

# 固体DNP NMRのご紹介



ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部

木村 英昭

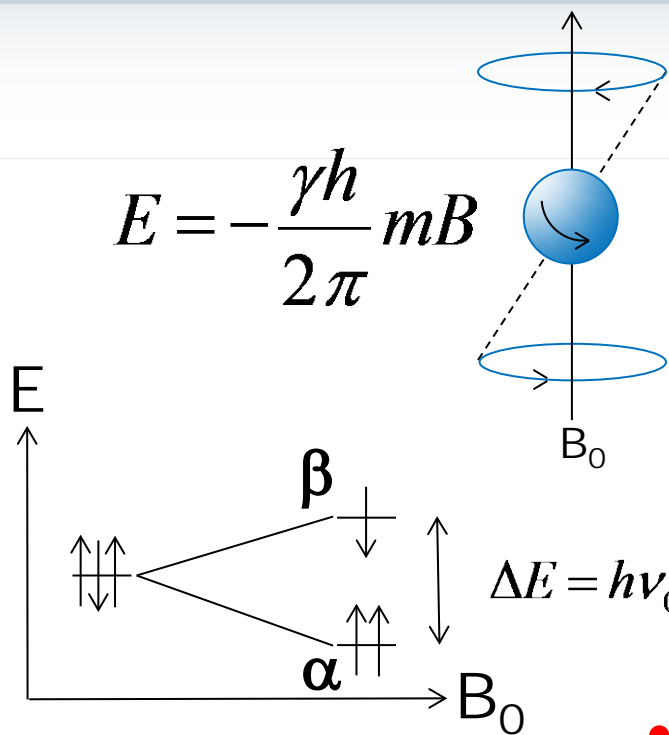
畑中 稔

Bruker Webinar 2016.7.27-28



- DNPとは? どのように動くのか? なにが必要なのか?
  - 理論と装置構成
- DNP実験のためのサンプル調製方法
  - 生体 / 材料 / 低分子
- 最先端の DNP アプリケーション例

# なぜ感度上昇が必要なのか？



- NMRは分子の構造や運動を原子レベルで調べられる
- 感度が基本的に良くない

$$\frac{N_{lower}}{N_{upper}} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} = e^{-\frac{\gamma h B_0}{2\pi k_B T}} \sim 1.0001 \text{ at } 600 \text{ MHz}$$

- 平衡状態で、 $\alpha$ スピンと $\beta$ スピンのポピュレーションの差は極めて小さい  
 $\alpha$ : 10,001 vs.  $\beta$ : 10,000  
→ 低い感度, 長い実験時間



$B_0 = 0$



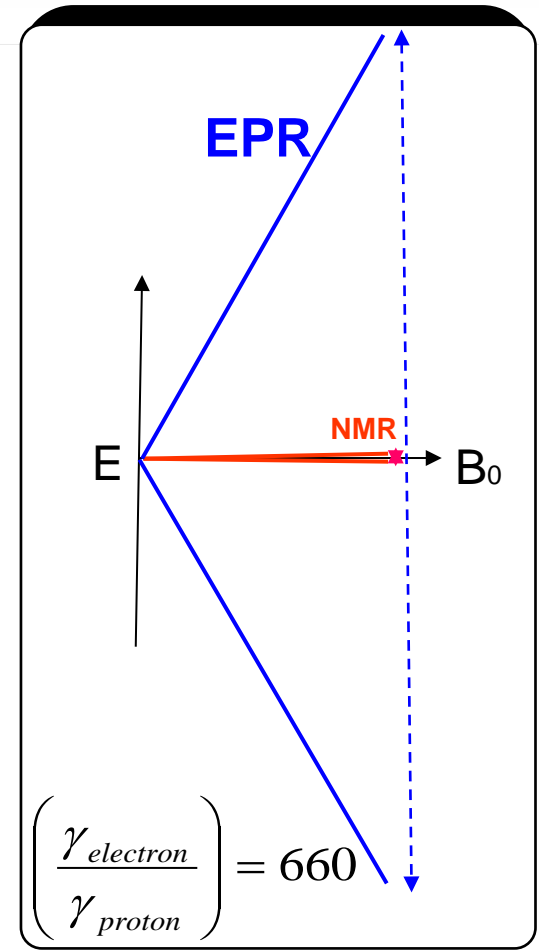
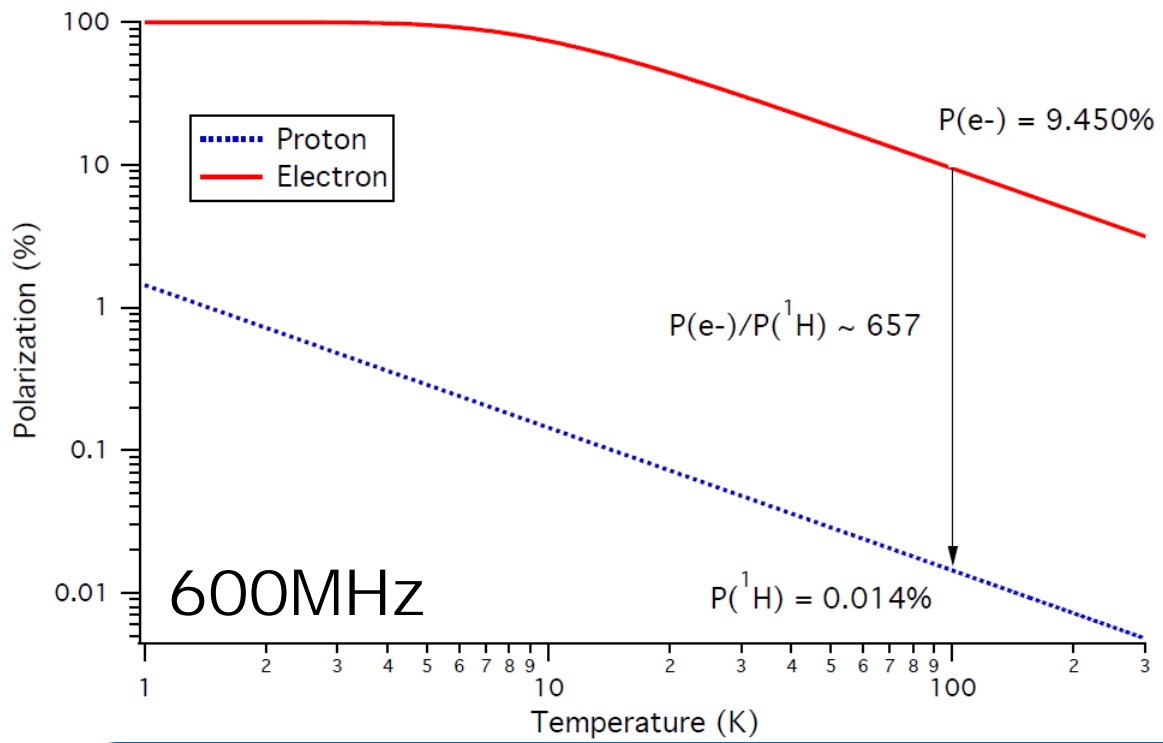
$B_0 \neq 0$



# DNPとは?

## DNP: Dynamic Nuclear Polarization

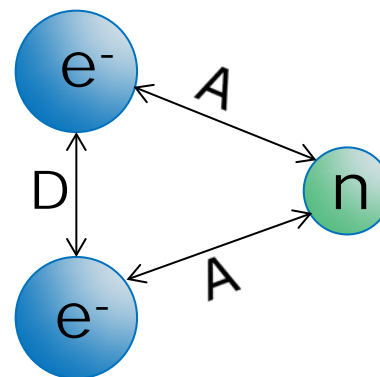
- 高い電子分極を原子核に移す
  - EPR frequency (GHz)での照射
  - NMR frequency (MHz)での検出



# DNPのメカニズム

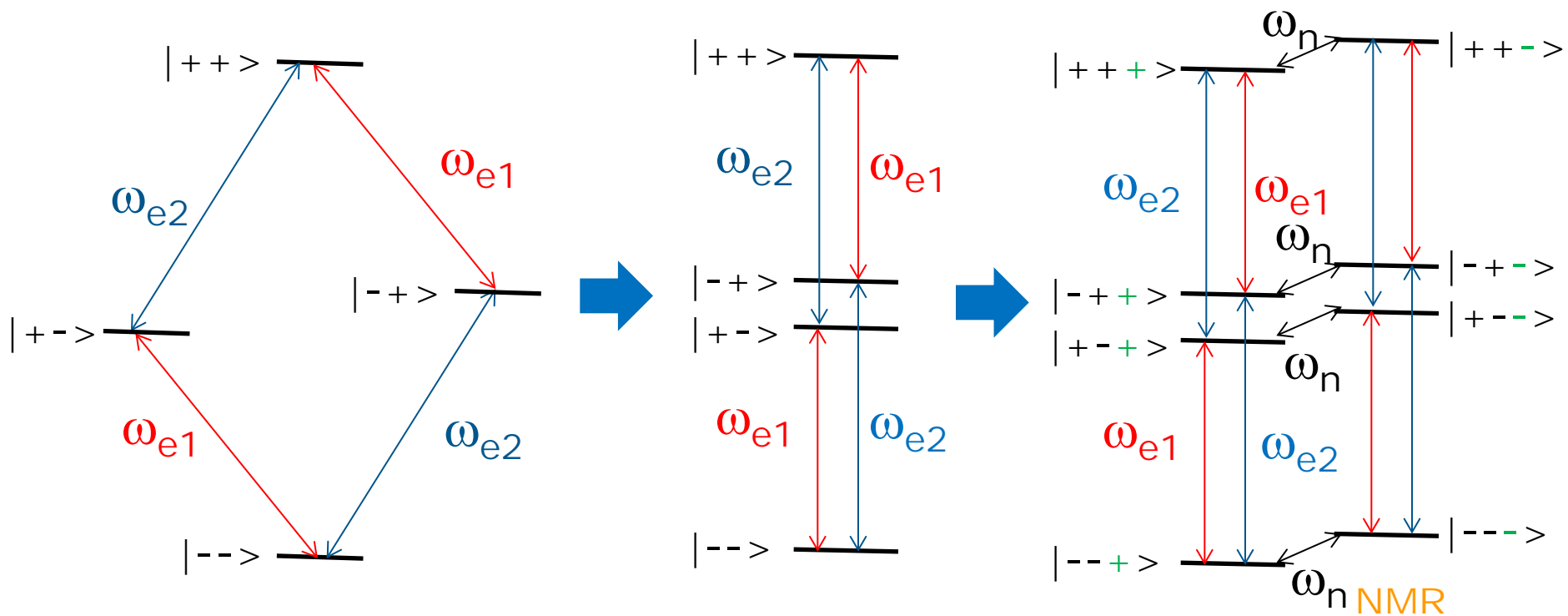
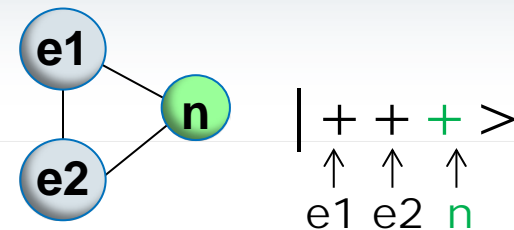
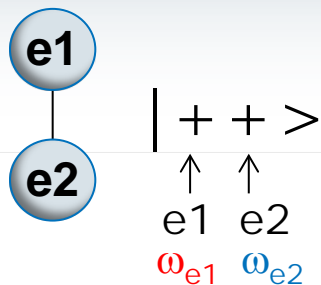


- Overhauser effect
  - Solid effect
  - Thermal mixing
- Cross-effect (高磁場)
    - 2 dipolar-coupled electrons
    - 1 or more hyperfine-coupled nuclei

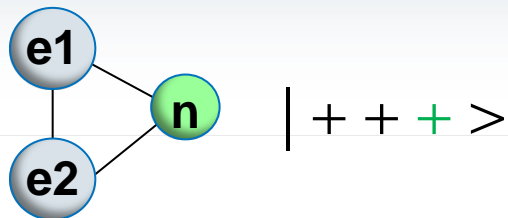


D = Dipolar Coupling  
A = Hyperfine Coupling

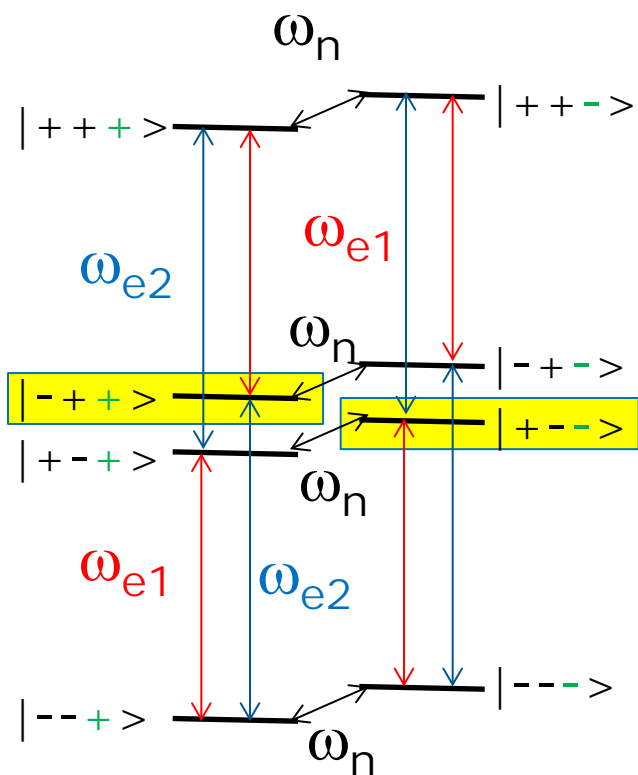
# Cross effectのメカニズム (1)



