

2014年度 分子機能化学特論 第3回目 4月24日

2. 多核多次元NMRによる生体関連物質の分子構造解析

担当: 生物応用化学専攻 前田史郎

【授業の目標】

化学・生化学の分野で広く用いられているNMR法の原理と、タンパク質およびその生体関連物質との分子間相互作用を解明するのに用いられている各種NMR法を理解する。

【授業の内容（進展度合等）】

1. NMRの発展史 - どのように発展し、何をすることができるか-
2. NMRの原理と装置 - 量子力学的な基礎と測定装置のしくみ-
3. 2次元NMRの原理と応用 - COSY, J-分解, NOESYなど-
4. 多核2次元NMRの原理と応用 - HETCOR(CH-COSY)など-
5. インバース法の原理と応用 - HSQC, HMQC, HMBCなど-
6. 多核多次元NMRによる生体関連物質の分子構造解析
7. 固体高分解能NMRの基礎・固体NMRによる高分子化合物の物性評価

休講のお知らせ 5月15日(木) 補講は後ほど連絡します

1

4月17日

Q. 溶液NMR測定の際に、重クロロホルムに代表される重水素化溶媒を用いる理由を説明せよ。

[1]重水素のNMR信号を利用したNMRロックを用いて磁場と発振周波数の相対的な安定度を高めて高分解能測定を可能にする。超電導NMR装置では短時間なら、ロックなしでも測定可能である(オート測定はできない)。

[2]試料に比べて溶媒の量の方が多い、また溶媒のピークは一般に本数が少ない。したがって、プロトン(^1H)NMR測定では、試料のスペクトルではなく、溶媒ピークしか測定できないことになる。大きなピークがあると、ダイナミックレンジの問題があって小さなピークは観測できないか、定量性が良くない。生体系試料では $^1\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ を溶媒に使うこともあり、溶媒ピークをプリサチュレーションで消去する方法もあるが、選択性が良くないと溶媒ピーク近傍の試料ピークは測定できない。 ^{13}C などの多核NMR測定の際は長時間積分が必要な場合が多く、NMRロックをかけるために重水素化溶媒が必要となる。

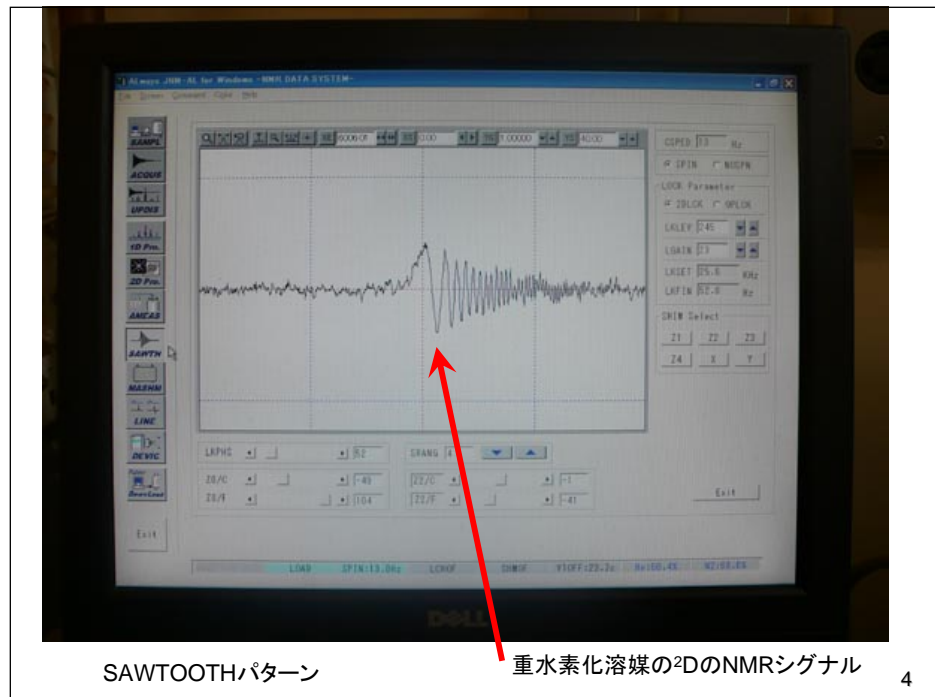
[3]重水素化溶媒のピークをリファレンスに利用することもある。

2

Q. 溶液NMR用の試料には、なぜ重水素化溶媒を用いるのか？

A. 溶液NMRの測定には 10^{-9} (0.001ppm)以上の安定度が必要であり、溶媒の重水素NMR信号を利用したNMRロックを掛けるため、NMR装置において時間的な変動の要因となる磁場および周波数シンセサイザの両方を独立に 10^{-9} 以上の安定度に保つことは容易でない。NMR室内に人が入ることによる室温の変動や超伝導磁石の近くを人が動くだけで磁場が乱れてしまう。ラジオ波周波数または磁場のどちらかが変動しても、両者の相対的な関係で表される共鳴条件 $\omega=\gamma H$ 、を高精度で制御するように工夫されたのがNMRロック機構である。

