

分子運動と脳機能 —21世紀の創薬，遺伝子療法，再生医学への NMR, MRI の応用—

桑田 一夫

岐阜大学医学部生理学第二講座

はじめに

NMR は 20 世紀初頭，MRI は 20 世紀後半に開発され，それぞれ飛躍的な発展を遂げてきた。今や両者は，生命科学，医学・医療にとって不可欠の手段となっている。さて，その隆盛は 21 世紀も継続するだろうか？ 筆者は，Yes と考える。

その理由は幾つかある。まず，NMR, MRI は核スピンの物理学に基づく計測手段であり，新しい医療手技が登場しても，それに合わせて，開発・改良が可能である。また，観測対象である核スピンの振舞いは量子力学原理に基づいて記述できる。したがって，他の分子生物学的手段と異なり，物理的な部分を生物学的な部分と切り離して論じることができる。また，他の手段に比べ，生物に対する侵襲が格段に少ないという特質がある。更に細かく述べると，

1. 周波数軸で見たとき，核の置かれた電子環境の違いが，化学シフトの差となる。分子量が比較的小さい生体高分子では，したがって，原子レベルでの分解能を与える。ほとんどの生物機能にとって，原子レベル分解能での情報が必要にしてかつ十分である。例えば，原子核内の情報は生物にとっては日常的に必要なもので

はない。また，電子状態は基本的に原子核の位置によって瞬時に決まるので，原子核の位置が決定的な役割を果たす。不対電子の状態は電子スピン共鳴（EPR）によって観測可能であるが，核スピンと電子スピンの間で選択的な磁化移動を行うことが可能なので，将来は電子スピン情報も NMR 情報に取り込める，と考えられる。

2. 原子核間の距離情報とダイナミクス情報とを与える。スカラー相互作用や双極子相互作用は原子核間の距離情報とダイナミクス情報とを含んでいる。また，原子核間の距離情報とダイナミクス情報とは本質的に分離可能である。これらの情報を基に計算機シミュレーションを行うことにより，蛋白質や核酸等の生体高分子の溶液内立体構造や構造揺らぎの計測（ピコ秒からミリ秒のオーダーまで）が可能となっている。こういった情報はデザインされた外来化学物質による系統的な生体高分子制御（創薬）を可能にしている。

3. MRI 情報は本来，核スピンに由来するが，画像自体が原子核レベルの空間分解能をもっている訳ではなく，各ピクセルの値はそれがカバーする空間に存在する原子核からの寄与の総和である。そのため，原子核の環境が一樣

キーワード off-resonance irradiation, prion disease, functional MRI, gene therapy, tissue engineering

であれば、コントラストはなく、イメージとしての情報は皆無に近い。そのため常磁性体を導入し、特定部位の原子核集団の緩和を速くすることにより、その周辺の信号をわざと消して情報を得ようとする。これがNMRとは異なる点で、NMRでは信号の線幅を狭くし、なるべく信号を分離し、よく見えるように工夫するという方向が主流である。ところがMRIでは信号を消すことにより、コントラストを得ようとする。この手法は初期のNMRでよく用いられた。しかし今ではNMRとMRIは、あたかも独立に発展してきたかのような観を呈する。したがって、現段階のMRIでは、できるだけ「選択的に信号を消す」ことが重要である。しかし、まさにこの方向にこそ、医学的に重要な応用の道が開けているのである。

4. 21世紀の医学・医療において、遺伝子治療や再生医学が重要になるだろうことはもはや疑いがない。20世紀のMRIは、緩和時間、BOLD効果、あるいは拡散定数といった内因的なパラメータを、MRIコントラストとして用いてきた。そのようなコントラストの特徴は、我々が既に十分見てきたとおりであり、その限界も肌で感じている。そのようなある意味で受動的なコントラストを用いていたのでは、新しい医学への応用は期待できない。今後は特定の遺伝子発現をMRIを用いてイメージングするような新しい医学応用が期待できる方法を開発すべきであろう。例えば、生化学領域において良く用いられる、培養細胞内での特定の発現蛋白の分布を見るためのGFP (green fluorescent protein) に類したりポーター蛋白の開発が重要であろう。

5. NMRでもその流れは相通ずるものがある。すなわち、生理的溶液条件下で測定できることは、もうほとんどやり尽くされた。あとは、昔のヒト・ゲノム・プロジェクトのように蛋白質構造プロジェクトを立ち上げ、機械と人

の数を増やし、ルーチン測定を繰り返し、大規模なデータベースを作成する作業が残っているだけである。これは重要ではあるが、残念ながら、21世紀の新しい展望は見えてこない。一方、赤坂らによって導入された「高圧NMR」は、新たなビジョンをさし示すものである。すなわち、試料に対して外部から摂動を加え、複数の蛋白質構造のポピュレーションをシフトさせる。そして、生理的条件下ではまれにしか存在しえない蛋白質構造を検出する。蛋白質の機能は必ずしも安定構造においてなされるとは限らない。安定構造は自由エネルギーが最も低い構造、つまり、基底状態である。基底状態において活性があるとすると、蛋白質は常に機能的状態にあり(短絡状態)、生体にとって必要な細かい調節が利かないように思われる。実際の酵素反応速度等(ほとんどミリ秒のオーダー)から考えると、基底状態では蛋白は機能をもたず、生理的条件下ではポピュレーションの低い励起状態又は活性化状態が存在し、そのまれな構造が、活性を有すると考えたほうが自然である。そのような、生物学的に意味のある活性化状態を検出するには、系に外部からできるだけ「自然」な摂動を加え、ポピュレーションを基底構造から活性化構造へとシフトさせる以外に方法がないのである。オフ・レゾナンス照射を用いたラジオ波による摂動も同様の考え方に基づいている。このように、系に外部から摂動を加えるという発想は、MRIの場合と不思議によく似ている。

