

第 38 回 NMR 討 論 会

講 演 要 旨 集

日時 1999年10月13日(水)～10月15日(金)

会場 北海道大学クラーク会館

共催

日本化学会・日本分析化学会・日本薬学会・日本生化学会・高分子学会
日本農芸化学会・日本物理学会・日本生物物理学会・日本磁気共鳴医学会

1999年9月24日

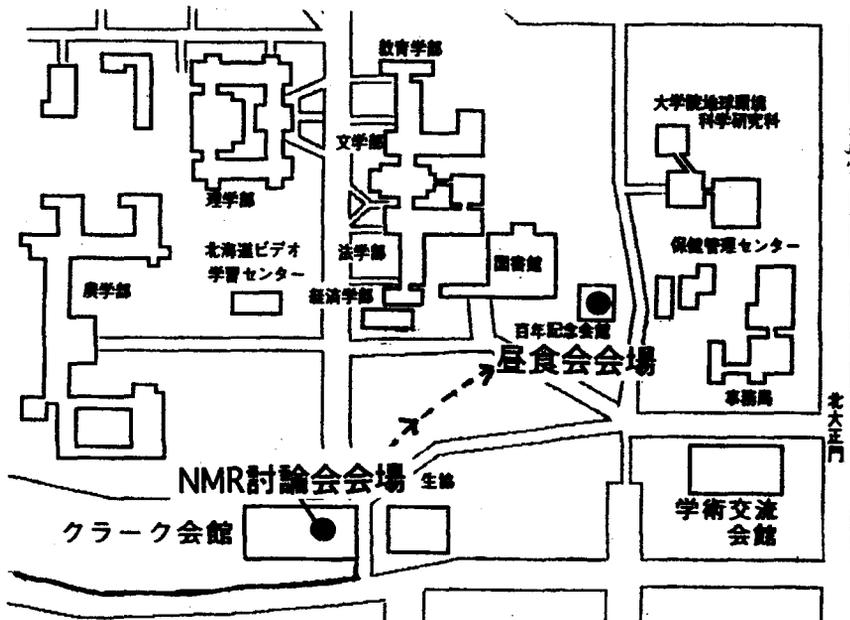
第38回NMR討論会
昼食会参加者 各位

第38回NMR討論会
世話人 堤 耀広

この度は第38回NMR討論会昼食会にご出席いただきありがとうございます。
本会を下記の要領で開催いたしますのでご参集くださるようお願い
致します。

日 時：1999年10月14日（木）12時40分より

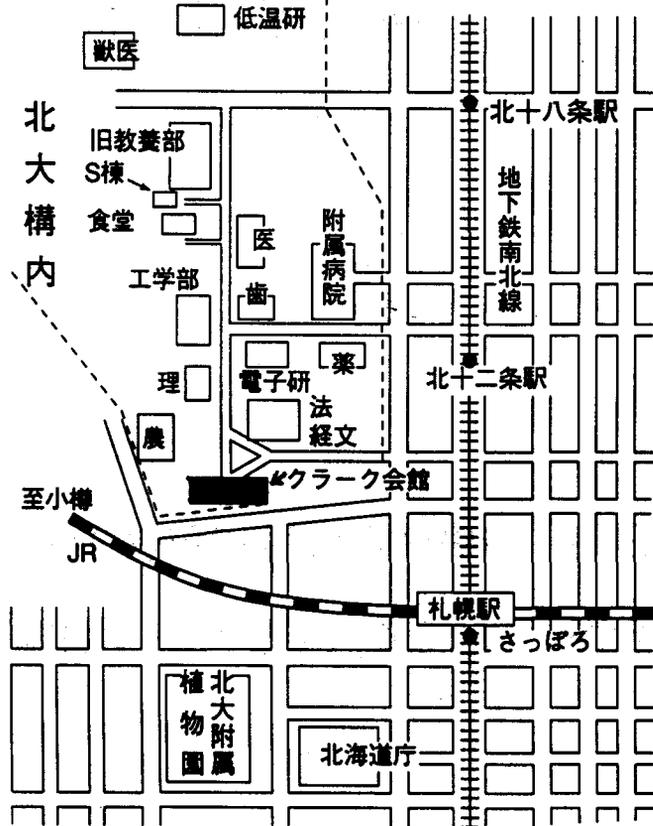
場 所：北海道大学百年記念館大会議室（会場より徒歩5分）



第38回NMR討論会 会場案内

北海道大学クラーク会館
(札幌市北区北8条西8丁目)
tel : 011-716-2111 (代表)

◇会場案内図



◇交通

JR札幌駅(北口)より徒歩12分
地下鉄南北線札幌駅、又は北12条駅より徒歩15分
地下鉄東豊線札幌駅より徒歩17分
タクシー; 札幌駅より5分

◇連絡先

〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目
北海道大学大学院工学研究科量子物理工学専攻
堤 耀広
tel : 011-706-6639、fax: 011-716-6175
e-mail : atsutsu@eng.hokudai.ac.jp

第38回NMR討論会プログラム

第1日 10月13日(水)

(9:25 - 9:30) 開会の挨拶

(9:30-10:30)

座長 島田一夫

- | | | | |
|-----|--|-----|---|
| | | ... | |
| 1L1 | TROSYスペクトルのArtifactとその消去
(CREST1、都立大・理2) ○児嶋長次郎1、甲斐荘正恒1,2 | | 1 |
| 1L2 | 二次元高圧NMRによる蛋白質の圧力変性中間体の構造
(神戸大院自然科学1、神戸大理2、レーゲンスブルク大3、マックス・プランク研4、スクリプス研5)
○井上匡子1、北原 亮1、山田博昭2、赤坂一之1、Peter Wright5、Christian Herrmann4、Werner Kremer3、
Till Maurer3、Hans R. Kalbitzer3 | | 3 |
| 1L3 | 塩基修飾を受けたDNAを認識する蛋白質の立体構造解析
(奈良先端大) 三島正規、伊藤紀幸、大木 出、池上貴久、秋山昌広、真木寿治、中別府雄作、○白川昌宏 | | 5 |

— 休憩 —

(10:50-11:30)

座長 白川昌宏

- | | | | |
|-----|---|-----|---|
| | | ... | |
| 1L4 | hU2AF65の2つのRNA結合ドメインの立体構造解析
(東大院理1、University of Massachusetts Medical Center2) ○伊藤拓宏1、武藤 裕1、Michael R. Green2、
横山茂之1 | | 7 |
| 1L5 | 線虫由来抗菌ペプチドASABFの立体構造解析
(北大理1、農水省畜系昆虫研2、富山医薬大薬3) ○相沢智康1、田谷内政人1、鈴木政人1、星野宏和1、
藤谷直樹1、小金沢 望1、松浦篤志1、宮澤光博2、加藤祐輔2、熊本康裕1、出村 誠1、河野敬一3、
引地邦男1、新田勝利1 | | 9 |

(11:30-12:40) 特別講演

座長 神藤平三郎 (H. Shindo, Chair)

- | | | | |
|------|--|-----|----|
| | | ... | |
| 1SL1 | Solution NMR with Very Large Molecules
(ETH, Switzerland) Gerhard Wider | | 11 |

座長 阿久津秀雄 (H. Akutsu, Chair)

- | | | | |
|------|---|-----|----|
| | | ... | |
| 1SL2 | Towards Understanding of Calmodulin Target Recognition Mechanisms
(University of Toronto, Canada) 伊倉光彦 | | 13 |

(14:00-16:00)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3の倍数 + 1)

(16:00-18:00)

座長 赤坂一之

- | | | | |
|-----|--|-----|----|
| | | ... | |
| 1L6 | 大腸菌細胞分裂に関する新規タンパク質YhhPの溶液構造
(農水省生物研1、東薬大2、名大農3) ○加藤悦子1、八田知久1、神藤平三郎2、水野 猛3、石井祐子3、
山田寿美3、山崎俊正1 | | 14 |
| 1L7 | 超好熱性古細菌由来TBP蛋白質-DNA複合体の高温下での内部運動性の解析
(工技院生命研1、科技団2) ○山崎和彦1,2、館野 賢1,2、鈴木 理1,2 | | 16 |
| 1L8 | 新規ドメインPB1の立体構造と結合配列の認識
(都臨床研1、日本女子大理2、CREST3、学習院大院理4、東京大医科研5、九大医6、北大薬7) ○寺沢宏明1、
小椋賢治1、戎井悦子1、市川さおり2、堀内正隆1,3、湯沢 聡1,4、横地政志1,3、畠中英樹1、伊藤隆司5、
住本英樹6、稲垣冬彦7 | | 18 |

座長 内藤 晶

- | | | | |
|-----|---|-----|----|
| | | ... | |
| 1L9 | 蛋白質BPTIにおける個々 ¹³ C核の加圧による化学シフト
(神戸大自然科学1、神戸大理2、ラトガーズ大学CABM3) ○李 華1、山田博昭2、Rong Xiao3、
Gaetano Montelione3、赤坂一之1,2 | | 20 |

1L10	脂質二重膜作動性生理活性物質の膜表裏分布に関するNMR解析 (東大院理) ○小林好真、村田道雄、橋 和夫	...	22
1L11	MAS-Multiconformational液晶NMR法によるHIVプロテアーゼ阻害剤の構造解析 (阪大医) ○木村敦臣、牧田智薫子、藤原英明	...	24

第2日10月14日(木)

(9:20-10:40)

座長 田之倉 優

2L1	The Solution Structure of Ecteinascidin 729-DNA Adduct using NOE-Restrained Refinement Procedures (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA) ○濱田季之、Xiang-lei Yang、Kenneth L. Rinehart、Andrew H.-J. Wang		27
2L2	NMRと無細胞合成系を用いたタンパク質基本構造の決定 (理研ゲノムセンター ¹ 、理研細胞情報伝達 ² 、東大院理 ³) ○木川隆則 ^{1,2} 、矢吹 孝 ¹ 、山口絵未 ¹ 、関 英子 ¹ 、松田貴憲 ¹ 、元田容子 ¹ 、松田夏子 ¹ 、横山茂之 ^{1,2,3}	...	31

座長 鶴澤 洵

2L3	NMR分光法によるアルカリプロマイド水溶液中における水分子のD核および ¹⁷ O核のスピン-格子緩和速度におよぼす温度および圧力効果 (立命館大理工 ¹ 、創価大工 ²) ○文野浩一 ¹ 、清水昭夫 ² 、谷口吉弘 ¹	...	33
2L4	Artifactual Attenuation Associated with Large Gradient Pulses in PGSE NMR Diffusion Measurements (機能水研 ¹ 、工技院物質研 ²) ○早水紀久子 ² 、William S. Price ¹ 、井出博之 ¹ 、荒田洋治 ¹		35

— 休憩 —

(11:00-12:30) 特別講演

座長 平沖敏文 (T. Hiraoki, Chair)

2SL1	Unusual Proteins and Uncommon NMR Nuclei (University of Calgary, Canada) Hans J. Vogel	...	38
座長 安藤 勲 (I. Ando, Chair)			
2SL2	NMR Imaging in Soft Matter (RWTH, Germany) Bernhard Blümich	...	39

(14:00-16:00)

ポスターセッション(説明義務ポスター番号:3の倍数+2)

(16:00-18:00)

座長 渡部徳子

2L5	新しいアプローチによるNMR microscopeの開発(3) (筑波大物理工学 ¹ 、筑波大学臨床医学 ²) ○拝師智之 ¹ 、植松孝明 ¹ 、松田善正 ¹ 、巨瀬勝美 ¹ 、吉岡 大 ² 、阿武 泉 ²	...	42
2L6	マルチスライスHSQC法を用いた高感度 <i>in vivo</i> ¹³ C代謝物イメージング 第三報 (東芝医用機器システムセンター ¹ 、創価大生命科学研 ²) ○渡邊英宏 ¹ 、梅田匡朗 ¹ 、石原康利 ¹ 、岡本和也 ¹ 、小田正記 ² 、金松知幸 ² 、塚田裕三 ²	...	44
2L7	マンガンイオンを用いる動物脳機能イメージング法 (国立環境研 ¹ 、筑波大医 ²) ○三森文行 ¹ 、熊谷 恵 ^{1,2} 、豊岡秀訓 ²	...	46
座長 寺尾武彦			
2L8	¹ H高磁場固体高分解能NMR法を用いたペプチド及びポリペプチドの化学シフトと構造解析 (日本ブルカー ¹ 、東工大院工 ²) ○山内一夫 ¹ 、黒木重樹 ² 、藤井一馬 ² 、安藤 勲 ²	...	48
2L9	マジック角試料回転条件下で同種核双極子相互作用により高効率で磁化移動するための複合ラジオ波駆動リカップリングパルス系列 (横浜国大工) ○藤原敏道、Purnima Khandelwal、阿久津秀雄	...	50

- 2L10 ビタミンD₃誘導体の固相合成におけるSR-MAS測定の利用 . . . 52
 (東工大院理工1、日本電子2) 高橋孝志1、○土黒一郎1、土井隆行1、津野久幸2

第3日 10月15日(金)

(9:20-10:40)

座長 林 繁信

- 3L1 超臨界流体用の *in-situ* 高圧NMRプローブの開発 . . . 55
 (阪大院理1、帝人2、神戸薬大3) 永阪文憲1,2、○江口太郎1、中山尊量3、中村巨男1

- 3L2 ¹²⁹Xe用連続フロー型スピン偏極装置：高濃度Rb光ポンピング触媒における最適化されたセルの構造 . . . 59
 (電総研) ○服部峰之、平賀 隆、守谷哲郎

座長 早水紀久子

- 3L3 Tb₁Vo.9H₂Dy(x+y=0.7)における水素及び重水素のサイトと拡散 . . . 61
 (工技院物質研) ○林 繁信、B. Bandyopadhyay

- 3L4 高温 *in-situ* NMRイメージング法による石炭軟化溶融過程の研究 . . . 65
 (新日鐵先端研1、日本電子2) ○齋藤公児1、古牧育男1、長谷川憲一2

— 休憩 —

(11:00-12:10) 特別講演

座長 恵良田知樹 (T. Erata, Chair)

- 3SL1 Conformation and Dynamics of Extensively Labeled Solid Proteins by Multidimensional Methods and Applications . . . 69
 (Iowa State University, USA) Mei Hong

座長 斉藤 肇 (H. Saito, Chair)

- 3SL2 The NMR Angle on Troponin-C: Everything moves, and every movement is relevant to calcium regulation 70
 (University of Alberta, Canada) Brian D. Sykes

(14:00-16:00)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3の倍数)

(16:00-18:00)

座長 堀井文敬

- 3L5 固体NMR/*ab initio* tight-binding MO法による三次元高分子結晶の構造と電子状態の研究 . . . 71
 (東工大院理工1、奈良女子大生活環境2、東ソ3) ○安藤 勲1、藤井一馬1、黒木重樹1、黒子弘道2、内田雅人3

- 3L6 多核固体NMRによるヘテロポリ酸(H₃PW₁₂O₄₀)反応場の解析 . . . 75
 (東大院工1、広大工2) ○内田さやか1、犬丸 啓2、御園生 誠1

座長 朝倉哲郎

- 3L7 固体高分解能NMRによる膜蛋白質の動的構造 . . . 79
 (姫路工大理1、ウエイン州立大2、カリフォルニア大3) ○斉藤 肇1、辻 暁1、山口 悟1、谷生道一1、河瀬靖治1、米林香華1、河南るり子1、長谷川 潤1、内藤 晶1、Richard Needleman2、Janos K. Lanyi3

- 3L8 固体スピンエコーNMRによる高分子の構造研究 . . . 81
 (東工大院生命理工) ○浅川直紀、櫻井 実、井上義夫

座長 竹腰清乃理

- 3L9 ¹²⁹Xe NMR化学シフト値によるガラス状高分子の微細孔サイズの評価 . . . 83
 (名工大工) ○吉水広明、宮内 実、鈴木智幸、辻田誠治、木下隆利

- 3L10 多次元二量子遷移固体NMR法による無秩序な高分子の局所構造解析 . . . 85
 (京大化研1、University of Massachusetts2) ○梶 弘典1,2、Klaus Schmidt-Rohr2

[溶液測定法の開発]

- P1 二面体角 ψ に関連する遠隔スピン結合定数のDQ/ZQ法による決定 . . . 87
(北大理) ○熊木康裕、引地邦男、新田勝利
- P2 Selective J-HMBC 2D法による異種核間ロングレンジカップリング定数の測定 . . . 89
(千葉大分析センター1、日本電子2、雪印乳業3) ○徳永達裕1、関 宏子1、内海博明2、中越雅道3、山口健太郎1
- P3 微量試料の測定法 . . . 93
(日本女子大理) 高橋征三

[溶液応用 (蛋白質・ペプチド)]

- P4 脂質二重膜に結合したマガイニン2の立体構造 . . . 95
(群馬大工1、京大薬2) ○武田明美1、若松 馨1、館 知也2、松崎勝巳2
- P5 NMR距離解析法を応用したシクロスポリン分解物の光学活性部位の構造解析 . . . 96
(資生堂医薬研) ○島田治男、川西聡政、八戸昌秋、本山 晃、吉岡桂子、難波隆二郎
- P6 Dodecylphosphocholineミセル中のPACAP27 . . . 98
(奈良先端大1、武田薬品開拓一研2、武田薬品医化研3) ○井ノ岡 博1,3、大瀧徹也2、北原 治2、池上貴久1、遠藤聡史3、北田千恵子2、大儀和宏2、音田治夫2、藤野政彦2,3、白川昌宏1
- P7 蛋白質の区分安定同位体標識法 . . . 99
(阪大蛋白研) ○大友崇紀、京極好正、山崎俊夫
- P8 ATF-2の転写活性化ドメインの多次元NMRによる構造解析 . . . 101
(横浜市大院総合理1、理研LS2) ○長土居有隆1、花岡慎悟1、酒匂千晶1、長井由木子1、前川利男2、石井俊輔2、西村善文1
- P9 大腸菌Diniタンパク質の立体構造解析 . . . 103
(理研1、東大院理2) ○相原秀樹1,2、伊藤 隆1、横山茂之2、柴田武彦1
- P10 コリシンインヒビタータンパク質の立体構造と分子間相互作用の解析 . . . 104
(東大院農1、理研遺伝生化学2、理研細胞情報伝達3、東大院理4) ○板倉健人1、伊藤 隆2、大野光宏1、木川隆則3、武藤 裕4、柴田武彦2、横山茂之3,4、正木春彦1
- P11 The three-dimensional energy landscape of *Staphylococcal* Nuclease . . . 106
(神戸大院自然科学1、神戸大理2) ○Michael W. Lassalle1、山田博昭2、赤坂一之1
- P12 Highly Ordered Molten GlobuleのNMR解析 . . . 107
(北大院理1、東大院理2、富山医薬大薬3) ○小橋川敬博1、小柴琢己1、出村 誠1、藤谷直樹1、熊木康裕1、引地邦男1、桑島邦博2、河野敬一3、新田勝利1
- P13 アカザライトロポニンCの溶液構造解析 . . . 109
(東大院農生科1、東大生物生産セ2、北大水産3、海洋バイオ研4、海洋生物利用セ5、バリアン6) ○瀧本史明1、永田宏次2、岩崎わかな1、尾島孝男3、西田清義3、足立恭子4、紺野 彩5、根本暢明6、田之倉 優1
- P14 Lysozyme Aggregation and Solution Properties Studied Using PGSE NMR Diffusion Measurements . . . 111
(機能水研) William S. Price、○土屋文彦、荒田洋治
- P15 プリンリプレッサー-DNA結合ドメインの構造変化 . . . 115
(横浜市大院総合理1、電通大2) ○鈴木咲良1、剣持直之1、長土居有隆1、三瓶巖一2、溝淵 潔2、西村善文1
- P16 HoxD9ホメオドメインとHMG1BoxAの複合体 . . . 116
(CREST1、都立大理2、Univ. of Milano3) ○大木進野1、前田美恵1、Monica Beltrame3、Marco E. Bianchi3、甲斐荘正恒1,2

P17	ナトリウムチャンネルの不活性化ゲートとIII-IVリンカー中のIFMモチーフを模倣したオリゴペプチドとの相互作用 (京大薬) 黒田義弘、○前田能崇、宮本和英、中川照眞	・・・	118
P18	<i>Streptomyces Metalloproteinase Inhibitor</i> (SMPI) の活性ループ部位のペプチドの構造と活性 (都立大理 ¹ 、CREST ² 、阪大蛋白研 ³ 、京大工繊大 ⁴) ○Feliciano M.1、Ohki S.2、Gonzalez N.1、Tate S.1、Tamura K.3、Aimoto S.3、Hiraga K.4、Oda K.4、Kainosho M.1,2	・・・	120
P19	レセプター刺激による活性化に伴うG蛋白質 α サブユニットの構造変化 (群馬大工 ¹ 、三菱化学生命研 ²) 中島勝弥 ¹ 、○大塚 敦 ¹ 、千田麻裕子 ¹ 、若松 馨 ¹ 、田中剛史 ² 、須貝真理子 ² 、河野俊之 ²	・・・	123
P20	HMG2 boxBの立体構造およびDNAとの相互作用の解析 (都立大理 ¹ 、東理大基礎工 ²) ○江奈武一郎 ¹ 、楠 真一 ¹ 、吉岡研一 ² 、吉田充輝 ² 、甲斐荘正恒 ¹	・・・	124
P21	マイクロ波温度ジャンプNMR法によるタンパク質フォールディングの研究 (神戸大自然科学) ○川上 勝、赤坂一之	・・・	125
P22	ジストロフィンWWドメインと β -ジストログリカンとの相互作用解析 (東大院農 ¹ 、東大生物生産セ2、国立精神神経セ神経研 ³) ○加藤有介 ¹ 、永田宏次 ² 、野口 悟 ³ 、吉田幹晴 ³ 、小沢鏡二郎 ³ 、田之倉 優 ¹	・・・	126
P23	Ves1-1Sの立体構造解析 (三菱化学生命研 ¹ 、理研遺伝生化学 ²) ○田中剛史 ¹ 、須貝真理子 ¹ 、伊藤 隆 ² 、井ノ口 馨 ¹ 、河野俊之 ¹	・・・	128
P24	ω -conotoxin MVIIIC野生型と改変体の構造比較 (三菱生命研) ○小林邦子、佐々木 亨、佐藤一紀、河野俊之	・・・	130
P25	エラスチンタンパク質のコアセルベーション前後における分子運動性の解析 (名工大工) ○吉水広明、杉浦雅紀、藤原美穂、辻田義治、木下隆利	・・・	132
P26	Ubiquitin Binding Interface Mapping on Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1) by NMR Chemical Shift Perturbation (理研 ¹ 、東京医歯大歯 ² 、三菱化学生命研 ³ 、北里大理 ⁴) ○Sundaresan Rajesh ^{1,2} 、伊藤 隆 ¹ 、坂本泰一 ³ 、岩本真理子 ³ 、小寺義男 ^{3,4} 、土田信夫 ² 、柴田武彦 ¹ 、河野俊之 ³	・・・	133
P27	ヌクレオチドプールの浄化に関する酵素ヒトMTH1の構造解析 (奈良先端大 ¹ 、阪大薬 ² 、九大生体防御研 ³) 伊藤紀幸 ¹ 、○三島正規 ¹ 、池上貴久 ¹ 、山縣ゆり子 ² 、中別府雄作 ³ 、白川昌宏 ¹	・・・	135
P28	骨形成因子I型レセプター細胞外ドメインおよびその変異体の溶液構造 (農水省生物研 ¹ 、阪大薬 ² 、阪大蛋白研 ³) ○八田知久 ^{1,3} 、小西博子 ² 、加藤悦子 ¹ 、京極好正 ³ 、小林祐次 ² 、山崎俊正 ¹	・・・	136
P29	HIV-2 ヌクレオキャプシドタンパク質の構造機能関連の研究 (北里大理 ¹ 、北里大医療衛生 ² 、三菱化学生命研 ³) ○小寺義男 ^{1,3} 、永井美佐 ¹ 、平山幸二 ¹ 、小松博義 ² 、前田忠計 ¹ 、佐藤一紀 ³ 、河野俊之 ³	・・・	138
P30	モデルペプチドを用いたプリオン蛋白質(PrP)タンデムリピートの研究 (北大院理 ¹ 、札医大保 ²) ○吉田 均 ¹ 、熊木康裕 ¹ 、松嶋範男 ² 、引地邦男 ¹ 、中田充夫 ¹	・・・	140
P31	小麦胚芽レクチンと糖鎖との相互作用の解析 (工技院生命研 ¹ 、パリアンテクノロジーズジャパン ²) ○金澤健治 ¹ 、石塚靖子 ¹ 、根本暢明 ² 、根本 直 ¹ 、中西洋志 ¹	・・・	141
P32	Musashi1タンパク質の2つのRNA結合ドメインの構造・運動性・相互作用残基とRNA結合能との関連 (横浜国大工 ¹ 、阪大医 ²) ○小林典典 ¹ 、渡邊道直 ¹ 、菅野玲介 ¹ 、永田 崇 ¹ 、佐伯純一 ¹ 、栗原靖之 ¹ 、今井貴雄 ² 、榊原伸一 ² 、岡野栄之 ² 、上杉晴一 ¹ 、片平正人 ¹	・・・	142
P33	海洋生物ホヤH-抗原活性糖鎖の立体構造研究 (東和大 ¹ 、福山大 ² 、日本電子データム ³ 、日本電子 ⁴ 、広島大 ⁵) ○加藤祐子 ¹ 、太田雅也 ² 、宗像達夫 ¹ 、藤原正子 ³ 、藤井直之 ⁴ 、重田征子 ⁵ 、松浦史登 ²	・・・	144

P34	CystatinA G4V変異体の立体構造と機能 (都立大理1、膏学大理2) ○狩谷英里1、須田真輔1、橋 真一1、梶 裕之1、鮫島達也2、甲斐荘正恒1	・・・	146
P35	システインプロテアーゼ阻害蛋白質CystatinAのP25S変異体の立体構造解析 - α ヘリックスに存在するPro残基の役割について- (都立大理1、膏学大理工2) ○榎葉信久1、橋 真一1、狩谷英里1、須田真輔1、梶 裕之1、 鮫島達也2、甲斐荘正恒1	・・・	148
P36	NMRを用いた触媒抗体の構造生物学的解明 (東大院薬1、生物工研2) ○坂倉正壽1、榎葉信久1、高橋栄夫1、藤井郁雄2、嶋田一夫1	・・・	149
P37	VavのN末端側SH3ドメインは自己のプロリンに富む領域を結合している (都臨床研1、CREST/JUST2、学習院大理3、北大院薬4) ○小椋賢治1、永田宏次1、堀内正隆1,2、 戎井悦子1、瀧澤 隼1,3、豊中秀樹1、稲垣冬彦1,2,4	・・・	151
P38	サイトカインLECT2のリフォールディングとNMRによる高次構造解析 (東大院農生科1、東大生物生産研2、国立感染研生物活性物質部3) ○伊藤三恵1、永田宏次2、加藤有介1、 山越 智3、鈴木利男3、田之倉 優1	・・・	153
P39	分子内水素結合をプローブとしたミオグロビンの高次構造変化の解析 (筑波大化学) ○竹元賢治、山本泰彦	・・・	155
P40	フッ素置換ヘムをもつミオグロビンの ¹⁹ F NMR (筑波大化学1、長岡高専2) ○平井佑紀1、山本泰彦1、鈴木秋弘2	・・・	157
P41	メチル化DNA特異的リプレッサーPCM1のメチル化DNA結合ドメインの立体構造と相互作用 (奈良先端大1、熊本大2) ○大木 出1、下竹敦毅1、藤田直之2、中尾光善2、白川昌宏1	・・・	159
P42	好熱性古細菌由来FKBPの溶液構造 (東大院農1、東大生物生産研1、バリアンジャパン3、海洋バイオテクノロジー研4、積水化学工業水無瀬研5) ○鈴木倫太郎1、永田宏次2、川上 将1、根元輔明3、古谷昌弘4,5、足立恭子4、丸山 正4、田之倉 優1	・・・	160
[溶液応用 (蛋白質・ペプチド以外)]			
P43	液晶NMR法におけるスペクトルの自動解析の試み (北大院理) ○竹内 浩、小中重弘	・・・	161
P44	LC-NMRなどによる化合物の構造解析 (日本電子) ○藤本孝子、内海博明	・・・	163
P45	ビリジニルアソリル-パラジウム錯体のNMR解析 (理研1、奈良先端大2) ○越野広雪1、佐竹彰治2、中田 忠1、鶴澤 洸1	・・・	165
P46	High order spin系の解析について --- J-resolved-HMQC法の応用 (東大院農1、東大分生研2) ○降旗一夫1、瀬戸治男2	・・・	167
P47	Self-Diffusion of Supercooled Water to 238 K Using PGSE NMR Diffusion Measurements (機能水研) William S. Price、○井出博之、荒田洋治	・・・	169
P48	パルスフィールドグラジエントを用いたフッ素核の2次元NMR法 (旭硝子中研) ○笹倉英史、森澤義富	・・・	172
P49	リチウム塩を含む有機電解液の無限希釈付近の自己拡散係数と電気伝導率の研究 (工技院物質研1、ユアサコーポレーション2、機能水研3) 早水紀久子1、○杉本恭子1、相原雄一2、 William. S. Price3	・・・	174
P50	アミノ酸 (L-Leu)-フェナントロリン-混合配位子白金錯体の構造とオリゴDNAとの相互作用 (中央大理工1、東薬大2) ○松木 陽1、神藤平三郎2、佐久間千鶴子2、千嘉良 誠1	・・・	176
P51	取消		

P52	糖鎖置換シクロデキストリンの高磁場NMR法による構造解析 (工科院生命研 ¹ 、東理大基礎工 ² 、武庫川女子大薬 ³)○堤 遊 ^{1,2} 、山垣 亮 ^{1,2} 、石塚靖子 ¹ 、中西洋志 ^{1,2} 、小泉京子 ³	・・・	178
P53	パルスNMRを用いた ¹ H T ₂ 測定による多糖水溶液の水素結合構造の研究 (東水大水)○松川真吾、渡部徳子	・・・	179
[液晶、膜、不均一系]			
P54	液晶NMR法におけるMAS/NMAS C-13 スペクトルの利用 2-ビニルオキシピリジンについて (阪大医 ¹ 、阪大薬 ²)○藤原英明 ¹ 、木村敦臣 ¹ 、Alexander Vashchenko ²	・・・	181
P55	木材中における各種溶媒の ² H-NMRスペクトル (理研 ¹ 、日本女子大 ²)○鶴澤 洵 ¹ 、柴田俊之 ¹ 、南澤明子 ²	・・・	183
P56	OMAS NMRによる液晶の ¹³ C化学シフトの直接的決定法の開発 (京大院理)○西山裕介、久保 厚、寺尾武彦	・・・	185
P57	溶液及びリオトロピック液晶中でのピューロマイシンのコンホメーション解析 (神戸薬大 ¹ 、阪大医 ²)○杉浦真喜子 ¹ 、木村敦臣 ² 、藤原英明 ²	・・・	187
P58	磁場配向酸性生体膜DMPGに結合したメリチンの固体高分解能NMRスペクトル解析 (姫路工大理)○則定和志、内藤 晶、永尾 隆、辻 暁、斉藤 肇	・・・	189
P59	多種核NMRによる高分子電解質中のイオンの拡散と高分子マトリックスの拡散状態の解析 (工科院物質研 ¹ 、ユアサコーポレーション ² 、機能水研 ³)○早水紀久子 ¹ 、相原雄一 ² 、杉本恭子 ¹ 、 W. S. Price ³	・・・	191
P60	³⁹ K-NMR、固体 ¹³ C-および ²³ Na-NMRによるデキストランゲル中のアルカリ金属イオンの存在状態の解析 (東水大水産) 渡部徳子	・・・	192
P61	自発的磁場配向膜を用いた膜結合生理活性ペプチドの高分解能構造解析 (姫路工大理)○内藤 晶、永尾 隆、小畑真紀、辻 暁、斉藤 肇	・・・	194
[計算、シミュレーション、データ処理]			
P62	芳香族アミド化合物のNMR化学シフト値に対する置換基効果 (横浜国大工 ¹ 、横浜国大機器センター ²)○禪 知明 ¹ 、近藤聖子 ¹ 、末澤裕子 ² 、榊原和久 ¹ 、廣田 稔 ¹	・・・	196
P63	核スピン結合定数の理論計算 (北見工大)○馬場雄久、福共宏之	・・・	198
[医用/in vivo NMR, イメージング]			
P64	高磁場(1.0T)永久磁石を用いたMRマイクロスコプの開発 (筑波大学物理工学)○拝師智之、松田善正、植松孝明、巨瀬勝美	・・・	199
P65	ガンマキノウワバとタマナギノウワバの蛹の ¹ H核スピン-格子緩和：低温処理と測定温度の効果 (北海道農試)○金子順一、下川繁三	・・・	201
P66	CP-060Sの虚血時Na overload抑制作用について (北大医 ¹ 、中外製薬富士御殿場研 ² 、テクノサイエンスラボ ³)○福田洋之 ¹ 、鈴木好幸 ² 、 深澤正徳 ² 、黒丸 修 ² 、下川繁三 ³ 、佐久間一郎 ¹ 、北畠 顕 ¹	・・・	202
P67	スピン偏極XeガスのMRI実験 (電総研 ¹ 、産業医大 ² 、秋田脳研 ³ 、阪大医 ⁴)○服部峰之 ¹ 、平賀 隆 ¹ 、守谷哲郎 ¹ 、木下良正 ² 、 飯田秀博 ³ 、木村敦臣 ⁴ 、藤原英明 ⁴	・・・	205
P68	高速型回転座標系イメージング法によるMRI計測 (電総研)○服部峰之、清水秀明、守谷哲郎	・・・	206
P69	超小型ポータブルMRIユニットの開発 (筑波大学物理工学)○巨瀬勝美、拝師智之	・・・	207

