

“時間依存性 NOE” による
水分子-高分子プロトン間交
差緩和速度の検討

Evaluation of the Cross Relaxation Rate between Water Protons and Macromolecule Protons by “Time Dependent NOE”

麻生正邦 (富山医科薬科大学医学部放射線医学教室)
亀井哲也 (同 上)
石崎良夫 (同 上)
柿下正雄 (同 上)

キーワード

cross relaxation rate, water-macromolecule system, spin diffusion, nuclear Overhauser effect

要 旨

We attempted to obtain the cross relaxation rate between the water protons (WP) and the macromolecule protons (MP) in red blood cell sediments by analyzing the time dependence of nuclear Overhauser effect (NOE), based on the cross relaxation model formulated by Koenig and co-workers. Using the effect of spin diffusion, the MP signal was saturated selectively with radio-frequency pulse (pre-saturation pulse,) and then the successive change was measured as a function of the length of the pre-saturation pulse. Factors affecting the change in intensity of the WP signal, such as “chemical exchange” and “partial saturation”, were also investigated, and they were found to be negligible on our experimental conditions. This method appears to be useful to obtain the cross relaxation rate easily and promptly.

1 はじめに

生体組織において、水分子プロトンの縦緩和時間は短縮することが知られている。これを説明するものとして、従来より数種のモデルが提案されているが、近年、高分子表面における水分子プロトンと高分子プロトンとの交差緩和 (cross relaxation) が主因であるとする説が認められてきている¹⁾。この交差緩和の存在は、タンパク結晶に水和した水分子のプロトンが非指数関数的縦緩和を呈することから、その因として指摘されたものであるが^{2,3)}、Edzes と Samulski により、コラーゲンに水和した水分子のプロトンの磁化の挙動を記述する際にこの交差緩和の影響が考慮され⁴⁾、さらに、Koenig ら⁵⁾ や Eisenstadt ら⁶⁾ により、タンパク (高分子) 水溶液中の水分子プロトンの磁化の挙動を記述する際にもこの機序が適用されている。そこで我々は、Koenig らの交差緩和モデル⁵⁾ に基づき、高分子水溶液中の水分子プロトンと高分子プロトンを 2 スピン系 (two-spin system) で近似し、スピンドiffusion) を利用して高分子プロトンシグナルをラジオ波で選択的に飽和させ、この際水分子プロトンシグナルに見られる NOE (nuclear Overhauser effect) のラジオ波照射時間依存性より、両系間の交差緩和速度を算出すること——時間依存性 NOE——を試みた。

なお、同様の交差緩和速度を算出するのに、水分子プロトンの選択的縦緩和時間と非選択的縦緩和時間との差違を利用する方法が報告されているが⁷⁾、水分子プロトンと高分子プロトンとのシグナル上の重なりを考慮した場合、その“選択性”

には難のあるものと考えられる。

ここでは、“時間依存性 NOE” が、水分子-高分子プロトン間交差緩和速度を近似的に算出するのに有用であることを示すと共に、この交差緩和速度が Koenig らのモデルに特有のものであることをも明らかにする。

2 理 論

Koenig らの交差緩和モデルでは、高分子水溶液中の水分子プロトンと高分子プロトンは、磁氣的相互作用を有する独立の熱力学系として扱われる。高分子水溶液中の水分子の存在状態に関しては、種々のモデルが提案されているが、高分子表面における水分子の滞在時間 (residence time) は $10^{-5} \sim 10^{-6}$ のオーダーであり^{8,9,10)}、水分子相互間で極めて速い交換が行われている。一方、高分子プロトンでは、一般に $\omega \cdot \tau_c \gg 1$ (ω は共鳴角周波数、 τ_c は高分子の回転拡散の相関時間。ただし、isotropic rigid sphere model を適用した場合) が成立し、分子内交差緩和に基づくスピンドiffusion) により、高分子プロトンは比較的短時間に均一なスピンドiffusion) 温度に到達する¹¹⁾。従って、緩和時間測定タイムスケールでは、水分子プロトンと高分子プロトンは磁氣的相互作用を有する独立の熱力学系と見做し得、2 スピン系で近似することができる。

