

# 溶液 DNP-NMR の代謝研究への応用

阿部 孝政<sup>1</sup>、久保 均<sup>2</sup>、原田 雅史<sup>2</sup>

<sup>1</sup> オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社 MRI/Biotoools 事業本部

<sup>2</sup> 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 画像情報医学分野

## Metabolic Study by Solution State DNP-NMR

Takamasa Abe<sup>1</sup>, Hitoshi Kubo<sup>2</sup>, Masafumi Harada<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MRI/Biotoools Division, Oxford Instruments KK, <sup>2</sup> Department of Medical Imaging,  
Institute of Health Biosciences Graduate School, The University of Tokushima

Recently, dynamic nuclear polarisation (DNP) has been shown to greatly enhanced signal intensity of NMR nuclei in solution-state NMR spectroscopy. In 2003, Ardenkjaer-Larsen *et al.* developed an automated method to polarise <sup>13</sup>C nuclei at low temperatures in a strong magnetic field in the presence of a trityl radical then bring the sample to room temperature very quickly to perform solution-state NMR measurements.<sup>1)</sup> This method was most practical for long  $T_1$  <sup>13</sup>C nuclei such as non-protonated carbonyl or carboxyl carbons in rapidly tumbling small molecules, which yielded NMR signal enhancements of 10,000-fold or higher. Therefore, DNP is expected to be useful to metabolic study such as metabolic imaging, metabolic diagnostics and metabonomics. We have been performed to measure some metabolic relevant molecules for these studies. The results will be discussed.

### 1. はじめに

NMR および MRI の弱点である感度の問題を、超偏極技術を利用することによって克服する試みが近年活発に行われており、最近では応用研究の報告も増えてきている。超偏極技術には <sup>129</sup>Xe や <sup>3</sup>He などの希ガスをを用いる手法やパラ水素添加法、動的核偏極法(DNP) などいくつか知られており、それらをシステムティックに行うための装置も開発されてきた。DNP に関しては、2003 年に Ardenkjaer-Larsen らが極低温・強磁場中にて試料と安定なトリチルラジカルを共存させた条件で <sup>13</sup>C 核を偏極し、その後瞬時にサンプルを室温へ戻して溶液 NMR 測定を行うためのオートメーション化された手法を開発した<sup>1)</sup>。この手法は、すばやくタンブリングしている低分子化合物におけるカルボニル炭素などのプロトンが結合していない 4 級炭素のように、長い  $T_1$  を持つ <sup>13</sup>C 核に対しては 1 万倍あるいはそれ以上のシグナル増幅をもたらす。その魅力的なアプリケーションの一つとして、生きた動物で <sup>13</sup>C 化学シフトイメージングを用いた 1-<sup>13</sup>C ピルビン酸、1-<sup>13</sup>C 乳酸、1-<sup>13</sup>C アラニンのリアルタイム代謝イメージングを Golman らが報告している<sup>2)</sup>。このように DNP の技術を用いることによってこれまで感度不足のために実現が困難であった特定の化合物の代謝をリアルタイムでモニターすることを可能にするだけでなく、微量な成分を数多く含む代謝物の網羅的解析すなわちメタボロミ

---

Keywords: dynamic nuclear polarization, DNP, DNP-NMR, hyperpolarisation, metabonomics

あべ たかまさ、くぼ ひとし、はらだ まさふみ

クス研究への応用にも役立つものと思われ、代謝研究の発展に大きく貢献していくものと期待される。本研究では生体内の代謝活動をリアルタイムにモニターすることが期待される数種の代謝関連物質を用いて溶液 DNP-NMR 測定を行い、検討を行った。

## 2. 実験方法

代謝関連物質として、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose,  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate,  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -pyruvate,  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glutamate,  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glycine を選択し、 $^{13}\text{C}$  核について DNP によるシグナル増強度の評価を行った。それぞれの化合物数百  $\mu\text{g}$  ~ 数 mg を  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6=1:1$  または  $\text{D}_2\text{O}/\text{Glycerol}=3:2$  のガラス化溶媒に溶解し、そこに 15 mM の濃度となるように trityl radical(OX63 または Finland)を添加した。核偏極装置には HyperSense(Oxford Instruments 製)を用い、適量の試料を 1.4 K で 60 分間偏極を行った。偏極した試料を溶解するための溶媒として 4 ml の 0.25 mg/ml EDTA 水溶液を用い、NMR には Bruker DRX600 を用いて 60 度または 90 度パルスにより FID を収集した。また、DNP-NMR スペクトルを取得後、比較のために thermal スペクトルも収集した。

## 3. 実験結果と考察

シグナル増強が化合物によってどの程度違いがあるのか確かめるため、すべての化合物について  $^{13}\text{C}$  DNP-NMR 測定を行った。それぞれについて検討した結果、thermal スペクトルと比較して数 10 ~ 数 1000 倍に S/N が増加したスペクトルが得られた。特に  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -pyruvate は著しいエンハンスが見られたが(Fig. 1)、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose に関してはそれほど大きな効果が得られなかった。この差は観測している  $^{13}\text{C}$  核の縦緩和時間  $T_1$  に強く依存しており、およそ 50 秒と比較的長い緩和時間を持つ pyruvate の 1 位の炭素と比べて glucose の 1 位の炭素は 1 ~ 2 秒と非常に短く、測定時には大部分の偏極が失われてしまったためである。

以上の結果から、DNP 後の溶液 NMR 測定におけるシグナル増強は観測核の  $T_1$  値に大きく依存するため、モニターの対象とする化合物にはカルボニル炭素など長い  $T_1$  値を持つ 4 級炭素を持つことが理想であり、今回測定した化合物でグルコースを除くすべての化合物で代謝研究に応用できる可能性が示唆された。現在は代謝のモデル系としてマウスの癌細胞を用い、さらに研究を進めているところである。

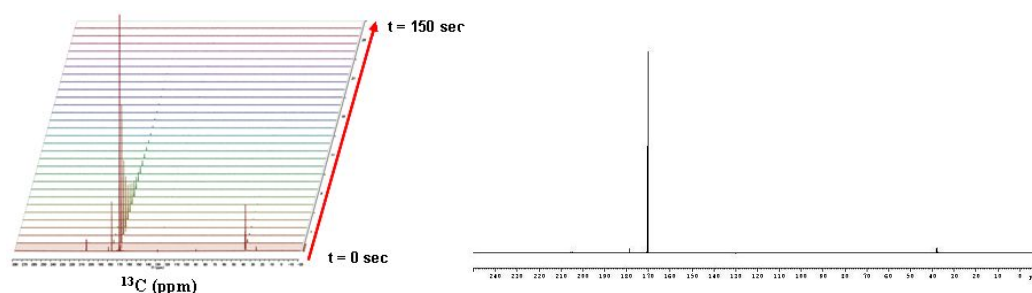


Fig.1  $^{13}\text{C}$  DNP-NMR spectra of  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -pyruvate

## 参考文献

- 1) Ardenkjær-Larsen J.H. *et al.*, *PNAS*, 100, 18, 10158-10163 (2003)
- 2) Golman K. *et al.*, *PNAS*, 103, 30, 11270-11275 (2006)