P70	取消	
P71	ウニ受精卵の ¹ H-NMRによる経時変化の追跡 (日本女子大理 ¹ 、国立精神神経センター神経研 ² 、生理研 ³) ○高橋征三 ¹ 、横田真希子 ¹ 、 酒井彦一 ¹ 、荻野孝史 ² 、村上政隆 ³	・・・ 209
[固体測定法の開発]		
P72	¹³ C、 ¹⁵ N標識試料の等方化学シフト分解多次元固体高分解能NMR法の開発 (横浜国大工) ○戸所泰人、佐々健太郎、藤原敏道、阿久津秀雄	・・・ 211
P73	ペプチドにおける全ての ψ 角の同時決定を可能にする固体NMR法 (京大院理) ○溝上 潤、竹腰清乃理、寺尾武彦	・・・ 213
P74	重水素NMRによるガラス性結晶ペンタクロロトルエンの乱れた構造の解析 (京大院理) ○市川真史、久保 厚、今城文雄、寺尾武彦	・・・ 215
P75	MAS下での ¹ H-位相反転FSLG照射による ¹³ Cスピン拡散の促進 (京大院理) 竹腰清乃理、○中村新治、寺尾武彦	・・・ 217
P76	固体 ¹³ C-2H-2次元相関MASNMR法による常磁性シフトテンソルの決定 (京大院理) ○伊藤俊樹、久保 厚、寺尾武彦	・・・ 219
P77	高速MAS下における ¹⁵ N- ¹ H/ ¹³ C- ¹ H相関NMR法によるペプチドの ϕ 角決定法の開発 (京大院理) ○今泉孝幸、竹腰清乃理、寺尾武彦	・・・ 221
P78	同位体ラベル絹シーケンスモデル化合物の2次元粉末パターン解析 (東京農工大工) ○中澤靖元、中井利仁、芦田 淳、岩館清雄、大郷耕輔、朝倉哲郎	・・・ 223
P79	¹⁴ N Overtone Recoupling under MAS (京大院理) ○矢野友海、武田和行、竹腰清乃理、寺尾武彦	・・・ 225
P80	Study of dynamic nuclear polarization due to photoexcited triplet states (京大院理) ○武田和行、竹腰清乃理、寺尾武彦	・・・ 227
[固体物性、高分子、固体イメージング]		
P81	Investigating the local structure of [¹⁻¹³ C]Ala labeled silk fibroins of <i>S.c. ricini</i> using solid state NMR (ETH ¹ 、北大院理 ² 、東京農工大工 ³) J.D. van Beek ¹ 、L. Beaulieu ¹ 、○出村 誠 ² 、朝倉哲郎 ³ 、B. H. Meier ¹	・・・ 228
P82	固体 ¹⁹ F{ ¹ H}-CP/MAS NMRを用いた含フッ素高分子の相構造と交差分極のダイナミクス (東工大院理工 ¹ 、ダラム大 ²) ○安藤慎治 ¹ 、Robin K. Harris ² 、Stefan A. Reinsberg ²	・・・ 230
P83	シリカ表面に成長したPEOグラフト鎖の構造と分子運動-NMRとESRによる観測- (名工大) 丸田 睦、山本勝宏、○嶋田繁隆	・・・ 232
P84	² H NMRによる常磁性[Fe(H ₂ O) ₆][SiF ₆]結晶の研究 (金沢大理) ○飯島隆広、水野元博、須原正彦	・・・ 234
P85	² H MAS NMR法による高分子の構造解析 (東工大院 ¹ 、化学技術戦略推進機構 ² 、日本ブルカー ³) ○黒木重樹 ¹ 、小野真之介 ¹ 、安藤 勲 ¹ 、 木村英昭 ² 、山内一夫 ³	・・・ 236
P86	¹⁹ F固体NMRによるバクテリオロドプシンの構造解析(2) (サントリー生有研) ○岩下 孝、関谷紀子、金 鐘文、吉原和雄、石黒正路	・・・ 238
P87	P(VDF/TrFE)/at-PMMAブレンドの相溶性に関する研究. II (北大院工) ○金田嘉次、石井文明、堤 耀広	・・・ 240
P88	α 、 ω -アルカンジオール結晶多形の構造とダイナミクスに関する固体NMR解析 (京大化研 ¹ 、熊本大理 ²) ○桑原和弘 ¹ 、堀井文敏 ¹ 、小川芳弘 ²	・・・ 242

P89	固体高分解能 ¹³ C NMRによるバクテリオロドプシン細胞外側プロトンチャンネル構造の解析 (姫路工大理1、ウェイン州立大2、カリフォルニア大3) ○谷生道一1、辻 暁1、山口 悟1、 河南るり子1、内藤 晶1、Richard Needleman2、Janos K. Lanyi3、斉藤 肇1	244
P90	固体高分解能 ¹³ C NMRによるバクテリオロドプシン膜貫通部位の構造-機能相関の解析 (姫路工大理1、ウェイン州立大2、カリフォルニア大3) ○辻 暁1、河南るり子1、長谷川 潤1、 内藤 晶1、Richard Needleman2、Janos K. Lanyi3、斉藤 肇1	246
P91	固体高分解能NMRによるパパインと複合体を形成した基質類似ペプチドの高次構造および ダイナミクスの解明 (姫路工大理) ○上平美弥、内藤 晶、辻 暁、斉藤 肇	248
P92	固体高分解能 ¹³ C NMRによるバクテリオロドプシンのフォールディングにおける高次構造変化の解析 (姫路工大理1、ウェイン州立大2、カリフォルニア大3) ○山口 悟1、辻 暁1、内藤 晶1、 Richard Needleman2、Janos K. Lanyi3、斉藤 肇1	250
P93	高圧 ¹²⁹ Xe NMRによる高分子の自由体積の研究 (阪大院理1、帝人2、神戸薬科大3、東大原総セ4) ○永阪文憲1,2、江口太郎1、中山尋量3、 中村巨男1、伊藤泰男4	252
P94	選択的スピン拡散NMR法による高分子の局所構造解析 (京大化研) ○増田憲二、堀井文敬	254
P95	¹³ C-NMRによるgellan gum水溶液のゾルゲル転移に関する研究 (北大院工) ○泉川大輔、平沖敏文、堤 耀広	256
P96	優先富化現象を示す化合物の固体NMRによる結晶構造の比較 (理研1、京都院人間環境2) ○高橋弘樹1、仲村高志1、田村 類2、鶴澤 淳1	258
P97	¹³ C化学シフト分解 ¹ H-NMR 2次元モーメントイメージング (筑波大学物工) ○野中正幸、松井 茂、井上多門	260
P98	¹ H- ¹³ C 2次元NMRによるシルクフィブロインモデルペプチド[Ala-Gly] ₁₂ の固体構造解析 (群馬大工1、日本電子2) ○岸 哲史1、木村英昭1、尾崎拓男1、杉沢寿志2、出口健三2、荘司 顯1	262
P99	固体重水素NMRによるポリペプチド主鎖のダイナミクス (北大院工) ○森越信之、窪田俊介、平沖敏文、堤 耀広	264
P100	P(VDF/TrFE)/at-PMMAブレンドの相分離と ¹ H- ¹³ C交差緩和、II (北大院工) ○越 大亮、石井文明、堤 耀広	266
[固体化学におけるNMR]		
P101	Euドーパ-Y ₂ O ₂ Sで、最近接YにEuが置換された ⁸⁹ Yシグナルの帰属 (三菱化学横浜総合研1、化成オプトニクス2、東京水産大3) ○原園としえ1、安達隆二2、渡辺徳子3	268
P102	メソポーラスマテリアル FSM-16 の細孔構造の解析 (工科院物質研) Xiulan Xie、○林 繁信	272
P103	抗癌薬ジフェニルヒダントイン結晶におけるフェニル基の動的挙動と水素結合ネットワーク (群馬大工) 横山貴司、○武田 定、丸田悟朗	276
P104	水溶性チタンオキシカルボン酸錯体の ¹³ C-NMRによる評価および複合酸化物合成への展開 (東工大応セラ研1、東工大資源研2) ○多田 大1、垣花真人1、中村義之2	277
P105	REDOR法による同位体ラベル縮シークェンズモデル化合物の分子間配置の決定 (東京農工大工) ○龜田恒徳、中井利仁、数原順子、小松耕平、中澤靖元、朝倉哲郎	279
P106	Valinomycin結晶の ¹³ C 化学シフトテンソルに関する研究 (東京農工大工1、ユタ大2) ○龜田恒徳1、McGeorge Gary2、Anita M. Orendt2、David M. Grant2	280

P107	11B-MQMAS-NMRによるホウ素化合物の構造解析 (新日本製鉄1、日本電子2) ○金橋康二1、齋藤公児1、杉沢寿志2	・・・	282
P108	NMR緩和時間によって測定される非晶質医薬品の運動性と結晶化速度の関係 (国立衛研) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄	・・・	284
P109	¹ H, ¹¹ B, ¹³ C, ²⁹ Si NMR法による熱硬化性樹脂カルボラン複合含ケイ素ポリマーの 熱硬化メカニズムの解析 (化学技術戦略推進機構1、積水化学工業2) ○木村英昭1、沖田晃一1、一谷基邦2、米沢光治2、杉本俊哉2	・・・	286

[ハードウェア]

P110	高温イメージングプローブ (日本電子1、新日鐵先端研2) ○山腰良晃1、長谷川憲一1、齋藤公児2	・・・	288
P111	超臨界流体用NMRサンプルチューブの開発 (日本電子) ○江口剛史、杉沢寿志、櫻井智司	・・・	290
P112	化合物半導体を用いた高感度前置増幅器の超高磁場への応用 (日本電子) ○末松浩人、国府田 明、栗原範明	・・・	292
P113	ロックチャンネルを利用したFG-shimming (日本電子) ○氣田佳喜、藤井直之	・・・	294
P114	乾燥空気を用いた固体NMRにおける長時間低温測定を試み (バリアンテクノロジーズジャパン) ○芦田 淳、串田克彦	・・・	296
P115	MAS用空気軸受の改良 (日本電子) 樋岡克哉	・・・	298
P116	固体用パルス磁場勾配NMR装置の試作と固体材料測定への応用 (大阪工研) 赤井智子	・・・	299

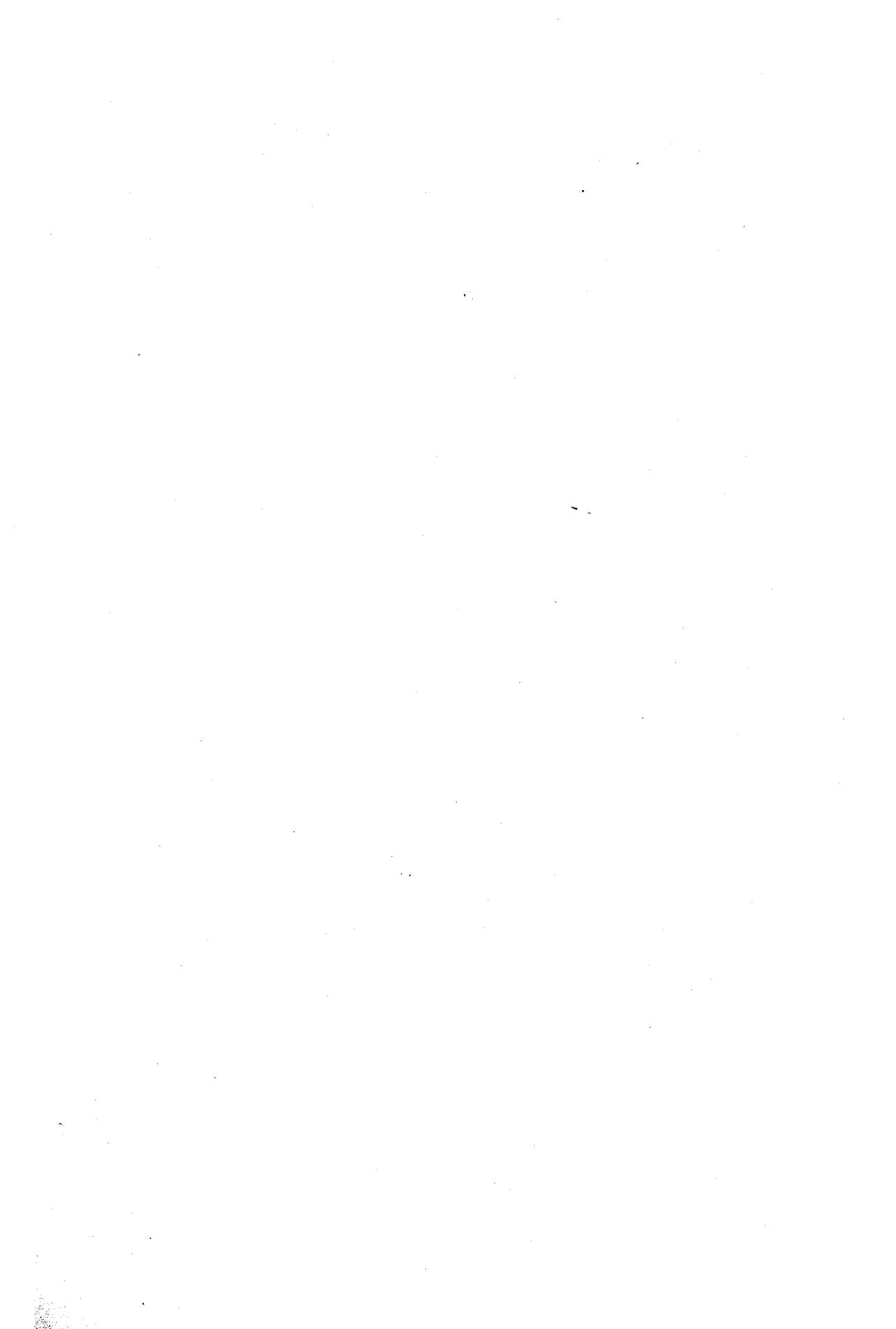
[その他]

P117	コンビナトリアル合成における高分解能MAS溶液プローブの応用 (東レリサーチセンター) ○川口 謙、木村一雄、三重堀茂樹、丸山季浩	・・・	301
P118	ホワイトノイズ解析によるNMRの感度向上法 (神奈川大学1、大工研2) ○藤原鎮男1、福見俊夫2	・・・	302

付録

キーワード索引	・・・	307
著者索引	・・・	311
参加者名簿	・・・	315

第1日 10月13日(水)



Artifacts in TROSY Spectrum and its EliminationChojiro Kojima¹ and Masatsune Kainosho^{1,2}¹CREST, JST and ²Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

Abstract In ¹H-¹⁵N TROSY experiments of proteins and nucleic acids, positive and negative multiplet components have been observed as artifacts in ¹H and ¹⁵N dimension, respectively. Simple product operator calculation indicated the shortening of second coherence transfer delay time (τ_2 in Figure 1) which is next to t_1 period was useful to suppress this artifact. In fact the artifacts in TROSY spectra were suppressed by shortening the delay time in three systems, one DNA (8kDa) and two proteins (11kDa and 17kDa) (Figure 2). Though the shortening of the delay time attenuated both target and artifact signals, this technique will help the quantitative analysis of the TROSY spectrum.

TROSY法は本質的にはデカップルを行わないHSQC法であり、4つに分裂したピークの中で最も鋭い信号1つだけを観測する。この選択は信号の重なりを減少させるために必須であるが、技術的にはまだ不完全であり、目的ピークの t_1 軸側や t_2 軸側に残存ピークが現れる。このArtifactの原因にはCSA項とプロトン-プロトンの双極子項が考えられるが、今回600MHzと800MHzの二つの磁場を用いる事で、主にプロトン-プロトン双極子項に由来する事が確認された。直積演算子による計算からこのArtifactの消去がTROSYパルスの2番目の磁化移動時間 (Figure1、 τ_2) を短くする事で可能である事に気づき、分子量8千のDNAと分子量1万1千および1万7千のタンパク質に適用した。サンプルや測定温度の違いによって時間 τ_2 を調整する必要があったが、試みた全ての系でこの方法が有効であり、実際にArtifactのないTROSYスペクトルが得られる事が確認された (Figure 2)。

溶液高磁場NMR、TROSY、¹H-¹⁵N HSQC、Artifactの消去、タンパク質核酸

こじまちょうじろう、かいのしょうまさつね

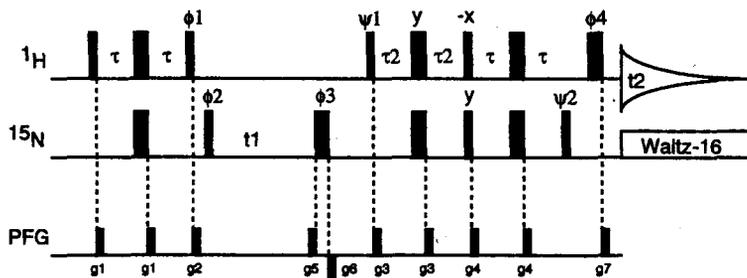


Figure 1. Pulse sequence of sensitivity- and gradient-enhanced TROSY. Thin and thick pulses are 90° and 180° pulses, respectively. Pulse phases are x unless indicated otherwise. P- and N-type signals are selected with sign inversion of PFGs $g5/g6$ and phases $\psi1/\psi2$. For States-TPPI mode detection sign inversion of the following is required: pulse phase $\phi2$, receiver phase, and PFGs $g5/g6$. Phase cycle: $\phi1 = 8(x), 8(-x)$; $\phi2 = 4(x), 4(-x)$; $\phi3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi4 = x, -x$; $\psi1 = y$; $\psi2 = x$; receiver = $4(x), 8(-x), 4(x)$. Delay: $\tau = 1/(4^1 J_{NH})$; $\tau2 \leq 1/(4^1 J_{NH})$. $\tau2$ is the delay time to be optimized for the artifacts elimination.

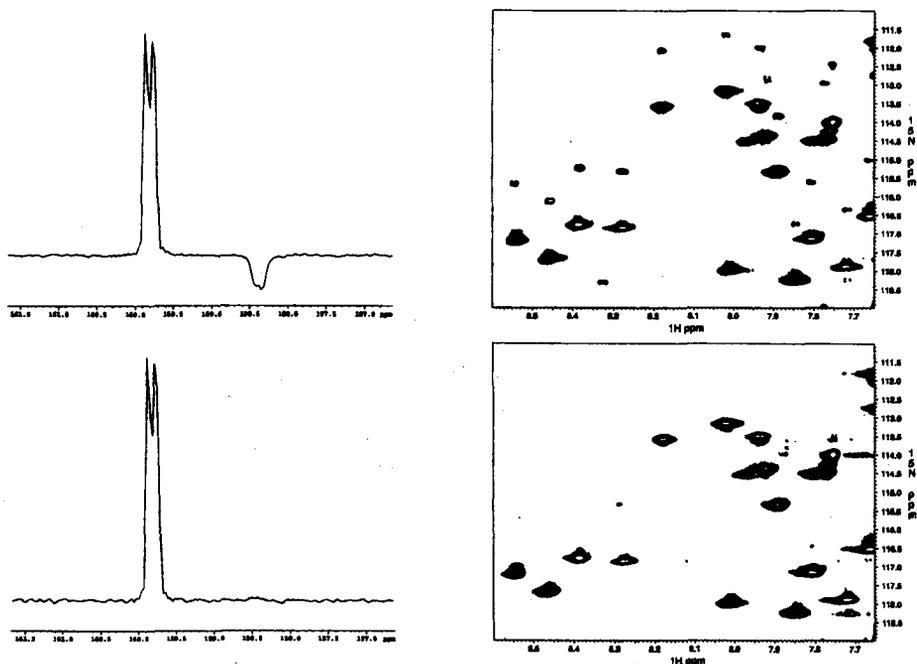


Figure 2. (left) 1D slices of thymine imino ^{15}N from TROSY spectrum of 8kDa ^{15}N labeled DNA. Conventional (bottom) and artifact eliminated (top) TROSY, $\tau2 = \tau$ and $\tau2 = 1.15$ ms, respectively. Negative peak is the artifact and small splitting ~ 7 Hz is due to ^{15}N - ^{15}N J-coupling through H-bond. (right) a part of TROSY spectrum of 11kDa ^{15}N labeled protein. Conventional (bottom) and artifact eliminated (top) TROSY, $\tau2 = \tau$ and $\tau2 = 1.65$ ms, respectively.

二次元高圧NMRによる蛋白質の圧力変性中間体の構造

(神大院・自然科学1、神大・理2、レーゲンスブルク大3、
マックス・プランク研究所4、スクリプス研究所5)
○井上匡子1、北原 亮1、山田博昭2、赤坂一之1、
Peter Wright5、Christian Herrmann4、
Werner Kremer3、Till Maurer3、Hans Robert Kalbitzer3

**Intermediate structure of pressure induced unfolding in protein
by two dimensional NMR spectroscopy**

(1The Graduate School of Science and Technology and 2Faculty of Science, Kobe
University; 3Institute for Biophysics and Physical Biochemistry, University of
Regensburg; 4Max-Planck-Institute for Molecular Physiology;
5Scripps Research Institute)

○Kyoko Inoue1, Ryo Kitahara1, Hiroaki Yamada2, Kazuyuki Akasaka1,
Peter Wright5, Christian Herrmann4,
Werner Kremer3, Till Maurer3, Hans Robert Kalbitzer3

Abstract:

The study of the Ras-binding domain of the Ras guanine-nucleotide exchange factor (RalGEF-RBD) in 95%¹H₂O solution using the high resolution and high pressure NMR method showed the presence of a unique equilibrium unfolding intermediate. At around 1000bar, the peak volume intensities of some amino acid residues in the ¹H/¹⁵N HSQC spectrum were decreased and new peak is appeared in the "random-coil" region. This was identified with a locally denatured intermediate folding species of the protein, due to selective hydration of the protein in regions rich with hydrophobic "cavities". It is likely that the selective hydration is a general first step for pressure denaturation in proteins, as similar phenomenon has been found in apomyoglobin and other proteins.

序論:

蛋白質は溶液中で天然構造と変性構造の間で平衡が成り立っているが、圧力はこの平衡を支配する熱力学因子の一つである。本研究で用いられた高分解能高圧NMR法は、溶液中の蛋白質への圧力効果を各原子サイトレベルで検出できる唯一の方法である。当研究室で開発されたオンライン高圧セル¹⁾と高磁場NMR (Bruker750MHz) の組み合わせにより任意の圧力下 (1-3500bar) で任意のパルスシーケンスによる測定が可能となった。これまで、我々はこの方法を用い、圧力による蛋白質立体構造変化の詳細を研究、報告してきた^{2,3,4,5)}。今回、¹⁵N標識をしたRas binding domain of Ras guanine-nucleotide exchange factor (RalGEF-RBD, 87残基)⁶⁾ に対する圧力効果を研究したところ、高圧下で部分的構造変化を持つ変性中間体を取ることが解った。同様の現象はアポミオグロビンでも発見された。このような局所的な三次構造の変化が蛋白質分子全体の個々の残基で検出されたのは初めてである。この変性構造のNMR信号を解析し、観察された局所的な変性構造について考察する。

実験

¹⁵N ラベルされた試料の¹⁵N/¹H HSQCスペクトルを30bar から 2000bar まで段階的に加圧し、測定した。2000bar での測定後圧力を30bar とし、再測定を行うことで系の可逆性を確認した。

キーワード：高圧NMR、タンパク質、圧力変性、変性構造、RalGEF

いのうえきょうこ、きたはらりょう、やまだひろあき、あかさかかずゆき、ピーター ライト、クリスチャン ヘルマン、ウェルナー クレマー、ティル モウラー、ハンス・ロバート カルピッツァー

結果及び考察

RalGEF-RBDでは、1000barを越えたところから天然構造由来のアミノ酸残基の信号強度が選択的に減少し始め、同時に変成構造を示す領域に新しいピークが現れた。更に高圧では、新たらしいピークの信号強度は増加し、天然構造由来の信号は一部消失した。また、2000barでは全体的に天然構造由来の信号強度は減少した。しかし、化学シフト値及び体積積分より、この変性は可逆的に進行していることがわかった。アポミオグロビンでも同様に加圧と共にシグナル強度の減少が認められ、更に、2000barでは変性状態へ転移していた。しかし、アポミオグロビンでは可逆性は低く、2000barでは不可逆変性であった。各々の蛋白質における信号強度変化の大きい残基を、溶液中、一気圧で決められた三次元構造上にマッピングすると、RalGEF-RBDでは主に三箇所のループ上に、アポミオグロビンではB-Helix後半からCD-loop、G、H-Helix部位に集中していた。これらの部位はそれぞれ、緩和時間 (T_2) の特に長い残基とヘムポケット周辺部位に良い一致を見せている。

このような圧力による蛋白質の局所的三次構造変化がどのような機構で生じているのかを考察した。最近、高圧下では水分子が、蛋白質疎水内部に進入する方がエネルギー的に安定化するという計算結果が報告された⁷⁾。もし、このように水分子が蛋白質内部の特定部位に進入するならばRalGEF-RBDのHSQCスペクトル中で部分的に化学シフトの変化が大きいことを説明できるかもしれない。

蛋白質の疎水性コアに溶媒の水分子が進入した結果局所的な変性が起こり、さらに圧力を加えていくと蛋白質全体の変性が進むと考えられる。RalGEF-RBDでは変化の大きい残基の近くにキャビティが存在し、また分子内の局所的な運動性の高い部分と一致することから、水分子のキャビティへの侵入が十分に考えられる。アポミオグロビンでは加圧とともにシグナルの消失した部位の多くは疎水性残基であり、部位特異的な構造崩壊の初期段階は疎水部分で生じることが分かった。アポミオグロビンのヘムポケットは周辺残基による再配向が起きるが、不完全パッキング等が生じ水分子の侵入を可能にするのではないかと考えられる。

RalGEF-RBDのHSQCスペクトル上で見られた天然構造由来の信号とそうでないものはNMRの時間尺度でslow exchangeである。つまり、1000barでは少なくとも天然構造を持つものと局部変性した構造とが平衡状態にある。また、2000barで信号強度の減少(約25%)が天然構造由来の信号全体にも認められるということは、蛋白質全体が変性した構造も生じていると考えられる。従って、加圧にともない、天然構造—局部変性構造—全体が変性した構造へと推移すると考えられる。この現象は可逆であることから、今後、本高圧NMR法により、蛋白質立体構造形成機構のより詳細な研究が可能になると思われる。

References

- 1) Yamada, H., *NMR Basic Principles and Progress* 24, 232-263 (1990).
- 2) Akasaka, K., Tezuka, T. & Yamada, H., *J. Mol. Biol.* 271, 671-678 (1997).
- 3) Li, H., Yamada, H. & Akasaka, K., *Biochemistry* 5, 1167-1173 (1998).
- 4) Inoue, K., Yamada, H., Imoto, T. & Akasaka, K., *J. Biomol. NMR* 12, 535-541 (1998).
- 5) Akasaka, K., Li, H., Yamada, H., Li, R., Thoresen, T. & Woodward, C., *Protein Science*, in press (1999).
- 6) Geyer, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Wittinghofer, A. & Kalbitzer, H. R., *Nature Struct. Biol.* 4, 694-699 (1997).
- 7) Hummer, G., Garde, S., Garcia, A. E., Paulaitis, M. E. & Pratt, L. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1552-1555 (1998).

塩基修飾を受けたDNAを認識する蛋白質の立体構造解析

三島正規¹、伊藤紀幸¹、大木出¹、池上貴久¹、秋山昌広¹、真木寿治¹、中別府雄作²、○白川昌宏¹(¹奈良先端大・バイオ、²九大・生医研、科技団・CREST)

NMR studies of proteins that recognize modified bases in DNA

Masaki MISHIMA¹, Noriyuki ITO¹, Izuru OHKI¹, Takahisa IKEGAMI¹, Masahiro AKIYAMA¹, Hisaji MAKI¹, Yusaku NAKABEPPU², ○Masahiro SHIRAKAWA¹ (School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, and ² Med. Inst. of Bioreg., Kyushu Univ. & CREST)

DNA in living cells contains many base modifications. Some of them are functional and regulatory, e.g. those caused by site specific DNA methylation. On the other hand, ultraviolet irradiation, reactive oxygen and other chemical agents produce a broad spectrum of structurally unrelated base modifications, i.e. base damages. These damages are potentially mutagenic or lethal to cells, and thus usually eliminated through DNA repair processes. We have studied two enzymes that are responsible for repair of oxidative base damages, human MTH1 (hMutT) and *Bacillus subtilis* MutM by multi-dimensional, heteronuclear NMR spectroscopy. Interestingly, the secondary structure topology of hMTH1 is similar to that of *E. coli* MutT, despite their low sequence similarity. Advantages of NMR techniques that were recently introduced and were employed in the present study, such as protein deuteration, TROSY, detection of hydrogen bonds using coupling constants ($^3J_{NC}$) and structure refinements using residual dipolar couplings, will also be discussed.

● DNA塩基の化学修飾

生体中のDNAの塩基はさまざまな化学修飾を受けている。それらの化学修飾は機能の上から2つに大別できる：細胞内の特定の酵素の働きで受ける機能的あるいは調整的な化学修飾と、紫外線や様々な化学物質によってもたらされる塩基損傷である。

機能的な塩基修飾の代表として塩基のメチル化をあげることができる。原核生物では塩基は様々なメチル転移酵素によりメチル化を受け、ファージ等からの感染制限の獲得、ミスマッチ修復機構における新生鎖認識の役割を担う。一方、高等真核生物ではCpG配列におけるシトシン塩基5位のメチル化が唯一の塩基修飾である。このCpGメチル化は転写抑制、クロマチン構造変化など多くの細胞内の調整機能を担う。

一方、損傷としての塩基修飾は紫外線による塩基の開裂、重合などの大きな化学構造変化から、アルキル化剤や活性酸素等の化学物質による塩基のメチル化、酸化などの局所的な化学変化など多種多様なものを含む。こういったDNAの化学構造の変化はしばしば複製などの過程を経て変異として固定化し、細胞死や発癌などを引き起こす。通常、生物はこういったDNA上の損傷をDNA修復と呼ばれる機構によって取り除く。

key words: DNA repair, 8-oxo-dGTP, CpG Methylation, TROSY, Hydrogen Bond

みしま まさき、いとう のりゆき、おおき いずる、いけがみ たかひさ、あきやま まさひろ、まき ひさじ、なかべつぷ ゆうさく、しらかわ まさひろ

● 塩基の酸化損傷

様々な塩基損傷のうち、蛋白質によるDNAの分子認識といった観点から、我々が特に興味を持ったのは、最も微細な損傷である酸化である。塩基の酸化は好氣的呼吸や紫外線照射によって生体膜などから発生した酸素ラジカルが塩基を攻撃することによって起こる。酸化損傷、特にミトコンドリアDNAにおけるものは、加齢とともに蓄積し老化現象の一因となっていると考えられている。酸化損傷のうち特に重要なのはデオキシグアニンの8位が酸化された8-oxodG (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine)である。これはシトシンだけでなくアデニンとも塩基対を形成するため、DNA鎖中に取りこまれるとG:C→T:Aトランスポージョン型塩基置換変異を起こし、強力な変異源となる。

MutT、MutM蛋白質は8-oxodG型酸化損傷による遺伝子の変異を抑制する酵素である。MutT蛋白質はヌクレオチドプール中に生成した8-oxodGTPを特異的に加水分解し、8-oxodGMPとすることにより、8-oxodGのDNA鎖中への取り込みを抑制している。一方MutM蛋白質は、DNA鎖中に取り込まれシトシンと塩基対を形成した8-oxodGを特異的に認識し、N-グリコシド結合と3'、5'位のホスホジエステル結合を切断することにより、8-oxodGをDNA鎖中から除去する。我々は酸化塩基の認識機構、修復機構を明らかにすることを目的として、MutTのヒトホモログであるhMTH1 (156残基)と枯草菌MutM (276残基)のNMRによる解析を行った。

● hMTH1

hMTH1については、 ^{15}N ラベル体、 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ラベル体、 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$ ラベル体を利用した3D CBCA(CO)NH、CBCANH、HN(CA)CO、HNCO、3D HCCH-TOCSY、C(CO)NH、H(CCO)NH、 ^{15}N -TOCSY HSQC、及び4D HC(CO)NHスペクトルを測定した。これらの解析により現在までに主鎖及び側鎖の帰属をほぼ完了した。帰属を基に化学シフト・インデクス法により2次構造推定を行った。その結果、hMTH1は2つの α ヘリックスと7本ストランドからなる β シートを持つことが判った。これは同様の活性を持つ大腸菌Mut Tタンパク質の2次構造トポロジーとほぼ同じである。両者のアミノ酸配列の相同性が17%と低いことを考えると、この立体構造の類似性は興味深い。中別府らによってhMTH1には熱安定性の低いV83M変異体が約25%のヒトで見つかっているが、構造解析の結果、V83はストランド内に位置しており、構造安定性への寄与が示唆された。おそらくこの残基のVal→Met置換によって、 β シート部の安定性が損なわれるのであろう。

● MutM

MutMはNMR濃度では容易に凝集体を形成し、NMR測定に適した条件では十分な溶解度を示さなかった。そこでAP-siteを含む17merのDNAと複合体を形成させることでNMR測定可能な条件(pH 6.8 50 mM K-phosphate, 1.4 mM MutM-DNA, 303 K)を設定することができた。MutM-DNA複合体は分子量40kDaで、 ^{15}N 核に関する予備的な緩和実験から推定した回転相関時間は約20 nsであった。重水素化した蛋白質を用いて、主鎖の連鎖帰属のための各種三次元測定を行った。3D HNCA、3D HN(CO)CA、3D HN(CA)CB、3D HNCO、3D HN(CA)CO、3D ^{15}N NOESY-HSQC、4D HN(CA)NH実験から部分的に連鎖帰属をすることができた。従来のINEPTタイプのHN(CA)CO実験では、十分な感度が得られず、実質上帰属には有用でなかったが、TROSY-HN(CA)COでは顕著な感度の上昇が得られ、ほとんどの全てのカルボニル基のシグナルを観測することができた。

本討論会では、これら2つのDNA修復酵素に加えて、CpGメチル化に結合して転写制御を行うメチル化DNA結合ドメインの構造解析の結果を報告する予定である。特に解析の際に用いた手法—蛋白質の重水素ラベルとTROSY法、水素結合を介した $^3\text{h}J_{\text{NC}}$ 結合定数による水素結合の同定、残余双極子-双極子相互作用の測定など—を中心に議論したい。

1L4 hU2AF⁶⁵の2つのRNA結合ドメインの立体構造解析

(東大・院理・生化¹, University of Massachusetts Medical Center²)
○伊藤拓宏¹, 武藤裕¹, Michael R. Green², 横山茂之¹

Structural analysis of two RNA-binding domains of hU2AF⁶⁵

(Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science,
The University of Tokyo¹, University of Massachusetts Medical Center²)
Takuhiro Ito¹, Yutaka Muto¹, Michael R. Green², and Shigeyuki Yokoyama¹

The large subunit of the human U2 snRNP auxiliary factor (hU2AF⁶⁵) is an essential splicing factor required for binding to the polypyrimidine tract immediately upstream of the 3' splice site. We determined the solution structures of the first and second RNA-binding domains (RBD1 and RBD2, respectively), by NMR. The tertiary structure of the RBD2 is similar to those of typical RBDs. In contrast, the RBD1 structure has unique features: the loop between $\alpha 1$ and $\beta 2$ (the $\alpha 1/\beta 2$ loop) is much longer and has a defined conformation. Chemical shift perturbation experiments showed that the U2AF-binding RNA fragments interact with the four β -strands of RBD2, whereas, they interact with $\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 4$, but not with $\beta 2$ or the $\alpha 1/\beta 2$ loop, of RBD1. The characteristic $\alpha 1$ - $\beta 2$ structure of the hU2AF⁶⁵ RBD1 may interact with other proteins, such as UAP56.

