
原 著

生体高分子系のプロトン 核磁気緩和。交叉緩和と その応用

Proton Magnetic Relaxation of
Biopolymer Systems. Cross Re-
laxation and Its Application.

赤坂一之 (京都大学理学部化学教室)

..... キーワード

スピン-格子緩和時間 (T_1), 交叉緩和, 交叉緩和時間 (T_{1s}), スピン拡散, 緩和の sink 選択的ラジオ波照射, 飽和, 核オーバーハウザー効果 (NOE), 双極子磁場, 分子運動, 相関時間, 分子間相互作用, タンパク質, *Streptomyces Subtilisin Inhibitor* (SSI).

..... 要 旨

プロトンのたて緩和において重要な役割りを果たす交叉緩和について述べる。まず簡単に理論的背景を述べ、次いでタンパク質の水溶液 (重水) を例として、交叉緩和の効果について述べる。これらの系では、信号の一部を選択的にラジオ波照射した場合、ほぼすべてのプロトンのたて緩和時間の著しい減少、信号強度の著しい減少から観測された。これらの現象は交叉緩和に基づくプロトン間のスピン拡散で説明されるが、これは生体高分子系 (生体組織を含む) における一般的な現象であるので、医学的応用においても注意が必要である。一方、このスピン拡散を積極的に利用すれば、(1) 分子運動の速さや分子の大きさによる信号の分離、(2) 分子間相互作用の検出、に有効であることを実例によって示す。

1 緒言

核磁気共鳴の医学的応用においては、プロトン緩和時間が重要な情報源の1つである。生体組織は一般に水を含む生体高分子系であり、このような系でのプロトン緩和においては「交叉緩和」なるものが重要な働きを示す。さらに交叉緩和の結果として「スピン拡散」の現象が生じる。プロトンの T_1 を測定するとき、これらの現象は測定の仕方によって異った寄与をするため、これらに対する考慮を払わなければ実験結果を適切に理解することができない。

この報文では、タンパク質の重水水溶液系についてこのことを具体的に示し、さらにスピン拡散を積極的に利用した研究について言及する。

2 プロトン緩和の理論的背景

常磁性イオン等の効果が充分無視できる場合、プロトンの緩和(たて緩和, 横緩和)は近隣プロトンから受ける双極子磁場の大きさと、それを揺動させる分子運動とによって規定されることは既に確立されている¹⁾。今プロトン2個だけを考えて、これらのプロトン(1, 2)のたて磁化 $\langle I_1 \rangle$, $\langle I_2 \rangle$ の時間変化(緩和)は次式で与えられる²⁾。

$$\frac{d\langle I_1 \rangle}{dt} = -\rho_{12}(\langle I_1 \rangle - I_1^0) - \sigma_{12}(\langle I_2 \rangle - I_2^0) \quad (1a)$$

$$\frac{d\langle I_2 \rangle}{dt} = -\rho_{21}(\langle I_2 \rangle - I_2^0) - \sigma_{21}(\langle I_1 \rangle - I_1^0) \quad (1b)$$

ρ_{12} , ρ_{21} , σ_{12} , σ_{21} は双極子磁場の大きさと分子運動の内容によって決定される定数で、その具体的な形は後で述べる。(1a), (1b)式で重要なことは、右辺第2項(交叉緩和項)の存在によって、 $\langle I_1 \rangle$ の緩和には $\langle I_2 \rangle$ が、 $\langle I_2 \rangle$ の緩和には $\langle I_1 \rangle$ が効いてくることである。即ち双極子機構による緩和の場合、お互の緩和は独立ではない。高分子系

でのプロトンたて緩和において、この交叉緩和項((1a), (1b)の第2項)は特に量要な働きをするので、このことに対する理解なしにはプロトンのたて緩和を論ずることはできない。

分子の内部運動は無視できるとし且つ分子は全体として等方的に回転している(正しくは“回転拡散”している)とすると、 ρ_{12} , ρ_{21} , σ_{12} , σ_{21} は次式で与えられる¹⁾。

$$\begin{cases} \rho_{12} = \rho_{21} = K_{12} \left\{ \frac{1}{10} \right\} \\ \times \left\{ \tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right\} \\ \sigma_{12} = \sigma_{21} = K_{12} \left\{ \frac{1}{10} \right\} \left\{ -\tau_c + \frac{6\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} \right\} \end{cases} \quad (2)$$

$$\quad (3)$$

$$K_{12} = \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r_{12}^6} \quad (4)$$

