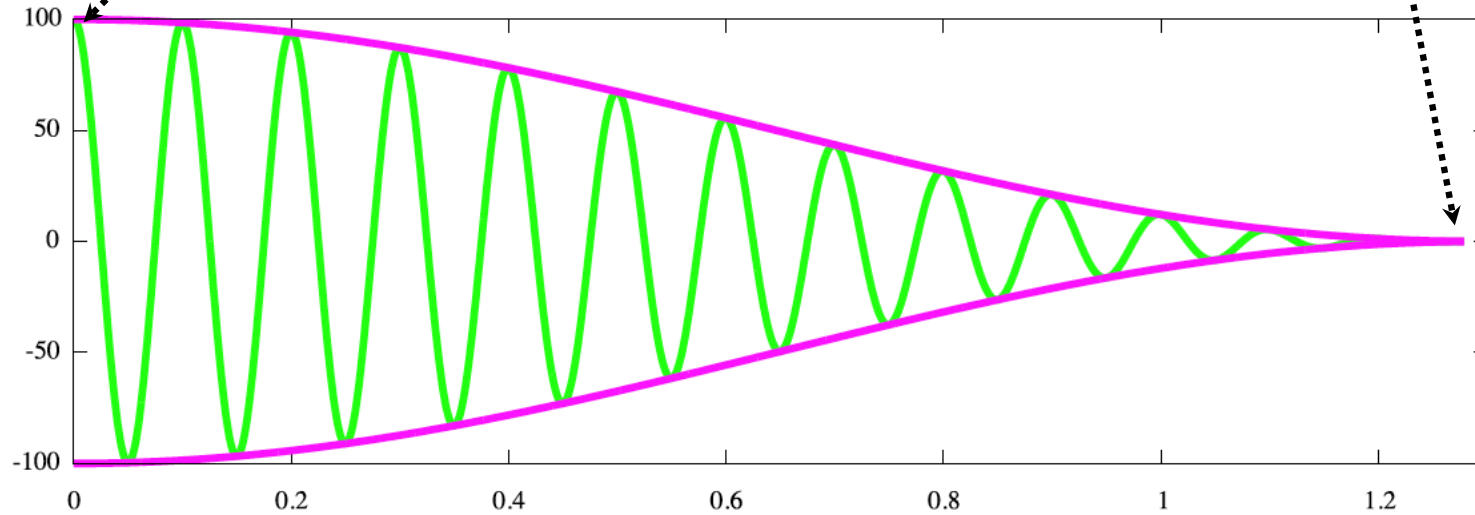


再び wiggle (波)が出てしまう。

\sin^2 (\cos^2) window 関数はなかなか便利

$$\sin^2(0.5\pi) = 1$$

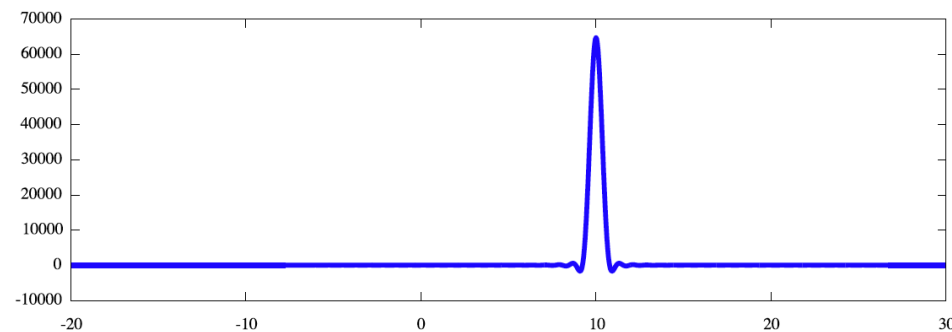
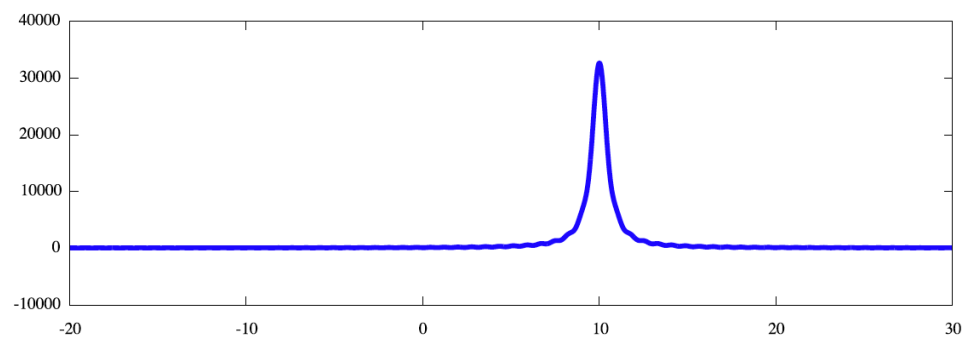
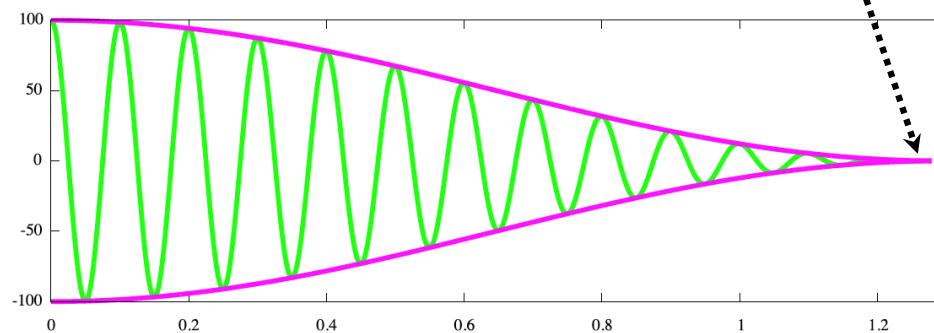
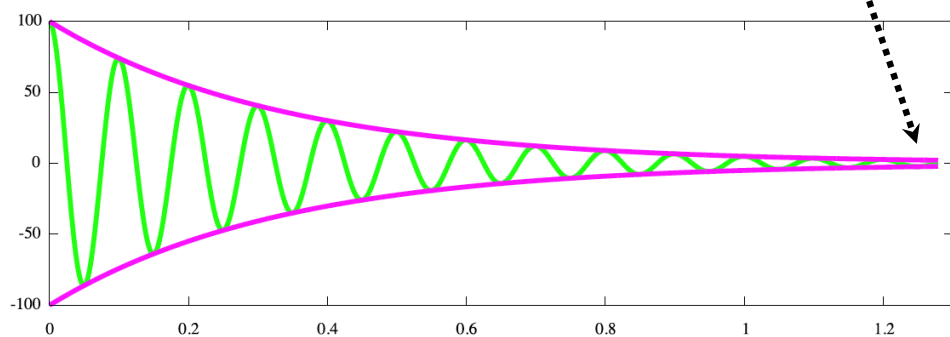
$$\sin^2(0.99\pi) = \frac{1}{1000}$$