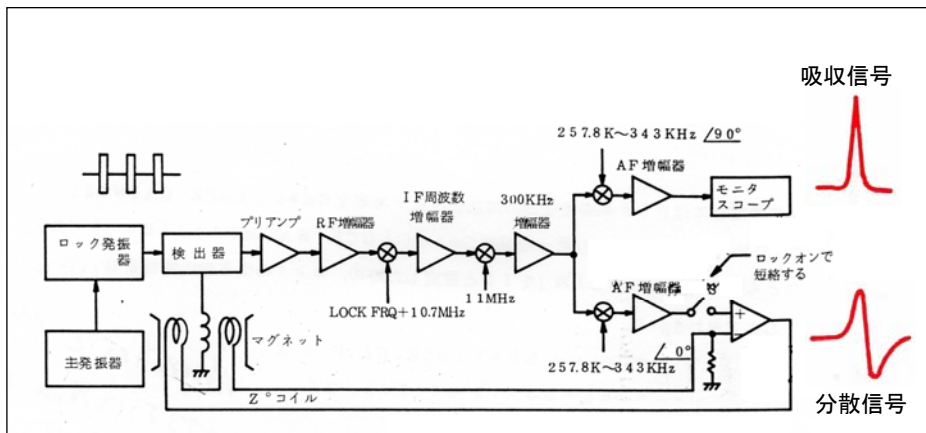
3



SAWTOOTHパターン

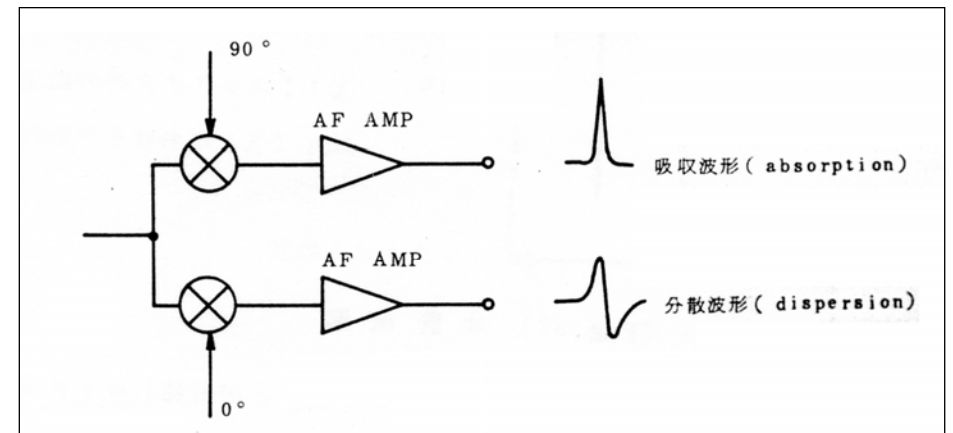
重水素化溶媒の ^2D のNMRシグナル

4



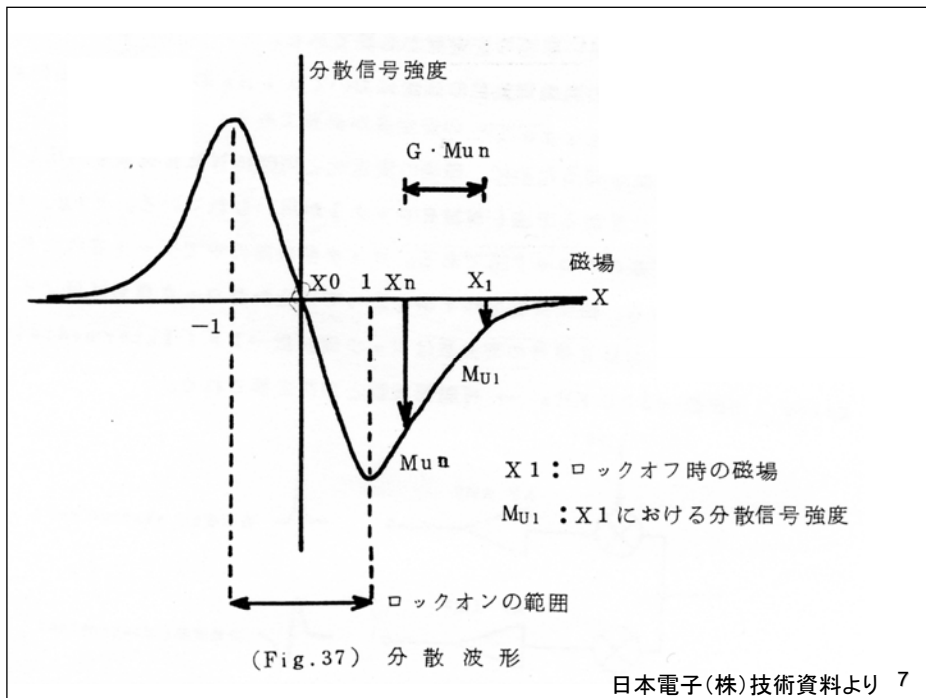
(Fig. 35) ロック系のブロック図

日本電子(株)技術資料より



(Fig. 36) ロック用受信器のAF段

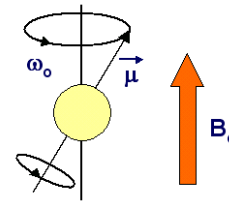
日本電子(株)技術資料より



(Fig. 37) 分散波形

日本電子(株)技術資料より 7

スピンの運動方程式(Bloch方程式)



静磁場 B_0 中におかれた磁気モーメント μ の核は、 B_0 と相互作用する。この相互作用による運動は角運動量 J の時間変化と考えると、

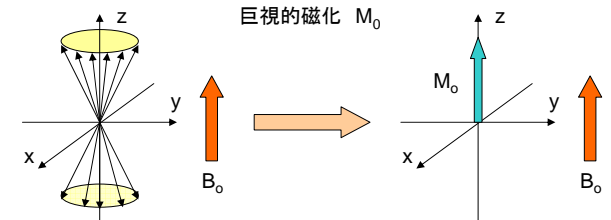
$$\frac{d\vec{J}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad \text{と表される。}$$

角運動量の時間変化はトルクに等しい。トルクとは、回転運動における回転軸まわりのモーメントであり、回転力を表わす。

$\vec{\mu} = \gamma \vec{J}$ だから、

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \times \vec{B}_0$$

ここで $\sum \vec{\mu}$ を考えてみる。

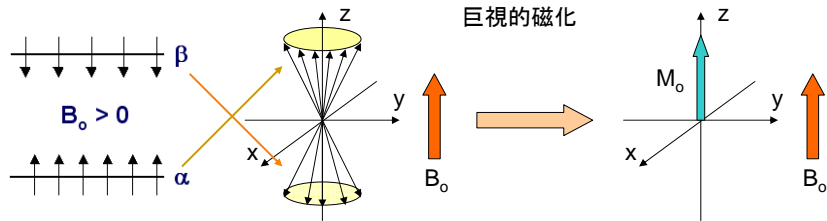


巨視的磁化(スピンの集合)の運動方程式(Bloch方程式)

$$\sum \vec{\mu} = \mathbf{M}_0 \text{ であるから, } \frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \text{ を } \mathbf{M}_0 \text{ で表わすと,}$$

$$\frac{d\mathbf{M}_0}{dt} = \gamma \mathbf{M}_0 \times \mathbf{B}_0 \quad \text{ここで、太字はベクトルを表わす.}$$

スピン分布と巨視的磁化との対応(共鳴現象の視覚化)



Bloch 方程式



Felix Bloch
Stanford University
Stanford, CA, USA
1905 - 1983

$$\frac{d\mathbf{M}_0}{dt} = \gamma \mathbf{M}_0 \times \mathbf{B}_0$$

この方程式は何を意味しているのか？

$B=(0,0,B_0)$ というように磁場 \mathbf{B} を適当に選ぶことにより、この方程式は核磁化が周波数 $\omega_0 = \gamma B_0$ で永久に歳差運動し続けることを示している。この式の中には磁化を熱平衡状態へ緩和させる項は含まれていない。

しかしながら、現実にはNMR実験は緩和する。

Bloch 方程式

そこで、Felix Bloch は基礎方程式に次のような修正を加えた。

$$\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt} = \mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t) - \mathbf{R}(\mathbf{M}(t) - \mathbf{M}_0)$$

熱平衡状態の磁化、 M_0 と異なる磁化に対して“緩和行列” \mathbf{R} が作用するように経験的な修正を加えた。

Bloch方程式は現象論的な方程式であり、理論的に導かれたものではない。

Bloch 方程式

そこで、Felix Bloch は基礎方程式に次のような修正を加えた。

$$\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt} = \mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t) - \mathbf{R}(\mathbf{M}(t) - \mathbf{M}_0)$$

熱平衡状態の磁化、 M_0 と異なる磁化に対して“緩和行列” \mathbf{R} が作用するように経験的な修正を加えた。

Bloch方程式は現象論的な方程式であり、理論的に導かれたものではない。

Bloch 方程式

$$\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt} = \mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t) - \mathbf{R}(\mathbf{M}(t) - \mathbf{M}_0)$$

この方程式は、容易に行列の成分に分けることができる。

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \gamma[M_x(t)B_y(t) - M_y(t)B_x(t)] - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1}$$

z-軸方向の成分

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma[M_y(t)B_z(t) - M_z(t)B_y(t)] - \frac{M_x(t)}{T_2}$$

x-軸方向の成分

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma[M_z(t)B_x(t) - M_x(t)B_z(t)] - \frac{M_y(t)}{T_2}$$

y-軸方向の成分

2つの緩和時間 T_1 と T_2 は、それぞれ縦緩和時間、横緩和時間と呼ばれている。

○原子核スピンの運動

核スピン I を持つ原子核は角運動量 L と核磁気モーメント μ を持つ。

$$\mu = \gamma L$$

γ : 磁気回転比

$$L = \hbar I$$

$\hbar = \frac{h}{2\pi}$, h : プランク定数

したがって、

$$\mu = \gamma \hbar I$$

核スピンは量子化されており、固有関数を $|Im\rangle$ とすると、

$$I^2 |Im\rangle = I(I+1) |Im\rangle,$$

$$I_z |Im\rangle = m |Im\rangle$$

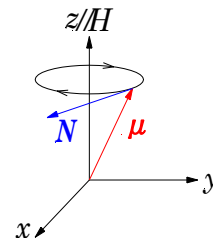
ここで、 $m = -I, -I+1, \dots, I-1, I$

m は $2I+1$ 個の値をとる。 I_z は I の z 成分であり、通常静磁場 H_0 の方向を z 軸に取る。

角運動量 L は次のように定義される。 $L = r \times p$

両辺を t で微分すると

$$\begin{aligned} \frac{dL}{dt} &= \frac{dr}{dt} \times p + r \times \frac{dp}{dt} \\ &= v \times mv + r \times \frac{d(mv)}{dt} \\ &= 0 + r \times m \frac{dv}{dt} \\ &= r \times ma \\ &= r \times F \\ \therefore \frac{dL}{dt} &= N \end{aligned}$$



角運動量 L の時間変化はトルク ($N=r \times F$) に等しい。

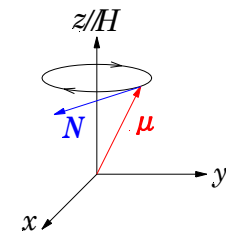
静磁場 H_0 の中に置かれた磁気モーメント μ にはトルク N が働く。

$$N = \mu \times H_0$$

$$\frac{dL}{dt} = \mu \times H_0$$

ところで、 $\mu = \gamma L$ であるから、

$$\frac{d\mu}{dt} = \mu \times \gamma H_0$$



j 個の核からなる系の巨視的磁化 M は、個々の核磁気モーメント μ_j の和で表わされる。

$$M = \sum_j \mu_j$$

[参考] ニュートンの運動方程式

$$\frac{dM}{dt} = M \times \gamma H_0$$

$$F = ma = m \times \frac{dv}{dt} = \frac{d(mv)}{dt} = \frac{dp}{dt}$$

○基準回転系(回転座標系)

