NMRで挑む複雑系の分子宇宙

三澤 拓真^{1,2}·伊藤 研悟^{1,2}·菊地 淳^{1,2,3}

1. はじめに

地球は太陽系という星系の中の一つの惑星であるが、 太陽系の外側にはさらに銀河系や銀河団といった階層性 の異なる宇宙が拡がっている. 一方で原子スケールに着 目すると、個々の原子は異なる電子雲に囲まれ、原子の つながりで分子(化合物)が形成され、各スケールに応 じた階層性がある. ここで、異なる階層性に応じた関係 性があることにも着目したい. 星どうしは万有引力に則 り関係性を有しているが、分子も生体環境中では、代謝 反応に即した関係性を有している. つまり生物のような 複雑系は多種多様な分子で構成されており、よく知られ たNMRによる有機構造決定のような精製された分子を 観測する場合より、混合物の解析では多くの情報を得ら れることが期待できる. たとえば、グルコースと解糖系 の下流およびTCA回路に位置する各種有機酸を同時に 観測できれば、あたかも太陽系が銀河系のどの方向へと 一緒に動いているかを記述するが如く、解糖系の流量や TCA回路の代謝方向を知れる可能性がある.ここでは混沌とした分子群の有り様を"分子宇宙"と呼ぶことにする.この複雑系の分子宇宙に挑む術を身につければ、精製物の観測とは異なり自然の理に迫り得る可能性もある.

天体観測に可視光以外にもγ線、X線や赤外線を用いるように、分子宇宙の計測にも波長の異なる電磁波を利用し得る。NMRの場合はラジオ波を用いるために、体液や組織抽出物を混合物のまま、あるいは生体の非侵襲計測が可能な特徴を有する¹⁾。本稿では溶液および固体NMR法で挑む分子宇宙解析を紹介する(図1)。

試料分子が精製物であれ混合物であれ、NMRスペクトルからは化学シフト δ 、スピン結合Jと、シグナル強度と線幅の情報が得られる。 δ の値は由来する化合物の原子団に応じて周波数が異なり、強度と線幅は含まれる化合物量と存在状態に応じて変化する。つまり計測試料中の化合物組成が変われば、スペクトル中の縦・横軸の数値も変化するため、その特徴・関係性抽出を可能とするデータマイニングが鍵となる。つまり古来は星座で暗

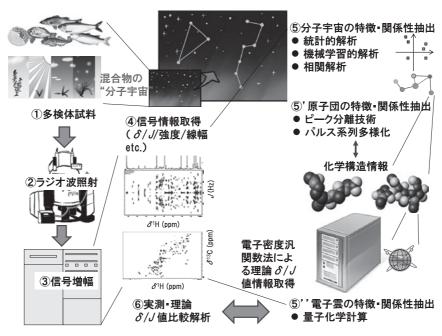


図1. "NMRで挑む複雑系の分子宇宙"の概念

い夜道の方向を確認したように、分子宇宙において組成の増減を分類・ネットワーク化することで、検体試料が健康あるいは疾患の方向に動いているかなどをデータマイニングできる。こうした代謝レスポンスの情報抽出を目的としたメタボノミクス分野について、三澤が項目2で解説する。この際、多検体の計測情報を比較解析するからこそ、健康と疾患といった複雑系成分比の違いを浮き彫りにすることができるため、この計算に用いる統計科学やデータベースに関しても項目3で解説する。

一方、複雑な混合物のシグナル解析を行う場合、特に 固体 NMR 法ではピーク分離を工夫する余地がある。項 目 4 で伊藤が独自のアプローチも含めて紹介し、さらに J結合や双極子結合を利用して化学シフトを分離する各 種パルス系列を項目 5 で紹介する。加えて、シグナルとして得られた化学シフトが生体分子の構造とどのように 相関するかを予測する手段として、半経験的ならびに量子化学計算を項目 6 で鳥瞰することとする。

2. メタボノミクス

メタボノミクスの概念 ヒトは恒常性を維持し続ける生き物であり、さまざまな細菌との共生を成した超生命体として存在しているため、非常に入り組んだ複雑系の代謝反応場を形成している。ヒトに限らず、あらゆる多細胞生物は食事や運動、あるいは疾患といったさまざまな生体環境変動要因の曝露を受けているにも関わらず、その恒常性を維持し続けるメカニズムはいまだ部分的にしか解明されていない。代謝物の組成解析や同定に趣をおいた研究をメタボロミクスと呼ぶのに対し、この代謝ブラックボックスである代謝反応場としての多細胞生物を、尿や糞便といったoutput情報を用いて、食や運動などのinputに対する代謝レスポンスを解析する研究領域はメタボノミクスと呼ばれている(図2).

