

研究ノート

超伝導磁石核磁気共鳴による 生体物質の研究

京 極 好 正*

近年、生化学、生物物理学、生物工学、医学、薬学等の分野で核磁気共鳴を使った研究が盛んになってきている。これは超伝導磁石の核磁気共鳴装置が普及してきたのがおもな原因であろう。では何故超伝導の核磁気共鳴装置が必要なのかと言え、大きく2つに分けて考えることができる。1つは超高磁場の必要であり、1つは大きな試料で均一な磁場を得る必要性であろう。

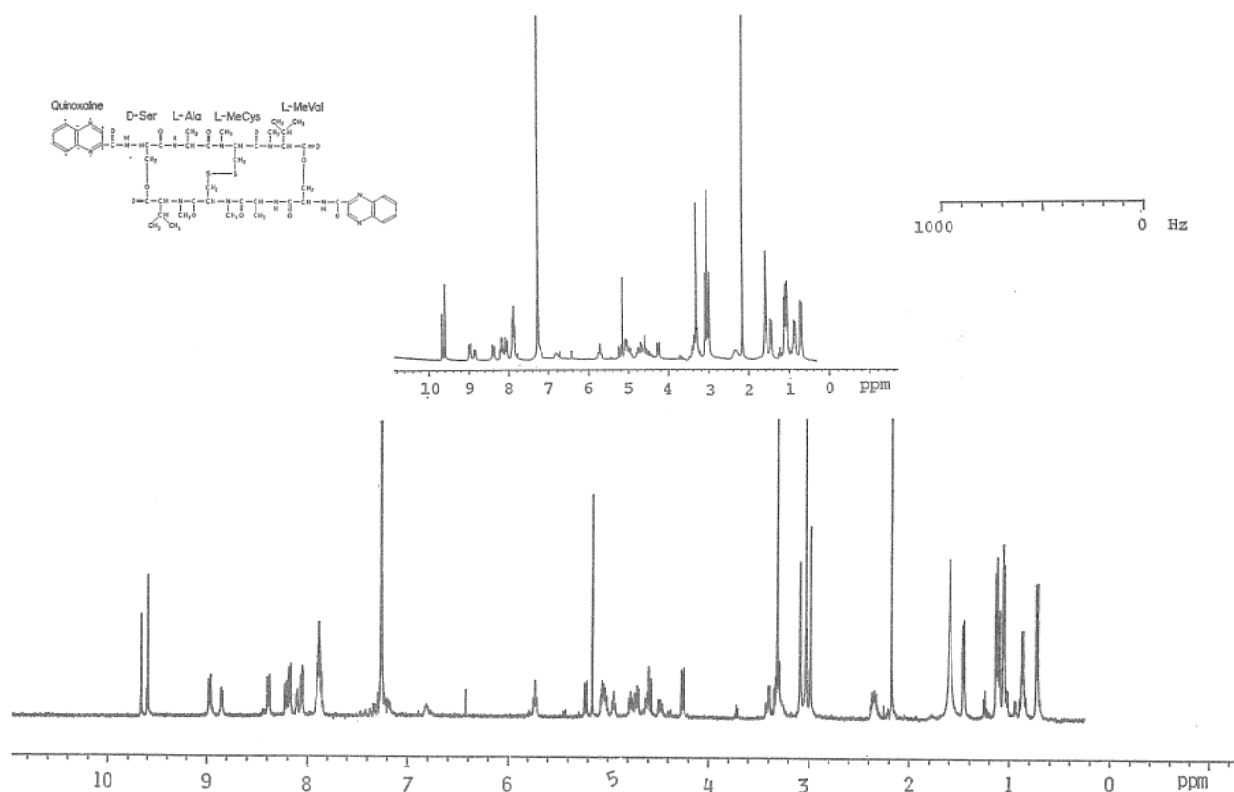
1. 超高磁場装置の必要性：磁気モーメントを持つ核は磁場の中におかれると核ゼーマン効果によってエネルギー準位の分裂が生じ外部振動磁場を与えるとその間隔に相当する振動数で共鳴吸収を示す。その振動数 $\nu = \frac{\gamma}{2\pi} H_0$ で与えられる。 γ は核の種類に固有の磁気回転比であり、装置の静磁場 H_0 がきまると共鳴周波数は1つに決るように見える。しかし分子を構成している核にはいろいろな化学的な環境の違いがあって等価ではない。個々の核の受ける磁場は $\nu_i = \frac{\gamma}{2\pi} H_0 (1 - \sigma_i)$ と考えられる。ここに σ_i はしゃへい定数と言われ $10^{-7} \sim 10^{-5}$ の程度の大きさを持つ値である。したがって個々の核の共鳴点を区別して観測するには $\Delta\nu_{ij} = \frac{\gamma}{2\pi} H_0 (\sigma_i - \sigma_j)$ の差を識別せねばならない。蛋白質のような生体高分子になると小さな分子量のもので数百個のプロトンを有する。これを全部区別することは到底不可能であるが、より多くのプロトンを区別するにはできるだけ H_0 の大きなものがよいことになる。 H_0 としてはこれまでの電磁石の装置は 23.5 KG (プロトンの共鳴周波数 100 MHz) 程度であるが、この程度の装置では分子量数百の有機化合物はまだし