# Cross effectのメカニズム (2)



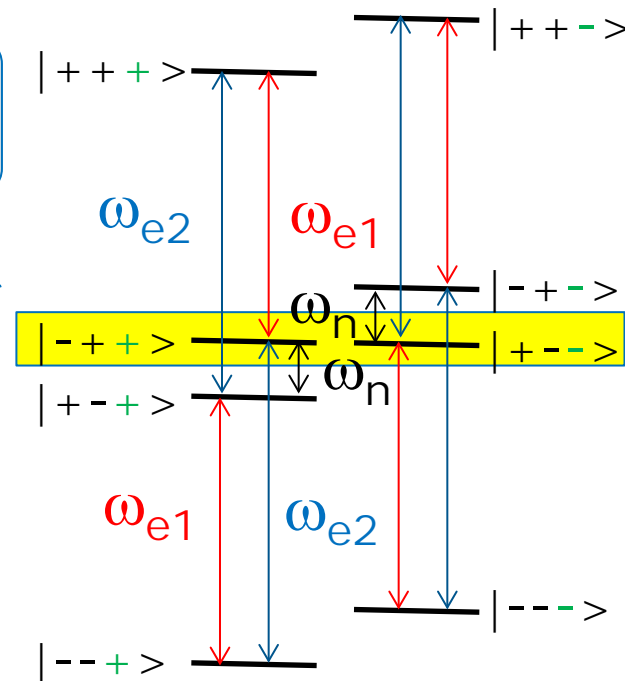
ポピュレーションの移動



エネルギー準位の縮退



$\omega_{e2} - \omega_{e1} = \omega_n$   
の条件を満たす

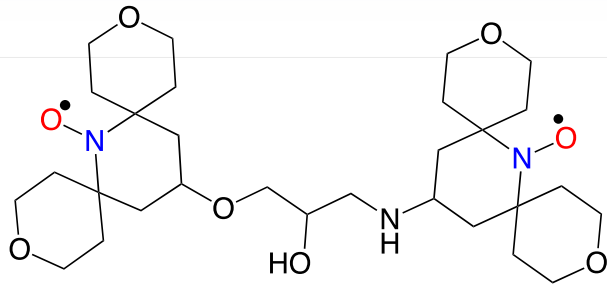




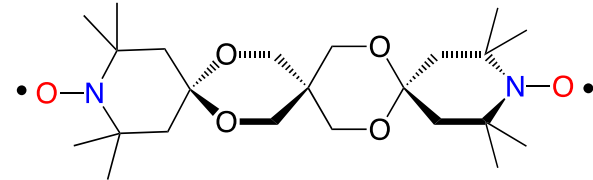


# 分極剤 -Biradicals-

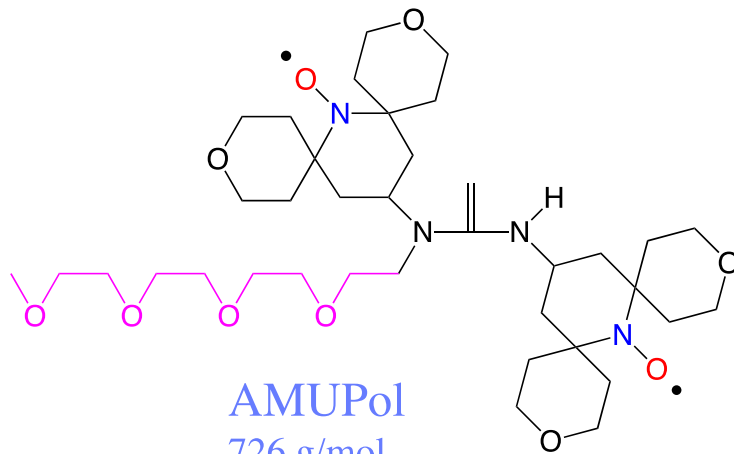
- $\omega_{e2} - \omega_{e1} = \omega_n$  の条件
- 電子スピン間の距離
- g因子の配向



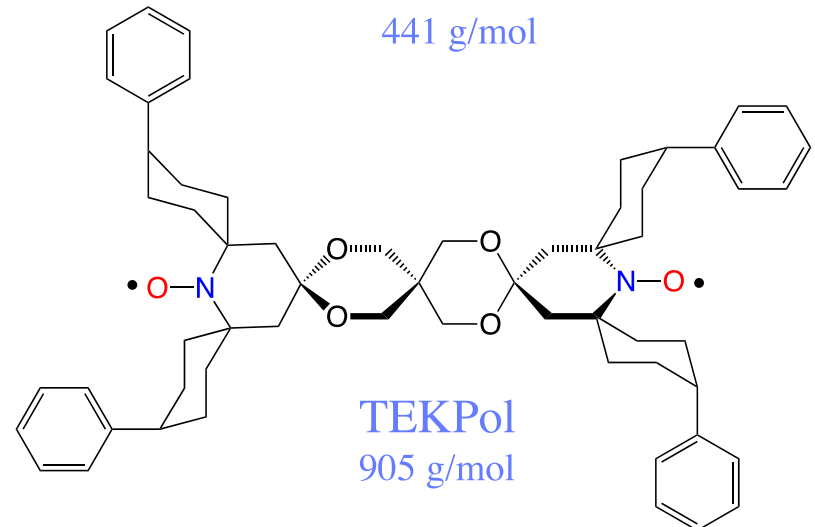
TOTAPOL  
399 g/mol



bTbK  
441 g/mol

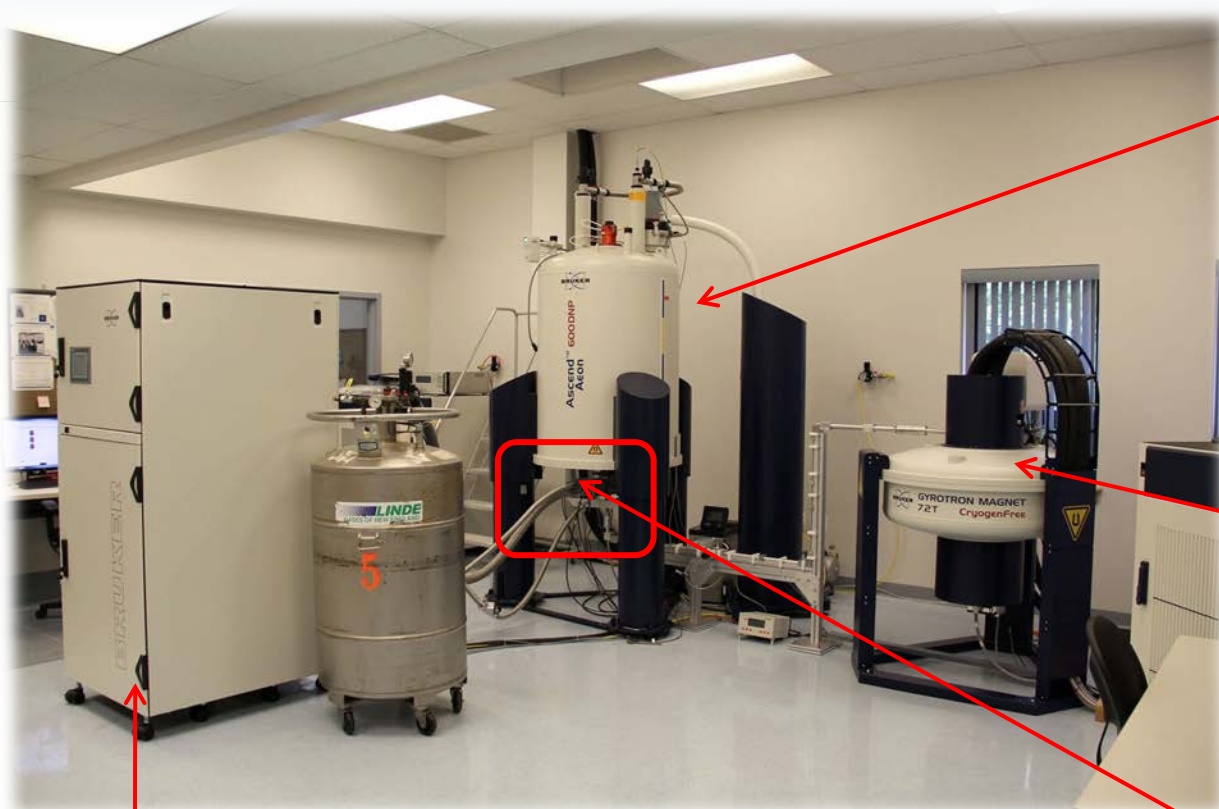


AMUPol  
726 g/mol



TEKPol  
905 g/mol

# DNP-NMR装置構成



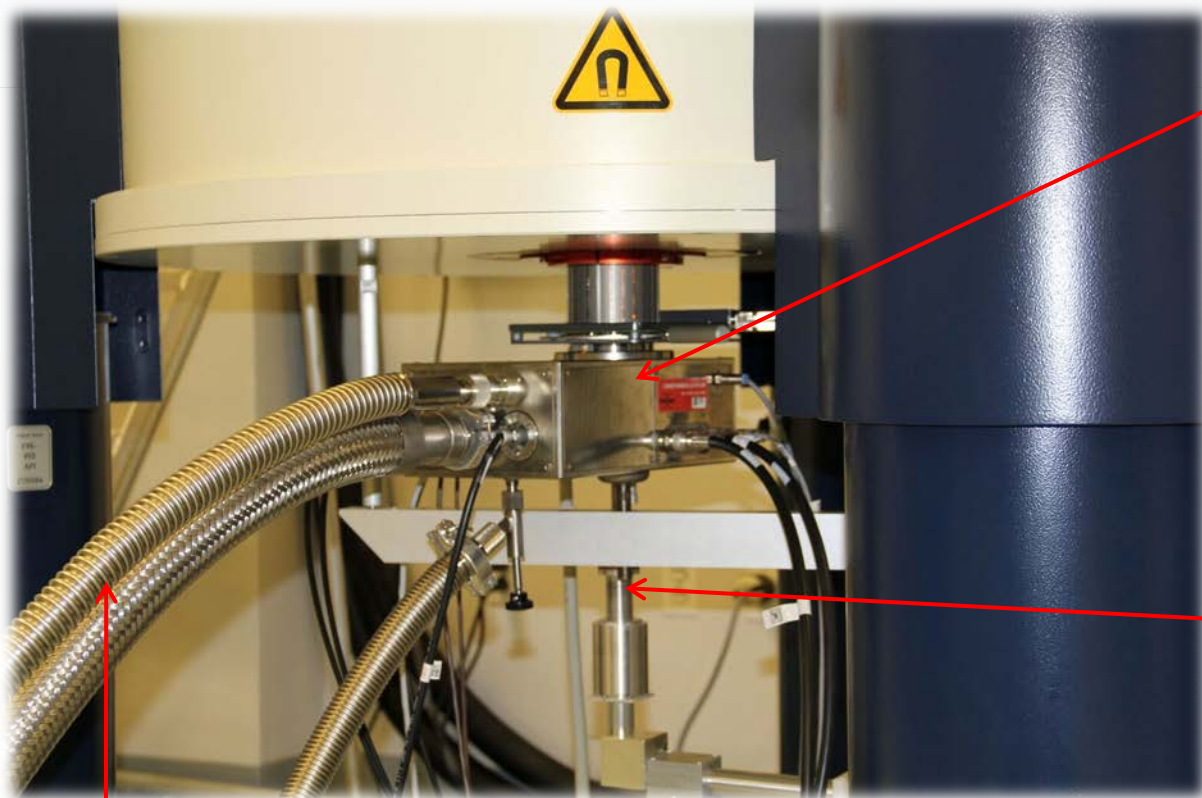
- NMRマグネット  
(sweep coil付き)

- マイクロ波 発生源  
: Gyrotron

- DNPプローブ

- Low-temperature Magic Angle Spinning (LTMAS) Cabinet

# DNP装置 (プローブ周り)

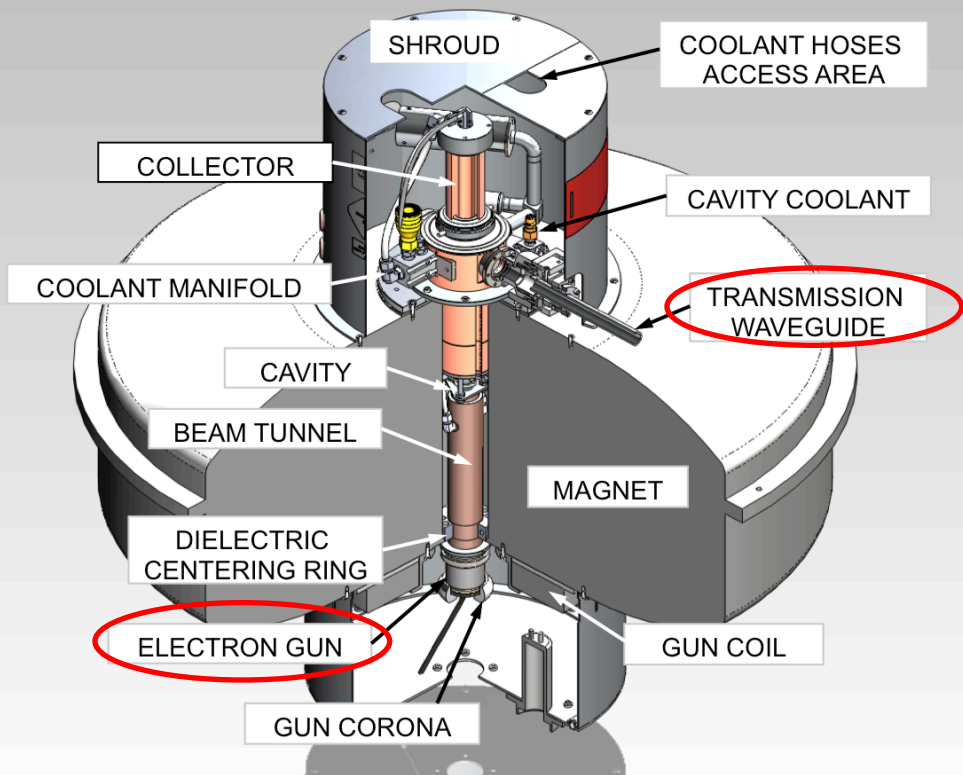


● Probe base

● Microwave Waveguide from Gyrotron

● LTMAS Cabinet からのCold Gas と Vacuum ライン

# Gyrotron: 高出力 マイクロ波 発生源

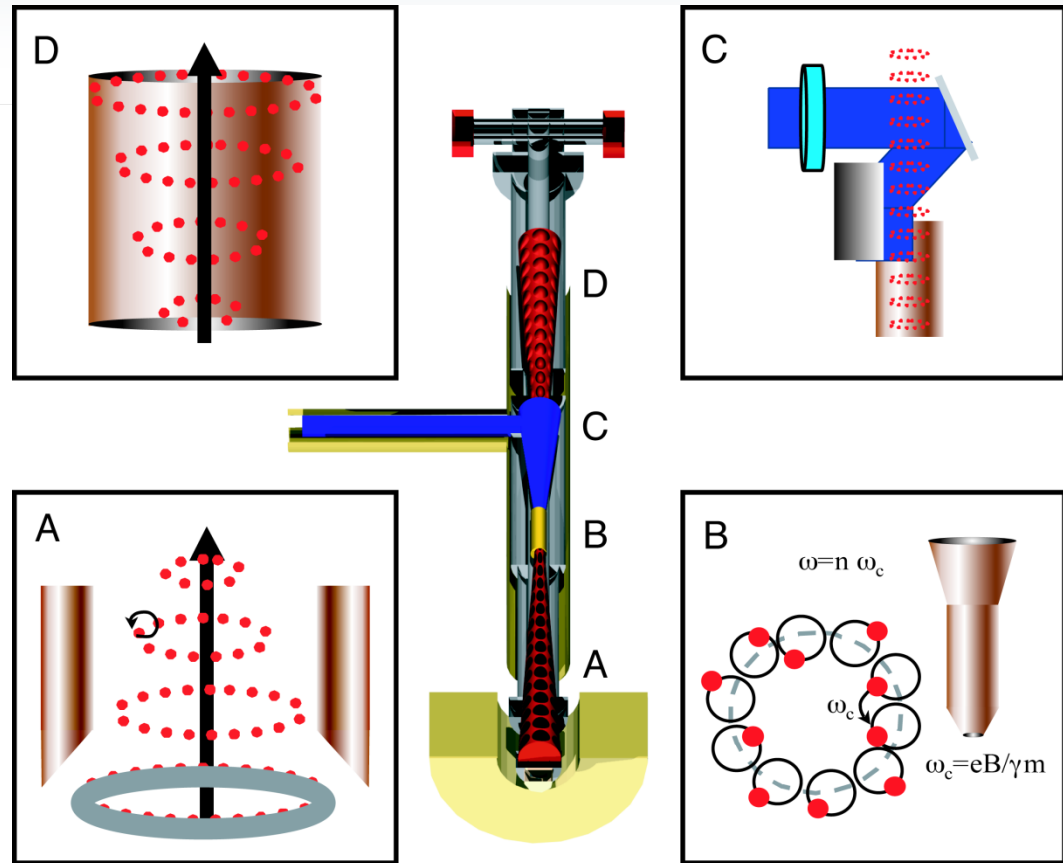


9.7 T magnet (527 GHz second harmonic)

# Gyrotron: 動作原理



- A: 電子の出射: Electron gunの正極の環状リングから照射された電子は、負極方向へ加速します。マグネット内では磁力線に沿って加速し、電子ビームはキャビティへと向います。
- B: 電子ビームはキャビティにまとめられ、磁場強度が最も強い場所でマイクロ波に換えられます。電子ビーム径はelectron gunとキャビティの位置での磁場 $B_0$ の比で決まります。
- C: マイクロ波ビームはstep cut mode converterによって抽出され、ダイヤモンド窓からGyrotronの外に出されま。残った電子ビームはcollectorへと向かいます。
- D: 磁場の外に出た電子ビームはdecompressされ、エネルギーを失った電子は最終的にcollectorに回収されます。