ここに、高分子試料を重水に溶解した場合、高分子交換性プロトンの滞在時間が、一般に高分子表面における水分子のそれよりも長いことから (ただし、pH=7 付近で)¹²⁾、水分子プロトンと高分子交換性プロトンとの“化学交換 (chemical exchange)” が水分子プロトンの磁化の挙動に及ぼす影響は、水分子プロトンと高分子プロトンとの交差緩和のそれに比して軽微と考えられる。そこで、“化学交換”の影響を無視するならば、Koenig らの交差緩和モデルより、水分子プロトンの磁化成分の挙動は次式で記述される。

受 付 1985年4月8日
最終稿受付 1985年6月24日
別刷請求先 (〒930-01) 富山市杉谷2630
富山医科薬科大学放射線科
麻生正邦

“時間依存性 NOE” による水分子-高分子プロトン間交差緩和速度の検討

$$\frac{d}{dt} \cdot \frac{S-S_0}{S_0} = -(f \cdot R_s + R_c) \frac{S-S_0}{S_0} + R_c \cdot \frac{P-P_0}{P_0} \quad (1)$$

ただし、 S, P は水分子プロトンと高分子プロトンの磁化 Z 成分であり、 S_0, P_0 はそれぞれの平衡値。 R_s は水分子プロトンに固有の縦緩和速度。 R_c は 2 スピン系で近似した場合の水分子-高分子プロトン間交差緩和速度。 f は水分子全体中のプロトンと重水素原子の比である。

ここで、適当な（即ち、水分子プロトンシグナルに直接の影響を及ぼさない程度の）照射パワーレベル、照射位置で高分子プロトンシグナルをラジオ波照射し、スピン拡散により、十分に短い照射時間で高分子プロトンシグナル全域の飽和が得られるならば、

$$t \div 0 \text{ で } S \div S_0, P = 0 \quad (2)$$

となり、また、重水中では

$$f \cdot R_s \div 0 \quad (3)$$

の近似が成立する。そこで、ラジオ波照射下での水分子プロトンの磁化 Z 成分の挙動は、式 (1), (2), (3) より

$$\frac{d}{dt} \cdot \frac{S-S_0}{S_0} \div -R_c \left(1 + \frac{S-S_0}{S_0} \right) \quad (4)$$

となり、

$$\frac{S-S_0}{S_0} \div \exp(-R_c \cdot t) - 1 \quad (5)$$

が得られる。

以上より、交差緩和速度 (R_c) は、水分子プロトンシグナルに見られる NOE ファクター $\left(\frac{S-S_0}{S_0} \right)$ の時間的変化を解析することにより近似的に算出することができる。

3 試料と方法

試料調製：ヒト血液を EDTA 採血管にて採取し、生理食塩水で 1 回、等張食塩重水 ($D_2O > 99.75\%$) で 5 回の遠沈洗浄 (3000 r. p. m., 10 min)

後、上清及びホワイゾーンを除去して、残りの赤血球沈渣を試料とした。なお、6 回目の遠沈洗浄の際、血球浮遊液に一酸化炭素 ($CO \geq 99.9\%$) を 20 分間吹き込んで溶存酸素を置換した。試料は、上記操作後直ちに、一酸化炭素を充たした NMR 試料管 ($\phi 5 \text{ mm}$) に入れて密封した。

