

2014年度 分子機能化学特論 第4回目 5月1日

1. 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 ーどのように発展し、何をj知ることができるかー
2. NMRの原理と装置 ー量子力学的な基礎と測定装置のしくみー
3. 2次元NMRの原理と応用 ーCOSY, J-分解, NOESYなどー
4. 多核2次元NMRの原理と応用 ーHETCOR(CH-COSY)などー
5. **インバース法の原理と応用 ーHSQC, HMQC, HMBCなどー**
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の基礎と高分子化合物の物性評価への応用

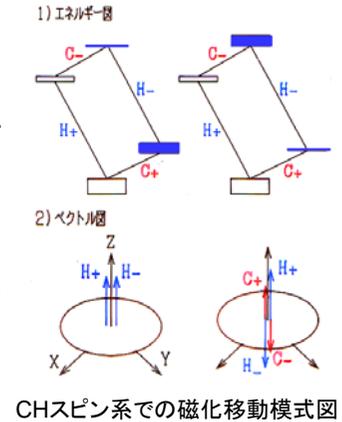
休講 5月15日(木) 補講 5月2日(金) 4時間目

1

4月24日

Q. INEPTを用いると, ^{13}C スペクトルを感度良く測定することができる。また, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ シフト相関2次元NMRスペクトル(CH-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。

A. z軸方向にIスピンの反位相磁化を作ることができれば, Iスピンの遷移の一方の占拠数を逆転させたことになる。そうすると, スピン結合しているもう一方のSスピンの占拠数も逆転させたことになり, z軸方向に大きなSスピンの反位相磁化が生じる。このように, Iスピンの反位相磁化を作ることによって, 直接結合しているI-S スピン間に, 磁化移動を生じさせ, 大きなS磁化を得ることができる。



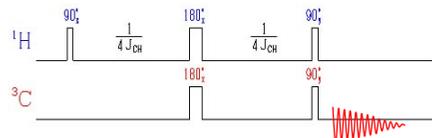
2

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。

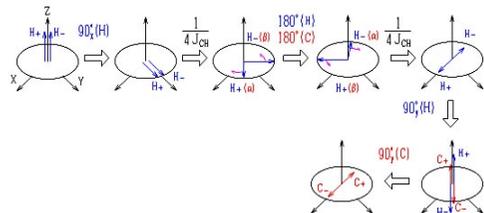
abundant spin: γ が大きく, 自然存在比が大きな核種... ^1H

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



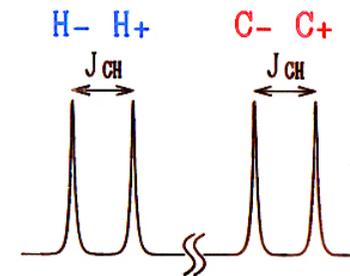
INEPTパルスシーケンス



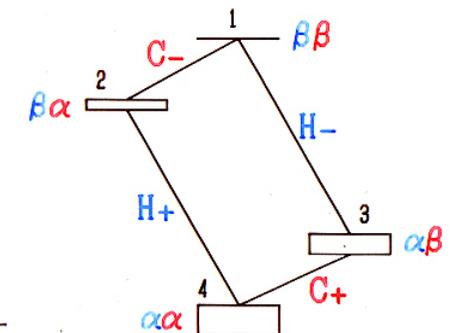
磁化ベクトルによる
INEPTの説明

3

CH 2スピン系



NMRスペクトル

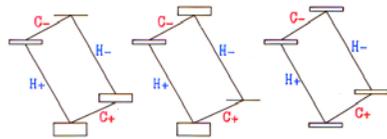


エネルギーレベルと占拠数

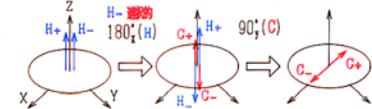
4

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

1) エネルギー図



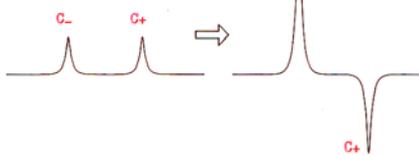
2) ベクトル図



3) パルス系列



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。

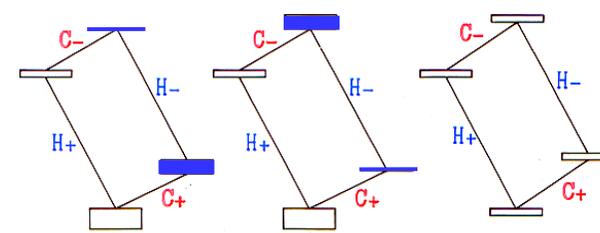
(2) スピ結合している相手のスピ系にも反位相磁化が誘起される。

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

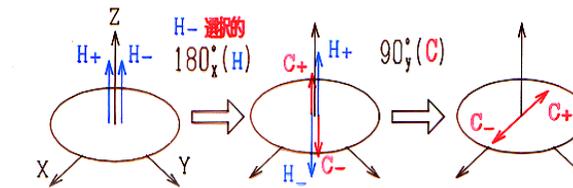
5

選択的占拠数移動 (SPI)

1) エネルギー図

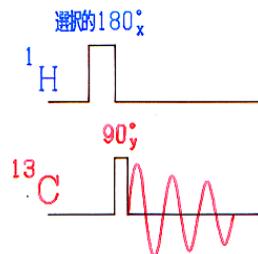


2) ベクトル図

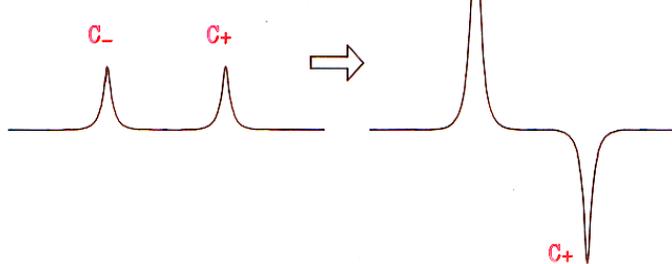


6

3) パルス系列

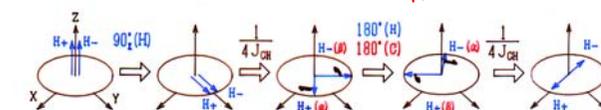
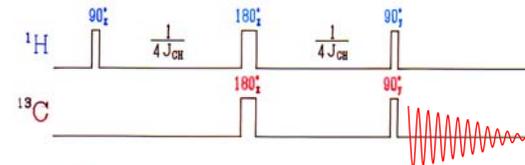


