

とめて報告したい。

1 はじめに

^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F などの核スピン I が $1/2$ である核の NMR の化学的及び生物学的な応用は一般的である。これらは高い天然存在率 (^{13}C を除いて) 及び比較的高い共鳴周波数を持つためその測定感度が高く測定が容易である事他に大きな化学シフト¹⁾ を持ち化合物の構造決定やその核の環境変化を知るのに極めて有用であるなどその応用範囲は極めて広い。それらの $I=1/2$ 核の緩和速度²⁾ の決定が医学的診断に有効に用いられているのは周知の通りである。しかし、NMR は原則として $I=1/2$ 以外の核スピンを持っているすべての核に対してその応用が可能であるはずである^{2,3)}。

我々は近年 $^2\text{H}(I=1)$, $^{43}\text{Ca}(I=7/2)$, $^{25}\text{Mg}(I=5/2)$ 及び $^{67}\text{Zn}(I=5/2)$ など $I=1/2$ 以外の核の NMR を生体系に応用する事を試みた⁴⁻¹⁵⁾。特に、 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} は生体にとって極めて重要な働きをする金属イオンであるにもかかわらず、それらが発色性でなく又反磁性であるため、水溶液中においてそれらの物性を直接的に調べる事は不可能であった。金属酵素や金属タンパク質中のこれら金属イオンの結合部位周辺構造を調べる場合、希土類金属イオンや遷移金属イオンを言わばモデル的に用いてその電子スピン共鳴やケイ光などを測定し、元の金属イオンの結合部位周辺構造を推定してきた。しかし、ほとんどの場合、モデル金属イオンの結合部位は元の金属イオンの結合部位とは異なるし、又モデル金属イオンを用いた場合の生物活性は元の金属イオンを用いた場合よりは低い。以上のような観点より、 ^{43}Ca , ^{25}Mg 及び ^{67}Zn NMR を生体系に応用する事はこれらの金属イオンの生体内における役割りを知るのに極めて有効であると考え、これらの金属 NMR をいくつかの生体関連物質に適用しいくつかの興味ある結果を得たので⁵⁻¹⁵⁾、その一部をここにま

2 実験

^{43}Ca は 49.1% enrich したものを CaCO_3 としてフランス原子力庁 (Commissariat a L'Energie Atomique) より、 ^{25}Mg は 95.66% enrich したものを MgO として Prochem より、又 ^{67}Zn は 78.63% enrich したものをメタルとして Prochem よりそれぞれ購入した。いずれも 1M HCl 又は HNO_3 により可溶化した後、NaOH 溶液で中性化した。

^{43}Ca , ^{25}Mg 及び ^{67}Zn NMR は Bruker 社 CXP-300FT NMR を用いてそれぞれ 20.19, 18.36 及び 18.77 MHz で測定した。直径 10 mm のサンプル管を用いて外部 D_2O でロックした。積算には 90° パルス (約 $80 \mu\text{s}$) を用いて、取り込み時間は 0.12s-4.2s であった。これは核の緩和時間に応じて充分に長い時間をとるようにした。積算回数は $S/N > 6$ を得るため、1,000-200,000 を必要とした。S/N を上げるため数 Hz の exponential line broadening を行った。多くの場合、200-400 μs の dead time をとり機械的な雑音を消去した。測定条件の詳細については文献 14 を参照されたい。

3 結果

3.1 ^{43}Ca NMR

我々は ^{43}Ca NMR を Ca^{2+} が反応必須であるサーモライシン、コンカナバリン A 及びカルモデュリンへ応用した^{6,8,9,15)}。 ^{43}Ca NMR は Lund 大学のグループによる応用例があるが³⁾、我々の結果はそれらにほぼ一致した。即ちフリー Ca^{2+} の ^{43}Ca NMR の線幅はサーモライシンやカルモデュリンを添加する事により著しく増大した。サーモライシンの反応には、 Ca^{2+} の他に Zn^{2+} を必須とする。 Ca^{2+} サーモライシン溶液の線幅は Zn^{2+}

や反応阻害剤である L-ロイシンヒドロキサム酸によって変化しなく、これは後に述べる ^{67}Zn NMR の結果と著しく対照的である。一方図1のようにフリー Ca^{2+} のカルモデュリン添加によって著しく広がった線幅は反応阻害剤であるトリフ

