

大阪大学蛋白質研究所先端核磁気共鳴装置群利用報告書
(トライアルユース)

利用企業名	株式会社 JEOL RESONANCE
利用者部署、氏名	ソリューション・マーケティング部 SLTG 大阪 SVCT 佐田 勝志
連絡先 住所	〒562-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-5 ニッセイ新大阪南口ビル
連絡先 電話番号 Fax、E-Mail	Tel. 042-526-5142 Fax. 042-426-5778 E-mail. sata@jeol.co.jp
利用課題名	企業ユーザーのための固体 NMR アプリケーション開発
概要	蛋白質研究所では、DNP 固体 NMR 装置の開発を初めとした様々な最先端の成果を挙げており、かつ、NMR 装置を産業界に利用開放している経験から、企業ユーザーのニーズを把握している。そこで、本トライアルユースでは、蛋白質研究所 NMR 施設スタッフの協力の下、企業ユーザーのニーズに合った手法開発を行うことを目的とする。
利用実施時期及び期間	平成 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 8 月 31 日 総利用日数 : 20 日 当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由)
利用 NMR 装置	<input type="checkbox"/> 950 MHz (超低温プローブ、溶液) <input type="checkbox"/> 800 MHz (超低温プローブ、溶液) <input checked="" type="checkbox"/> 700 MHz (固体) <input type="checkbox"/> 600 MHz (超高感度固体 DNP) <input type="checkbox"/> 600 MHz (溶液) <input type="checkbox"/> 500 MHz (固体) <input type="checkbox"/> 500 MHz (溶液) <input type="checkbox"/> 400 MHz (溶液)

成果の概要	目的	近年、製薬関連企業からプロトン観測の実験依頼がある。それは企業がターゲットとする試料は同位体標識できないこと、また微量しか得られないことが多いからである。そこで、超高速試料回転が可能となる 1mm プローブを使って、企業からの依頼を想定した実験を行い、最適な条件を検討する。
	実験内容	1 mmローター（体積 0.8ul）に ^{13}C 同位体標識と非同位体標識したアラニンをそれぞれ充填した。実験は 700MHz 装置を使って、試料回転数 70kHz、プローブ温度 27°C（温度制御なし）で行った。1 次元 ^1H single pulse (Dipolar Decoupling MAS) と ^{13}C Cross-Polarization (CP) 測定、最後に 2 次元 H-C Hetero-Nuclear Correlation NMR (HETCOR) 測定を行った。
	結果及び考察	<p>^{13}C 同位体標識アラニンの 1 次元 ^1H 1pulse 測定では 3 つのプロトン ($\text{H}\alpha$, $\text{H}\beta$, NH) が分離して観測され、線幅は平均 0.6ppm だった(図 1)。カルボン酸の ^1H が観測されていないため中性固体であることがわかる。^{13}C CP 測定では、接触時間は 2ms で CP 条件はプロトン RF 磁場強度 100kHz、カーボン 30kHz 付近で最適条件を探した。^1H デカップリングは XiX スキームで 13kHz が一番良かった。結果、線幅 0.1ppm で CO, $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ の信号が観測され、それぞれ J_{CC} 結合による信号分裂を確認した(図 2)。分裂幅は、CO は 54Hz、$\text{C}\alpha$ は 35Hz と 55Hz、$\text{C}\beta$ は 32Hz だった。非同位体標識アラニンは測定時間 1.6h で $\text{S/N}=13$ の ^{13}C CPMAS スペクトルが得られた。バックグラウンドはなかった。^{13}C single pulse スペクトルでは 120ppm 付近にバックグラウンドが観測された。^{13}C 同位体標識アラニンの 2 次元 H-C HETCOR 測定は、混合期は CH 双極子相互作用を利用する接触時間 4ms の CP であり、展開期と取り込み期の ^1H と ^{13}C デカップリングは RF 強度 8-10kHz で、それぞれ CW 法と WALTZ 法を採用した。CP 条件はプロトン RF 50kHz、カーボン 20kHz 付近で最適化した(図 3)。展開時間と取り込み時間が短かったために分解能が落ちてしまったが、十分に時間をとれば高分解能スペクトルが得られる。非同位体標識アラニンの 2 次元 ^1H-^{13}C HETCOR 測定の確認は今後行う。</p> <p>以上の実験から、プロトン共鳴周波数 700MHz の高磁場で回転数 70kHz の高速回転により、これまで困難であった ^1H-^1H 双極子でカップリングを行うことで 1mg 以下の試料量で実用的な感度の高分解能 ^1H 及び ^{13}C-NMR スペクトルを得られることが確認できた。</p>
社会・経済への波及効果の見直し	1 mm高速 MAS プローブを使うことで、製薬や化学関連企業が扱う同位体標識が困難で微量しか得られない固体試料から、初めて高分解能なプロトン NMR の構造情報を得ることができる。この性能により、より多くの企業ユーザーが固体 NMR 利用に関心を持つことが期待できる。	
成果公開時期の希望	<input checked="" type="checkbox"/> 即時公開 <input type="checkbox"/> 論文・特許公開後（最大 2 年後まで）	
利用周辺環境に関する希望		
その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。)	