4) スペクトル



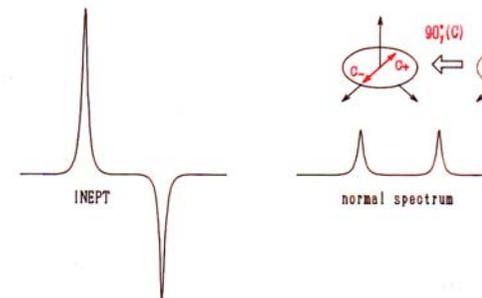
7

INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer)



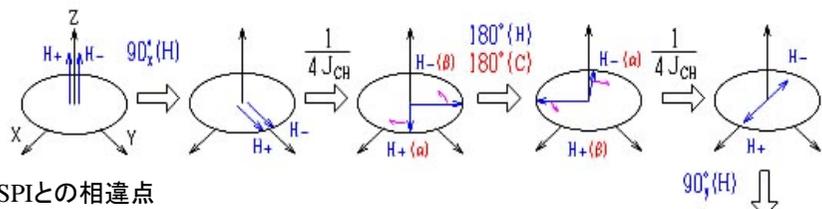
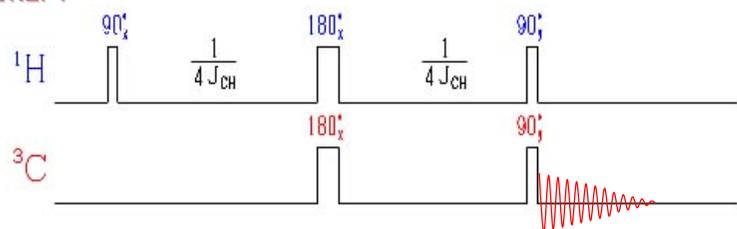
¹Hスピ系に反位相磁化を作ることができた。

反位相磁化をz軸方向に向かすると、分極移動が生じる。



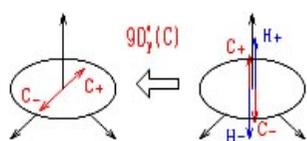
8

INEPT



OSPIとの相違点

INEPTでは、**非選択的パルス** (幅が狭く振幅の大きなパルスでありハードパルスという) を用いて、特定の吸収線だけでなく、I-S結合している全ての吸収線に対して分極移動を行わせることができる。

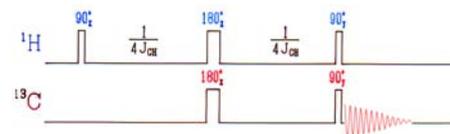


INEPTによる感度の向上

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($T_{1C} \gg T_{1H}$)なので、積算効率が向上する。



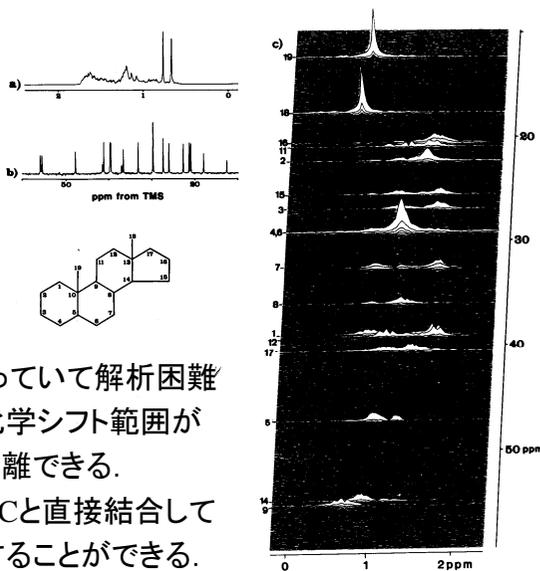
通常、高分子化合物の溶液試料の ^1H の T_1 は1s程度であるが、 ^{13}C の T_1 は ^1H よりもずっと長く、物質によって数秒から数十秒の範囲にある。

5- α -androstaneの

(a) ^1H

(b) ^{13}C

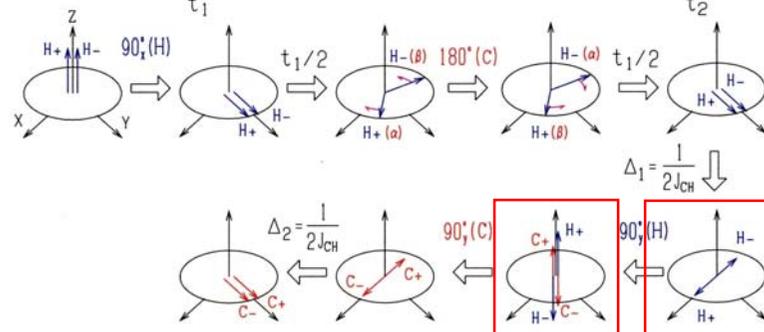
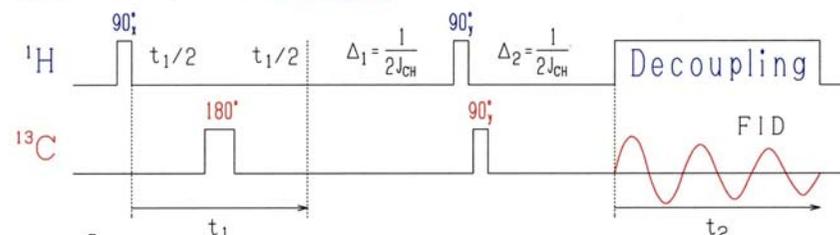
(c) CH-COSY
(HETCOR)



CH_3 以外の ^1H は重なっていて解析困難である。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。