もアミノ酸が数個連ったペプチドでさえシグナルの分離は不十分であった。それ以上の強さの磁場の装置には超伝導磁石が用いられるようになった。現在 NbTi の線材を使った磁石で 94 KG (400 MHz) までの装置が、Nb₃Sn を使ったもので 140 KG (600 MHz) の装置が実用に供されている。360~400 MHz の装置は我が国でも20台近く普及しているが 500 MHz の装置は当蛋白質研究所のものが我が国で、第1号であり、600 MHz の装置は世界でも市販品はなく、研究機関での製作機が1~2ある。図はアミノ酸10個の環状ペプチドトリオスチンAの200 MHz と 500 MHz 装置で測定したスペクトルである。

このような装置を維持するには、どうしても液体ヘリウムが必要である。装置は一度稼働させると止めることなく半永久的に磁場を入れたままにする。そのための液体ヘリウムの消費量は現在の装置では磁場の強さにあまり関係なく 0.5 l/日以下である。磁場入れの時には 200~300 l の液体ヘリウムがいるが、一度稼働すれば維持には1ヵ月30 l 位しかいらぬ。これは昔の装置に比べてきわめて少ない消費量であり、経済的にも維持にさほど負担を感じなくなっている。これがまた装置普及の原因でもあろう。

単に高い磁場を作るといっただけならこれ以上のものも可能であろうが、核磁気共鳴の装置には非常に高い磁場の均一性と安定性が要求される。すなわち最低直径5mm高さ1cm位の容量の試料管で絶対共鳴周波数約500 MHz で、0.1 Hz の分離を可能にするにはこの容量の中で 2×10^{-10} の均一性が要求される。そのためにはシムコイルと言って、カレントにより付加的な磁場を発生させて静磁場を微調節するコイルが20近くもある。また、微弱なシグナルをノイズから区別して検出するためにシグナルの積算

* 京極好正 (Yoshimasa KYOGOKU), 大阪大学, 蛋白質研究所, 蛋白質物性部門, 教授, 理博, 生物構造化学



図説明 ペプチド抗生物質トリオスチンAのプロトン核磁気共鳴スペクトル，
重クロロホルム溶液 0.3ml に 1.5mg の試料を溶かし，16回積算。
上図 JEOL FX-200，下図 JEOL GX-500 で測定したもの。
同じ周波数スケールにしてある。

を行うが，その間で磁場が変動してはいけない。そのためには積算の間，すなわち数分から数10時間の間磁場が周波数にして 0.1 Hz もずれてはいけないのである。電磁石や永久磁石では絶対的に変動を抑えることは不可能であるが，超伝導磁石ではそれに近い値が得られ，しかも NMR ロックという操作と組み合わせて，相対的にそれを可能としている。

超高磁場の装置のもう1つの利点は感度である。NMR の感度は $N \frac{(I+1)}{I} \mu^3 H_0^2$ に比例する。ここに μ は磁気モーメント， I は核スピンの大きさ N は核の数であるが，測定する核種が決まれば，装置としては磁場の二乗に比例することになる。実際には検知コイルの Q 値の問題等もあって H_0^2 にはなかなか比例しないようであるが，理想的に行けば，磁場が約3倍になると，感度は1桁上り，試料の濃度は1/10で済むようになる。このことは貴重な生体試料の測定では大事なことであり，試料の絶対量を減らせることと，溶解度が小さなもので

も測定可能になる場合が出てくる。分子量の大きな蛋白質のような場合，そもそもシグナルの線幅は太く，超高磁場装置を用いてもシグナルの分離にはたいした効果の無い場合でも感度の面で超高磁場装置が有用な場合も多い。それでも他の分光法に比べてまだ感度は悪く，蛋白質でも最低 1 mM ~ 0.3 mM 濃度の溶液が 0.3 ml 位は必要である。