但し ω_0 はラーモア角周波数 ($\omega_0 = 2\pi\nu_0$), τ_c は分子の回転拡散の相関時間である。大切なことは ρ_{12} があらゆる τ_c の値に対して常に正の値をとるのに対し、交叉緩和項の係数 σ_{12} は τ_c の増大に伴って正から負へと変化することである ($\omega_0 \tau_c = 1.12$ のときに $\sigma_{12} = \sigma_{21} = 0$)。この様子を(1b)式の第1項と第2項の係数の比(σ_{21}/ρ_{21})として表わしたのが図1である。この比 σ_{21}/ρ_{21} はプロトン1の吸収を飽和 ($\langle I_1 \rangle = 0$) させたときのプロトン2の吸収強度の変化の割合(核オーバーハウザー効果, NOE)そのものに等しい。 σ_{21}/ρ_{21} の値が0であることはプロトン2の吸収強度に変化がないことを示し、-1であることはその吸収強度が100%減少、即ちゼロになることを意味する。横軸には τ_c の他に分子量が目盛っているが、これはタンパク質を念頭において、Stokes-Einsteinの関係式

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta a^3}{3kT} = \frac{M\bar{V}\eta}{RT} \quad (5)$$

(a : 分子半径, M : 分子量, \bar{V} : 部分比容, η : 粘度)より導いたものである。

測定周波数 ($\nu_0 = \omega_0/2\pi$) によって多少異なる

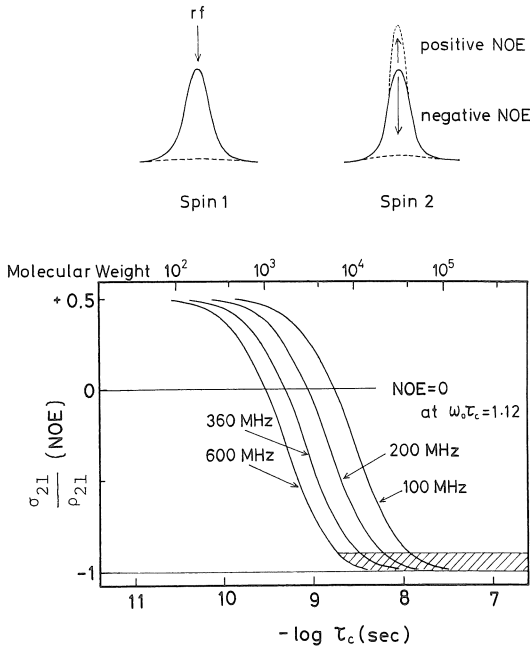


図1 孤立した2プロトン系において、プロトンスピ1に選択的にラジオ波を加えて、その信号を飽和させたとき、プロトンスピ2の信号強度を、測定周波数 $\nu_0 (\nu_0 = \omega_0 / 2\pi)$ をパラメータとし、 τ_c (分子運動の相関時間—但し球状分子の回転拡散を仮定した場合) の関数として表したもの (=核オーバーハウザー効果=NOE= σ_{21}/ρ_{21} , 式(1)参照). 斜線部分はスピ拡散が顕著と考えられる領域を示す。

が、分子量数万以上のタンパク質においてはおしなべて σ_{21}/ρ_{21} の比は -1 に近い。即ち、これらの系ではプロトン1の吸収の飽和は、それに隣接するプロトン2の吸収強度をほとんどゼロにしてしまう、即ち飽和させてしまう(交叉飽和, 負のNOE)。仮りにプロトンが次々と双極子相互作用の鎖でつながっていれば(生体高分子の内部は大抵こうなっているのだが), この飽和は次々とプロトンの鎖を伝わってゆくことになる。このようなスピンの励起状態の拡散を“スピ拡散”と呼んでいる³⁾。

このことは次のようにいうこともできる。今スピ1を選択的に励起したときに(飽和は一種の励起である), その励起エネルギーの行方は2つある(図2)。1つはそのまま分子運動(熱エネルギー)へ渡ってしまう場合で、これが“スピ-格子緩和”と呼ばれる過程である。もう1つは、スピ1の励起エネルギーがスピ2の励起に使われることで、プロトン間が双極子結合で強固に結ばれている固体中ではこの過程が極めて効率よく起こることが知られている。最近になって、溶液中の生体高分子でも、後者の過程が無視できないばかりか極めて重要であることがわかってきた^{4~11)}。