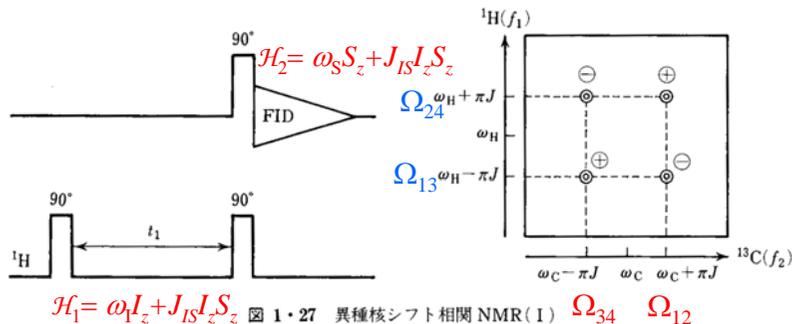
Fig.2.11 (a) The conventional proton spectrum of 5 α -androstane recorded at 200 MHz. (b) The conventional broadband proton-decoupled ^{13}C spectrum recorded at 50 MHz. (c) The heteronuclear shift correlation spectrum. The resonances are broadened along the F_1 -axis by homonuclear proton coupling.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

CH-COSYのパルス系列



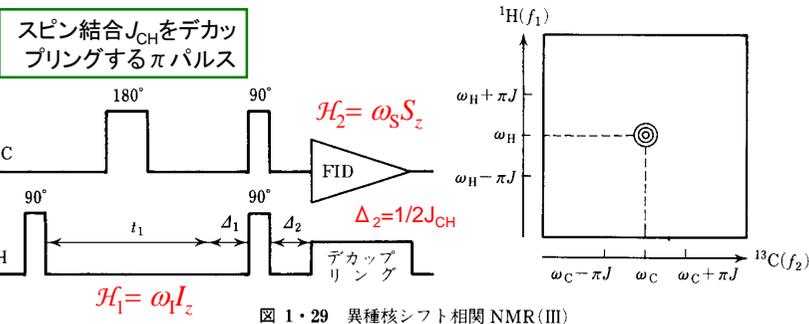
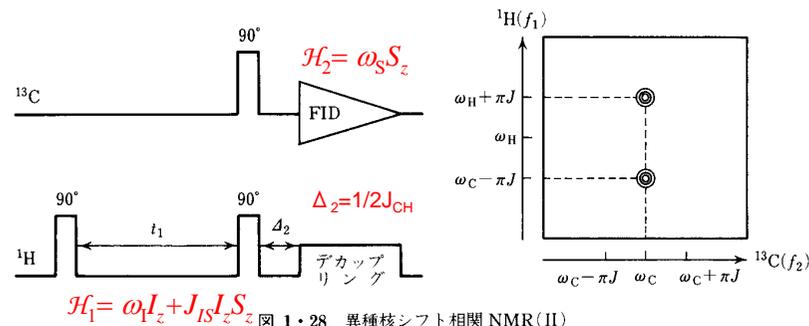
分極移動 反位相磁化の生成

異種核シフト相関の最も基本的なパルスシーケンス



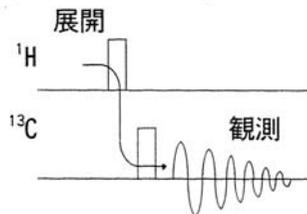
$$(\omega_1, \omega_2) = (\Omega_{24}, \Omega_{12}), (\Omega_{24}, \Omega_{34}), (\Omega_{13}, \Omega_{12}), (\Omega_{13}, \Omega_{34})$$

($\omega_H=0$ に現れるaxial peakは除いてある)



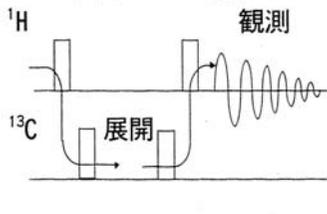
5. インバース法の原理と応用 -HSQC, HMQC, HMBCなど-

^{13}C 観測異種核相関法
(^{13}C - ^1H COSY etc)



感度 $\gamma_H \gamma_C^{\frac{1}{2}} \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1^H}}\right)$

^1H 観測異種核相関法
(インバース法)



感度 $\gamma_H^{\frac{1}{2}} \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1^H}}\right)$

γ_H : ^1H の磁気回転比, γ_C : ^{13}C の磁気回転比, $\frac{\gamma_H}{\gamma_C} = 4 \therefore \gamma_H = 4\gamma_C$

$$\frac{\gamma_H^{\frac{1}{2}} \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1^H}}\right)}{\gamma_H \gamma_C^{\frac{1}{2}} \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1^H}}\right)} = \frac{(4\gamma_C)^{\frac{1}{2}}}{4\gamma_C \gamma_C^{\frac{1}{2}}} = \frac{4^{\frac{1}{2}}}{4} = 4^{\frac{1}{2}} = 2$$

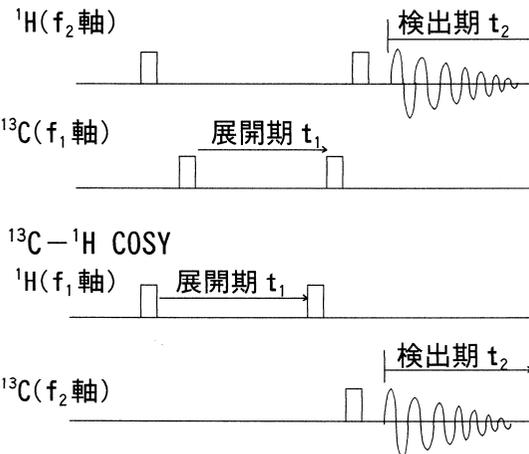
インバース法の感度は ^{13}C 観測異種核相関法より 8 倍高い。

【インバース法の利点と欠点】

利点...測定感度が向上する。

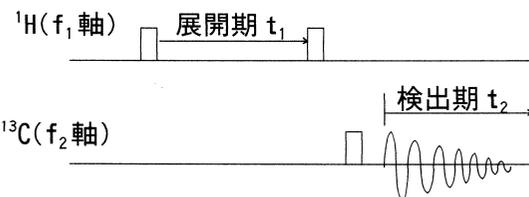
欠点... f_1 軸 (^{13}C 軸) のデジタル分解能が低い。

インバース法



t_1 軸の測定ポイントを増やすと積算時間に直接影響する。ポイント数を2倍にすると、測定時間が2倍かかる。そのため、通常は256ポイント程度が用いられる。ポイント数が少ないので分解能が劣る。