メタボノミクスの流れ 前述の通り、生物の代謝は 非常に複雑であるため、特定のinputに対して、いかな る outputが観察されるか予測が難しい。そこで、サン プルを網羅的に分析し、データマインニングすることで inputを与える前と与えた後の統計的、あるいは機械学 習的な比較解析から、そのinputに対してどのような反 応がなされたか推測することが可能になる。メタボノミ クスではNMR、LC/MS、GC/MSといった分析機器が 広く用いられているが、各機器によって同定可能な物質 数には差異が存在する。たとえばヒト代謝物データベー スの先駆けであるHMDBによればヒト代謝物の総数は 約3000種類とされ、その中で現在同定可能な物質数は 約500種類である。最新のヒト尿データベースの報告例

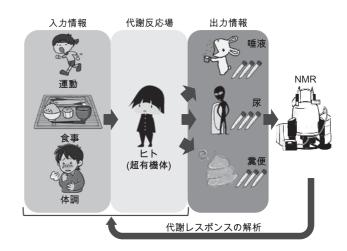


図2. メタボノミクスの概念

では、LC/MSで127種類、GC/MSで179種類、NMRでは209種類の代謝物の同定に成功しており、500種類のうち、89種類はGC/MS、98種類はLC/MS、108種類はNMRでしか同定することができない代謝物である。よって少なくとも尿中代謝物の解析においては、NMRは他の2つの手法と比較すると、一番高い網羅性と独自性を併せ持つ分析機器だといえる²⁾. 以上のことから、ここではNMRメタボノミクスにスポットを当て紹介していく.

メタボノミクスの実際例 近年テーラーメイド医療 という言葉をよく耳にするようになった. これはヒトゲ ノム計画においてDNA配列の解読がなされたことと. 塩基配列決定技術の発達により、個人個人のゲノム情報 についても短期間での取得が可能になってきた為、それ らの情報を活かして患者の個人差も考慮した医療を行う 事を指した言葉である.しかしヒトには、歳や性別、疾 患の有無や摂取栄養. さらには腸内微生物叢の違いなど が存在し, たとえば, 薬物動態や感受性などは到底 DNA情報だけで解釈できるものではない. そこで ClaytonらはNMRメタボノミクスの手法を用いて薬物 代謝表現型の分析方法を確立した3). このように医療技 術に踏み込んだ研究の他にも、HolmesらがINTERMAP にて行った研究では、普段の食事が代謝プロファイルの 違いに反映されることが明らかとなり、さらに代謝プ ロファイルの違いと血圧の関係について議論されてい る⁴⁾. より身近な応用例として、生活習慣による変動の 解析にもNMRメタボノミクスは使われている. また. メタボノミクスは他の解析と組み合わせることでより 専門性の高い研究領域にも切り込んでいくことができ る. 例として、2011年にFukudaらがNatureに発表し たbifidobacteriaによる腸管内感染防御機構についての

2014年 第9号 505

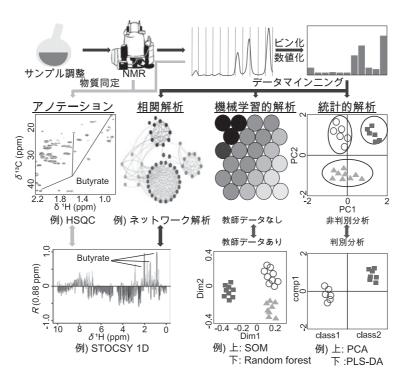


図3. 多変量解析と物質同定

報告では、話の根幹的な部分であるbifidobacteriaの acetate 産生を見いだしており 5)、さらに2013年には Furusawa らがNature にて、マウスの比較解析から、制 御性 T 細胞の分化誘導が片利共生細菌による butyrate 産 生に起因している事を突き止めた 6 . 加えて2014年に はフラクトオリゴ糖のプレバイオティクス効果による IgA 産生と腸内微生物由来の tyramine や butyrate 産生に 相関があるという報告もあがっている 7). このように生物の恒常性バランスの変化を見いだす強力なツールとしてメタボノミクスは活用されている.