このようにして、スピンの励起エネルギーが次々と伝播するとき、その最終的行先はどうかという、そのうちにスピ-格子緩和の起り易い部

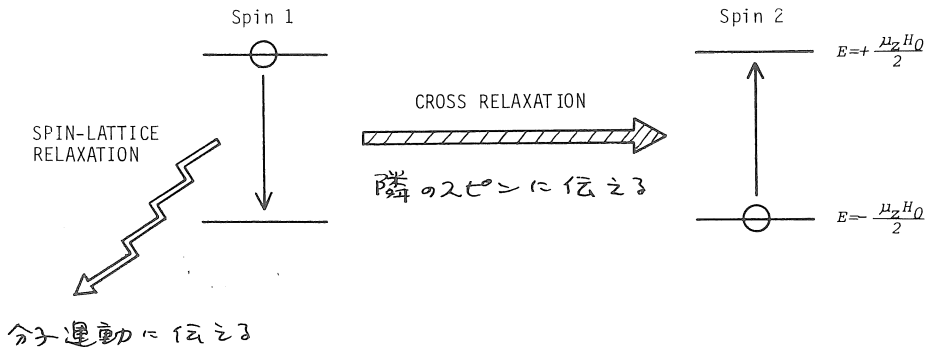


図2 励起されたプロトン1のゼーマンエネルギーが、他のエネルギーに変換される2つの過程

位にぶつかりそこで分子運動の励起に使われて熱エネルギーに転換することになる。このような部位を“緩和の sink”と呼び、そこは分子運動の盛んな部位である。具体的には、生体高分子の場合、内部回転しているメチル基や溶媒と接している分子表面がこれに当たると考えられる。一般にプロトンのため緩和時間が、固体でも高分子溶液でも、あるいは生体組織においても、数百ミリ秒から1秒程度であり、余り大きな差異を生じない原因の1つは、プロトン系のため緩和の機構が、これらの“緩和の sink”で起こり、それが各系に多くの場合共通のもの（例えばメチル基の回転）であることに因ると考えられる。

3 実験

すべてのタンパク質の ¹H-NMR 測定は、外径 5 mm の試料管を用い、重水 (99.8%) 溶液中、pH 7, 25°C にて行った。用いた装置は Bruker 社製 HX-360 (360 MHz), および WH-400 (400 MHz) 高分解能 NMR 装置である。

交叉飽和の実験は図 3 に示すパルス系列により

行った。presaturation パルスの出力は $\gamma H_2/2\pi = 50 \sim 70 \text{ Hz}$ 程度に選んだ。交叉飽和下での T_1 測定は、図 3 のパルス系列で presaturation パルスの途中に 180° 反転パルスを加えることにより行った。

4 交叉緩和に基く現象とその応用

タンパク質の重水溶液中でのプロトン測定を例にとって、交叉緩和の影響が実際にどのように現われ、又それを利用してどのような情報が得られるかについて、著者の考えを提案したい。

A たて緩和時間 (T_1) への影響

交叉緩和項 ((1a) (1b) の第 2 項) の影響によって、通常のプロトン T_1 測定 (すべての磁化を同時に反転又は飽和させる) においてはその値は、先に述べたようにほとんど緩和の sink の性質で決り、個々のプロトンの局所的な環境を余り反映しなくなる。即ち、 T_1 はほとんどすべてのプロトンについて均一な値をもつようになる。