^{13}C - ^1H COSY



t_2 軸の測定ポイントを増やしても測定時間は数秒増える程度なので全体の測定時間にはほとんど影響しない。通常は512ポイント程度が用いられる。

¹H観測異種核相関(インバース、インダイレクト)法の利点

インバース法: 測定感度が向上する。感度の良い核種を測定できる。

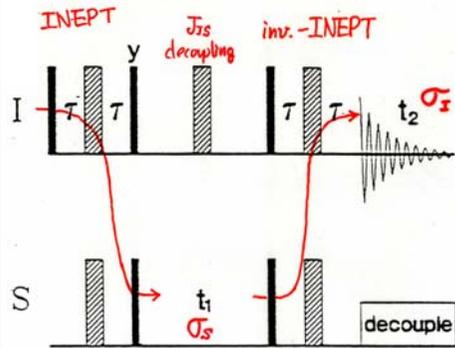
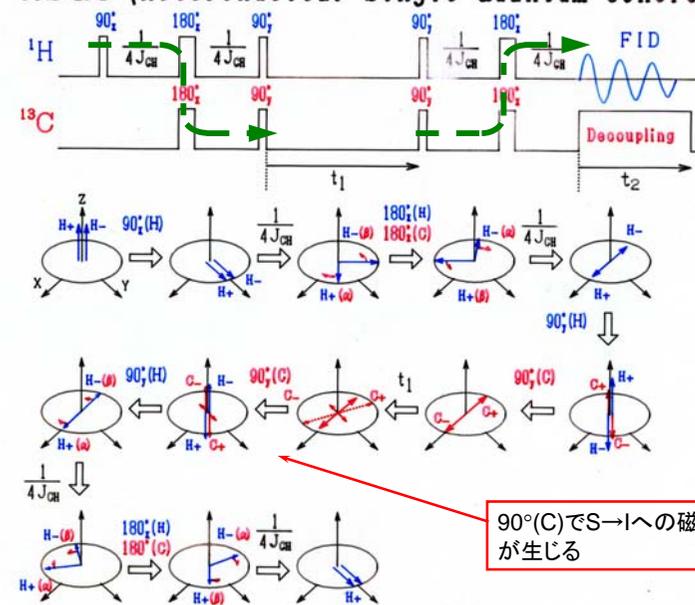


Figure 4.49. Pulse sequence of the HSQC experiment. The narrow bars represent 90° pulses, all with 'x' phase, except the one marked 'y'. The hatched wide bars represent 180° pulses. Typically spin I is ¹H and S is ¹³C or ¹⁵N.

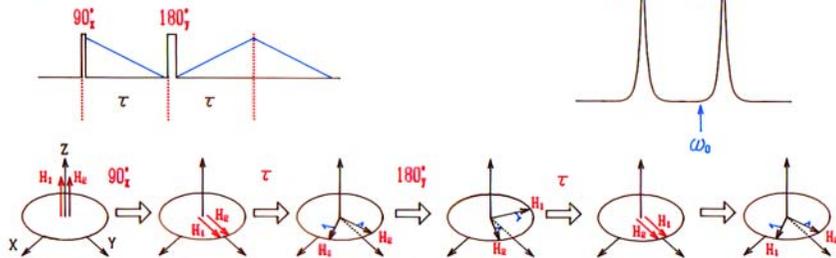
t₁時間の間にスピンのπパルス照射するとI-S間スピン-スピン相互作用J_{IS}がデカップリングされるのでスピン分裂が消除される。
→分解能が向上する。

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)



90°(C)でS→Iへの磁化移動が生じる

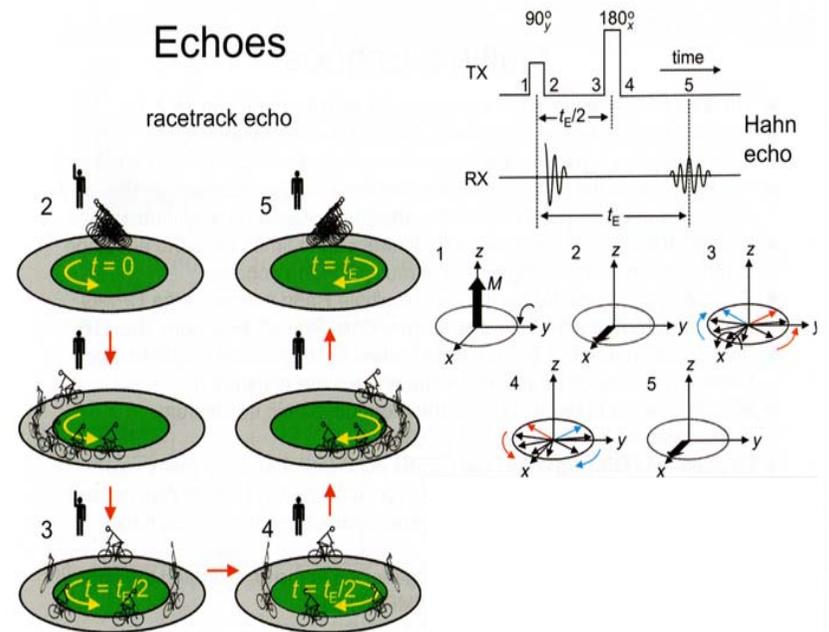
Spin Echo (Hahn Echo)



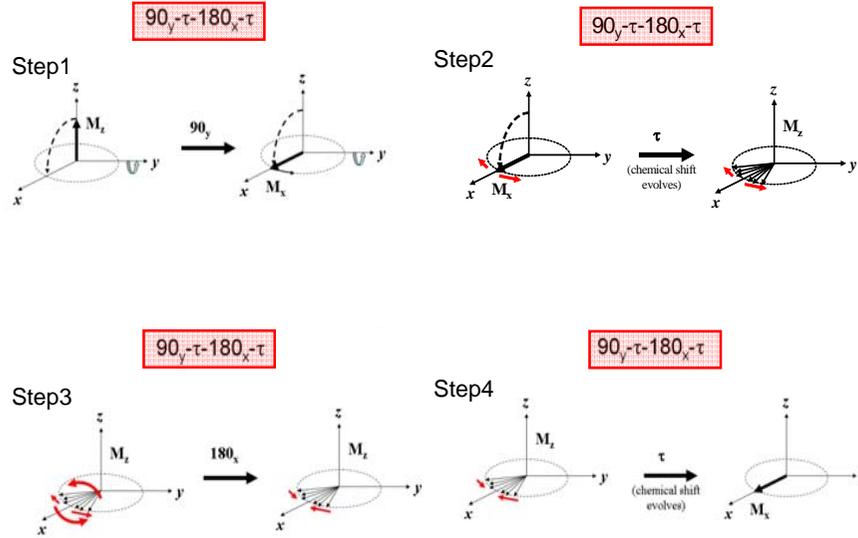
○デッドタイム(パルス後のレシーバの回復に要する時間: FIDを観測できない)の影響を受けずにパルス直後からのFIDを観測できる。