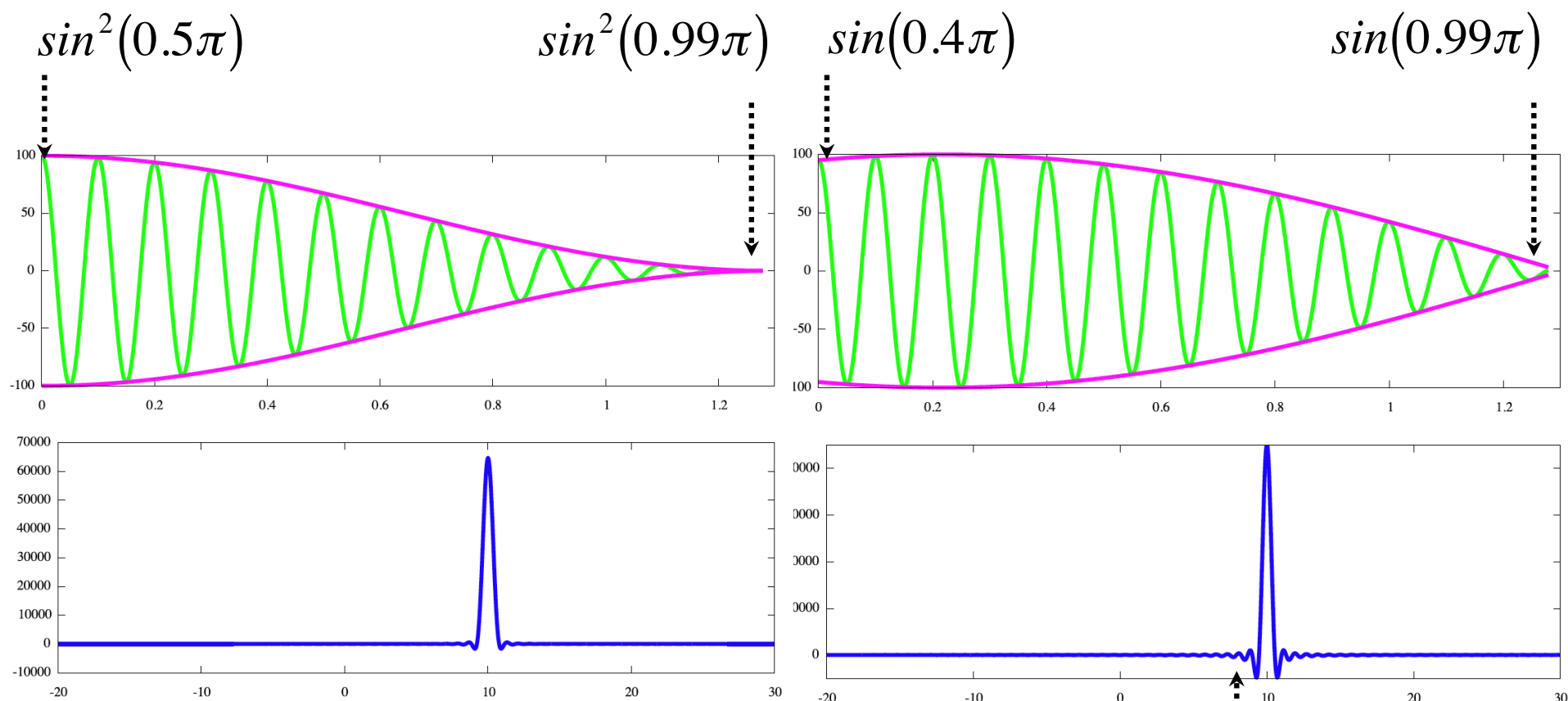
\sin^2 (\cos^2) window 関数は、
線幅もそれほど広げない。

$$\exp(-3a_q) = 0.02$$

$$\sin^2(0.99\pi) = \frac{1}{1000}$$



ポイント数の少ない間接測定軸には、
sin (*cos*) window 関数を使えば、
分解能をそれほど落とさずに済む。

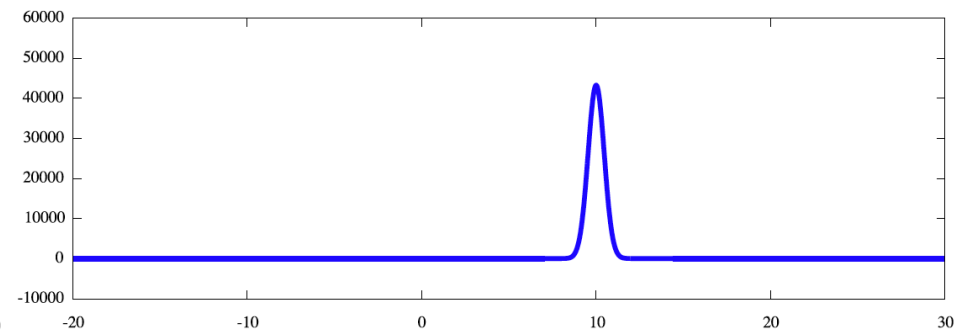
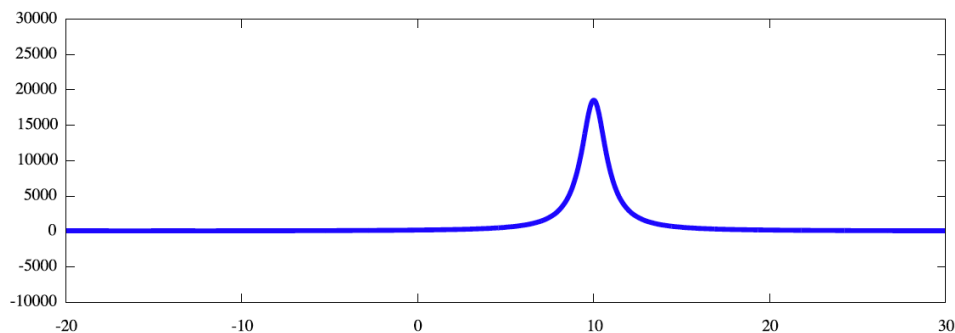
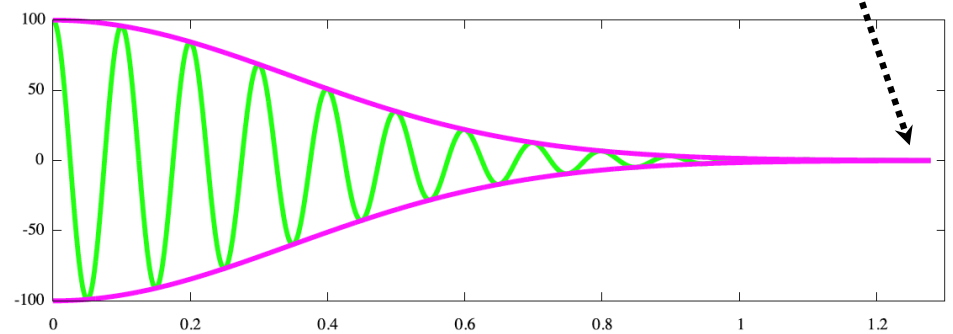
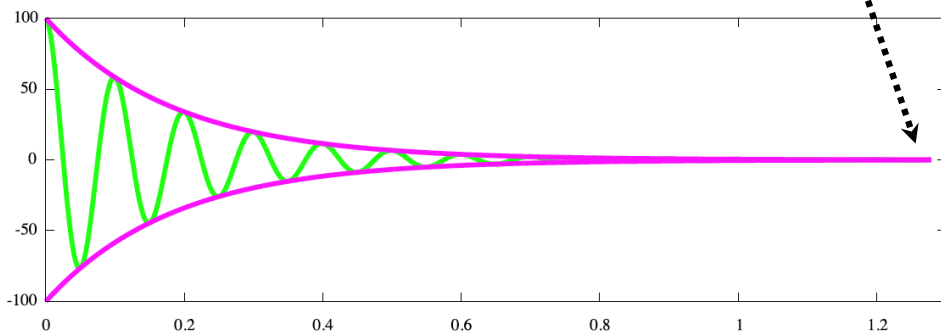


しかし、着地が急激な分、少し wiggle が ...