私に与えられたテーマとして、NMRおよびMRIに応用が可能な、ラジオ波による摂動、オフ・レゾナンス照射、およびリポーター蛋白質開発に関して、第28回日本磁気共鳴医学会大会シンポジウム2「NMRと臨床計測法」で述べた内容をここにまとめる。

2001年1月16日受理

別刷請求先 〒500-8705 岐阜市司町40 岐阜大学医学部生理学第二講座 桑田一夫

I. ラジオ波による摂動

1. NMR

一次元の系に対する効果は、MRI との関連で第2節で述べる．ここでは、二次元以上の多次元 NMR スペクトルを対象にする．したがって、問題になるのは二つの核スピン、 k, l 間の磁化移動である．

(i) スカラー相互作用に対する効果

オフ・レゾナンス照射場においては、スカラー相互作用による遷移確率は相当低くなる (Fig. 1)¹⁾．これは、遷移確率が以下のように表現できるからである．

$$P_{kl}(\tau) = \frac{\Omega_R^2}{\Omega^2} \sin^2 \left(\frac{\Omega\tau}{2} \right) \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 Ω_R は Rabi 周波数 (カップリング定数とおおむね等しい．¹H では、0 から 18 Hz の間にある) で、 $\Omega = \Omega_R + \Delta^2$, $\Delta = \{(\omega_i - \omega_{RF})^2 + \omega_2^2\}^{1/2}$ である．また ω_i はスピンの共鳴周波数、 ω_{RF} は照射するラジオ波の周波数、 ω_2 はその強度を表す．(1)式から、オフ・レゾナンス周波数が増加すると、急激に遷移確率が下が

ることが分かる．つまり、オフ・レゾナンス照射場では、スカラー相互作用が弱くなり、ゼロ量子遷移もほとんど起きなくなることを意味している．

(ii) 双極子相互作用に対する効果

これに対し、双極子相互作用はかなり特徴的な変化を示す．オフ・レゾナンス照射場では、照射しているラジオ波と同じ周波数の回転系から見た場合、量子化軸は、静磁場の方向より β 度傾く (Fig. 2 参照)^{2),3)}．ここで、

$$\beta = \tan^{-1} \left(\frac{\omega_2}{\omega_i - \omega_{RF}} \right) \dots\dots\dots (2)$$

である．この量子化軸に沿う緩和は $T_{1\rho}^{off}$ と呼ばれ、この軸に垂直な平面内での緩和は $T_{2\rho}^{off}$ と呼ばれている (Fig. 2)^{2),3)}．この時、二つのスピン間の交差緩和速度は、以下のような式で表現される．

$$\sigma_{off} = \frac{1}{10} \hbar^2 \frac{\gamma^4}{r_{kl}^6} \times \left\{ \frac{|(\omega_k - \omega_{RF})(\omega_l - \omega_{RF})| \sigma_{NOE} + \omega_2^2 \sigma_{ROE}}{\Omega_k \Omega_l} \right\} \dots\dots\dots (3)$$

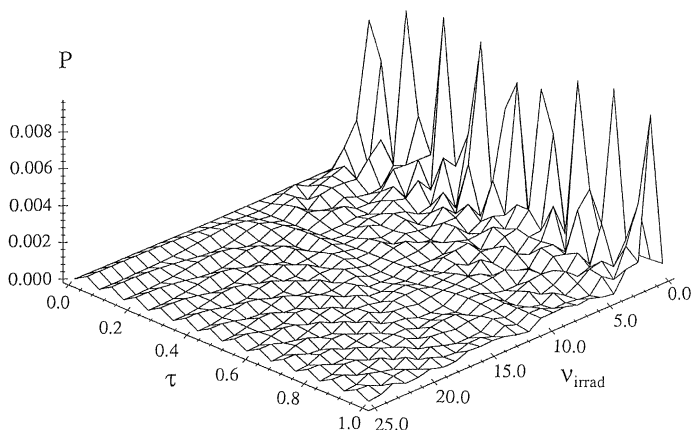


Fig. 1. Zero-quantum transition probability, P_{kl} for a coupled k and l spins ($J = 5$ Hz, $\omega_k = -\omega_l = 2\pi \times 250$ Hz) under the off-resonance irradiation field ($\omega_2 = 2\pi \times 5000$ Hz) as a function of off-resonance irradiation frequency v_{irrad} (kHz) $= \omega_{RF} / (2\pi \times 10^3)$ and irradiation period τ (s).

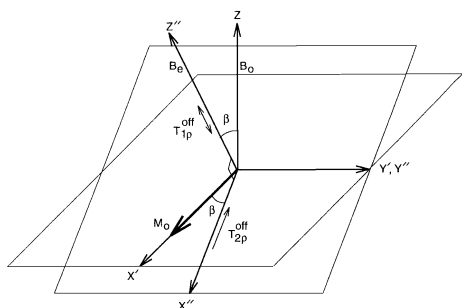


Fig. 2. Magnetization-vector diagram describing the off-resonance irradiation effect on the relaxation process of two spins. Off-resonance irradiation field establishes the effective field, B_e at angle β relative to the z-axis. The plane perpendicular to B_e is the tilted transverse plane. Relaxation occurring along B_e is characterized by the time constant T_{1p}^{off} , whereas the relaxation time constant in the tilted transverse plane is T_{2p}^{off} .