○多次元NMRのパルス系列において、スピン結合や化学シフトをリフォーカス(消除)するのに用いる。

Echoes

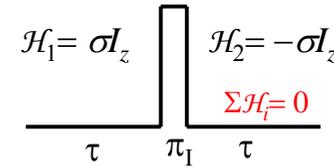


“エコー”で化学シフトをリフォーカス(再結像)する



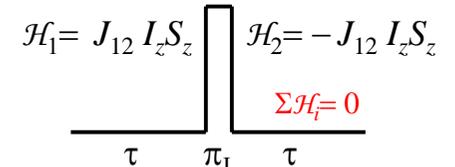
πパルスの効果

(1) 化学シフト $\mathcal{H}_0 = \sigma I_z$



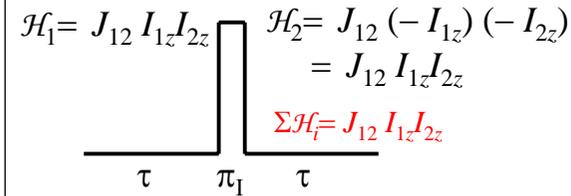
化学シフト相互作用は
消去される

(3) 異種核間スピン結合 $\mathcal{H}_{J12} = J_{12} I_z S_z$



異種核間スピン相互作用は
消去される。

(2) 同種核間スピン結合 $\mathcal{H}_{J12} = J_{12} I_{1z} I_{2z}$



同種核間スピン相互作用は影響を受けない。

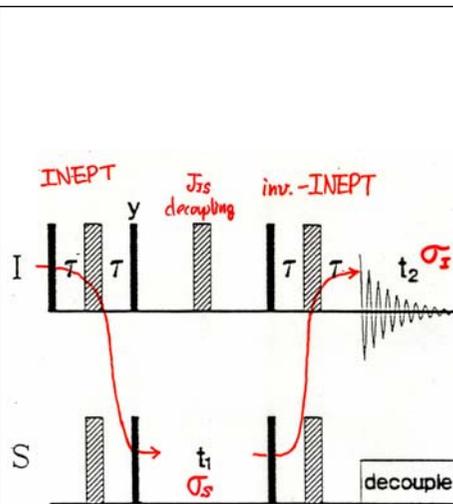
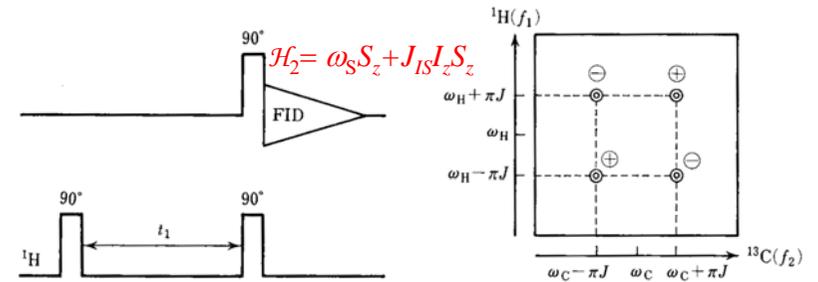
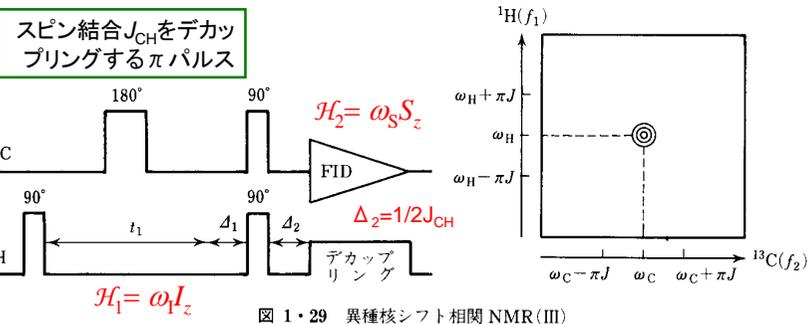
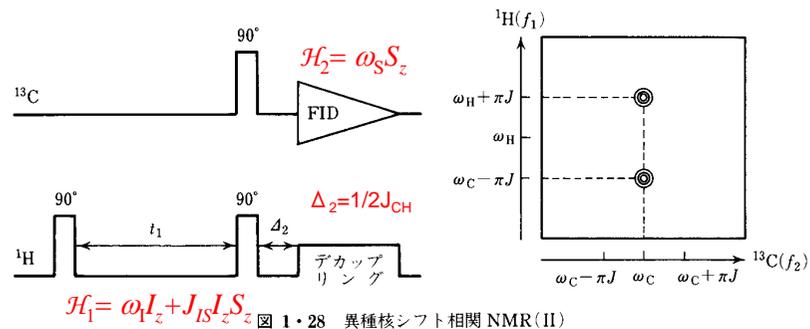


Figure 4.49. Pulse sequence of the HSQC experiment. The narrow bars represent 90° pulses, all with ‘x’ phase, except the one marked ‘y’. The hatched wide bars represent 180° pulses. Typically spin I is ^1H and S is ^{13}C or ^{15}N .

t_1 時間の間にスピンのπパルス
を照射するとI-S間スピン-スピン
相互作用 J_{IS} がデカップリングされ
るのでスピン分裂が消去される。
→分解能が向上する。



$\mathcal{H}_1 = \omega_I I_z + J_{IS} I_z S_z$ 図 1・27 異種核シフト相関NMR (I)



NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

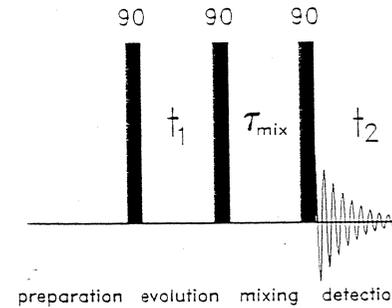


Figure 4.15. Pulse sequence of the NOESY experiment.