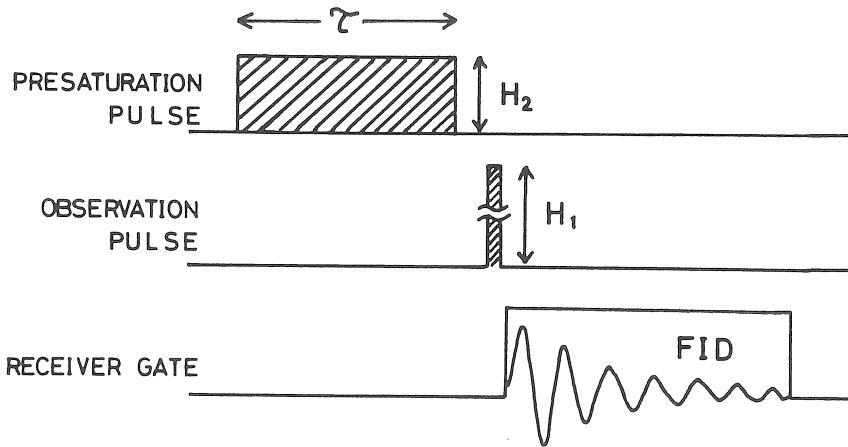


図 3 選択的ラジオ波照射 (presaturation パルス) による交叉飽和のためのパルス系列。
 H_2 により選択照射を行い、 H_1 によりすべての信号を検出した後、FID をフーリエ変換する。 τ を変えることにより、交叉飽和の時間依存性を測定できる (図 6 参照)。

このことをもう少し定量的にみてみよう。今、簡単のために2個のプロトンのみよりなる系について考えると、(1)式を2個のプロトンを同時に反転した場合について解くと、プロトン1、プロトン2に共通に

$$T_1^{-1}{}_{\text{nonselect}} = \rho_{21} + \sigma_{21} = \rho_{12} + \sigma_{12} \quad (6)$$

ところで図1でみたとおり、 τ_c の大きい高分子では $\sigma_{21}/\rho_{21} \approx -1$ 即ち $\sigma_{21} \approx -\rho_{21}$ であるため、

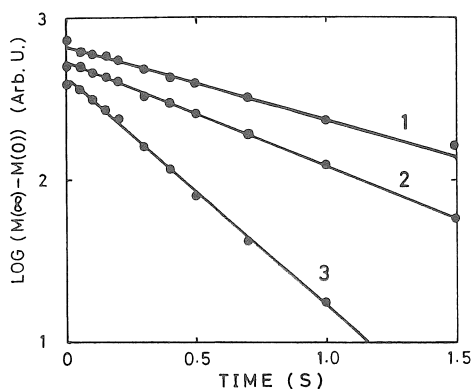
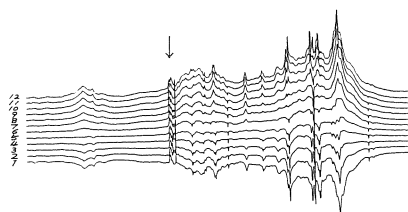


図4 上図は SSI の重水溶液 (23mg/ml, pH 7) のプロトンたて緩和に及ぼすラジオ波照射の影響 (20°C, 360 MHz)。ラジオ波 (H_2) は矢印の位置 ($\delta=4.82$, HDO 吸収の位置)に下記に示す時間加えた。

- 1: 1 msec, 2: 50 msec, 3: 100 msec,
- 4: 50 msec, 5: 200 msec, 6: 300 msec,
- 7: 400 msec, 8: 500 msec, 9: 700 msec,
- 10: 1 sec, 11: 1.5 sec, 12: 3 sec.

下図は磁化の時間変化 ($M(\tau) - M(\infty)$) の片対数プロット (1: $\gamma H_2/2\pi=0\text{Hz}$, 2: $\gamma H_2/2\pi=8\text{Hz}$, 3: $\gamma H_2/2\pi=24\text{Hz}$)。 (文献 10)。

$T_1^{-1}{}_{\text{nonselect}} = \rho_{21} + \sigma_{21} \approx 0$ となる。即ち、 T_1 は著しく長くなり、交叉緩和が支配的となって、いくつものスピンの相互作用している系ではスピン拡散が起こる。その結果、プロトンの緩和は $\rho_{ij} + \sigma_{ij}$ が比較的大きな値をもつ“緩和の sink”で支配的に起こるようになるのである。

ところが、今スピン1の T_1 測定に際して予めスピン2を飽和させておいてから、スピン1を反転させてそのたて磁化の回復速度を測ることを考える (選択的 T_1 測定)。この場合 (1a) 式の右辺第2項は定数となって緩和に寄与しないから

$$T_1^{-1}{}_{\text{select}} = \rho_{21} \quad (7)$$

ρ_{21} 自身は正の値をもち、 τ_c と共に増大する量であるから ((2) 式)、 $T_{1\text{select}}$ は $T_{1\text{nonselect}}$ とは全く異なり、極めて短い (数ミリ秒から数十ミリ秒) 値をもつ。即ち交叉緩和がある系でそのプロトン系の一部を選択的にラジオ波照射すると、他のプロトンの緩和が著しく短縮される。