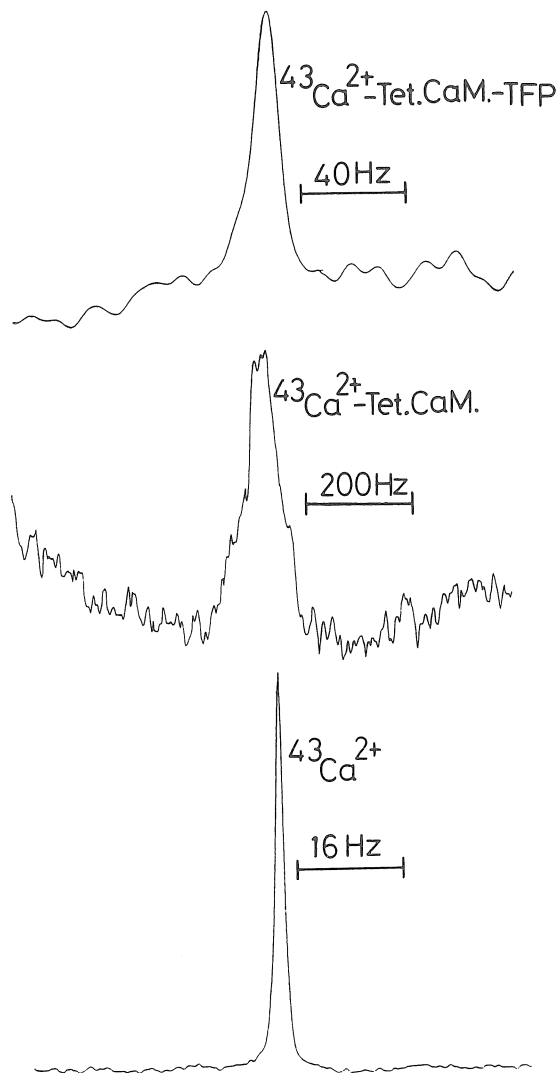


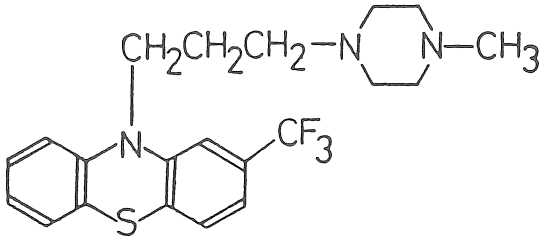
図1 下からフリー Ca^{2+} 、 Ca^{2+} -テトラヒメナカルモデュリン及び Ca^{2+} -テトラヒメナカルモデュリン-TFP 溶液の ^{43}Ca NMR スペクトル。詳しい実験条件については文献 8) を参照。

ルオペラジン (TFP) の添加によって著しく減少した。この減少カーブよりトリフルオペラジン2分子がカルモデュリン1分子に結合している事がわかった。又この Ca^{2+} -カルモデュリン溶液の線幅は大過剰の Mg^{2+} の添加により減少するが、大過剰の KCl の存在によって変化しない事より陽イオンのカルモデュリン上の結合部位についていくつかの推定が可能になった。又、 Ca^{2+} -カルモデュリン溶液の $T_{1\rho}$ を測定する事により Ca^{2+} のカルモデュリン上の運動性についていくつかの考察がなされた。このようにサーモライシン及びカルモデュリンについては各種の試薬により線幅が大きく変化し、タンパク質表面の Ca^{2+} 結合部位周辺構造を調べるのに ^{43}Ca NMR が有用である事が示された。一方、フリー Ca^{2+} の ^{43}Ca NMR はコンカナバリン A を大過剰添加してもその線幅が変わらなかった。この事より Ca^{2+} のコンカナバリン A への結合速度は 10s^{-1} 以下の極めて小さな値であるか、又は Ca^{2+} のコンカナバリン A への結合定数が極めて小さい事が示唆された。温度を下げる事によりコンカナバリン A を除くタンパク質に結合した Ca^{2+} の ^{43}Ca NMR の線幅はすべて減少した。この事よりタンパク質結合 Ca^{2+} の大きな線幅は主に化学交換速度に支配される事が示唆された。