Lorentz-to-gauss window 関数を使えば、
裾野が尾を引かない。

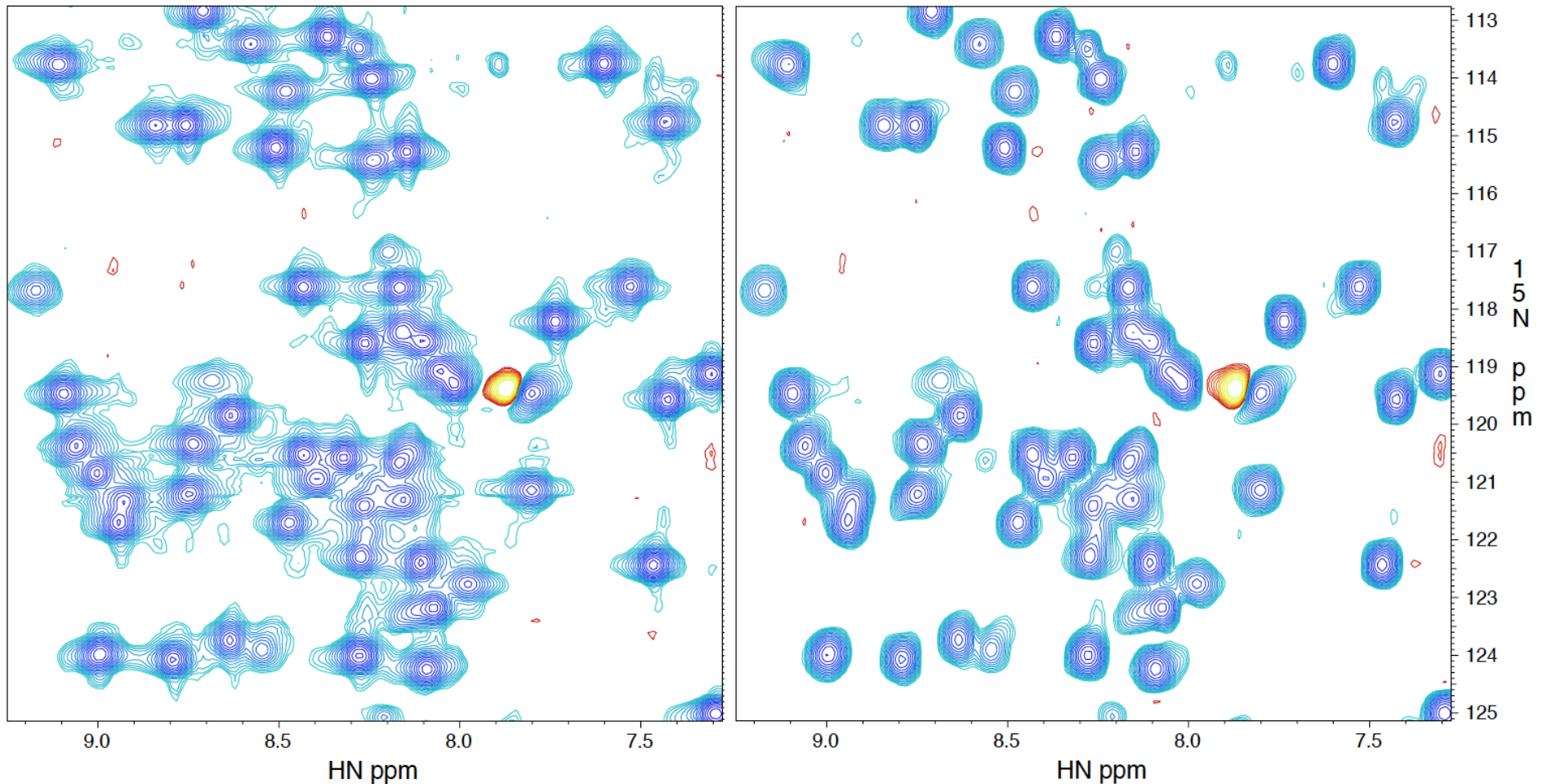
$$\exp(-5.4a_q) = 0.001$$

$$\exp\left(+R_2a_q - \frac{\sigma^2}{2}a_q^2\right) = 0.001$$



分解能が向上した交換条件として、少し感度を失う。

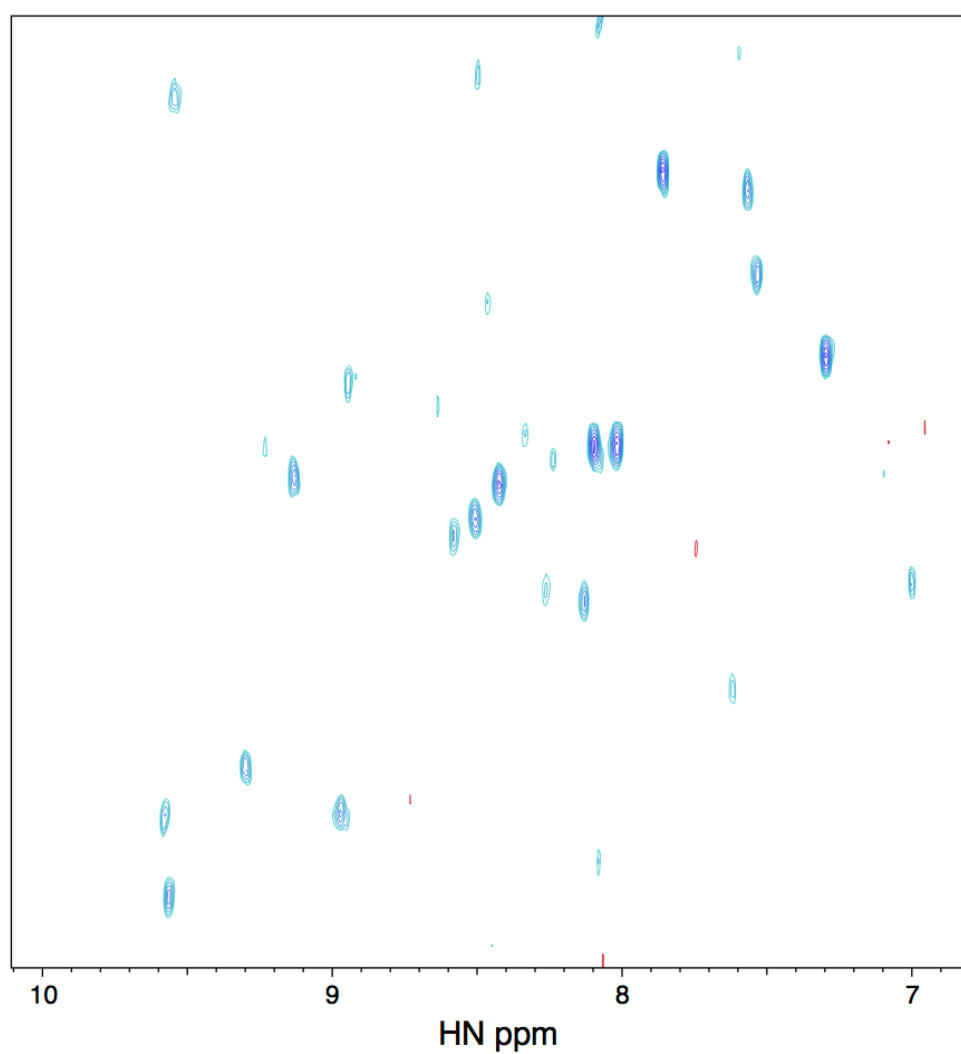
感度が許せば、lorentz-to-gauss window 関数は \cos^2 window 関数よりもよい。



