

実施課題名：光誘起核スピン分極測定によるタンパク質バインディングポケット構造とラジカル対ダイナミクス研究

【背景】血清アルブミンタンパク質のバインディングポケットは、ドラッグデリバリー等の立場から注目されている。これらと薬剤等が結合した状態の構造解析の研究は多種存在するが、結合した色素分子の光化学反応プロセスに関する詳細な研究は数える程しか存在しない。また、これらのバインディングポケット中での電子移動反応とそれにより生成するラジカル対の挙動は、生体内での量子効果としても興味深く、動物の磁気受容のモデルともなりうる。さらにラジカル対に起因する光CIDNP (Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization) は、生体分子系の高速観測や近年MRI等の医療応用を目指すDNP法において、核スピン分極による高感度化をもたらす。

【実施内容】

2021年1月7日に理研を訪問し、理化学研究所で開発された、NMR光照射装置を用いてBSA (Bovine Serum Albumin) とアントラキノン誘導体2,6-AQDS (Anthraquinone 2,6-disulconate) を混合した溶液においてCIDNP測定にトライした。事前に埼玉大学において、過渡吸収測定やその磁場効果測定、さらに分子動力学計算等を行った。これらの結果から1) AQDSがBSAとバインドしていること、2) AQDSがBSAのバインディングポケット中に存在するトリプトファンと電子移動反応によりラジカル対を形成すること、3) ラジカル対は励起三重項状態から作られること、4) 一重項ラジカル対から再結合反応が起こっていることなど明らかにした。以上の結果からみてCIDNPが観測できることがかなり期待された。予想に反し、観測されたCIDNP信号は極めて小さく、サンプルの光による劣化と相まって、その存在を完全に確認することはできなかった。この結果は以下の理由によるものと推察される。1) 化学反応がサイクリックでしかも20マイクロ秒程度でラジカル種が消えてしまい、ラジカル種における核スピンの緩和を待たずに反応が完結してしまうために、スピンソーティングメカニズムがさほど機能しなかった、2) 磁場強度とラジカル種のg値の異なり Δg と超微細結合とのマッチングが合わなかった。