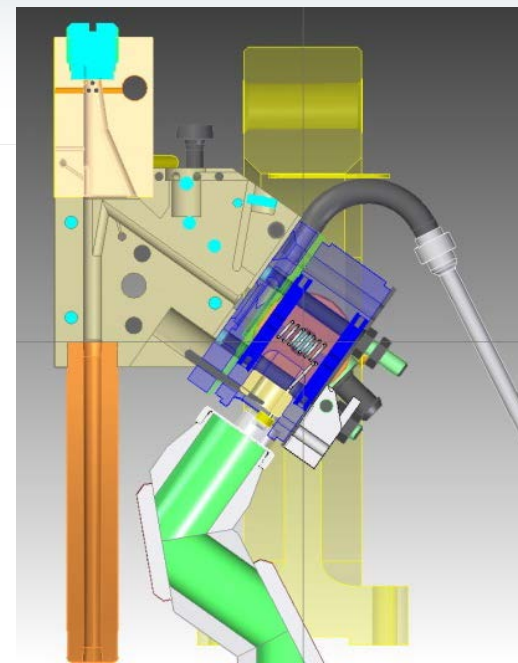


## Gyrotron Functional Details

# Bruker DNP プローブ



- プローブの種類:
  - 3.2 mm (28  $\mu$ L, 15kHz)
  - 1.9 mm (8  $\mu$ L, 25kHz)
  - 1.3 mm (4  $\mu$ L, 40kHz)
- HXY 3チャンネル
- 最低サンプル温度  $\sim$ 100 K
- 効率的な  $\mu$ W waveguide
- VT、bearingそしてdrive gas を独立に最適に制御

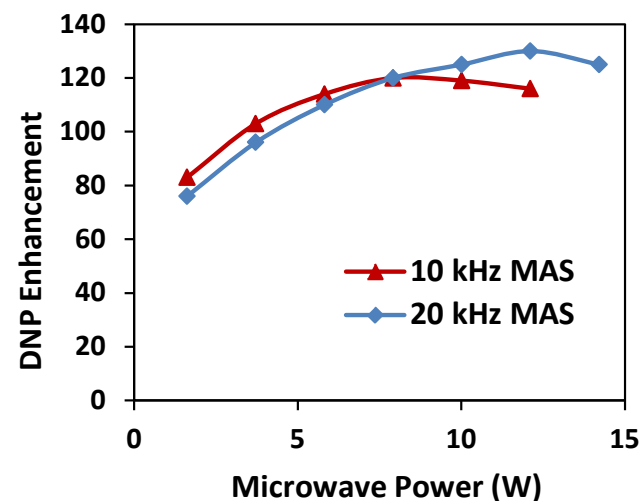
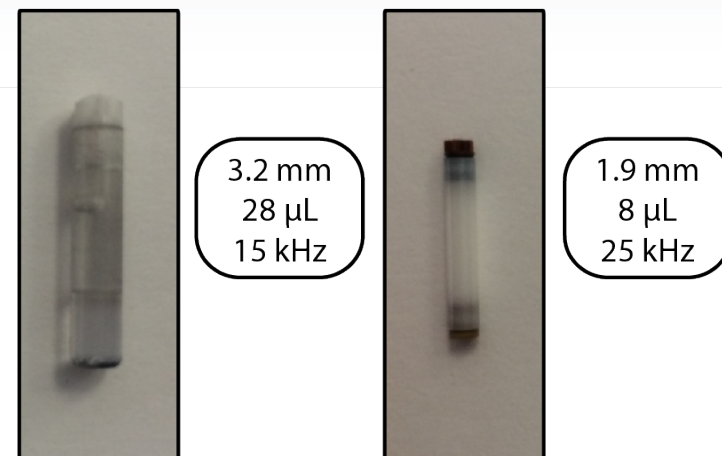


1.9 mm DNP probe head

# Bruker DNP ローター



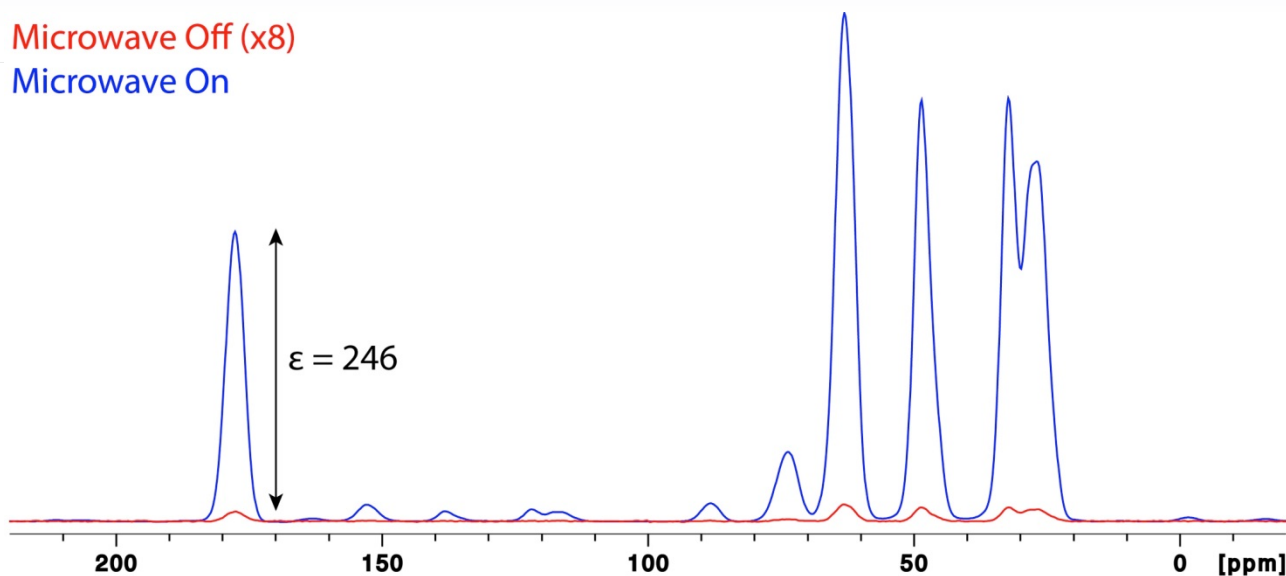
- 3.2 mm:
  - サファイアローター
  - ジルコニア drive cap
- 1.9 & 1.3 mm:
  - ジルコニアローター
  - ベスペル drive & bottom caps
- Faster spinning、ローター径を小さくすることでマイクロ波の透過効率が上がり、より高い感度上昇( $\epsilon$ )が得られます



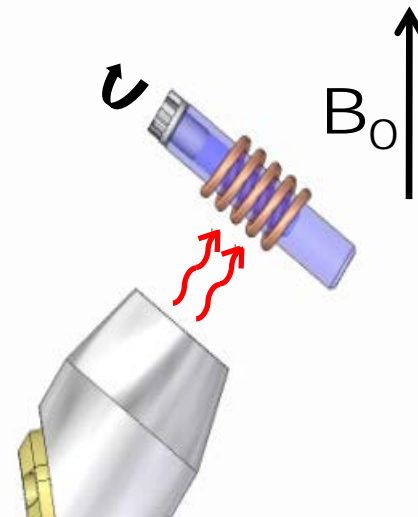
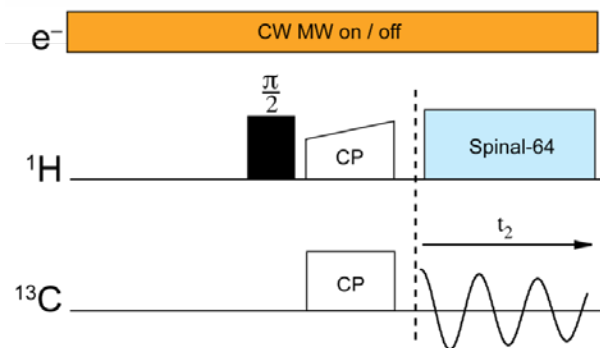
# DNPによるProlineの $^{13}\text{C}$ -CPMASの感度上昇



Microwave Off (x8)  
Microwave On



400 MHz / 263 GHz DNP: 12 kHz MAS  
0.25 M U- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Proline with 10 mM AMUPol  
in glycerol- $\text{d}_8$ / $\text{D}_2\text{O}$ / $\text{H}_2\text{O}$  6:3:1 mixture



- AMUPol Maximum Enhancement:  
~240 @ 400 MHz ; ~130 @ 600 MHz



# Bruker DNP システムの稼働状況



$^1\text{H}$ NMR	DNP NMR Magnet	Gyrotron Frequency	Harmonic	Gyrotron Magnet
400 MHz	400/89 Ascend (Aeon) DNP	263 GHz	2 <sup>nd</sup>	4.6 T
600 MHz	600/89 Ascend (Aeon) DNP	395 GHz	2 <sup>nd</sup>	7.3 T
800 MHz	800/89 USP RS	527 GHz	2 <sup>nd</sup>	9.7 T

- 世界中で稼働している DNP システムは25台:
  - ヨーロッパ 16
  - アメリカ 8
  - 中東 1

# Outline



- DNPとは? どのように動くのか? なにが必要なのか?
  - 理論と装置構成
- **DNP実験のためのサンプル調製方法**
  - 生体 / 材料 / 低分子
- 最先端の DNP アプリケーション例

# 固体 DNP 実験ためのサンプル条件

- 不対電子 (ラジカル or バイラジカル)
  - サンプルそのもの、または添加試薬に不対電子がなければなりません
- Nitroxide ベースのラジカル or バイラジカル (TEMPO, TOTAPOL, \* AMUPol†...)
  - 263/395/527 GHz DNP 分光器のマイクロ波周波数にはnitroxide ラジカルが適しています
  - 必要な濃度: 5-20 mM
- DNP測定では低温 (~ 100 K) で凍らせたサンプルになります
  - サンプルと(バイ)ラジカルを不凍溶媒に溶かすか、混ぜます。
  - DNPの効率を高めるためD化溶媒を用いる  
(溶媒への<sup>1</sup>H spin diffusionを抑える)



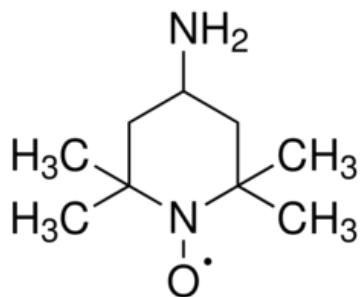
\* Song, C.; Hu, K.N.; Joo, C.G.; Swager, T.M.; Griffin, R.G. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 11385.

† Sauvée, C., et al., Angew Chem Int Ed Engl. 2013, 52(41), 10858

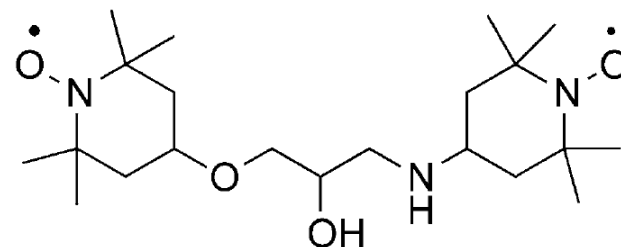
# DNP測定に用いられる水溶性ラジカル



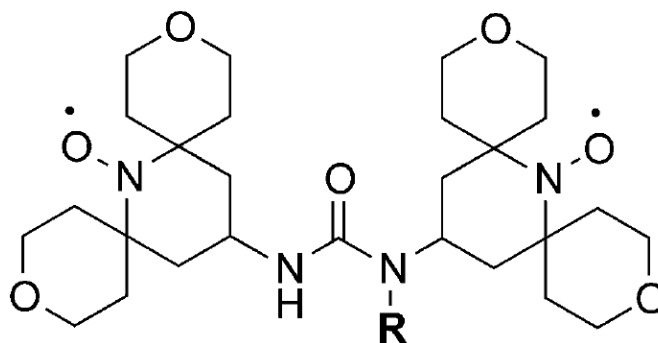
## Nitroxide radicals



4-amino-TEMPO  
(171 g.mol<sup>-1</sup>)



TOTAPOL  
(399 g.mol<sup>-1</sup>)

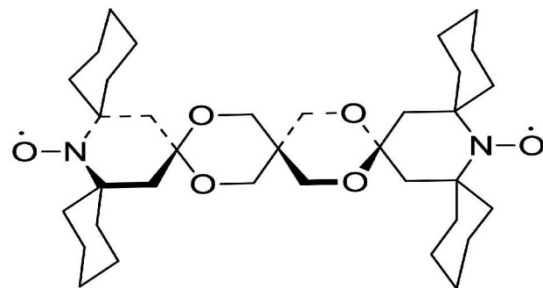


**R = (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>Me, AMUPol**  
(726 g.mol<sup>-1</sup>)

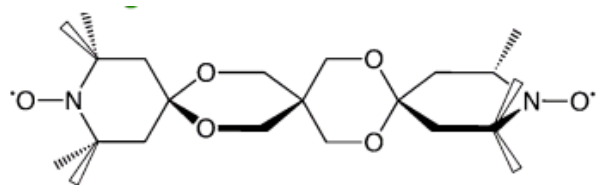
# DNP測定に用いられる有機溶媒に溶けるラジカル



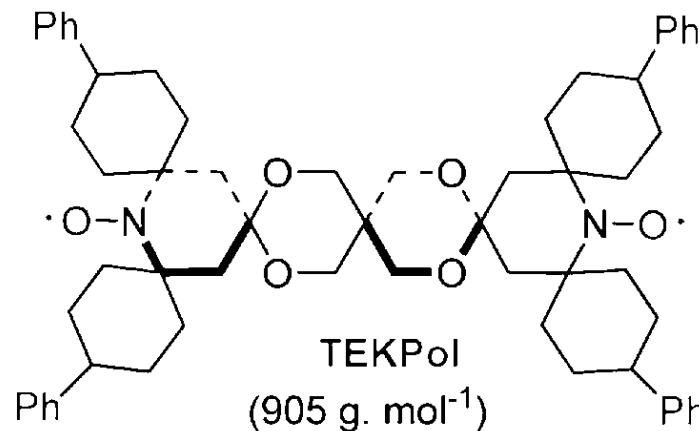
## Nitroxide radicals



bCTbK  
(601 g.mol<sup>-1</sup>)



bTbK  
(441 g.mol<sup>-1</sup>)