【序論】

スプライシング反応に必須の蛋白質であるhU2AF⁶⁵は、反応の初期にpre-mRNAの3'スプライス部位近傍に存在するポリピリミジン塩基に富む配列に結合し、スプライソソーム形成の核となる。hU2AF⁶⁵はRNA結合ドメイン(RBD)を3つ連続して持っており、これらが協調して一本鎖RNAを認識していると考えられている。本研究では1番目と2番目のRBD(RBD1, RBD2)の立体構造をNMR法により決定し、hU2AF⁶⁵の標的RNAとの相互作用を調べた。

【方法】

大腸菌による大量発現系を用いて、非標識と¹⁵N標識のRBD1とRBD2を調製した。測定条件は、100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5 (RBD1)あるいはpH 6.5 (RBD2))中で、温度は298Kであり、装置はBruker社のDRX600及びDMX500を用いた。2D NOESY, 2D TOCSY, 2D DQF-COSY, 2D ¹H-¹⁵N HSQC, 3D ¹⁵N-edited TOCSY-HSQC, 3D ¹⁵N-edited NOESY-HSQCを用いて、主鎖および側鎖の帰属を行った。NOEによる距離情報は2D NOESYと3D ¹⁵N-edited NOESY-HSQCを用いた。3D HNHA及びshort-mixingの2D TOCSY, 2D NOESY及び、2D ROESYから、二面角の情報を収集した。立体構造はX-PLOR 3.1を用いて、968個(RBD1)あるいは1131個(RBD2)の距離情報と、78個(RBD1)あるいは80個(RBD2)の二面角情報を基に、simulated annealing法により決定した。また、chemical shift perturbationの実験は、0.8mMのRBDに対して、モル比1:1から1:1まで、0.2刻みでRNAを加え、各段階で2D ¹H-¹⁵N HSQCを測定した。

【結果と考察】

Fig.に示した20個の構造は、収束の良い領域の主鎖のr.m.s.d.が0.36Å (RBD1)及び0.33Å (RBD2)であり、側鎖を含めると0.87Å (RBD1)及び0.68Å (RBD2)であった。RBD2は $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ という典型的なRBDの構造であった一方、RBD1は $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ の構造はとりつつも、非常に特徴的な構造であった。すなわち、RBD1の $\alpha 1$ ヘリックスは通常のRBDよりC末側

スプライシング、立体構造、RNA、RNA結合タンパク質、RNA結合ドメイン

いとう たくひろ, むとう ゆたか, Micael R. Green, よこやま しげゆき

に1ターン長く、更に $\alpha 1/\beta 2$ ループは12残基と長く、 β シートの裏側に突きだした構造をしていた。逆に $\beta 2/\beta 3$ ループは4残基と非常に短く、 $\alpha 2$ ヘリックスも他のRBDより短かった。RBD1及びRBD2は他種のU2AFでもアミノ酸配列の保存性が高いため、他種においてもhumanと同様の立体構造をとっていると考えられる。

2種類のピリミジン塩基に富むU2AFの標的RNA ($U_5C_3U_5, ACUCU_4CACAUAG$) と、ポリA (A_{15}) を用いて、chemical shift perturbationの実験を行ったところ、RBD1とRBD2の両ドメインともに、標的RNAに特異的に結合した。しかしながら、RBD2が4つの全ての β ストランドでRNAを認識している一方で、RBD1は主に $\beta 1, \beta 3,$ 及び $\beta 4$ ストランドでRNAを認識しており、 $\beta 2$ ストランドや特徴的な $\alpha 1/\beta 2$ ループはRNAの認識に関与していなかった。これらはRBD1とRBD2両者のRNA認識機構が部分的に異なることを示している。

これらの結果より、RBD1の $\alpha 1/\beta 2$ ループ周辺の領域は、スプライシング反応においてRNA結合とは異なる機能、すなわち蛋白質相互作用などに関与していると考えられる。現在までの生化学的な解析より、UAP56というDEAD-box蛋白質が標的である可能性が挙げられるため、今後検証を進めていきたい。

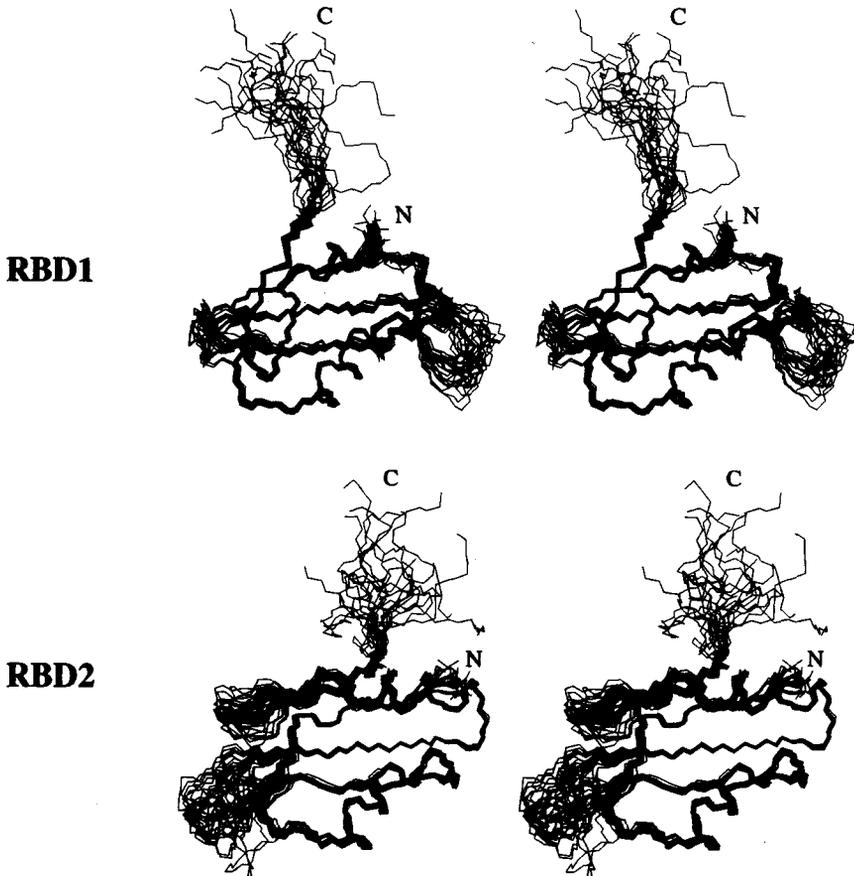


Figure. The solution structures of the hU2AF⁶⁵ RBD1 and RBD2. The 20 backbone structures are shown in stereoviews.

線虫由来抗菌ペプチド ASABF の立体構造解析

(北大院・理¹、農水省・蚕糸昆虫研²、富山医薬大・薬³)○相沢智康¹、田谷内政人¹、鈴木政人¹、星野宏和¹、藤谷直樹¹、小金沢望¹、松浦篤志¹、宮澤光博²、加藤祐輔²、熊木康裕¹、出村誠¹、河野敬一³、引地邦男¹、新田勝利¹**Structural analysis of ASABF, antimicrobial peptide from a nematode, *Ascaris suum***Tomoyasu Aizawa¹, Masato Tayauchi¹, Masahito Suzuki¹, Hirokazu Hoshino¹, Naoki Fujitani¹, Nozomi Koganesawa¹, Atsushi Matsuura¹, Mituhiro Miyazawa², Yuusuke Kato², Yasuhiro Kumaki¹, Makoto Demura¹, Keiichi Kawano³, Kunio Hikichi¹, and Katsutoshi Nitta¹¹Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, ²National Institute of Sericultural and Entomological Science, ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University

Structural studies of ASABF, antimicrobial peptide consisting of 71 residues and containing 4 intramolecular disulfide bridges derived from the body fluid of the nematode *Ascaris suum* have been performed using two-dimensional proton nuclear magnetic resonance. By use of the combination of two dimensional NMR techniques, the proton resonances of 65 residues except for the C-terminal region (66-71) were assigned. The elements of the secondary structure of ASABF, one α -helix and two β -strands with an antiparallel β -sheet, were deduced from the pattern of NOE connectivities, the H-D exchange study and the values of J coupling constants. Based on this solution structure, ASABF is likely to be categorized into insect defensin family with Cysteine-Stabilized $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) motif.

多細胞生物に由来する抗菌ペプチドは、昆虫を主とする節足動物、脊椎動物、植物などにおいて、幅広く存在することが知られている。このうち、記憶免疫システムを持たない、無脊椎動物の生体防御機構においては、レクチンや抗菌ペプチドなどが主要な役割を担っていると考えられており、これらの解明は生物が進化する過程でどのように生体防御機構を獲得してきたか知る上でも興味深い。また、これらの因子は哺乳動物にも、生体防御の基本的メカニズムとして備わっており、初期防御の中で重要な役割を持つため、臨床的にも注目され始めている。興味深いことに、進化的に大きく離れた生物に見いだされ、活性も異なる抗菌ペプチドにおいて、立体構造上の類似点をもつものがあることが知られており、その構造と機能の関係が注目されている。

このような背景をもとに、我々は進化の過程でかなり初期に昆虫や脊椎動物から分岐したと考えられる線虫をターゲットとして、生体防御機構について解析し、これらの分子の立体構造と機

キーワード：NMR、立体構造、抗菌ペプチド

あいざわともやす、たやうちまさと、すずきまさひと、ほしのひろかず、ふじたになおき、こがねさわのぞみ、まつうらあつし、みやざわみつひろ、かとうゆうすけ、くまきやすひろ、でむらまこと、かわのけいいち、ひきちくにお、につたかつとし

能の進化についての解明を試みている。さらに、線虫はモデル生物としても注目されているが、この生体防御機構についてはほとんど研究が進んでおらず、この意味でも重要な意味を持つ。本研究では、線虫 *Ascaris suum* から新規に単離された抗菌ペプチド、ASABF について、その溶液中での立体構造を ^1H 二次元 NMR 法を用いて解析したので報告する。

ASABF は、全長 71 残基からなるペプチドでそのアミノ酸配列 (Fig.) 及び cDNA 配列が解析されている。8 個のシステインはすべてジスルフィド結合を作っていることが判明しているが、その結合様式は化学的には決定されていない。また、昆虫由来の抗菌ペプチドである insect defensin とある程度の一次配列上の相同性があり、ASABF も Cys32、Cys51 を除けば、insect defensin ファミリーに見られる、C...CXXXC...C...CXC の配列を保存している。しかしながら、insect defensin のジスルフィド結合は 3 組で数が異なること、多くの insect defensin は、40 残基程度で ASABF と比較してかなり小さいことなどから、その分類は決定されていなかった。

実験はまず、メタノール代謝酵母 *P. pastoris* を用い、ASABF を酵母菌体外に分泌する発現系を構築する事より開始した。通常の培養では発現量が上がらなかったが、培養槽を用い、菌体濃度を高濃度にする事により、培地 1 リットルあたり数十 mg の ASABF を発現することに成功した。この試料は活性測定の結果、天然の ASABF と同様の活性を持つこと、CD 測定の結果から、熱や酸性条件下でも立体構造を維持していることが解った。さらに、立体構造について検討するため、NMR 測定をおこなった。試料は、重水及び軽水中に約 2.5mM の濃度で溶解し、pH を 5.0 に調整し ^1H NMR 測定をおこなった。装置は、日本電子社製 JMN- α 500 及び α 600 を用い、DQF-COSY、TOCSY、NOESY スペクトルを数点の温度で測定し、シグナルの帰属をおこなった。Ala1 から Lys65 について連鎖帰属が完了したが、C 末端側の残基については、いくつかのプロリンが、シストランスの異性型をとっていることなどから、複数の信号が観測されていると考えられ完全な帰属はできていない。凍結乾燥後の試料を重水に溶解して、アミド交換速度の遅い残基を同定し、帰属結果から得た NOE 情報、スピン結合情報とあわせて、二次構造を同定した結果、N 末端側に α ヘリックスが、C 末端側に逆平行 β シートが同定された。さらに、これらの二次構造を持つ残基の位置は、insect defensin ファミリーと相同性が高かった。X-PLOR による構造計算の結果からも、Cysteine-Stabilized $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) モチーフをもつ立体構造が得られており、ASABF は同様のモチーフを有する insect defensin ファミリーに属すると考えられる。このことは、線虫と同様に進化の過程で初期に分岐したと考えられる軟体動物のイガイから発見され insect defensin に分類される可能性が指摘される抗菌ペプチド MGD-1 が、同様に 4 本のジスルフィド結合を持つこととあわせて考えると、この抗菌ペプチドファミリーの進化を考える上で興味深い。

	1	10	20	30	40	50	60	70							
ASA	AVDFSS	ARM	DPGLS	-KVAQGL	ISS	EK-FQN	-GTGH	EKR	GGRPTV	CDR	GRGG	EWSP	SVPMP	KGRSS	RG
TEN	---VT	-GD	ILS	VEAK	GVKLN	DA	AAH	L-FR	GRSG	-GY	NGKR	---V	V	G	R
MGD	--GFG	-RP	-----	NNY	Q	HRH	KS	I	PG	RG	-GY	GGXH	-RLR	TC	YR

Fig. Alignment of ASABF amino acid sequence with insect defensin super family. ASA, ASABF from the nematode *Ascaris suum*; TEN, Tenecin1, which is the insect defensin most similar to ASABF, from the larvae of the coleopteran *Tenebrio molitor*; MGD, MGD-1 from the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

G. Wider, K. Pervushin, M. Salzmann, R. Riek and K. Wüthrich
Institute of Molecular Biology and Biophysics, ETH Hönggerberg,
CH-8093 Zurich, Switzerland

NMR is a very powerful method for detailed studies of biological macromolecules in solution. However, the sensitivity of the method decreases with increasing molecular size due to fast transverse relaxation by dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy. Interference between these relaxation mechanisms can be used to reduce signal losses (1,2), a technique which is realized in TROSY (Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy). At high polarizing magnetic fields the TROSY principle benefits diverse multidimensional NMR experiments which include the ^{15}N - ^1H fragment of a peptide bond (3) or the ^{13}C - ^1H moiety in aromatic rings (4).

TROSY was implemented into a variety of through-bond correlation NMR experiments. In such experiments up to a 30-fold sensitivity increase could be achieved for a 110 kDa $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled protein utilizing TROSY. TROSY can also be combined with the NOESY experiment which is of utmost importance for detailed structural studies of a protein. The combination of NOESY and TROSY offers reduced relaxation in all spectral dimensions and suppression of diagonal peaks (5).

The application of the TROSY principle opens an avenue for solution NMR studies e.g. of large oligomeric proteins, or of isotope-labeled proteins contained in unlabeled large particles, such as nucleic acid complexes, detergent micelles or lipid vesicles.

References:

1. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wüthrich, Proc. Nat. Acad. Sci. **94**, 12366-12371 (1997). Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution.
2. K. Pervushin, G. Wider, and K. Wüthrich, J. Biomol. NMR **12**, 345-348 (1998). Single transition-to-single transition polarization transfer (ST2-PT) in $[15\text{N}, 1\text{H}]$ -TROSY.
3. M. Salzmann, G. Wider, K. Pervushin, H. Senn and K. Wüthrich, J. Am. Chem. Soc. **121**, 844-848 (1999). TROSY-type triple-resonance experiments for sequential NMR assignments of large proteins.

4. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6394-6400 (1998).
Transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY) for NMR studies of aromatic spin systems in ^{13}C -labeled proteins.

5. K. Pervushin, G. Wider, R. Riek and K. Wüthrich, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, in press (1999).
The 3D NOESY- $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -ZQ-TROSY NMR experiment with diagonal peak suppression.

1SL2

Towards Understanding of Calmodulin Target Recognition Mechanisms

Mitsuhiro Ikura

Division of Molecular and Structural Biology, Ontario Cancer Institute and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, 610 University Avenue, Toronto, Ontario, Canada M5G 2M9

Calmodulin (CaM) acts as an intracellular calcium sensor that translates the Ca^{2+} signal into a variety of cellular processes. Ca^{2+} -CaM recognition of a short polypeptide segment (typically 20-30 residues) in target proteins induces conformational changes in both CaM and the target, enabling the target protein to become functionally active. To date a total of about 150 CaM-binding proteins have been identified, and three-dimensional structures of Ca^{2+} -CaM in three different forms of target-peptide complex has been determined previously (i.e., skeletal and smooth muscle myosin light chain kinases or MLCKs, and CaM kinase II). These structural studies have shown that there are two different classes of CaM target recognition: the 1-14 class, first discovered in MLCKs, uses key interactions involving two bulky hydrophobic residues spaced by 12 amino acid residues in the middle; the 1-10 class, found in CaM kinase II, features the spacing of only 8 residues between two bulky hydrophobic residues. Current questions include: (i) do these structures represent all possible modes of CaM target recognition? (ii) can one predict, from the amino acid sequence of target, how CaM would bind the target?

We have recently determined the structure of Ca^{2+} -CaM in complex with a CaM kinase kinase (CaMKK) peptide using both NMR spectroscopy and X-ray crystallography. The structure revealed a reversed orientation of the CaMKK peptide with two globular domains of CaM, as compared to that of CaM-MLCK or CaM-CaM kinase II complex. More recently we have been studying the structure of Ca^{2+} -CaM in complex with a peptide derived from petunia glutamate decarboxylase, which appeared to form a 1:2 CaM-peptide complex.

From these and previous studies, it is clear that CaM employs a number of different mechanisms for target recognition, by virtue of (i) a flexible domain linker connecting two globular domains and (ii) a methionine-rich hydrophobic patch on each domain. The diversity of CaM-target interactions is remarkable in view of protein-protein recognition processes essential for cellular signaling, and further studies will reveal a more complete picture of CaM's versatility. In order to assist structural and functional analyses on CaM-dependent activation of target proteins, we have developed a web-based database for calmodulin binding peptides (<http://calcium.oci.utoronto.ca>). This database contains 176 entries of distinct calmodulin binding sequences with a total of 1670 homologous sequences, that are harvested from gene and protein databases. Based on structural information described above, four distinct classes have been defined. The database offers tools for browse, search and analysis on CaM binding sequences found in numerous proteins.

大腸菌細胞分裂に関与する 新規タンパク質 YhhP の溶液構造

○加藤悦子¹、八田知久¹、神藤平三郎²、水野猛³、石井祐子³、山田寿美³、
山崎俊正¹

¹農水省・生物研、²東薬大、³名大・農

Three-dimensional solution structure of YhhP,
a novel *Escherichia coli* protein implicated in the cell division

Etsuko Katoh¹, Tomohisa Hatta¹, Heisaburo Shindo², Takeshi Mixuno³, Yuko Ishii³,
Hisami Yamada³ and Toshimasa Yamazaki¹

¹National institute of agrobiological resources,

²Tokyo university of pharmacy and life science, ³Nagoya university

The 3D structure of YhhP protein has been determined by heteronuclear multidimensional NMR in combination with simulated annealing and restrained molecular dynamic calculation. YhhP holds into a compact two-layered α/β -sandwich structure: one layer consists of a mixed four-stranded β -sheet and the other comprises two α -helices. The CPxP motif, commonly observed for the putative YhhP homologs, is found at the N-terminus of helix α 1, and plays a significant structural role in stabilizing this helix. Structural homology searches using SCOP structural classification of protein database revealed that the two-layered α/β -sandwich fold similar to that of YhhP is found in a number of functionally diverse RNA-binding, DNA-binding and catalytic proteins. Among them, the C-terminal ribosome-binding domain of translation initiation factor IF3 displays the greatest similarity.

[緒言]

YhhP タンパク質 (81 残基) は、H-NS (大腸菌由来のヒストン様タンパク質) 変異株においてストレス誘導シグマ因子 σ^E の安定化を促進する因子として同定された。その後の研究により YhhP タンパク質欠損株は、LB 培地の対数増殖期において極端に伸張した繊維状細胞を形成し、生育が静止期になると一斉に細胞分裂が起こり多数の無核細胞を放出することが明らかになった。このことから、YhhP タンパク質は細胞分裂や染色体分配に深く関与していることが示唆されるが、その詳細な分子機能や作用機構については未だ不明である。また、YhhP タンパク質はいずれの機能既知タンパク質とも一次構造上の相同性が低く極めて特異な一次構造を有するが、ゲノム配列の検索から明らかなように、YhhP 類似タンパク質が様々な微生物に広く分布していることは興味深い。本研究では機能未知な YhhP タンパク質の三次構造を NMR 法を用いて解析し、その結果をもとに YhhP タンパク質の機能を解明する糸口を見つけようとするものである。

[実験]

¹⁵N 標識および ¹³C/¹⁵N 標識した YhhP タンパク質は大腸菌を用いた系により大量合

Keywords: YhhP、溶液構造、大腸菌、細胞分裂

かとうえつこ、はったともひさ、しんどうへいさぶろう、みずのたけし、
いしいゆうこ、やまだひさみ、やまざきとしまさ

成した。NMR 測定は 1mM の YhhP タンパク質、NaCl (0.1 M)、NaN₃ (2mM)、DTT (2 mM) を溶解した 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1) について、Bruker DMX750 を用いて 25°C で行った。NMR シグナルの帰属は異種核多次元 NMR 法を用いて定法に従って行った。ディスタンスジオメトリー (DG) 法と分子シミュレーション (SA) 法を併用した構造計算は X-PLOR3.1 を用いて行った。

[結果]

NMR 測定により得られた 1,655 の束縛条件に基づき YhhP タンパク質の高次構造を決定した。収束の悪い N 端および C 端を除いて (4-79)、RMSD は主鎖原子について 0.13 Å、全重原子について 0.62 Å であった。YhhP タンパク質は β - α - β - α - β - β からなるコンパクトな α/β サンドウィッチ構造であることが判明した。4 本鎖 β シートと 2 本の α ヘリックスの間には広範囲に渡って疎水性コアが形成されている。微生物由来の YhhP 類似タンパク質 (いずれも機能や高次構造については不明) において保存されているアミノ酸の多くは、この疎水性コア内に位置している。このことは、これらの YhhP 類似タンパク質も同様の α/β サンドウィッチ構造をとっていることを示唆している。さらに、YhhP 類似タンパク質に特徴的な CPxP モチーフは $\alpha 1$ の N 端に位置しており、2 残基前の Leu 残基を含めた LxCPxP が新しいタイプの N-capping box として、この α ヘリックスの安定性を向上させていることが示唆された。また、LxCPxP モチーフの構造上の特徴として、Cys-Pro 間のペプチド結合が *cis* 構造であることが挙げられる。

SCOP による高次構造のホモロジー検索を行った結果、いくつかの DNA 結合タンパク質、RNA 結合タンパク質などと YhhP タンパク質の立体構造が類似していることが明らかとなった。この中で、転写開始因子の C 端側リボゾーム結合領域である IF3C が、唯一 YhhP と同一の β - α - β - α - β - β トポロジーを共有している。さらに、両タンパク質は類似した表面電荷を示す。このことから、IF3C と YhhP タンパク質の機能の関連性について興味をもたれる。現在、これらの高次構造からの情報をもとに YhhP タンパク質の機能について解明を急いでいる。

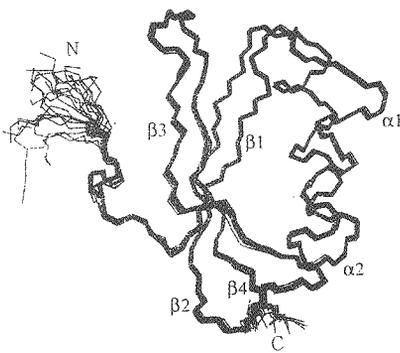


Figure 1. Superposition of the backbone atoms of the final 20 calculated structures.

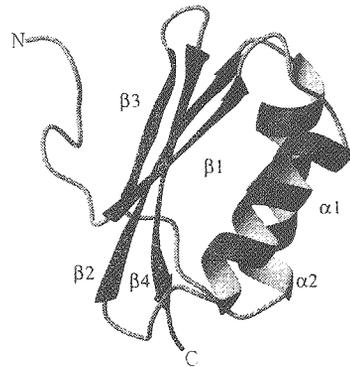


Figure 2. A ribbon diagram of the energy-minimized average structure of YhhP.

1L7

超好熱性古細菌由来TBP蛋白質-DNA複合体の高温下での内部運動性の解析

○山崎和彦^{1, 2}、館野賢^{1, 2}、鈴木理^{1, 2, 3}

¹生命工学工業技術研究所・構造生物学研究施設、²科学技術振興事業団・戦略的基礎研究推進事業、³東京大学大学院・総合文化研究科

Internal Motions of the TATA-box Binding Protein that Originates in a Hyper-thermophilic Archaeobacterium Upon Binding the Target DNA

Kazuhiko Yamasaki¹, Masaru Tateno¹, and Masashi Suzuki^{1,2}

¹AIST-NIBHT CREST Centre of Structural Biology, ²Graduate School of Human and Environmental Sciences, University of Tokyo

The TATA-box binding protein (TBP) is one of the essential transcription factors. It is composed of approximately 200 amino acid residues. This protein binds the TATA-box DNA and thereby bends the DNA to a large degree. NMR spectra of TBP that originates in the hyper-thermophilic archaeobacterium upon binding the target DNA were measured at 50°C, by taking advantage of the high thermal stability of the protein. The backbone amide signals of TBP were assigned by a semi-automated procedure. Internal motions of the TBP were analyzed by ¹⁵N relaxation measurements and the results were discussed.

【はじめに】

TATA-box 結合蛋白質 (TBP) は、プロモータ上の TATA-box を認識し、転写の開始位置および方向を決定する。TBP は、極めて対称性の高い N 末端側と C 末端側の 2 つのドメインからなり、標的 DNA に結合してこれを大きく屈曲させる。TBP は約 200 アミノ酸残基からなり、DNA との複合体は 30 kDa 程度の分子量となるため、溶液 NMR による研究対象としては大きい系である。本研究では、超好熱性古細菌 *Pyrococcus* sp. OT3 由来 TBP の高い熱安定性を利用し、高温での測定により主鎖アミド基のシグナルの帰属に成功した。これに基づき、緩和時間測定により内部運動性を解析した。

【方法】

¹³C および ¹⁵N で標識した *Pyrococcus* sp. OT3 由来 TBP を大腸菌により発現、精製し、12塩基対 DNA (5'GCTATATATAGC 3'、TATA-box 配列に下線) との複

キーワード：蛋白質-DNA複合体、内部運動性、緩和時間、H-D交換速度

やまさきかずひこ、たてのまさる、すずきまさし

合体を調製した。Bruker社DMX750およびDMX500を用い、試料温度50℃で、同種核および異種核多次元NMRスペクトルを測定した。HNCA/HN(CO)CA、NOESY-HMQC/TOCSY-HMQC、HNCA/HNCO/TOCSY-HMQC/HCACOのスペクトル間に見られる連結性を用いて半自動的にシグナルを連鎖帰属した。緩和時間 ($T_1, T_2, {}^1\text{H}-{}^{15}\text{N}$ NOE) を測定し、主鎖アミド基の内部運動性を解析した。

【結果および考察】

高温 (50℃) での測定により、常温 (25-40℃) での測定より良好なスペクトルが得られた。特に、HNCAなど異種核の関わる測定において顕著な差がみられ、高温においてのみ、期待される数のクロスピークが観測された。半自動化連鎖帰属により、90%以上の主鎖アミドシグナルを同定した。[${}^1\text{H}-{}^{15}\text{N}$]HSQCスペクトル上で重なりを生じるものを除き、143個のシグナルについて、 ${}^{15}\text{N}$ 核緩和時間を測定した。

これまでの解析により、ループ領域のみならず、 α ヘリックス、 β シートなど二次構造を形成している残基にも高い運動性を示すものがあることが分かった。また、分子形態の極めて高い対称性にもかかわらず、運動性は必ずしも対象的ではなく、全体的にはN末端側のドメインの方が高い運動性を示す傾向があった。今後さらに解析を進めるとともに、分子動力学計算の結果との比較・対応を行い、実際の運動のモードおよびTBPによるDNA認識機構と内部運動性の関係について考察する予定である。

新規ドメイン PB1 の立体構造と結合配列の認識

(東京都臨床研¹、日本女子大・理²、CREST・JST³、学習院大・院理⁴、
東大医科研・ヒトゲノム⁵、九大院医系・分子病態⁶、北海道大学・薬⁷)
○寺沢宏明¹、小椋賢治¹、戎井悦子¹、市川さおり²、堀内正隆^{1,3}、湯沢聡^{1,4}、
横地政志^{1,3}、島中秀樹¹、伊藤隆司⁵、住本英樹⁶、稲垣冬彦^{1,3,7}

Structure of the novel domain PB1 and identification of its ligand binding surface

(Department of Molecular Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science¹, Faculty of Science, Japan Women's University², CREST·JST³, Institute for Biomolecular Science, Gakushuin University⁴, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo⁵, Department of Molecular and Structural Biology, Kyushu University, Graduate School of Medical Science⁶, Department of Structural Biology, Hokkaido University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences⁷)
Hiroaki Terasawa¹, Kenji Ogura¹, Etsuko Ebisui¹, Saori Ichikawa², Masataka Horiuchi^{1,3}, Satoru Yuzawa^{1,4}, Masashi Yokochi^{1,3}, Hideki Hatanaka¹, Takashi Ito⁵, Hideki Sumimoto⁶ and Fuyuhiko Inagaki^{1,3,7}

The PC motif is an evolutionarily conserved sequence found in various signaling proteins, including Cdc24p, indispensable for cell polarization of the budding yeast, and p40phox, present in the signaling complex of the microbicidal phagocyte NADPH oxidase. Sumimoto and Ito have identified a novel domain, designated PB1, in Bem1p (a protein for cell polarization) and p67phox (an activator of the oxidase), recognizing the PC motif to directly interact with Cdc24p and p40phox, respectively. The three-dimensional structure of the PB1 domain of Bem1p has been determined in solution by NMR spectroscopy. The surface of the PB1 domain that interacts with the PC motif has been identified by monitoring perturbation of chemical shifts of ¹³C/¹⁵N-labeled PB1 domain resonances upon titration with the unlabeled PC motif containing peptide.