Fig.1

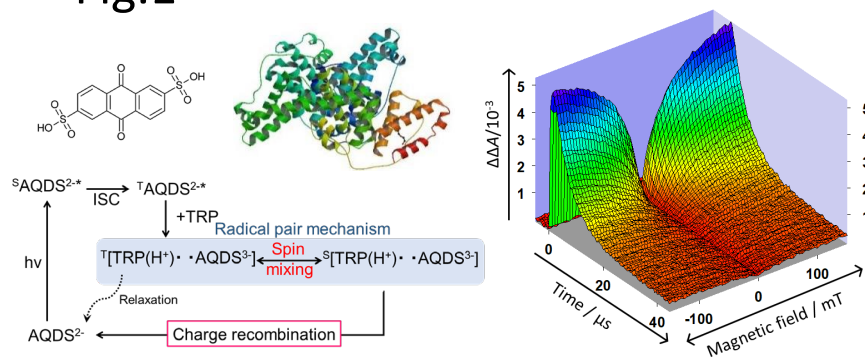


Fig.1: 2,6-AQDS, BSA系における反応スキームと得られた過渡吸収の磁場効果

Fig.2

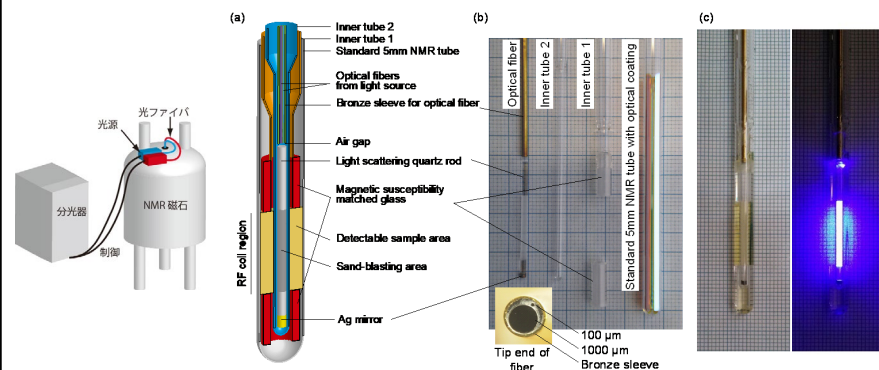


Fig.2: 用いたCIDNP測定装置

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題
利用報告書

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

課題受付番号	PF20-01-R-029		
利用課題名	光誘起核スピン分極測定によるタンパク質バインディングポケット構造とラジカル対ダイナミクス研究		
実施機関名	埼玉大学		
実施部署名	理工学研究科		
実施責任者管理職名・氏名	職名	准教授	氏名 前田 公憲
実施部署所在地	埼玉県さいたま市桜区下大久保 2 5 5		
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	生物と量子力学との関連についての観点から、生体分子系の磁気感受に着目して来たが、近年蛋白質中にバインドした色素分子が光励起によりラジカル対を生成し、非常に大きな化学反応の磁場効果を生成することを明らかにしてきた。これらは動物の磁気感受のメカニズムを探るためのモデルだと考える。しかし、通常の分光測定ではバインディングポケットの所在やそこでの構造など、ローカルな情報を得ることは困難である。本研究ではこれらの光誘起核スピン分極測定を多周波数のNMR装置を用いて行う事により、バインディングポケットの構造やそこでの化学反応プロセスの詳細を明らかにし、より高度な色素-蛋白質結合系を構築し、磁気感受モデルとして利用することを目的とする。		
利用実施時期、及び期間	2020 年 5 月 1 日～2021 年 3 月 31 日 総利用日数： 5 日 ☐当初計画どおり・☒当初計画変更 (変更理由) 埼玉大の問題であるが、新型コロナウイルスの影響で出張を控えることがもとめられる状態が続いたため、時間のかかる NMR による構造決定等の測定を行わず、NMR の利用を最低限に減らして CIDNP の可能性の確認のみとした。		
利用施設 理化学研究所	NMR 装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、(○) 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz 利用期間 1：2021 年 1 月 7 日～2021 年 1 月 7 日 利用期間 2：20 年 月 日～20 年 月 日 利用期間 3：20 年 月 日～20 年 月 日	

		利用装置② ・ (○) 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz 利用期間 1 : 2021 年 3 月 8 日～2021 年 3 月 11 日 利用期間 2 : 20 年 月 日～20 年 月 日 利用期間 3 : 20 年 月 日～20 年 月 日
その他の 利用施設		
成果の 概要	実施内容 (字数制限はありませんが 400 字～800 字以内(程度)でお書きください。)	本研究の対象ではないが、CIDNP が観測可能であることがよく知られている、リゾチームーフラビン系において、CIDNP の測定ができたとの報告を NMRPF 担当者から受けて、その条件等から本研究のサンプルである、牛血清アルブミン (BSA) とアントラキノン誘導体 (AQDS) 溶液を作り、それらのラジカル対の形成とその後の反応について、過渡吸収法とその磁場効果、さらに高速磁場スイッチング法を用いてその反応速度等も含めて詳細に検討した。その結果これらの結果から 1) AQDS が BSA とバインドしていること、2) AQDS が BSA のバインディングポケット中に存在するトリプトファンと電子移動反応によりラジカル対を形成すること、3) ラジカル対は励起三重項状態から作られること、4) 一重項ラジカル対から再結合反応が起こっていることなど明らかにした。以上の結果からみて CIDNP が観測できることがかなり期待され、結合ポケットに AQDS ラジカルがほぼ完全に閉じ込められる反応系と結合ポケットからのラジカルのエスケープが顕著な反応系とを用意した。 どちらの系も CIDNP が観測される事が予想されたが、予想に反し、観測された CIDNP 信号は極めて小さく、サンプルの光による劣化と相まって、その存在を完全に確認することはできなかった。この結果は以下の理由によるものと推察される。 1) ポケット内でのラジカル反応がサイクリックで、しかも 20 マイクロ秒程度でラジカル種が消えてしまうために、ラジカル種における核スピンの緩和を待たずに反応が完結してしまう。そのために核スピンの電子スピンペアの量子力学的時間発展によって選択される、所謂スピンソーティングメカニズムがさほど機能しなかった。2) 磁場強度とラジカル g 値の異なり Δg と超微細結合とのマッチングが合わなかった為、CIDNP を観測するに適していなかった。3) 核スピン分極がみられるほど反応効率が顕著なものではなかった。 以上が考えられる原因ではあるが、完全な原因はいまだに不明である。しかし経験から言って、CIDNP 法はうまくマッチングした時には強い分極が観測されるが、うまく観測されない系において、それらをチューニングして分極の観測を成功させるのは一筋縄ではいかないため、信号を見るための条件のチューニングはさほど行わなかった。他の手法により反応系をより深く知ることにより、原因を特定できるかもしれない。