ここで、 γ は核磁気回転比、 r_{kl} は、核 k, l 間の距離を表す。ここで、 $\sigma_{NOE} = -J(0) + 6J(2\omega)$, $\sigma_{ROE} = 2J(0) + 3J(\omega)$, J はスペクトル密度関数である。蛋白質等の生体高分子では、通常、 σ_{NOE} は負、 σ_{ROE} は正である。したがって、オフ・レゾナンス照射周波数が0(オン・レゾナンス)から大きくなるに従い、交差緩和速度は正から負へと変化する。これに伴い二次元オフ・レゾナンス・スペクトル(Off-resonance ROESY)の交差ピークの符号も、オフ・レゾナンス照射周波数の変化により符号が反転する。この現象を利用して、核間距離とダイナミクスとを分離できる¹⁾。

(iii) Fast exchange に対する効果

固体 NMR では、双極子相互作用の遅い揺らぎ (10^{-4} 秒) が存在するとマジック・アングル回転周波数 (40 kHz) との破壊的な干渉が起り、信号が消えてしまう⁴⁾。これと同じ現象が溶液 NMR でも起る。ただし、溶液 NMR では固体 NMR の場合と異なり、核が置かれている電子環境(化学シフト)が比較的ゆっくり変化(マイクロ秒オーダー)すると、

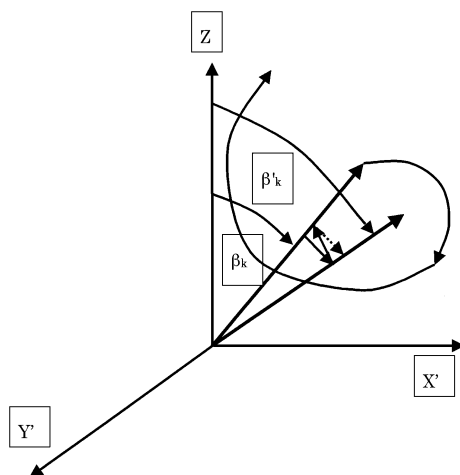


Fig. 3. Illustration of the unlocking process of spins in the presence of the slow chemical shift exchange reaction. Initially, spins are aligned along the axis tilted by β_k from Z axis and then slowly fluctuate to another axis tilted by β'_k . Suppose this exchange time is exactly half of the inverse of the effective rotational frequency ω_e . When spins are going around the β_k axis by 180 degree, β_k switches to β'_k , and spins are going around the β'_k axis in the twice diameter. Because of the repetition of this process, initially aligned spins become completely unaligned.

オフ・レゾナンス照射場は、その核の緩和過程に干渉する。その効果は、大きく分けると、①化学シフトのランダムな揺らぎに伴う緩和の効果⁵⁾、②スピン・ロックがかからないことによるスピン温度の不均一効果 (Fig. 3)、③ベリー位相の蓄積⁶⁾による効果、等がある。これらの効果が全体として、当該ピークの消去に寄与する、と考えられる。

(iv) 蛋白質の熱揺らぎ

ここで、蛋白質の熱運動というものを考えてみよう。蛋白質は数千から数万個の原子が化学結合によってつながった非常に複雑な分子である。通常、そのような複雑な合成高分子ではそのサイズは分子ごとに異なり、全体としてはガウス分布をする。また決して特定の構造というようなものをもたない。ところが、蛋白質はア

ミノ酸配列により一義的に決定される唯一の天然立体構造を有し (Anfinsen の仮説)⁷⁾, この天然構造を中心として熱揺らぎを行っている, と信じられている. この熱揺らぎを蛋白質のダイナミクスと称する.

蛋白質のダイナミクスはフェムト (10^{-16}) 秒から日のオーダーまで極めて多岐にわたる. その理由は蛋白質が, 多体系であり, 典型的な複雑系であることによる. 生物の複雑さは, まずこの蛋白質ダイナミクスの複雑性から始まる, といえるだろう.

このような複雑系をどのように一般的に表現するのが良いか, まだ分かっていない. しかし, 蛋白質のように, 電子よりもむしろ原子核の位置の変化が問題になるような古典力学的多体系では, 興味深い理論が展開されている. 一つは, Arnold 拡散⁸⁾である. 蛋白質は, 天然構造の近傍で調和振動を行っていると考えられるが, そのモードはフェムト秒からピコ秒と極めて速い. しかし, 振動モード間のエネルギー移動 (Arnold 拡散) は極めて遅く, それは系のポテンシャルの非線型性に依存する. このようなダイナミクスは, 基本的に摂動論で記述される. 二つには非摂動論的なダイナミクスであり, 例えば, Riemann dynamics⁹⁾がある. それによれば, カオスの挙動を示す複雑系には, 幾らでも遅い周期軌道が存在し, それは \log (素数) を幾つも掛け合わせた数で表現されるというものである. これは, ガウス分布をするランダム・ユニタリ行列 (GUE) の固有値が, Riemann ζ 関数の零点の分布と統計的に等しいという観測¹⁰⁾に基づいている. どちらにしても, 蛋白質のような複雑系では, 幾らでも遅い運動モードというものは存在し得る. 特に, マイクロ秒からミリ秒のオーダーの熱揺らぎは蛋白質の機能とカップルしており, 蛋白質立体構造の安定性と深い関係がある.