パルス NMR を記述するときに、磁化 M の運動を実験室に固定した座標系(fix)を基準にするよりも、磁気モーメント μ の歳差運動と同じ方向に H_0 のまわりを回転する座標系(rot)を基準にすると便利である。

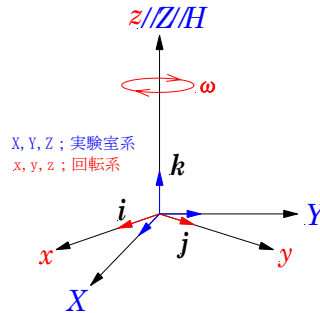
$$\left(\frac{dM}{dt}\right)_{\text{fix}} = \gamma M \times H_0$$

磁化ベクトル $M = M_x i + M_y j + M_z k$ の微分は次式で表される。

$$\frac{dM}{dt} = \left(\frac{\partial M_x}{\partial t} i + \frac{\partial M_y}{\partial t} j + \frac{\partial M_z}{\partial t} k\right) + \left(M_x \frac{\partial i}{\partial t} + M_y \frac{\partial j}{\partial t} + M_z \frac{\partial k}{\partial t}\right)$$

ここで、単位ベクトル i, j, k の回転は、角速度ベクトル ω を用いると次のようになる。

$$\frac{\partial i}{\partial t} = \omega \times i, \quad \frac{\partial j}{\partial t} = \omega \times j, \quad \frac{\partial k}{\partial t} = \omega \times k$$



X, Y, Z ; 実験室系
x, y, z ; 回転系

したがって、

$$\left(\frac{dM}{dt}\right)_{\text{fix}} = \left(\frac{\partial M}{\partial t}\right)_{\text{rot}} + \omega \times (M_x i + M_y j + M_z k) = \left(\frac{\partial M}{\partial t}\right)_{\text{rot}} + \omega \times M$$

上の式と比べて書き換えると、

$$\gamma M \times H_0 = \left(\frac{\partial M}{\partial t}\right)_{\text{rot}} + \omega \times M$$

$$\left(\frac{\partial M}{\partial t}\right)_{\text{rot}} = \gamma M \times H_0 - \omega \times M = \gamma M \times \left(H_0 + \frac{\omega}{\gamma}\right)$$

ここで、 $\frac{\omega}{\gamma}$ は、座標回転の効果から生じる**仮想的な磁場**である。

有効磁場 $H_{\text{eff}} = H_0 + \frac{\omega}{\gamma}$ を用いると、

$$\left(\frac{\partial M}{\partial t}\right)_{\text{rot}} = \gamma M \times H_{\text{eff}}$$

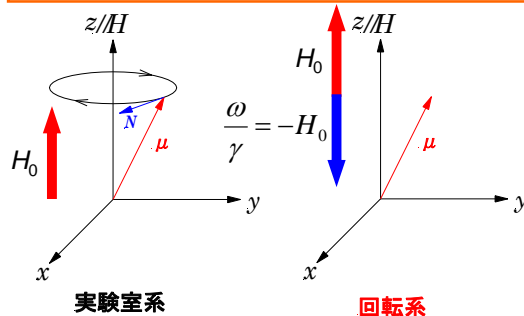
共鳴条件 $\omega_0 = -\gamma H_0$ では、

$$H_{\text{eff}} = H_0 + \frac{\omega_0}{\gamma} = 0$$

すなわち、**角速度 ω_0 で回転する回転系では、静磁場 H_0 は存在しない。**

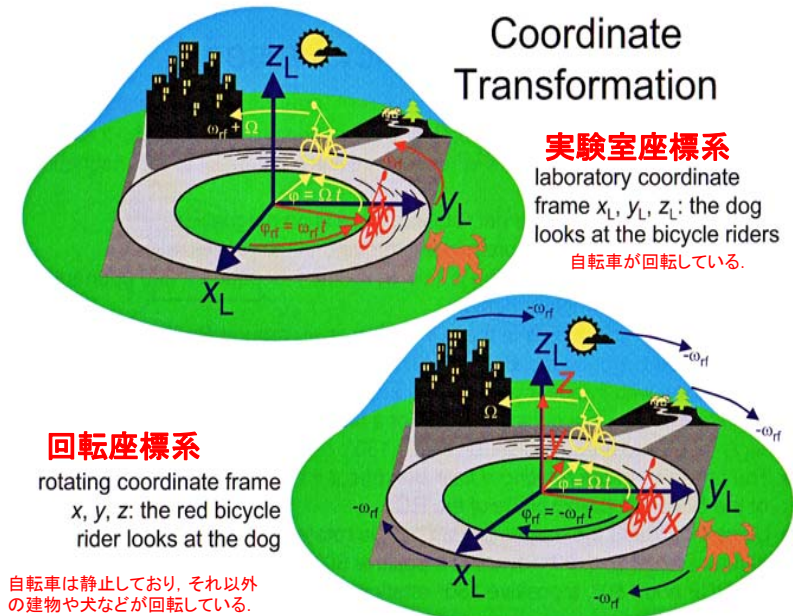
したがって、**回転系では磁気モーメント μ は静止している。**

パルスNMRにおいて、ラジオ波パルスによる磁化(磁気モーメント)の運動は回転座標系で記述される。



回転座標系では、外部静磁場は存在しないので、パルスによる磁化の運動を簡単に表わすことができる。例えば、 $90^\circ(x)$ パルスを加えると、x軸のまわりに 90° 回転し、磁化はz方向から、y方向に向きを変える。

Coordinate Transformation



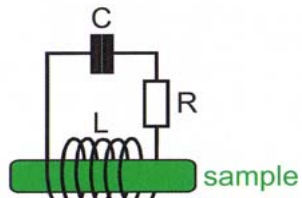
実験室座標系
laboratory coordinate frame x_L, y_L, z_L : the dog looks at the bicycle riders
自転車が回転している。

回転座標系
rotating coordinate frame x, y, z : the red bicycle rider looks at the dog

自転車は静止しており、それ以外の建物や犬などが回転している。

Magnetic Fields in an Oscillator Circuit

直線振動磁場

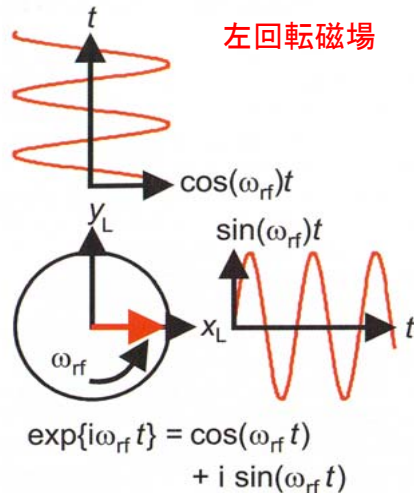


$2 B_1 \sin(\omega_{rf} t)$
magnetic field B_1
oscillating with
frequency ω_{rf}

$$2 B_1 \sin(\omega_{rf} t) = -i B_1 [\exp\{i\omega_{rf} t\} - \exp\{-i\omega_{rf} t\}]$$