NMRメタボノミクスの方法 メタボノミクスは input情報に対する代謝応答を output情報から解析することが主な目的であるため、input情報の収集が何よりも重要となることを念頭に入れて output 試料(尿や糞便など)の分析を行う.input に対してどのような変化が現れるかは未知であるためサンプルは網羅的に解析する必要がある.NMRにて得られたスペクトルデータはケミカルシフトの区画化(bin化)および数値化を行い統計的、時には機械学習的に解析を行う.また、結果を解釈する上で強力なツールとなるものに相関解析があげられる(図3).

アノテーション NMRにより得られたデータは縦軸に強度、横軸は化学シフトの値がふられているが、物質レベルで話をするためには、化学シフトから物質を同

定する必要がある。また、メタボノミクスには一般に 1 H化学シフトが使われるが、糖類などは 1 Hのみではアノテーションが難しいことがある。そこで 1 H化学シフトの二次元NMRである 13 C化学シフトの二次元NMRである 13 C化学シフトの一次元NMRである 13 C化学シフトの一次元NMRである 13 C化学シフトの一次元NMRである 13 C化学の一次元NMRである 13 C化学シフトの一次元NMRである 13 C化学の一次元NMRである 13 C化学の一次元NMRである 13 C化学の一次元NMRでの一次元NMRである 13 C化学の一次元NMRである 13 C化学の一次元NMRである 13 C化学の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次元NMRでの一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次元NMRでの一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次元NMRでの一次の一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次の一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの一次の一次元NMRでの

3. データベースや統計手法の活用

多変量解析 代謝混合物の同定と定量が主目的であるメタボロミクスと生理刺激による代謝レスポンス解析を主目的とするメタボノミクスの両方において重要となるのが多変量解析である。そもそもNMRにより得られた複雑系の莫大な量のデータは人間の目で見て違いがわかるものではないため、まずサンプルの違いを明確にする(集団分離)必要がある。多変量解析は手法の観点から統計解析と機械学習の二つに大別され、また入力情報の観点から判別分析と非判別分析(機械学習の場合は教師データの有無)に分けることができる。統計手法の非判別分析としてはPCA(principal component analysis)が主流である。この方法は分散が最大となるように直線を引いたものを主成分スコアPC1(principal component 1)軸とし、それに直交するようにPC2軸を引く、以後

506 生物工学 第92巻

この作業を因子の数だけ繰り返していく方法であり、す なわち、サンプル間の違いを最大限に表現する統計手法 である. PCAによりうまくクラスタリングされたのな らば、そのスコアに対する寄与率を表す、因子負荷量か らそのクラスターを形成している原因物質を見いだすこ とができる. 言わばPCAは容疑者を選定し. 他者との 違いを指摘する行為である. 逆に怪しい人物が最初から 分かっている場合、つまり、注目したいinputの差異が ある場合は、判別分析を用いて、そのinputに対するレ スポンスの違いを調べる事もでき、それにはPLS-DA (partial least squares discriminant analysis) やOPLS-DA (orthogonal partial least squares discriminant analysis) といった手法がよく用いられている. また. 人間は無意 識のうちに大量の学習データ中から意味のある違いを見 いだし分類するという、今紹介してきた手法と同様のこ とを行っており、人工知能に関する研究を生命科学分野 に応用することもできる. 生命科学分野で扱われる機械 学習の手法として教師データを利用しない SOM (selforganizing maps) やアルゴリズムの特性上, 大量のデー タを処理することが可能なRandom Forest などがあげら れ,強力な解析ツールとなっている.

相関解析とその応用 代謝物は自然発生するもので はなく. さまざまな物質との相互作用の結果として産生 される. そういった物質間のつながりを観測したいとき に有用なのが相関解析であり、相関関係からパスウェイ を推測できることに加え, 注目する物質の拡張も行うこ とができる. 相関解析では物質間のつながりをわかりや すく可視化できる相関ネットワーク解析やSTOCSY (statistical total correlation spectroscopy) がよく用いら れている. STOCSYはNMRにより得られた化学シフ ト間の相関を取ることで観測された物質間の関係を見る ものである. これを二次元展開し相関係数によって色分 けすることでヒートマップとして表示しパターン解析を 行える他に、1次元で、特定の物質にスポットをあて、 他の物質との関係を見たりする事もできる. この STOCSYを応用するとアノテーションに用いることも できる. 例としてFurusawaらの報告で重要であった butyrateを考えてみると、NMRではCH₃が一つ、CH₂ は二つの計三つのシグナルが異なる化学シフトに観測さ れるが、これらのシグナルは同じ物質由来であるが故に、 同様の動きをする為、相関係数はきわめて高くなる. こ れを利用してアノテーションの信頼性を高めることがで きるのである.