TEKPol  
(905 g. mol<sup>-1</sup>)

# 生体物質の一般的な調製



## 可溶性の生体分子

- AMUPol またはTOTAPOL のGlycerol-d<sub>8</sub>, D<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O溶液の調製
  - 60:30:10 (vol:vol:vol) Glycerol-d<sub>8</sub>:D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O溶媒溶液の準備 (10mM TOTAPOL)
    - ラジカルストック溶液 (0.3 ml) - 0.18 ml Glycerol, 0.09 ml D<sub>2</sub>O, 0.03 ml H<sub>2</sub>O
    - およそ1.2 mg の TOTAPOL を量りとり、D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O 混合溶媒に溶かします。
    - glycerol-d8 加え、よく混ぜます。
- サンプルを十分なラジカル溶液に溶かす → 25ulをローターに詰める。
- 多くのラジカルは吸湿性です – バイアルを開ける前には室温に戻し、空気に長時間触れないようにしてください。

# 膜タンパク質の調製

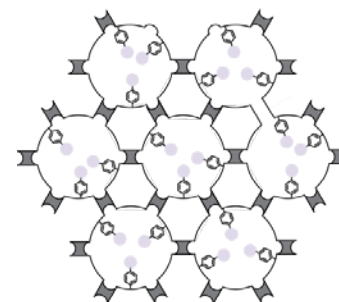
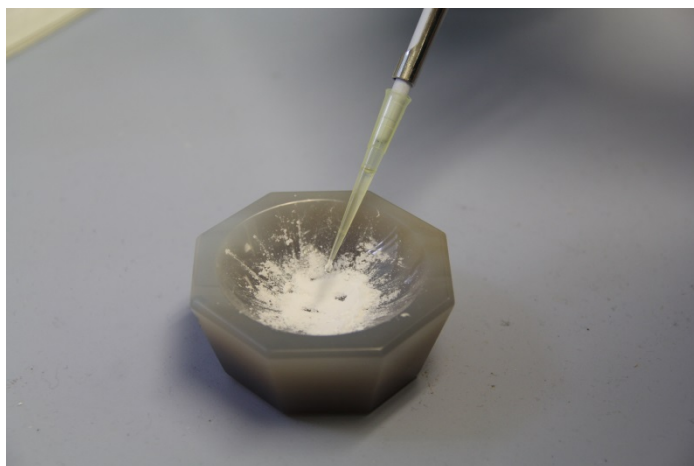


## 膜タンパク質、アミロイド線維

- ラジカルをサンプル内に均一に混ぜる方法は、サンプルの状態で異なります。
  - サンプルによっては単純に、少量のラジカルストック溶液に混合、懸濁するだけ十分です。
  - 多くの場合は、遠心分離を行い、余分なラジカル溶液を取り除きます。
  - 脂質を多く含むサンプルでは、脂質がcryo-protectantの性質を持つため、グリセロールの濃度を減らしても大丈夫です。
- DNP溶媒溶液の条件(pH, バッファー, 塩濃度, etc.) はサンプルごとに調整する必要がある場合もあります。その際、Nitroxideは低pHで不安定ですのでご注意ください。

## 溶媒の選択

- ラジカル溶液が単に材料界面を湿らせるためだけであれば、粘性があるグリセロール:水溶液は良い選択ではありません。
- 水系溶媒: 10 mM biradical (90:10 (vol:vol) D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O または DMSO:D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O 78:14:8 (wt:wt:wt) )
- 有機溶媒: 10 mM TEKPol with 1,1,2,2-tetrachloroethane
- およそローターのfull volume量の固体試料を準備し、調製を開始します。



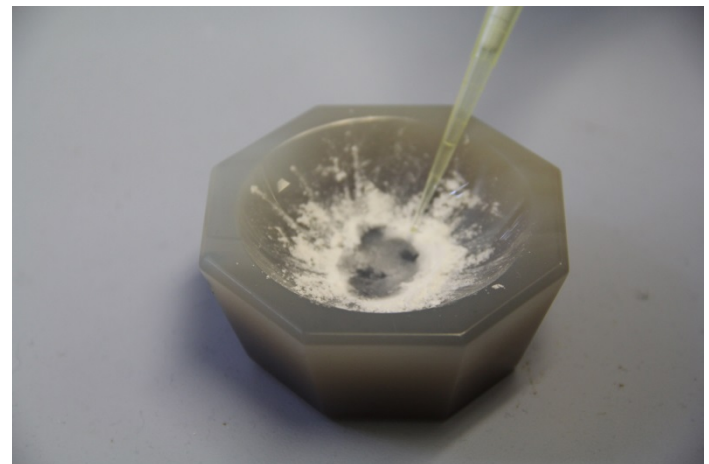
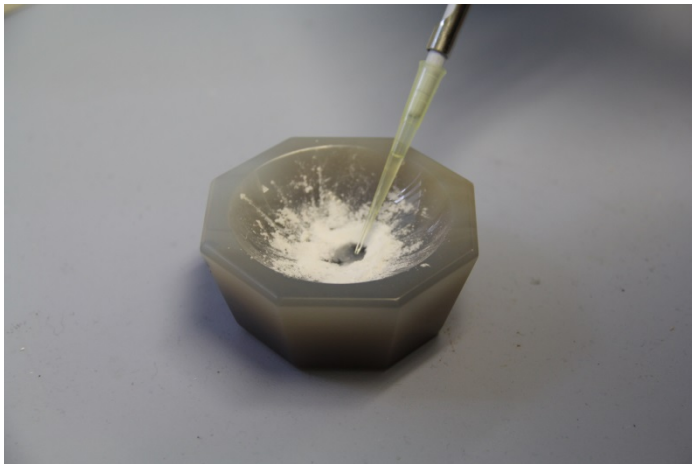
Lesage A. et al., J. Am. Chem. Soc.,  
2010, 132(44), 15459



# 溶媒浸漬によるサンプル調製 (1)



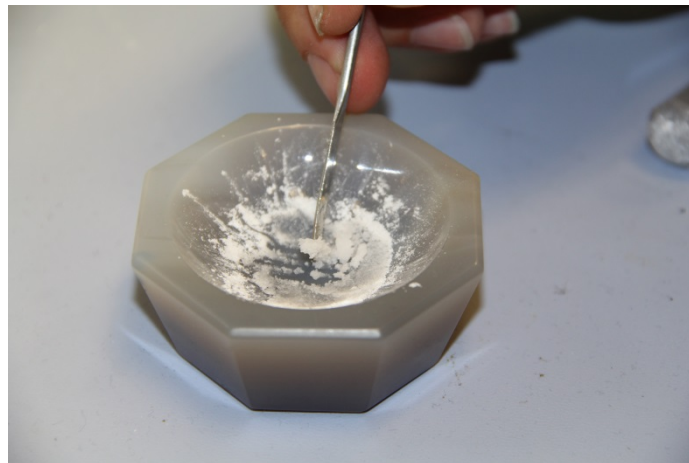
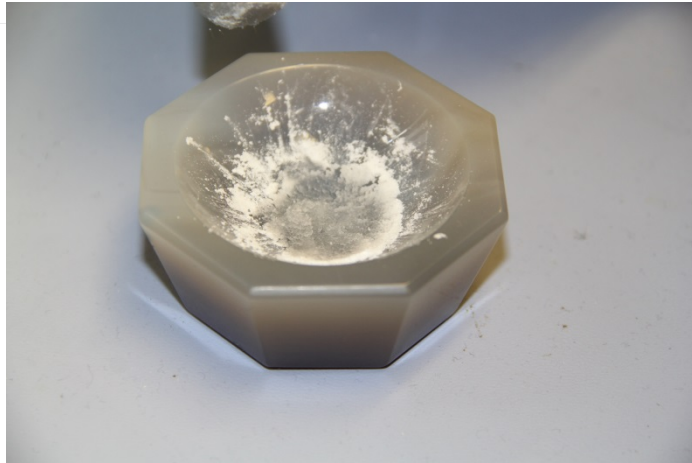
- ラジカル溶液をパウダーにかき混ぜながら、湿ったペースト状になるまでゆっくり加えます。
- 多くのサンプルでは、界面にラジカル溶液が吸着、または細孔に吸収されます。



## 溶媒浸漬によるサンプル調製 (2)



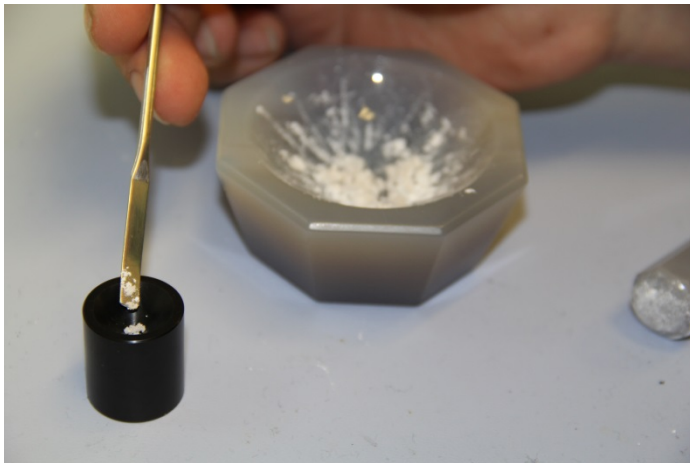
- 一旦、パウダーが湿ったペースト状になったら、少量のパウダーを更に加えます。  
→ サンプルは湿った状態ではなく、ペースト状に見えます。



# 溶媒浸漬によるサンプル調製 (3)



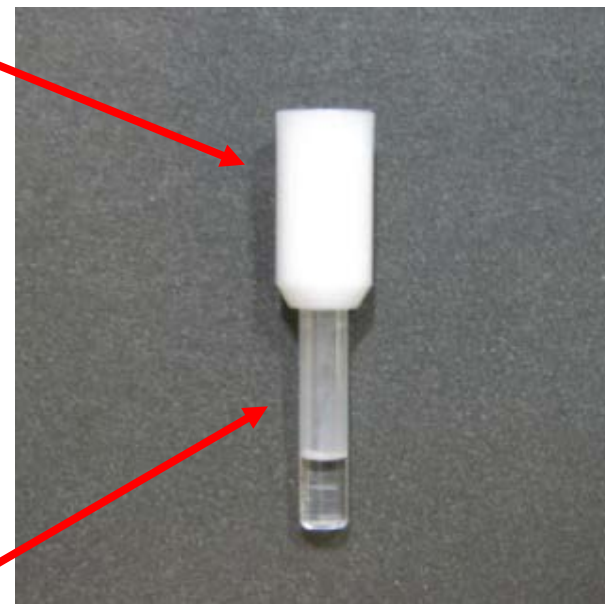
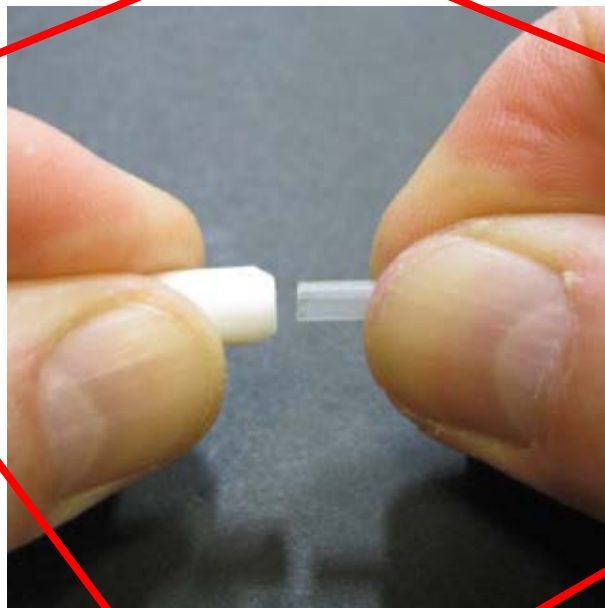
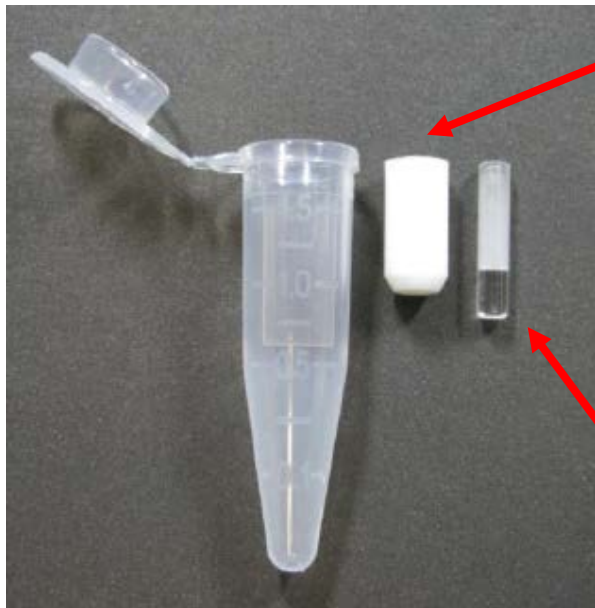
- ペースト状サンプルをローターに詰めます。



# サンプルパッキング：専用ファンネルの使用 (1)



ファンネル(じょうご)