実際の生体高分子では1つのプロトンは他の多くのプロトンと双極子結合で結ばれているため、(6)、(7) 式のような定量的な取扱いは容易でない。この場合には、1つのプロトンの飽和はこれと遠く離れた他のプロトンの緩和に対して、交叉飽和とスピン拡散を通じて、影響を与えることができる。これを現象論的に表わすために、先に著者¹⁰⁾は T_{IS} なる量を導入し、ラジオ波照射を直接受けるプロトン系 S とこの影響の下に緩和するプロトン系 I との交叉緩和時間とした (図5)。

即ち、プロトン I はそれがもともと持っている天然の緩和の sink (メチル基の回転など) に加えて、新たに人工的な緩和の sink (S) をもつことになり、その分だけ緩和が速められることになる。即ちラジオ波照射下でのたて緩和時間を T_1 とすると

$$T_1^{-1} = T_1^{-1} + T_{IS}^{-1} \quad (8)$$

ここで S プロトンの数に対して I プロトンの数が余り多くないときは、(8) 式右辺の T_1 はラジオ波照射しない時の T_1 とほぼ等しいと考えること

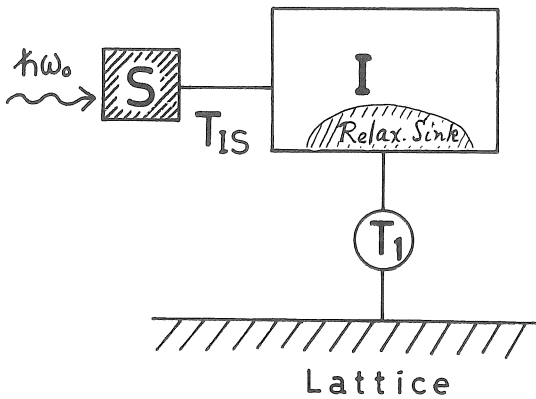


図5 高分子系のプロトン緩和過程を示す模式図。通常のスピン-格子緩和 T_1 (多くは緩和の sink を通じて起こる) と選択的ラジオ波照射されたプロトンスピン S への交叉緩和 T_{1s} の2つの過程が存在する。

ができるので、(8) 式から T_{1s} を実験的に求めることができる¹⁰⁾。

T_{1s} は“みかけ”の交叉緩和時間であるため、ラジオ波出力 (即ち H_2 の大きさ) とスペクトル上での照射位置 (即ち、どれだけの数のプロトンが直接飽和されるか) に依存するが、これが一定の場合には、 S スピンと I スピンの間の双極子結合の強さ (又はスピン拡散 α 効率)、つまりプロトン間距離と分子の運動性に顕著に依存するパラメータである点が注目される。このパラメータ T_{1s} の応用の1つとして、タンパク質分子内での残基の相対的露出度や運動性が議論された¹¹⁾。

B スペクトル強度への影響

上で述べたように、スピン拡散が顕著に起こる生体高分子系においては、スペクトルの一部のラジオ波による選択的照射は、スペクトル全領域にわたるプロトンの緩和時間に影響を与えるのみでなく、その吸収強度を著しく減ずることは前にも述べた。図6はタンパク質 *Streptomyces subtilisin inhibitor* (SSI) (分子量 23000) の