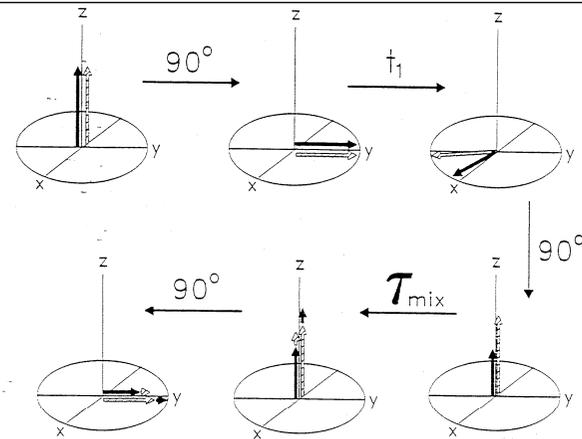


Figure 4.16. Schematic overview of the NOESY experiment. It starts with a 90° pulse to bring the magnetization to the XY plane. During t_1 the spins are labeled with their offset frequencies. The second 90° pulse creates Z magnetization again. During the mixing time, τ_{mix} , magnetization is transferred from one spin to another via cross-relaxation. The third 90° pulse brings the magnetization back in the XY plane, where the precession will be monitored during t_2 .

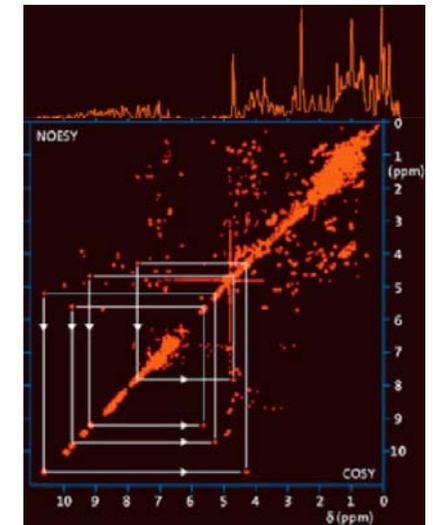
磁化がZ軸方向にある間に、空間的に近い核の間で磁化移動が生じる。

核オーバーハウザー効果 (NOE)

核オーバーハウザー効果 (NOE) とは、空間的に近い距離にある原子対の片方の原子核にラジオ波を照射すると、他方の原子核の信号が大きくなることである。NOEは原子核間距離を r とすると $1/r^6$ に比例している。

右の図はNOESYと呼ばれる2次元NMRスペクトルである。空間的に近い位置にある原子核の間に、交差ピークが現れる。

交差ピークの強度は、NOE効果の大きさを表わしており、空間的に近いほど信号強度が大きい。したがって、信号強度から原子核間距離情報を得ることができる。



異種核間多量子コヒーレンスシフト相関二次元NMR Heteronuclear MultiQuantum Coherence (HMQC)

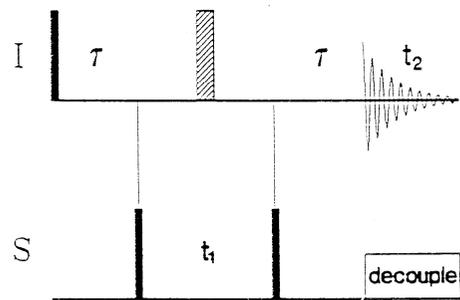
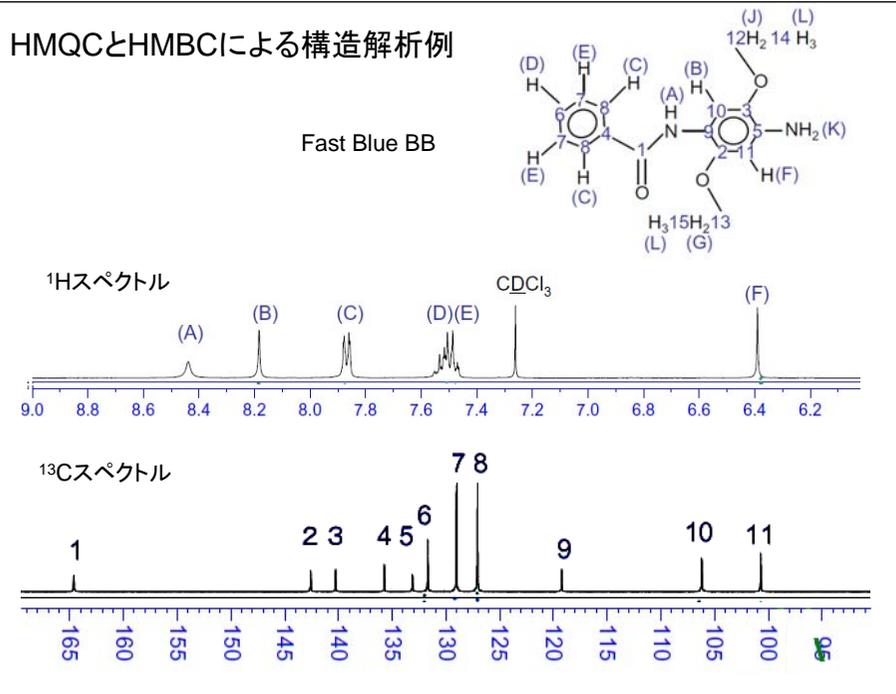


Figure 4.50. Pulse sequence of the HMQC experiment.

