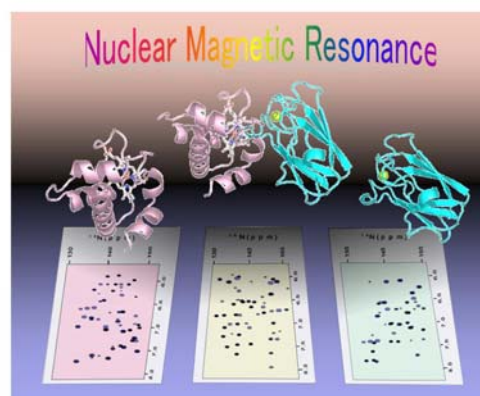


|          |                    |
|----------|--------------------|
| ディビジョン番号 | 8                  |
| ディビジョン名  | 生体機能関連化学・バイオテクノロジー |

|     |                |
|-----|----------------|
| 大項目 | 1. 生体機能関連化学    |
| 中項目 | 1-9. 構造生物化学    |
| 小項目 | 1-9-4. NMR構造解析 |

#### 概要

NMR測定技術、安定同位体標識技術などの発展により、分子量約67万のタンパク質の立体構造の決定と内部運動の解析が可能となった。分子の回転拡散運動に異方性を強制的に付与した際に観測される残余双極子相互作用定数が、立体構造の精密化に利用されるようになった。また、水素結合を介したスピンスピン結合定数の測定法が開発され、水素結合のドナーとアクセプター間での電子的相互作用の解析が可能となった。



#### 現状と最前線

NMRが、これほどまでに多くの研究に適用される理由は、単にすべての分光法の中で最も多くの情報を与える手法であるということだけではない。その誕生以来の不断かつ飛躍的な発展により、化学研究におけるNMRの有用性と可能性が益々拡大していることにも因る。急速な発展を継続しているNMR構造解析の将来予測は容易ではないが、現在から遡って約10年間における発展を概観することにより、現状と最前線を紹介すると共に、展望の一助とする。

NMR構造解析は、分子の立体構造、電子構造、内部運動に関する定量的な情報を与える。条件さえ揃えば、分子量67万のタンパク質の溶液中での立体構造の決定と機能に重要な内部運動のタイムスケールも解析できることが示されている。高分子のNMR構造解析では、相関時間の増大に伴う横緩和時間 ( $T_2$ ) の短縮が大きな障害となる。 $T_2$  が短いとシグナルの線幅は増大するので、シグナルの検出感度と分解能の低下を引き起こすと同時に、多次元NMRに重要なコヒーレンス移動の効率も低下する。これらの問題を克服して、高分子の多次元NMRシグナルの検出感度を向上させるために、 $T_2$  が相対的に長いコヒーレンスを選択的に検出するTROSY (Transverse relaxation optimized spectroscopy) 法が開発された。また、構造解析の新手法として、交差緩和 (Cross relaxation) を利用したペプチド主鎖二面角の決定法や水素結合を介したスピンスピン結合定数 ( $J$  値) の測定法なども開発された。水素結合を介した  $J$  値の測定は、水素結合に関与するドナーとアクセプター間での電子的相互作用の存在を実証することと等価であり、水素結合形成の直接的な証明として利用されている。

共鳴現象を利用するNMRによる構造解析の手法は、回折を利用して原子座標を実験的に決定するX線結晶構造解析法とは根本的に異なり、立体構造は実験結果から計算により求められる。タンパク質、核酸などの生体高分子の立体構造をNMRにより求める場合、シグナル帰属や構造計算に多大な時間と労力を要するため、これらの自動化、高速化を支援するソフトウェアの開発が活発に行われている。また、得られる立体構造の精密化のために、試料溶液に液晶などを加えて分子の回転拡散運動に異方性を強制的に付与した際に観測される残余双極子相互作用定数(Residual dipolar coupling (RDC))を利用する手法も開発された。RCDは、ピコ秒からミリ秒のタイムスケールの内部運動の解析にも有用であることが示されている。ところで、NMRにより求められる生体高分子の立体構造は統計平均であり、その構造に基づいて分子の機能をすべて解明できるとは限らない。そこで、高圧下での測定や核磁気緩和時間の詳細な解析から、存在割合は微量だが、分子の機能に密接に関わると考えられる立体構造の検出やキャラクタリゼーションを行う手法が提唱された。

NMRの検出感度の向上を目指した研究も目覚ましい進展を遂げている。感度は信号と雑音の比を指標として考えることができるので、信号の増大だけでなく、雑音の減少も感度の向上に寄与する。NMRシグナルの検出コイルを25 K程度の極低温にして熱雑音を抑える低温プローブが普及するようになった。一方、信号の増大に向けては、不対電子スピンの大きな磁化を核スピンの移す様々な手法が研究されている。また、高磁場マグネットの開発は<sup>1</sup>Hの共鳴周波数で1 GHzへの到達が目前である。<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>Nなどの天然存在比が低い核種のシグナル検出に利用される安定同位体標識の技術の発展も目覚ましい。無細胞タンパク質合成技術が開発され、添加したアミノ酸をそのままタンパク質合成に導入することが可能になったため、タンパク質中の任意のアミノ酸を選択的に標識することができるようになった。立体特異的に標識されたアミノ酸を合成する技術が開発され、スペクトルの分解能も飛躍的に向上した。固体NMR測定技術では、65 kHzの高速マジック角試料回転が達成され、双極子相互作用などの異方性によるシグナルの広幅化の低減に利用されている。また、多次元NMRの測定時間を大幅に短縮するProjection reconstruction法などが開発され、単位測定時間当たりの検出感度が向上した。

#### 将来予測と方向性

- ・ 5年後までに解決・実現が望まれる課題  
反応中間体など短寿命かつ低濃度の分子種の立体構造とダイナミクスの解析法の確立  
分子量7万程度のタンパク質およびタンパク質複合体の立体構造解析手法の整備
- ・ 10年後までに解決・実現が望まれる課題  
不対電子スピンを利用してNMRシグナルの検出感度を向上させる手法の汎用化  
生きた細胞中における生体高分子の直接解析技術の開発

#### キーワード

コヒーレンス移動、残余双極子相互作用定数、安定同位体標識、無細胞タンパク質合成技術、高速マジック角試料回転

(執筆者：山本泰彦)