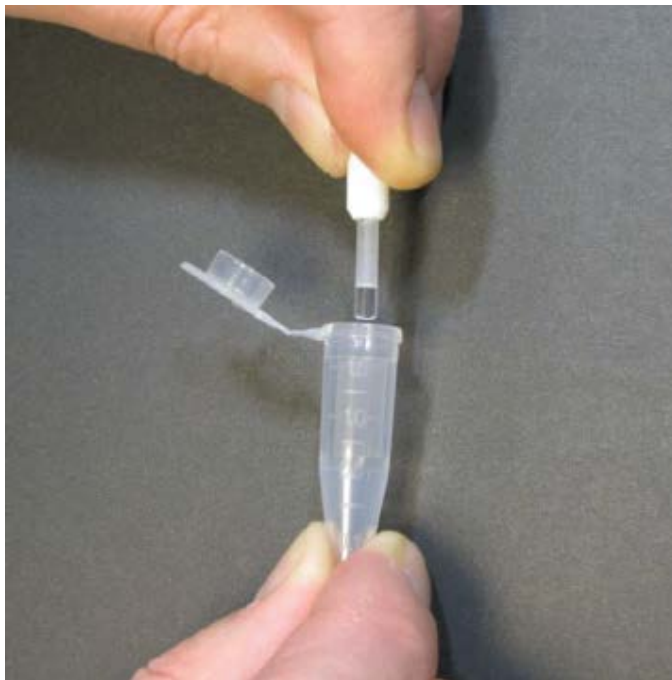


サファイアローター

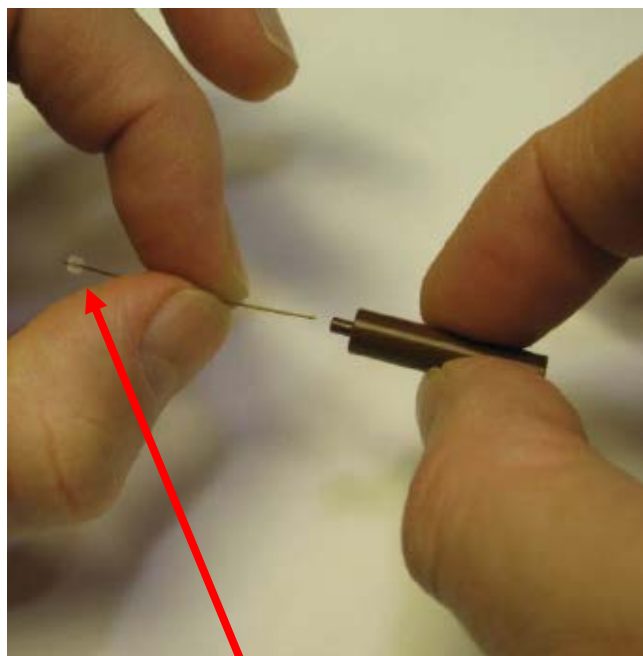
# サンプルパッキング：専用ファンネルの使用 (2) **BRUKER**



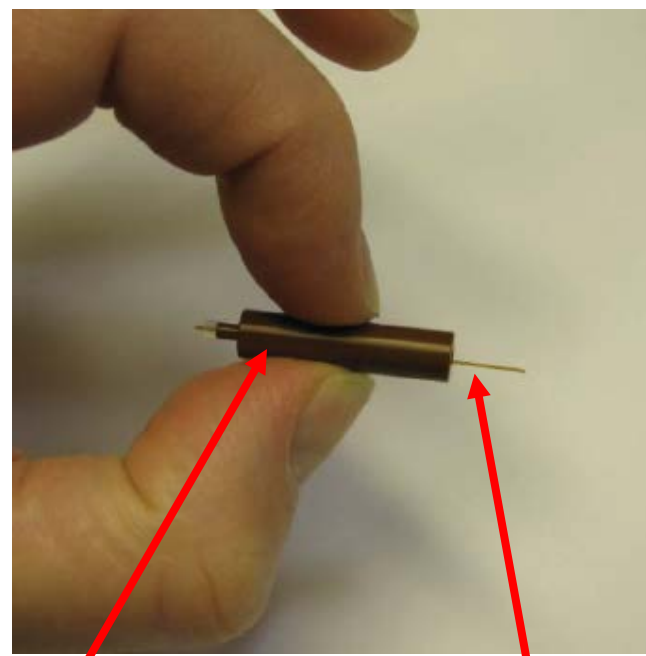
エッペンドルフチューブにファンネルがついたローターをそのまま入れ、遠心分離器で遠心することで粘性の高いサンプルをローター内に移すことができます。



# ソフトシリコンゴム栓によるサンプルシーリング (1) **BRUKER**



ソフトシリコンゴム栓



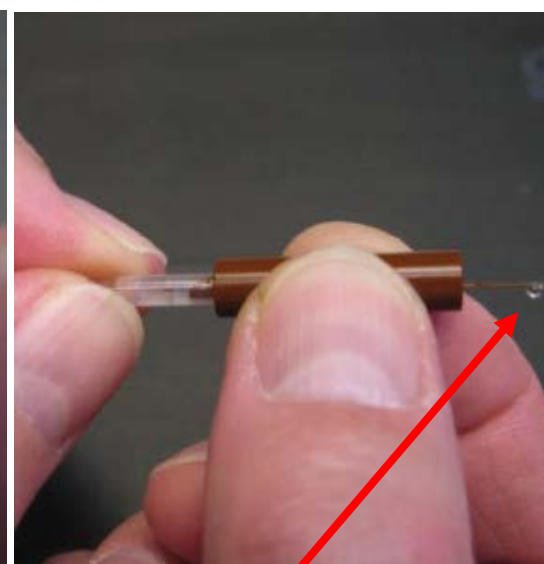
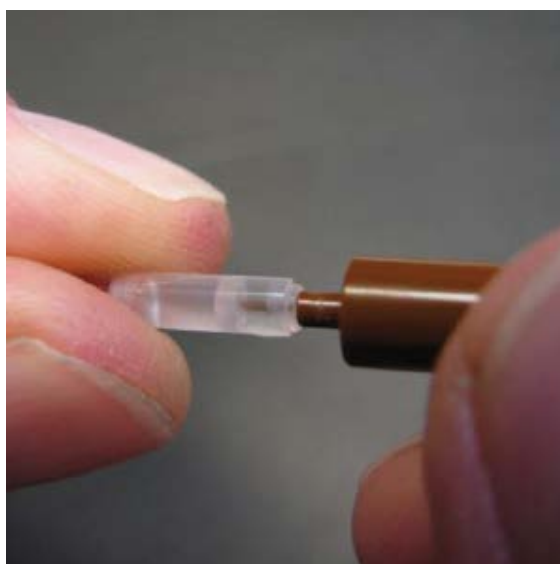
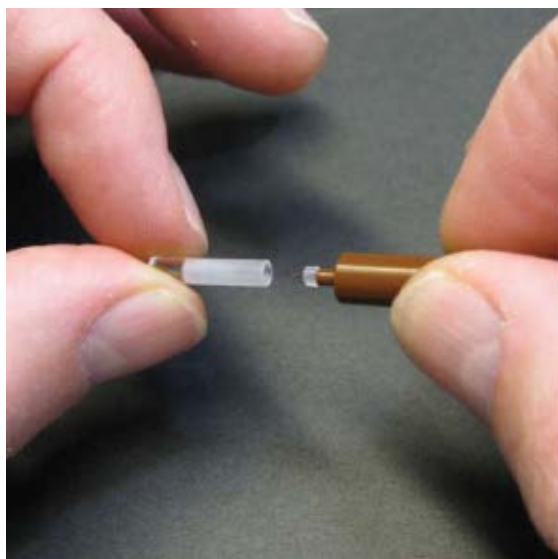
デプスツール

キャピラリー

# ソフトシリコンゴム栓によるサンプルシーリング (2) **BRUKER**



## デプスツールを用いたシリコンゴム栓の挿入

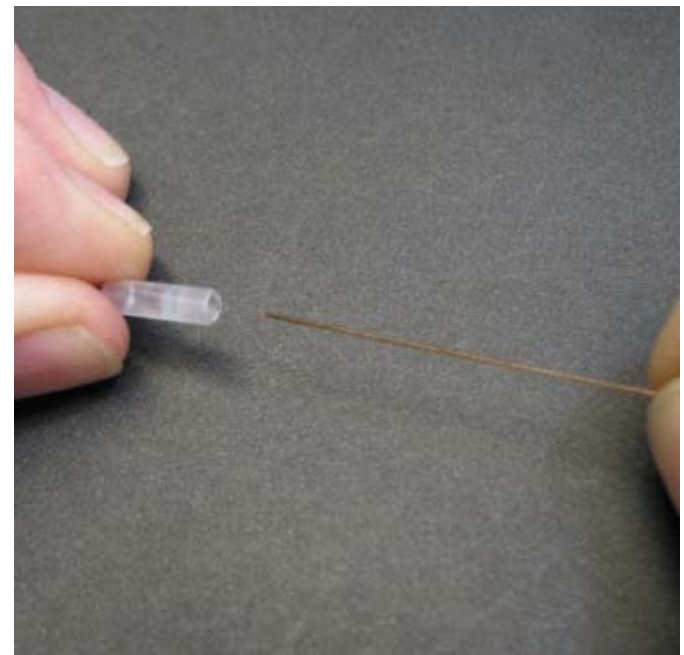
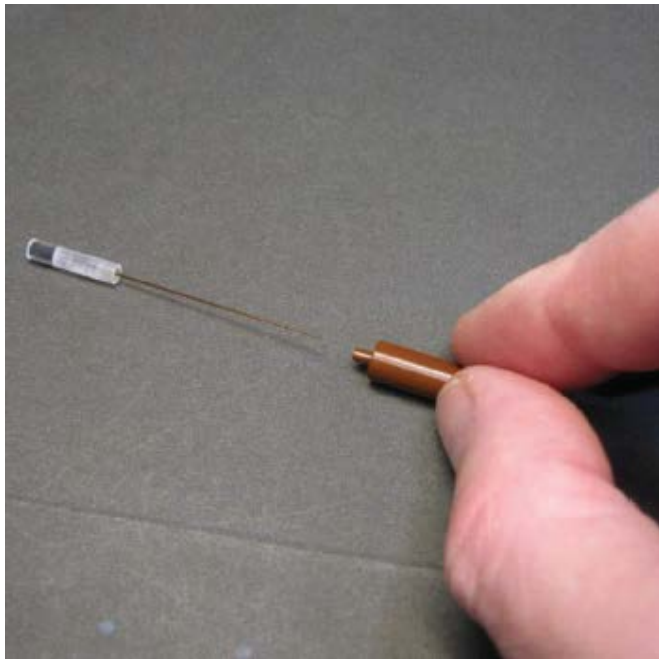


余分な溶媒

# ソフトシリコンゴム栓によるサンプルシーリング (3) **BRUKER**



キャピラリーを抜いた後、シリコンゴム栓のキャピラリー用の穴は自然にふさがります

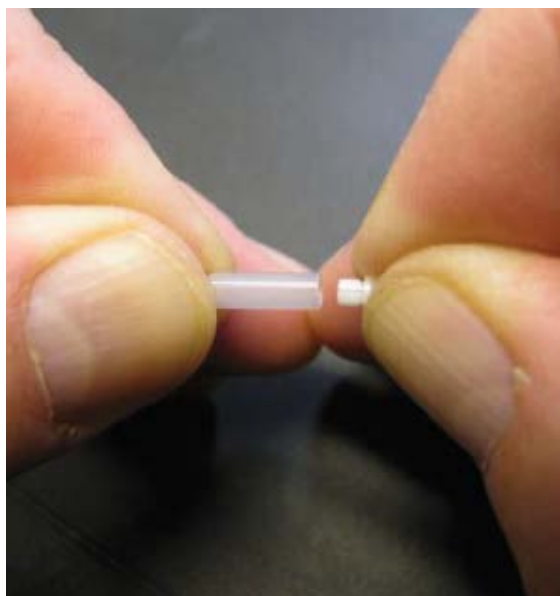




# ジルコニアドライブキャップの装着



- 樹脂のキャップと異なり、ジルコニアキャップはゆるくできており、指先で抜き差しすることができます。
- ジルコニアキャップは繊細で、こわれやすいです。キャップをねじることや、キャップリムーバーで外すことは避けてください。



キャップをローターに装着します



キャップが破損していないか確認し、完全に差し込みます



ローター底面にマーカを塗れば、実験準備完了です

# Outline

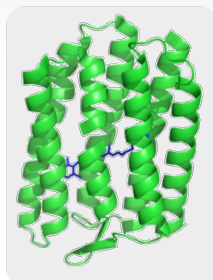


- DNPとは? どのように動くのか? なにが必要なのか?
  - 理論と装置構成
- DNP実験のためのサンプル調製方法
  - 生体 / 材料 / 低分子
- **最先端の DNP アプリケーション例**