(v) 蛋白質の $\alpha \rightarrow \beta$ 転移への応用

プリオン病やアルツハイマー病等のいわゆるコンフォメーション病は, 蛋白質が天然構造

と異なる立体構造に転移することにより生ずると考えられている¹¹⁾. その中でも決定的な役割を演ずるのが, α ヘリックスから β シートへと二次構造の転移 ($\alpha \rightarrow \beta$ 転移) であり, これが蛋白質の大きな構造変化の引きがねになる. これを検出するのは, NMR 以外の方法では至難である. なぜなら, 通常の IR やラマン等の分光学的方法では, 残基レベルでの情報が得られず, 蛋白質のどの部位で転移が起きたのかを知ることが難しいからである. X線回折や電子線回折では, 分子は結晶中にあるので, 溶液中のように自然な状態における蛋白質のコンフォメーション変化は望めない.

Fig. 4 は $\alpha \rightarrow \beta$ 転移を起こすモデル蛋白質として知られる β ラクトグロブリンの天然立体構造を示している^{12),13)}. A は溶液中の NMR スペクトルから計算された三次元立体構造を 17 個重ねたものであり, B は X線解析に基づくものである. 主要ヘリックスの角度等の違いを除き, 両者には大きな差がない. これは, β ラクトグロブリンが安定な平均構造を有することを示している.

このように安定な構造を有する β ラクトグロブリンが, 遅いグローバルなコンフォメーション変化を起こすかどうかを調べるために, 三次元の Off-resonance ROESY スペクトルを測定した. 先に述べた, 化学シフトの遅い揺らぎ (\sim サブミリ秒スケール) と傾いた軸の回りの回転周波数 (数 $k \sim$ 数十 kHz) との破壊的干渉によるシグナルの消失度合いを測定すると, Fig. 5 のようになる. ここで水平面の軸は共にアミノ酸残基番号を示す. 垂直軸は, オフ・レゾナンス照射周波数の変化に伴う交差ピークの変動を示す. これが大きいほど, 遅い揺らぎが支配的であるということを示している. この図では, 20 番前後 (β ストランド A に相当) の残基と 120 番前後の残基 (β ストランド H に相当) との間の交差ピーク強度の変動が非常に大きい. このことは, β ラクトグロブリンの β バレル構造を作っている, 最初 (N 端のスト

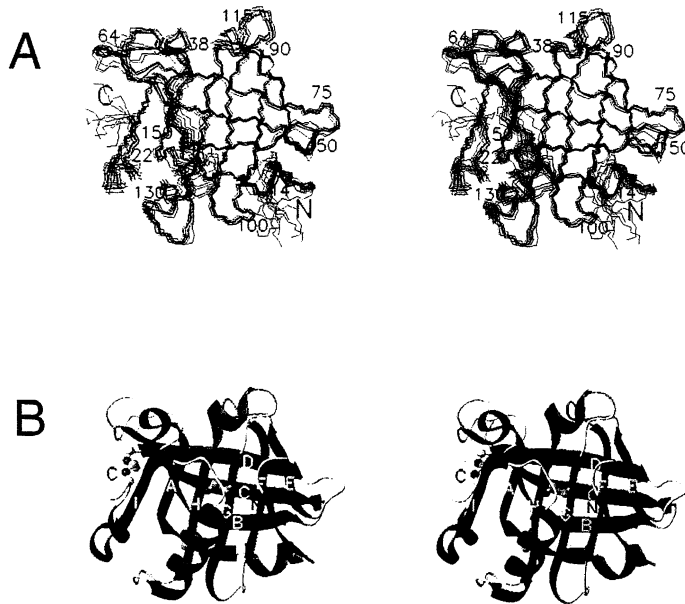


Fig. 4. (A) NMR and (B) X-ray structures of bovine β -lactoglobulin. Diagram indicating the superimposition of the 17 NMR structures was produced using MOLMOL (Koradi et al., 1996).

ランド A) と最後の β ストランド (C 端のストランド H) 間で、大きい、グローバルなゆっくりした構造変化が起きていることを示している。実は、 β ラクトグロブリンは構造形成過程の初期に、 β ストランド A 付近に α ヘリックスが形成されることが分かっている¹⁴⁾。 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移を伴うようなグローバルな構造変化が、非常に低い確率で、溶液中でも起こっている可能性がある。このような $\alpha \rightarrow \beta$ 転移は蛋白質天然構造を壊す原因となる。

人口の高齢化に伴い我が国において急増しているアルツハイマー病や、人間の致死性難病であるクロイツフェルト・ヤコブ病、あるいはそれとの関連を疑われる狂牛病等は、タンパク質分子の構造変化、 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移が原因となって脳の神経細胞死を引き起こすため、コンフォメーション病と総称されている。しかし、そのようなタンパク質の特殊な構造変化が具体的にどのような姿で起きるのは今まで全く知られて

いなかった。

我々は、 β ラクトグロブリンをモデルにして、その内部で瞬間的に起きるこの特殊な構造変化の全体像を、世界で初めて原子レベルの分解能で観測することに成功した¹⁴⁾。コンフォメーション病の原因となる蛋白質 (プリオン、アルツハイマー β 蛋白等) は、 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移を引き起こした後、凝集して不溶性のアミロイドという物質を生じて沈殿するため、原子レベルでの解析が困難であった。これに対し、 β ラクトグロブリンは、牛のミルクに含まれる、乳児の栄養源としての全く安全な蛋白であり、 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移を起こしても、凝集しない。