直線振動磁場は、左回転磁場と右回転磁場の重ね合わせである。

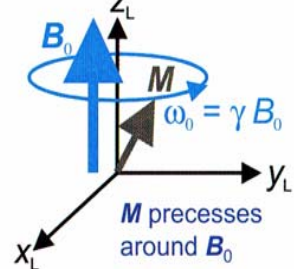
左回転磁場



$$\exp\{i\omega_{rf} t\} = \cos(\omega_{rf} t) + i \sin(\omega_{rf} t)$$

Action of rf Pulses

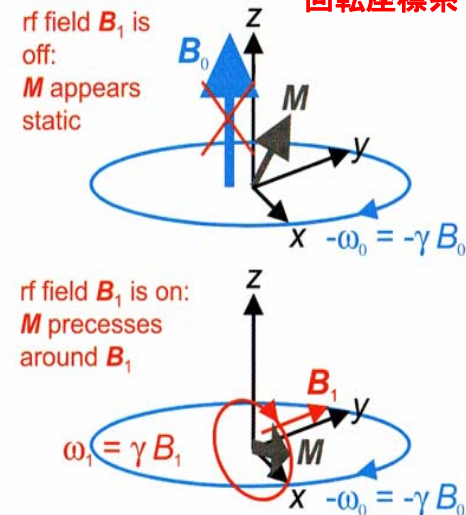
laboratory coordinate frame
実験室座標系



90° pulse: $\omega_1 t_p = \pi/2$
180° pulse: $\omega_1 t_p = \pi$

rotating coordinate frame

回転座標系

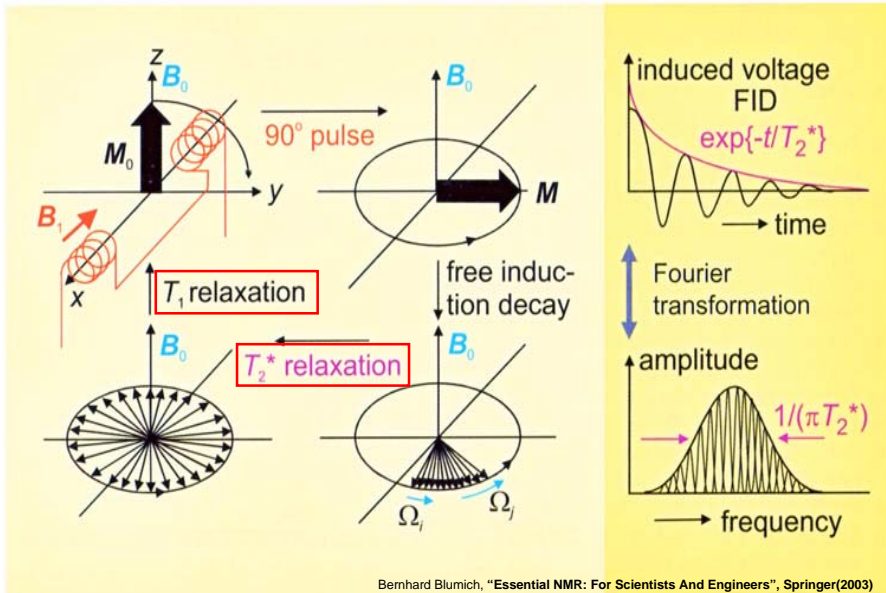


回転座標系では B_1 は静止している。

Bernhard Blumich, "Essential NMR: For Scientists And Engineers", Springer(2003)

Fourier NMR

下図は回転座標系で表わされているのでコイルと静磁場 B_0 は実際にはないことに注意！



Bernhard Blumich, "Essential NMR: For Scientists And Engineers", Springer(2003)

○分極移動とスペクトル編集

NMR の特徴・・・感度が低い。

$$\text{さらに, } ^{13}\text{C} \text{ は } ^1\text{H} \text{ の } \sim \frac{1}{6400} = \frac{1}{\left(\frac{\gamma_H}{\gamma_C}\right)^2} \times 100$$

$$\frac{\gamma_H}{\gamma_C} \cong 4, \text{ } ^{13}\text{C} \text{ の天然存在比は } 1\%$$

感度を向上させる方法

1) 高磁場 NMR: Zeeman 分裂幅を大きく, すなわち占拠数の差を大きくして, 信号強度を大きくさせる。

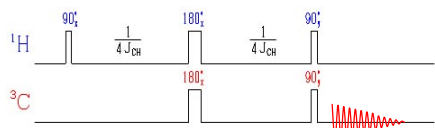
- 永久磁石 $\leq 90\text{MHz}$
- 電磁石 $\leq 100\text{MHz}$
- 超伝導磁石 $\leq 900\text{MHz}$

2)分極移動: abundant spin の大きな磁化を rare spin に移動させて感度を向上させる。

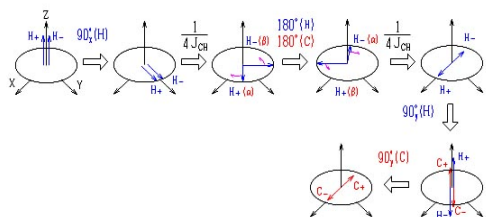
abundant spin: γ が大きく, 自然存在比が大きな核種... ^1H

rare spin: γ が小さく, 自然存在比が小さな核種... ^{13}C , ^{15}N

γ が小さく, 試料中の含有率の小さな核種... ^{31}P

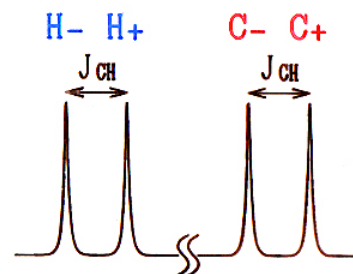


INEPTパルスシーケンス

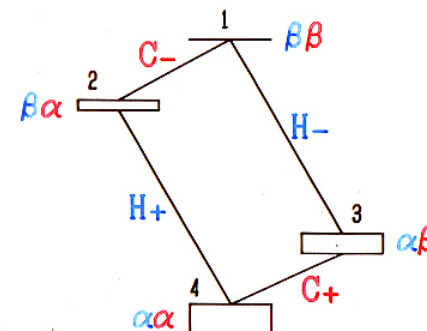


磁化ベクトルによる
INEPTの説明

CH 2スピン系



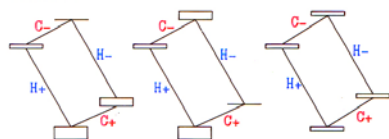
NMRスペクトル



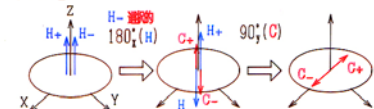
エネルギーレベルと占拠数

選択的占拠数移動 (SPI : Selective Polarization Inversion)

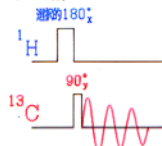
1) エネルギー図



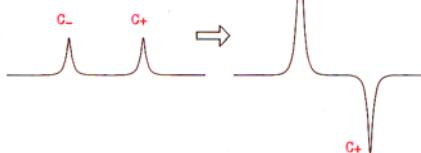
2) ベクトル図



3) パルス系図



4) スペクトル



スピ結合している2つの
スピ系で磁化移動を
実現する手順

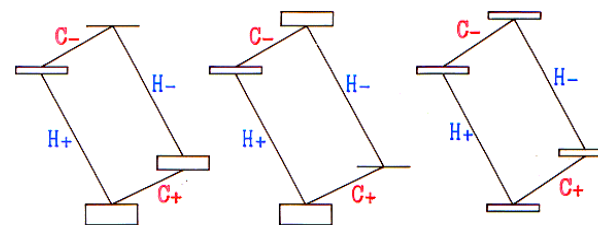
(1) 180°パルスを加えて,
z軸方向に, 一方のスピ
系の反位相磁化を作る。

(2) スピ結合している相
手のスピ系にも反位相
磁化が誘起される。

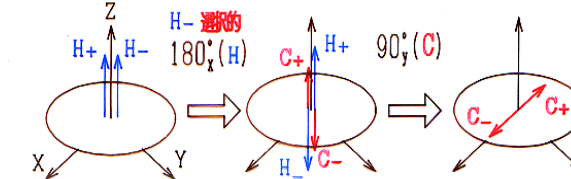
(3) 90°パルスを加えて,
磁化をx-y面に倒すと強
度が増大したNMR信号が観
測される。

選択的占拠数移動 (SPI)