NMR 測定：装置は Varian XL-200 NMR spectrometer (1H : 200 MHz) を使用し、パルス系列は

$$[-T_{\text{pre-observation pulse}}(45^\circ) - T_a - T_a -]n$$

とした。ただし、 T_{pre} は pre-saturation pulse (以下 P. S. P.) の照射時間で変数、P. S. P. の照射位置は水分子プロトンシグナル中心より 900 Hz (4.5 ppm) 高磁場側の高分子プロトンシグナル領域内とした。 T_a はデータ取得時間で 1 sec, T_a は遅延時間で 12 sec, n は積算回数で 20 回とした。また、スペクトル幅は 10000 Hz に設定した。

4 結果と考察

図 1 は、P. S. P. 照射時間を変えて赤血球沈渣プロトン NMR スペクトルを観測したものである。ただし、P. S. P. の照射パワーレベル ($\gamma Hz / 2\pi$) は約 170 Hz とした。照射しない場合は、水分子プロトンのシャープなシグナルと共に、高分子プロトンのブロードなシグナル (aliphatic region 及び aromatic region) が認められる。高分子プロトンシグナルは、照射時間に比例して、急速で比較的均一な減衰を呈しており、スピン拡散の影響は顕著と考えられる。一方、水分子プロトンシグナルも照射時間に比例して緩徐な減衰を呈するが、図 2 は、P. S. P. 照射時間の関数として水分子プロトンの磁化 Z 成分 (S 値) をプロットしたものである。この場合、P. S. P. 照射位置と水分子プロトンシグナル端とが約 750 離れていることから、P. S. P. 照射の水分子プロトンシグナルへの直接影響（即ち、“部分飽和 partial saturation”）

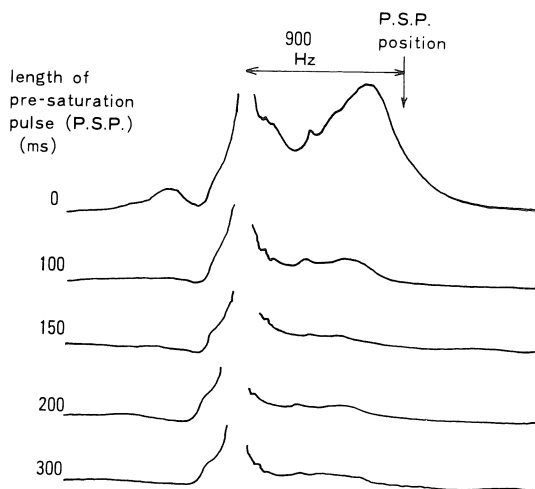


図 1

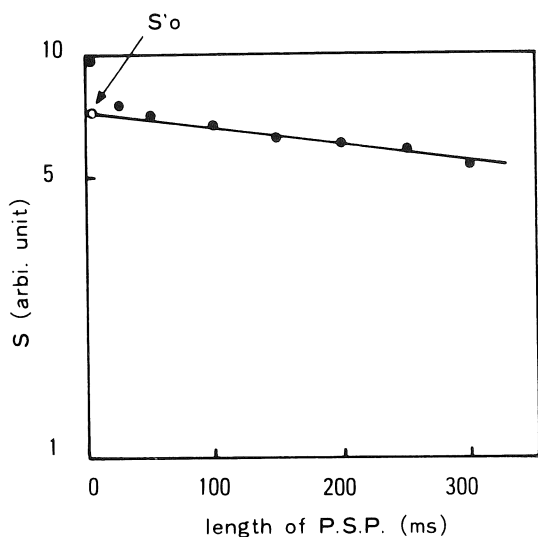


図 2

は無視できる程に軽微と考えられる。従って、 S 値の減衰は水分子-高分子プロトン間の磁化移動 (transfer of magnetization) によるものと見做されるが、水分子プロトンと高分子交換性プロトンとの“化学交換”の影響は軽微と考えられることから、この磁化移動の原因は、主と水分子-高分子プロトン間の交差緩和であると結論付けることが