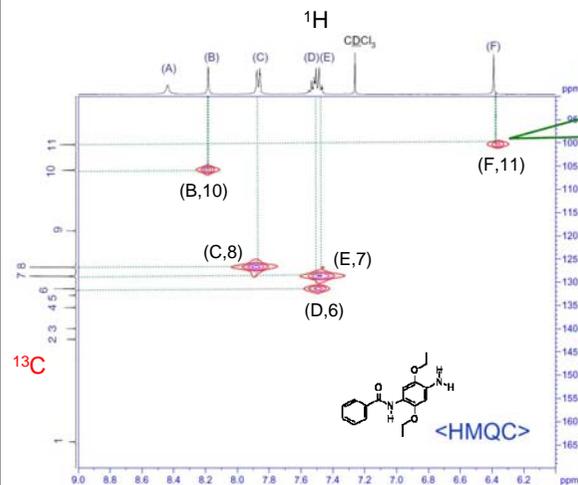
HMQC (Heteronuclear MultiQuantum Coherence)シーケンスは多量子遷移を含むのでベクトルモデルでは説明できない。直積演算子法を用いた計算を行う必要がある。

33

HMQCとHMBCによる構造解析例

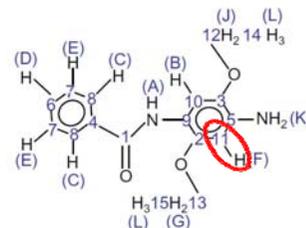


HMQCとHMBCによる構造解析例 (1) HMQCスペクトル



B-Fのプロトンは¹³Cと直接結合しているが、Aには相関ピークがないのでヘテロ原子と結合していると考えられる。

H(F)とC(11)が直接結合していることが確認できます



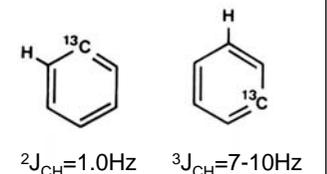
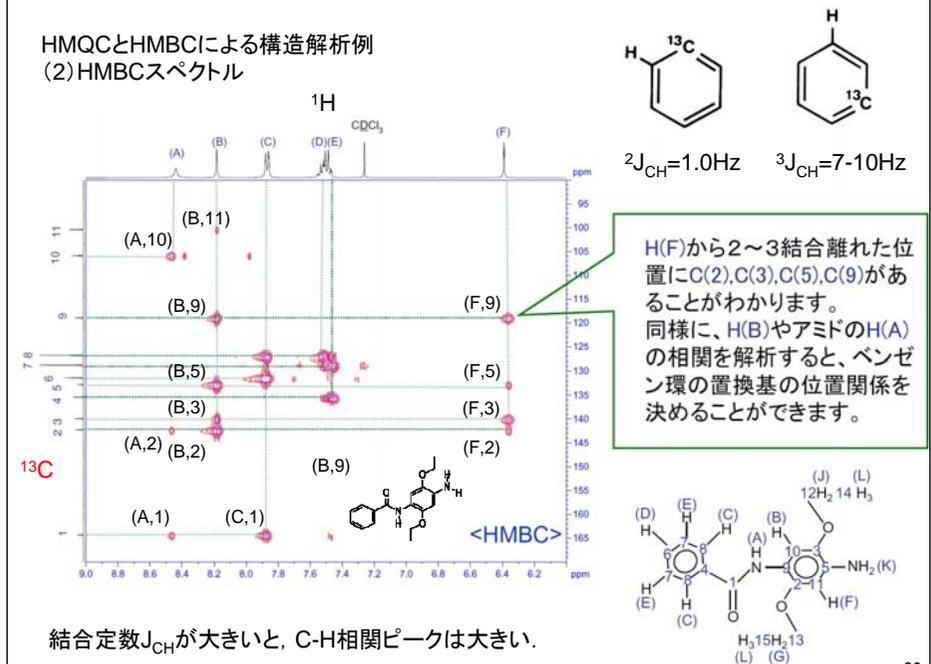
測定試料: Fast Blue BB

4-Amino-2,5-diethoxybenzanilide; N-(4-Amino-2,5-diethoxyphenyl)benzamide

(http://www.hitachi-chem-ts.co.jp/news/hkts_news_20090127-01.pdf)

35

HMQCとHMBCによる構造解析例 (2) HMBCスペクトル



H(F)から2~3結合離れた位置にC(2), C(3), C(5), C(9)があることがわかります。同様に、H(B)やアミドのH(A)の相関を解析すると、ベンゼン環の置換基の位置関係を決めることができます。

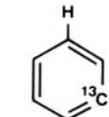
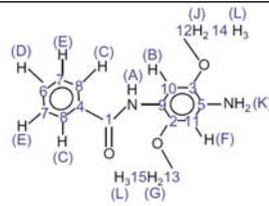
結合定数 J_{CH} が大きいと、C-H相関ピークは大きい。

36

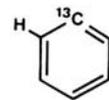
HMQC (◎)およびHMBC (○) 相関表

	1q	2q	3q	4q	5q	6	7	8	9q	10	11
A	○	○								○	
B		○	○		○				○	◎	○
C	○					○		◎			
D						◎		○			
E				○			◎				
F		○	○		○				○		◎

qは四級炭素



$^3J_{CH}=7-10\text{Hz}$



$^2J_{CH}=1.0\text{Hz}$

タンパク質のNMRにおけるシグナル帰属

天然存在比

$^1\text{H}:100\%$

$^{13}\text{C}:1.1\%$

$^{15}\text{N}:0.37\%$

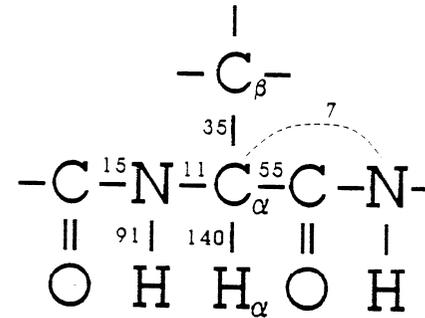


Figure 5.20. Peptide fragment with typical (absolute) values of J coupling constants indicated.