利点ばかり述べたが，磁場が高くて不利になる場合もある。ある種のカルボニル基の ^{13}C などには化学シフトの異方性が大きい。そのような場合，磁気異方性による緩和はやはり磁場に比例し，線幅は磁場の二乗に比例する。従って小さな化学シフトの差しかないカルボニル基のシグナルの分離は磁場を高くするとかえって悪くなる。同様のことはそのシグナルにスピンスピン結合による微細構造がある場合にも，磁場が高くなると線幅の拡がりのため見えなくなってしまうことがある。

このようにしてシグナルを分離することが我

々にとっては目的でなく仕事のはじまりである。分離されたシグナルの各々が化学構造上のどの核に由来するかを決めることがまず問題である。そのためには、有機化学的に、また生合成を利用して特定の場所に同位元素をいれ、それによって生じるシグナルの消失や、核スピン分裂を見て帰属する。そのようなことが難しい場合は色々な情況証拠を集めて帰属を行うが、どうしても誤りをおかしやすい。帰属が出来てはじめて、シグナルの温度や濃度変化によるシフトの挙動、常磁性物質との接触によるシグナルの線幅の拡がり、緩和時間、二重共鳴による分裂や強度の変化等を測り、これらを総合して、分子中の核と核の距離、位置関係、他分子との結合位置または分子中の特定のグループの動きやすさ等の情報を得ることが出来るようになる。現在溶液中の分子で原子レベルの情報が見られるのは核磁気共鳴法しかないと言ってしまう。

2. 広い試料部装置の必要性：生体からとり出した試料には溶液にはならない凝集物、たとえば腱とか筋、また生体膜や細胞壁のような超分子構造をとっているものもある。このような試料の核磁気共鳴は線幅が2桁も3桁も広く、化学シフトの差よりも線幅の方が大きくなって、単に磁場が強力というだけではシグナルの分離は出来ない。そのようなものに対して ^{13}C や ^{31}P のような“rare spin”核のシグナル強度を強め、その線幅も溶液のシグナルより1桁程度の広いシグナルを得る固体高分解能 NMR 法が普及しはじめている。この方法では①交叉分極法(CP法)、②マジック角度回転法(MAS)、③多重パルス法といった手法を行っているが、MASの場合、試料管を磁場方向から、 54.7° 傾けて、線幅程度的高速回転を行う。そのような装置は試料部はかなりのスペースが必要で、その部分が大きくとれる超伝導磁石が用いられることが多い。MASでは線幅は磁場強度に比例するので、試料管の回転数も比例して増大しないとならないが、技術的には大変難しく、現実には300 MHz以上の装置でMASを行うことはまだできていない。固体高分解能 NMRは、今まで高分解能 NMRの対象とならな

った高分子や分子集合体でスペクトルが得られるというわけで、多くの人々が期待しているが高分解能と言っても溶液のそれとはかなり線幅も広いこと、プロトンは線幅を細くすることが難しいこと、感度の点など、現時点であまり過大評価してはならないだろう。

これまでの測定試料は生体から取り出された物質で、 1 cm^3 程度の範囲で磁場の均一性が保たれていればよかったが、生物個体そのままや組織、器官の一部で灌流実験などしながら測定するには広い試料部で均一な磁場が必要となる。実際には直径3 cm~5 cmの試料管にネズミを入れたり、筋肉を入れて ^{31}P のシグナルからATPの代謝の実験等が行われている。

生体中で一番測定しやすいのは水のシグナルであり、水の状態に関する研究は多い。以前から腫瘍になったり、癌化した細胞の水の縦緩和時間 T_1 は正常細胞のそれと比較して長いと言われている。多分に水含量が多くなっていることが第一の原因であろうが、真の理由ははっきりしない。しかし、これを医学的に実用化して、人の身体の1部または全体で、水のNMRの強度や T_1 の分布を調べる方法(zeugmatography)が行われている。この測定は高分解能 NMRで行うような原理で行わず、磁場勾配法とか磁場焦点法とか言う方法がとられる。水のみ対象とするから磁場の大きさはそれ程大きいものが必要でないが、人を入れるような装置は直径1 mにもおよび、その枠内で均質な磁場を作り 1 mm^2 程度の分布の分解能を上げるのは容易なことではない。測定点での磁場は弱くとも、磁場の原点から遠いし、均一性、安定性が分解能に効くので超伝導磁石が用いられる場合が多い。人を入れるような装置では、磁場の人体におよぼす影響が問題とされ、米国の基準では最大磁場2テスラ、磁場の最大許容時間変化は3テスラ/秒となっている。英国では照射電磁波の上限も15MHgと定められている。この方法が本当に癌化の予見に役立つかどうかは議論があるが、磁気エネルギーの人体に対する影響は小さいだろうと言うことから胎児の診断に使われる計画もある。りんごのシグナルによる脳の診断などととも将来の発展が注目される分野である。