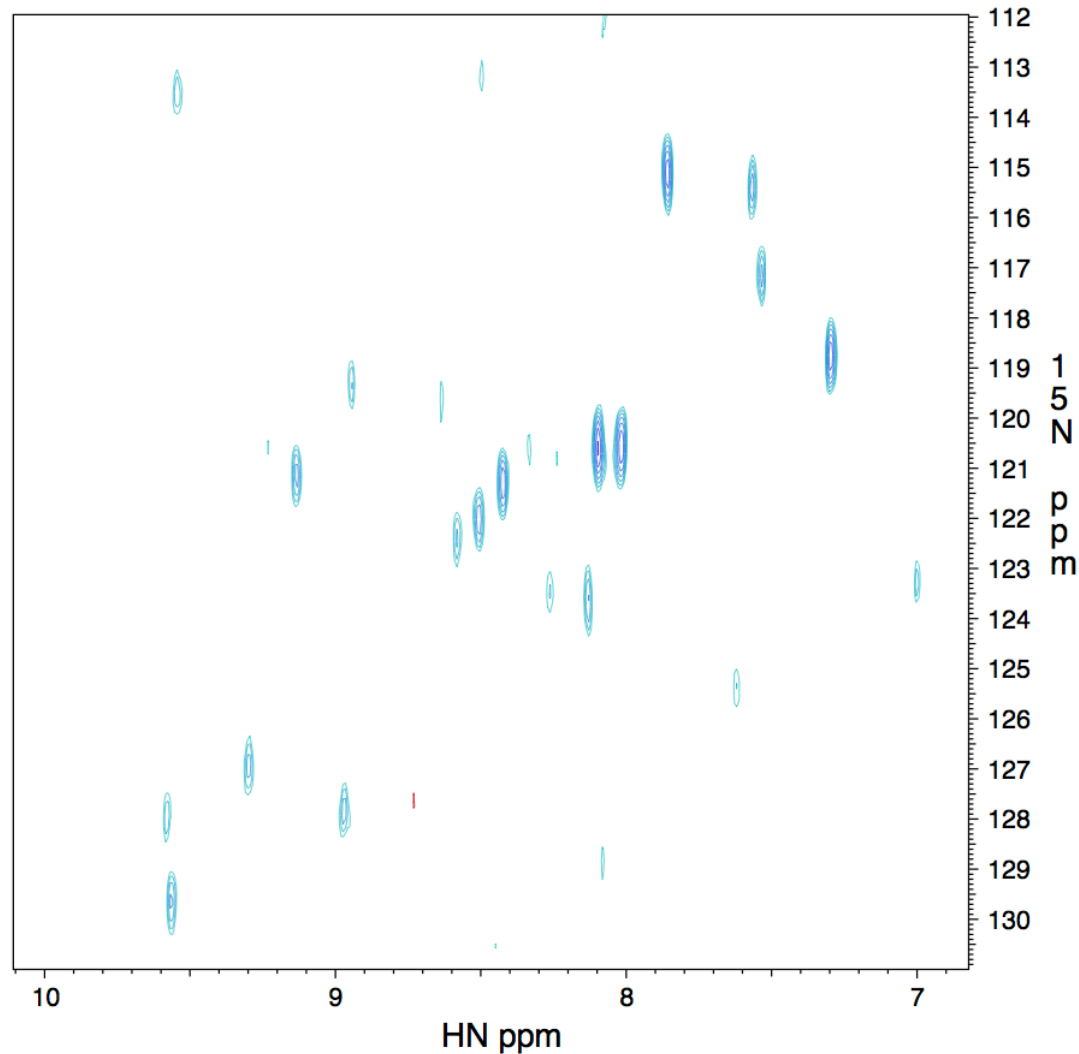
$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 次元ともに $\cos^2(q\sin)$ ともに Lorentz-to-gauss exponential-window (em) では 特に注意が必要

三次元測定では両方の間接測定軸に linear prediction を使ってみよう。

3D HNCACB の $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 平面



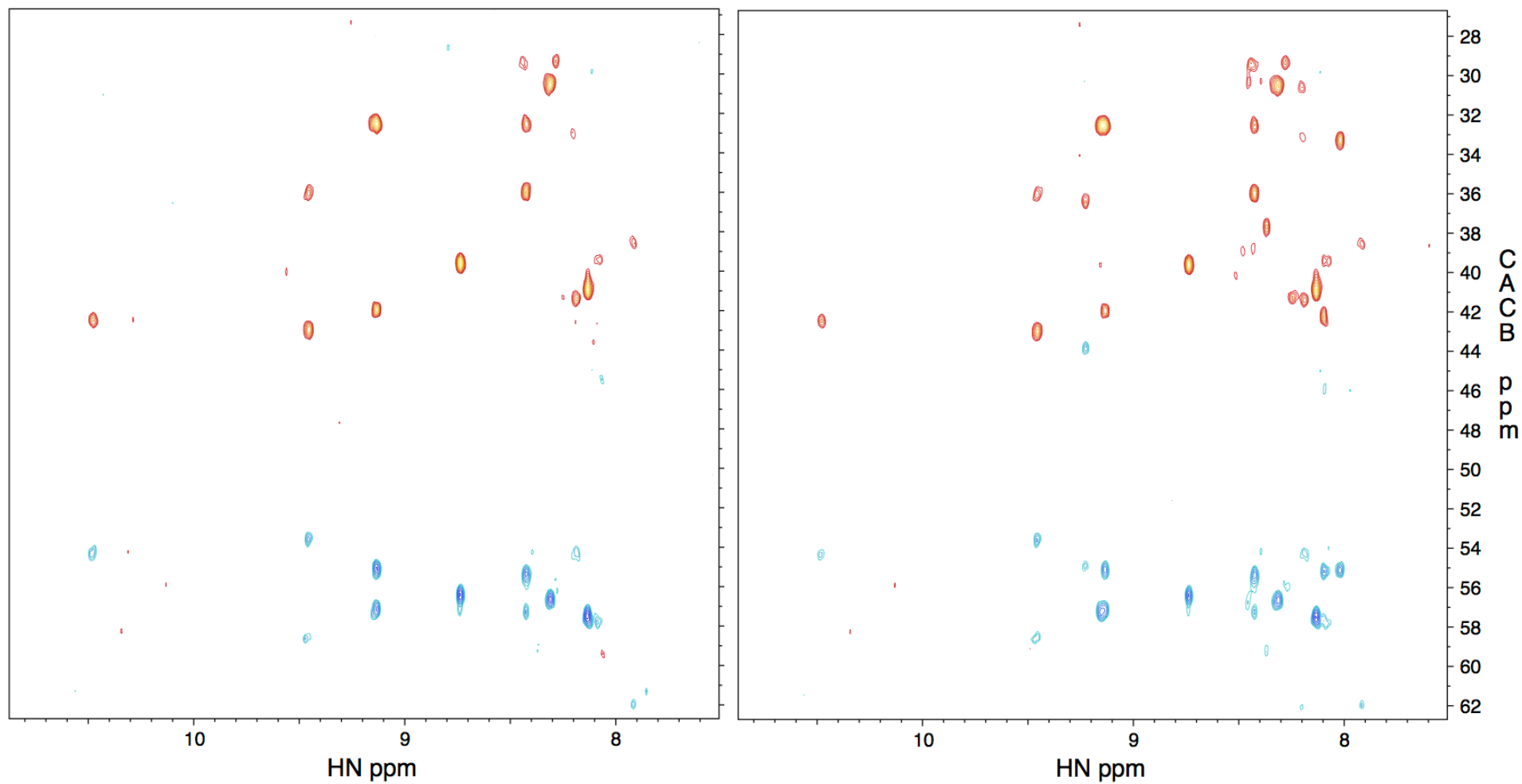
$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 両軸に LP