【はじめに】

PC モチーフ (Phox and Cdc24) は多くのシグナル伝達タンパク質に存在する、酸性残基に富んだアミノ酸配列で、進化的に保存されている。出芽酵母の細胞極性を調節する Cdc24 や、食細胞 NADPH オキシダーゼ (Phox) の細胞質内因子である p40phox は PC モチーフを含むが、PC モチーフの機能は最近まで不明であった。住本・伊藤らは、Cdc24 の結合タンパク質である Bem1p と、p40phox の結合因子である p67phox について、PC モチーフとの結合に必要な領域を限定した。結果としてその領域に新規なアミノ酸相同配列を見出し、PB1 (Phox and Bem) ドメインと命名した。PB1 ドメインは塩基性残基に富んだアミノ酸配列をもち、保存されたりジン残基に変異を導入するといずれの系においても PB1 ドメインと PC モチーフの結合は失われる。シグナル伝達を担う新しいドメインである PB1 と PC モチーフの分子認識機構を明らかにするため、Bem1p PB1 ドメインの立体構造を NMR 法により決定し、化学シフトの変化に基づいて PC モチーフの結合部位を同定した。さらに、Chemical Shift Index (CSI) により、PC モチーフにおける PB1 との結合に重要な領域の 2 次構造を推定した。

キーワード：PB1 ドメイン、PC モチーフ、Bem1p、Cdc24、NMR

氏名：○てらさわひろあき、おぐらけんじ、えびすいえつこ、いちかわさおり、ほりうちまさたか、ゆざわさとる、よこちまさし、はたなかひでき、いとうたかし、すみもとひでき、いながきふゆひこ

【方法】

Bem1p PB1 ドメイン (Bem1p PB1) ならびに Cdc24 の PC モチーフを含む領域 (Cdc24 PC) は大腸菌を用いて発現した。 ^{15}N または $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ ラベル体は M9 培地で取得した。

複数のクロマトグラフィーにより精製した試料について UNITY plus 600 および UNITY INOVA 500 を用いて多核多次元 NMR の測定をおこなった。Bem1p PB1 については帰属を完了した。得られた NOE に基づく距離情報は 1 2 6 9 個、2 面角情報は 6 5 個、2 1 個の水素結合に基づく距離情報は 4 2 個であった。X-PLOR を用いて simulated annealing 法により構造計算をおこない、立体構造を決定した。Cdc24 PC については主鎖の帰属を進めている段階である。結合部位の同定には Bem1p PB1 に対して Cdc24 PC の滴定をおこない、1D スペクトルならびに 2D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルで検知して最終的に 1 : 1 の複合体を調製した。

【結果と考察】

Bem1p PB1 は 4 本鎖からなる β シートと 2 本の α ヘリックスから成っている (Figure 1)。 β シートは 1 本目の α ヘリックスと筒状を成し、1 本目の α ヘリックスと直行する位置にある 2 本目の α ヘリックスが筒の一端をふさぐような形になっている。筒の内部は疎水性残基によりコアが形成されている。構造がフレキシブルと思われる領域を除いた主鎖の root-mean-square deviation は 0.31 Å、側鎖を含めると 0.71 Å であった。

アミノ酸 1 次配列相同性が極めて低い PB1 ドメインにおいて、唯一保存されている Lys482 は N 末端から 1 本目の β ストランド上にあつて、変異に基づく実験から Lys482 が Cdc24 PC の酸性残基と相互作用すると推測された。Bem1p PB1 に対して Cdc24 PC の滴定をおこない、2D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを解析したところ、化学シフトの変化の大きい領域は Lys482 を含み、1 本目と 2 本目の β ストランド上、1 本目の α ヘリックスと 3 本目の β ストランドをつなぐループ上、2 本目の α ヘリックスと 4 本目の β ストランドをつなぐループ上に位置して、Figure 1 の手前の分子表面にマップされた。

Cdc24 PC については主鎖の帰属を進めており、保存されたアミノ酸配列については主鎖の帰属が完了したので、CSI に基づいて 2 次構造を推定した (Figure 2)。Cdc24 PC 単体と Bem1p PB1 との複合体の 2D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを比較したところ、コンセンサスである DEDGD を含む最初のループと β ストランドに大きな化学シフトの変化が見られた。このことから、Cdc24 PC のループ上の DEDGD 配列と Bem1p PB1 の Lys482 を含む塩基性残基の静電相互作用が予想される。

p67phox-p40phox の結合と Bem1p-Cdc24 の結合は互いに特異的であり、解析を進めることにより特異性のメカニズムを明らかにするとともに、新規の PB1 ドメイン探索のあしがかりとしたい。

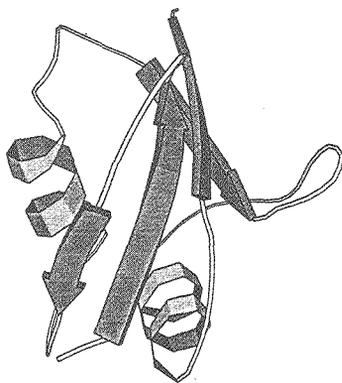


Figure 1: Ribbon diagram of the three-dimensional structure of the PB1 domain of Bem1p (Molscript).

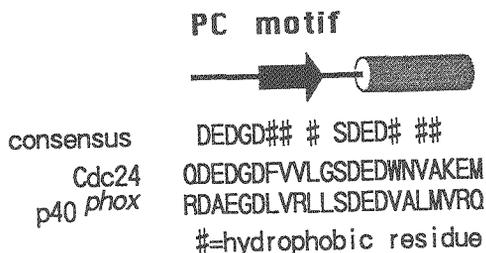


Figure 2: Prediction of the secondary structure of the PC motif of Cdc24 based on the Chemical Shift Index.

Pressure-Induced Chemical shifts of Individual ¹³C Nuclei in BPTI(¹Graduate School of Science and Technology and ²Faculty of Science, Kobe University; ³Center for Advanced Biotechnology and Medicine, Rutgers University)○Hua Li¹, Hiroaki Yamada², Rong Xiao³, Gaetano Montelione³ and Kazuyuki Akasaka^{1,2}

The use of the pressure-coupled NMR experiments to probe the native ensemble of proteins is now a field of burgeoning interest. Following the studies of pressure-induced chemical shifts of main chain (1) and side chain protons (2) and amide nitrogens (3), we have extended our research to those of ¹³C nuclei. By performing HNCA (2D version), HNCO (2D version), ¹H-¹⁵N HSQC and ¹H-¹³C HSQC measurements on ¹³C, ¹⁵N-labeled bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) in aqueous solution at various pressures between 1 and 2000 bar, we detected for the first time the chemical shifts of ¹³C nuclei induced by pressure. As the chemical shifts of ¹³C nuclei, especially ¹³Cα and ¹³CO, is a precise reflection of a protein structure, the newly determined pressure-induced chemical shifts of ¹³Cα and ¹³CO, together with some side chain carbon shifts, are expected to characterize the pressure response of the structure of BPTI in greater details.

はじめに) オンライン高圧セルシステムと高分解能 NMR を組み合わせた新しい高圧 NMR 法では、高機能の NMR 分光器をそのまま使用するため、プロトンから多核まで多様な測定が、常圧と同じ高い分解能で行うことができる。これまでこの装置を用いて、プロトン及び ¹⁵N で標識した蛋白質 BPTI を対象に、1D、2D の ¹H-NMR 及び ¹H-¹⁵NHSQC 測定を 1~2000 気圧の範囲で行った。その結果、加圧により、水素結合の短縮(1)、三次構造変化(2)、芳香環 flip-flop 運動の抑制(2)、主鎖構造変化(3)などが、化学シフト、線幅、NOE などの NMR パラメーターの圧力依存性から明らかとなった。今回、初めてこの方法を ¹³C NMR に適用し、圧力による ¹³C の化学シフト変化の測定を試みた。

実験) 高圧 NMR 装置を用いて、36°C、1~2000 気圧の範囲で、軽水中 (90%¹H₂O/10%²H₂O)で、¹³C と ¹⁵N で標識した蛋白質 BPTI の HNCA (2D version)、HNCO (2D version)、¹H-¹⁵N HSQC と ¹H-¹³C HSQC 測定を行った。試料溶液は、¹³C と ¹⁵N で標識した BPTI を 20 mM 酢酸緩衝液中(pH 4.6)に、1 mM の濃度に溶かしたものである。

Keywords: High pressure, ¹³C chemical shift, structural change, hydrogen bond, BPTI

○リ カ、やまだ ひろあき、ショー ロン、ガエタノ モンテリオン、あかさか かずゆき

結果と考察) HNCA (2D version)、HNCO (2D version) (Fig. 1)、 ^1H - ^{15}N HSQC と ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルから、個々のプロトン、炭素及び窒素原子の圧力による化学シフト変化を追跡した。その結果、まずプロトンと窒素原子の圧力シフトは、これまでの ^1H 、 ^{15}N からの結果をよく再現した。次に、主鎖の $^{13}\text{C}\alpha$ 、 ^{13}CO も、側鎖の ^{13}C も、圧力に対して直線的で、且つ可逆的に変化し、その変化の大きさは部位毎に異なることがわかった。

(1) 2000 気圧で主鎖 $^{13}\text{C}\alpha$ (58 個内の 49 個)、 ^{13}CO (58 個内の 50 個)、側鎖メチル基の ^{13}C (20 個内の 19 個)の圧力によるシフトの平均値はそれぞれ $-0.089 (\pm 0.151)$ ppm、 $0.068 (\pm 0.146)$ ppm、 $0.320 (\pm 0.173)$ ppm である。側鎖メチル基 ^{13}C の圧力シフト平均値が主鎖の $^{13}\text{C}\alpha$ 、 ^{13}CO のそれに比べずっと大きいことが注目される。従って、側鎖の方がより大きい揺らぎを持っていると考えられる。

(2) 2000 気圧でのヘリックス、ループ及びシート領域の $^{13}\text{C}\alpha$ 圧力シフトの平均値はそれぞれ $-0.188 (\pm 0.200)$ ppm、 $-0.053 (\pm 0.113)$ ppm、 $-0.044 (\pm 0.099)$ ppm である。 $^{13}\text{C}\alpha$ 化学シフトインデックスは蛋白質の二次構造を反映する有力な指標である。ヘリックス領域の $^{13}\text{C}\alpha$ 化学シフトインデックスを調べた結果、1 気圧でも 2000 気圧でも、ヘリックス構造は保たれたままであることがわかった。それゆえ、観測された負の圧力シフトは、BPTI のフォールドした状態内の種々のヘリックス構造間で、一定の方向へとポピュレーション変化が起こることに対応する。

(3) 加圧により ^{13}CO は低磁場シフトの傾向を示す。圧力による ^{13}CO の低磁場シフト傾向は、プロトンと窒素の低磁場シフトと同じく、水素結合の短縮を意味すると思われる。水素結合のアクセプターとして分子内の水素結合に貢献するもの、貢献しないものの ^{13}CO 圧力シフトの平均値は、2000 気圧ではそれぞれ $0.017 (\pm 0.143)$ ppm と $0.102 (\pm 0.139)$ ppm である。従って、“自由”状態にある ^{13}CO は溶媒水と水素結合してあり、その水素結合は圧力によってより短縮された、つまり水和層がより圧縮されたことが推定される。

まとめ) 蛋白質の ^{13}C 化学シフトは圧力に敏感であり、その解析は加圧下の蛋白質の主鎖及び側鎖の構造変化及びダイナミクスについて、有用な情報源となることが明らかとなった。

- 参考文献) 1. Li, H., Yamada, H., and Akasaka, K. (1998) *Biochemistry* 37, 1167-1173.
 2. Li, H., Yamada, H., and Akasaka, K. (1999) *Biophys. J.*, in press.
 3. Akasaka, K., Li, H., Yamada, H., Li, R., Thoresen, T., and Woodward, K. (1999) *Protein Science*, in press.

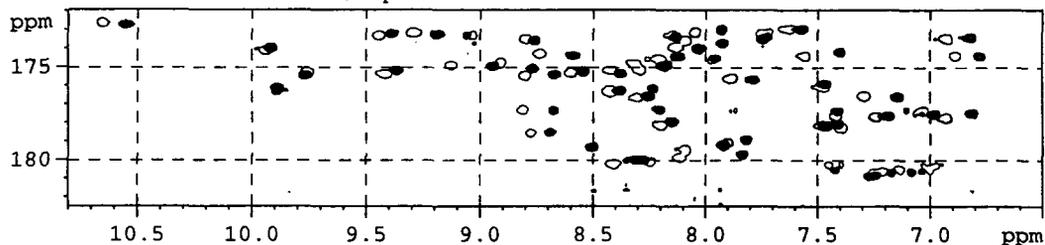


Fig. 1 HNCO (2D version) spectra at 30 bar (filled circles, ●) and 2000 bar (open circles, ○).

NMR analysis on the distribution of membrane-targeting substances between inner and outer leaflets of lipid bilayer.

(School of Science, The University of Tokyo)

○Kobayashi, Yoshimasa; Murata, Michio; Tachibana, Kazuo.

It has been revealed recently that the inside/outside topology of lipid bilayer plays an important role when membrane-targeting substances elevate permeability of cell membrane. We planned to estimate the distribution of $^{13}\text{C}_3$ labeled substances between the two leaflets of the bilayer, particularly for small molecules fluorescence-labeling to which may alter their molecular behaviors. First, we succeeded in introducing an lipid asymmetry to artificial vesicles which enough are small to show satisfying conventional ^{13}C NMR spectra. Next, by means of solid state NMR techniques, better resolved spectra were obtained.

【序】

細胞膜を構成する脂質二重膜は一般に、二重膜の内葉と外葉で脂質組成が異なっており、この脂質膜非対称分布が膜作動性生理活性物質の活性発現に際して重要な役割を果たす例が数多く知られている。ペプチド・タンパク性活性物質に関してはこれまで、人工脂質二重膜小胞(リポソーム)における分子の膜表裏分布を定量する手段として蛍光分光が積極的に用いられてきたが、蛍光ラベルが活性分子全体の極性に及ぼす影響が無視できない分子量数百以下の低分子についてはこの方法の適用は困難である。我々は、このような系においても、活性物質に ^{13}C ラベルを施すことでNMRによる膜表裏分布評価が可能と考え、脂質表裏非対称性分布を有する一枚膜リポソームにおける実験系の構築を試みてきた。

リポソームに関する従来のNMR研究は、溶液NMR

Table 1. Introduction of lipid asymmetry to unilamellar vesicles

Entry	Composition of Lipids	Size (nm)	Temp (°C)	Time (min)	PA transported
1	DOPC/DOPA = 10:1	100	45	30	~100%
2	DOPC/DOPA = 10:1	50	45	60	0%
3	EggPC/EggPA = 10:1	100	45	40	0%
4	EggPC/EggPA = 10:1	100	70	90	~100%
5	EggPC/EggPA = 10:1	50	70	60	~100%
6	EggPC/DOPA = 10:1	100	70	80	0%

DO: dioleoyl; PC: phosphatidylcholine; PA: phosphatidic acid.

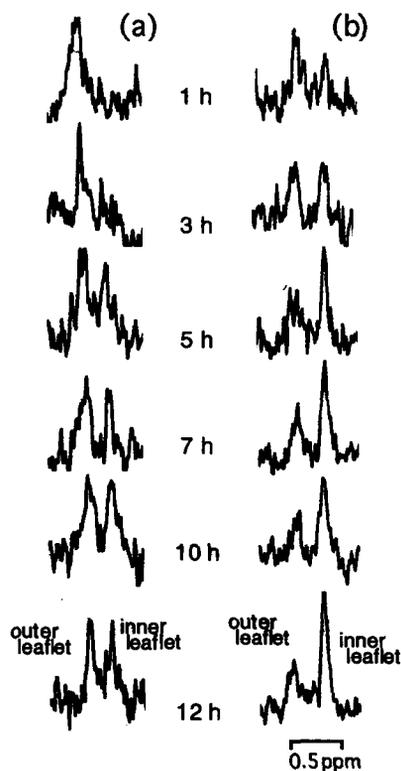


Figure 1. Time change of ^{13}C NMR spectra of the $^{13}\text{C}_3$ labeled Chlorpromazine in EggPC/EggPA (10:1) LUVs (size:50 nm), only outside of which Pr^{3+} was added. (a) Control. (b) EggPA was rich in inner leaflet.

キーワード： 固体 ^{13}C NMR、脂質二重膜、膜作動性分子、シフト試薬、脂質非対称分布

こばやしよしまさ、むらたみちお、たちばなかずお

ではSUV（粒径20 nm程度の小さなリポソーム）、固体NMRではMLV（流動性の低い巨大な脂質多重層）を専ら対象として進められてきた。本研究で対象としたのは、脂質表裏非対称性分布を安定に有する粒径が50-1000 nmの「中程度の」粒径の一枚膜リポソームである。ここで我々は、まずこの系で優れたNMRスペクトルを得るためのサンプル調製法及びNMR測定法の検討を行なったので、その結果を報告する。

【十分な分解能を与える表裏脂質非対称分布リポソームの調製】

【表裏脂質非対称化法】

酸性脂質を含むリポソーム（50-200 nm）の内外にpH勾配（外液pH = 2, 外液pH = 9）を与えて昇温し、濃度勾配によるH⁺輸送担体となりうる酸性脂質のみを選択的に二重膜内葉にフリップさせることで非対称性の導入に成功した（Table 1）。酸性脂質の表裏存在比は、リポソーム表面電位を蛍光プローブを用いて定量することで決定した。Entry 5の条件で得た非対称リポソーム懸濁液は、¹³C NMR (125 MHz)において、内外葉のPC分子のコリン残基のメチルシグナルが常磁性シフト試薬（Pr³⁺, Dy³⁺, Fe(CN)₆³⁻）の添加によって識別可能であった。

【膜作動性生理活性物質への応用】

塩基性分子であるクロロプロマジン（Cp）は、内葉に酸性脂質が局在している赤血球脂質二重膜中において静電相互作用により膜内葉により多く蓄積することが示唆されているものの、分光学的には観測されていない。そこで今回、Table 1, entry 5の条件で調製した非対称リポソーム懸濁液に、¹³CH₃化Cp誘導体およびシフト試薬Pr³⁺を添加し、Cp誘導体の表裏分布の時間変化を¹³C NMRで追跡した。その結果、リポソーム内葉への酸性脂質非対称分布に依存した本分子の外葉から内葉への移動速度の上昇が観測された（Figure 1）。

【DD-MASの利用】

¹³C NMRを用いて脂質二重膜中の生理活性分子の膜表裏分布を評価するためには、対象とする生理活性分子のシグナルが脂質分子シグナルから十分に分離している必要がある。そこで、溶液NMRでは広幅シグナルとなってしまう脂質メチレン鎖領域（20-40 ppm）での分解能向上を目的として、DD-MASの利用を検討した。

【方法と結果】

測定機は主にChemagnetics社製CMX-infinity、日本電子社製SR-MASプローブを用い、粒径50-1000 nmのリポソームを¹³C DD-MAS NMR測定に供した。その結果、特にメチレン鎖領域の飛躍的な分解能向上が観測された。この分解能向上については高出力プロトンデカップリングの寄与が主であった。

赤血球内方陥没誘発による膜透過性亢進活性を示すヌノサラシ科魚皮膚毒成分リポグラミスティンAの¹³CH₃誘導体を、卵黄脂質二重膜小胞に添加しDD-MAS（1 kHz）条件下で¹³C NMR測定した。その結果、溶液NMRではメチレン鎖のシグナルとの重なりのため観測不可能だった¹³CH₃シグナル（35.5 ppm）を明瞭に観察できた（* in Figure 2）。

【謝辞】

NMR測定を行なって下さった(株)日本電子の津野久幸氏、(株)バリアンジャパンの串田克彦氏に深謝します。

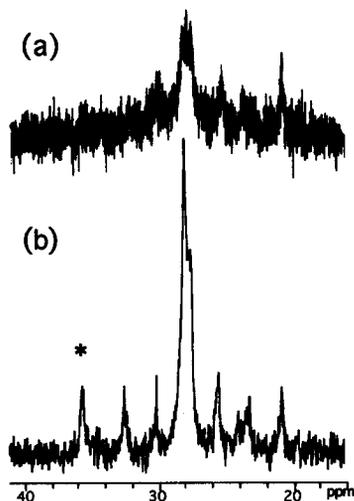


Figure 2. ¹³C NMR spectra of EggPC LUVs (7.5 mg, size: 50 nm) containing ¹³CH₃ labeled lipogrammistin-A (0.6 mg) in their membrane. (a) Liquid NMR (125 MHz, 9175 scans). (b) DD-MAS NMR (75 MHz, 1124 scans).

Multiconformational Liquid-Crystal NMR Study on Conformation Diversity of a Potent Inhibitor of HIV-1 Protease, KNI-272

The conformation diversity of a potent inhibitor of HIV-1 protease, KNI-272, has been investigated in a liquid-crystal medium by the multiconformational NMR spectroscopy. The NMR structural data were acquired in the anisotropic environment basing upon the vicinal coupling constant of the ^1H - ^1H ROE factors. As a result of the energy calculation, we found 5 seed conformers for KNI-272 which are considered to present in the anisotropic environment. These conformers were submitted to the multiconformational analysis of NMR structural data. From the analysis, it is revealed that the conformation of KNI-272 is preorganized into the rigid state which is slightly different from the conformation complexed with HIV-1 protease. The conformation around the Apns residue, however, shows the intrinsic preference for the conformation complexed with HIV-1 protease. The result suggests that the interaction between the bulky side chains and the environments is of particular importance.

【目的】

HIV プロテアーゼ阻害薬であるトリペプチド誘導体 KNI-272(iQoa-Mta-Apns-Thz-tBu, iQoa=5-isoquinolyl-oxyacetyl, Mta=methylthioalanine, Apns=allophenylnorstatine, Thz=thioproline, tBu= *tert*-butylamine)は、HIV-1 の増殖に対して強力な抗ウイルス作用を示し、酵素選択性、細胞毒性の点でも優れている(1)。その溶液構造は、ペプチドと同様にフレキシブルな構造をとり得るにも関わらず、酵素との複合体における構造と類似であることが報告されており(2)、このことから KNI-272 は酵素との結合の前段階において著しく構造化されるために高い選択性を示すと考えられている(3)。したがって、その構造多様性を解析し、構造活性相関解析を行うことは、作用機序に関するより興味深い知見を与えるものと思われる。そこで、本研究では Multiconformation 解析により、KNI-272 の生体膜モデル中での構造多様性を解析し、KNI-272 の酵素結合能との相関を調べることにした。

【実験】

溶媒はリオトロピック液晶である CsPFO(cesium perfluorooctanoate)液晶を用いて、KNI-272 を 0.1wt.%溶解させた。NMR測定は Varian INOVA 400WB を用いて室温にて行った。Multiconformation 解析は自作のプログラムを用いて、文献記載の手順に従って行った(4)。

MAS 液晶 NMR 法、multiconformation 解析、HIV プロテアーゼ阻害剤、KNI-272

きむらあつおみ、まきたちよこ、ふじわらひであき

【結果】

CsPFO 液晶中に溶解した KNI-272 の ROESY スペクトルより求めた構造パラメータ、および分子力場計算から得た KNI-272 の 5 個の seed 構造をもとに Multiconformation 解析を行った結果を表 1 に示す。表中の W_i^{\min} 、及び W_i^{\max} 、 W_i^{ave} は、それぞれ最小、最大、平均存在確率を意味する。表 1 から KNI-272 は Thz ψ 角、および Mta χ 角を除いて、概ね複合体構造に類似の構造をとっていることが分かる。この Thz ψ 角、および Mta χ 角に見られる差異は、疎水基と溶媒との相互作用によってもたらされたものと考えられる。また、運動性に関しては、iQoa 残基は非常に自由度が高いが、他の構造、特に酵素との結合能に大きく関与していると考えられる部位は rigid であった。これらの結果は、疎水性の側鎖が環境との相互作用によりその構造を変化させるものの、pharmacophore を有する残基に関しては、複合体構造類似の固有の構造に構造化される傾向があることを示唆する。

以上の結果をもとに、KNI-272 の酵素結合能に関する三次元構造活性相関解析を行ったところ、iQoa 残基の周辺に親水場が存在し、カルボキシル基と安定に相互作用することが分かった。したがって、この部位の構造自由度を保持しつつ、水素受容能を有する官能基を付与することで、より酵素と高い親和性を有する薬剤の設計が可能であると考えられる。

Table 1: Results of Multiconformational Analysis^a

	conformer					CX
	1	2	3	4	5	
iQoa ψ	46.2	43.2	61.4	63.0	105.4	36.0
iQoa χ_1	-145.5	171.3	-152.2	-154.6	34.0	-169
Mta ϕ	-82.1	-59.0	-82.4	-77.9	-79.1	-119
Mta ψ	71.6	123.7	73.3	73.2	80.5	74.0
Mta χ_1	-49.8	179.9	-55.7	52.2	-60.2	-166
Apsn ϕ	-79.8	-97.3	-82.0	-84.1	-85.6	-107.1
Apsn ψ	176.7	179.8	175.2	174.8	176.5	164.4
Apsn ψ_2	-87.9	-88.2	-86.8	-96.4	-86.8	-90.6
Apsn χ_1	-58.1	-49.0	-60.5	-62.0	-58.5	-56.4
Thp ψ	-40.8	-41.1	156.1	-34.9	116.3	146.8
W_i^{\min}	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
W_i^{\max}	0.91	0.58	0.43	0.82	0.48	
W_i^{ave}	0.24	0.18	0.15	0.28	0.15	
Energy (kcal/mol)	0.8	1.1	3.4	5.7	6.9	

^a CX: complexed with HIV-1 protease

<参考文献>

- 1) Kiso, Y. *Biopolymers* 1996, 40, 235.
- 2) Ohno, Y. *et. al. Bioorg. Med. Chem.* 1996, 4, 1565.
- 3) David, L. *et. al. J. Phys. Chem.* 1999, 103, 1031.
- 4) Kimura, A., Takamoto, K., Fujiwara, H. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 9656.

第2日 10月14日(木)

2L1 The Solution Structure of Ecteinascidin 729-DNA Adduct using NOE-Restrained Refinement Procedures

(School of Cell and Structural Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign)

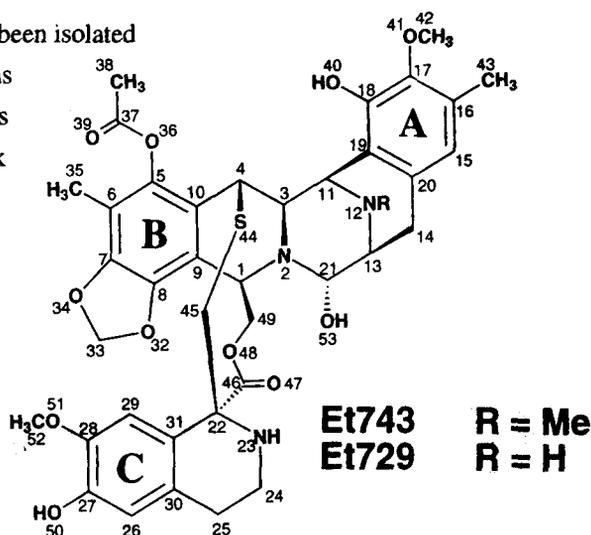
○Toshiyuki Hamada, Xiang-lei Yang, Kenneth L. Rinehart, Andrew H.-J. Wang

Abstract: The marine alkaloid ecteinascidin 729 (Et 729) has shown potent *in vivo* antitumor activities. The solution structure of Et729 bound to $[d(\text{TAAGCTTA})]_2$ is determined by the NOE-restrained SPEDREF refinement procedure. The simulated 2D NOE spectrum of the refined structure is well agree with the observed spectrum (*R*-factor 29.4 %), and the structure retained reasonable chemistry in the molecule. The refined structure suggests that the A unit of Et729 is located on the minor groove perpendicularly, while the B unit is closely associated with the unalkylated strand, and the C unit is lie on the alkylated strand.

Introduction: The ecteinascidins^{1,2} (Ets) are marine alkaloids isolated from extracts of the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata* and some of them possess potent antitumor activity.³ Ecteinascidin 743 (Et743) is currently undergoing phase II clinical trials as a result of its promising efficacy in preclinical antitumor tests. Although the detailed molecular mechanism of action still remains unclear, Et 743 has been reported to yield DNA sequence-selective alkylation of guanine N2 in the minor groove of duplex DNA.⁴ Additionally, bioassays for antimetabolic activities and enzyme inhibitions revealed Et 743 showed potent inhibition of DNA and RNA synthesis and of RNA polymerase activity but much less inhibition of DNA polymerase activity.²

Ecteinascidin 729 (Et729) has been isolated from the same tunicate recently and it has significantly stronger antitumor activities than Et743. This suggests that the lack of methyl group at the N12 position of Et743 is important for drug's activity.

Here we present the solution structure of Et729 bound to $[d(\text{TAAGCTTA})]_2$ determined by the NOE-restrained refinement procedure.



Ecteinascidin729, DNA octamer, NOE-restrained refinement, 2D-NMR, X-PLOR

はまた としゆき、 Xiang-lei Yang, Kenneth L. Rinehart, Andrew H.-J. Wang

Results and Discussion: Reaction of Et729 with the octamer duplex [d(TAAGCTTA)]₂ containing an AGC alkylation site yielded a stable 1:1 drug-DNA adduct. Nonexchangeable proton to proton connectivities in the adduct were determined using two-dimensional (2D) nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) and total correlation spectroscopy (TOCSY) experiments. Exchangeable protons were studied in an H₂O-D₂O (9:1) mixture via 2D NOESY and TOCSY experiments. The resulting spectra exhibited well-resolved cross-peaks for both Et729 and the oligomer. All resonances of 2D NOESY spectra in D₂O have been assigned stereospecifically using a standard sequential assignment. Interproton connectivities were then determined; many NOE cross peaks were identified as Et729 to DNA intermolecular contacts. Fig 1A shows NOE cross peaks of the aromatic to H1'/H5 fingerprint region of the Et729-DNA complex molecules.

Analysis of Et729 to DNA NOEs via two-dimensional NMR spectroscopy were utilized to position Et729 in the minor groove, with the A unit to the 5' side of the alkylated 4G and the B unit to the 3' side. Interactions of Et729 with the alkylated oligonucleotide strand are evidenced by strong NOEs between DNA and H13 and H21. The unit B is closely associated with the DNA strand opposite the alkylation site, showing NOE connectivities between A11, G12, C13 protons and H33a,b. Only one NOE between the A unit and DNA, suggesting that the A unit is located on the minor groove perpendicularly. Some NOE connectivities between the alkylated strand and protons of the C unit indicate that the C unit was lie on that strand.

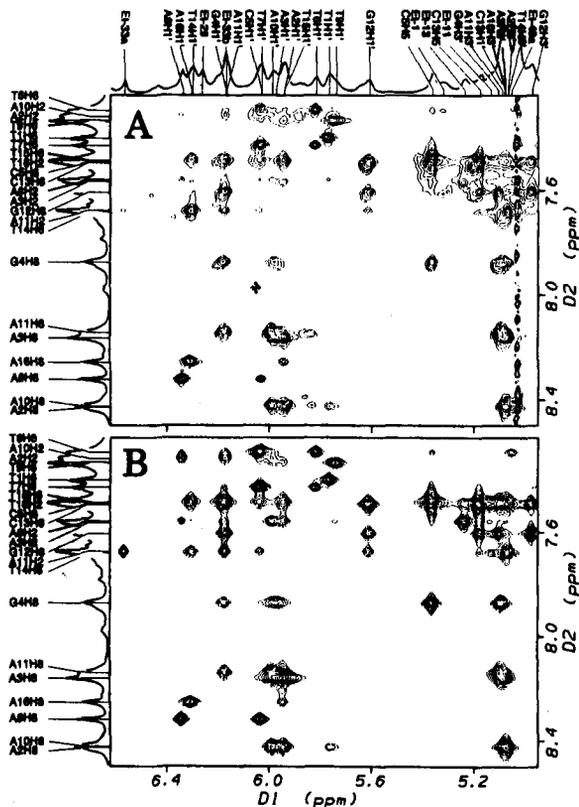


Figure 1:
2D-NOESY spectra showing the cross peaks between aromatic and H1'/H5 protons of Et729-[d(TAAGCTTA)]₂ adduct.
(A) Experimental spectrum.
(B) Simulated spectrum (*R*-factor 29.4 %).

Structural refinement of this molecule was carried out by the procedure SPEDREF⁵. The experimental 2D NOESY data set was analyzed using MYLOR to define the line shapes and chemical shifts for each spin in each frequency domain. These line shapes were then used to determine the volumes of the NOESY cross peaks. The inversion-recovery experiment determined the T_1 relaxation time for every spin. The correction time τ_c was determined using the SPEDREF procedure and found to be 5.5 ns for Et729-DNA adduct. The starting model of complex built in QUANTA97, was initially relaxed without NOE restraints using the program X-PLOR. After 20 cycles of NOE-restrained simulated annealing minimization, molecular symmetry was slowly imposed while running an additional 40 cycles of NOE-restrained conjugate gradient minimization. The NMR R -factor ($\sum |N_o - N_c| / \sum N_o$, where N_o and N_c are the experimental and calculated NOE integrals, respectively) for the refined Et729-DNA model is 29.4 %. The agreement between the experimental and calculated NOE data can partly be seen in Figure 1. The refined structure can satisfactorily explain all experimental cross peaks in both the nonexchangeable and exchangeable 2D NOESY spectra.