1) エネルギー図



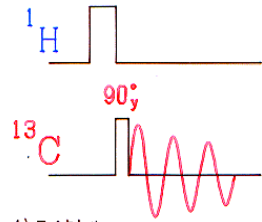
2) ベクトル図



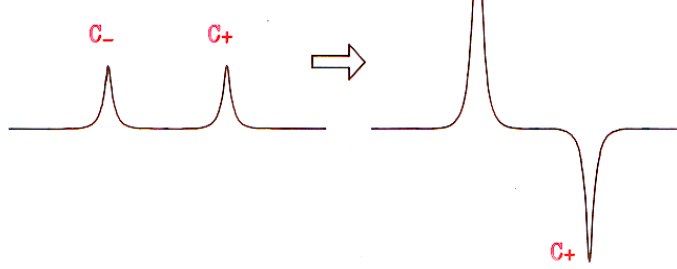
3) スペクトル

3) パルス系列

選択的 180°_x



4) スペクトル



SPIの問題点

(1) 選択的励起を行わなければならない。

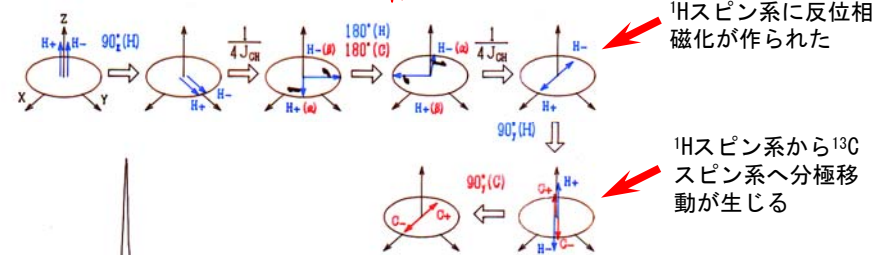
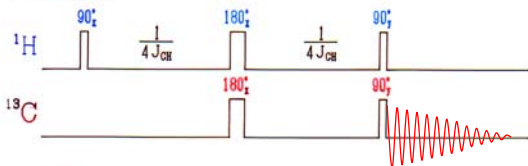
① 強度が弱く、長い低出力パルス

② 周波数範囲が狭い特殊な形状のパルス

(2) ^1H デカップリングすると逆位相信号が相殺する。

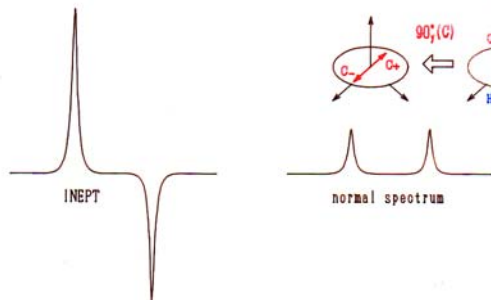


INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer)

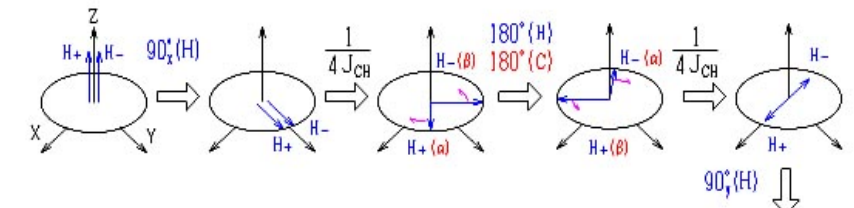
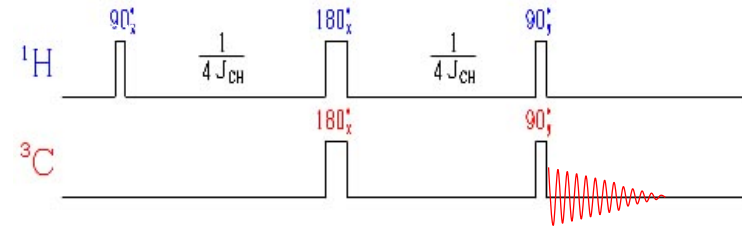


^1H スピ系に反位相磁化が作られた

^1H スピ系から ^{13}C スピ系へ分極移動が生じる

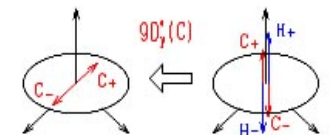


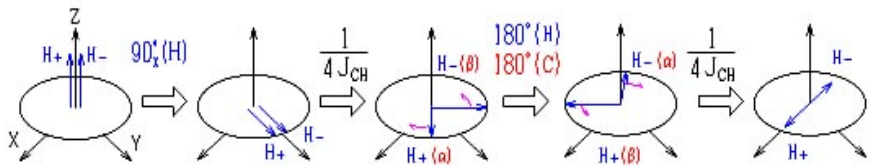
INEPT



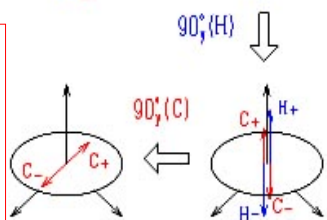
OSPIとの相違点

INEPTでは、非選択的パルスを用いて分極移動を行わせている。





- (1) HスピンとCスピンの結合しているC-Hの2スピン系を作っているとする。
- (2) 目標は、Hスピンの大きな分極をCスピンの移動させることである。そうすると、①Cスピンを感度良く測定することができる。そして、②2次元シフト相関NMRにおいて、スピン結合しているC-Hの間にだけ交差ピークを生じさせることができる。
- (3) 手順は、xy面内にHスピンの反位相磁化を作る。
- (4) 90° パルスでz軸方向にこの反位相磁化を向かせる。
- (5) z軸方向に反位相磁化が存在しているということは、Hスピンの2つの遷移のうち、一方の占拠数を逆転させたことになる。
- (6) そうすると、スピン結合しているCスピンの、正と負の大きな占拠数差を生じさせる。したがって、Cスピンの反位相磁化が現れる。
- (7) Cスピンの90° パルスを加えてxy面内に倒すと観測できる。



○xy面内に反位相磁化を作ることができれば、90°パルスを加えることで、スピン結合しているもう一方のスピンに分極移動させることができる。

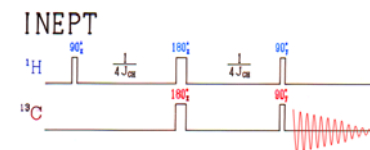
INEPTの特徴

① γ の比だけS/Nが向上する。

$$\left(\frac{\gamma_{1H}}{\gamma_{13C}} \right) \cong 4, \quad \left(\frac{\gamma_{1H}}{\gamma_{15N}} \right) \cong 10, \quad \text{etc.}$$

② パルス系列の繰り返し時間は ^1H の T_1 で決まる。通常 ^{13}C の T_1 は ^1H よりもずっと長い($T_{1C} \gg T_{1H}$)ので、積算効率が向上する。