我々は $\alpha \rightarrow \beta$ 転移を観測するため、超高速混合法と高分解能核磁気共鳴法 (NMR) を連結させた特殊な装置を開発した。 β ラクトグロブリンは立体構造形成を開始直後 (0.00013 秒後)、タンパク質の端に短い α ヘリックス構造を一時的に形成することが分かった。この中間

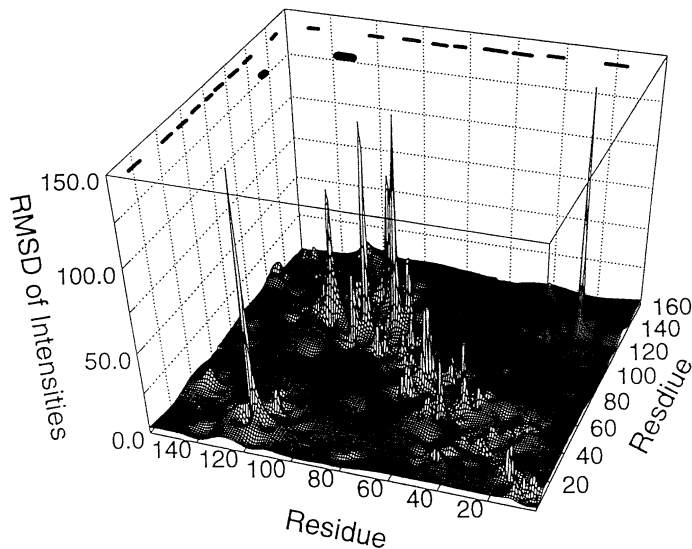


Fig. 5. 3D plot of the normalized RMSD of the cross-peak intensities in the Off-resonance ROESY-HSQC spectra using the shifted laminar pulse for spin-lock whose excitation maximum is different from the carrier frequency by 30 to 100 kHz. The location of β -strands (thin bar) and major helix (thick bar) on the X-ray structure are indicated.

構造はその後、約 0.8 秒で、 β シートに変化する ($\alpha \rightarrow \beta$ 転移). $\alpha \rightarrow \beta$ 転移では、いったんでき上がった水素結合ネットワーク (α ヘリックス) が壊れ、新たなネットワーク (β シート) に組み変わるため、反応が相対的に遅い. また実際にこの転移が起きる部位では、局所的に α ヘリックスを形成しやすい性質があるにもかかわらず、分子全体としてエネルギーを下げるために、 β シート構造を取っていることが分かった (局所的相互作用と非局所的相互作用のミスマッチ). このように、タンパク質分子内部で局所と全体のミスマッチが存在する部位で $\alpha \rightarrow \beta$ 転移が起きやすいようである.

このようなミスマッチはプリオンタンパク質 (狂牛病やクロイツフェルト・ヤコブ病の原因タンパク質) においても見られ、そのようなタンパク質立体構造の不安定性が、脳内の神経細胞を死に至らしめるメカニズムの根底にあるようだ.

タンパク質の構造的に不安定な部位を原子レベルで特定できれば、同部位の安定性を補強するための薬剤設計 (創薬) も可能となると考えられ、コンフォーメーション病の薬物治療への応用が期待できる. また逆に、ここで観測されたような中間体構造をもつタンパク質は細胞膜や脳血液関門を通過しやすい性質を有するため、遺伝子治療と並ぶタンパク質治療が考案されている. 例えば、プリオン病等による神経細胞死を薬物治療で停止させた後、脳内で欠損した神経細胞を補充するために移植された幹細胞を、神経細胞へ分化誘導する目的等で応用する道も開けている.

2. MRI

(i) イメージング・コントラストに対する効果

MRI におけるオフ・レゾナンス照射効果は磁化移動コントラスト (MTC) として知られている. この効果は一般に、以下の変形プロホ方程式を解くことにより一般に記述でき

る¹⁵⁾.

$$\begin{aligned} \frac{dM_Z^A}{dt} = & - (R_T + R_A) (M_Z^A - M_0^A) \\ & + \frac{R_T}{f} (M_Z^B - M_0^B) - 2R_{rfA}M_Z^A \\ & \dots\dots\dots(4) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{dM_Z^B}{dt} = & - \left(\frac{R_T}{f} + R_B \right) (M_Z^B - M_0^B) \\ & + R_T(M_Z^A - M_0^A) - 2R_{rfB}M_Z^B \\ & \dots\dots\dots(5) \end{aligned}$$

ここで、 M_Z^i は、 i スピンの磁化、 M_0^i は RF 照射を行わないときのスピンの平衡磁化、 R_i は i スピンの縦緩和時間、 R_T は A および B スピン間の交差緩和時間、 $f = M_0^A / M_0^B$ 、 R_{rfi} は線型を表し、ローレンツ型の線型をもつ場合、以下のように定義される。

$$R_{rfi} = \frac{\omega_1 T_{2i}}{1 + 4\pi^2 \Delta_i^2 T_{2i}^2} \dots\dots\dots(6)$$

NMR 実験により求められた、オフ・レゾナンス照射下での核スピンの平衡磁化は、式(4)から(6)で表現できることは良く知られている^{15),16)}。上述の多次元オフ・レゾナンス・スピン・ロック実験では、照射するラジオ波の位相が、実験の最初から最後までコヒーレントでなければならないが、この場合は位相をランダムに変化させてもよい。