^{13}C 軸だけに LP

LP をかけた次元は同じように見えるはずなのだが

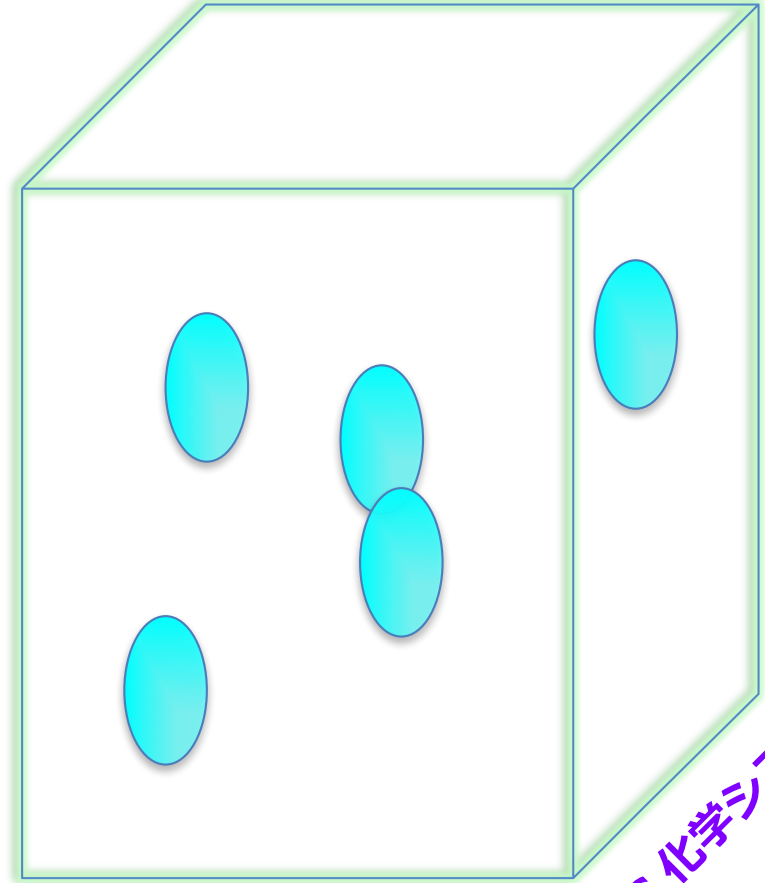
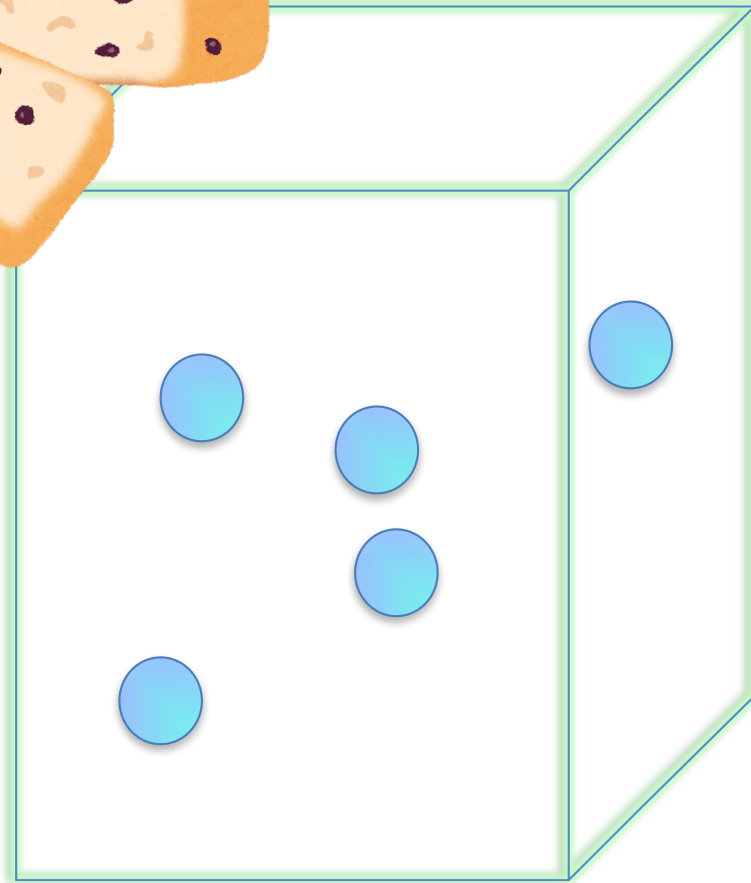
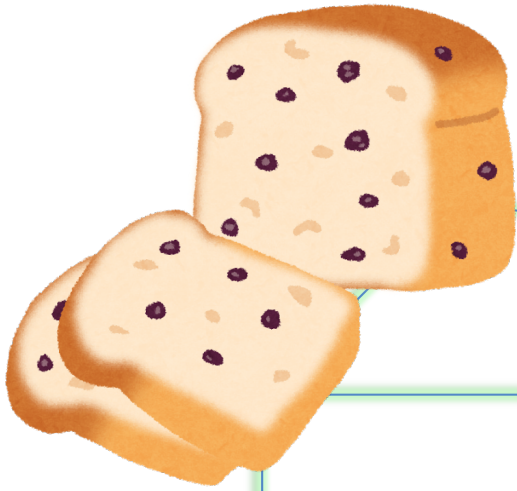
3D HNCACB の $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 平面



$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 両軸に LP

^{13}C 軸だけに LP

叩いて縦に引き延ばした干し葡萄の入ったパン



^{15}N 化学シフト

^1H 化学シフト

^{13}C 化学シフト

「葡萄がたくさん！」と喜んでいてはいけない。
水分を含んで伸びきった葡萄でもよいのか？

```
xyz2pipe -in fid/test%03d.fid -x -verb          ㊦
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.0 -pow 2 -c 1.0  ㊦
| nmrPipe -fn ZF -size 2048                      ㊦
| nmrPipe -fn FT                                ㊦
| nmrPipe -fn EXT -x1 5.5PPM -xn 11.2PPM -sw     ㊦
| nmrPipe -fn PS -p0 101.0 -p1 0.0 -di          ㊦
| pipe2xyz -out ft/temp%03d.DAT -ov -x          ㊦
```

```
xyz2pipe -in ft/temp%03d.DAT -y -verb          ㊦
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.95 -pow 1 -c 1.0  ㊦
| nmrPipe -fn ZF -auto                            ㊦
| nmrPipe -fn FT                                ㊦
| nmrPipe -fn PS -p0 -90.0 -p1 180.0 -di        ㊦
| pipe2xyz -out ft/temp%03d.DAT -y -ov -inPlace  ㊦
```

```
xyz2pipe -in ft/temp%03d.DAT -z -verb          ㊦
| nmrPipe -fn LP                                ㊦
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.0 -pow 2 -c 1.0  ㊦
| nmrPipe -fn ZF -size 256                      ㊦
| nmrPipe -fn FT                                ㊦
| nmrPipe -fn PS -p0 -90.0 -p1 180.0 -di        ㊦
| pipe2xyz -out ft/temp%03d.DAT -z -ov -inPlace  ㊦
```

```
xyz2pipe -in ft/temp%03d.DAT -y -verb          ㊦
| nmrPipe -fn HT -ps90-180 -auto                ㊦
| nmrPipe -fn PS -inv -hdr                      ㊦
| nmrPipe -fn FT -inv                          ㊦
| nmrPipe -fn ZF -inv                          ㊦
| nmrPipe -fn SP -inv -hdr                     ㊦
| nmrPipe -fn LP -ps90-180 -auto               ㊦
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.0 -pow 2 -c 1.0  ㊦
| nmrPipe -fn ZF -size 128                    ㊦
| nmrPipe -fn FT -neg                          ㊦
| nmrPipe -fn PS -p0 -90.0 -p1 180.0 -di      ㊦
| pipe2xyz -out ft/temp%03d.DAT -y -ov -inPlace  ㊦
```

```
xyz2pipe -in ft/temp%03d.DAT -x -verb          ㊦
| nmrPipe -fn POLY -auto                       ㊦
| pipe2xyz -out ft/temp%03d.DAT -x -ov -inPlace  ㊦
```

```
xyz2pipe -in ft/temp%03d.DAT -y -verb          ㊦
| pipe2xyz -out ft3/HNCBCA%03d.DAT -z -ov
```

```
xyz2pipe -in ft3/HNCBCA%03d.DAT -x > hncacb.ft
```

13C/15N 軸の LP の方法

1H 軸を FT (baseline 補正はしない方が
良いかも)