データベースの利用 各物質間の関係を明らかにしたところでその物質が具体的になんという物質なのかが

解らなければ議論ができない. そこで重要な役割を担う のがデータベースである. NMR における主要なデータ ベースとして構造情報が詳細に記載されているBMRB8). TOCSY (total correlated spectroscopy) による間接的 なスピン結合の情報からアサインをつけることができる TOCCATA⁹⁾, ヒト代謝物に特化したHMDB²⁾, HSOC の1スペクトルから200以上の一括アノテーションが可 能なSpinAssign¹⁰⁾などがあげられ、用途によって使い 分けることで高精度なアノテーションが可能となる. な かでもSpinAssignはバイオインフォマティクスの領域 において開発された相同性検索プログラムBLASTと同 様な事がNMRでもできるのではないかというコンセプ トで作られたツールである. BLASTはアミノ酸や核酸 の配列情報をもとに既存のデータと照合, 相同性の高 い高次構造を提示することによりその機能や構造を調 べることができる検索プログラムであるのに対し. SpinAssignはNMRの化学シフトをもとにデータベース と照合、相同性の高いものを抽出して提示するプログラ ムである. SpinAssignでは相同性の指標としてp-value を採用しており、異なるアルゴリズムを用いている点で、 他のデータベースとの差別化がなされている.

4. メタボノミクス的アプローチ実例

前項までにメタボノミクスの基本的なアプローチを解 説してきた. これらを踏まえ. Katoらのフラクトオリ ゴ糖 (以下FOS) の摂食実験例について解説する (図4). まず、この研究の背景には、FOSは腸内環境を整え る効果があるが、ヒト自体を利用した代謝変動と、その 反応を触媒する腸内微生物叢の変動を同時に追跡した例 は皆無であった.そこでKatoらはヒトにおけるFOSの 摂食実験を行い、代謝混合物である糞便からFOSによっ て引き起こされた代謝変動を抽出し、 プレバイオティク ス効果をつかさどる物質や腸内細菌の同定を試みた 7 . まず、FOSの摂食群とコントロール群に対し、非判別 分析であるPCAを行った. するとFOSの摂食群は各ポ イントのバラつきも大きく、コントロール群とは異なる 傾向が確認された. そこで判別分析を行い. 何が各群を 特徴づけているかを浮き彫りにし、得られたローディン グプロットから関係性の高いケミカルシフトを推定、物 質同定のために、2D-JやHSOCといった2次元NMRの 情報も加え, FOSによるbutyrateやp-cresol, tyramine といった有機酸の変動が大きく寄与している事を見いだ した. この事実をうけ、免疫学的、細菌学的なアプロー チも組合せ解析を行ったところ、FOSの摂食により、 腸内微生物叢の変動が起こり、tyrosineをtyraminや

2014年 第9号 507

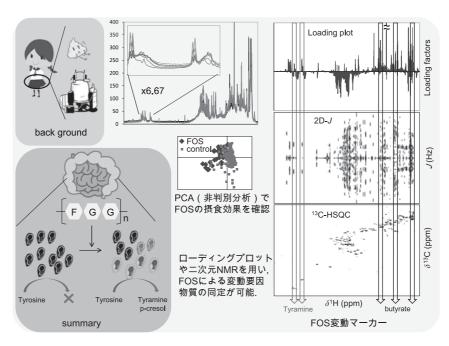


図4. FOS接食変動マーカー解析の実例. 中央1D-NMRの実線はコントロール、点線はFOS摂食時を示している. FOS摂食で増減する 1 H化学シフトをローディングプロットで追跡し、2D-Jや 13 C-HSQCを用いた物質同定を行う.

p-cresolまで分解できる腸内細菌の増加に伴って、IgA の産生量が増加する現象を確認した.