通常の gradient echo (GE) や echo-planer (EPI) 法のような高速イメージング法では、それぞれの取り込みで、磁化は必ずしも平衡になっていない。また、SAR の問題もあり、十分磁化が平衡に達するほど長時間の照射は行えない。このような場合、式(4)~(6)を陽に解くことにより、準平衡状態の核スピンの磁化を計算することも可能である。臨床用 MRI を用いた実験からは、準平衡状態であっても平衡磁化の場合と相対的に良く似た振る舞いをする事が分かっている^{17),18)}。

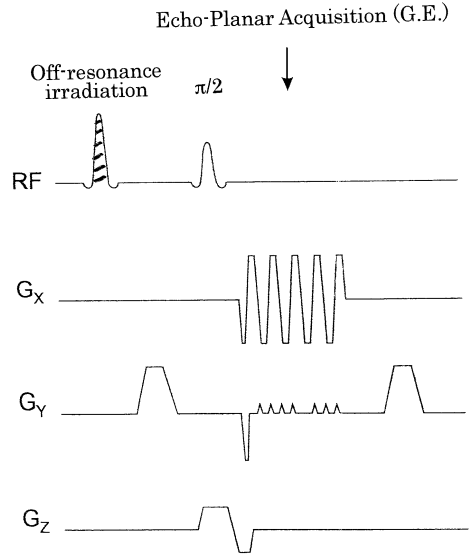


Fig. 6. Pulse sequence, MTC-EPI used for the acquisition of the functional MTC (f-MTC). Here, MT pulse was 18 ms with sinc shape. Power was 180 Hz.

(ii) fMRI への応用

EPI にオフレゾナンス照射を行った例を紹介する。パルス系列は Fig. 6 に示すように、EPI 取り込みの前に MT パルスを照射する。MT パルスは通常 SINC 波形であるが、実際には目的に応じて、種々の形状のラジオ波パルスが照射可能である。

ウシ血漿アルブミンゲル (BPA*-gel) を用いて測定した例を Fig. 7 に示す。蛋白濃度が 25 から 20, 15% へと減少するに連れ、イメージの相対強度は 2 倍, 3 倍と増えてゆくのが分かる。これは、EPI 測定が T_2 の変化に非常に鋭敏な測定であることを示している。Fig. 8 では、フィンガー・タッピング運動を行ったとき、SPM 解析で、統計的に有意に賦活された部位を、オフ・レゾナンス周波数の関数として示している。オフ・レゾナンス照射をしない場合を上段に、300 Hz, 1000 Hz および 3000 Hz オフ・レゾナンスで照射した場合をそれぞれ左か

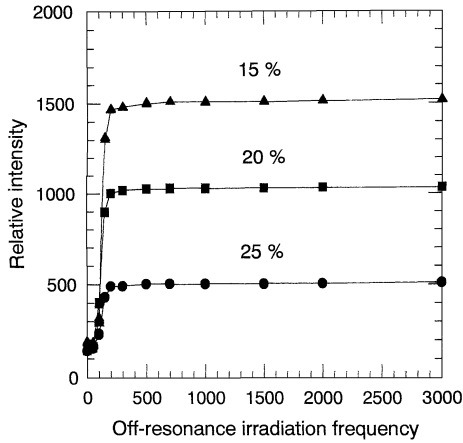


Fig. 7. Plot of the MTC-EPI image intensities of bovine plasma albumin gel (BPA*-gel) as a function of the off-resonance irradiation frequency. Protein concentration in gel was changed from 15 to 25%.

ら順に下段に示す．分布に少しずつ変化が見られ，オフ・レゾナンス周波数の増加に伴い，統計的に有意な領域が増大してきているのが分かる．これを数値で示すと Fig. 9 のようになる．最大の Z スコア，クラスターサイズ，Z が 4 以上の確率，クラスターサイズが 100 以上の確率が，それぞれ，オフ・レゾナンス照射周波数の増加とともに増大してきている．破線は，照射しない場合の値を示す．したがって，1500 Hz 以上，水プロトンから離れた部位を照射した場合，オフ・レゾナンス照射を行わない場合よりも，感度の増加が見られる．これには，幾つかの理由が考えられる．まず，血流の増加に伴う蛋白濃度の相対的減少が挙げられる．脳活動に伴い，局所の CBV は 15～20% 増加すると考えられている．また，神経細胞の活動に伴う細胞内の水プロトンの緩和時間の延長も考えられるが，これが検出可能かどうかは