本報告書については、印刷または必要な編集・加工を行った上で公開します。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資料作成または発表をお願いする場合があります。

スペクトルまたは図の添付欄

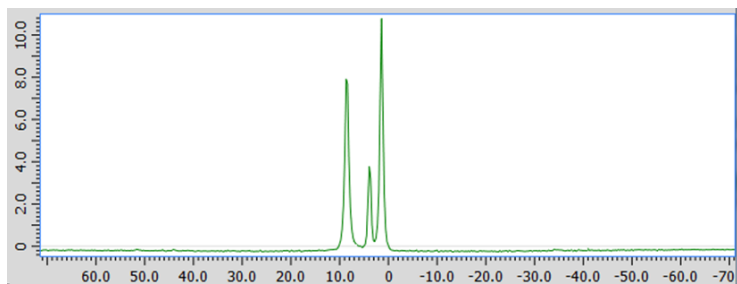


図 1. ^{13}C 同位体標識アラニンの ^1H 1pulse スペクトル

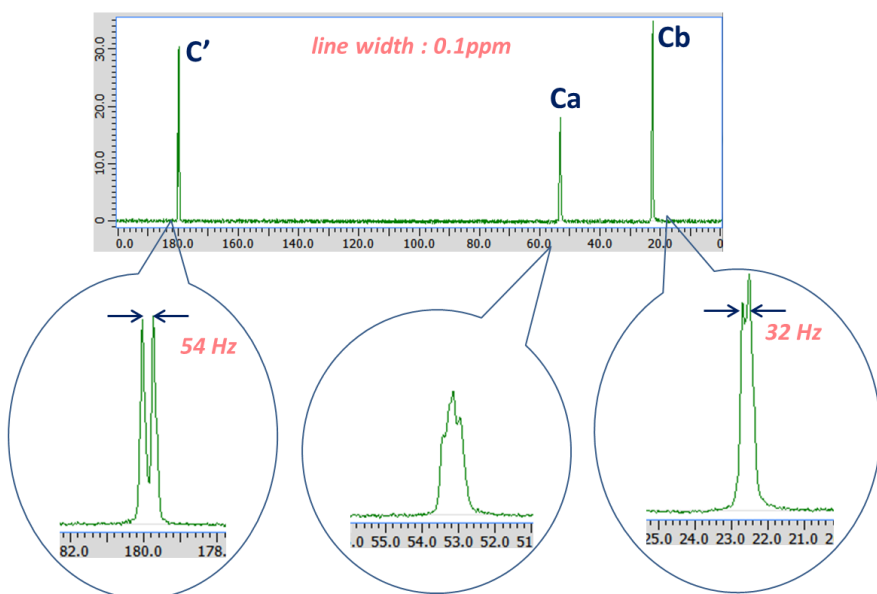


図 2. ^{13}C 同位体標識アラニンの ^{13}C CP スペクトル

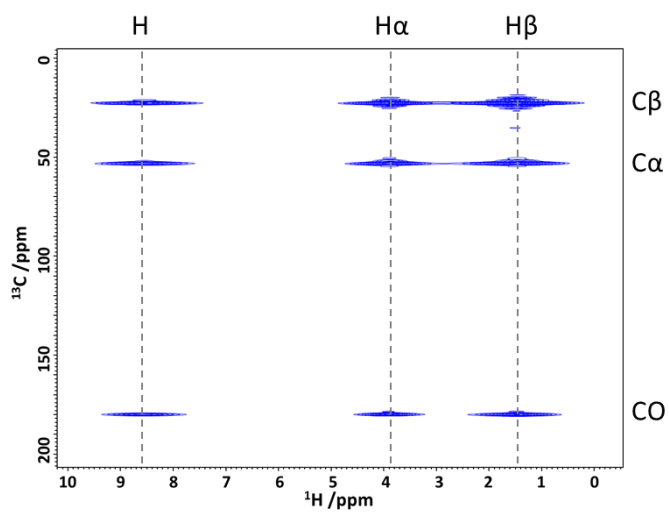


図 3. ^{13}C 同位体標識アラニンの H-C HETCOR スペクトル
(高速試料回転によりプロトンのサイドバンドはなし)