13C よりもデータ数の少ない 15N 軸に軽く
window をかけて FT

13C 軸を LP して FT

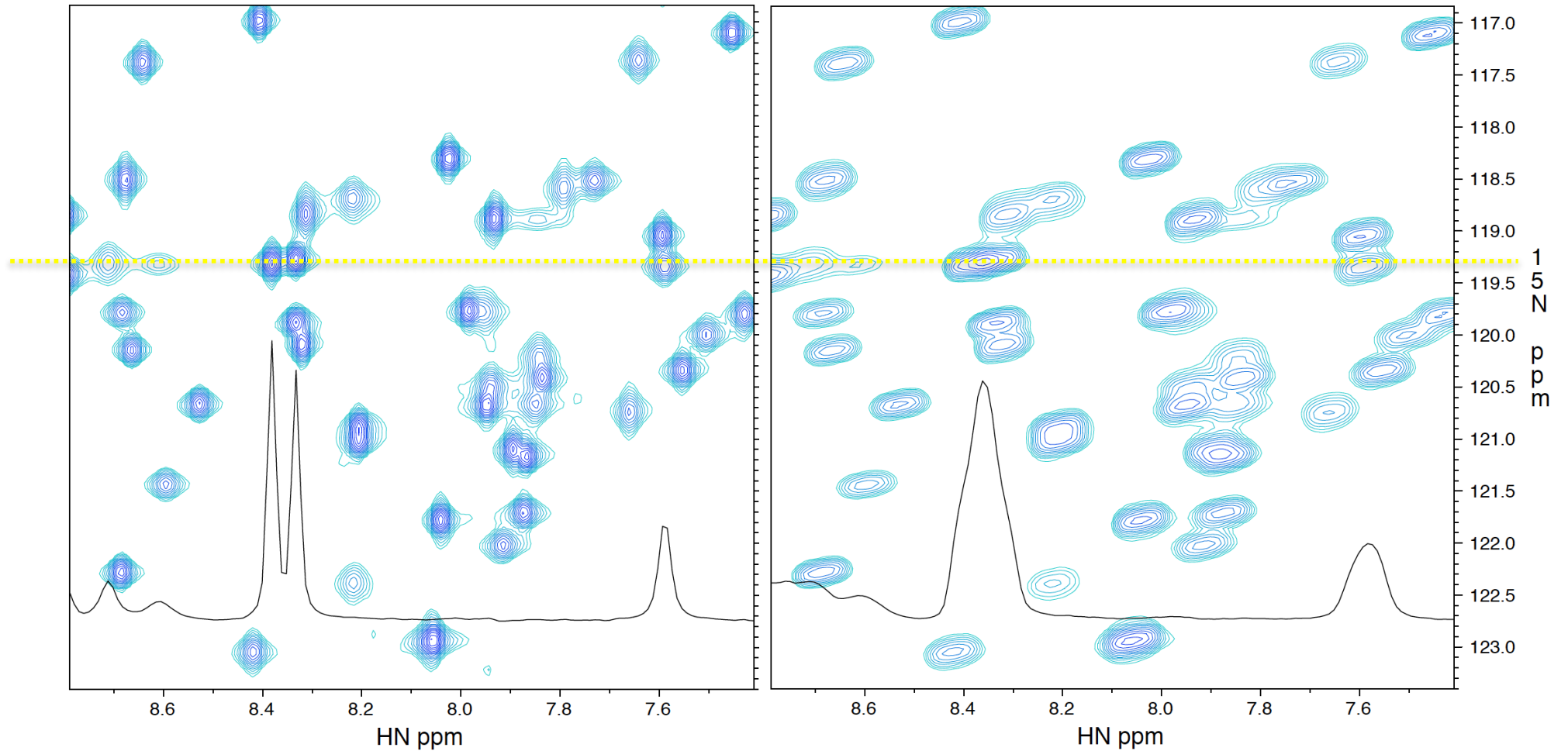
15N 軸を 1/FT

15N 軸 (constant-time) に鏡像 LP して
FT

1H 軸の baseline 補正

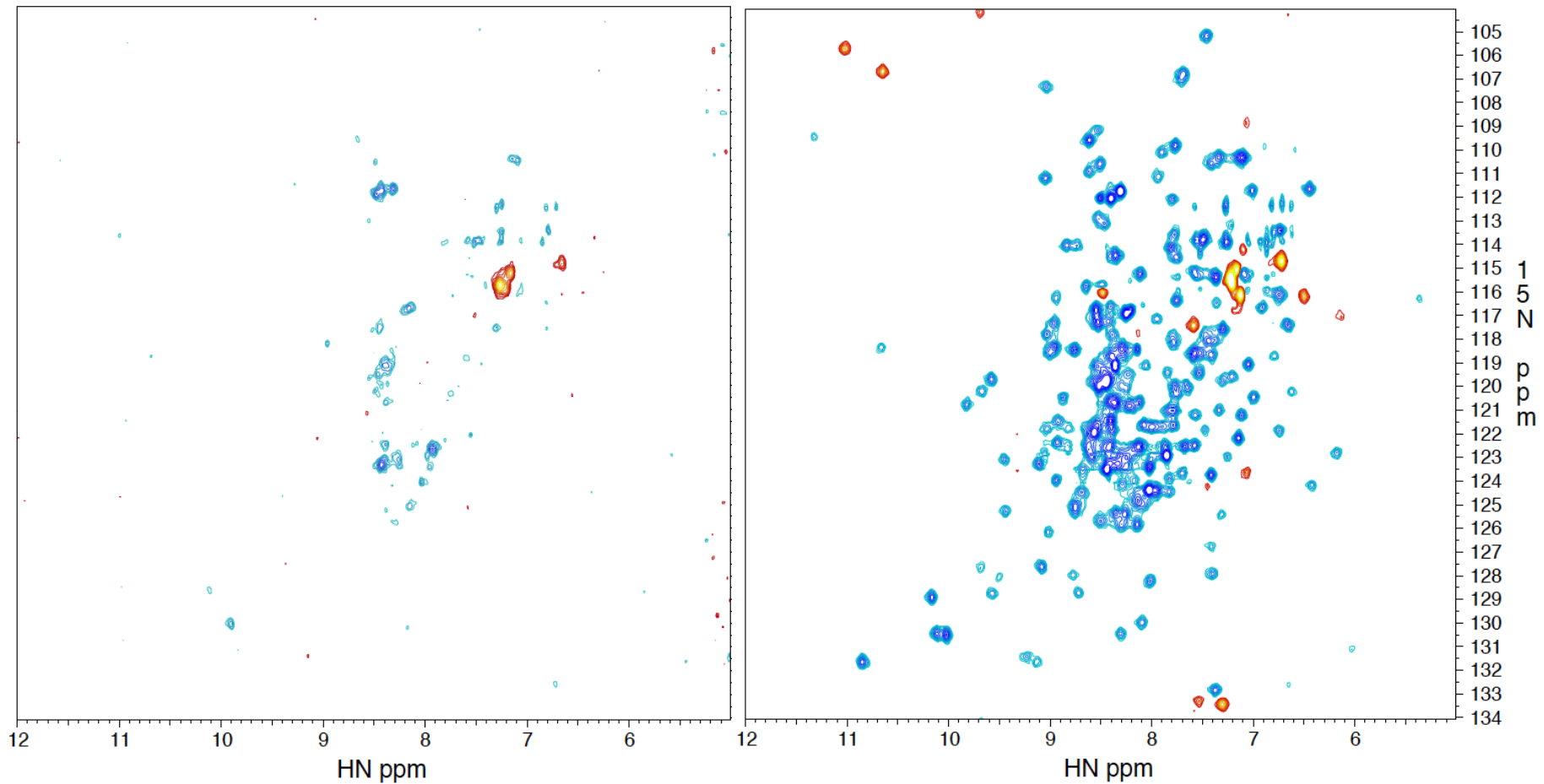
z-シムさえきっちり合わせれば x, y 方向のシムは適当でよい？

x, y シムを 2,700 unit ずつずらすと



グラジエントシムのマップは更新されている？ どの位の頻度で？

こうなってしまうと NMR だけの力ではどうしようもない。。。。

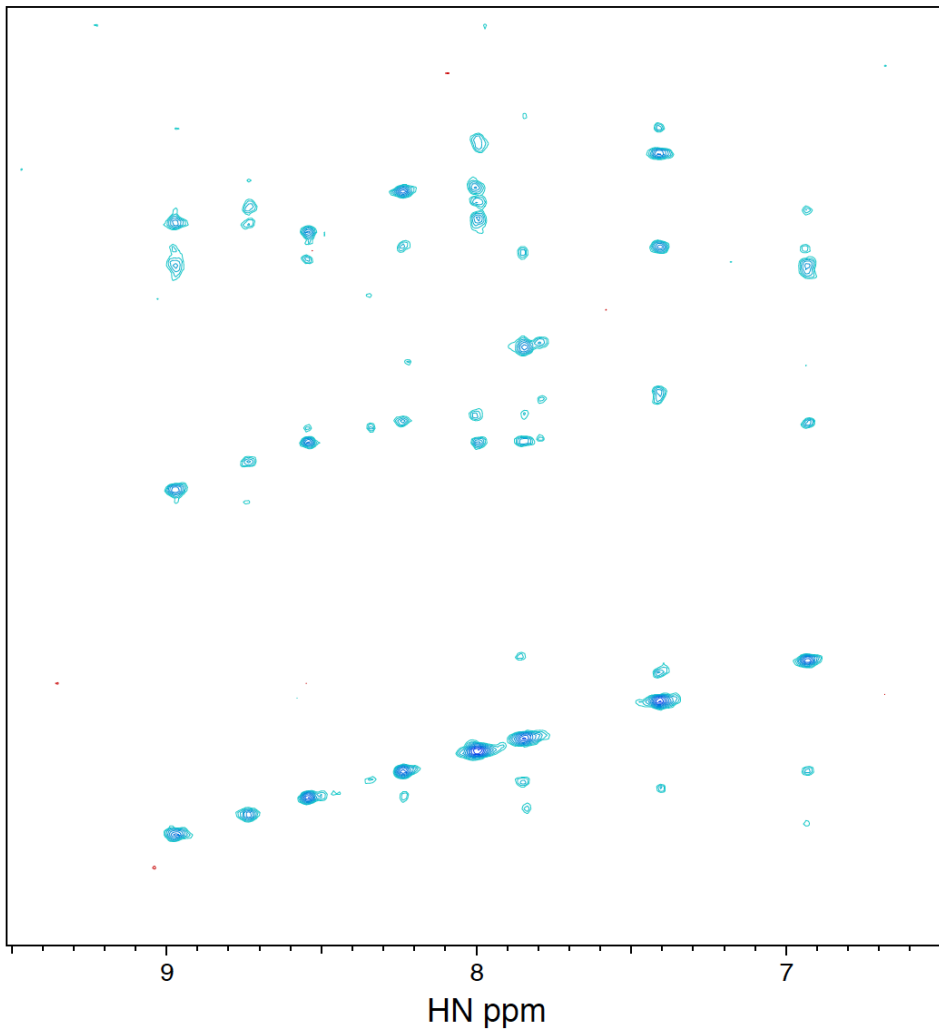


100 μM ^{15}N -labeled in 20 mM Na-Pi (pH 6.0) and 10% D_2O

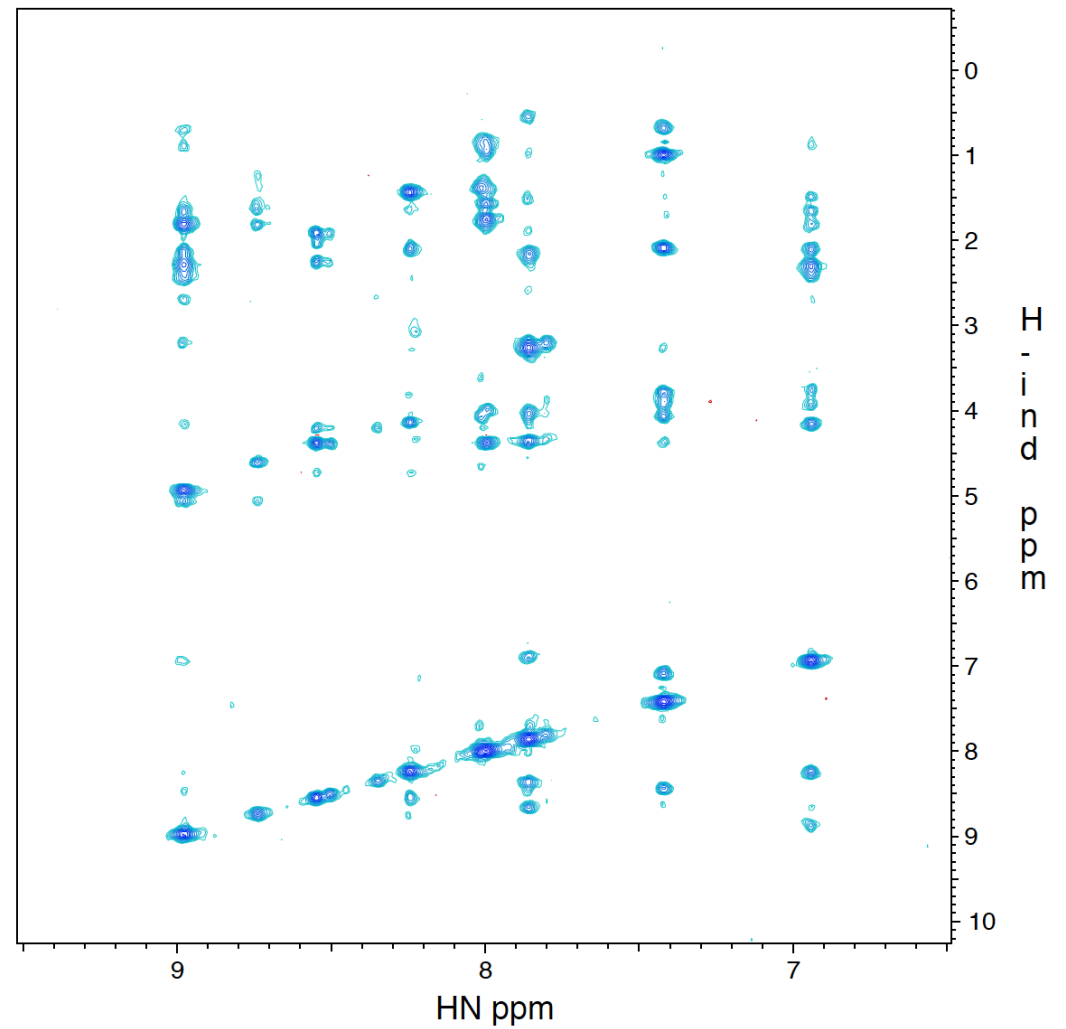
170 μM ^{15}N -labeled in 20 mM Na-acetate (pH 4.0) and 10% D_2O

2D FHSQC-TROSY wfb and WG at 298K on 400MHz (1024* x 128*)

わあーさすが !!



¹⁵N-edited NOESY
on 600 MHz (room-temp. probe)



¹⁵N-edited NOESY
on 800 MHz (cryogenic probe)

パルスのパワーって何？

どうも ^{15}N の decoupling が強過ぎて、試料の温度が上がってしまうようだ。それにプローブも壊れそう。

pcpd3 (@90°) = 150 μs を 300 μs に延ばそう。そして、その分のパワーを減らそう。

$$150 \mu\text{s} : 10^6 / (150 * 4) = 1666.7 \text{ Hz (@ } x \text{ dB)}$$

$$300 \mu\text{s} : 10^6 / (300 * 4) = 833.35 \text{ Hz (@ } (x+6) \text{ dB)}$$

$$\text{RF-磁場強度}_{p2} = 20 * \log_{10} (\text{パルス長}_{p2} \div \text{パルス長}_{p1}) + \text{RF-磁場強度}_{p1}$$