このように代謝混合物を対象としたNMR分析は、代謝表現型を捉える点で非常に優れており、未知の現象を発見したり、あらたなバイオマーカーを探索したりすることも可能な、非常に強力なツールだといえる。次項では、混合物シグナルを分離する戦略を詳しく述べることとする。

5. 混合物シグナル分離法

ピーク分離の概略 生物の代謝混合物群はNMRを用いて網羅的に検出可能であるが¹¹⁾,特に1次元NMRスペクトルにおいては分解能の状態により、複数の代謝物のピーク同士が重なり、純成分ピークの正確な化学シフト値やピーク強度がわからないことがある。重なったピークを純成分のピークとして解析を行いたい場合にはシグナルの分離を行う必要がある。シグナルの分離は主に音声音響信号処理や画像処理で使われている手法であり、複数のシグナルが合わさったデータやノイズが含まれたデータから、単一のシグナルを抽出する際に用いられるデータ処理技術である。波形の状態や分離する目的により種々の数学的・統計学的な処理方法があり、その一つの方法としてMCR-ALS(multivariate curve resolution-alternating least squares)法があげられる.

MCR-ALS法によるピーク分離 前述のMCR-ALS

法とは、混合成分のスペクトルを、繰り返し交互最小自 乗法を用いて各純成分のスペクトルに分離する手法であ り、NMRスペクトルに適用すれば各代謝物由来の化学 シフト値・ピーク強度・半値幅を算出することが可能で ある. NMRの場合、繰り返し交互最小自乗法に用いる 関数はガウス関数やローレンツ関数が一般的に使われて おり、MCR法で純成分のピークを適切に得られれば、 そのピークは前述の純成分情報として解析に用いること が可能である¹²⁾. NMRスペクトルをピーク分離し解析 するソフトウェアとしてはPeakSimulator ASAや竹 NMR, Fityk (海外) などが知られている. Fitykの操 作を例としてあげると、NMRの各成分ピークが正規分 布になると仮定し、ピークを追加しながら最小自乗法を 用いて実測スペクトルに近似させてピークを分離する. 筆者らも海藻類の固体NMRのシグナルをピーク分離 し、得られた成分データと無機元素との因果分析により、 海藻多糖類と金属との関係性を検証した13).

6. NMRシグナル帰属に用いるパルス系列

固体・溶液 NMR法 代謝物の NMR法で分析の対象となる核は、主に H核と C核であり、そのうちどちらを解析するか、どのような情報を得ようとするかにより、分析時に照射するラジオ波パルス(パルス系列)が異なる、溶液 NMRでは、水やメタノールなどの可溶化画分を計測することができ、固体 NMRでは、不溶性の

508 生物工学 第92巻

溶液 ¹ H- ¹ H相関	$\begin{array}{c c} \text{COSY} \\ \hline H_1 & H_2 & \text{II} & \\ -C_1 - C_2 - & \text{II} & \\ \hline \end{array}$	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	NOESY $ \begin{array}{ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
溶液1H-13C相関	$\begin{array}{c c} \text{HSQC} \\ & \stackrel{\text{H}_1}{-C_1-} & \stackrel{\text{O}}{=} \stackrel{\text{O}}{\underset{\text{ca}}{\text{T}}} \\ & F_2(\text{th}) \end{array}$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{c c} DEPT\text{-HSQC} \\ H_1 \overset{H_1}{\overset{H_2}{\overset{H_1}{\overset{H_2}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}$	$\begin{array}{c} \text{HCCH-COSY} \\ \stackrel{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{(I)}}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}}{\overset{\text{(I)}}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{\text{(I)}}}{\overset{\text{(I)}}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{(I)}}{\overset{\text{(I)}}{\overset{(I)}}}}{\overset{\text{(I)}}}{\overset{I}}{\overset{(I)}}{\overset{(I)}}{\overset{(I)}}{\overset{(I)}}}{\overset{(I)}}}{\overset{I}}{\overset{(I)}}{\overset{(I)}}{\overset{(I)}}}}{\overset{(I)}}}{\overset{(I)}}}}{\overset{(I)}}}}}}{\overset{I}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}$
固体13C検出	$\begin{array}{c c} \text{HETCOR} \\ (\begin{matrix} H_1 & H_2 \\ \vdots & \ddots & I_2 \\ -C_1 & C_2 \end{matrix}) & \begin{matrix} G & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & &$	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	INADEQUATE $\begin{array}{ccc} & & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & $	3D-CCC H ₁ H ₂ H ₃

図5. シグナル帰属に用いる溶液・固体パルス系列の例. 原子間の実線矢印はスピン結合, 点線矢印は双極子結合を示す.