# 固体 DNP NMRの応用範囲



**生体物質**  
タンパク質  
- 膜タンパク質  
- アミロイド線維



**材料**  
- ナノ粒子  
- 触媒  
- メソポーラス材料  
- バイオ材料  
- 機能性シリカ  
- ...



**固体DNP**

**低分子有機分子**  
- 医薬関連分子



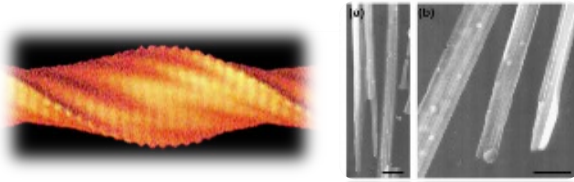
**高分子**  
- 天然  
- 合成



# DNP 応用例 - 生体物質 -

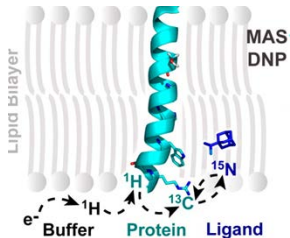


- **アミロイド線維**



- **チャンネルタンパク質**

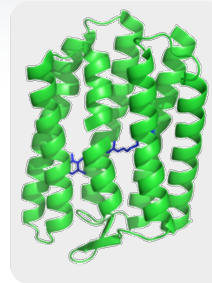
- KscA Kチャンネル
- M2 H<sup>+</sup>チャンネル



DNP  
Biological  
Samples

- **膜タンパク質**

- バクテリオロドプシン
- フोटロドプシン



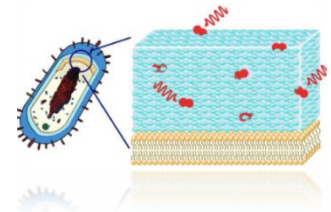
- **ペプチド**

- ワクチン
- 自己集積



- **細胞壁**

- 植物
- バクテリア

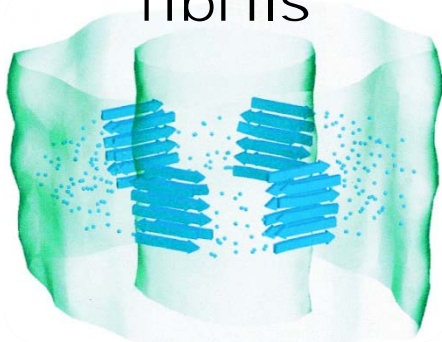


- 主に <sup>13</sup>C と <sup>15</sup>N 検出
- 多次元測定 (構造解析等)
- 高度の複雑な系の測定が多い

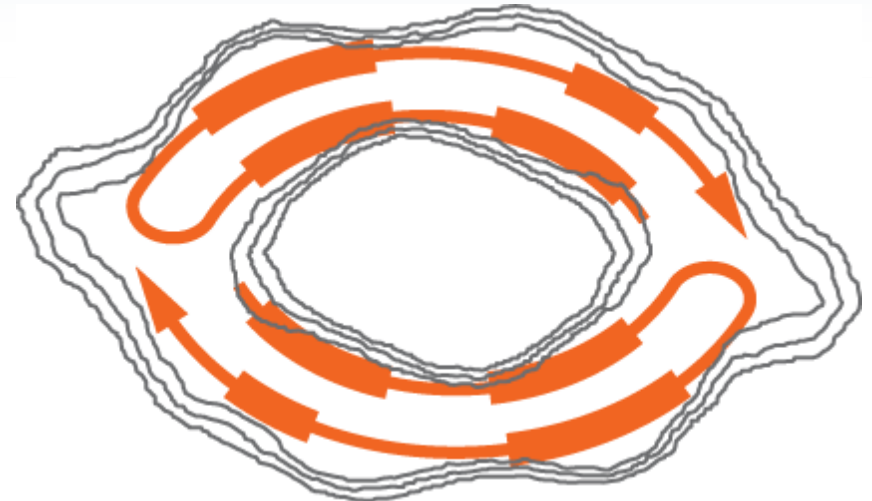
# PI3-SH3 線維: 電子顕微鏡 と NMR



PI 3-SH3  
fibrils



Cryo-EM: Jiménez et al.  
(1999) EMBO J. 18: 815

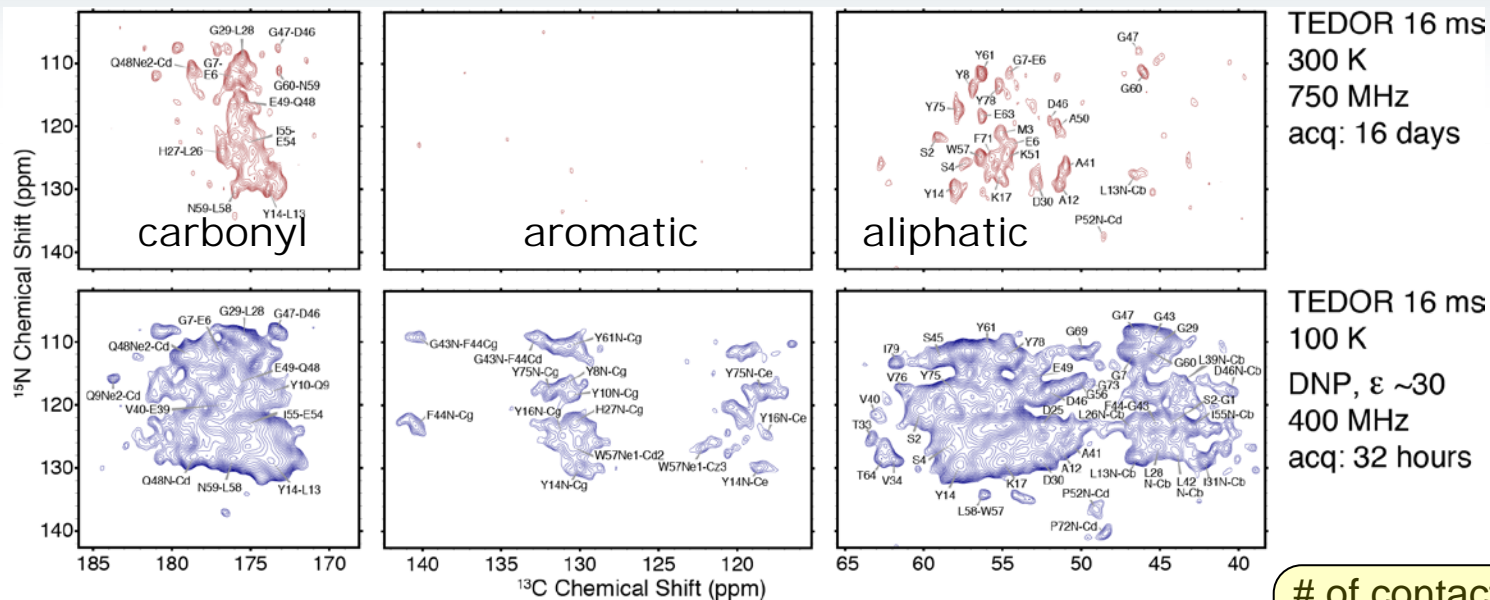


Bayro et. al. Biochemistry (2010)

- クライオ電顕による研究 (Jimenez et al. EMBO J. 18 (1999) 815) から PI3-SH3 (86 残基、SH3 domain of PI3 kinase) 線維の構造モデルが構築される。
- 電顕の密度マップからはタンパク質の構造は求められていない。
- Goal: 固体NMRを用いて原子レベルでのタンパク質の構造を求める。

MODEL → STRUCTURE

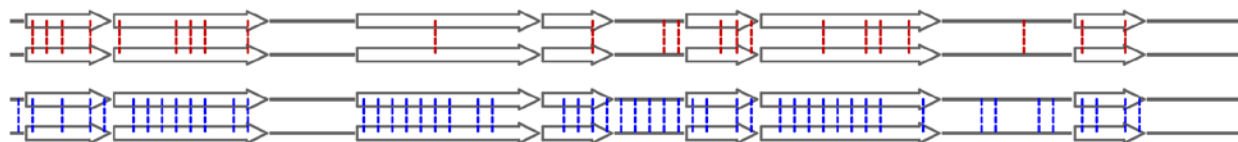
# PI3-SH3線維の分子間 $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ 相関スペクトル



TEDOR 16 ms  
300 K  
750 MHz  
acq: 16 days

TEDOR 16 ms  
100 K  
DNP,  $\epsilon \sim 30$   
400 MHz  
acq: 32 hours

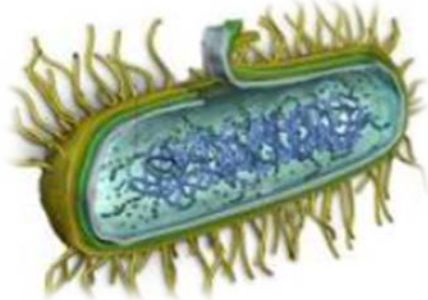
Interstrand  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  constraints



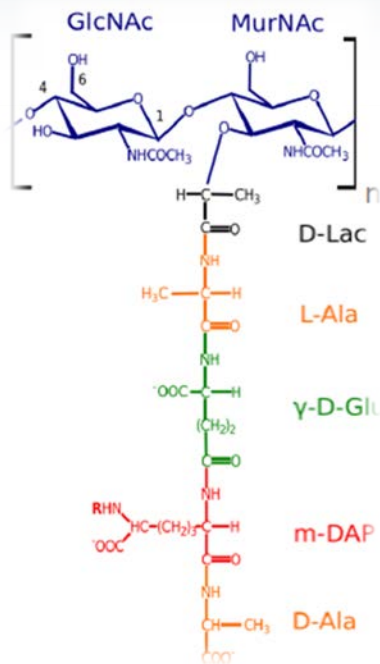
# of contacts:  
23 @ 278 K  
52 @ 100 K

- DNPによる感度上昇で、100Kにて 52 個のクロスピークが観測された (DNP gain: 30)
- PI3-SH3線維の三次元構造を決める上で重要な、タンパク質分子間の構造制限情報が、DNPにより短時間で得られた。

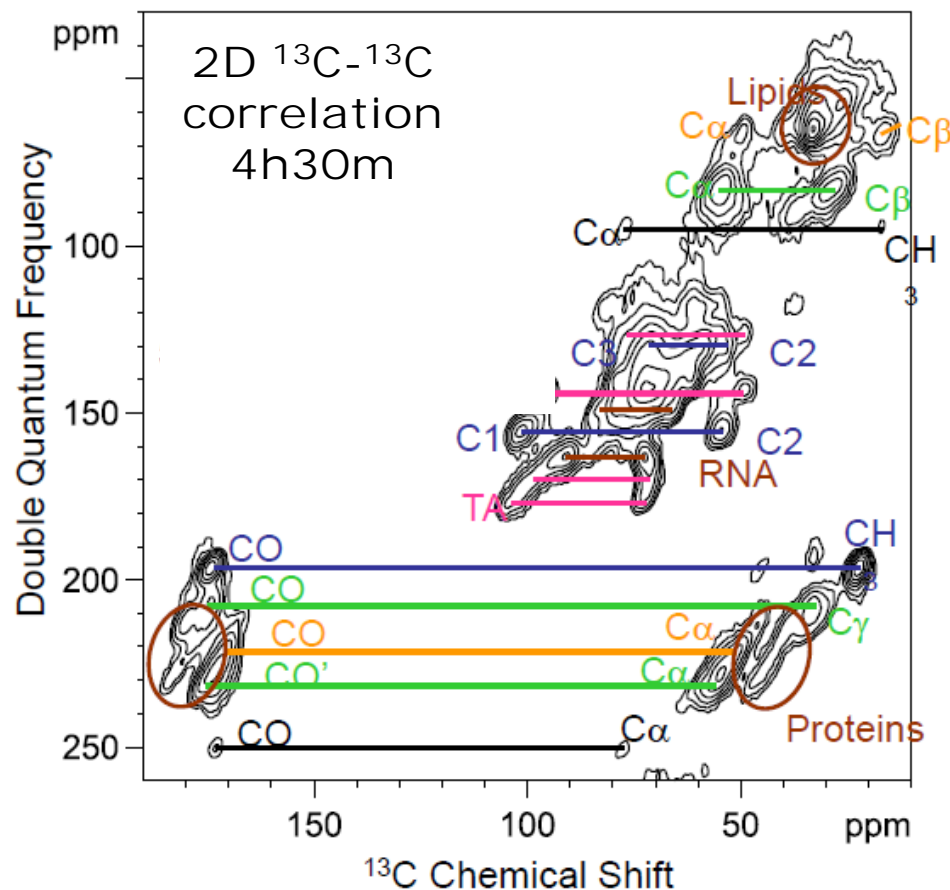
# 生きた細胞の細胞壁形成高分子の 選択的 DNP-NMR測定



Bacillus subtilis  
bacterial cell



Peptidoglycan  
(PG)

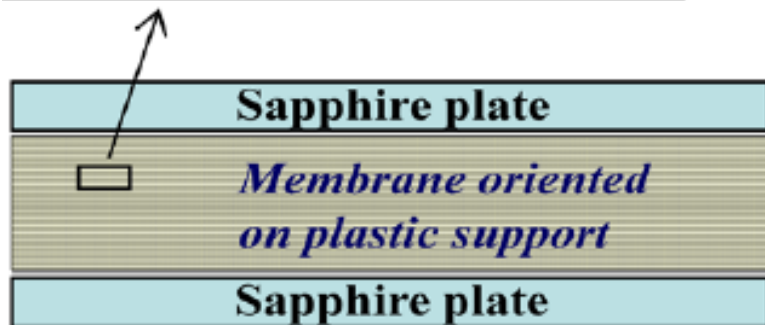
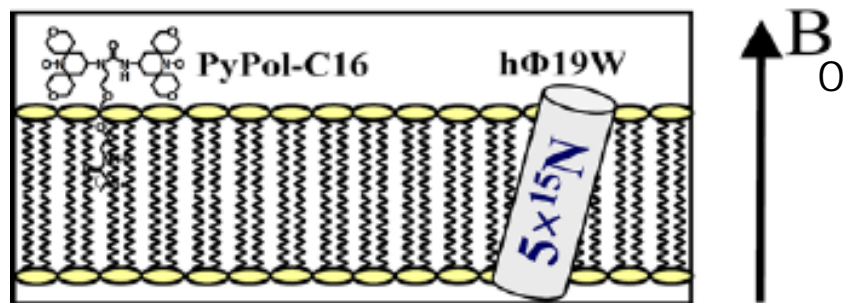



- 生きた細胞の細胞壁ペプチドグリカンのシグナル感度の上昇
- DNP gain: 24 (600 in times!)

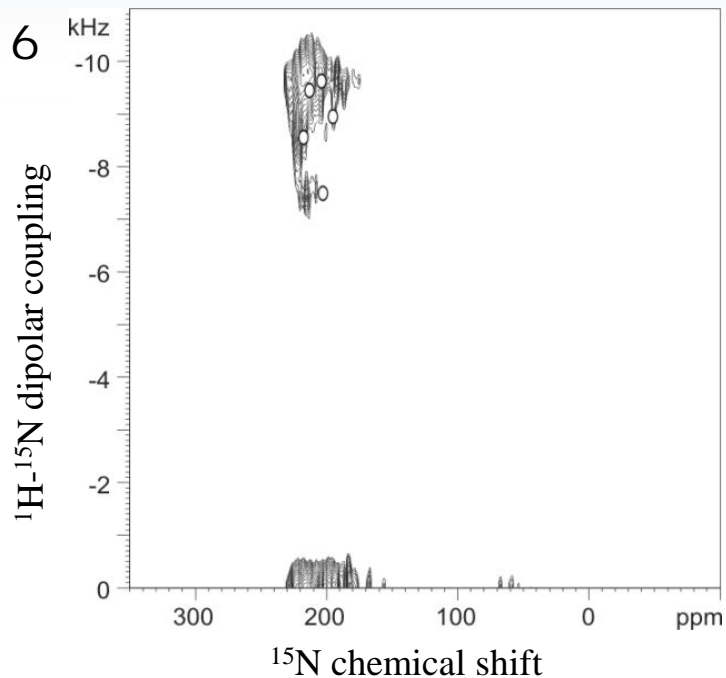
# 配向生体膜のStatic DNP



[5x<sup>15</sup>N]-hF19W(3mg) in POPC with PyPol-C16



 **μ-wave**



DNP gain: 17  
2時間以下で2D PISEMAスペクトル!

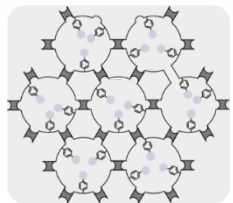
室温測定に比べ40倍の感度上昇 → 1/1600の  
時間節約



# DNPの材料科学への応用

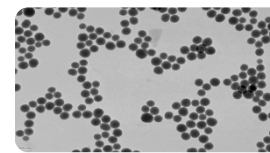


- 機能性材料

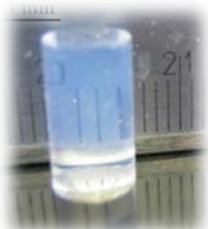


DNPを  
応用する材料

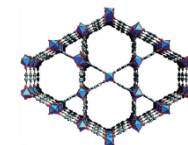
- ナノ粒子



- メソポーラス・シリカ、アルミナ



- 金属-有機構造体(MOFs)