	本課題により得られた成果と当初目標との比較 (字数制限はありませんが 400 字～800 字以内(程度)でお書きください。)	CIDNP 信号がほとんど得られなかったので、当初目標とした成果はほとんど得られなかった。CIDNP 信号はその環境場や手法の特性上このように信号が得られないことは珍しくはないが、磁場効果等の結果から長寿命ラジカル対が存在し、長い寿命を持つフリーラジカル的な意味を持つ状態もできていることから考えると、CIDNP が取れなかったのはいささか不思議であり、現在その原因を調査している。新型コロナウイルスによる出張自粛の環境において、理化学研究所を訪問し、実験することが限られていたため、技術的な改良をさほどできなかった。しかし、結果を見る限りにおいてちょっとした改良によって見えない信号が見えてくるとは考えがたく、CIDNP に関しては、その対象となる分子系も含めて、方法論を抜本的に見直す必要がある。しかし日本ではほとんど測定することのできない Photo CIDNP を測定できる可能性を持つ施設が、日本国内に誕生したことは、生体分子系のダイナミクスに興味を持つ我々のような研究者にとって、重要なことであり、多彩な生体分子系への展開が期待される。
	成果発表	特になし。
	今後の展開 (字数制限はありませんが 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)	理化学研究所担当者と CIDNP 測定のための、装置改良の可能性や妥当な化学反応系の選択等について議論を続け、結果によって新たな課題の申請を行う可能性がある。一方で、他の研究者等特に DNP 技術発展の立場から、光による DNP 形成に興味を持つ声は多い。例えばペンタセン等の有機結晶の光励起状態を利用した生体分子による DNP の可能性についての研究が大阪大学等を中心に進められているし、ラジカルと励起三重項との電子スピン分極に基づく核スピン分極の生成についてもイギリスのグループが進めている。今後理化学研究所においても、光を用いた核スピン分極に関する研究められるならば、私も微力ながら協力したいと考えています。
社会・経済への波及効果の見通し (字数制限はありません 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)		核スピン分極は、主に DNP を中心として、単に NMR の高感度化から MRI による診断の高速化や選択的な代謝の分析など、多彩な医学領域に波及する可能性がある。近年では DNP 等の磁気共鳴技術はスピンという量子力学的な技術応用の一つと考えられ、量子コンピューティングなどの技術と協調して進歩することが期待されており、量子技術の社会的な認知や医療等のセンサー技術にも関与していくものと期待される。

利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望	私のような比較的小さな大学においては、通常の有機化学的構造決定での NMR 利用は一般的だが、タンパク質等で用いられる巨大磁石による測定をする機会が限られている中で、このような機会を与えられたことは大変喜ばしいことです。今後とも多様な研究者、学生に開かれた NMR 施設を望みます。
今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待	各スピン分極に限らず光照射やストップドフローなどと組み合わせたダイナミックな NMR 法の開発を今まで以上に進めていただければ、我々の利用の機会も増えて助かります。
成果公開延期の希望の有無	なし
その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。)