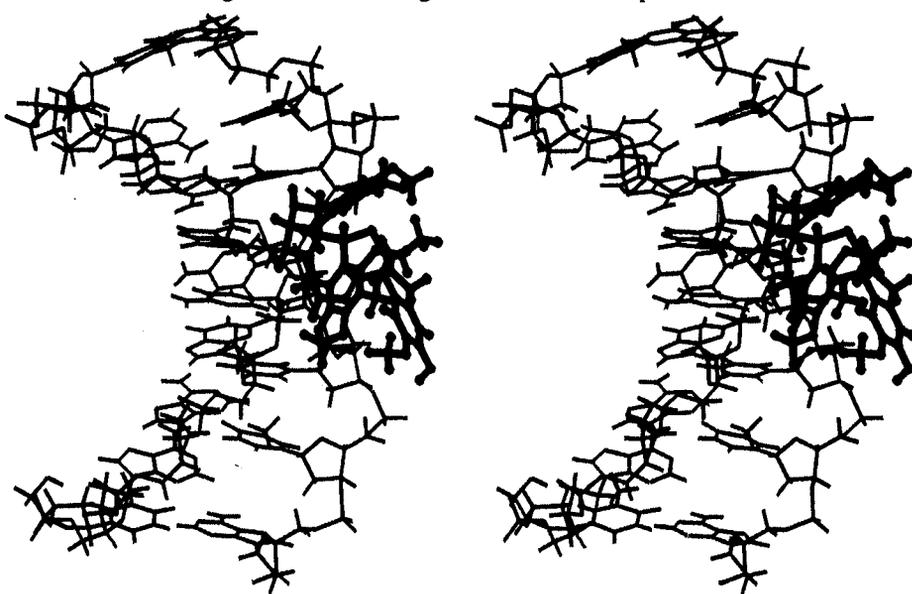


Figure 2: Stereodrawing of Et729-[d(TAAGCTTA)]₂ adduct.

The refined model of Et729 - DNA adduct are shown in Figure 2. The essential structural feature of the adduct appears to be similar to that of Et743 - DNA adduct^{6,7,8} and of the earlier model obtained by computer modeling^{3,9}. On the basis of our model of Et729, we can propose the antitumor activity is partially dependent upon the number and spatial orientation of the hydrogen bond donor/acceptor sites. The detailed biological implication of this structure will be addressed. Studies of structures of additional Et analogues will enhance our understanding on the biological activities of many DNA-binding antitumor drugs.

References

1. Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F.; Li, L. H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4512-4515.
2. Sakai, R.; Jares-Erijman, E. A.; Manzanares, I.; Elipe, M. V. S.; Rinehart, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9017-9023.
3. Sakai, R.; Rinehart, K. L.; Guan, Y.; Wang, A. H.-J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 11456-11460.
4. Pommier, Y.; Kohlhagen, G.; Bailly, C.; Waring, M.; Mazumder, A.; Kohn, K. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13303-13309.
5. Robinson, H.; Wang, A. H.-J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3524-3533.
6. Moore, B. M., II; Seaman, F. C.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5475-5476.
7. Moore, B. M., II; Seaman, F. C.; Wheelhouse, R. T.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2490-2491.
8. Seaman, F. C.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13028-13041.
9. Guan, Y.; Sakai, R.; Rinehart, K. L.; Wang, A. H.-J. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1993**, *10*, 793-818.

2L2

NMRと無細胞合成系を用いたタンパク質基本構造の決定

(¹理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター, ²理化学研究所・細胞情報伝達研究室, ³東京大学大学院・理学系研究科)

○木川隆則^{1,2}, 矢吹孝¹, 山口絵未¹, 関英子¹, 松田貴意¹, 元田孝子¹, 松田夏子¹, 横山茂之^{1,2,3}

Structure determination of basic protein folds using the NMR spectroscopy and the cell-free protein synthesis

Takanori Kigawa^{1,2}, Takashi Yabuki¹, Emi Yamaguchi¹, Eiko Seki¹, Takayoshi Matsuda¹, Yoko Motoda¹, Natsuko Matsuda¹, and Shigeyuki Yokoyama^{1,2,3}

¹Genomic Sciences Center (GSC) and ²Cellular Signaling Laboratory, RIKEN, Saitama, and ³Graduate School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Infinite number of protein structures can actually be constructed from a finite number of basic protein folds (approximately 1000). To identify all protein folds and then compile an encyclopedia of folds, numbers of protein samples suitable for the structure determination should be prepared efficiently and rapidly. For this purpose, the cell-free protein synthesis system would be suitable. We have improved the cell-free system to produce milligram quantities of proteins by optimization and adopting the new "dialysis method". Recently, we developed [¹³C, ¹⁵N]-Trp, and then, preparation of the uniformly [¹³C, ¹⁵N]-labeled protein by the cell-free system became possible. In this presentation, the application of cell-free system to NMR analysis of protein folds will be discussed.

1. 序

我々は、タンパク質の高次構造の基本的な構成単位である基本構造を網羅した百科事典の作成により、タンパク質高次構造の全体像の理解を目指している。この過程においては、従来のタンパク質の構造解析とは桁違いの、数多くの構造解析試料の調製が必要となるため、多数のcDNAクローンから構造解析に適した試料を、効率よく選択し産生することが求められる。PCRにより増幅したDNA断片をそのまま鋳型として利用可能であること、各種因子の添加が容易であること、多数のタンパク質発現を同時並行しておこなうための機械化・自動化に適していること、等の理由により、我々はタンパク質発現系の中核として無細胞系の利用を検討してきた。

キーワード：安定同位体, アミノ酸選択的標識, 部位特異的標識, 多次元NMR, 無細胞タンパク質合成系

きがわたかのり, やぶきたかし, やまぐちえみ, せきえいこ, まつだたかよし, もとだようこ, まつだなつこ, よこやましげゆき

II. 無細胞タンパク質合成系の改良

昨年の本会において発表したように、我々の系では、試験管内で反応をおこなう場合で1mlの反応液当たり0.4mg程度の目的タンパク質を得られるようになっており、さらに、透析により基質交換をおこなう方法を用いると、1mlの反応液を用いて6mg以上のタンパク質が得られるようになっていた。

最近、反応に用いる粗抽出液を調製する大腸菌株について検討をおこなったところ、さらに2倍程度の合成量が得られることがわかり、また、GroEなどのシャペロンタンパク質を反応液に添加すると、合成タンパク質の可溶性や合成量が向上することも判明した。さらに、PCRにより増幅したDNA断片を、クローニングなどの操作を経ずに、そのまま反応の鋳型として用いることも検討した。多数のcDNAクローンを、可能な限り配列非依存的に処理する手順を設計・構築し、実際にマウスのcDNAライブラリーに対して適用し、一定の結果を得た。

III. 無細胞系を利用したタンパク質の安定同位体標識

無細胞系を利用して、均一 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識タンパク質を調製する場合には、原理的には、安定同位体標識したアミノ酸を20種類用意する必要があると考えられる。これまで入手可能な $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識アミノ酸は、Trpを除く19種類であったため、無細胞系を利用したタンパク質の均一二重標識はほぼ不可能であった。この状況を打開するために、日本酸素株式会社の協力により $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Trpを開発した。この標識Trpを用いて、Trp選択的標識Y32W-Rasタンパク質を調製し、NMRスペクトルを測定して、標識源として無細胞系で利用可能であることを確認した。これにより、無細胞系を用いた均一 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識タンパク質の調製が実現可能となった。

次に、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識した藻類のタンパク質画分の酸加水分解物から調製したアミノ酸混合物の利用を検討した。この混合物には、20種のアミノ酸のうち、Asn, Gln, Cys, Trpは含まれていないが、このうち、AsnとGlnに関しては、合成反応中に、アミノ酸代謝系を利用して、AspおよびGluから転換させることにより供給可能であることがわかった。すなわち、上記アミノ酸混合物、Cys、およびTrpを用意することにより、無細胞系を用いて容易に均一 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識タンパク質の調製が可能であることがわかった。Figure 1に、この手法を用いて調製した均一 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識Rasタンパク質の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを示す。

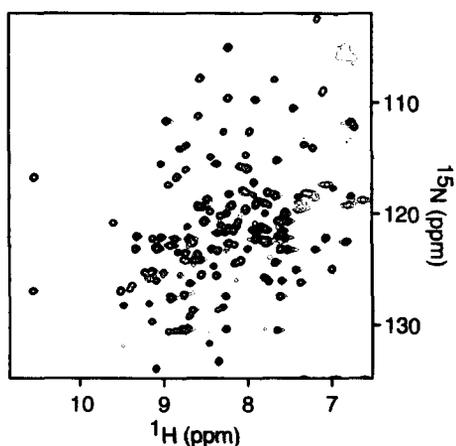


Figure 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Ras protein prepared by the cell-free system with $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -algal amino acid mixture, $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Cys, and $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Trp.

Temperature and Pressure Effects on the Spin-lattice Relaxation Rates of D and ^{17}O Nuclei in D_2O Molecule in Alkali Bromide Aqueous Solutions by NMR Spectroscopy
 Koichi, FUMINO¹; Akio, SHIMIZU²; Yoshihiro, TANIGUCHI¹

¹Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga, 525-8577

²Faculty of Engineering, Soka University, Hachioji, Tokyo, 192-0003

The spin-lattice relaxation rates (R_1) of D and ^{17}O nuclei of heavy water (D_2O) molecule in alkali bromide (LiBr, NaBr, KBr, CsBr) aqueous solutions were measured in the range of 0.1-300 MPa, 0-1.0 molkg⁻¹ and 10-50°C by NMR. The R_1 value decreases with increasing temperature and pressure. The rotational correlation times (τ) obtained by the R_1 value decreases with increasing temperature and pressure and τ is in this order: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{D}_2\text{O} > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$. This implies that the interaction between D_2O molecules becomes weaker with increasing temperature and pressure and that the D_2O molecules rotate more remarkably.

1.はじめに 以前に¹⁾、アルカリブロマイド (LiBr, NaBr, KBr, CsBr) 水溶液中における水分子のD核および ^{17}O 核のスピン-格子緩和速度 (R_1) を 30°C、1.0 molkg⁻¹、0.1-300 MPa において測定した。 R_1 の値は圧力の増加とともに減少し、アルカリ金属イオンに配位する水分子におけるD核および ^{17}O 核の回転相関時間 (τ)の値は各圧力において、 $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{D}_2\text{O} > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ の順になり、圧力の増加とともに減少した。そこで、高圧力下における水分子の回転運動に関する知見をさらに得るため、上記水溶液中における水分子のD核および ^{17}O 核の R_1 を 10-50°C、0-1.0 molkg⁻¹、0.1-300 MPa において測定した。

2.実験方法 R_1 の測定は前報¹⁾と同様に Inversion-recovery 法を用いて行った。測定圧力は 0.1, 50±1, 100±1, 150±1, 200±1, 250±1, 300±2 MPa、測定温度は 10±0.1, 20±0.1, 30±0.1, 40±0.1, 50±0.1°C、溶液濃度は 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 molkg⁻¹とした。 R_1 の測定誤差は3%以内であった。

3.結果および考察 50°C、300MPa におけるアルカリブロマイド水溶液中について、水分子のD核のスピン-格子緩和速度比 (R_1/R_1^0) と溶液濃度 m との関係を図. 1 に示す。 R_1/R_1^0 は m と直線関係にあり、(1)式により与えられる²⁾。(この傾向は ^{17}O 核についても同様であった。)

$$R_1/R_1^0 = 1 + B \cdot m \quad (1)$$

ここで、 R_1^0 は純水における測定核の R_1 、 B はイオン-溶媒間相互作用に関するパラメーターである。(1)式の B はイオン分割により、(2)式が成立する。

NMR、アルカリブロマイド水溶液、水分子、スピン-格子緩和速度、圧力

ふみの こういち、しみず あきお、たにぐち よしひろ

$$B = B^+ + B^- \quad (2)$$

R_1 の値は、二状態モデル³⁾を仮定することにより(3)式として表される。

$$R_1 = (1-x^+x^-)R_1^0 + x^+R_1^+ + x^-R_1^- \quad (3)$$

ここで、 R_1^+ および R_1^- はそれぞれカチオンおよびアニオンに配位する水分子の R_1 、 $x^\pm = n^\pm m/50.0$ 、 n^\pm はイオンの配位数である。(3)式および $B^+(K^+) = B^-(Cl^-)$ を仮定して(4)式が得られる。

$$B^+ = \{(R_1^+/R_1^0) - 1\} \cdot (n^+/50.0) \quad (4)$$

さらに極度尖鋭化条件下では(5)式が成立する⁴⁾。

$$R_1 = (3/40) \{(2I+3)/I^2(2I-1)\} (e^2qQ/\hbar)^2 \times \{1 + (\eta^2/3)\} \tau \quad (5)$$

ここで I はスピン量子数、 e^2qQ/\hbar は四極子結合定数、 η は非対称性パラメーター、 τ は測定核の回転相関時間である。これよりアルカリ金属イオンに配位する水分子の測定核の τ が得られ、10℃および50℃におけるD核の τ についてFig. 2およびFig. 3に示す。 τ の値は、高圧力下において各温度について $Li^+ > Na^+ > D_2O > K^+ > Cs^+$ の順になり、温度の増加とともに減少することが認められた。(この傾向は¹⁷O核についても同様であった。)これは、高圧力下においても温度の増加とともに水分子間の水素結合が弱くなり、水分子が一層速く回転することによるものと思われる。さらに、 τ におよぼす温度依存性および圧力依存性は、一般に $Li^+ > Na^+ > D_2O > K^+ > Cs^+$ の順になることが認められた。

4. 参考文献

- 1) 文野浩一・清水昭夫・谷口吉弘, 第37回NMR討論会要旨集, 611 (1998).
- 2) A. Shimizu and Y. Taniguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 1572 (1990).
- 3) H. G. Hertz, "Water," Plenum Press, New York (1973).
- 4) A. Abraham, "The Principles of Nuclear Magnetism," Oxford University, Oxford (1967).

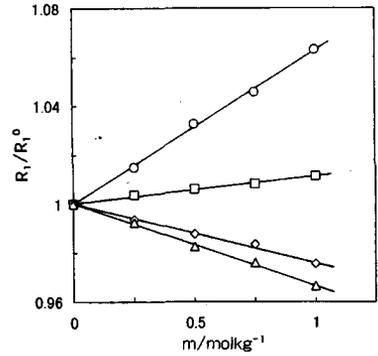


Fig. 1 Concentration dependences of R_1/R_1^0 values of D nucleus in aqueous alkali bromide solutions and pure D_2O at 50°C and 300 MPa.
○: LiBr, □: NaBr, ◇: KBr, △: CsBr

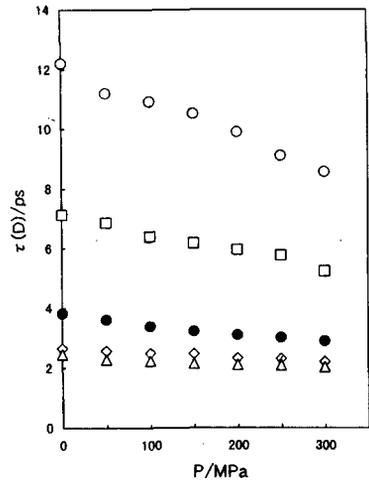


Fig. 2 Pressure dependences of τ values of D nucleus for the coordinated D_2O molecule and pure D_2O molecule at 10°C.
○: Li^+ , □: Na^+ , ◇: K^+ , △: Cs^+ , ●: pure D_2O

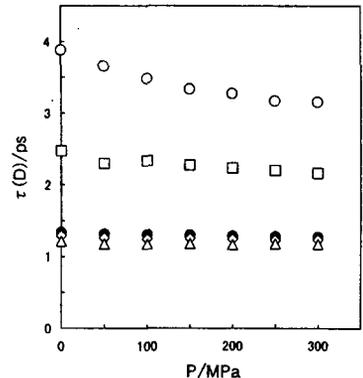


Fig. 3 Pressure dependences of τ values of D nucleus for the coordinated D_2O molecule and pure D_2O molecule at 50°C.
○: Li^+ , □: Na^+ , ◇: K^+ , △: Cs^+ , ●: pure D_2O

Artifactual Attenuation Associated with Large Gradient Pulses in PGSE NMR Diffusion Measurements

(物質研、機能水研究所)

早水紀久子、William S. Price、井出博之、荒田洋治

Kikuko Hayamizu¹, William S. Price², Hiroyuki Ide² and Yoji Arata²

¹National Institute of Materials and Chemical Research
Higashi 1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan

²Water Research Institute, Sengen 2-1-6
Tsukuba, Ibaraki 305-0047, Japan

The pulse-gradient spin-echo (PGSE) NMR experiment requires the sequential generation of two identical gradient pulses. When attempting to measure the translational diffusion of an extremely slowly diffusing and/or quickly relaxing molecule or to trying to probe the structure of restricted geometries, very high amplitude gradient pulses are required. As is well known the imposition of such large gradient pulses with short rise and fall times can generate eddy currents which can greatly degrade the spectra. However, equally serious is the generation of phase-based artifacts resulting from mismatch in the effective area (i.e., the time integral of the gradient pulse) between the sequential gradient pulses. These appear as artifactual attenuation and distortion in the spectra which, in the first instance, is similar to (and commonly mistaken for) the effects of eddy currents (see Figure 1).

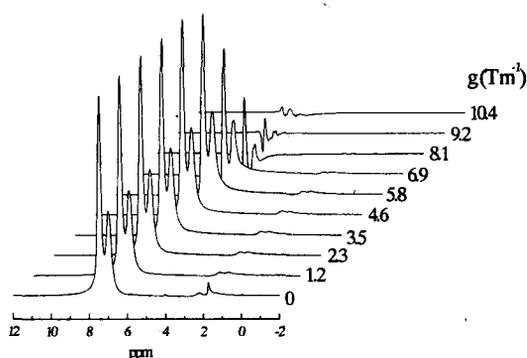


Fig. 1 ¹H PGSE NMR spectra of an extremely slowly diffusing Mw 20 000 000 polystyrene sample using rectangular gradient pulses. The experimental parameters were $\Delta = 20$ ms, $\delta = 2$ ms and g ranging in equal increments from 0 to 10.4 T m^{-1} . The spectra are plotted on the same scale and are presented in phase-sensitive mode. Within experimental error, the signal shows little attenuation or phase distortion up to $g = 4 \text{ T m}^{-1}$. Above $g = 5 \text{ T m}^{-1}$ there was severe phase-shifts/distortion and it is not possible to phase the spectra into purely absorption lineshapes. Above 7 T m^{-1} severe artifactual attenuation (i.e., not diffusion related) of the signal is observed.

Key words: Pulse-Gradient Spin-Echo, Diffusion, Artifactual attenuation, Mismatch

はやみずきくこ、ウイリアム・S・プライス、いでひろゆき、あらたようじ

Small degrees of mismatch cause 'unphysical' concave downward curvature in PGSE attenuation plots. It is interesting to theoretically consider the effects of the gradient pulse mismatch and vibration/sample movement. We define

$$\mathbf{q} = \frac{1}{2\pi} \mathbf{g} \gamma \delta \text{ (m}^{-1}\text{)} \quad [1]$$

and starting from the average propagator representation of the short gradient pulse approximation, but including the effects of a phase-shift, ϕ , due to the effects of a gradient mismatch, $\Delta \mathbf{q}$, and sample movement, $\Delta \mathbf{r}$, between the first and second gradient pulses in the PGSE sequence (NB in $\Delta \mathbf{q}$ and $\Delta \mathbf{r}$ 'Δ' denotes differential and is not to be confused with the interval 'Δ' between the gradient pulses). Thus we have

$$E(\mathbf{q}, \Delta) = \int \rho(\mathbf{r}_0) \int P(\mathbf{R}, \Delta) e^{i[2\pi \mathbf{q} \cdot \mathbf{R} + \phi]} d\mathbf{R} d\mathbf{r}_0 \quad [2]$$

where $\rho(\mathbf{r}_0)$ is the spin density, \mathbf{R} is the dynamic displacement defined by $\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_0$ (the starting and finishing positions of a spin with respect to the first and second gradient pulses), $P(\mathbf{R}, \Delta)$ is the average propagator (i.e., the probability that a spin will move by a displacement \mathbf{R} during the time interval Δ) and the phase term can be expressed as

$$2\pi \mathbf{q} \cdot \mathbf{R} + \phi = 2\pi [(\mathbf{q} + \Delta \mathbf{q}) \cdot (\mathbf{r}_0 + \mathbf{R} + \Delta \mathbf{r}) - \mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_0]. \quad [3]$$

For simplicity the gradient (and therefore \mathbf{q}) is taken to be oriented along the z -direction and it is assumed that $\Delta \mathbf{q}$ is parallel to \mathbf{q} (i.e., a magnitude mismatch). Thus we are only concerned with the z -components of \mathbf{r}_0 , \mathbf{R} and $\Delta \mathbf{r}$ (i.e., z_0 , Z and Δz , respectively) and so Eq. [3] becomes

$$2\pi \mathbf{q} \cdot \mathbf{R} + \phi = 2\pi [qZ + (q + \Delta q)\Delta z + \Delta qz_1] \quad [4]$$

and thus, Eq. [2] can be re-written as

$$E(q, \Delta) = \underbrace{\int P(Z, \Delta) e^{i2\pi qZ} dZ}_{E_{\text{diff}}(q, \Delta)} \underbrace{\left\{ e^{i2\pi(q + \Delta q)\Delta z} \right\}}_{\phi(\Delta z)} \underbrace{\int \rho(z_1) e^{i2\pi \Delta q z_1} dz_1}_{E_{\text{phase}}(\Delta q)}. \quad [5]$$

The first term (i.e., $E_{\text{diff}}(q, \Delta)$) is the attenuation due to diffusion and it is what is really sought in a PGSE measurement. $E_{\text{diff}}(q, \Delta)$ is a real valued function. The second term (i.e., $\phi(\Delta z)$) is the residual phase-shift due to vibration/sample movement (or flow). This term is a complex valued function and produces net-phase-shifts and is likely to produce complicated phase behaviour through the series of spectra in a PGSE measurement since Δz is likely to be a function of q . Note this term depends on Δz and not on z (i.e., it is position independent). The effects of $\phi(\Delta z)$ can be removed by individually phase correcting each spectrum or by computing the absolute value (or magnitude) spectrum (recall, $|\exp(i2\pi(q + \Delta q)\Delta z)| = 1$), although this entails a loss of signal resolution and makes all of the noise in the spectrum positive. If the degree of sample movement is not constant for a given q and if a number of scans are averaged, this term has the potential to produce some signal attenuation. Nevertheless, this problem can still be removed by individual phasing or computing the absolute value spectrum and then adding the spectra.

The third term (i.e., $E_{\text{phase}}(\Delta q)$) is the residual phase-twist resulting from the gradient pulse mismatch. It is the integral of the position (i.e., z)-dependent phase-shifts (this has clear similarity to k -space encoding in imaging) and is independent of D and the interval Δ . This term can result in severe artifactual signal attenuation. $E_{\text{phase}}(\Delta q)$ contributes a sample shape (relative to the gradient orientation) dependent signature to $E(q, \Delta)$ and thus $E_{\text{phase}}(\Delta q)$ is different for different sample/gradient geometries. For a cylindrical sample of length l centred in the gradient we obtain

$$E_{\text{phase}}(\Delta q) = \frac{\int_{-\frac{l}{2}}^{\frac{l}{2}} e^{i2\pi\Delta q z_0} dz_0}{l} \quad [6]$$

$$= \text{sinc}(\pi\Delta ql).$$

$E_{\text{phase}}(\Delta q)$ term cannot be removed by phase correction or by computing absolute value spectra. However, computing absolute value spectra will make negative attenuations positive. From the form of Eq. [6] it can be seen that gradient mismatch can result in artifactual diffraction peaks. Thus, the only real means of avoiding this problem is to have perfectly matched gradient pulses. Although ‘rectangular’ gradient pulses are preferable from a theoretical viewpoint, we found that shaped gradient (e.g., half-sine) pulses with rise and fall times more tractable for the current amplifier and thus are more sequentially reproducible (see Fig. 2). As well as generating fewer phase-based artifacts such shaped pulses also decrease the likelihood of vibration problems.

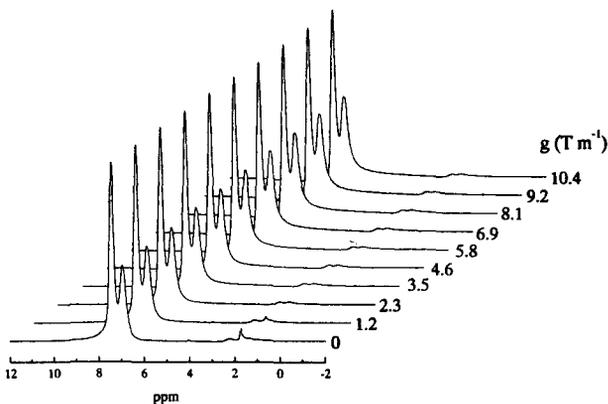


Fig. 2 A ^1H PGSE NMR diffusion measurement similar to that shown in Fig. 1 except that now sine-shaped gradient pulses are used. The sine-shaped gradient pulses were approximated by changing the gradient amplitude through 64 increments. The spectra are plotted on the same scale and are presented in phase-sensitive mode. There is much less artifactual attenuation than observed for the rectangular gradient pulse, nevertheless even using the sine-shaped gradient pulses there is

evidence of slight phase distortion at higher g values. Note for the same duration and gradient amplitude a sine gradient pulses has an integral of only ~ 0.64 of its rectangular counterpart.

Reference

Price, W. S., K. Hayamizu, H. Ide, and Y. Arata. 1999. Strategies for diagnosing and alleviating artifactual attenuation associated with large gradient pulses in PGSE NMR diffusion measurements. *J. Magn. Reson.* **139**, 205-212.

UNUSUAL PROTEINS AND UNCOMMON NMR NUCLEI

Hans J. Vogel

Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, Canada

Modern molecular biology methods are instrumental in producing the isotope-labeled proteins that are required for solution structure determination by NMR. The same methodology can also be used to introduce a variety of unnatural amino acids into proteins at high yield. While the use of fluorinated aromatic amino acids has been well established, our recent work has shown that fluorinated aliphatic amino acids, various methionine analogs, and proline analogs can be incorporated as well into calcium-binding proteins expressed in *E. coli*. Of particular interest is the use of dehydroproline, which provides unique insight into cis-trans isomerism of the X-Pro peptide bond in proteins, which can be studied readily by proton NMR. Seleno- and fluoro-methionine are useful derivatives for multinuclear NMR studies; they provide insight into the role of the sulfur atom of Met sidechains in proteins.

NMR studies of metal ions bound to proteins have usually relied on the use of spin 1/2 substitute nuclei, such as cadmium-113 NMR. We have recently demonstrated that quadrupolar NMR nuclei, such as Al or Ga have advantageous relaxation properties that facilitates their study. In particular the central quadrupolar transition can be observed when such metal ions are bound to relatively large proteins, such as the iron-binding transferrins. The NMR resonances have field-dependent shifts and linewidth, and sharpen with decreased temperature and increased viscosity. Unique information about metal ion liganding and metal motions can be obtained from the peculiar properties of protein-bound quadrupolar nuclei.

Bernhard Blümich

Magnetic Resonance Center MARC, RWTH, D-52056 Aachen

Nuclear magnetic resonance imaging is best known in medicine, where it competes with x-ray tomography. This is so because of its unique contrast features which allow discrimination of different types of soft matter. Basically the same contrast features identify NMR imaging as a powerful method for characterization of soft synthetic matter in industrial and technological applications [1]. For the purpose of NMR, materials rich in protons are most suitable. Such materials are polymers, elastomers, food stuffs, and various pastes and fluids.

Following a brief introduction to NMR imaging and image contrast, different applications [2] of the method will be discussed. For example, in elastomers an interface can be detected by NMR when two rubber sheets with different formulations of additives are covulcanized. Depending on the contrast method, the lateral extension of the interface is found to be narrower than 0.1 mm or larger than 0.2 mm. The narrow interface is detected with chemical shift contrast and defines the chemical interface. The wide interface is detected by differences in transverse relaxation and defines the physical interface which is related to the change in modulus of the sample (Fig. 1). Further applications of NMR imaging of elastomers concern curing, cross-link density, swelling, and static as well as dynamic mechanical mechanical load [3].

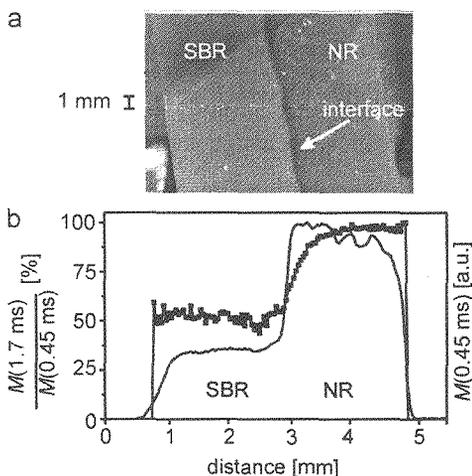


Fig. 1: Images from the interface between unfilled, covulcanized sheets of SBR and NR. a) Photo showing the interface (arrow). b) 1D profiles acquired by single-point imaging with the acquisition delayed by t_1 . The interface between both materials assumes a different width for a chemical-shift weighted profile (rugged curve, right scale) and a relaxation parameter weighted profile (smooth curve, left scale). The corresponding t_1 delays are indicated in the figure.

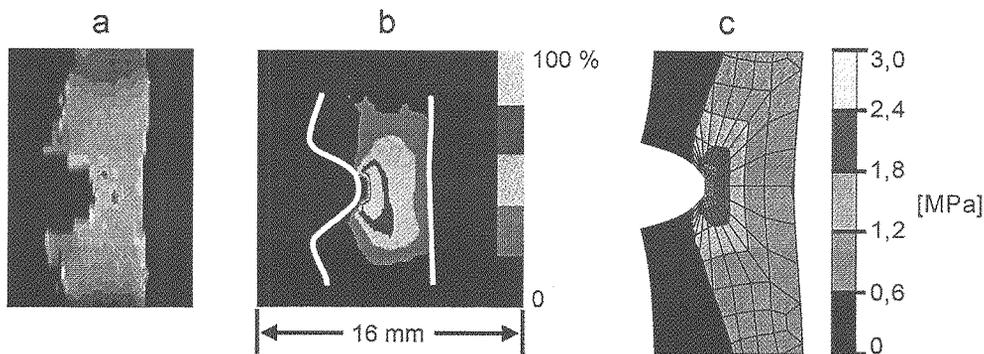


Fig. 2: Stress images of rubber bands with a cut after correction for spin density and relaxation effects. a) ^1H double-quantum filtered image of poly(isoprene). b) ^2H double-quantum image at $\lambda = 1.3$ of deuterated butadiene oligomers incorporated into a rubber band by swelling. c) FEM calculation of stress in a sample similar to *b*.

Contrast in elastomers derives from the of residual dipolar interactions among protons on inter cross-link chains which are only partially averaged because of anisotropic rotational motion. These couplings can be probed by relaxation methods as well as by multi-quantum NMR from dipolar encoded longitudinal magnetization, double-quantum coherences, and triple-quantum coherences. As an example, Fig. 2 shows double-quantum filtered NMR images of strained rubber bands with a cut. The basic features of the proton image (a) are comparable to those of the deuteron image (b) from deuterated spy molecules incorporated into the rubber network by swelling. The observed NMR contrast reproduces the simulated strain distribution (c).

The potential of NMR imaging in chemical engineering is addressed by flow analysis of matter transport in an extruder and by cross-filtration in a hollow-fiber dialysis module. In such experiments the interesting parameters of translational motion are position, velocity, and acceleration. All of them are accessible by different kinds of pulsed field gradient (PFG) NMR, the most representative of which is NMR imaging. Velocity imaging can be understood in terms of a position exchange experiment which correlates the velocity distribution with the position distribution (image). In a similar fashion a velocity exchange experiment [4] can be shown to correlate the acceleration distribution with the velocity distribution [1].

For analysis of large objects the NMR-MOUSE, a *mobile universal surface explorer* has been developed. Its use for quality control and potential applications in process control are illustrated with diverse examples from studies of steel-belted car

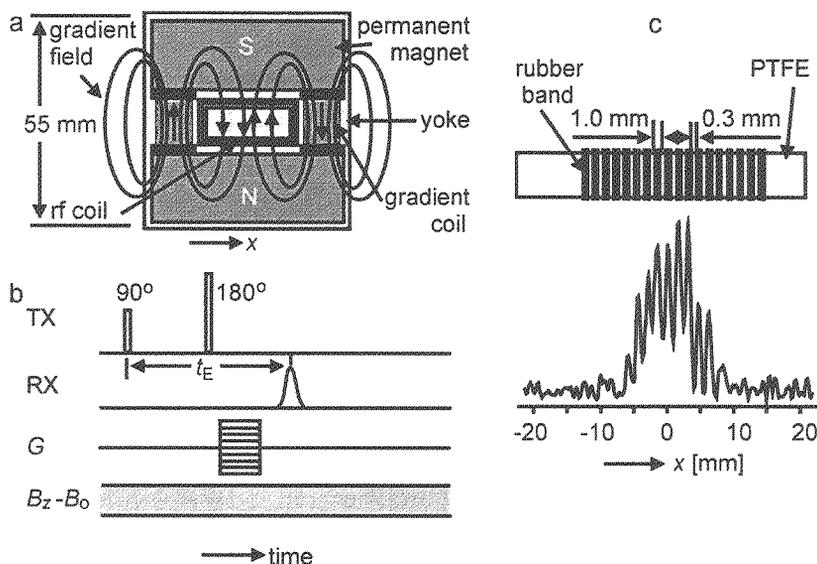


Fig. 3: 1D imaging with the NMR-MOUSE. a) Schematic drawing of the sonde. Coils for pulse field gradients are accommodated within the gap between the two permanent magnets which provide the inhomogeneous field. b) Imaging sequence. Space information is acquired by spin-echo phase encoding. In the echo maximum the inhomogeneity $B_z - B_0$ of the magnetic field of the NMR-MOUSE is ineffective. c) Drawing of the phantom consisting of a rubber band wound around a holder from PTFE. The signal from the rubber band and the signal-free gaps are reproduced within the sensitive volume by the 1D image.

tires, conveyor belts, the Achilles tendon in vivo, coatings on sheet iron [5], and cross-link density of latices. The NMR-MOUSE has been extended to incorporate pulsed field gradients to obtain 1D spatial resolution. First applications concern phantoms (Fig. 3) and rubber sheets with textiles.