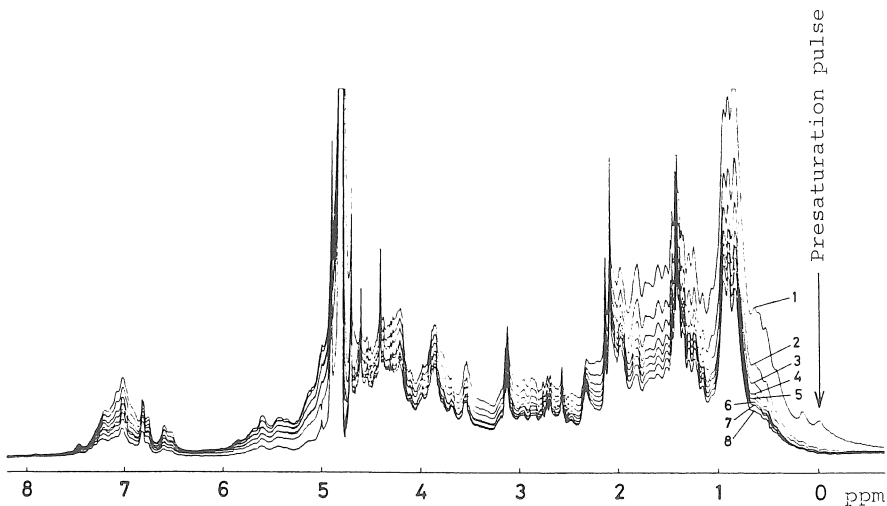


図6 スピン拡散に基づくスペクトル強度の変化 (文献 11)。スペクトルの一部の選択的ラジオ波照射が、全スペクトル領域に及ぶ。試料は SSI (43 mg/ml 重水中, pH 7)。測定は 20°C , 400 MHz, $\gamma H_2/2\pi \sim 70\text{ Hz}$ にて行った。

1: 1 msec, 2: 100 msec, 3: 200 msec, 4: 300 msec, 5: 400 msec, 6: 500 msec, 7: 800 msec, 8: 2000 msec.

400 MHz ^1H NMRスペクトルにおけるこのような例を示すものである¹¹⁾.

このような飽和の移動が起こるのは、 $\omega_0\tau_c \gg 1$ を満足する場合(図1の斜線部分)であり、 $\omega_0\tau_c \leq 1$ の場合(低分子や高分子の速い運動領域)では、NOEが0又は正であり、吸収強度は逆に増

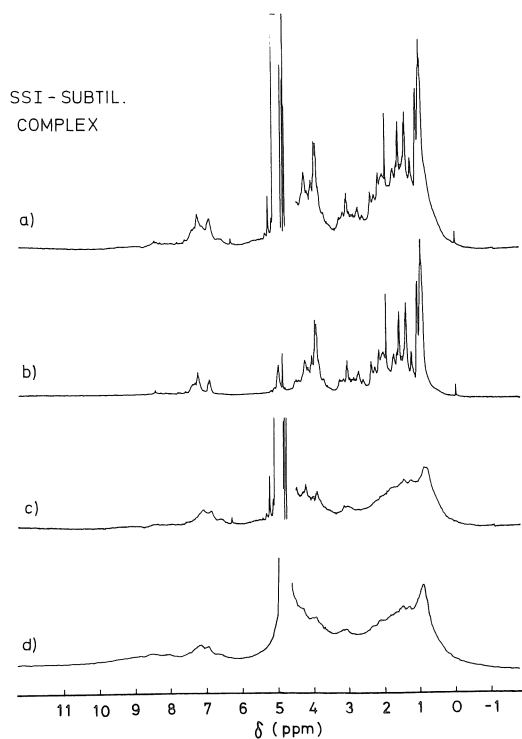


図7 スピン拡散の効率の違いを利用した高分子と低分子のスペクトルの分離.

高分子=SSI-subtilisin BPN' 複合体 (分子量の78000)

低分子=subtilisin BPN'の分解したペプチド

(a) 通常測定によるスペクトル
(b) HDOの位置(タンパク質の α プロトンの吸収位置)に presaturation パルスを加えた直後

(c) (a)-(b)

(d) 低分子成分をクロマトグラフィーにより取除いた後の高分子成分のみの通常スペクトル。(c)との類似性に注目.

大きえする. 高分子と低分子のこのようなスピンドイナミックスの違いを利用すれば, 両者が共存し, それらのスペクトルが重なり合う場合に, 高分子の信号を選択的に飽和し, 低分子のみの信号をとり出す. あるいはその逆をすることができる. 図7はこの例を示すもので, 高分子(実際はSSIとsubtilisin BPN'との複合体,分子量78000)とペプチド(subtilisin BPN'の分解物)の重水溶液である. a)は通常のスぺクトル, b)は水(HDO)の位置に presaturation パルスを加えた直後のもので c)はその差である. 即ち, presaturation パルスを加えることによって, 全スペクトル領域に及ぶ c)の成分が消失したことになる. HDO以外の位置にスペクトル変化が及んでいるのはスピン拡散によるものである. この幅広いスペクトル成分は d)と一致するが, d)は純粋なタンパク質成分(SSI-subtilisin complex)のスペクトルであり, c)がこれと一致するということは, スピン拡散がタンパク質成分全体に及ぶこと, しかし低分子のペプチドには及ばないことを示している. このようにスピン拡散現象を利用することにより, 低分子成分(b)と高分子成分(c)とをスペクトル上で分離観測することができる.

