

DNP-NMR を用いた多核 NMR メタボロミクスに関する基礎的研究

日本医科大学 NMR 研究施設¹⁾、オックスフォード・インストゥルメンツ(株)²⁾、
京都大学 初期診療・救急医学講座³⁾、日本医科大学 救急医学講座⁴⁾

○平川慶子¹⁾、阿部孝政²⁾、小池薫³⁾、佐藤格夫⁴⁾、増野智彦⁴⁾、大野曜吉¹⁾

Basic research for multinuclear NMR based metabolomics with DNP-NMR

NMR laboratory, Nippon Medical School¹⁾, Oxford Instruments KK²⁾
Department of Primary Care & Emergency Medicine, Kyoto University³⁾
Department of Critical Care Medicine, Nippon Medical School⁴⁾

Keiko Hirkawa¹⁾, Takamasa Abe²⁾, Kaoru Koike³⁾, Norio Sato⁴⁾, Tomohiko Masusno⁴⁾
and Youkichi Ohno¹⁾

Dynamic Nuclear Polarisation (DNP) yields greatly enhanced signal for ¹³C, ³¹P and ¹⁵N nuclei in solution-state NMR spectroscopy. This procedure has been shown to yield a signal-to-noise enhancement of over 10,000 times compared to conventional NMR experiment. The present study investigated the feasibility of using DNP-NMR for metabolomic study.

【背景】我々は、NMR メタボロミクスを用いた疾患解明システムの確立をめざしている。これまでに、各種疾患における体液や臓器内の代謝物について、¹H NMR スペクトルを用いた網羅的解析を行った結果、出血性ショック後の蘇生効果や髄膜腫摘出物の新たな鑑別診断などに関して臨床応用につながる結果を得ることができた。炭素、窒素、リンは、生体分子に含まれる重要な元素であるが、観測対象となる同位体 (¹³C、¹⁵N、³¹P) の相対感度が低く、体液や臓器抽出物の NMR スペクトルについては、これまで良質なデータを得ることが困難であった。しかしながら、これらの観測核はケミカルシフト範囲が広く、代謝物 1 分子中に含まれる同一元素数も少ないなど分子情報を得るうえでは数々の利点があり、測定手法の改善により十分な S/N 比が獲得できれば、複数の核種による NMR スペクトルデータを用いた高精度のメタボローム解析が期待できる。感度の向上法としては、高磁場マグネットの使用、同位体濃縮などがあるが、設置環境やコスト面から、汎用性が低く、病態解析や診断応用などの臨床応用を目的とした NMR メタボロミクスへの応用は現在のところ困難である。

Key Words: DNP-NMR. metabolomics, phospholipid, ATP, choline

ひらかわけいこ

そこで、我々は、あらたに近年話題の DNP-NMR 法を用いた超高感度測定に注目し、多核 NMR スペクトルによるメタボローム解析への有用性に関する基礎的研究を開始した。今回、エネルギー代謝関連リン化合物およびリン脂質化合物の標準品などを用いて ^{31}P 、 ^{13}C 、 ^{15}N について DNP-NMR 測定におけるサンプル調整や測定条件の最適化と共に、thermal 測定データとの比較も行った。

【方法】

- (1) 測定試料 ; ①ATP②ADP③PC④PEA⑤PtC⑥PtEA⑦大豆由来リン脂質混合物
- (2) NMR 測定 ; NMR 測定はすべて横浜理化学研究所 NMR 施設の 600MHz DRXR600 型 FT-NMR 装置 (Bruker) にて行った。DNP-NMR 測定における試料の超偏極化は装置に付設された in vitro DNP polarizer、Hypersense™ (Oxford instruments) を用いて行った。

【結果】

ラジカルを選択、偏極時間、ガラス化溶媒などを最適化することにより、今回測定した化合物については、 ^{31}P 、 ^{13}C 、 ^{15}N すべての核種について、DNP-NMR 測定で、1 回の積算で S/N 比のよいスペクトルデータを得ることができた。

緩和時間の影響など、今後検討すべき課題は多いが、リン脂質やエネルギー代謝関連リン化合物など、従来の測定法では満足は得られなかった代謝物の解析への活用が期待できる結果が得られた。

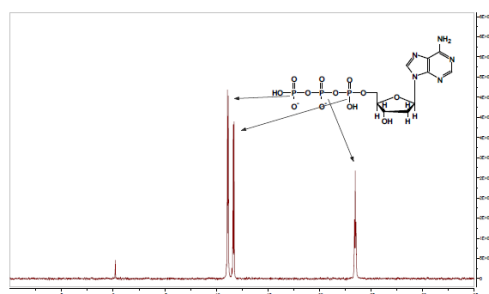


Fig.1 ^{31}P DNP-NMR spectrum of 500µg ATP with OX63. (1 scan)

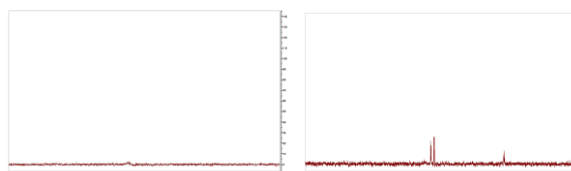


Fig.2 ^{31}P Thermal spectra of 500µg ATP with OX63. (Left: 1scan, Right: 512 scan)

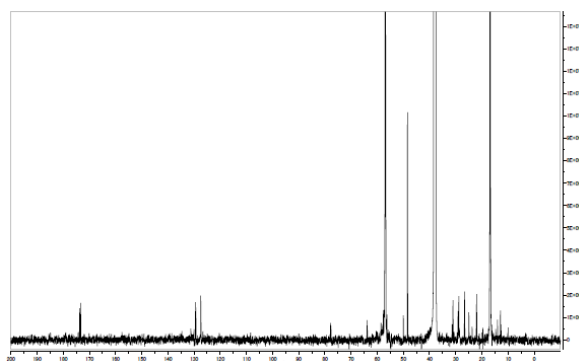


Fig.3 ^{13}C DNP-NMR spectra of Phospholipid from Soy bean. (1 scan)

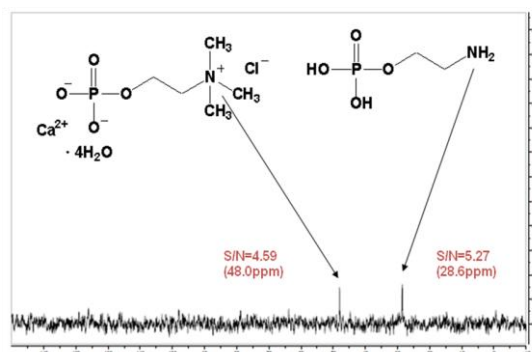


Fig.4 ^{15}N DNP-NMR spectra of PC/PEA=1:1 mixture.