References:

1. I. Ando, T. Asakura, eds., *Solid State NMR of Polymers*, Elsevier Science. B. V., Amsterdam, 1998; B. Blümich, *NMR Imaging of Materials*, Oxford University Press, Oxford, in press.
2. P. Blümmler, B. Blümich, *Rubber Chem. Tech.* 70 (1997) 468.
3. P. Blümmler, B. Blümich, R. Botto, E. Fukushima, eds., *Spatially Resolved Magnetic Resonance*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
4. P. T. Callaghan, S. Codd, J. D. Seymour, *Concepts Magn. Reson.* 11 (1999) 181.
5. G. Zimmer, A. Guthausen, U. Schmitz, K. Saito, B. Blümich, *Advanced Materials* 9 (1997) 987.

Development of an MR Microscope Using a Portable MRI Unit and a Clinical Whole-Body Magnet

T. Haishi, T. Uematsu, Y. Matsuda, K. Kose, H. Yoshioka*, and I. Anno*

Institute of Applied Physics and Institute of Clinical Medicine*, University of Tsukuba, Japan

An approach to the low field (1-2 T) MR microscope is proposed for use of MR microscopes in clinical sites. The proposed system uses a magnetic field of a clinical whole body magnet and a portable MRI unit, which works independently of the clinical MRI. Experiments using a 1.5 T clinical whole body magnet presented clear 2D images at (50 mm)² pixel size and 3D images from (150 mm)² to (200 mm)² voxel size. It is thus concluded that the proposed system can be a useful add-on MRI system to existing or future clinical MRI scanners, because neither electrical connection to the scanners nor cost for the magnet is required.

<はじめに>

低磁場 NMR マイクロスコープ (1~2 T) は、臨床用 MRI で取得された画像と、 T_1 や T_2 などのパラメータを高空間分解能で直接比較できるといった利点を有する。これを、病院等で実現する場合には、臨床用 MRI を活用することが最も有効であろう。ハードウェア変更の少ない方法として、小口径 RF コイルと、高性能勾配磁場システムを使用する手法があるが、勾配磁場強度が最高でも 25 mT/m 程度であるので、100 μ m 程度の空間分解能の撮像において、 T_1 強調画像 (TE ~ 5 ms) や、3D 勾配エコー法などの、臨床で使用されるパルスシーケンスの使用は困難である。また、臨床機本体を有効に活用する手法として、小口径勾配コイルと小口径 RF コイルを使用する方法があるが、勾配コイルを繋ぎかえる事は多くの臨床ユーザーにとって、困難とリスクを伴うものである。上記の問題を解決するために、我々は、任意の RF コイルと勾配コイルが接続可能な小型 MRI ユニットと、臨床用 MRI の静磁場のみを用いて、NMR マイクロスコープを実現する手法 (MRMICS) を提案し¹⁾、これまでの報告で、MRMICS が抽出サンプルの撮像に極めて有効であることを示してきた²⁻⁴⁾。二次元画像に関しては、スライス厚 2 mm、面内分解能 100 μ m の画像を、また、三次元画像に関しては、画素サイズが (200 μ m)³ 程度の画像を、それぞれ実用的な時間で計測することが可能であった。本研究では、さらに、*in vivo* における NMR マイクロスコープを実現するために、MRMICS のための 3 軸サーフェイス勾配磁場コイルを開発し、*in vivo* 撮像の基礎実験を行った。

<装置>

Fig.1 に、システムの全体像を示す。Fig.1(左側)の小型 MRI ユニットには、サイズが 54 cm(W) x 77 cm(H) x 60 cm(D)、総重量が 79.5 kg、キャスター付きで可搬型のものを使用した。特徴としては、32 bit DSP システムによるパルスシーケンサ⁵⁾、コンパクトで高性能な DDS (Direct Digital Synthesizer) ユニット、TFT 液晶ディスプレイ(磁石の近傍で使用するには不可欠)などがあげられる。Fig.1(右側)は静磁場を用いるための、1.5 T 臨床用 MRI 装置である。Fig.2 に、開発を行った 3 軸サーフェイス勾配磁場コイル⁶⁾を示す。図中の矢印が指す方向が勾配磁場の軸となっており、また、 G_z 方向が静磁場 B_0 方向となっている。この 3 軸勾配磁場コイルは、ポリエチエン被服銅線直径 (0.5 mm) を用いており、アクリル製板 (2 mm 厚) に瞬間接着剤で固定されている。直流抵抗およびインダクタンスは、 G_x : 2.38 Ω , 790 μ H, G_y : 1.88 Ω , 570 μ H, G_z : 0.92 Ω , 310 μ H であった。

MRMICS, マイクロスコープ, *in vivo*, 勾配磁場コイル

はいしともゆき, うえまつたかあき, まつだよしまさ, こせかつみ, よしおかひろし, あんのいずみ

<撮像実験と結果>

開発を行った3軸サーフェイス勾配磁場コイルの効率を測定するために、撮像実験を行った。被写体は、内径9.0 mmのNMR用試験管の底部に、硫酸銅水溶液と直径6.35 mmのナイロン球を入れた水ファントムである。パルスシーケンスはTR/TE = 100/15 msの2D-SE法であり、FOVは(25.6 mm)²、画素サイズは(200 μm)²、画素数は128²、信号積算回数は1回であった。また、TR/TE/FA = 200 ms/5 ms/60°、画素サイズが(200 μm)³の3D-GE法でも撮像を行った。なお、水ファントムは、コイル平面の中心から約33 mm外側に設置し、RFコイルとしてソレノイド・コイル(内径14 mm, 3巻)を用いた。

Fig.3(a)に、本システムで撮像した水ファントムの2D画像を示す。このように、面内で200 μmの空間分解能の画像を、約13秒で取得する事が出来た。また、開発した勾配コイルの効率は、水ファントムのサーフェイス・レンダリング画像であるFig.3(b)の元画像および撮像パラメータより、G_x: 0.40 G/cmA, G_y: 0.38 G/cmA, G_z: 0.49 G/cmAと計測された。

<まとめ>

*in vivo*におけるNMRマイクロスコープを実現するために、MRMICSのための3軸サーフェイス勾配磁場コイルを開発し、*in vivo*撮像の基礎実験を行った結果、~200 μm程度の空間分解能を達成した。今後のおもな課題として、開発を行ったシステムとサーフェイスRFコイルを接続し、*in vivo*における撮像実験を行うことがあげられる。

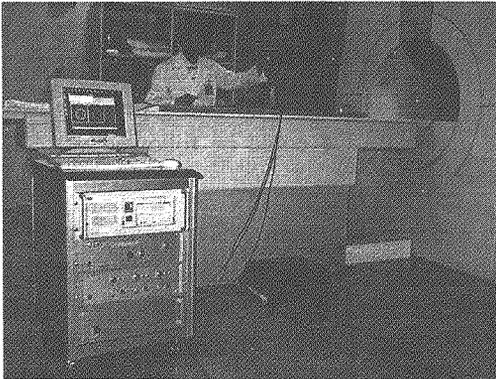


Fig.1: A portable MRI unit (weight: 80 kg), gradient probe, and 1.5 T whole body magnet.

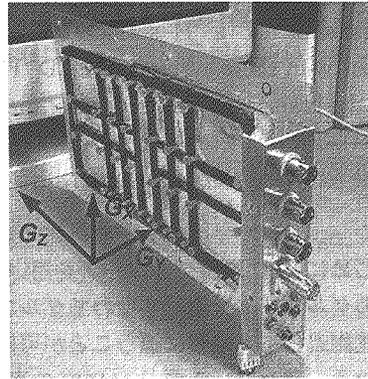


Fig.2: 3-axis surface gradient coil. Size: 20 cm (W) x 10 cm (H).

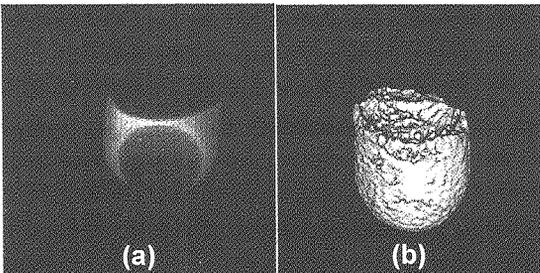


Fig.3: (a) Projection image of a water phantom acquired with 2D-SE (TR/TE = 100/15). FOV: (25.6 mm)², Matrix size: 128², pixel size: (200 μm)², NEX: 1, T_{acq}: ~ 13 sec. (b) Volume rendered surface image of a water phantom acquired with 3D-GE (TR/TE/FA = 200/5/60). FOV: (25.6 mm)³, Matrix size: (64)³, pixel size: (200 μm)³, NEX: 1, T_{acq}: ~ 14 min.

<参考文献>

- 1) K. Kose, et al, 6th ISMRM abstract, pp.1924, 1998.
- 2) 巨瀬勝美・他, 第3回NMRマイクロイメージング研究会講演要旨集, pp.40-43, 1998.
- 3) K. Kose, et al, 7th ISMRM abstract, pp.2036, 1999.
- 4) H. Yoshioka, et al, 7th ISMRM abstract, pp.2119, 1999.
- 5) K. Kose, et al, 6th ISMRM abstract, pp.2021, 1998.
- 6) Z. H. Cho, et al, J. Magn. Reson. 94, pp.471-485, 1991.

マルチスライス HSQC 法を用いた高感度
In Vivo ^{13}C 代謝物イメージング 第三報

(¹ (株) 東芝医用機器・システムセンター, ² 創価大生命科学研究所)

○渡邊英宏¹, 梅田匡朗¹, 石原康利¹, 岡本和也¹

小田正記², 金松知幸², 塚田裕三²

High Sensitive *In Vivo* ^{13}C Metabolite Imaging Using Multislice HSQC

H. Watanabe¹, M. Umeda¹, Y. Ishihara¹, K. Okamoto¹,
 M. Oda², T. Kanamatsu², Y. Tsukada²

¹Toshiba Medical Systems Research & Development Center,

²Institute of Life Science, Soka University

A multislice HSQC sequence is a ^1H [^{13}C] magnetic resonance spectroscopic imaging (MRSI) method with good metabolite resolution via the ^{13}C chemical shifts, which enables us to follow the ^{13}C enrichment of metabolites in multi-volumes in a human brain even on a whole-body scanner. To shorten the preparation period for higher sensitivity, a strong gradient system (maximum amplitude = 30 mT/m and ramp time = 200 μs) was developed. To maximize the sensitivity, a new rf coil system (a QD Bird-Cage coil doubly tuned both to ^1H and ^{13}C for transmission and a ^1H surface coil for detection) was developed. Using a 2T whole-body scanner with these systems, the 2D ^1H - ^{13}C HSQC magnitude-mode spectra could be obtained from the brains of volunteers after the oral administration of glucose C1 (0.5 g per 1 kg body weight). From these spectra, the time-course of glutamate C4 could be followed with 20-minute temporal resolution and with 8-ml spatial resolution.

【はじめに】 ^{13}C 標識グルコースを用いた ^{13}C Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging (MRSI)では、脳内のグルコース代謝、すなわちグルコースからグルタミン酸やグルタミン等といったアミノ酸への代謝過程を非侵襲に追うことが可能であるため、 ^{13}C MRSIは有力な代謝測定法として期待されている。我々は、この ^{13}C MRSIの高感度シーケンスとして、これまでに ^1H 感度、マルチボクセルスペクトロスコピー、代謝物の高分離が可能なマルチボクセル HSQC 法を提案し、人ボランティア試験にて、2T 全身用 MRI 装置を用いて観測時間 16 分で 37 ml の後頭部領域から、2D ^1H - ^{13}C 相関 HSQC スペクトルを取得でき (1, 2)、勾配磁場系の強化により感度を向上させることができることを報告してきた (3)。今回この勾配系の他に、新たに開発した送受信分離型 rf コイル (送信用 ^1H , ^{13}C 二重同調コイルと受信用 ^1H サーフェスコイル) を上記装置に組み込むことにより、20 分の時間分解能で人脳 8 ml の領域から ^1H [^{13}C]グルタミン酸信号を取得することに成功したので報告する。

キーワード: ^1H - ^{13}C HSQC, 脳代謝, *in vivo*, グルコース, グルタミン酸

わたなべひでひろ, うめだまさあき, いしはらやすとし, おかもとかずや, おだまさのり, かなまつともゆき, つかだやすぞう

【方法】 標識グルコースを用いた ^{13}C -MRSI の重要な観測対象であるグルタミン酸に対しては、S/N の点で、HMQC よりも t_1 期で J_{HH} が展開しない HSQC が有利である。この HSQC を全身用 MRI 装置上で実現できるようにしたシーケンスがマルチスライス HSQC シーケンスである (Fig. 1)。このシーケンスでは、準備期内の ^{13}C 反転パルスを準備期 ^1H のエコー時刻より $1/(4J_{\text{CH}})$ 前に印加している。この結果、準備期 ^1H エコー時間 2τ を任意に設定でき、全身用 MRI 装置にてもスライス用 rf および勾配磁場パルスを印加することが可能となる。第 2 の特徴は、 t_1 に続く逆分極移動後に生じられる $2I_z S_z$ の利用である。この状態では ^1H 、 ^{13}C 共に縦磁化であるため、non-observable でありかつ緩和が長い。従ってマルチスライスが適用でき、マルチボクセルスペクトロスコーピーが可能となる。Fig. 1 に示したシーケンスでは、z 方向のマルチスライスにより z 方向に 2 ヶの 3D 局所励起 HSQC 信号を取得することが可能となる。

このマルチスライス HSQC シーケンスでは、信号減衰の原因となる J_{HH} は t_1 期以外すなわち準備期および逆分極移動後に展開する。この準備期間の短縮化のため、立ち上がり時間 = 200 μs 、最大強度 = 30 mT/m の勾配系を開発した (3)。また、均一送信分布および受信感度向上のため、送受信分離型 rf コイル (送信用 ^1H 、 ^{13}C 二重同調コイルと受信用 ^1H サーフェスコイル) を開発した。

ボランティア試験は創価大学生命科学研究所の承認を得て実施し、システムには上記システムを組み込んだ 2T ^{13}C スペクトロスコーピー研究用全身用 MRI 装置 (東芝製) を用いた。試験について文書にて同意を得た成人ボランティアに市販の $[1-^{13}\text{C}]\text{D}$ グルコース (ISOTEC 社製) を体重 1 kg 当たり 0.5 g 溶かした 30% 水溶液で経口にて服用してもらい、その後後頭部領域からのマルチスライス HSQC 信号を取得した。

【結果】 得られた HSQC 信号を再構成し、時間分解能 20 分、空間分解能 8 ml で人脳の 2D ^1H - ^{13}C スペクトルおよび、グルタミン酸 4 位への ^{13}C の取り込みの時間変化を取得できることを確認した。Fig. 2 にグルタミン酸 4 位 (Glu C4) の F_2 方向プロファイルを示す。

【結論】 マルチスライス HSQC 法は人脳のグルコース代謝観測の有効な方法であり、勾配系の強化および送受信分離型 rf コイルによりさらに感度を向上させることが可能である。

【謝辞】 本研究開発は、医療福祉機器技術研究開発制度の一環として、新エネルギー・産業技術開発機構 (NEDO) からの委託により実施したものである。

【参考文献】 1. H. Watanabe, et al., 5th Annual Meeting, ISMRM, 360, 1998

2. 渡邊英宏 他, 第 36 回 NMR 討論会要旨集, P.285, 1997

3. 渡邊英宏 他, 第 37 回 NMR 討論会要旨集, P.271, 1998

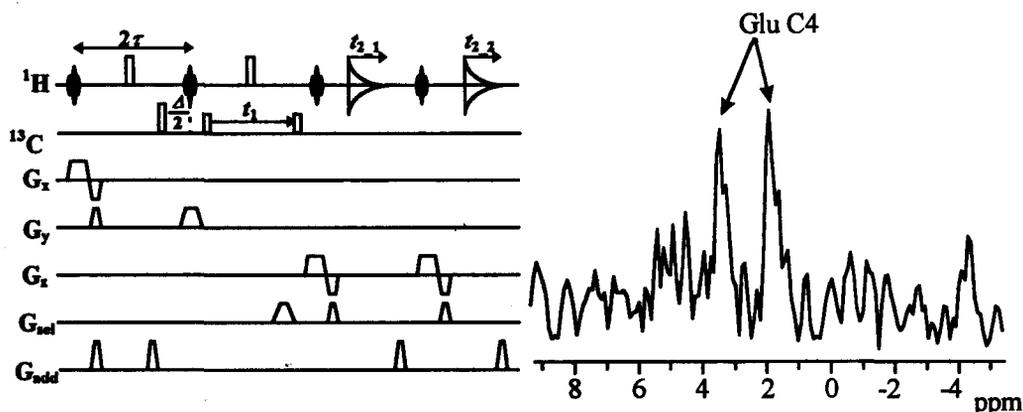


Fig. 1. Multislice HSQC sequence.

Fig. 2. Time resolved HSQC spectrum of the human brain.

2L7 マンガンイオンを用いる動物脳機能イメージング法

○三森文行¹、熊谷 恵^{1,2}、豊岡秀訓²
(¹国立環境研究所、²筑波大医)

Functional Magnetic Resonance Imaging in Animal Brain Based on T_1 shortening by Manganese Ion

F. Mitsumori¹, M. Kumagai^{1,2}, H. Toyooka²
(¹National Institute for Environmental Studies, ²Tsukuba Univ.)

A functional magnetic resonance imaging method for experimental animals was exploited based on the shortening of the T_1 in the activated neurons in which manganese ion intrudes. We modified the method proposed by Lin and Koretsky to reduce the required amount of manganese ion up to approximately one tenth of the original method by introducing manganese chloride directly to the rat brain from the external blood circuit placed at the right carotid artery. Some examples of functional images obtained with activation by neurotransmitter chemicals and by sensory stimulation are demonstrated.

【はじめに】 ヒトの脳機能マッピングのために、小川らの開発したヘモグロビンの磁性変化を用いるBOLD法が広く行われている。しかし、この方法では脳機能の発現に伴う信号変化は数%以下と小さく、脳容積の小さな実験動物での応用は容易ではない。Koretskyらはマンガンを外因性常磁性試薬として用いることにより100%以上に及ぶ信号変化を得られる方法を提案した¹⁾。この方法は、賦活化した神経細胞によるマンガンイオンの取り込みを観測するためBOLD法に比べより直接的な神経活動を見ている等の長所があるが、最大の難点は外部から投与するマンガンイオンが生体に対して毒性を有することである。今回、我々はKoretskyらの方法を一部改良することにより、必要とされるマンガンイオン量を約10分の1に低減することができた。本法による化学物質による脳神経細胞の賦活化や、体性感覚野の刺激の例を示す。

【方法】 Wistar ラットに薬物投与を行うためにhalothane麻酔下(1-1.5%, N₂O 50%, O₂ 50%)において右総頸動脈、内頸動脈間に外部循環回路を設定した。動物の呼吸は人工呼吸器を用い、呼吸数70回/分、1回換気量12ml/kg体重に制御した。手術終了後、halothane麻酔を停止し、 α -chloralose (10mg/ml)とurethane(100mg/ml)の混合溶液を α -chloraloseが35mg/kg体重となるように腹腔内投与した。25% D-mannitol溶液5ml/kg体重を外部循環系より約30秒間で投与

NMRイメージング、脳機能、マンガン、T1強調画像、ラット脳

みつもりふみゆき、くまがいめぐみ、とよおかひでのり

し、右側の血液脳関門を破壊した。さらに、60mM $MnCl_2$ 溶液を1.0ml/hの流速で15分間投与した。化学物質による脳賦活のためには、塩化マンガン投与終了後に外部循環系よりグルタミン酸、ドーパミン、ガンマアミノブチル酪酸(GABA)等を投与し、脳の冠状断面のイメージ測定を行った。体性感覚野の賦活のためには、ラット左前肢皮下に電極を設置し、塩化マンガン投与と同時に強度1.5mA、0.3ms幅の直流電気パルスをも3Hzで15分間与え、左前肢体性感覚野の観測を行った。イメージ測定には、自作の内径50mmのsine コイルNMR信号検出器を用いた。この信号検出器を口径30cmの水平ボア磁石を有するBruker Biospec24/30 NMR分光計に接続して測定を行った。磁場勾配コイルはMagnex社の自己シールド型 AGRAD 255/178を用いた。上記測定システムを用いて、 T_1 強調画像(TR/TE=306/13ms, データ256×256)をスピネコー法により測定した。FOVは5cm、スライス厚は2mm。

【結果と考察】 図1にグルタミン酸により右脳を賦活化した場合のラット頭部 T_1 強調画像を示す。右大脳半球で明瞭な信号増大が認められる。塩化マンガンの投与のみでは脳室部位を除いて信号変化は認められないため、ここで観測された変化はグルタミン酸による脳の賦活を示すと考えられる。グルタミン酸は90%以上の脳神経細胞において神経伝達物質として用いられ、その受容体が脳全体に分布している事実と符合している。Koretskyらの原法では塩化マンガンを下腿静脈より全身的に投与しており、その総量は144 μ moleに昇る。これに対して我々の頸動脈外部循環系からの投与方法では約10分の1の15 μ moleにとどまっている。塩化マンガンは毒性を有し投与量の増大に伴って心機能低下等の弊害が見られるため、マンガン投与量の低減は本法の実用化のためにきわめて重要である。また、我々の方法では下腿静脈のカニューレーションも省略でき、原法に比べて手術侵襲も少なくすむという利点がある。

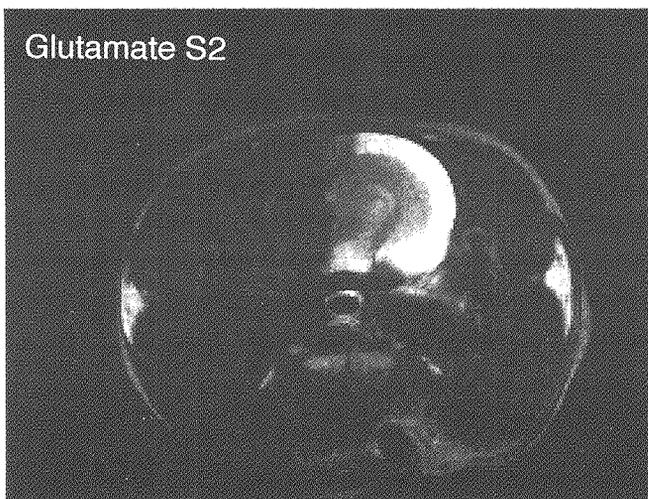


Fig.1 T_1 weighted image (TR/TE =306/13ms) of a rat brain whose right hemisphere was activated by 13 μ mole of glutamate.

【文献】 (1) Y-J Lin, AP Koretsky, Magn.Reson.Med., 38, 378 (1997).

¹H 高磁場固体高分解能 NMR 法を用いた
 ペプチド及びポリペプチドの化学シフトと構造解析
 ○山内一夫¹、黒木重樹²、藤井一馬²、安藤 勲²
 日本ブルカー¹、東工大工²

**Chemical Shifts and Structural Analysis of Peptides and Polypeptides
 Using High Field High Resolution Solid State ¹H NMR**

Kazuo Yamauchi¹, Shigeki Kuroki², Kazuma Fujii², Isao Ando²

Bruker Japan¹,

Department of Chemistry and Materials Sciences, Tokyo Institute of Technology²

High resolution ¹H NMR spectra of glycine (Gly)-containing peptides and polypeptides in the solid state were measured to elucidate the relationship between the hydrogen bond length and ¹H NMR chemical shift. In this study, single pulse experiment was performed with the high speed magic-angle-spinning (MAS) at 30KHz and high resonance frequency (800MHz for proton) for high resolution proton spectra. From these high resolution spectra, it is found that the Gly amide proton chemical shift move downfield with a decrease in the hydrogen bond length between nitrogen and oxygen atoms ($R_{N...O}$). Further, theoretical calculations explain well these experimental results.

結言

ペプチド及びポリペプチドの水素結合はその立体構造を決定するための要因の一つになっている。我々は固体状態での水素結合に関する分子(¹³C, ¹⁵N, ¹⁷O)の化学シフトと結合距離について考察してきた。今回報告するプロトン(¹H)は感度は良いが固体分子中では双極子相互作用が非常に大きいため正確な等方的化学シフトを得ることが一般的に難しく、さらに水素結合に関与しているペプチド及びポリペプチド中では窒素が化学結合しておりその窒素(¹⁴N)との核四極子結合により広幅化する。今回、この核四極子相互作用の除去を目的にマジック角での高速度回転 (30KHz) をおこないそれと同時に測定を高磁場中 (18.8T) で行うことにより核四極子相互作用を除去することを目的として実験を行った。これにより得られた先鋭化されたスペクトルの水素結合をしているアミドプロトンの化学シフトと固体中での水素結合距離 ($R_{N...O}$) について化学シフトの理論計算から求められた化学シフトと水素結合距離の結果と比較検討を行った。

¹H、固体高磁場 NMR、ペプチド、化学シフト

やまうちかずお、くろきしげき、ふじいかずま、あんどういさお

実験・結果・考察

^1H NMR スペクトルは Bruker 社製分光器 Avance 800 に 2.5mmMAS プローブを用いて Figure 1 の脚注に示すグリシンを含む 9 種類のペプチド及びポリペプチドについて測定を行った。測定条件としてはそれぞれシングルパルス法で MAS 回転 30kHz、繰り返し時間 10sec、積算回数 16 回でスペクトルを得た。

9 種類のペプチド及びポリペプチドのスペクトルを Figure 1 に示す。これらのスペクトルは通常のプロトン MAS スペクトルに比べてはるかに先鋭化がなされており高磁場と高速回転で行う測定極めて有用であることがわかる。これらのスペクトルの各ピークは図中に示すようにそれぞれのピークを帰属することができた。また、水素結合に関与しているアミドプロトンのピークも観測されそれぞれ帰属することができた。

これらのスペクトルから得られた水素結合を形成しているアミドプロトンの化学シフトと X 線構造解析から得られている水素結合距離($R_{\text{N}\cdots\text{O}}$) の関係を Figure 2 に示す。これから水素結合距離が短くなることによりプロトンの化学シフトは低磁場シフトすることがわかる。ab-initio 6-31G** 法による理論化学シフト計算の結果も実験結果と同様なシフト傾向があることがわかった (Figure 2)。

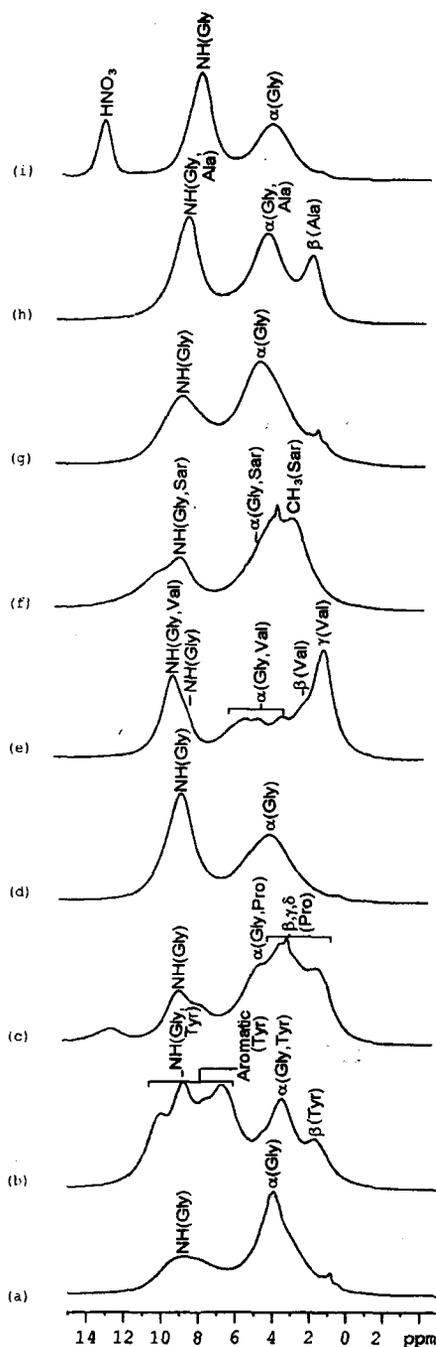


Figure 1 ^1H MAS NMR spectra of Gly-containing peptides and polyglycines by single pulse method at a MAS rate of 30 kHz at 800MHz. (a) polyglycine (form II), (b) Tyr-Gly-Gly, (c) Pro-Gly-Gly, (d) Gly-Gly, (e) Val-Gly-Gly, (f) Sar-Gly-Gly, (g) polyglycine (form I), (h) Ala-Gly-Gly, and (i) Gly-Gly · HNO_3 .

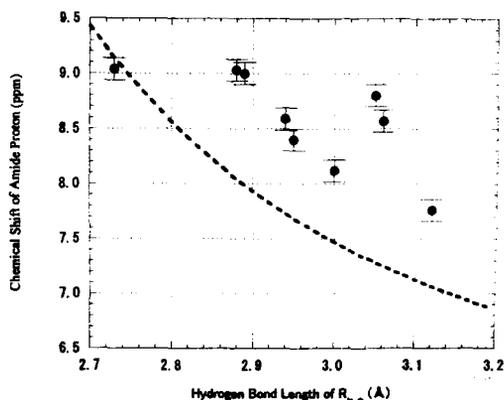


Figure2 Plots of the determined ^1H chemical shift values (δ) of hydrogen-bonded Gly amide protons of Gly-containing peptides and polyglycines in the solid state against their hydrogen-bond lengths between amide nitrogen and oxygen atoms($R_{\text{N}\cdots\text{O}}$) as determined from X-ray diffraction. The bars indicate the experimental errors in the spectra. The dotted line is the result of the theoretical calculation.

2L9

マジック角試料回転条件で同種核双極子相互作用により 高効率で磁化移動するための複合ラジオ波駆動リカップ リングパルス系列

(横浜国大・工) ○藤原敏道、Purnima Khandelwal、阿久津秀雄

Composite Radio-Frequency Driven Recoupling Pulse Sequence for Efficient Magnetization Transfer by Homonuclear Dipolar Interaction under Magic-Angle Spinning Conditions

Toshimichi Fujiwara, Purnima Khandelwal, and Hideo Akutsu

Faculty of Engineering, Yokohama National University, Yokohama 240-8501, Japan

Magnetization transfer in rotating powdered solids under the radio-frequency driven recoupling (RFDR) pulse sequence is enhanced by reducing the orientation dependence of the homonuclear dipolar interaction recoupled. Composite RFDR (CRFDR) pulse sequence for the enhancement consist of RFDR units ($\tau_i - \pi - \tau_R - \pi - \bar{\tau}_i$) with different τ_i , where τ_R is the sample rotation period, τ_i and $\bar{\tau}_i$ ($= \tau_R - \tau_i$) are delays. The delay τ_i modifies the zero-quantum spin operators and the sample rotation-angle dependence of the effective dipolar Hamiltonian. Numerical simulation for a two-spin system with a dipolar interaction and isotropic chemical shifts indicates the maximum transferred magnetization by CRFDR is larger than that by the RFDR pulse by about 30% over a broadband. Experimental results for ^{13}C -labeled amino acid also confirmed the improvement.

【はじめに】

固体高分解能NMRで核スピン間の双極子結合による磁化を移動する方法は、多次元化学シフト相関分光法、距離測定や二面角測定を行なう上で基礎となるものである。この約10年間にそのような測定法のためにマジック角試料回転条件で同種核双極子相互作用が働くようにするリカップリングパルス列が多く開発されてきている。それら測定法の感度を高めるには、このリカップリングにより高い効率で磁化を移動させることが必要である。双極子相互作用はその角度依存性により大きさに分布が生じるため、磁化移動を行なった場合には2スピン系では一方のスピン磁化の約50%が他方に移る。この角度依存性を減少させることができれば、磁化移動効率を大きく向上させることができる。私たちは180°パルス列であるRFDR法についてこのような考え方を適用し、リカップリングされる同種核双極子結合のゼロ量子成分について試料回転により変化する角に対する依存性を減少させ、広い帯域にわたって磁化移動効率を向上させた。この方法の理論、計算機シミュレーションと ^{13}C 標識アミノ酸についての実験結果を報告する。

固体NMR、リカップリング、安定同位体標識、マジック角試料回転、核双極子相互作用、

ふじわらとしみち、プルニマ カンデルワル、あくつひでお

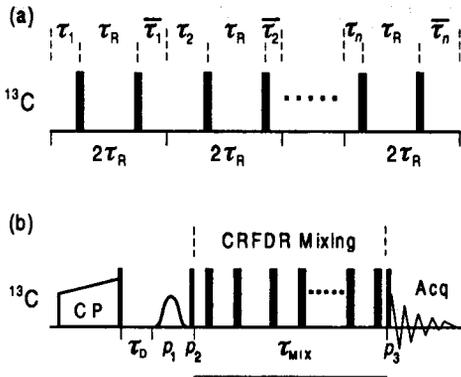


Fig1. (a) Pulse sequence CRFDRn. (b) Pulse sequene for magnetiazion transfer with CRFDR. τ_R : spinning period.