③ 信号の強度比が正しくないことがある。

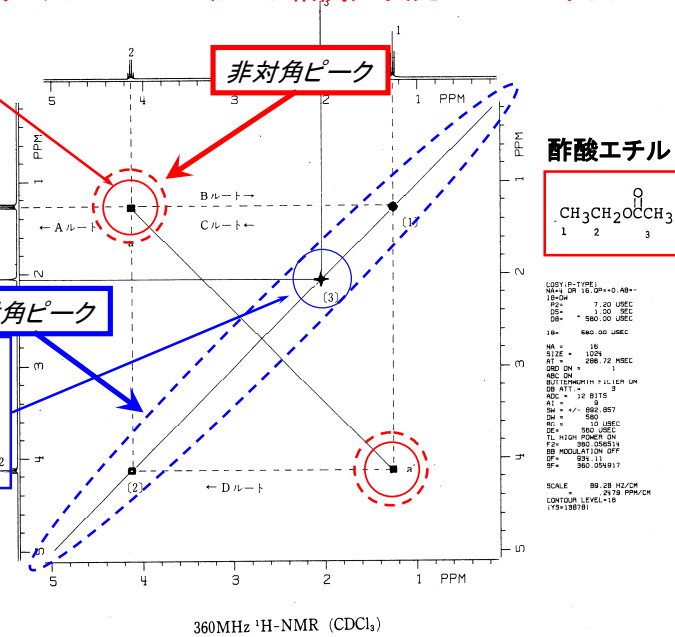


3. 2次元NMRの原理と応用 —COSY, J-分解, NOESYなど—

多次元NMR: 酢酸エチルのCOSY(シフト相関)2次元NMRスペクトル

H¹とH²がカップリングしていることを示す相関(非対角)ピーク
CH3C(O)OCH2CH3

H³が孤立していることを示す対角ピーク
CH3C(O)OCH2CH3
他のピークと相関がない。



2次元NMR測定のスキーム

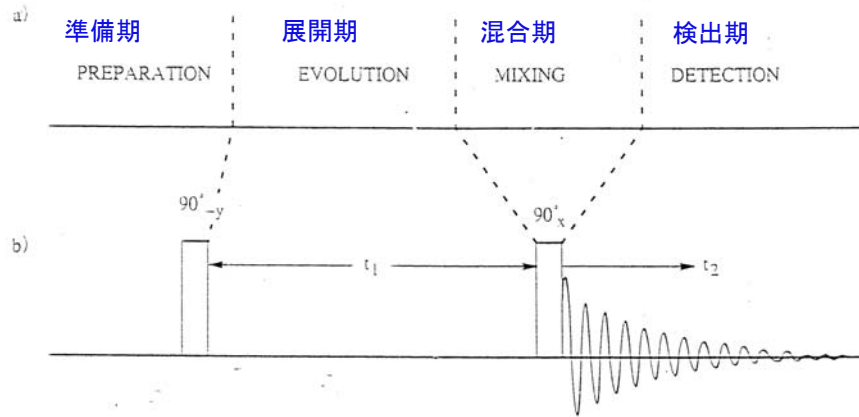
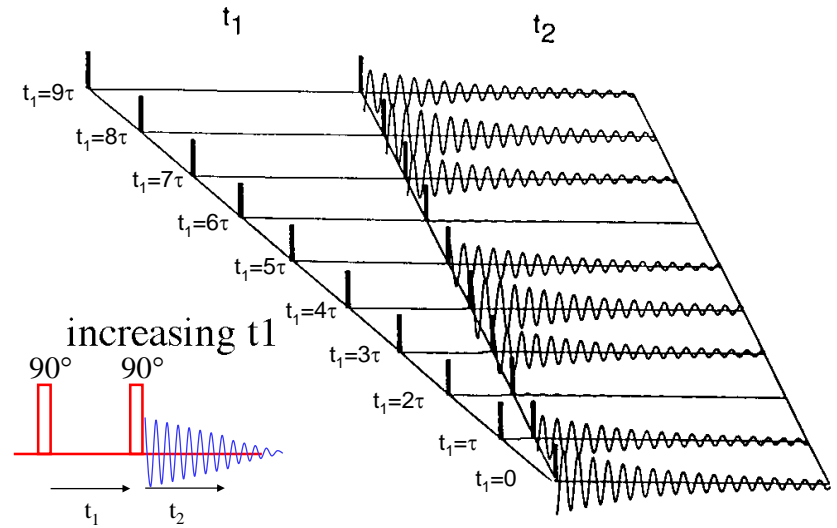


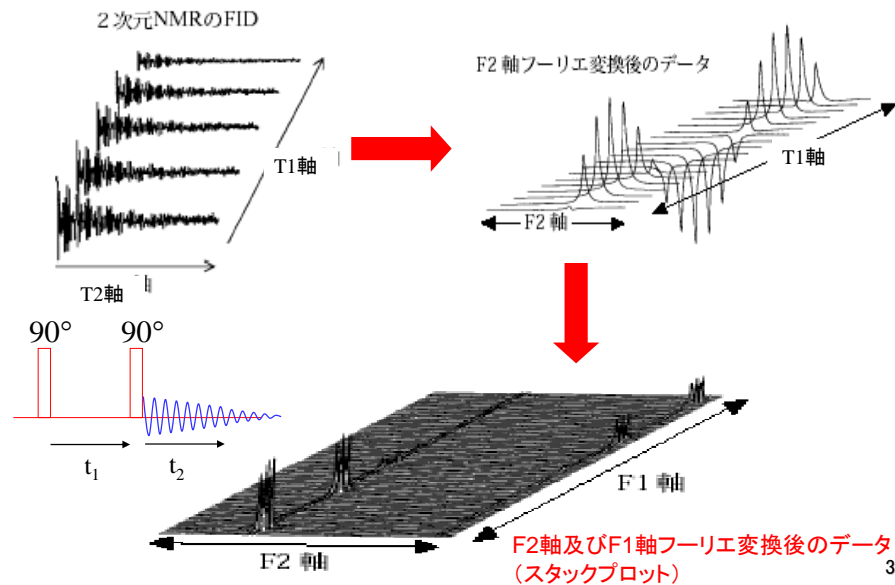
図 3.1 (a) 2次元 NMR 測定のスキームは Preparation (準備), Evolution (展開), Mixing (混合), 及び Detection (検出) 期間から成る. (b) COSY (3.2 節) 測定のためのパルスシーケンス [Ad Bax, Bull. Magn. Reson., 7, 167-183 (1985) の Figure 1 より]

COSY(シフト相関)2次元NMR

実際にはNMR信号を観測しない 実際にはNMR信号を観測する



2次元NMRデータ処理の流れ



異種核シフト相関(HETCOR; HETeronuclear shift COrelation)

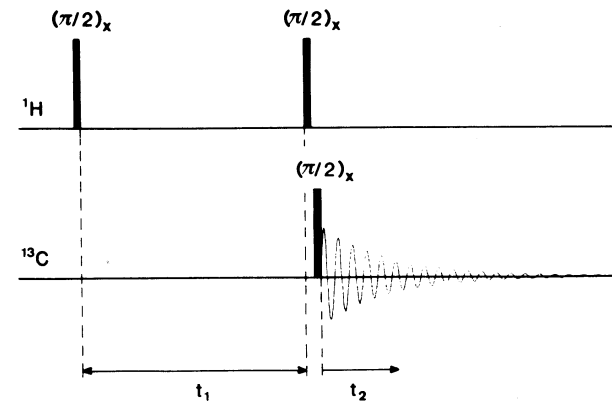


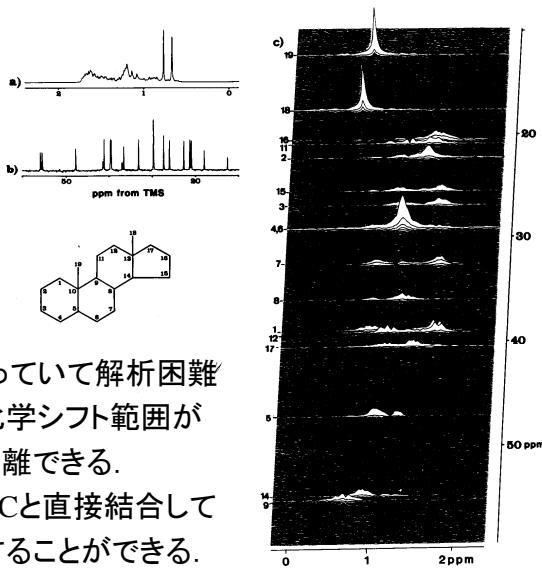
Fig.2.2 Basic scheme of the heteronuclear shift correlation experiment.

5- α -androstandeの

(a) ^1H

(b) ^{13}C

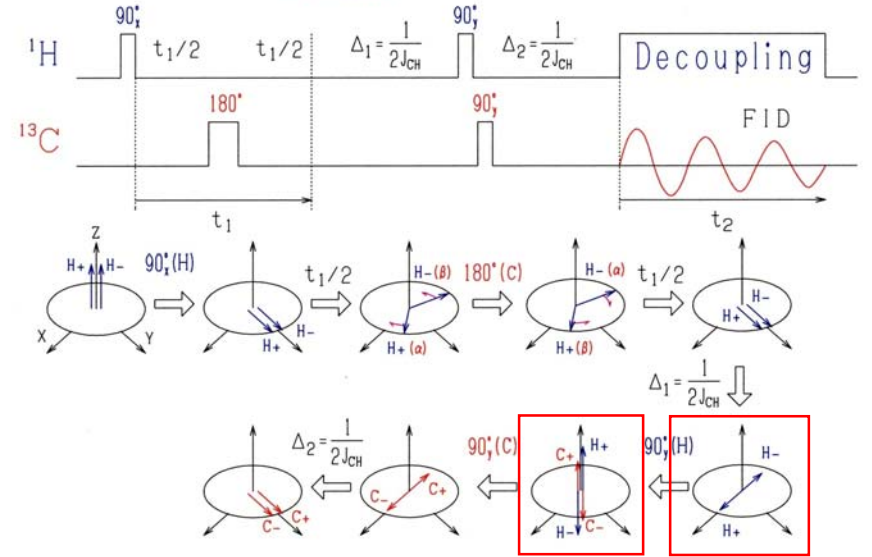
(c) CH-COSY
(HETCOR)



CH_3 以外の ^1H は重なって解析困難である。一方、 ^{13}C は化学シフト範囲が広いので1本ずつに分離できる。HETCORを用いると ^{13}C と直接結合している ^1H を2次元展開することができる。

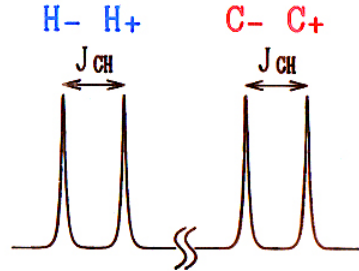
Fig.2.11 (a) The conventional proton spectrum of 5 α -androstande recorded at 200 MHz. (b) The conventional broadband proton-decoupled ^{13}C spectrum recorded at 50 MHz. (c) The heteronuclear shift correlation spectrum. The resonances are broadened along the F_1 -axis by homonuclear proton coupling. From ref.(7).