高分子成分を計測することが可能である。1次元NMR計測では、「Hの場合には化合物中における「Hの数や電子状態に依存する化学シフト値、隣接する「Hの数に依存するカップリングがあり、「3Cの場合は炭素原子の数と電子状態に依存する化学シフト値が見られる。しかし、混合試料の場合には化学シフト値がオーバーラップするため、成分の帰属や構造の推定を行う場合には、2次元あるいは3次元NMRのパルス系列を駆使する。

多次元NMR 多次元NMRパルス系列を駆使する ことで、シグナルの重複が激しい混合物の計測でも、構 造や運動性の違いで対象シグナルを分離して計測し、超 分子構造や物性に関する情報を抽出できる可能性があ る. Hのみを検出する2次元溶液NMRのパルス系列を 用いることにより、隣接する「Hや同一スピン系の「Hが 検出でき、また、NOE結合(空間的に近傍にあるスピ ンの対)やスピン結合(化学結合で近傍にあるスピンの 対)の情報を得ることができる(図5上). ¹³C核も取り 入れることで、炭素と直接結合している Hや同一スピ ン系の¹H. 炭素と直接結合している ¹H 数を知ることが できる(図5中). 固体NMR法にも多くのパルス系列が 開発されているが(図5下)、双極子相互作用の異方性効 果が強く、「H検出型の計測が大変難しいため、多次元 NMRパルス系列の適用が遅れている. 感度の低い¹³C 検出でも積算の稼ぐことのできる1D-CP/MAS. あるい は4級炭素を強調するための1D-NOS/MAS法などが広 く用いられている.しかし. 試料を¹³C安定同位体標識 化し、それを完全標識と仮定すれば¹H-¹³C結合検出型 では100倍、¹³C-¹³C結合検出型では1万倍の存在量を計 測できることになる14-16).

7. 化学シフト値予測法

経験的化学シフト帰属法 化学シフトの帰属を行う場合,前述の多様なNMRパルスプログラムを用いて計測された成分の構造解析を行う.また,経験的な方法としては 1 H, 13 C, 1 H- 13 C HSQCスペクトルをBMRB 8 や当研究室が開発したSpinAssign 10 などのデータベースで検索し,その一致したシグナル数と誤差のレベルによりアノテーションの候補をつける.さらにデータベースと組み合わせた予測法における特徴として,HOSE (hierarchical organization of spherical environments) コード 17 やCAST/CNMRのCANOST (autoCANOnicalization system for organic STructures) コード、CAST (CAnonical representation of STereochemistry) コードを用いることがあげられる 18)。多くの化学シフト値予測ソフトは,予測したい化合物を部分構造に分けてデータベース検索を

表1. 化学シフト値予測法の例

システム	予測法の特徴	原子核
SpinAssign BMRB	データベース検索	¹ H, ¹³ C
Predict NMR CDK	HOSEコード利用	¹H, ¹³C など
CAST/CNMR	CASTコード利用	¹³ C
ChemDraw ACD NMR	加成則	¹H, ¹³C など
Gaussian	CSGT GIAO	¹ H, ¹³ C など
GAMESS Q-Chem	GIAO	¹ H, ¹³ C
ORCA	IGLO	¹ H, ¹³ C

2014年 第9号 509

行い,推定シフトの基準値を算出し,加成性の規則を適用して,基準値を増分して最終値を出しているようである(表1).

非経験的化学シフト値予測法 化学シフト値の経験 的な予測に頼らない、量子化学に基づく非経験的な手法 が近年注目されている. これは、計算機科学の発展によ り、計算量の多いものでも早い速度で計算ができるよう になったからである. 化学シフト値を量子化学的に計 算する方法として, GIAO (gauge independent atomic orbital) 法¹⁹⁾がもっとも用いられており、他にCSGT (continuous set of gauge transformations), IGLO (individual gauge for localized orbitals) 法があり、ソ フトウェアとしてはGaussian, GAMESS, Q-Chem, ORCAなどがある. 計算の一般的な流れとしては、計 算する化合物のモデルを3次元上で作成し、Hartree-Fock法などの分子軌道法や密度汎関数法に基底関数を 組み合わせてエネルギー的に構造を最適化し²⁰⁾, GIAO 法などを用いて遮蔽定数を算出する. Gaussian はスピ ン結合も計算することができる. また, 溶媒効果や溶媒 との相互作用を考慮するために、PCM (polarizable continuum model) 法や予測したい化合物の周りに水分 子を置くこともある. さらに、化合物の異性体を考慮す るために分子動力学計算を併用して複数の化合物の構造 を作成し、ボルツマン分布から各構造の存在確率を求め、 化学シフト値を補正する. しかし. 実測値と計算値の完 全な一致は現状として難しくさまざまな要因が実測値に は含まれていると考えられる. そのため、各官能基に対 して補正因子(複数の実測値と理論値の線形・非線形近 似多項式の係数および定数項)を算出して、部分的に化 学シフト値を補正するなどの研究が行われている. 今後 は実用に即した量子化学計算の適用により化学シフト値 の予測精度が向上することに期待したい.