できる。

ここで、P.S.P. 照射時間が 100 msec. 以下では、水分子プロトンと高分子プロトンとのシグナル上の重なりが著しいため (図 1), S 値は見掛けの非指数関数的減衰を示しているが、150 msec. 以上では、その減衰は指数関数性を呈している (図 2)。そこで、P.S.P. 照射時間が 150 msec. 以上での S 値の挙動を指数関数で近似し、これより 0 msec. での真の平衡値を求め、これを S_0' とするならば、図 1, 2 で見られるように、式 (2) の条件は近似的に満たされており、従って、 S 値の挙動は式 (5) で S_0 を S_0' で置き換えたもので近似することができ、交差緩和速度 $R_0 \approx 0.7 \text{ sec.}^{-1}$ が得られた。

〈水分子プロトンシグナルの“部分飽和”に関して〉

一般に、高分子プロトンシグナル領域内にラジオ波照射した場合は、照射による水分子プロトンシグナルの“部分飽和”を考慮しなければならない。しかし、我々の実験では、水分子プロトンシグナル端と P.S.P. 照射位置との距離 (約 750 Hz) が P.S.P. 照射パワーレベル (約 170 Hz) の 4 倍以上になるように設定しており、この場合には、“部分飽和”は無視できる程に軽微と考えられる¹³⁾。図 3 は、これを実験的に確認したものである。即ち、パルス系列、P.S.P. 照射パワーレベルは同じで、P.S.P. 照射時間を 700 msec. に固定し、P.S.P. 照射位置を移動させて、 S 値の変化を見たものである。この照射パワーレベル、照射時間では、図のどの位置で P.S.P. 照射した場合でも、高分子プロトンシグナルは十分に飽和されており、「高分子プロトンシグナルの分布に基づく、水分子-高分子プロトン間交差緩和の P.S.P. 照射位置依存性」¹⁴⁾ は消失しているものと考えられる。従って、ここで見られる S 値の差違は“部分飽和”の差違に基づくものである。ここに、水分子プロトンシグナル中心から 900 Hz 以上離れ

た位置を照射した場合、S 値に差違は無く、これらの照射位置では、P.S.P. 照射による水分子プロトンシグナルの“部分飽和”は無視できる程に軽微であることがわかる。

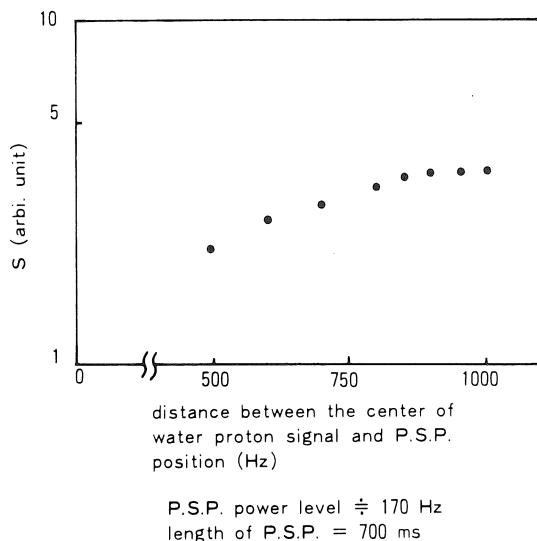


図 3

なお、高分子表面に滞在する水分子のプロトンシグナルはかなり広い線幅を持つことが予想されるが、その滞在時間が $10^{-5} \sim 10^{-6}$ sec. のオーダーであることから、水分子プロトンシグナルは交換による尖鋭化 (exchange narrowing) を呈するものと見做され、従って、これら高分子表面に滞在する水分子のプロトンシグナルを直接に P.S.P. 照射することの影響も無視できる程に軽微と考えられる。

〈水分子-高分子プロトン間の交差緩和に関して〉

Koenig らの交差緩和モデル (以下、K. モデル) は、高分子水溶液中の水分子プロトンの磁化の挙動を記述するものであるが、このモデルの基礎となっている Kalk と Berendsen のもの (以下、K.B. モデル) と比較した場合、以下の諸点において相違している。