以上のように ^{43}Ca NMR は Ca^{2+} 結合タンパク質内での Ca^{2+} の動き又はその周辺環境を調べるのに極めて有用であることがわかった。

3・2 ^{25}Mg NMR

Mg^{2+} は生体内においてはキナーゼ類の司るリン酸転移反応に必須な金属イオンである。フリー Mg^{2+} の ^{25}Mg NMR の線幅は ATP や ADP などに結合する事により著しく広がる。このため Mg^{2+} -ATP (ADP) 錯体がタンパク質と結合しても既に著しく増加した線幅はもうそれ以上広がる事はないとされていた。我々は Mg^{2+} -ATP (ADP) を基質とするクレアチンキナーゼ及びア



Trifluoperazine (TFP)

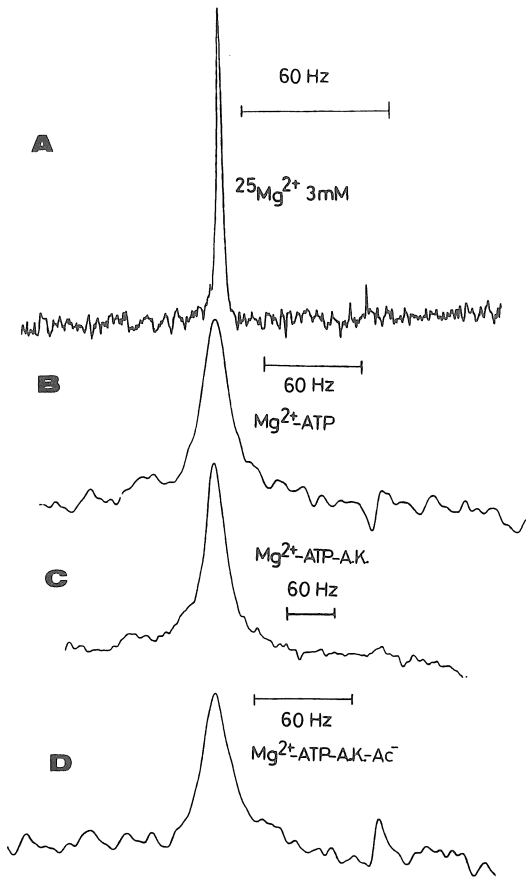


図 2 A. フリ-Mg²⁺, B. Mg²⁺-ATP, C. Mg²⁺-ATP-アセテートキナーゼ及び D. Mg²⁺-ATP-アセテートキナーゼ-アセテート溶液の ²⁵Mg NMR スペクトル. 詳しい実験条件に関しては文献 13) を参照. Reprinted from ref. 13 by permission of the copyright owner, Elsevier Sequoia.

セテートナーゼに ²⁵Mg NMR を応用した^{5,13)}. その結果 Mg²⁺-ATP-キナーゼの三者複合体は実は著しく広い線幅を与え又、その線幅はクレアチンとかアセテートのようなもう一方の基質や NO₃⁻ のような反応阻害剤の添加により大きく変化する事を見出した (図 2). Mg²⁺-ATP や Mg²⁺-ADP の ²⁵Mg NMR の線幅は温度を下げる事により増加するが、Mg²⁺-ATP (ADP)-キナーゼのような三者複合体や Mg²⁺-ATP (ADP)-キナーゼ-クレアチンのような四者複合体の ²⁵Mg NMR の線幅は温度を下げる事により減少する. これらの結果より Mg²⁺-ATP (ADP) の ²⁵Mg NMR の線幅と Mg²⁺-ATP(ADP)-キナーゼ三者複合体の ²⁵Mg NMR の線幅の機構が異なる事が示唆された. 即ち、前者の線幅は分子全体の動きに対応する相関時間に支配されるが、後者の線幅は化学交換速度に支配される事が推定された. 我々はさらに ²⁵Mg NMR をカルモデュリンに応用し¹⁵⁾, Mg²⁺ のカルモデュリン上の結合部位周辺構造が K⁺ 及び Ca²⁺ によってどう影響を受けるかについて詳細に調べた.