8. おわりに

筆者らはNMRで複雑系の分子宇宙に挑み続け、10年近くを経てきた。この間に低感度のNMRは役に立たないとの噂も聞いたが、筆者らを含めてNatureあるいは姉妹紙に多数貢献している事実からして^{21,22}、その噂は間違っていることが伺える。逆に言えば分子宇宙の世界では、高濃度の物質は、あたかも満月の夜に星座が見難

くなるが如く甚大な影響を与える。たとえば酢酸や酪酸などのありふれた物質は、かつて誰も生理機能に着目していなかったものの、筆者らが発見したように腸内の物理化学的環境を整えるために重要である^{5,6)}。他の高濃度物質の解析例としては、果実ジュースやワインの産地判別が約25種の代謝物組成で判別できることから²³⁾、比較的低磁場の高速多検体処理NMR装置が実用化されている。さらに近年では電磁石を利用した小型で高性能な、ベンチトップ型の低価格NMR装置が開発および販売され始めている。この小型NMR装置の開発に乗じて、試料管でなく検出コイル自体を回転させるMACS(magic angle coil spinning)技術²⁴⁾を搭載する試みも登場している。こうした装置を利用すれば、将来は食品や工業製品の製造現場での評価や、検診車や地方病院での簡易健康診断などへの導入が可能になるかもしれない。

文 献

- 1) 菊地 淳, 赤嶺健二:分光研究, 55, 320 (2006).
- 2) Bouatra, S. et al.: PLoS One, 8, e73076 (2013).
- 3) Clayton, T. A. et al.: Nature, 440, 1073 (2006).
- 4) Holmes, E. et al.: Nature, 453, 396 (2008).
- 5) Fukuda, S. et al.: Nature, 469, 543 (2011).
- 6) Furusawa, Y. et al.: Nature, 504, 446 (2013).
- 7) Kato, T. *et al.*: *DNA Res.*, (doi:10.1093/dnares/dsu013) (2014).
- 8) Cui, Q. et al.: Nat. Biotechnol., 26, 162 (2008).
- 9) Bingol, K. et al.: Anal. Chem., 84, 9395 (2012).
- 10) Chikayama, E. et al.: Anal. Chem., 82, 1653 (2010).
- 11) 関山恭代ら: ぶんせき, 2,81 (2012).
- 12) Tauler, R.: Chemometr. Intell. Lab. Syst., 30, 133 (1995).
- 13) Ito, K. et al.: Anal. Chem., 86, 1098 (2014).
- 14) Mori, T. et al.: Carbohydr. Polym., 90, 1197 (2012).
- 15) Komatsu, T. and Kikuchi, J.: *Anal. Chem.*, **85**, 8857 (2013).
- 16) Komatsu, T. and Kikuchi, J.: *J. Phys. Chem. Lett.*, **4**, 2279 (2013).
- 17) Bremser, W.: Anal. Chim. Acta, 103, 355 (1978).
- 18) Satoh, H. et al.: Tetrahedron, 59, 4539 (2003).
- 19) McWeeny, R.: Phys. Rev., 126, 1028 (1962).
- 20) Frisch, M. J. et al.: J. Chem. Phys., 80, 3265 (1984).
- 21) Claesson, M. J. et al.: Nature, 488, 178 (2012).
- 22) Kettunen, J. et al.: Nat. Genet., 44, 269 (2012).
- 23) 菊地 淳:実験医学, 32, p. 699, 羊土社 (2014).
- 24) Sakellariou, D. et al.: Nature, 447, 694 (2007).

510 生物工学 第92巻