CH-COSYのパルス系列

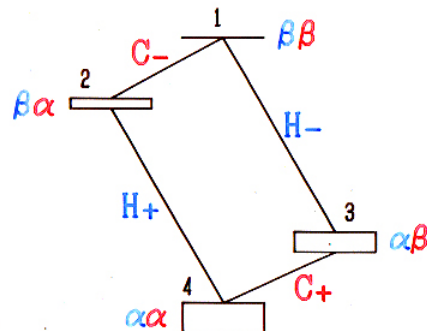


分極移動 反位相磁化の生成

CH 2スピン系

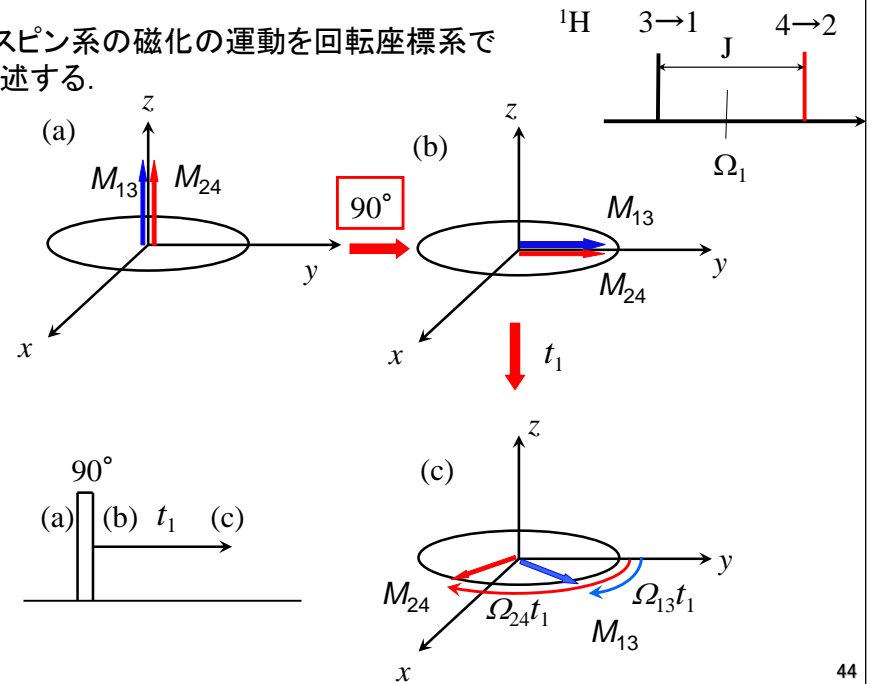


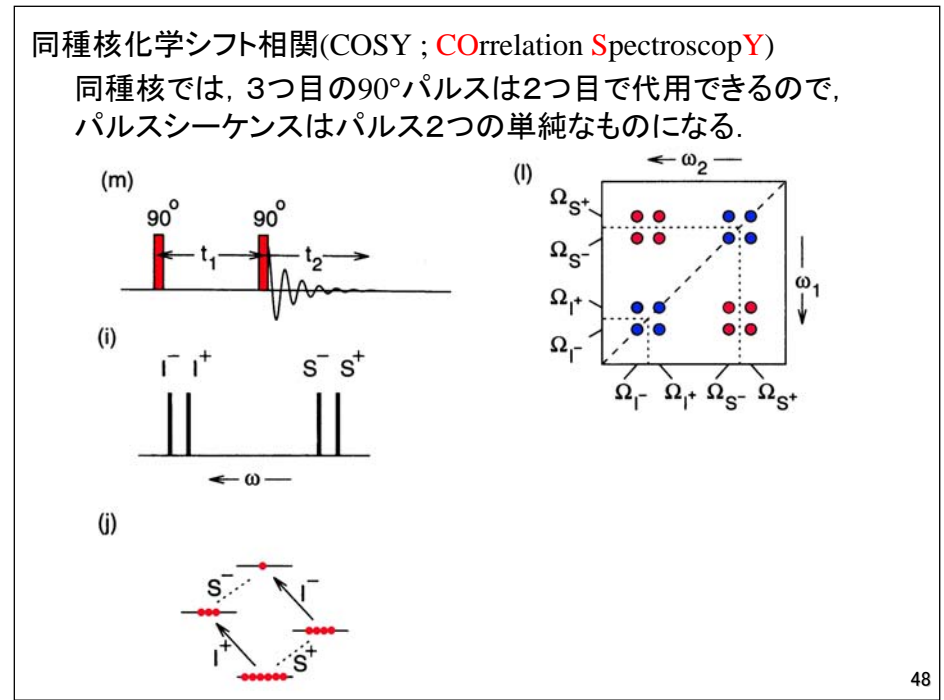
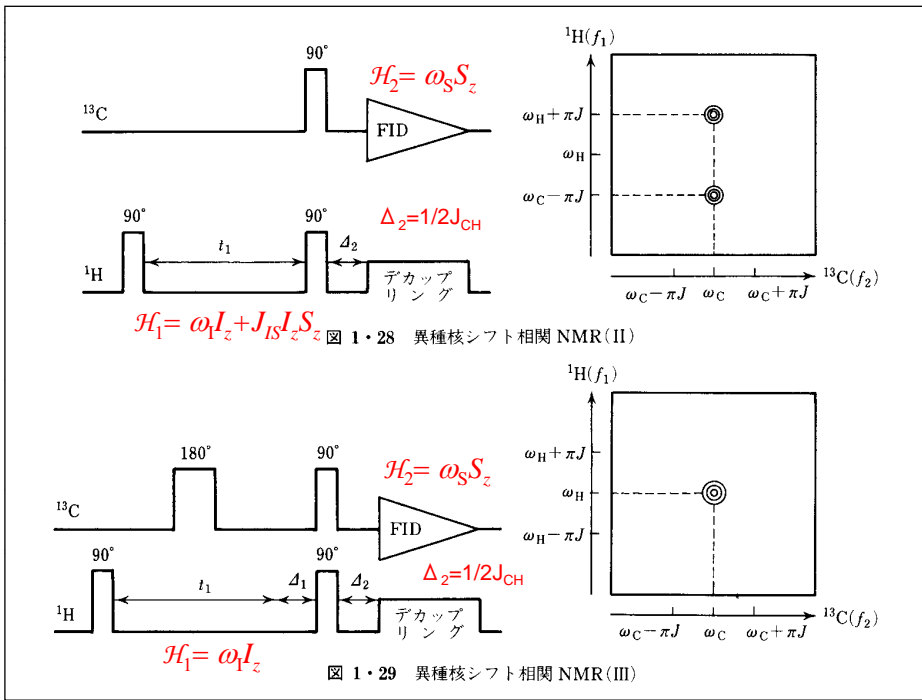
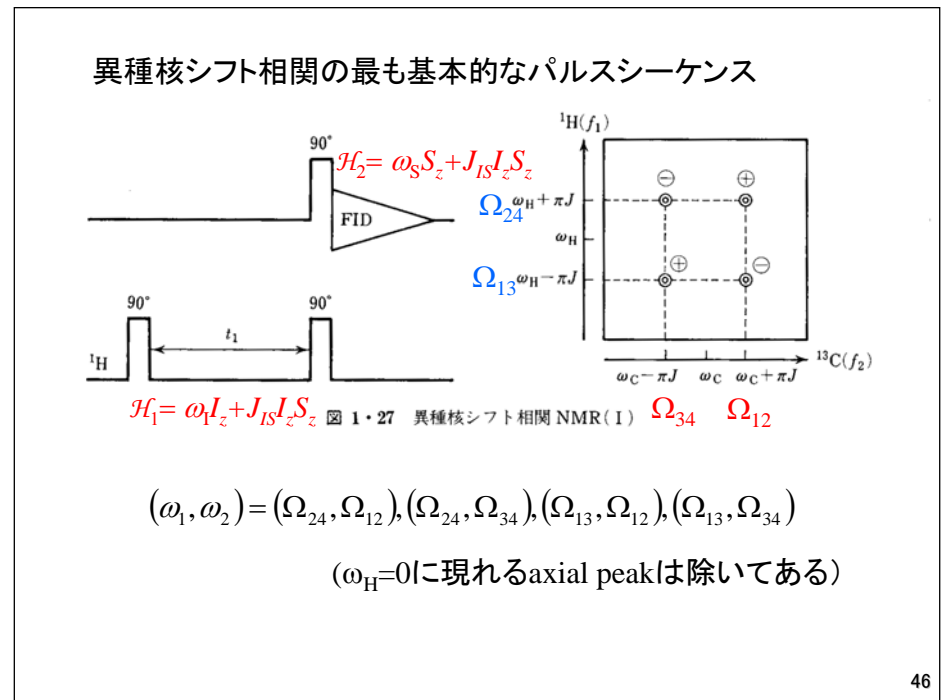
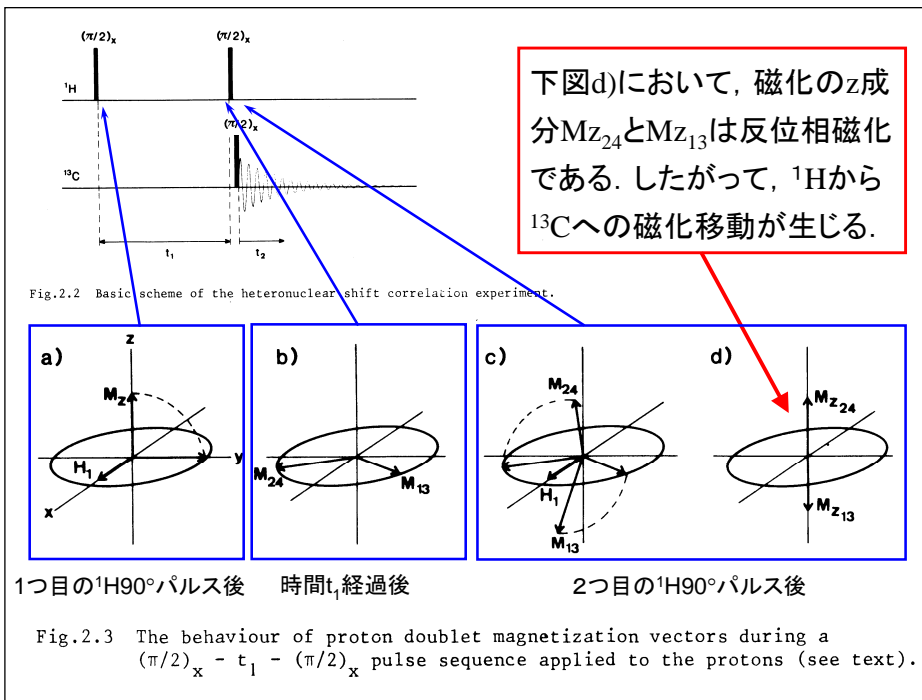
NMRスペクトル