以上のように我々は ²⁵Mg NMR が Mg²⁺-タンパク質, Mg²⁺-ATP のような二者複合体のみならず, Mg²⁺-ATP-タンパク質, Mg²⁺-ATP-基質-タンパク質のような三者及び四者複合体へも応用ができる事を初めて見出し, ²⁵Mg NMR の応用が広い事を示唆した.

3.3 ⁶⁷Zn NMR

⁶⁷Zn NMR は固体や高濃度 Zn²⁺ 溶液に適用された例があったが、半値幅が 40 Hz 以上で、対イオンの種類に依存して化学シフトが変化するとされていた. ⁶⁷Zn NMR はこの大きな線幅のため S/N も良くなく、⁴³Ca NMR や、²⁵Mg NMR の場合と異なり、化学的な応用はほとんど不可能とされていた. 我々はこの Zn²⁺ の高濃度溶液に見られる大きな線幅は、低濃度溶液においてかなり減少する事 (<10 Hz) を見出し、⁶⁷Zn NMR

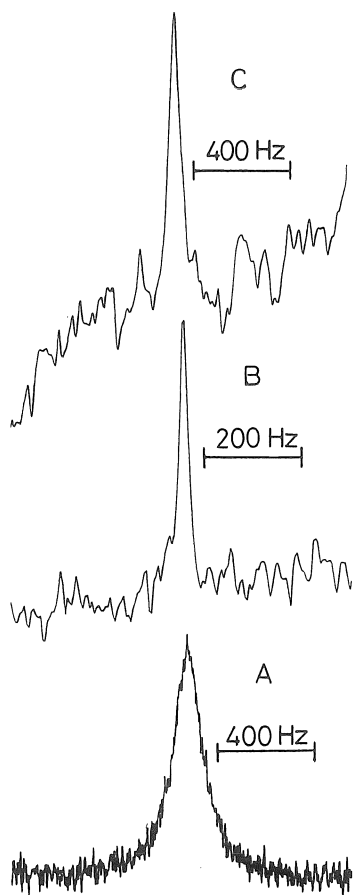


図 3 A. $ZnCl_2$ (2M), B. $ZnCl_2$ (50mM), C. Zn^{2+} -インシュリン溶液の ^{67}Zn NMR スペクトル. 詳しい実験条件に関しては文献 10) を参照.

Reprinted from ref. 10 by permission of the copyright owner, Elsevier Sequoia.

が化学的及び生化学的に応用が十分に可能である事を見出した (図 3)^{6,7,9,10-12,15)}.

我々はまず ^{67}Zn NMR を小分子に適用し、次いでサーモライシン、コンカナバリン A、インシュリンなどに適用した。フリー Zn^{2+} の ^{67}Zn NMR の線幅はホウ酸、酢酸、スルホン酸などの

添加によってそれ程増加しないが、イミダゾール誘導体の添加によって著しく増加する。 ^{67}Zn NMR の線幅の増加は他の方法によって求めた Zn^{2+} のこれら配位子への結合定数と密接な関係がある事が示唆された。又、フリー Zn^{2+} の ^{67}Zn NMR の線幅はサーモライシン、コンカナバリン A、インシュリン、DNA などの添加によって著しく増加した。我々はこれらの線幅の著しく増大した Zn^{2+} 溶液の温度依存性を調べた。その結果、 Zn^{2+} -イミダゾール溶液のように配位子の分子量が小さい系においては ^{67}Zn NMR の線幅が温度を下げる事により増大するが、 Zn^{2+} -サーモライシンなど配位子の分子量が 1 万以上の巨大分子の場合は ^{67}Zn NMR の線幅は温度を下げる事によって減少する事を見出した。この事より、小分子系の ^{67}Zn NMR の線幅は分子全体のゆらぎに対応する相関時間に主に支配されるが、巨大分子系の ^{67}Zn NMR の線幅は Zn^{2+} の化学交換速度に主に支配される事がわかった。 Zn^{2+} -サーモライシン溶液の ^{67}Zn NMR は Ca^{2+} 及び阻害剤の添加によってその線幅が著しく変化し、 Zn^{2+} 結合活性部位周辺構造がそれらにより変化する事が示唆された。 Zn^{2+} -コンカナバリン A 溶液の ^{67}Zn NMR は Ca^{2+} や糖の添加によって協同的に変化し、 Zn^{2+} 結合部位へのそれらエフェクターの間接的な関与が示唆された。