(1) K.B. モデルは、高分子内のプロトンスピンの緩和を扱っているため、相関時間は高分子の回転拡散のもので定義されているが、K. モデルでは、相関時間に明確な定義がなされていない。

(2) K.B. モデルでは、交差緩和速度は “ $\omega_0 - \omega_2$ ” で定義されているが、K. モデルでは、交差緩和速度 R_c は “ $\omega_0 - \omega_2$ ” に比例するもの (即ち、高分子表面における水分子プロトンと高分子プロトンとの交差緩和の効果が、水分子相互間の交換によって平均化されたもの) であり、従って、高分子水溶液の濃度に依存するものとなっている。ここに、 ω_0, ω_2 は遷移確率である。

(3) K.B. モデルでは、スピン i の局所の縦緩和速度 ($R_{1, i}$) は、スピン j との双極子相互作用に基づくものであるが、K. モデルでは、 R_s は水分子プロトンに固有の縦緩和速度であり、高分子プロトンとの双極子相互作用が考慮されていない。

以上を鑑みるならば、交差緩和速度 R_c が K. モデルに特有のものであることは明らかであり、しかも、Koenig 自ら認めていることであるが、この K. モデルでは、高分子水溶液中の水分子プロトン縦緩和速度の観測周波数依存性を説明できないことも指摘されている¹⁵⁾。

従って、K. モデルは水分子プロトンの磁化の挙動を近似的に記述するものとして評価されるべきであり、我々の算出した交差緩和速度 R_c も、K. モデルにおける交差緩和速度という意味以上のものは持ち得ないと考えられる。

ここで、高分子水溶液中の水分子プロトンの縦緩和には種々の運動 (高分子の回転拡散や並進拡散、水分子の高分子表面における回転拡散や並進拡散、など) が関与しているものと考えられるが、一般に、分子間のプロトンスピン緩和には分子の並進拡散が主要な寄与をなしている¹⁶⁾。そして、この並進拡散に関するスペクトル密度関数 $J(\omega)$ はモデル依存性ではあるが¹⁷⁾、一例として

Hwang と Freed のものを挙げるならば、以下の如く記述される¹⁹⁾。

$$J(\omega) = \frac{8}{27} \cdot \frac{n}{Dd} \times R_c \left[1 + \frac{1}{4} Z / 1 + Z + \frac{4}{9} Z^2 + \frac{1}{9} Z^3 \right] \quad (6)$$

$$Z = \sqrt{i\omega\tau} = \sqrt{i\omega d^2 / D}$$

ただし、 n はプロトン密度、 D は相対的並進拡散係数、 d は分子間最接近距離、 τ は並進拡散の相関時間、 ω は共鳴角周波数である。ここに

$$W_0 - W_2 = \frac{3}{4} \gamma^4 \hbar^2 \left[\frac{1}{12} J_0(0) - \frac{3}{4} J_2(2\omega) \right]$$

であることから、 $2\omega\tau \gg 1$ が成立する場合には $W_0 - W_2 > 0$ となることがわかる。実際、我々の装置では $\omega = 2\pi \times 2 \times 10^8 \text{ rad sec}^{-1}$ であるが、高分子表面における水分子の並進拡散の相関時間 ($\tau_{\text{wat.}}$) が、 $2\omega\tau_{\text{wat.}} \gg 1$ を満たすことを示唆するものが報告されており¹⁹⁾、従って、我々の算出した交差緩和速度 R_c が正の値をとることに関しては、矛盾の無い結果が得られたものと考えられる。

最後に、式(6)から容易に予測されることであるが、タンパク水溶液においてタンパクの変性が生じた場合などで、プロトン密度 (n)、や並進拡散の相関時間 (τ) の変化を介して、水分子プロトンの縦緩和速度も変化することが考えられる。“時間依存性 NOE” はこれを検索する手段として有用と思われ、現在、我々は実験、検討中である。