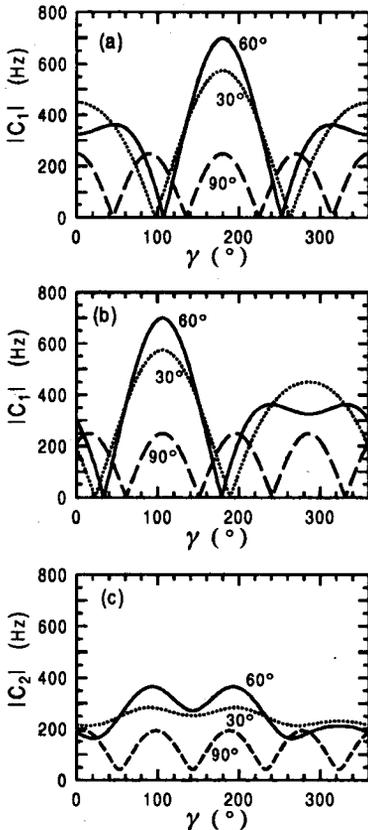


Fig.2 (a) Recoupled dipolar coupling strength C_1 under RFDR unit at $\tau = 0.5 \tau_R$ depending on β and γ . β shown in Figure and γ are Euler angles for the coordinate transformation from PAS to Spinner frame. (b) C_1 at $\tau = 0.7 \tau_R$ (c) Recoupled dipolar coupling strength C_2 under CRFDR2 with $\tau_1 = 0.5 \tau_R$ and $\tau_2 = 0.7 \tau_R$.

【理論】CRFDRパルス系列(図1 a)の試料2回転周期が今までのRFDRにパルス列に対応する。このCRFDRnパルス列はn個のRFDRユニットからなる。しかし各ユニットの π パルスの位置は τ_i の分だけ異なっている。一つのRFDRユニットの有効双極子相互作用は次のように表せる

$$C_1 \{ (I_{1x} I_{2x} + I_{1y} I_{2y}) \cos \phi_i - (I_{1y} I_{2x} - I_{1x} I_{2y}) \sin \phi_i \}$$

ここで、 $\phi_i = \delta_{12}(2\tau_i - \tau_R)/2$ 、 δ_{12} は共鳴周波数差である。 C_1 の静磁場に対する角度依存性を異なる二つの τ_i について図2 a,bに示した。上の式と図2に示すように τ_i は双極子結合の角度依存性部分と上の式のゼロ量子演算子の位相をともに変調する。このことを利用して異なる τ_i を持つRFDRユニットを連続させることで見かけ上双極子結合の角度依存性を小さくすることができる(図2C)。

このCRFDRによる磁化移動の混合時間依存性を図3aに、その帯域が広く移動効率が高いことを図3bに示す。2スピン系の計算では、CRDDRの磁化移動効率は70%以上でありRFDRより、約35%効率が高い。

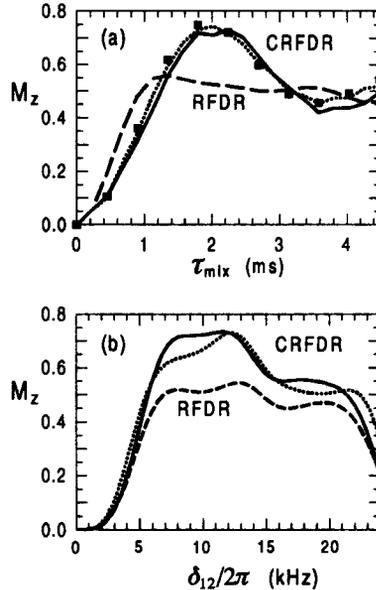


Fig.3 (a) The z Magnetization Transferred with CRFDR4 (solid), CRFDR2(dotted) and RFDR (dashed). (b) Transferred magnetization depending on resonance frequency difference.

2L10

ビタミンD₃誘導体の固相合成におけるSR-MAS測定の利用

東工大院理工1、日本電子2

高橋孝志1、○土黒一郎1、土井隆行1、津野久幸2

Application of SR-MAS NMR on the solid phase synthesis of the vitamin D₃ system
Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology 1, JEOL Ltd. 2
Takashi Takahashi 1, Ichiro Hijikuro 1, Takayuki Doi 1, Hisayuki Tsuno 2

Abstracts: Recently, solid phase synthesis has become a powerful tool for the preparation of not only oligopeptides and oligonucleotides but also small molecule libraries. In the development of a solid phase synthesis, the characterization of resin bound compounds in each reaction is important, especially in that of small molecules. We describe the application of SR-MAS (Swollen-Resin Magic Angle Spinning) NMR for monitoring reactions and structural determinations on solid phase. For the solid phase synthesis of the vitamin D₃ system, the sequential coupling of three components, the polymer-supported 8-keto CD-ring at the 11-hydroxy position, A-ring moieties, and the Grignard reagents was performed on a polystyrene resin. The correspondence of the ¹³C NMR spectra of products on a solid support with that on a solution phase synthesis ascertained the utility of SR-MAS NMR for a solid phase synthesis.

近年、短期間に多種類の低分子量化合物を合成する手法として、コンビナトリアルケミストリーを指向した固相合成法が注目を集めている¹⁾。ある化合物の誘導体合成に際し、多種類用意した各構成要素を組み合わせて化合物群を合成する方法論がコンビナトリアルケミストリーであり、固相合成法を適用することにより反応の後処理が簡便となるため、コンビナトリアル合成の自動化を可能とする。しかしながらこの有用な固相合成を行うにあたり、固相上に担持した化合物の構造決定²⁾には、通常液相合成において最も汎用的に利用されるNMRはそのまま適用することができない。そのため、基本的に官能基の有無しか確認できないIRにより固相上の化合物を確認するか、高分子担体から切り出した後に構造決定することが多く、固相合成ルートの開発は多大な労力と時間を要した。

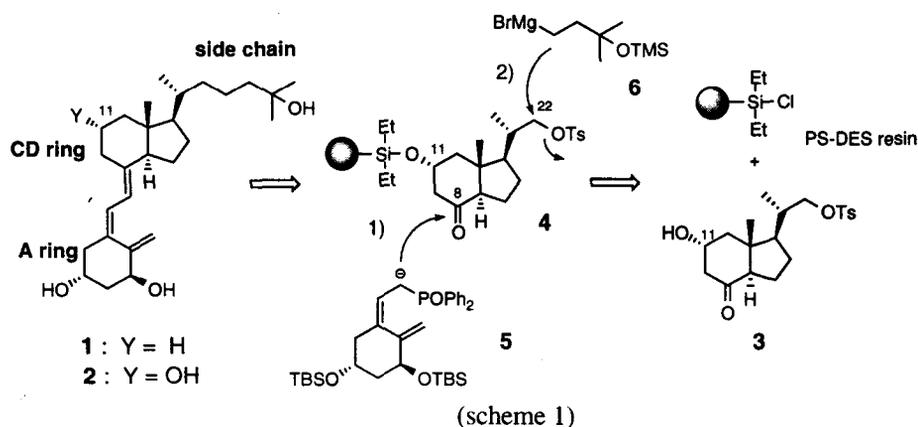
そこで、我々は固相上に化合物を担持したまま通常の液相合成と同様に反応のモニターおよび生成物の構造決定を行うために、SR-MAS (Swollen-Resin Magic Angle Spinning) NMR法³⁾を用いることとした。SR-MAS NMR法とは、化合物を担持したビーズを溶媒で膨潤させ、静磁場に対してマジックアングル角で回転させ¹³Cの高分解能NMR測定を行う手法である。この手法を適用することにより、多種類の

キーワード：SR-MAS測定、ビタミンD₃、固相合成

著者ふりがな：たかはしたかし、ひじくろいちろう、どいたかゆき、つのひさゆき

ビタミンD₃誘導体の固相合成ルート^{4), 5)}を容易に確立することに成功したので報告する。

具体的には、11位に水酸基を有するビタミンD₃誘導体**2**の固相合成について検討した(Scheme 1)。はじめにシリルリンカーを有するレジン(PS-DES resin)⁶⁾に対し、11位に水酸基を有するCD環**3**を導入する。次に固相上に導入したCD環**4**に対し、22位トシル基を損なうことなく Wittig 反応でA環**5**を導入、続いて生成したトリエン骨格を損なうことなく側鎖**6**を Grignard 反応で導入する。最後に、酸による切り出しを行い、ビタミンD₃誘導体を得ようと考えた。その各反応後のビーズに対するSR-MAS測定により得た¹³C NMRチャートと、液相で同反応を行い合成した11位水酸基のTES基保護体の¹³C NMRチャートとの比較を行い、固相反応のモニターを行った。その結果、それらは非常によい一致を見せ、容易に固相反応のモニターを行えたことにより、SR-MAS NMR法の有用性を確認した。



References

- 1) In *Combinatorial Chemistry*; Wilson, S. R.; Czarnik, A. W., Eds.; John Wiley: New York, 1997.
- 2) Egner, B. J.; Bradley, M.; *DDT* **1997**, 2, 102.
- 3) Kobayashi, S.; Akiyama, R.; Furuta, T. Moriwaki, M.; *Molecules Onlines*. **1998**, 2, 35.
- 4) Doi, T.; Hijikuro, I.; Takahashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6749.
- 5) For reviews of vitamin D, see: a) Zhu, G.-D.; Okamura, W. H. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 1877. b) Bouillon, R.; Okamura, W. H.; Norman, A. W. *Endocrine Rev.* **1995**, 16, 200.
- 6) a) Hu, Y.; Porco, J. A., Jr.; Labadie, J. W.; Gooding, O. W.; Trost, B. M. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4518. b) Hu, Y.; Porco, J. A., Jr. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2711. c) Doi, T.; Sugiki, M.; Yamada, H.; Takahashi, T.; Porco, J. A., Jr. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2141.

第3日 10月15日(金)



3L1 超臨界流体用の *in-situ* 高圧 NMR プロープの開発

(¹阪大院理,²帝人,³神戸薬大) 永阪文惣^{1,2}, ○江口太郎¹, 中山尋量³, 中村亘男¹

Design of *in-situ* High-pressure NMR Probe for Supercritical Fluids

Bunsow Nagasaka^{1,2}, Taro Eguchi¹, Hirokazu Nakayama³, Nobuo Nakamura¹

(¹Grad. Sch. of Science, Osaka University, ²Teijin Ltd., ³Kobe Pharmaceutical University)

A convenient high-pressure NMR probe has been designed. It consists of a high-pressure zirconia cell attached to a Be-Cu flange and a solenoid coil, and is connected to a gas handling system by means of Swagelok connectors. This probe can be applied to various types of heterogeneous systems at 0 - 20 MPa, and is easily installed into a wide bore superconducting magnet (e.g., for Bruker MSL-200). High-pressure ¹²⁹Xe NMR spectra were measured under the supercritical condition in order to study the structure and dynamics of xenon adsorbed in mesoporous FSM-16. ¹²⁹Xe NMR spectrum ($\nu_0 = 55.6$ MHz) consists of two lines. One peak at a high field is due to the free Xe gas and another at a low field to the adsorbed Xe into FSM-16. According to an empirical relation for ¹²⁹Xe chemical shift in the micropore system, the observed chemical shift (62 ppm) for adsorbed Xe at the low pressure limit leads to the mesopore diameter of 1.0 nm, which is much smaller than that determined by XRD (2.7 nm). With increase in the pressure the linewidth of the adsorbed Xe becomes very broad and cannot be described by a single Lorentzian lineshape.

簡易型高圧 NMR プロープ

高圧 NMR プロープはこれまでもいろいろなタイプのもので製作されており[1], 本討論会においても既にいくつか発表されている。いずれのプロープも一長一短があるが、特に固体を含む不均一試料の測定は非常に困難である。

そこで、われわれは、つぎのような簡易型高圧 NMR プロープを開発した。

1. 固体を含む不均一試料を、たとえば超臨界 CO₂ 雰囲気下 ($T_c = 31.4$ °C, $P_c = 7.3$ MPa, $\rho_c = 0.47$ g/ml) で測定できる[2].
2. 遷移金属触媒を用いた (水素化) 反応などの *in situ* 測定が可能。
3. 圧力範囲 : 0 ~ 20 MPa (ガス圧) ; 圧力上昇・下降の両方向の測定が可能。
4. 固体 NMR 装置 (Bruker MSL200 など) に簡単に組み込める。
5. 温度範囲 : -100 °C ~ +200 °C (現時点では約 0°C ~ 50°C まで)
6. 超伝導シムだけで十分な分解能を達成する。

超臨界流体, *in-situ* NMR, 高圧プロープ, FSM-16, 固体 NMR

ながさか ぶんそう, えぐち たろう, なかやま ひろかず, なかむら のぶお

7. 試料の充填を容易に行えるセルであること。
8. デッドボリュームを少なくして安全性を確保する。

Fig. 1 にプローブヘッドの断面図を示す。全体の外形は、Bruker の室温シムコイル内に装着できるように市販プローブに倣っている。固体試料にも使えるようにするために、コイルはソレノイド型（太さ 1.2 mm の Cu 線；現在の帯域は 42 - 64 MHz）を採用したので、耐圧のジルコニア（材質は Z201N）製 NMR セル（試料部は外径 9 mm、内径 5 mm、長さ 35 mm、内容積約 0.8 ml；max. 20 MPa）は水平に置く。このセルを O-リングを介して Cu-Be 製のフランジに取り付けている。フランジとジルコニアのセルは簡単にプローブ本体から取り外しできるので、試料を高圧セルに充填するのはきわめて容易である。

フランジには 1/8 インチの耐圧ステンレス管を溶接し、それを超伝導磁石の外側の圧力系と接続した。接続用の Swagelok 部分を含めて部品は非磁性のステンレス製で、ラインには 1/4、1/8 インチの肉厚ステンレスを用いた。圧力系から高圧セルの間のデッドボリュームは約 8 ml である。また、加圧ガスを一時貯めておくための凝縮用シリンダーを接続できるポートを設けることによって、加減圧調整およびガス回収を可能にした。圧力は、MKS のバラトロン・キャパシタンスマノメータで測定中もモニターできるようにした。この高圧ラインにより非常に簡便に圧力の上昇方向ばかりでなく、下降方向の測定も可能になる。

高圧プローブの感度と磁場のシムの効果などを確認するために、5 mm ϕ のガラス管に封じた 5 気圧の Xe ガスの ^{129}Xe NMR の信号を観測した (T_1 を短くするために NaY 型のゼオライトを入れた)。超伝導シムだけで、線幅が 1.5 ppm となり、 ^{59}Co 、 ^{129}Xe や固体の ^{13}C スペクトルの場合には十分な高分解能を達成できるはずである。感度も MSL-200 用 static probe と同程度であった。

温度制御には、Bruker の窒素吹き付けのシステムをそのまま使用する。プローブヘッド部分はテフロンシートで少し断熱しているが、不十分なので、ガラス製の真空ジュワーを取り付けられるよう改良を進めている。

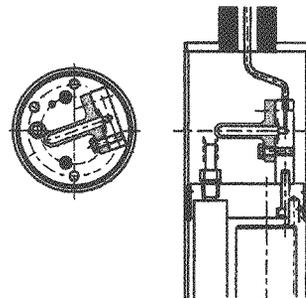


Fig. 1. Schematic diagram of *in-situ* high-pressure NMR probe

FSM-16 のメソ細孔に吸蔵された Xe の高圧 ^{129}Xe NMR

マイクロ細孔内に吸着した Xe の ^{129}Xe 化学シフトと細孔径や細孔構造との関係については、多くの研究がなされているが[3], FSM-16 などのメソ細孔をもつ系では研究例はまだほとんどない。今回は高圧プローブの試運転を兼ねて FSM-16 (メソ細孔径 2.7 nm : 筒状孔) に吸着させた Xe の ^{129}Xe NMR (共鳴周波数 55.6 MHz) を, Bruker MSL-200 分光計を用いて 0.1 - 10 MPa の圧力範囲で測定した。

Fig. 2 に $T = 295\text{ K}$ での測定結果を示す。共鳴線が 2 本観測されることから、吸着 Xe (○) と Free Xe gas (●) との交換は 0.2 ms ($\Delta\delta \approx 100\text{ ppm}$) より遅いことがわかる。Free Xe の ^{129}Xe 化学シフトは、気体の密度にほぼ比例して変化するが、臨界点 ($T_c = 289.8\text{ K}$, $P_c = 5.8\text{ MPa}$) 付近で密度が急激に大きくなり、6.5 MPa 以上でいわゆる超臨界流体になる。一方、メソ細孔内の ^{129}Xe 化学シフトおよび線形の圧力

依存性は気体とはまったく異なり、2 MPa 以上で吸収線形は複数の幅広い成分の重ね合わせであらわされるが、臨界点を超えると鋭い 1 本の吸収線形に戻る。なお、NMR 測定の前前後で試料の XRD パターンに変化がないことを確認した。

一般にゼオライトなどのマイクロ細孔の場合は、低圧の ^{129}Xe の化学シフト(δ)は、

$$\delta = \delta_0 + \delta_s + \delta_{Xe} \quad (1)$$

で書き表わされる[4]。ここで、 δ_0 は 0 MPa に補外した Xe ガスの化学シフト値 (0 ppm), δ_s は Xe と細孔壁との衝突による寄与, δ_{Xe} は Xe どうしの衝突による寄与で、この項は密度に比例する。したがって、吸着量が少ない場合には、 δ_s が主要な寄与をする。Xe の van der Waals 直径を D_{Xe} , 筒状の細孔径を d とすると、つぎのような経験的な関係 (自由行程モデル) が導かれる[5]。

$$\delta_s = a\delta_0 / (a + d - D_{Xe}) \quad (2)$$

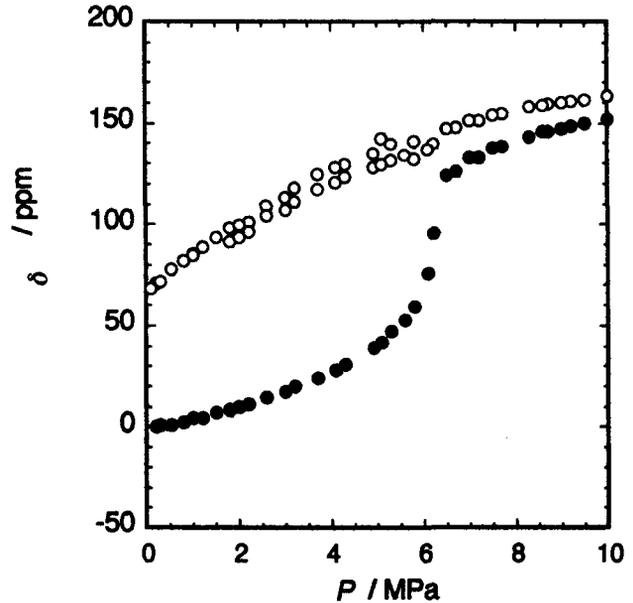


Fig. 2. Pressure dependence of ^{129}Xe NMR in FSM-16

ここで、 δ_s は細孔壁への吸着に固有な化学シフト、 a は定数である。

Fig. 1で0 MPaに補外した値(62 ± 2 ppm)から、式(2)を使って cylindrical pore の直径を見積もると約 1.0 nm となり、XRD の実測値 2.7 nm の半分以下になる。メソ細孔の場合は単純な自由行程モデルでは説明できないことがわかる。しかし、上の化学シフト値をモルデナイトの筒状の細孔(径 0.67×0.70 nm)内に吸着した Xe の値 105 ppm と比較すると[6]、FSM-16 のメソ細孔径がモルデナイトの細孔よりずっと大きくなっていることは明らかである。さらに、吸収線形の圧力依存性についても詳しい解析を進めている。

なお、本プローブを用いて、高圧 ^{129}Xe NMR 測定により高分子中の自由体積を評価した。メソ細孔中とはまったく異なる圧力依存性を示し、本討論会の P 93 で、その結果を報告する。

FSM-16の試料を提供して下さった豊田中央研究所の稲垣伸二氏に感謝いたします。

参考文献

1. (a) J. Jonas, D. L. Hasha, W. J. Lamb, G. A. Hoffman, and T. Eguchi, *J. Magn. Reson.*, **42** (1981) 169; (b) S. Gaemerts, H. Luyten, J. M. Ernsting, and C. J. Elsevier, *Magn. Reson. Chem.*, **37** (1999) 25; (c) J. W. Rathke, R. J. Klingler, R. E. Gerald II, K. W. Kramarz, and K. Woelk, *Progress in NMR Spectroscopy*, **30** (1997) 209.
2. (a) "Super critical fluids," *Chem. Rev.*, **99** (1999) pp. 353 - 634; (b) J. W. Rathke, *Organometallics*, **10** (1991) 1350; (c) R. J. Klingler and J. W. Rathke, *J. Am. Chem. Soc.*, **116** (1994) 4772.
3. (a) P. J. Barrie and J. Klinowski, *Progress NMR Spectroscopy*, **24** (1992) 91; (b) C. Dybowski, N. Bansal, and T. M. Duncan, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **42** (1991) 433; (c) D. Raftery and B. F. Chmelka, *NMR Basic Principles and Progress*, **30** (1994) 111.
4. T. Ito and J. P. Fraissard, *J. Chem. Phys.*, **76** (1982) 5225.
5. (a) J. Demarquay and J. P. Fraissard, *Chem. Phys. Lett.*, **136** (1987) 314; (b) B. Nagasaka, T. Eguchi, H. Nakayama, N. Nakamura and Y. Ito, *Radiation Physics and Chemistry*, in press. (1999).
6. J. Nagano, T. Eguchi, T. Asanuma, H. Masui, H. Nakayama, N. Nakamura, and E. G. Derouane, *Microporous and Mesoporous Mater.*, in press. (1999).

3L2

^{129}Xe 用連続フロー型スピン偏極装置： 高濃度 Rb 光ポンピング触媒における最適化されたセルの構造

¹電子技術総合研究所、²大阪工業技術研究所

○服部峰之¹、平賀隆²、守谷哲郎¹

CONTINUOUS-FLOW APPARATUS FOR HYPERPOLARIZATION OF ^{129}Xe :
OPTIMIZED STRUCTURE OF CELL FOR EFFICIENT SPIN EXCHANGE AT A HIGH CONCENTRATION
OF OPTICALLY PUMPED RUBIDIUM.

Mineyuki Hattori¹, Takashi Hiraga² and Tetsuo Moriya¹

¹Electrotechnical Laboratory, Tsukuba 305-8568; ²Osaka National Research Institute, Ikeda 563-8577.

We propose a specialized apparatus for hyperpolarization of Xe. The flow-through type apparatus for the polarization of noble gas nuclear spins using high-power diode laser arrays (794.7nm, 12W) was constructed. The performance for the polarization of natural abundant Xe gas was evaluated. In order to optimize the pumping condition, the shape of pumping cell, flow rate and temperature of the cell was varied.

【概要】Xe ガスのスピン偏極は、通常スピン交換法により行われるが、溜式の偏極装置においては、最終的に到達する偏極率の平衡値は、 ^3He では数十％に達するのに対し、 ^{129}Xe では数％程度が上限である[1,2]。図1に溜式のスキームで行った偏極XeのNMR信号を示すが、偏極率は1％程度である[3]。しかし、XeはHeよりも様々な物質と相互作用が強く、NMR・MRIで利用する上で ^{129}Xe の偏極率を向上させることは重要な課題である。ここでは、励起源としてダイオードレーザーアレイ(794.7nm, 12W)を利用し、偏極度の高い ^{129}Xe を効率よく得ることに特化した、フロー型の光ポンピング装置について発表する。

【課題】これまでの円筒状ガラス容器を採用した偏極装置[4,5]では、励起光強度は入射方向の入射面からの距離に依存して、ランベルト-ベールの式に従い、指数関数で減少する。円筒状ガラス容器内でのRb等の濃度は、励起光が強い部位に最適化して決定するため、入射面からの距離が離れた励起光強度が弱い部分かなりの体積を占めることになる。こうした励起効率の低い部位での偏極率の低下は、Xe等分子が拡散によって励起効率の高い部位に移動することにより解消されるが、全体の励起効率を低下させている原因となっている(実際に偏極された ^{129}Xe

の量は5%程度)。 ^4He をバッファーガスに用いて3気圧以上の高圧下で ^{129}Xe を選び偏極させ、液体窒素でトラップして貯蔵する装置の報告がある[5]。高圧にしている理由は、高圧広幅化によりレーザー励起光を効率よく吸収させるためである。我々は、フローセルを用いて常圧付近で安全にガスを流しながら偏極希ガスを製造し、後方に核磁気共鳴装置を配置することで連続的に偏極希ガスを発生させた後、偏極率を減少させずに短時間でNMR測定を行える偏極装置を報告した[6]。ここでは、この装置のセル形状を改良することで、安全にガスを流しながら、偏極率をさらに向上させた偏極希ガスの発生方法を最適化することを目的としている。

キーワード： ^{129}Xe 、フローセル、スピン偏極、光ポンピング、スピン交換

はっとりみねゆき、ひらがたかし、もりやてつお

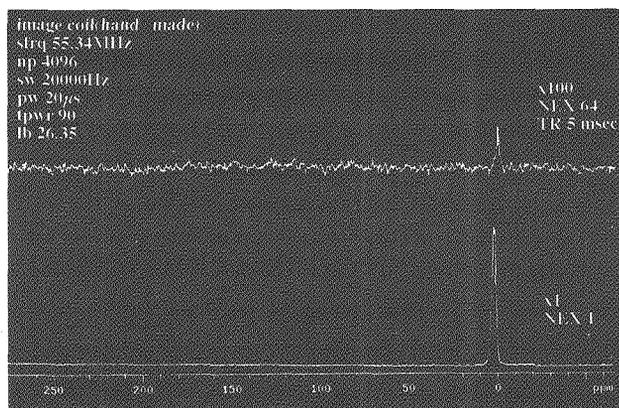


図1. 上:熱平衡XeのNMR信号.

下:偏極後のXeのNMR信号. 約1,800倍の感度増強.

【方法】フローセル内に低圧の希ガスと光ポンピング用触媒さらにクエンチャーガスの混合気体を一方向に流通させ、フローセル内には励起光を照射し、かつ磁場を印加することで、連続的に偏極希ガスを安全に製造することが可能である。フローセルの励起光照射面に垂直に磁力線が通過するように磁石を配置し、フローセル内の気体の流通方向に垂直に励起光を照射することで、偏極率向上が期待される。

Xe 核の偏極効率を決める要素としては、まず、励起光強度、希ガス濃度、クエンチャー(N_2)濃度、不純物(H_2O , O_2 など)濃度が考えられる。励起光強度が高い条件では、Rb 濃度を高めて、Xe 核との衝突回数を増大し、Xe-

Xe 間の衝突によるスピン系の緩和が偏極率の低下に効かない条件下で、偏極効率を効果的に上昇させられる。このときのセルの形状としては、受光面を広くし光路長を短くすると最も効率が上げられると考えられる。図2に示したような、二重円筒管の間を混合ガスが流れる設計も可能である。

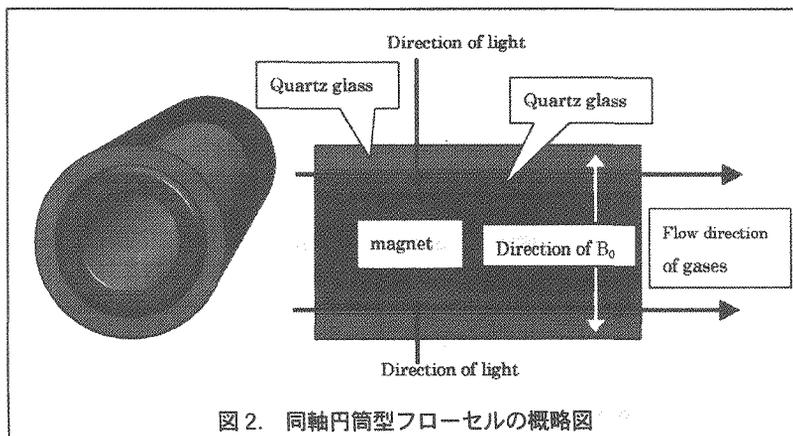


図2. 同軸円筒型フローセルの概略図

【実験】偏極操作に用いた装置は、以前報告したものを改良したものをを用いた[6]。Rb は、ガラスアンブルに封入された製品(フルウチ化学:99.99%)を、ステンレスパイプ内に入れた状態で内部を真空にして配管内部を洗浄した後、外部からステンレスパイプの上からアンブルごとつぶし、拡散ポンプで 10^{-6} Torr にひきながら、先に配置した偏極用フローセル(外径 50mm, 容量約 200 ml)の直下へ蒸留した。

4He , Xe, N_2 混合ガス(日本酸素:99.995%高純度ガス)を、常圧まで導入し、マスフローコントローラー(MKS:M-310-01C, M-100-11C)で、流量(He : ~ 10 sccm, $Xe(+N_2)$: ~ 1 sccm)を制御してフローを開始した。気化器からセルにかけては、 100 – $200^\circ C$ 程度の温度に保った。励起光には、GaAlAs ダイオードレーザー(Optopower:OPC-D012-795-HBHS; 794.7 ± 1 nm, 12W)を使用した。5mmx5mm 角の平行光ビームを $\lambda/4$ 波長板(CVI:QWPO-795-10-4-R15)を通して回転偏光にした後、レンズで拡大しセルの厚み方向に均一に照射した。セルを出た後の混合ガスは、冷却トラップで Rb 蒸気を除いた後、永久磁石2個の間に設置した液体窒素トラップへ導入し、偏極 Xe のみを得た。偏極率のセル形状、フロー速度、Rb 濃度(セルの温度)依存性を NMR 装置を使って評価した。 4He バッファーガスをを使用しない $100^\circ C$ の条件で、天然同位体比の Xe ガスについて、偏極率 $0.2 \pm 0.1\%$ を得ている。

【まとめ】Xe ガスのスピン偏極に最適化した偏極用セルの構造を提案した。この装置を用いると偏極率の高い ^{129}Xe を得ることができる。これを利用した NMR 実験、 1H 、 ^{13}C -NMR の高感度化の検証実験を計画している。

【参考文献】

- [1] T. G. Walker and W. Happer, Rev. Mod. Phys. **69**, 629-642 (1997).
- [2] M. S. Albert and D. Balamore, Nucl. Instr. and Meth. A **402**, 441-53 (1998).
- [3] 服部峰之、平賀隆、守谷哲郎、木下良正、飯田秀博、木村敦臣、藤原英明, 第 38 回 NMR 討論会, P67 (1999).
- [4] B. Driehuys, G. D. Cates, E. Miron, K. Sauer, and W. Happer, Appl. Phys. Lett. **69**, 1668 (1996).
- [5] M. Haake, A. Pines, J. A. Reimer, and R. Seydoux, J. Am. Chem. Soc. **119**, 11711 (1997).
- [6] 服部峰之、平賀隆、守谷哲郎, 第 36 回 NMR 討論会講演要旨集, P9, 103 (1997).

Sites and Dynamics of Hydrogen and Deuterium in $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_x\text{D}_y$ ($x+y \approx 0.7$) (National Institute of Materials and Chemical Research) Shigenobu Hayashi and Bilwadal Bandyopadhyay

Titanium-vanadium-hydrogen-deuterium (Ti-V-H-D) alloys with $([\text{H}]+[\text{D}])/([\text{Ti}]+[\text{V}]) \approx 0.7$ have been studied by means of ^1H and ^2H NMR. In the hydride, H atoms occupy the O sites, and H diffusion takes place between the ordered O sites. In the H-rich samples, H and D atoms occupy both the O and T sites, and the H and D atoms in the T sites diffuses faster than those in the O sites. The diffusion between the ordered O sites is confirmed by the ^2H quadrupolar line shape. In the D-rich samples, H and D atoms occupy the T sites. In the δ_D phase H and D atoms diffuse among the ordered T sites, the ^2H quadrupolar line shape is preserved, and the ^2H relaxation is dominated by the dipolar interaction. In the α_D phase the diffusion takes place between the disordered T sites, and another motional mode takes place simultaneously. The temperature and frequency dependence of T_1 of ^1H and ^2H can be described by modified Bloembergen-Purcell-Pound equations. Activation energies and mean residence times of H and D atoms have been estimated for each site.