我々は Zn^{2+} -インシュリン溶液の Zn^{2+} の動きを T_1 及び T_2 からある仮定の元に評価する事を試み、ゆらぎの相関時間を約 5 ns と求めた。 Zn^{2+} は生体内におけるカルモデュリンの機能に大きな影響を与えるとされている事から、我々は ^{67}Zn NMR を Zn^{2+} カルモデュリン溶液に応用し、 Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ 及び阻害剤とどういふ反応するかを詳細に調べている。

以上のように我々は ^{67}Zn NMR を化学的及び生化学的に応用する事を初めて試み、いくつかの興味ある結果を得、 ^{67}Zn NMR の応用範囲が極めて広いものである事を見出した。

4 考 察

我々の研究室にある CXP-300 FT NMR を用いた場合、¹H NMR が 300 MHz で測定が可能であるのに対して、⁴³Ca, ²⁵Mg, ⁶⁷Zn NMR は共鳴周波数が 20 MHz 前後であるので ¹H NMR に比べて感度がかかなり低くなる。さらにこれら NMR 検出可能な金属の天然存在率が、⁴³Ca, 0.145%, ²⁵Mg, 10.13%, ⁶⁷Zn, 4.11% とかなり低いため金属濃度が 50 mM 以上の濃度範囲では比較的容易に測定ができて、生化学的な目的に適った 1 mM 程度、できればそれ以下の濃度の金属イオンの NMR を測定しようとする極めて高価な enrich した金属イオンを購入しなければならない。さらに積算回数に関しては、タンパク質結合金属イオンの金属 NMR スペクトルを $S/N > 6$ で得るには、 10^4 - 10^5 回又はそれ以上積算する事が必要である。このため 1 回の取り込み時間を 0.1-0.2 s にしたとしても満足するスペクトルを得るまでに何時間も要する事は普通である。このような理由から、これら金属 NMR を生化学的に利用する場合多くの費用と多くの時間を必要とする。

我々が興味を抱いている金属タンパク質、金属酵素の金属イオンの結合は多くの場合（ヘム、クロフィルなどを除いて）、イオン結合でアミノ酸に結合している。金属イオンのアミノ酸への結合は pH 変化、イオン強度の変化、他の金属イオンの添加などによってその結合が容易に解裂する程弱い結合である。この事を別の言葉で言い換えると金属イオンのアミノ酸への結合は一種の平衡で成り立っており、平衡は結合の側に大部分片寄っているにしても金属イオンはタンパク質内のアミノ酸と非常に速い速度 ($> 10^{10} \text{s}^{-1}$) でついたり離れたりしている事になる。故にこのような化学交換が起きている金属イオンの金属 NMR の解釈は一義的でなくなってくる。

$I > 1$ の金属イオンがアミノ酸やタンパク質のような巨大分子に結合しても化学シフトの変化は観測されなく、シグナルの線幅が大きく変化する事になる。緩和時間 $T_1^{1)}$ も大きく変化する。故に、金属 NMR の解釈は主として T_1 と半値幅から求めた T_2 について議論する事になる。最も良く教科書などに出ている四重極緩和の式は^{2,3)}, extreme narrowing ($\omega\tau_c \ll 1$) の場合

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \frac{1}{T_2} \\ &= \frac{3\pi^2}{10} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right)^2 \left(1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \tau_c \end{aligned} \quad (1)$$

で表わされる。ここで τ_c は核のゆらぎを表す相関時間、 ω は Lamor 周波数、 q は核の電場勾配、 Q は核四重極モーメント、 η は非対称パラメータであり、 (e^2qQ/h) は核四重極結合定数とも呼ばれる。この式は小分子が等方的に速い自由運動をしている場合に適用され、化学交換が支配的である場合には適用できない。化学交換が存在する場合 extreme narrowing の条件下で

$$\frac{1}{T_{1\text{obs}}} - \frac{1}{T_{1\text{free}}} = \frac{P_B}{T_{1B} + \tau} \quad (2)$$