No-Saturation

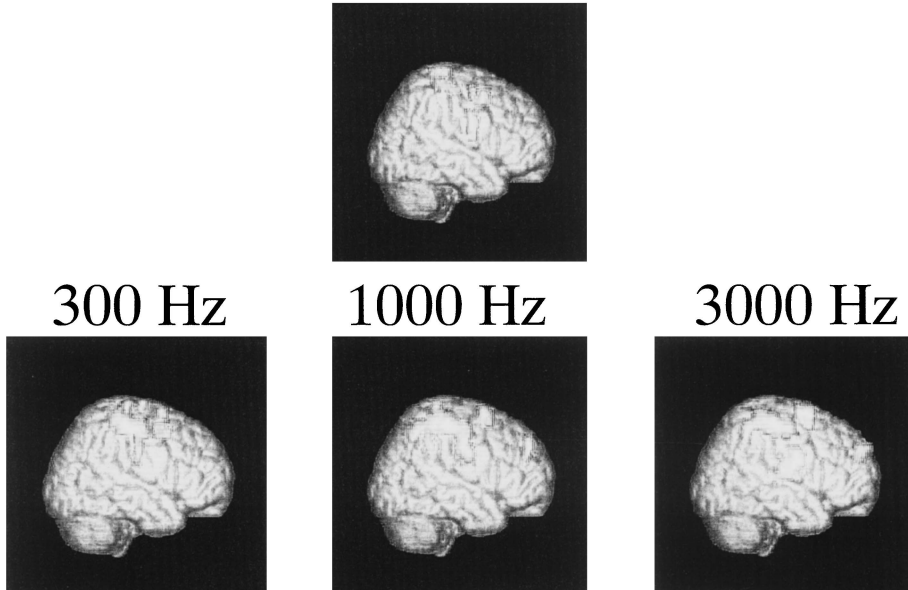


Fig. 8. Result of SPM analysis. Functional MTC images were analyzed using SPM analysis without the off-resonance irradiation and with the off-resonance irradiation varying the off-resonance irradiation frequency from 300 to 3000 Hz.

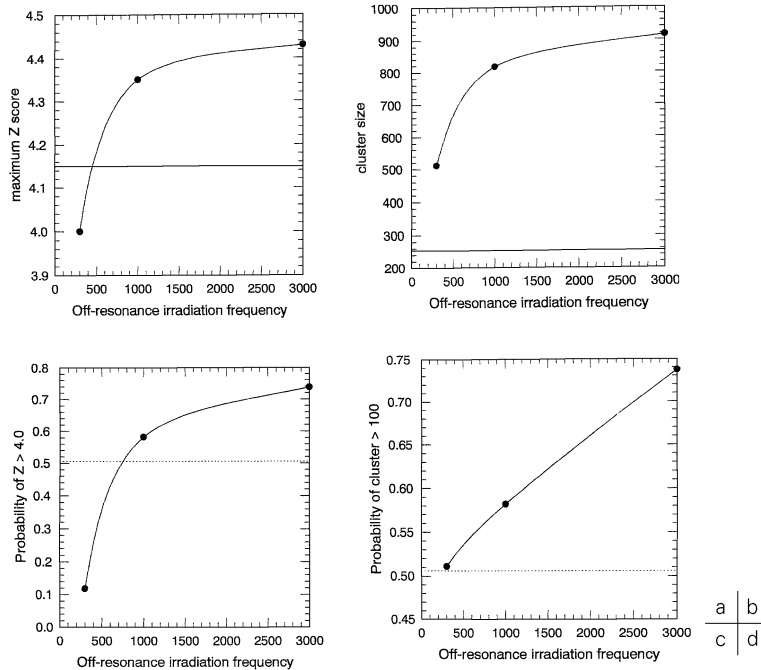


Fig. 9. (a) The maximum Z-score, (b) the maximum cluster size, (c) Probability of $Z > 4.0$ and (d) Probability of cluster size > 100 as a function of the off-resonance irradiation frequency.

今のところ不明である。しかし、確実に言えることは、BOLD 効果はオフ・レゾナンス照射周波数が 1000 Hz 以上ではほとんど影響を受けないので、BOLD 効果に対する影響ではない、ということである。

II. 21 世紀への展望：MRI 用リポーター蛋白質の開発

20 世紀の MRI は、緩和時間、BOLD 効果、あるいは拡散定数といった内因的なパラメータを、MRI コントラストとして用いてきた。そのようなコントラストの特徴は、我々が既に十分見てきたとおりであり、その限界も肌で感じている。そのような受動的なコントラストを用いていたのでは、新しい医学への応用は期待できない。

21 世紀の MRI は、外部から種々の摂動を加え、そのレスポンスを観測することにより、内因的なパラメータのみからは得られない、より特異的な情報を得ることにあると考えられる。

例えば、特定の遺伝子発現を MRI を用いてイメージングするためのリポーター蛋白質を開発するといった方向である。つまり、生化学領域において良く用いられている、培養細胞内での特定の発現蛋白質の分布を見るための GFP (green fluorescent protein) に類したリポーター蛋白質の開発が重要となるだろう。

そのような例を幾つか紹介する。

(i) トランスジェニック動物における遺伝子発現の *in vivo* マッピング

Louie らは、トランスジェニック動物における遺伝子発現を可視化するための、MRI 用リ

ポーター遺伝子を開発した¹⁹⁾。βガラクトシダーゼの基質でガドリニウムを籠状に包んだコントラスト剤を注入する。もし、ある部位でβガラクトシダーゼが発現され、活性を有していたとすると、籠が破れ中からガドリニウムが放出される。放出されたガドリニウムにより、周辺の水プロトンの T₂ が短縮し、信号が消失する。したがって MRI を撮れば、遺伝子発現部位をマッピングすることができる。

(ii) 幹細胞の分布および分化のイメージング

Lewin らは、HIV-Tat ペプチド断片と融合した鉄微粒子を用い、CD34+ 細胞をラベルした²⁰⁾。静脈内注入したこの細胞は、骨髄にとどまり、MRI を用いて細胞 1 個を観測することに成功した。さらに、磁気分離カラムを用いることにより、ラベルした細胞を回収できた。この方法は将来、幹細胞を用いた再生医学に広く応用することができるだろう。