一般に細胞等の生体系を直接プロトンNMRの観測対象とするとき, 種々の高分子成分と低分子成分が混在している. このような場合に幅広い高分子成分によって, 低分子成分の信号が覆い隠され観測され難くなる. この場合, スペクトルの一部(例えば水の共鳴位置)を選択的に照射することにより, 幅広い高分子の全スペクトル成分を消失させ, 必要な低分子成分の信号を浮き上らせて観測に供することが可能となる.

同一の方法は同じ生体高分子(例タンパク質)内の固い領域と柔らかい領域の識別に極めて便利な方法である^{6,11)}.

C 分子間相互作用の検出

図7ではタンパク質成分とペプチド成分には相

相互作用がなく両者はスペクトル上で明瞭に分離された。しかしもしある高分子と低分子（リガンド）が共存し且つ両者の間に相互作用があるとするれば、事情は異ってくる。即ちもし両者間で複合体形成が起きれば、高分子成分のプロトンの飽和は、それに結合した低分子成分のプロトンをも飽和するだろう。さらに飽和された低分子成分は飽和していない遊離の低分子成分と一般に化学交換するから、結局は遊離の低分子成分（リガンド）もすべて飽和を受けるようになる。

図8はこの一例を示す。即ち、タンパク質ミオシン（分子量45万）を含む重水溶液系において、ミオシンの信号の一部をラジオ波で選択照射するとその飽和は溶媒の水（HDO）に伝わって後者の

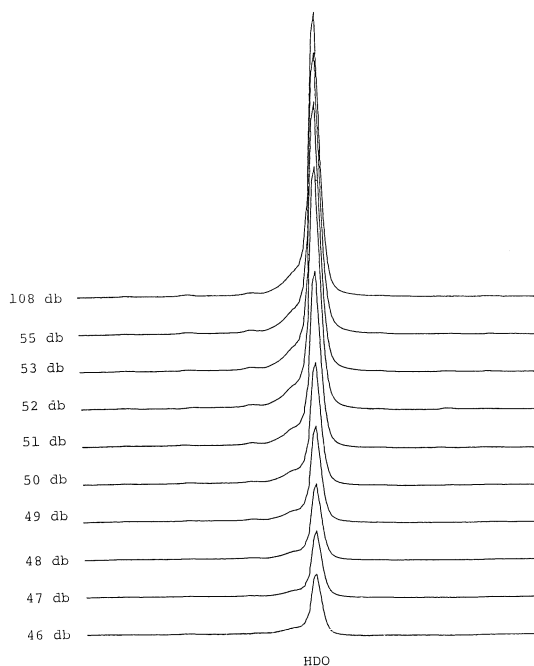


図8 ミオシンの重水溶液中におけるミオシンプロトンから水（HDO）への交叉飽和の実験。ラジオ波（ H_2 ）はHDOから10ppm高磁場例（ミオシンの吸収のすその部分）に照射（照射時間 $\tau=2$ sec）。数字はラジオ波 H_2 の減衰をデシベル単位で示す。

信号をも減少させる。照射ラジオ波の出力を増大すれば、HDO信号の飽和も顕著になる⁸⁾。

一般に、高分子成分のプロトンの吸収を完全に飽和し続けるとき、遊離のリガンドのプロトンの吸収強度 I^∞ は

$$\frac{I^0 - I^\infty}{I^\infty} = \frac{f_B T_1}{\tau_B + T_{st}} \quad (8)$$

で与えられる。ここに I_0 は飽和前のリガンドプロトンの吸収強度、 T_1 は遊離リガンドの T_1 、 f_B はリガンドの結合されている割合、 τ_B は結合状態の寿命、 T_{st} は結合リガンドプロトンが高分子プロトンから受ける飽和の時定数である。今、仮にリガンドと高分子間に相互作用がないとすると T_{st} は ∞ となり(8)式の右辺はゼロとなる。即ち飽和はリガンドへは伝わらない。逆に相互作用が充分強いと $T_{st} \approx 0$ となり(8)式の右辺は $\approx f_B T_1 / \tau_B$ となって T_1 を予め測定しておけば f_B と τ_B の比が求められる。仮りに f_B がわかっているれば τ_B 、即ちoff-rate constantの逆数が求められることになる。