エネルギーレベルと占拠数

2スピン系の磁化の運動を回転座標系で記述する。





tricyclodecane誘導体の
COSYスペクトル

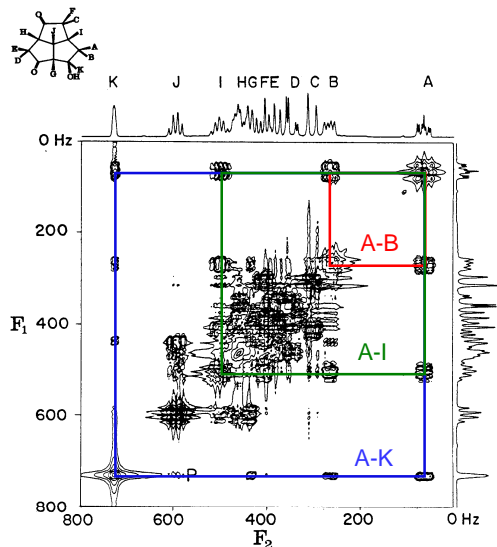
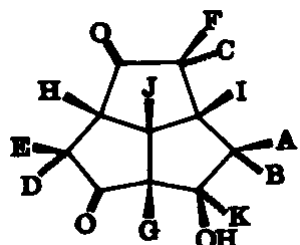


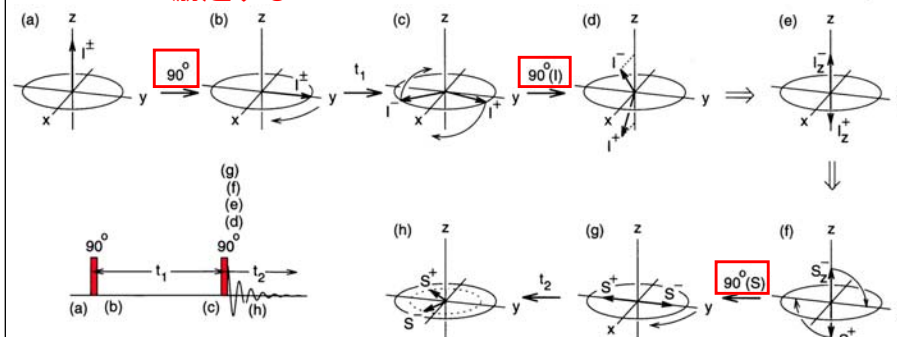
Fig.2.17 Quadrature Jeener spectrum of the tricyclodecane derivative shown on the inset, presented as an intensity contour plot. At the bottom left, marked P, is a spurious peak generated by the overlap of the tails of two diagonal peaks. Gaussian weighting has been used to avoid truncation effects. The spectrum is recorded at 200 MHz. The sample was kindly provided by Mr. P.L. Beckwith, Dyson Perrins Laboratory, Oxford. From ref.(17).

ベクトルモデルによるCOSYの説明

熱平衡
状態

Iスピンを
励起する

Iスピンの反位相
磁化が生じる



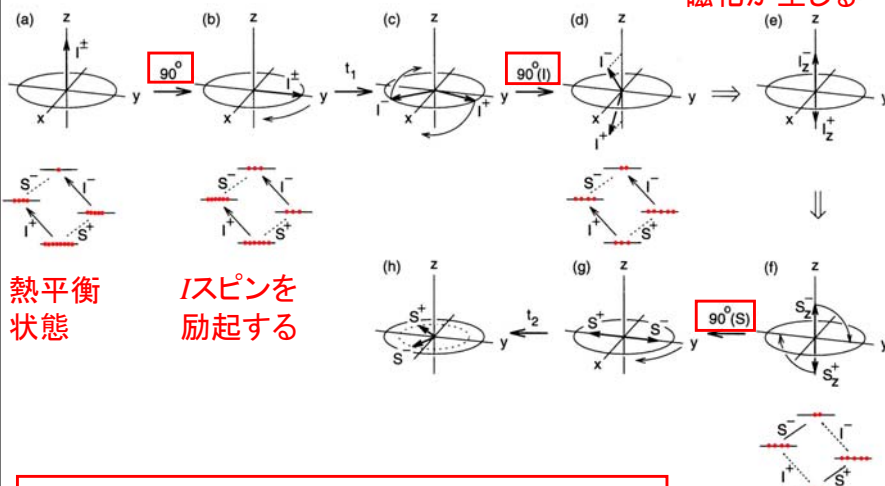
Sスピンの反位相
磁化が生じる

直接結合している I-S スピン間に相関が生じる.

→ シフト相関2次元NMRスペクトル

エネルギー準位図は次のようになる.

Iスピンの反位相
磁化が生じる



熱平衡
状態

Iスピンを
励起する

Sスピンの反位相
磁化が生じる

直接結合している I-S スピン間に相関が生じる.

→ シフト相関2次元NMRスペクトル

4月24日 学生番号, 氏名

(1)INEPTを用いると, ¹³Cスペクトルを感度良く測定することができる。また, シフト相関2次元NMRスペクトル(COSY)では, 直接結合している I-S スピン間に相関が生じる。このようにスピン結合しているスピン間に磁化移動が生じる理由を簡単に説明せよ。