- 有機-無機 ハイブリッド材料

- その他、可能性のある材料・分野

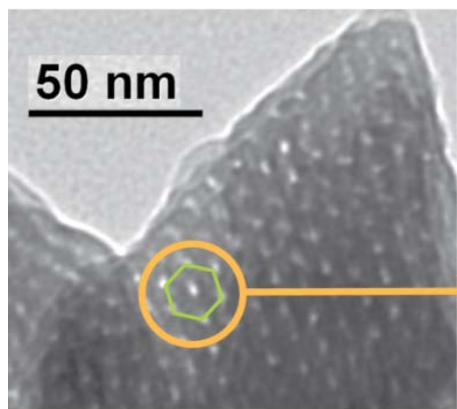
触媒, ドラッグ・デリバリー, メディカル・イメージング

測定対象核:  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{119}\text{Sn}$

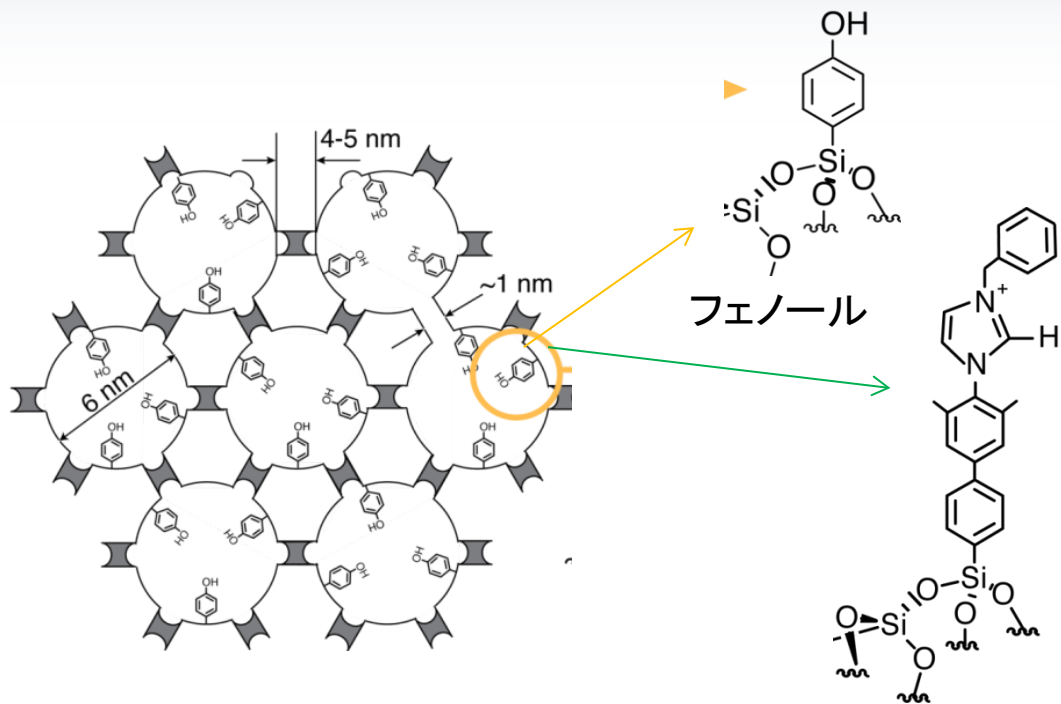
# 有機-無機ハイブリッド材料(機能性シリカ)材料への DNPの応用



## 材料について



シリカ骨格のTEM写真



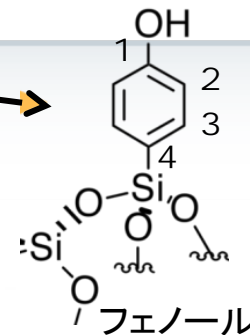
シリカのナノ構造図

最大6nm径までの細孔のネットワークを持つ。  
細孔内部にフェノールやイミダゾールが結合し、  
疎水性を有する。

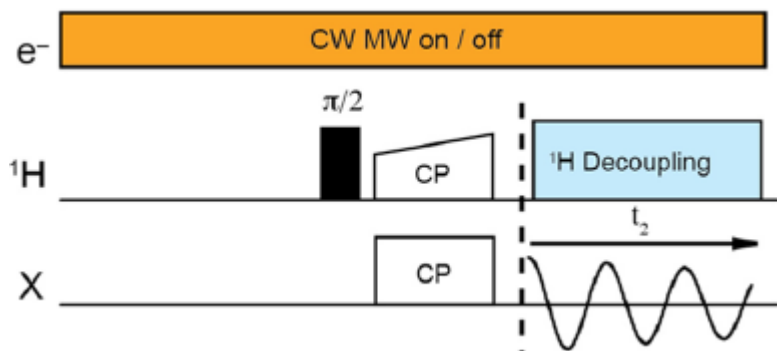
# 機能性シリカ表面部位のDNP (1D $^{13}\text{C}$ )



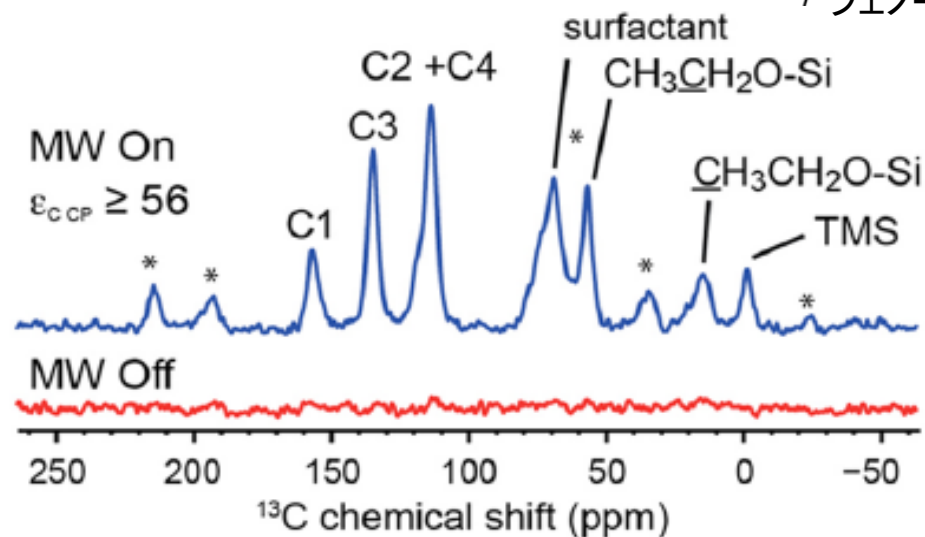
## $^{13}\text{C}$ CP-MAS Spectra



### 使用したパルス・シーケンス(CP)

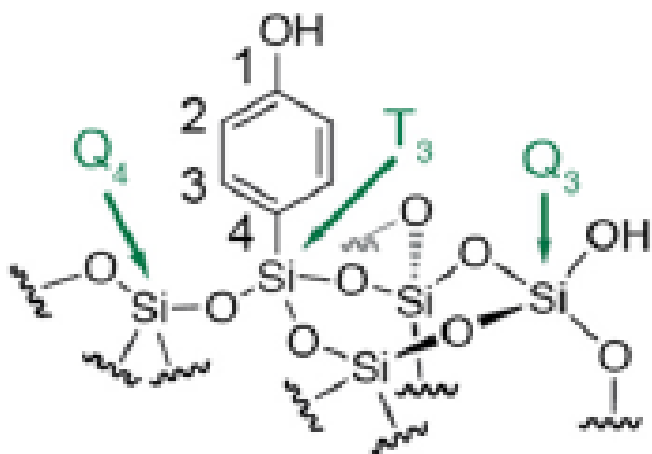


MW (Micro Wave) **On**はDNP有り  
**Off** は普通のCP-MAS

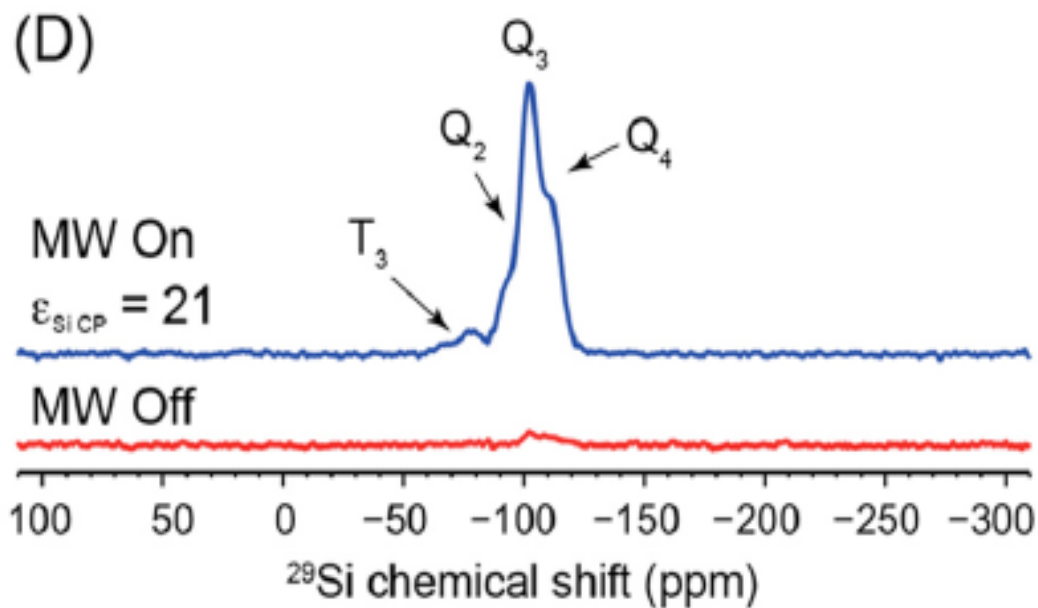


それぞれ2048回積算, 測定時間: 35min., MAS: 8KHz  
Radical: TOTAPOL, Temp.: 105K,  $B_0$ : 9.4T  
DNPで56倍以上の信号増大を観測。  
DNP無でこのS/N比を達成するなら70日以上必要

# シリカ(バルク部)のDNP (1D $^{29}\text{Si}$ )



## $^{29}\text{Si}$ CP-MAS Spectra

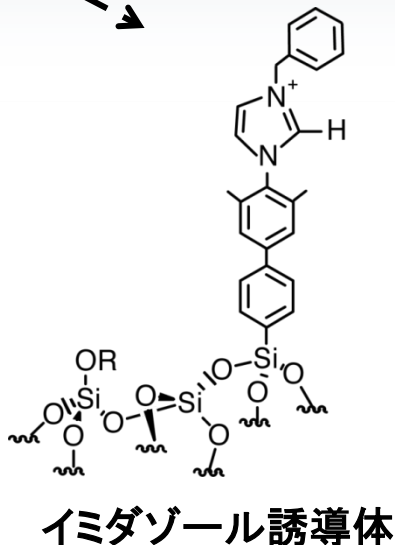
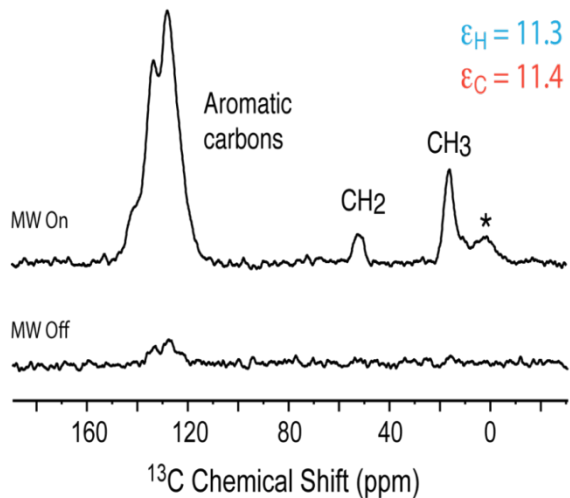


2048回積算, 測定時間: 35min., MAS: 8KHz,  
Radical: TOTAPOL, Temp.: 105K,  $B_0$ : 9.4T  
DNPで21倍の信号増大を観測。  
DNP無でこのS/N比を達成するなら10日以上必要

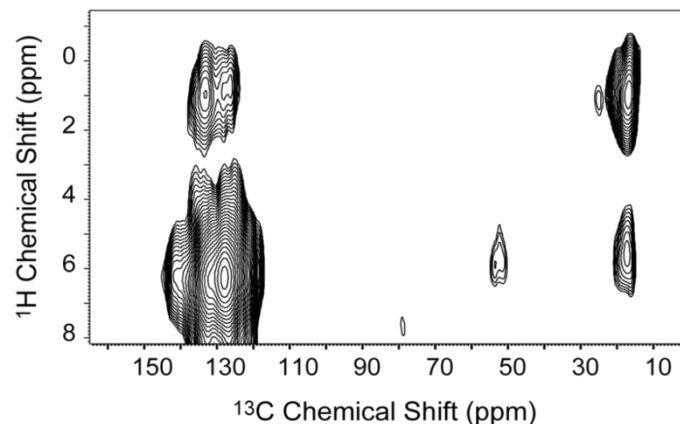
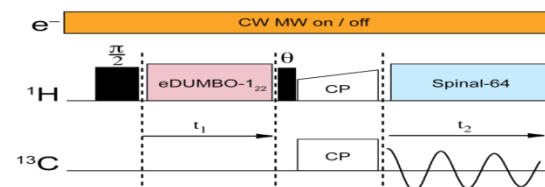
# 機能性シリカ表面部位のDNP (2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) **BRUKER**



## $^{13}\text{C}$ CP-MAS Spectra



## $^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ HETCOR Spectra With MW to induce DNP



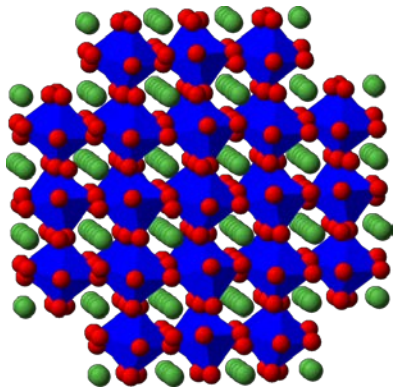
MAS: 12.5KHz, Contact time: 1ms,  
 積算: 128, 待ち時間: 1.5s, 測定時間: 4h  
 DNPを使用せずに同等のスペクトルを得るには  
 2週間以上必要な計算である。

DNPで11倍以上の信号増大が観測された。

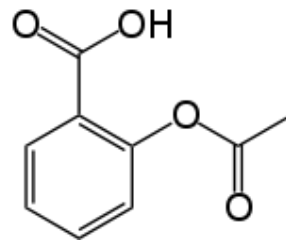
# $^{17}\text{O}$ 観測へのDNPの応用



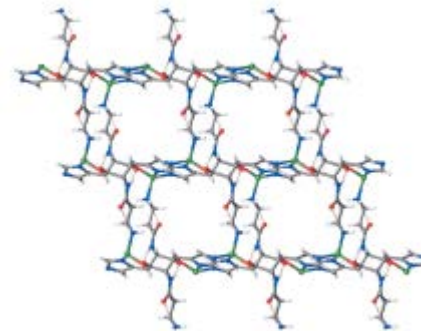
- $^{17}\text{O}$  は天然存在比が低く (0.038 %)、四極子核で(1 : 5/2)、共鳴周波数も低い。
- 酸素は、下記の例のように様々な材料に見出すことができる。
- これまでの対策は、高磁場、サンプル量、積算回数、であった。



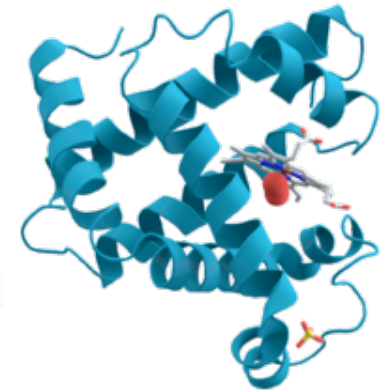
鉱物



有機化合物



超分子  
ネットワーク



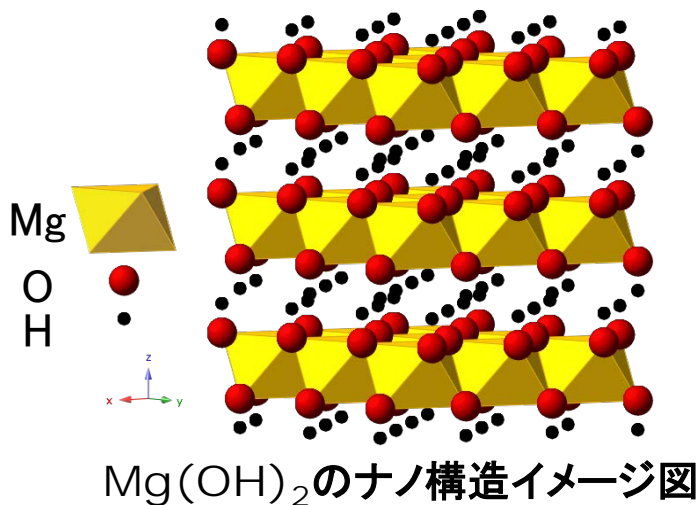
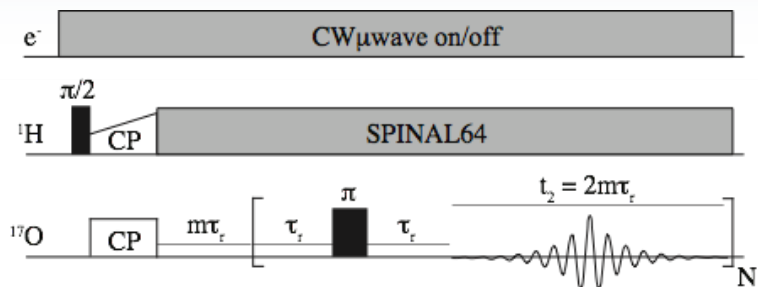
バイオ