このように、MRI による遺伝子、蛋白あるいは細胞特異的なイメージング法は、

- (i) *in vivo* で行える。
 - (ii) 細胞培養する手間が省け、さらに細胞レベルの情報を生体全体から直接得られる。
 - (iii) 医療に应用する場合、バイオプシー等と比較し、検査による侵襲が少ない。
- 等の非常に優れた特徴を有するため、今後、21 世紀の MRI 技術として、大きく発展する可能性があると考えられる。

文 献

- 1) Kuwata K, Liu H, Schleich T, James TL : Rotational correlation times of internuclear vectors in a DNA duplex with G-A mismatch determined in aqueous solution by complete relaxation matrix analysis of off-resonance ROESY (O-ROESY) spectra. *J Magn Reson* 1997 ; 128 : 70-81
- 2) Kuwata K, Schleich T : Off-resonance rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy. *J Magn Reson A* 1994 ; 111 : 43-49
- 3) Kuwata K, Schleich T : Polarization operator formalism description of the off-resonance ROESY experiment. *J Magn Reson A* 1995 ; 114 : 219-229
- 4) Rothwell WP, Waugh JS : Transverse relaxation of dipolar coupled spin systems under rf irradiation. *J Chem Phys* 1981 ; 74 : 2721-2732
- 5) Deverell C, Morgan RE, Strange JH : Studies of chemical exchange by nuclear magnetic relaxation in the rotating frame. *Mol Phys* 1970 ; 18 : 553-559
- 6) Suter D, Chingas GC, Harris RA, Pines A : Berry's phase in magnetic resonance. *Mol Phys* 1987 ; 1327-1340
- 7) Anfinsen CB : The tertiary structure of ribonuclease. *Brookhaven Symp Biol* 1962 ; 15 : 184-198
- 8) Arnold VI : Instability of dynamical systems with several degree of freedom. *Sov Math Dokl* 1974 ; 5 : 581-585
- 9) Berry MV, Keating JP : The Riemann zeros and eigenvalue asymptotics. *SIAM Rev* 1999 ; 236-266
- 10) Odolyzko AM : On the distribution of spacings between zeros of the zeta function. *Math Comp* 1987 ; 48 : 273-308
- 11) Carrel RW, Lomas DA : Conformational disease. *Lancet* 1997 ; 350 ; 134-138
- 12) Kuwata K, Hoshino M, Era S, Batt CA, Goto Y : α→β transition of β-lactoglobulin as evidenced by heteronuclear NMR. *J Mol Biol* 1998 ; 283 : 731-739
- 13) Kuwata K, Hoshino M, Forge V, Era S, Batt CA, Goto Y : Solution structure and dynamics of bovine beta-lactoglobulin A. *Protein Sci* 1999 ; 8 : 2541-2545
- 14) Kuwata K, Shastry M, Cheng H, Hoshino M, Batt CA, Goto Y, Roder H : Structural and kinetic characterization of early folding events in β-lactoglobulin. *Nature Struct Biol* 2001 ; 8 : 151-155
- 15) Kuwata K, Brooks D, Yang H, Schleich T : Relaxation matrix formalism for rotating frame spin-lattice proton NMR relaxation and magnetization transfer in the presence of an off-resonance irradiation field. *J Magn Reson B* 1994 ; 104 : 11-25

- 16) Brooks D, Kuwata K, Schleich T: Determination of proton magnetization transfer rate constants in heterogenous biological systems. *Magn Reson Med* 1994 ; 31 : 331-336
- 17) Okumura A, Kuwata K, Takenaka K, Nishimura Y, Shirakami S, Sakai N, Hayashi T, Era S : Pulsed off-resonance magnetization transfer for brain tumor in patients. *Neurol Res* 1998 ; 20 : 313-319
- 18) Okumura A, Kuwata K, Nishimura Y, Kawaguchi M, Takenaka K, Sakai N, Era S, Hoshi H : Clinical applicability of functional magnetic resonance imaging and activation study with single photon emission computerized tomography for functional mapping. *Neurol Res* 1998 ; 20 : 191-197
- 19) Louie AY, Huber MM, Ahreus ET, Rothbacher U, Moats R, Jacobs RE, Fraser SE, Meade TJ : *In vivo* visualization of gene expression using magnetic resonance. *Nature Biotechnol* 2000 ; 18 : 321-325
- 20) Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, Weissleder R : Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticle allow *in vivo* tracking and recovery of progenitor cells. *Nature Biotechnol* 2000 ; 18 : 410-414

Molecular Motion and Brain Function

Kazuo KUWATA

*Department of Physiology, School of Medicine, Gifu University
40 Tsukasamachi, Gifu 500-8705*

The effects of off-resonance irradiation on multidimensional heteronuclear NMR spectra and functional magnetic resonance imaging (fMRI) were investigated. Thermal fluctuation of β -lactoglobulin on the micro to millisecond time scale could be detected using multidimensional heteronuclear off-resonance rotating frame spectroscopy. Surprisingly, the regions with dominantly slow fluctuations corresponded to those undergoing the α to β conformational transition during folding. Since the α to β transition is crucial for several conformational diseases, such as prion and Alzheimer's disease, β -lactoglobulin is one of the most important model proteins used to investigate these diseases mechanisms.

Brain regions activated during finger tapping motion could be detected with significantly high sensitivity by the application of an off-resonance irradiation pulse prior to the EPI acquisition routine. Maximum Z-score and cluster size increased significantly with the increase of off-resonance irradiation frequency. This effect seems to be due to the transient increase of the cerebral blood volume (CBV) rather than the enhancement of the BOLD effect.