が良く用いられる。ここで $T_{1\text{obs}}$ は得られた T_1 値、 $T_{1\text{free}}$ はフリー金属イオンの T_1 値、 T_{1B} はタンパク質結合金属イオンの T_1 値、 P_B は金属イオンのタンパク質への結合割合を示し、 τ は金属イオンのタンパク質結合の平均時間である。しかし、この式は適当な結合定数及び交換速度又、extreme narrowing で $P_B \ll 1$ という様々な条件が満たされた場合にのみ適用する事ができる。一方 extreme narrowing case でなくて、化学交換に支配されないような条件下で核の四重極結合定数や核の電場勾配のゆらぎを求める式も提出されている^{2,3,14)}。

$$\left. \begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \frac{3\pi^2}{10} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right)^2 \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \\ &\quad \left[\frac{0.2\tau_c}{1+(\omega\tau_c)^2} + \frac{0.8\tau_c}{1+(2\omega\tau_c)^2} \right] \end{aligned} \right\}$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3\pi^2}{10} \left(\frac{e^2 q Q}{h} \right)^2 \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left[0.37\tau_c + \frac{0.5\tau_c}{1+(\omega\tau_c)^2} + \frac{0.2\tau_c}{1+(2\omega\tau_c)^2} \right] \quad (3)$$

他にも T_1 及び T_2 より金属 NMR を解釈する試みがなされているが^{2,3)}、我々の注目する金属-巨大分子相互作用を考察する場合上記の (2) 及び (3) 式を頭に入れておけば良いであろう。我々は Zn^{2+} -インシュリン及び Ca^{2+} -カルモデュリン溶液の Zn^{2+} や Ca^{2+} の動きや環境を知るのに (3) 式を適用したが、詳しい温度依存性の実験などが欠けているのでさらに詳しい検討が必要であろう。

我々がこれまで研究を進めたほとんどの金属イオン-タンパク質溶液の金属 NMR の線幅は主に化学交換に支配されているようであった。故に、様々な他の金属イオンや阻害剤の添加により引き起こされた金属イオン-タンパク質溶液の線幅の変化は主にその化学交換速度の変化によるのであろう。しかし、金属イオンが弱くタンパク質に結合しているとしても、その核四重極結合定数に影響を及ぼす核周辺の対称性の変化をも充分に考慮しなければならないであろう。一方、金属イオンに対して十分に少量のタンパク質を結合させた時の NMR の変化を観測する場合、平衡は圧倒的に結合の側に片寄っている事になるから、様々な添加剤による NMR の変化は、余程その平衡定数変る場合を除いて、平衡とはあまり密接な関係がないであろう。

以上、金属 NMR の解釈に際して多くの問題点などを挙げてきたが、定性的な解釈を行う場合、金属 NMR の有用性は著しく高いものである事がわかる。例えば、巨大タンパク質に結合した Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及び Zn^{2+} 自身の動き又はその環境が他の金属、阻害剤及び基質などの存在によってどのように変化するかを直接的に観察する事はこれまで不可能であった。 1H 、 ^{13}C NMR など

によってこれら金属の直接配位した核を検出する事は非常に困難である。 Ca^{2+} の代りに希土類金属イオンを用いて、電子スピン共鳴やケイ光スペクトルを測定しても多くの場合、希土類金属イオンは Ca^{2+} に対して阻害的に作用し酵素反応は進まない。又、 Zn^{2+} の代りに Cd^{2+} を用いて ^{113}Cd NMR を測定しても Cd^{2+} のタンパク質上の結合部位は Zn^{2+} のそれとは異なる。このような事を考えると、native な金属イオンの物性を直接的に調べて、金属タンパク質、金属酵素内の金属イオン結合部位周辺構造を考察する意義は極めて高いであろう。できれば 1H NMR^{16,17)} ^{31}P NMR¹⁸⁾、 ^{19}F NMR^{18,19)}、 CD ^{16,18,20)}などを併用して相補的な情報を得る事により、金属 NMR の重要性はさらに増すであろう。