RF-磁場強度 ($\omega = -\gamma B_1$) は電圧に比例



電力 (ワット, W) は、電圧 (ボルト, V) の二乗に比例する。

$$0.1 \text{ W} = 10 \text{ dBW}$$

$$1 \text{ W} = 0 \text{ dBW}$$

$$10 \text{ W} = -10 \text{ dBW}$$

$$100 \text{ W} = -20 \text{ dBW}$$

$$200 \text{ W} = -23 \text{ dBW}$$

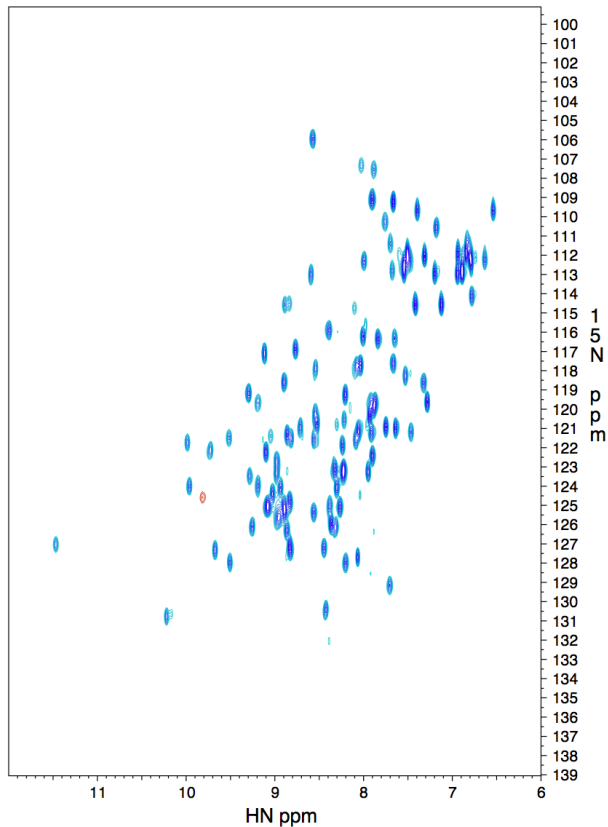
$$400 \text{ W} = -26 \text{ dBW}$$

RF-磁場強度 (V, パルス長から計算) が半分になれば 6 dB 足す。
電力パワー (W) が半分になれば 3 dBw 足す。

^{15}N の decoupling の pcpd3 (@90°) = 150 μs を 300 μs に延ばせば、プローブへの負担は 1/4 になる。

Decoupling の 90° パルス長は幾らに？ - ¹⁵N 編 -

我が家に 600 MHz が入ってきた。さあ 2D ¹H-¹⁵N HSQC から始めよう。でも、FID の最中の ¹⁵N-decoupling の 90° パルス長 (pcpd3) は幾らにすればいいの？



¹⁵N saturation の範囲

= 118 ± 16 ppm

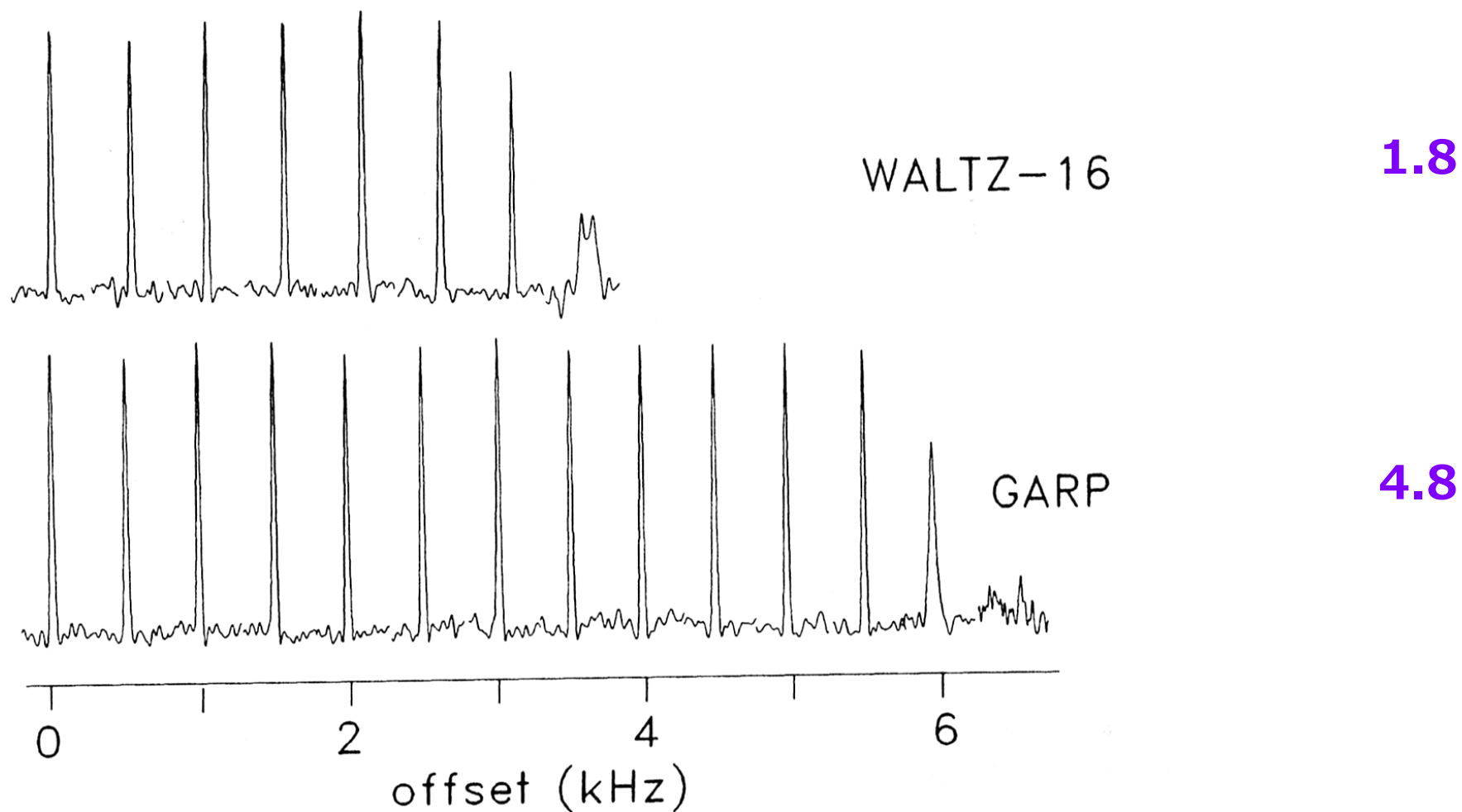
→ 32 ppm * 600MHz * 0.1013 = 1,945 Hz

WALTZ-16 の figure of merit : 1.8

→ RF-field : 1,945/1.8 = 1,081 Hz

pcpd3 = 10⁶/1,081/4 = 231 μs (@ 90°)

figure of merit
性能指数



2,300 Hz (@ $\tau_{90} = 109 \mu\text{s}$) で decoupling した場合

Decoupling の 90° パルス長は幾らに？ - ¹³C 編 -

なんだ簡単だね。それじゃ Tnpk 研に入ってきた 950MHz もついでに計算してあげよう。2D ¹H-¹³C HSQC の ¹³C-decoupling の 90° パルス長 (pcpd2) は幾らにすればいいのかな？

¹³C saturation (aliphatic) の範囲

= 41 ± 40 ppm

→ 80 ppm * 950MHz * 0.2514 = 19,106 Hz

GARP-4 の figure of merit : 4.8

→ RF-field : 19,106/4.8 = 3,980 Hz

pcpd2 = 10⁶/3,980/4 = 63 μs (@ 90°)

注意書きに「55 μs より強くは絶対に打つな！」と書いてある。ぎりぎりだったね。あれ？でもそれじゃ、芳香環も同時に観れないよ～。

世界最高級の NMR マシンは F1 マシンの様



本当は F1 マシンに 20 人ほどのピットクルーが集まって大急ぎで仕事をしている場面の写真

He 蒸発費	3.7 hr/L
¹ H 最高感度	12,000
本体価格	9 億円
年間維持費	2,500 万円
管理者	0.2 人

燃費	3 km/L
最高速度	415 km/h
車体価格	9 億円
年間維持費	400-600 億円
ピットクルー	20 人