

タンパク質回収フロー型自動 NMR 測定装置  
 ～1H-15N 相関スペクトルの測定と Similarity 計算の完全自動化～

ブルカー・バイオスピン(株) 佐藤 一

[はじめに]

NMR は原子 1 個の分解能を持っているので、化合物の構造解析をする上で必須の分析手段となっている。今日、溶液 NMR の対象となる試料は分子量数百の化合物から、数万以上の生体高分子にわたっており、解析結果から原子間の距離および角度情報などが得られる。NMR 法の問題点は、分子量の壁と感度の低さと考えられる。分子量が大きくなると、シグナルが重なり合い、解析が困難になる。この問題を解決するために、より高磁場の装置を用いて分解能を上げたり、試料に  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  などの安定同位体標識を導入してスペクトルを単純化したり、多核種多次元 NMR 法や TROSY 法をベースとしたパルスプログラムを用いてシグナルを先鋭化したりすることが一般的となっている。一方、感度の低さに対しては、検出コイルを約 20K に冷却した状態で測定するクライオプローブが高感度化に寄与している。このように NMR のハードとソフトウェアならびにタンパク質の試料調製の進歩により、NMR はタンパク質そのものの立体構造解析だけでなく、タンパク質-低分子化合物複合体や生体高分子同士の複合体に応用され、薬物の開発や分子認識の研究に役立てられている。本テーマでは、フロー型 NMR 検出器を用いて、試料の注入、二次元 1H-15N 相関 NMR スペクトル測定およびタンパク質回収を含む工程の自動化を行ない、薬物の候補となる低分子化合物を網羅的にかつ迅速に解析する新技術の開発をめざした。

[達成状況]

以下の工程を完全自動化し、本テーマの基本骨格を開発することができた。①タンパク質と低分子化合物の混合液を資生堂(株)社製の装置から弊社フロー型 NMR 検出器へ注入(約 4 分)、②弊社 NMR 装置において磁場のロックと分解能調整(数分)、③弊社 NMR 装置において二次元 1H-15N 相関 NMR スペクトルの測定(約 30 分)、④弊社ソフトウェア AMIX において、タンパク質単独のスペクトルと低分子化合物を混ぜたスペクトルの Similarity 計算(約 10 秒)、⑤AMIX から資生堂(株)社製のシステムへ計算結果を送信し、資生堂(株)社製のシステムにより試料を回収する(約 30 分)、⑥①に戻って次の試料の測定をはじめ。

[今後の取り組みと将来への展望]

AMIX の Similarity 計算において更なる精度と再現性の向上を図る。これによりタンパク質と低分子化合物との弱い相互作用を検知できると考えられる。

現在オンラインに組み込まれている Similarity 計算は観測された全ての相関シグナルに対して行なわれている。この装置において、フリーのタンパク質溶液の 1H-15N 相関 NMR スペクトルを 2 回自動測定したのち、その Similarity を計算すると、理想的に 1 となるが、実際には 1 とならないことがある。その理由として、微妙な濃度、温度または pH の差が影響していると考えられる、この問題を解決するために新たな Similarity 計算方法を検討している。すなわち任意の相関シグナル 20 本を選択する。そのうちの 10 本は経験的に低分子化合物と相互作用しない相関シグナルを選択する。この 10 本と残りの 10 本の Similarity 計算を独立に行なったのち、その比を求める。また 1H および  $^{15}\text{N}$  の化学シフト値の変化は低分子化合物がタンパク質に結合したかどうかの判定に用いられるが、この変化量の境界値を設けることにより、微妙なサンプル条件による影響が抑えられ、Similarity 計算の再現性が向上すると考えられる。

相関シグナルの選択ならびに化学シフト値変化量の境界値を設定することにより、Similarity 計算の精度と再現性が向上したことをオフラインにおいて動作確認することができた。これをオンラインに組み込む改良を行う。