これら金属 NMR を医学的に応用する事は可能であろうか。病態組織から単離精製したタンパク質、酵素などに上記のように金属 NMR を応用する事は充分に可能である。しかし、*in situ* でこれら金属 NMR を用いるにはいくつかの問題点を解決しなければならない。最も大きな問題点はやはり感度の点であろう。 1H で 300 MHz の共鳴周波数を持つような超伝導磁石を用いてもこれら金属 NMR の共鳴周波数は 20 MHz であり、人間や動物を対象とした場合、超高磁場の影響を考慮せねばならないであろう。次の問題点は生体内中のこれら金属イオンの濃度の点である。少なくとも同位元素を enrich した対象物を観察する必要があるであろうから、現在のこれら同位元素の高価 (10 mg, 10 万円以上) な事を考慮すると、経済的な面でその応用上の問題点が出て来る。最後に、これらの金属 NMR において、明確な化学シフトの違いから様々な判断、考察をする事は 1H NMR、 ^{31}P NMR、 ^{19}F NMR のようには行かないから、結局 T_1 及び T_2 ¹⁾ について議論する事になり解釈が一義的でなくなって来る。しかし、これに関しては、生体内での水の T_1 や T_2 の違いについて明確な解釈がこれまで行われてい

ないにもかかわらず、現象を把握する事によって ¹H NMR の応用が医学的分野に著しく拡がった事を考えると悲観的になる事もないであろう。

以上、我々が行ってきた実験結果をまとめると

(1) ²⁵Mg NMR は Mg²⁺-ATP(ADP)-クレアチンキナーゼのような三者複合体及び四者複合体へも充分に応用できる事を見出した。

(2) ⁶⁷Zn NMR は低濃度溶液 (Zn²⁺ < 50 mμ) では充分にその線幅が減少し、化学的及び生化学的応用は充分に可能である事を見出した。

(3) ⁴³Ca NMR はこれまでに知られているよに多くの Ca²⁺ 結合タンパク質に応用が可能であった。

文 献

- 1) 例えば NMR 医学1, 33, 39, 78, 85 (1981) を参照.
- 2) Harris, R. K. and Mann, B. E. Eds. *NMR and Periodic Table*, Academic Press, London (1978).
- 3) Lambert, J. B. and Riddle, F. G. Eds. *The Multinuclear Approach to NMR Spectroscopy*, D. Reidel, Dordrecht (1982).
- 4) Shimizu, T., Nozawa, T. and Hatano, M. *J. Biochem.* **91**, 1951 (1982).
- 5) Shimizu, T. and Hatano, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 720 (1982).
- 6) Shimizu, T. and Hatano, M. *Biochem. Bio-*

- phys. Res. Commun.* **104**, 1356 (1982).
- 7) Shimizu, T., Kodaka, M. and Hatano, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**, 988 (1982).
- 8) Shimizu, T., Hatano, M., Nagao, S. and Nozawa, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**, 1112 (1982).
- 9) Shimizu, T. and Hatano, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 22 (1983).
- 10) Shimizu, T. and Hatano, M. *Inorg. Chim. Acta* **76**, L177 (1983).
- 11) Kodaka, M., Shimizu, T. and Hatano, M. *Inorg. Chim. Acta* **78**, L55 (1983).
- 12) Hatano, M. and Shimizu, T. *Inorg. Chim. Acta* **79**, 30 (1983).
- 13) Shimizu, T. and Hatano, M. *Inorg. Chim. Acta* **80**, L37 (1983).
- 14) 清水 透, 簇野昌弘, 化学の領域, **36**, 702 (1982).
- 15) 清水 透, 簇野昌弘, 第10回生体分子の構造に関する討論会予稿集, p.15 (1983) (投稿中).
- 16) Kodaka, M., Shimizu, T. and Hatano, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56**, 523 (1983).
- 17) Kodaka, M., Shimizu, T. and Hatano, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56**, 1181 (1983).
- 18) Shimizu, T. and Hatano, M. *FEBS Letters* **160**, 182 (1983).
- 19) Shimizu, T., Hatano, M., Muto, Y. and Nozawa, Y. *FEBS Letters* **166**, 373 (1984).
- 20) Shimizu, T. and Hatano, M. *Biophysics* **23**, S263 (1983) (Abstract) (投稿中).