このような定量的解析を行わなくても、高分子からリガンドへの飽和移動が観測されるか否かによって両者に相互作用があるか否かが容易に判定できる。

タンパク質から水へと飽和が伝わる決定的な証拠は図9の例にみられる。即ち、ここにはあるタンパク質（SSI-subtilisin複合体）の ^1H NMRスペクトル（細線）と、飽和用ラジオ波（ f_2 ）の照射位置の函数としての水（HDO）の信号の飽和度（太実線）を示してある。後者の実線がタンパク質の ^1H NMRスペクトルに近い形を示すことから、このタンパク質のラジオ波による飽和が、リガンドとしての水を通じて系全体の水（HDO）に伝わったことが明らかである。

この“分子間スピン拡散”の方法の1つの利点は、高分子成分の信号が幅広くて観測し難い場合でも、リガンドの信号さえ観測できれば適用が可能である点である。このことに注目すれば、細胞

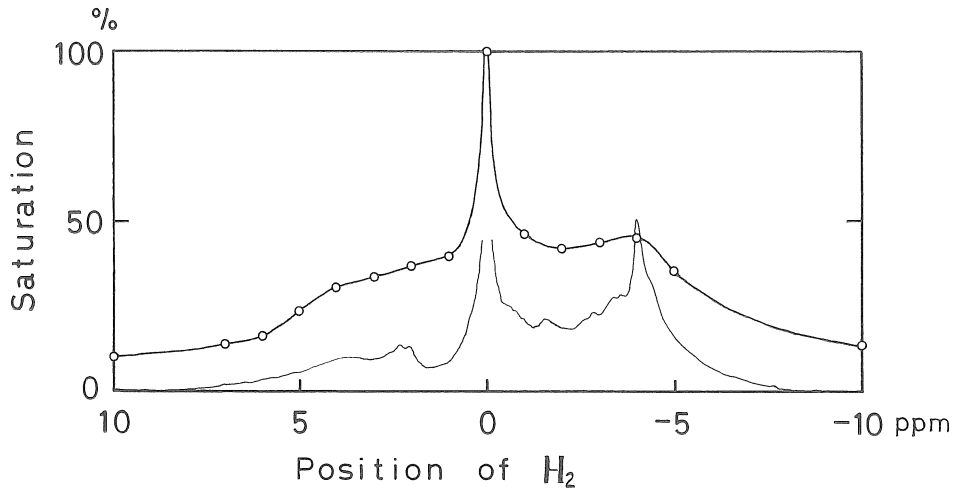


図 9 タンパク質-水 (HDO) 系における交叉飽和の action spectrum. タンパク質=SSI-subtilisin BPN' 複合体. 重水中, pH7. 測定は 25°C, 360 MHz. ラジオ波 (H_2) 照射位置の関数として, HDO 信号の飽和度を示す action spectrum (太実線)とタンパク質自身の NMR 吸収スペクトル (細実線) とが類似していることに注目.

成分と医薬品との相互作用を調べる等の目的にも簡便な方法として利用できることを指摘しておこう.

文 献

- 1) フェラー・ベッカー「パルスおよびフーリエ変換 NMR—理論および方法への入門」(赤坂, 井元訳および補遺) 吉岡書店, 1983.
- 2) I. Solomon, *Physical Review* **99**, 126 (1961).
- 3) 赤坂一之, *化学* **34**, 338 (1979).
- 4) A. Kalk and J. J. C. Berendsen, *J. Magn. Reson.* **24**, 343 (1976).
- 5) B. D. Sykes, W. E. Hull and G. H. Snyder, *Biophys. J.* **21**, 137 (1978).
- 6) K. Akasaka, M. Konrad and R. S. Goody, *FEBS Lett.* **91**, 320 (1978).
- 7) A. A. Bothner-by and P. E. Johner, *Biophys. J.* **24**, 779 (1978).
- 8) K. Akasaka, *J. Magn. Reson.* **36**, 135 (1979).
- 9) A. Kumar, G. Wagner, R. R. Ernst and K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3654 (1981).
- 10) K. Akasaka, *J. Magn. Reson.* **45**, 337 (1981).
- 11) K. Akasaka, *J. Magn. Reson.* **51**, 14 (1983).