タンパク質の構造解析では、スピン結合を利用するために、 ^{13}C および ^{15}N でフルラベルした試料が必要となる。

種々の3次元NMR法

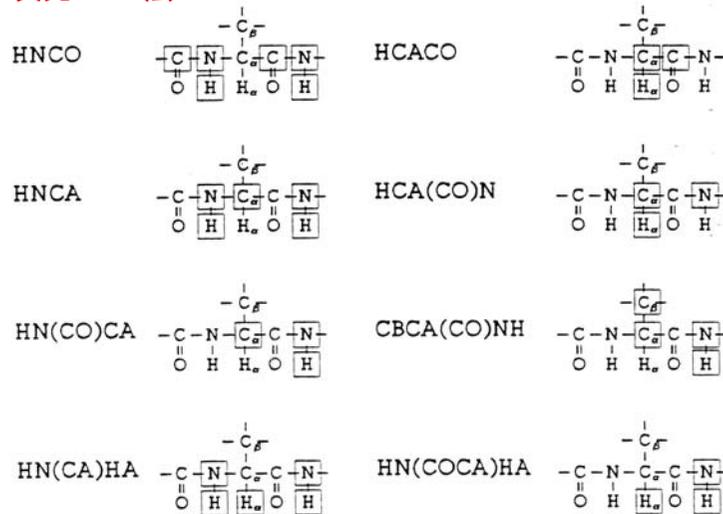
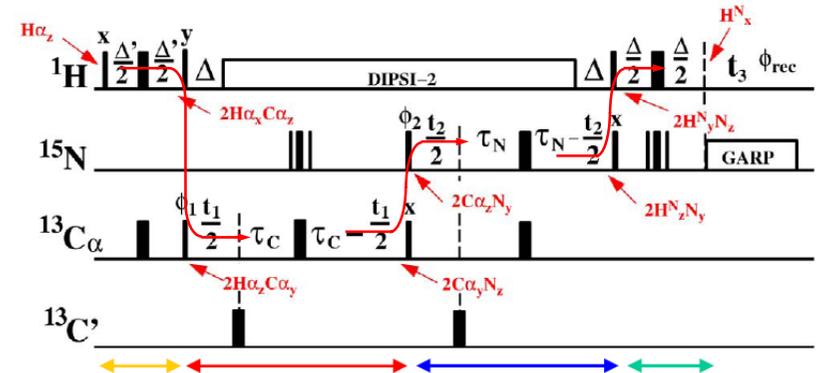


Figure 5.21. Collection of some of the 3D triple-resonance experiments used for the assignments of ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonances in proteins. The shaded boxes indicate the nuclei that are frequency labeled.

3D HNCA transfer: $\text{H}_\alpha \rightarrow \text{C}_\alpha(t_1) \rightarrow \text{N}(t_2) \rightarrow \text{HN}(t_3)$



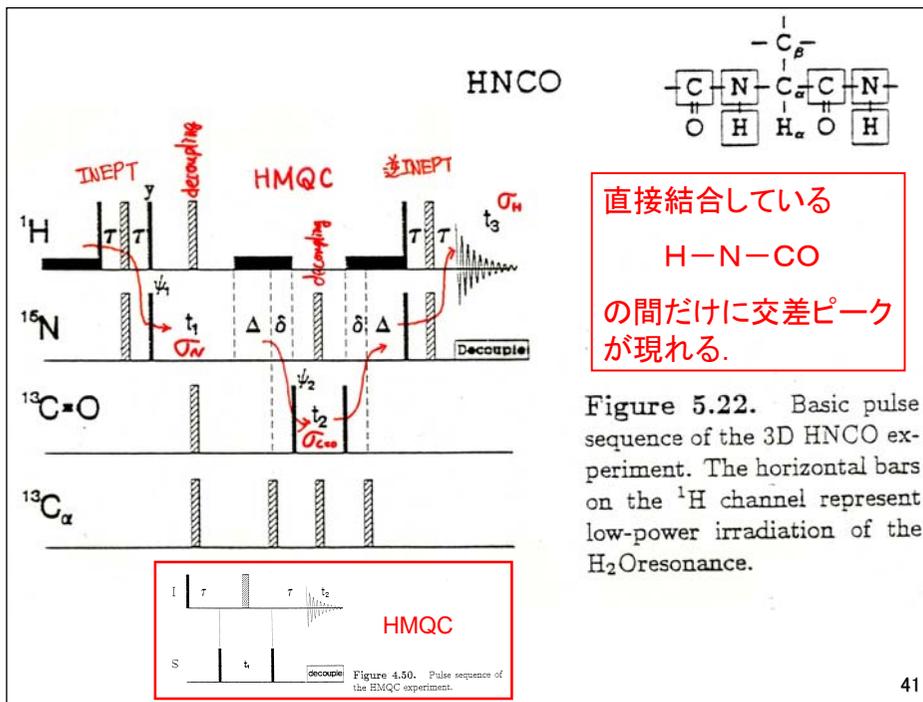
Transfer amplitude including T_2 relaxation

$\sin^2(\pi^1 J_{\text{H}\alpha, \text{C}\alpha} \Delta') \exp(-\Delta'/T_{2\text{H}\alpha})$

$\sin(\pi^1 J_{\text{C}\alpha, \text{N}} 2\tau_1) \cos(\pi^2 J_{\text{C}\alpha, \text{N}} 2\tau_1) \cos(\pi^1 J_{\text{C}\alpha, \beta} 2\tau_1) \exp(-2\tau_1/T_{2\text{C}\alpha})$

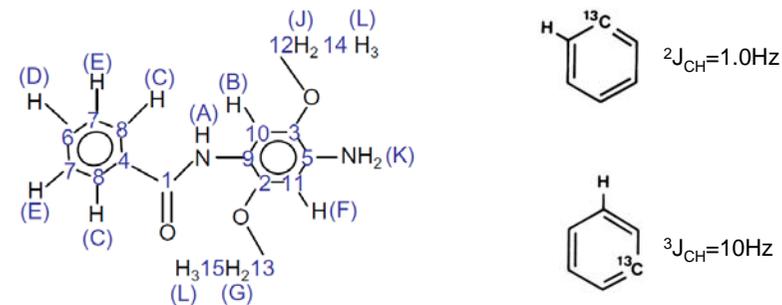
$\sin(\pi^1 J_{\text{C}\alpha, \text{N}} 2\tau_2) \cos(\pi^2 J_{\text{C}\alpha, \text{N}} 2\tau_2) \exp(-2\tau_2/T_{2\text{N}})$

$\sin^2(\pi^1 J_{\text{N}, \text{HN}} \Delta) \exp(-\Delta/T_{2\text{HN}})$



5月1日

Fast Blue BBのHMQCおよびHMBCスペクトルから次のように帰属されることを説明せよ。ただし、エチル基および NH_2 基の ^1H および ^{13}C スペクトルは示されていないので、J, K, L, Gおよび12-15については議論しなくて良い。



Fast Blue BB