# $^{17}\text{O}$ 観測へのDNPの応用



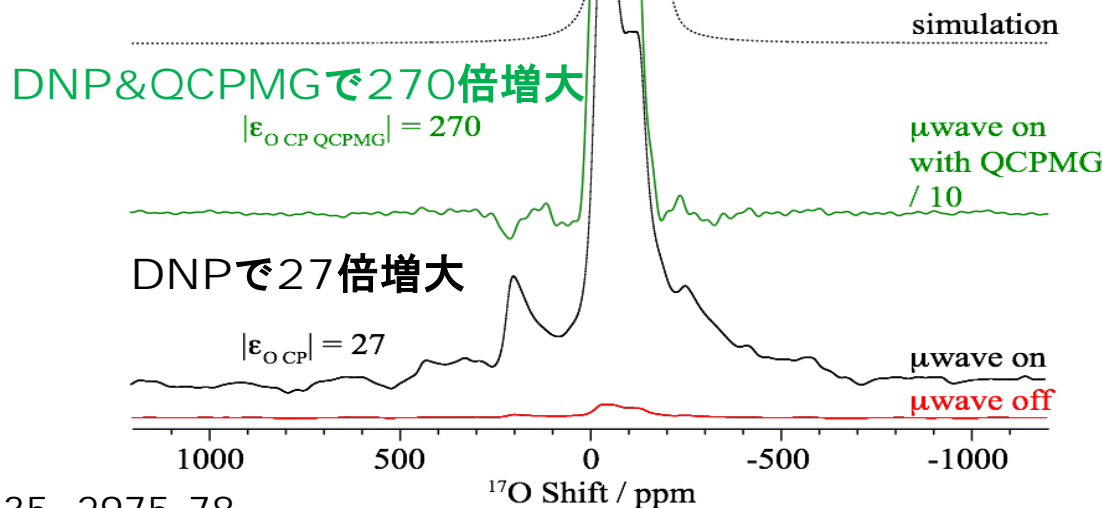
## $^{17}\text{O}$ 天然存在比の $\text{Mg}(\text{OH})_2$

### CPCPMGパルス



### $^{17}\text{O}$ CP & CPCPMG Spectra

ns: 64, 測定時間: 10min.



# 医薬製剤へのDNPの応用



## 医薬製剤の固体NMRについて

- API(活性医薬成分)量はサンプル全体の数%と少ないことが多い。
- 信号がたくさん観測され、互いに重なり合うことがあり、信号を分離したり、原子間相互作用の情報を得るためには、2D NMRが必要な場合がある。
- $^1\text{H}$ でさえ  $T_1$ が長いことが多い(10sを超える)、積算効率が悪いことが多い。

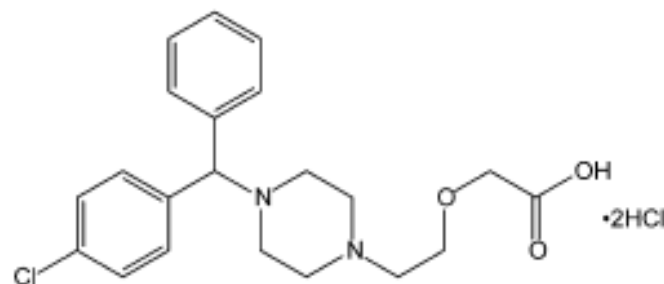
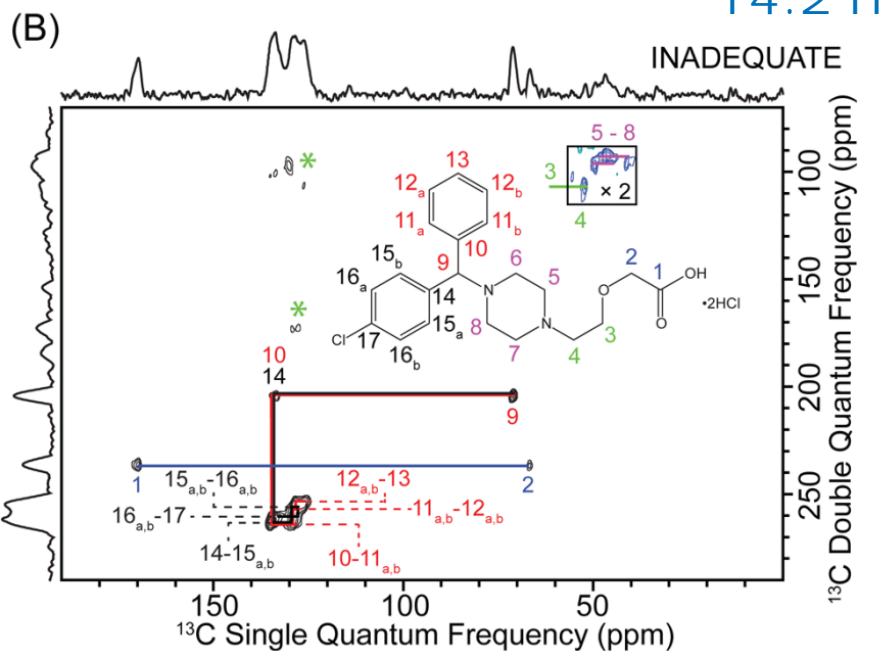
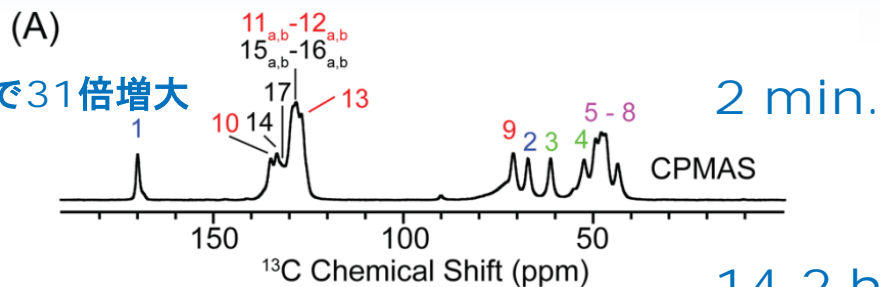


# 医薬製剤へのDNPの応用

## 実例1 セチリジン塩酸塩



DNP enhanced  $^{13}\text{C}$  CPMAS & INADEQUATE Spectra of Cetirizine Dihydrochloride



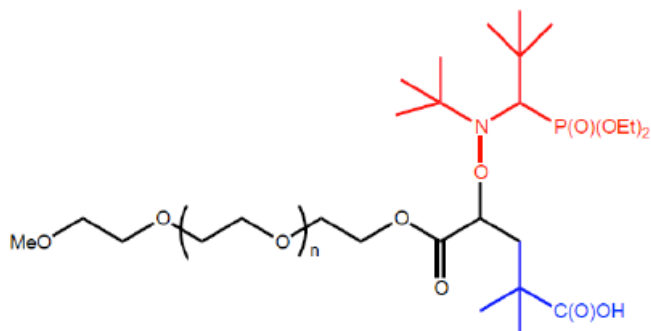
Cetirizine Dihydrochloride  
 ⇒抗ヒスタミン薬のひとつ。  
 アレルギー反応を抑制

⇒INADEQUATEにより  
 精度の高い信号の帰属が可能となる

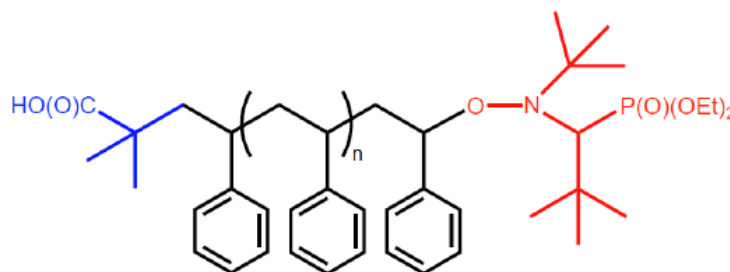
# 機能性高分子へのDNPの応用



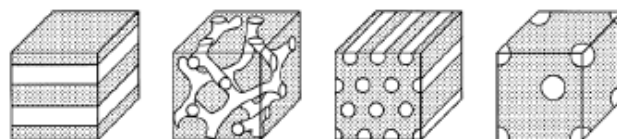
- 高分子末端の検出は、分子量が大きくなるほど困難である。
- 末端は、重合反応等の様々な反応に関わり、いわゆる「スマート・マテリアル」へと導く。



PEO (ポリエチレンオキサイド)



PS (ポリスチレン)



PS-b-PEO-b-PS

反応のコントロールで異なる凝集構造を形成しうる

# 機能性高分子へのDNPの応用

## PS (ポリスチレン)

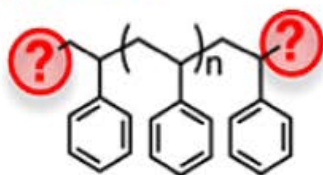


$^{13}\text{C}$  CP-MAS spectra DNP on/off of PS polymer ( $M_n$  13500 g/mol)

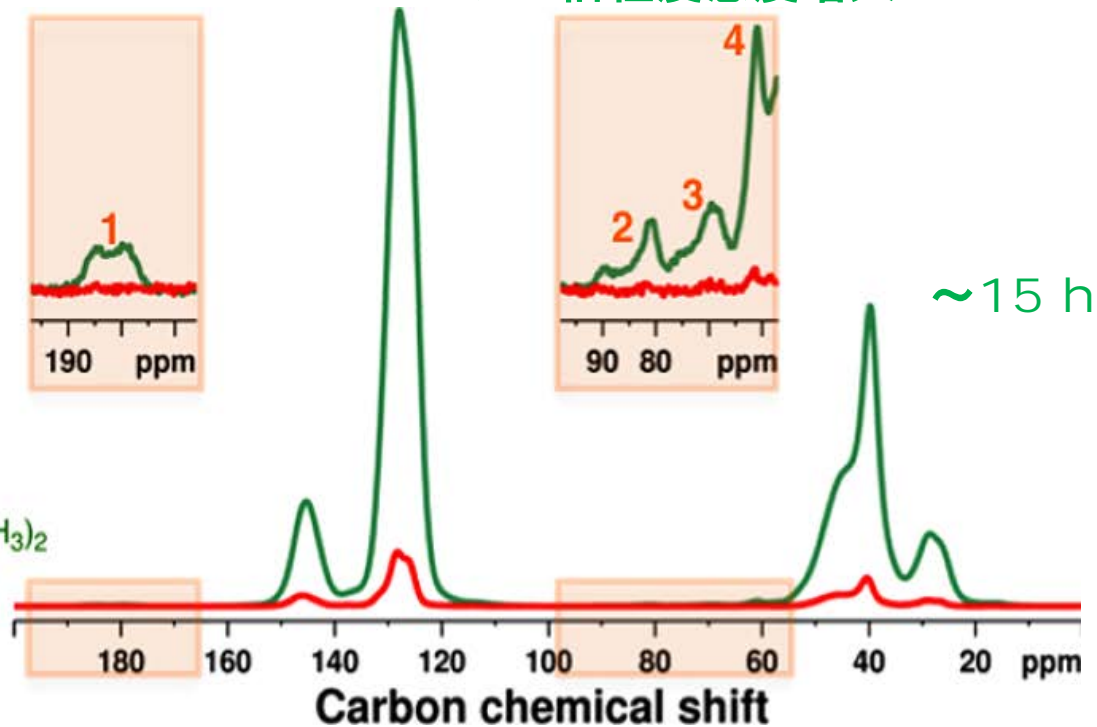
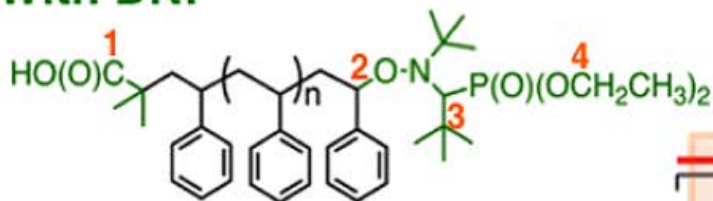
DNPで10倍程度感度増大

**Solid-State NMR of functional polymers**

**Without DNP**



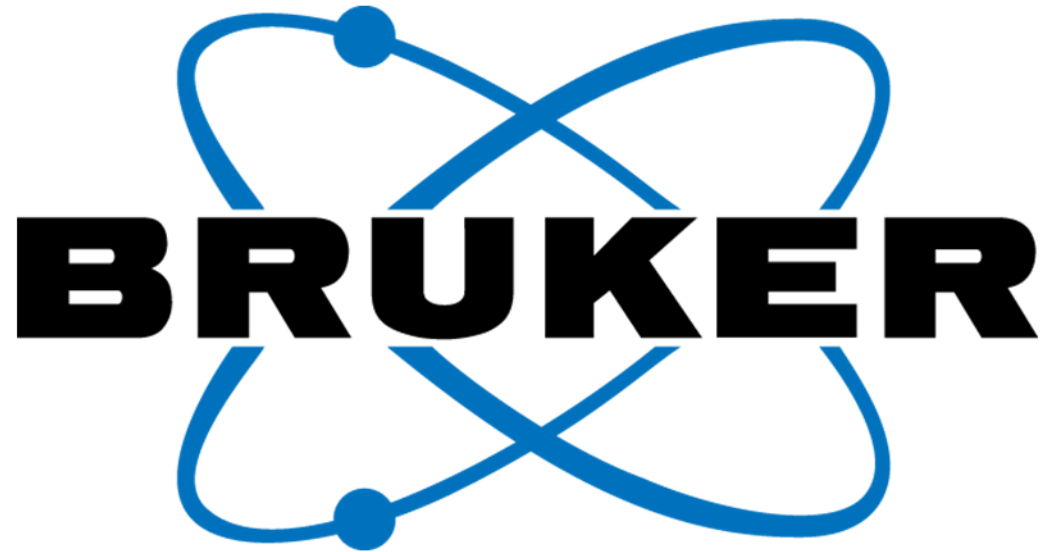
**With DNP**



# まとめ



- 固体DNP測定は、BRUKERから装置が市販され、サンプルの作成法も確立しつつあり、アプリケーション例も多く見られるようになってきた。
- DNP測定は、電子にマイクロ波を照射する手法なので、すでに提案されている様々な固体NMR測定のパルスで行うことができる。
- 特に、材料中のマイナー成分の観測、天然存在比が低い核の観測、INADEQUATEのような感度の低い測定に効果的である。



[www.bruker.com](http://www.bruker.com)

Would you like to learn more? Contact a customer service representative.