5 謝 辞

稿を終えるにあたり、NMR spectrometer の使用に便宜を計って頂いた本学薬学部、吉井英一教授、小泉徹教授、的場勝英助教授、研究を遂行するにあたり、種々の御助言を賜った本学化学教室、永田正典教授、広上俊一助教授、そして、

NMR spectrometer 使用の際、種々の御助力を頂いた本学研究協力課、森腰正弘技官に多大なる謝意を表します。

本論文の要旨は、第 5 回核磁気共鳴医学研究大会 (1985 年 3 月、東京) にて発表した。

文 献

- 1) B. M. Fung, T. W. McGaughy: Magnetic relaxation in heterogenous system, *J. Magn. Reson.*, **43**: 316-323, 1981.
- 2) G. J. Kruger: Presented at Fourth International Symposium on Magnetic Resonance, Rehovot, Israel, 1971.
- 3) J. E. Jentoft, R. G. Bryant: Nuclear magnetic resonance relaxation in lysozyme crystals, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**: 297-299, 1974.
- 4) H. T. Edzes, E. T. Samulski: Cross relaxation and spin diffusion in the proton NMR of hydrated collagen, *Nature*, **265**: 521-523, 1977.
- 5) S. H. Koenig, R. G. Bryant, K. Hallenga, et al.: Magnetic cross relaxation among protons in protein solution, *Biochemistry*, **17**: 4348-4358, 1978.
- 6) M. Eisenstadt, M. E. Fabry: NMR relaxation of the hemoglobin-water proton spin system in red blood cells, *J. Magn. Reson.*, **29**: 591-597, 1978.
- 7) G. Valensin, N. Niccolai: Cross relaxation effects on the longitudinal relaxation rate of water in protein solution, *Chem. Phys. Letters*, **79**: 47-50, 1981.
- 8) S. H. Koenig, K. Hallenga, M. Shporer: Protein-water interaction studied by solvent ^1H , ^2H and ^{17}O magnetic relaxation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 2667-2671, 1975.
- 9) J. R. Grigera, H. J. C. Berendsen: The molecular details of collagen hydration, *Biopolymer*, **18**: 47-57, 1979.
- 10) J. G. Diegel, M. M. Pinter: Origin of the non-exponentiality of the water proton spin relaxation in tissues, *Biophys. J.*, **15**: 855-860, 1975.

- 11) A. Kalk, H. J. C. Berendsen: Proton magnetic relaxation and spin diffusion in proteins, *J. Magn. Reson.*, **24**: 343-366, 1976.
- 12) K. Wüthrich, G. Wagner: Nuclear magnetic resonance of labil protons in the basic pancreatic trypsin inhibitor, *J. Mol. Bio.*, **130**: 1-18, 1979.
- 13) C. M. Dobson, E. T. Olejniczak, F. M. Poulsen, et al.: Time development of proton nuclear Overhauser effects in proteins, *J. Magn. Reson.*, **48**: 97-110, 1982.
- 14) 赤坂一之: 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, *NMR 医学*, **4**: 48-56, 1984.
- 15) S. H. Koenig: The dynamics of water-protein interaction. *A. C. S. (Am. Chem. Soc.) Symp. Ser. Water.*, **127**: 157-176, 1980.
- 16) ファラー, ベッカー「パルスおよびフーリエ変換 NMR」(赤坂一之, 井元敏明共訳)吉岡書店, 京都, 1979, p. 73.
- 17) アブラガム「核の磁性 (下)」(富田和久, 田中基之共訳) 吉岡書店, 京都, 1975, p. 559.
- 18) L. P. Hwang, J. H. Freed: Dynamic effects of pair correlation functions on spin relaxation by translational diffusion in liquids, *J. Chem. Phys.*, **63**: 4017-4025, 1975.
- 19) B. Halle, T. Anderson, S. Frósen, et al.: Protein hydration from water oxygen-17 magnetic relaxation, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**: 500-508, 1981.