Introduction Titanium (Ti) and vanadium (V) metals form a solid solution with a body-centered-cubic (bcc) structure over wide ranges of composition and temperature. The Ti-V alloys form stable hydrides as well as Ti and V metals do. The Ti-V-H system is expected to be synthesized at any $[\text{V}]/[\text{Ti}]$ ratio, having continuously varying properties. The crystal structure of monohydride $\text{Ti}_{1-z}\text{V}_z\text{H}_x$ ($x \approx 1$) is bcc in the range $0.2 \leq z \leq 0.8$, while it is body-centered-tetragonal (bct) for $0.9 \leq z \leq 1.0$. The crystal structure changes from bcc to bct within the range $0.8 < z < 0.9$. On the other hand, the monodeuteride $\text{Ti}_{1-z}\text{V}_z\text{D}_x$ ($x \approx 1$) has always the bcc structure. In the extreme case of pure vanadium, the isotope effect is expected to be the maximum. It is known that hydrogen and deuterium atoms occupy the O and T sites, respectively, in the monohydride (or monodeuteride) phase of vanadium, leading to the bct and bcc structures, respectively. If H and D atoms are contained simultaneously, the crystal structure is expected to depend on the $[\text{H}]/[\text{D}]$ ratio. Furthermore, there may be interaction between diffusing atoms at high concentration of diffusing atoms.

In the present work, we have studied $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{-H-D}$ systems. We report the results of ^1H and ^2H NMR on $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_x\text{D}_y$ ($x+y \approx 0.7$) as well as $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.75}$ and $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{D}_{0.71}$. $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.75}$ and $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{D}_{0.71}$ have different crystal structures, as expected. The dependences of the site occupancies and the diffusions of hydrogen and deuterium atoms on the $[\text{H}]/[\text{D}]$ ratio were studied by means of NMR.

Experimental We prepared the samples $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.63}\text{D}_{0.12}$, $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.50}\text{D}_{0.20}$, $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.35}\text{D}_{0.35}$ and

金属水素化物、水素、スピナー格子緩和時間、水素拡散、同位体効果

はやし しげのぶ・ビルワダル バンドパダイ

$\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.22}\text{D}_{0.52}$. The H and D contents in the samples are within ± 0.02 of the quoted figures.

The ^1H NMR measurements have been performed by a Bruker CXP90 spectrometer equipped with a Tecmag Real-time NMR Station MiniMacSpect operated by MacNMR5.4 software. Larmor frequencies were set at 30.3 ± 0.2 and 59.8 ± 0.4 MHz. The ^2H NMR measurements have been performed by Bruker ASX200, MSL400 and ASX400 spectrometers. Larmor frequencies were 30.7 MHz for ASX400 and 61.4 MHz for MSL400 and ASX400.

Results and Discussion ^1H NMR spectra have been measured for $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_x\text{D}_y$ and $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.75}$ at 30.3 MHz and 59.8 MHz in the temperature range between 77 and 420 K. At 77 K, all the samples show a Gaussian line shape with the full width at half maximum (FWHM) of 70 ± 10 kHz. Motional narrowing takes place around 120 K, and a considerably narrow line is observed above 140 K. During the narrowing process the line shape consists of two components with different line widths, suggesting the presence of at least two types of hydrogen atoms with different motional properties.

The temperature and frequency dependence of T_1 of ^1H can be described by modified Bloembergen-Purcell-Pound equations, and the following results are obtained as for hydrogen sites and diffusion. For $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.75}$, the activation energy (E_H) is 0.28 eV/atom. Hydrogen atoms occupy the O sites, and they jump between the O sites. There are two types of the O sites, which might be assigned to the O_{21} and O_{22} sites. There may be other kinds of motions at low temperatures. The similar results are obtained in $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.63}\text{D}_{0.12}$. In $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.50}\text{D}_{0.20}$, the O sites show an activation energy of 0.245 eV/atom. The increase in the D fraction results in the decrease in the activation energy. For the shorter T_1 component ascribed to the T sites, the E_H value is 0.23 eV/atom, which is smaller than that of the O sites. $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.35}\text{D}_{0.35}$ and $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.22}\text{D}_{0.52}$, show a strange temperature dependence of T_1 , caused by the phase transition. Below the transition temperature, the E_H value is about 0.23 eV/atom. H atoms diffuse among the T sites. Around 240 K, the H motion undergoes a drastic change following the order-disorder transition of the D sublattice.

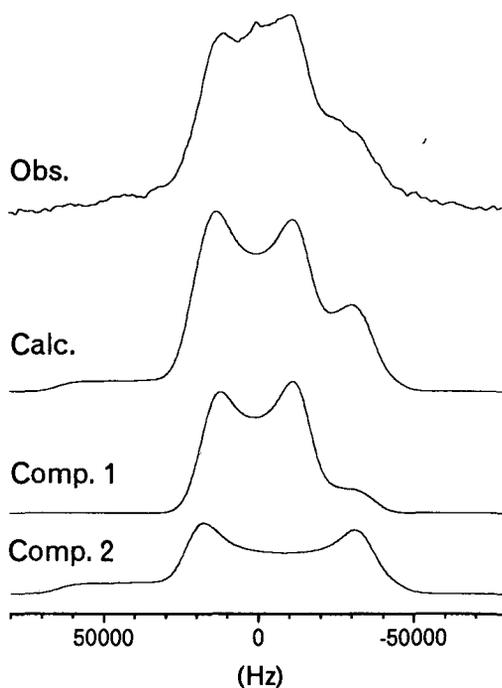


FIG. 1. Simulation of ^2H NMR spectra of $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{H}_{0.63}\text{D}_{0.12}$, measured at 61.4 MHz and 140 K.

The H motion above the phase transition temperature is simulated by assuming that immediately following the transition, E_H is reduced and that at higher temperatures a new motion is superimposed on the existing motion. The new motion at the high temperatures might involve the contribution of the O sites as the diffusion pathway.

In case of $Ti_{0.1}V_{0.9}H_{0.63}D_{0.12}$, 2H spectra confirm the existence of D atoms in two kinds of sites, the O and T sites, as shown in Fig. 1. With increase in temperature, first the inner doublet (component 1) corresponding to the T sites disappears at about 200 K, and then the narrow central component grows up. The outer doublet (component 2) corresponding to the O sites remains up to about 240 K. Above 240K, the doublet peak disappears, though the asymmetric line shape is observed up to about 380 K. These results demonstrate that the D atoms in the T site have higher mobility than D in the O sites. The diffusion of D atoms in the O sites becomes isotropic above 380 K, much higher than that in the T sites (about 200 K). In the bct structure, the D atoms occupy the O_z sites. Hopping among the O_z sites preserves the quadrupole line shape. The collapse of the quadrupole pattern suggests that sites other than the O_z sites, i.e., O_x , O_y and/or T sites are also used for the D diffusion. The temperature and frequency dependence of T_1 of 2H can be described also by modified Bloembergen-Purcell-Pound equations, as shown in Fig. 2. Due to the scattering of the observed T_1 data and complexity of the relaxation mechanisms, parameters of the D diffusion could not be estimated for the T sites.

In the D-rich samples, D atoms occupy the ordered T sites at low temperatures, and the ordering remains up to about 200 K. The ordered D sublattice collapses by the phase transition from the δ_D phase to the α_D phase, accompanied by the growth of the narrow central line in the 2H spectra. After the phase transition, the doublet disappears, and only the narrow central line is observed reflecting the isotropic diffusion of D atoms. Fig. 3 shows 2H T_1 results of $Ti_{0.1}V_{0.9}D_{0.69}$. D atoms jump among the ordered T sites in the δ_D phase. Hopping among the ordered T sites does

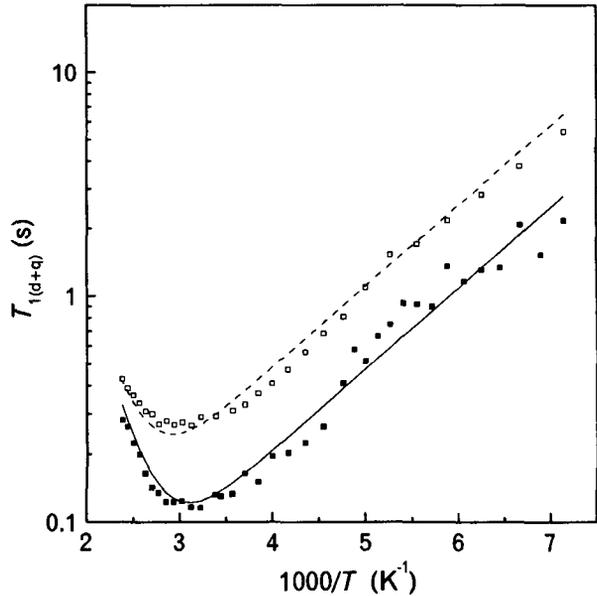


FIG. 2. 2H spin-lattice relaxation times caused by dipole-dipole and/or quadrupole interaction in $Ti_{0.1}V_{0.9}H_{0.63}D_{0.12}$ (the O site) at 30.7 (■) and 61.4 MHz (□), and their simulated results indicated by chain and solid lines.

neither average out the structured quadrupolar line shape, nor does it produce effective quadrupolar spin-lattice relaxation. Above 240 K in the α_D phase, where the deuterium sublattice becomes disordered, there might be considerable quadrupolar relaxation of ^2H , since the quadrupolar line shape collapses. The deuterium diffusion changes around the phase transition temperature, and, moreover, it seems that there exist simultaneously more than one type of motions at high temperatures.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. E. Akiba of our institute for the syntheses of dihydrides and help in measuring the X-ray powder diffraction. B. B. wishes to acknowledge the STA Fellowship.

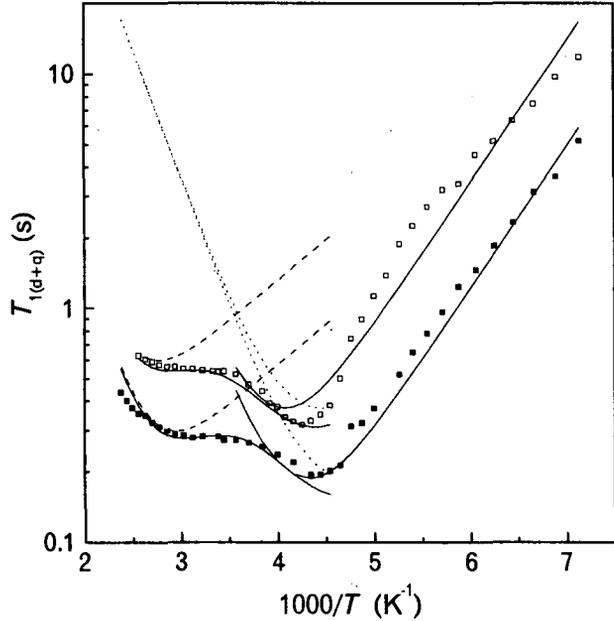


FIG. 3. ^2H spin-lattice relaxation times caused by dipole-dipole and/or quadrupole interaction in $\text{Ti}_{0.1}\text{V}_{0.9}\text{D}_{0.69}$ at 30.7 (■) and 61.4 MHz (□), and their simulated results indicated by solid lines. The chain and dotted lines indicate components used for the simulation.

(新日本製鐵(株) 先端技術研究所) ○齋藤公児
(新日本製鐵(株) 鉄鋼研究所) 古牧育男
(日本電子(株) 基礎研究部) 長谷川憲一

The Study of Softening Process of Coals using High Temperature In-situ NMR Microimaging Method
(a; Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Laboratories, b; JEOL Ltd.)

○ Koji Saito^a, Ikuo Komaki^a and Ken-ichi Hasegawa^b

Thermally induced changes in coals are interest from the standpoints of both fundamental and applied research for iron-making process. Furthermore, for very inhomogeneous coals, there is a fascination in the study about the influence of thermal dynamical changes. To monitor the dynamical changes in coals with temperature, an *in-situ* method must be used, because it is well-known that the properties of coals change dramatically in high temperature range (from 350 to 550 °C). Therefore, in this paper, we at first are demonstrating 3D-Single-Point-Imaging which has shown to be successful for studying short relaxation time systems and which is free from distortions due to susceptibility variations for coals. And we have carried out the first systematic *in-situ* high-temperature NMR microimaging study of coals between 25 and 550 °C with our newly developed high temperature microimaging probe with systems to clarify the behavior of mobile component at high temperature in coal specimens.

1. はじめに

NMR イメージング法は非破壊で化学構造情報が3次元的な分布情報として得られることから非常に有効である¹⁾。特に材料を対象に考えた場合、材料自身がダイナミックに変化する姿を *in-situ* で観測できれば、マテリアルサイエンス分野への当該手法の応用が更に広がる可能性が高い。そこで我々は、材料に変化を及ぼす影響が大きく且つ材料の耐久性等の検討の上でも特に重要な外部因子である温度に着目し、高温温度可変 NMR イメージングを行うためのシステムを構築した。対象材料としては、典型的な不均一材料であり産業上有用で且つ温度に応じて化学構造を変化させる石炭を選んだ。従来のイメージング法では石炭の直接観測が、その線幅が広いために不可能であり、また 400 °C 付近で生じる石炭の軟化溶解現象に関する化学的な知見は全くなかった。そこで本高温 *in-situ* NMR イメージング法でその軟化溶解現象を初めて捉えることに成功し、興味深い知見を得たので報告する²⁾。

2. 実験

NMR マイクロイメージングの測定は、日本電子社製 α -400 型分光計にマイクロイメージングユニットを付帯した装置で行った。プローブは到達試料温度が約 600 °C で、磁場勾配コイルと高温加熱部それぞれに 2 系統独立の水冷配管を行ってある。磁場勾配電源はテクロン 7782 モデルを X, Y, Z 軸用にそれぞれ使用し、電流値 50 A で発生磁場勾配量は約 250 gauss/cm であった。測定は室温 ~ 550 °C で、昇温速度は実炉と同じ 3 °C / min、測定のパルスシーケンスは Single-Point-Imaging 法³⁾であった。基本となるシーケンスと実験状況を Fig.1 に示す。また *in-situ* 測定での一画像の測定時間は約 8 分であった。主な測定条件は、パルス幅は 7 μ s、echo 時間は 80 μ s で、繰り返し時間は 10 ms、積算回数は 16 回であった。測定条件は X と Y 平面に対して 128 * 128 のデータサイズであった。実験に用いた石炭は実炉で使用されている粘結性の高いグニエラ炭と粘結性の低いウイトバンク炭で、測定には約 3 mm 程度の石炭粒を使用した。

NMR イメージング、石炭、シングルポイントイメージング、高温イメージング

さいとうこうじ こまきいくお はせがわけんいち

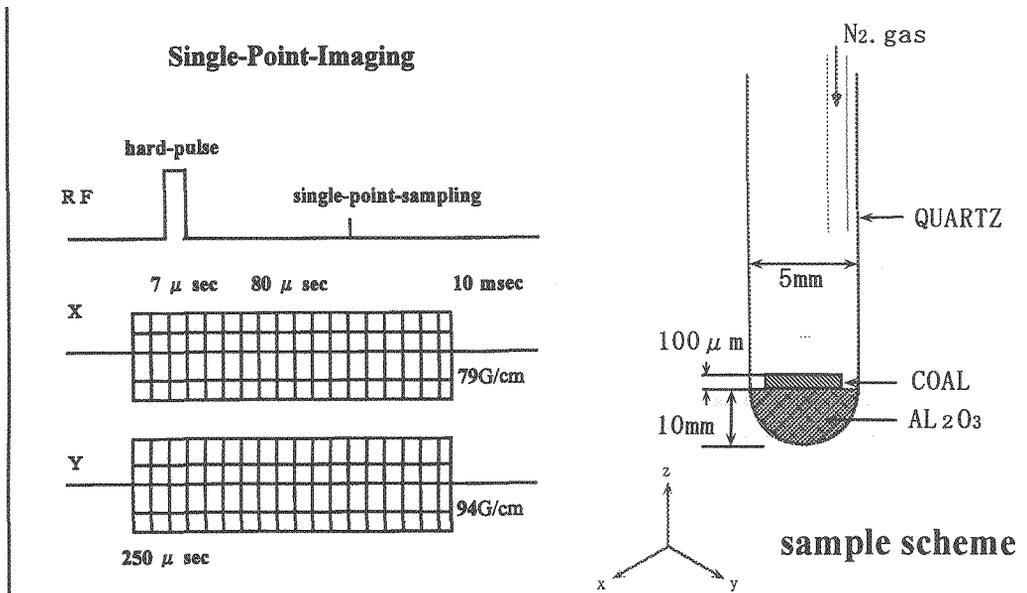


Figure 1 The pulse sequence of in-situ Single -Point-Imaging and Sample Scheme

3. 結果と議論

(1) 室温での NMR イメージングによる検討結果

石炭には一般に T_2 の短い成分と長い成分が存在しており、 T_2 の短い成分を immobile 成分、長い成分を mobile 成分と帰属している。しかし、生体に活用されているスピンエコー法では T_2 の長い成分でもその T_2 の長さがせいぜい $100 \mu s$ 程度のため、Fig.2(a) に示すように全くイメージ像を得ることができなかった。そこで先に報告したように 2H 重水素化ピリジン等による溶媒蒸気膨潤法で石炭を前処理することで、重水素化ピリジンが石炭中に存在する様々な架橋構造等の構造緩和を助長し、mobile 成分を増加させ、緩和時間を長くすることで、Fig.2(b) のような mobile 成分由来のイメージ像を得ていた。しかし、重水素化ピリジンによる溶媒膨潤の効果は元来の石炭固有情報に加味されているので信頼性や定量性が低く、またイメージ像も非常に不鮮明であり、正確な石炭の物性評価には活用できなかった⁵⁾。今回開発したプローブと SPI 法の組み合わせによって、溶媒膨潤処理をすることなく、Fig.2(c) のような直接鮮明な mobile 成分のイメージ像を得ることができ、mobile 成分の定量やその存在分布やその状態解析も可能となった。粘結性の高い Goonyella 炭には、mobile 成分が多く存在し且つそのドメインサイズ (平均 $117 \mu m$) が大きいのが、対して粘結性の低い Witbank 炭には mobile 成分が少なく且つそのドメインサイズ (平均 $55 \mu m$) も小さいことがわかった。

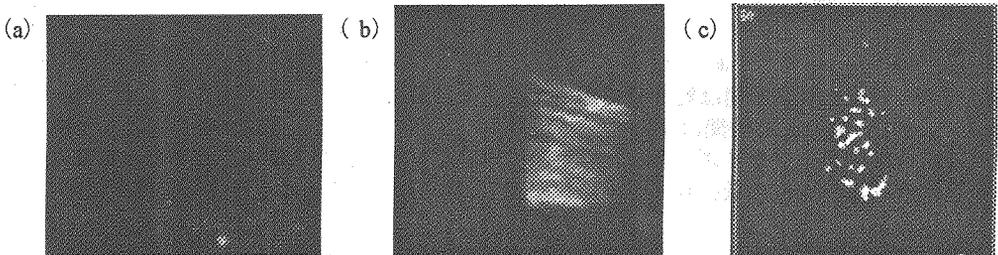


Fig.2 NMR microimages of Goonyella coal (a) non-saturated coal using spin echo method
(b) saturated coal by pyridine- d_5 using spin echo method
(c) non-saturated coal using Single-point Imaging method

(2) 広幅高温 in-situ 法による検討結果

Fig.3 に示すように、温度上昇に伴い、石炭中の mobile 成分の量は増加し、同時に NMR の半値幅は低下する。またその基本的な挙動は粘結性の高いグニエラ炭と低いウイトバンク炭で同じであるが、室温での mobile 量や高温で発現する mobile 量、半値幅等は大きく異なる。粘結性の高いグニエラ炭は室温での mobile 量も多く、高温で発現する mobile 量も多い。更に、高温での半値幅も狭くなっており、溶解性が高いことを示している。対して、粘結性の低いウイトバンク炭では高温で発現する mobile 量も低く、半値幅も広くて溶解性も低いことがわかる。これは、元来粘結性の高い石炭は π - π 相互作用が支配的なものに対して、粘結性の低い石炭には酸素を含む構造が多く、特に水素結合が多く存在することがわかっている。その結果、室温レベルでの mobile 成分が少ない。また温度上昇に伴い、水素結合の切断と同時に副反応として、再結合が生じて、強固な構造を形成しているためと考えられる。

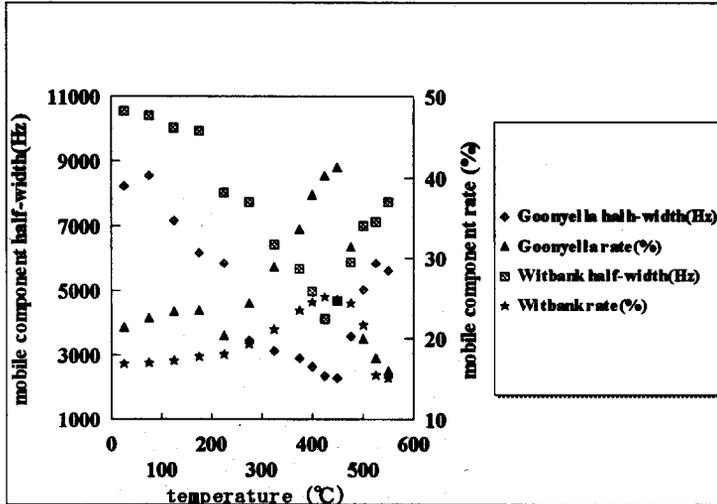


Figure 3
The relationships between the existent rate or their half width of mobile component and various temperatures

(3) 高温 in-situ NMR イメージング法による検討結果

石炭粒内での平均挙動は広幅法で検討したが、実際の粒内を観測するために、構築した本システムで粘結性の高いグニエラ炭の高温 in-situ イメージングを行った結果を Fig.4(a)~(h)に示す。観測は同一石炭の同一位置を観測している。元来室温で観測されている mobile 成分の役割が不明確であったが、今回の in-situ 高温イメージングの結果から、昇温に伴い mobile 成分が増加し且つそのドメインサイズを拡大して、徐々に粒内全体に均一に広がっていることがわかった。また石炭の最大軟化溶解温度域である 425 °C では、mobile 成分はほぼ粒内に均一に存在している。更に 475 °C 以降では軟化溶解がほぼ終了し、再固化反応の進行に伴い、石炭の粒内に存在する mobile 領域が極端に減少していることがわかった。高温で発現した mobile 成分の半値幅はかなり狭く、通常のスピンエコー法の観測も可能であることから、この温度域では粒内がほぼ均一に溶解状態にあると推定できる。この結果から、粘結性の高い石炭での軟化溶解現象のメカニズムは、温度上昇に伴う mobile 成分の拡がりの基点が室温での mobile 成分の存在位置から始まっており、基本となる室温レベルでの mobile 成分量が重要であり、温度上昇して 300 °C 以降で徐々に構造緩和が生じて石炭が軟化し始め、400 °C 付近で急激に溶解が起こっている過程と考えられる。対して、粘結性の低いウイトバンク炭 (Fig.4(i)) では最大の軟化溶解温度域でも、石炭粒内全体には mobile 成分は発現しておらず、またその半値幅もあまり狭くない。粒内の部分的には溶解している所もあるが、粒内全体では溶解していない。結局、石炭の軟化溶解現象は、石炭の粒内での mobile 成分を中心とした挙動が重要であることが本研究からわかり、高温 in-situ NMR マイクロイメージング法がこれらに関して、貴重且つ有益な情報を与えること、更にこの観測を行うことで、軟化溶解性状などの高温での石炭の性質を評価できることがわかった。

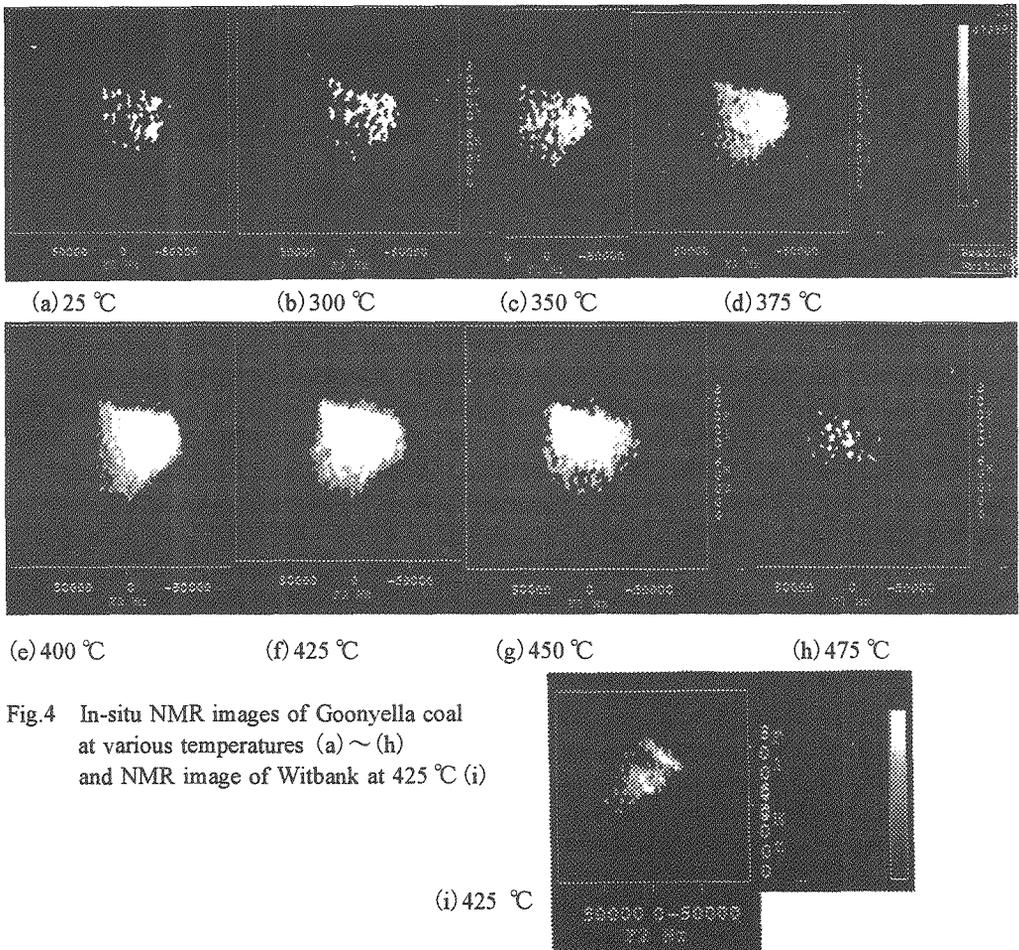


Fig.4 In-situ NMR images of Goonyella coal at various temperatures (a)~(h) and NMR image of Witbank at 425 °C (i)

4. まとめ

今回確立した高温 in-situ NMR マイクロイメージング法で、従来不明であった 400 °C 付近で急激に起こる石炭の軟化溶解過程を明らかにでき、粘結性を支配している因子の解明が可能であり、更に本法で産業上有用な石炭の高温性質を評価できることがわかった。また石炭以外にも、本技術が不均一な高分子材料等の耐熱性メカニズムの検討、熱硬化反応の検討、材料の加熱乾燥過程の検討において、外部因子として熱を与えた場合に、材料が受ける影響を in-situ イメージで観測できることから、今後幅広い分野に活用できると思われる。

参考文献

- 1) R.Kimmich NMR Tomography Diffusometry Relaxometry Springer (1997)
B.Blumich., P.Bluemler. and K.Saito, in 'Solid State NMR of Polymers', I.Ando and T.Asakura Eds. Elsevier, Amsterdam, 1998, 123
- 2) K.Saito, I.Komaki and K.Hasegawa Fuel (1999) in press
K.Hasegawa, R.Yamakoshi, H.Tsuno and K.Saito Proceedings of 13th-ISMAR 1998, 1, 396
K.Saito, I.Komaki, K.Hasegawa and H.Tsuno Proceedings of 13th-ISMAR 1998, 2, 581
- 3) S.Choi, X.-W.Tang, and D.G.Cory J.Imaging Syst.Technol. 1997, 8, 263
- 4) 齋藤公児 古牧育男 畠山盛明 第35回 NMR 討論会要旨集(1996)
- 5) 齋藤公児 古牧育男 松浦慎: 鉄と鋼 1999, 50, 730

3SL1

Conformation and Dynamics of Extensively Labeled Solid Proteins: Multidimensional Methods and Applications

Mei Hong

Department of Chemistry, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA

We describe our recent advances in the development of techniques for structure determination of proteins in the solid state in an efficient manner and applications of these techniques to three proteins. The efficient structure determination of disordered proteins by solid-state NMR requires the ability to measure multiple structural constraints in each experiment on each sample. To achieve this end, we have developed an approach that combines 2D and 3D magic-angle-spinning NMR with selective and extensive ^{13}C isotopic labeling. The selective and extensive ^{13}C labeling approach, intermediate between uniform labeling and site-specific labeling, facilitates structure determination by simplifying the NMR spectra and reducing line broadening. We demonstrate this robust biosynthetic labeling approach on a small model protein (Mr 8.5 kDa) and a large membrane protein (Mr 22 kDa). Various resonance assignment techniques involving homonuclear and heteronuclear coherence transfer have been developed and tested. They together yield sequential assignment of 25% of the residues and type assignment of 50% of the residues in the model protein. Simultaneous extraction of multiple torsion angles are also demonstrated, not only through quantitative measurement of the torsion angles but also through qualitative estimates of the conformation-dependent C_α chemical shift anisotropies in proteins. The C_α CSA measurement promises to be a quick diagnostic tool for secondary structure identification.

Molecular dynamics constitutes an integral part of the structure and function of proteins. Although fast motions can be investigated with existing ^2H NMR relaxation and lineshape experiments, methods for efficient examination of slow motions in proteins have been lacking due to the demanding sensitivity and limited site resolution of traditional exchange spectroscopy. We have designed a high-resolution 1D exchange technique for characterizing slow motions in proteins. The technique utilizes ^{15}N chemical shift interaction and is suitable under fast MAS. We show its application to a 22-kDa protein hydrogel with coiled coil domains. The correlation time and reorientation angle of the motion have been measured, and their implications on the dissociation and association dynamics of the coiled coils will be discussed. These NMR results provide a molecular basis for the viscoelastic behavior of the hydrogel. The combination of extensive isotopic labeling and fast-MAS exchange opens the possibility for studying slow dynamics in proteins both with feasible sensitivity and with high site resolution.

3SL2

The NMR Angle on Troponin-C: Everything moves, and every movement is relevant to calcium regulation

S. M. Gagné, L. Spyropoulos, R. T. McKay, M. T. Sykes, S. Tsuda, L. E. Kay and B. D. Sykes

*Department of Biochemistry and MRC Group in Protein Structure and Function,
University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2H7, Canada*

Troponin-C is the calcium regulatory protein in skeletal and cardiac striated muscle. This protein is flexible in many ways and this governs in part the thermodynamics, kinetics and energetics of the interaction of the protein with calcium and target proteins. Specifically, the calcium binding loops are mobile, calcium binding induces a transition from a 'closed' to an 'open' state, and the relative orientation of the two domains is random. We have studied these motions using ^{15}N NMR relaxation studies for the backbone motions, ^2H NMR relaxation for sidechain motions, lineshape analysis for interaction with target peptides, and temperature dependent studies of the opening/closing equilibrium. We have attempted to derive the entropic contributions to the equilibria involved from the NMR derived order parameters. We think this dynamic behaviour is important to the function of these proteins.

3L5 固体 NMR/*ab initio* tight-binding MO 法による三次元高分子結晶の構造と電子状態の研究

(東工大大理工)○安藤勲、藤井一馬、黒木重樹、(奈良女大生活環境)黒子弘道、(東ソ繊)内田雅人

A Study of Structure and Electronic State of Three-Dimensional Polymer Crystals by Combined Solid State NMR/*ab initio* Tight-binding MO Method

(Tokyo Institute of Technology) Isao Ando, Kazuma Fujii, Shigeki Kuroki, (Nara Women's University) Hiromichi Kurosu, (Toso Co.) Masato Uchida

Formulae for calculating the NMR chemical shift of a three-dimensional(3D) polymer crystal were derived by a combination of 3D *ab initio* tight-binding MO theory and the NMR chemical shift theory. This formalism was applied to 3D polymer crystals with different crystallographic forms within the STO-3G minimal basis set and other basis sets. The effects of inter- and intra-chain interactions on the experimental solid state ^{13}C NMR chemical shift and the electronic state, that is band structure, of polyethylene with the orthorhombic and monoclinic crystallographic forms were elucidated.

1. はじめに

高分子鎖は無限とも云える電子を有し、電子状態を評価しようとする大変な困難となる。また、NMR化学シフトを通して構造(コンホメーション、結晶構造)の解析するときどうしても高い精度での高分子鎖の電子状態の評価とNMR化学シフトの定式化が必要となる。そのような背景のもとに私どものグループは固体物理で知られているバンド(band)理論、すなわち tight-binding MO 理論を用いてNMR化学シフトの定式化し、半経験的 MO framework 内で一本および複数の高分子鎖の ^{13}C , ^{15}N NMR化学シフトの計算を通して、高分子のNMR化学シフトの挙動と構造の関係を明らかにしてきた。(1) 本報告では、これらの方法をさらに発展させて三次元高分子結晶のNMR化学シフト理論を *ab initio* MO framework 内で定式化することを目的とした。また、この方法をポリエチレンなどの高分子結晶に適用し、NMR化学シフトへの分子間相互作用、すなわち packing effect を解析する。この方法は高分子結晶に限られず、低分子結晶にも応用でき、NMR化学シフトの結晶における多形依存性の理解に強力な方法となることが期待できる。

固体 NMR、tight-binding MO 理論、高分子結晶、NMR 化学シフト

あんどういさお、ふじいかずま、くろきしげき、くろすひろみち、うちだまさと

2. 三次元高分子結晶のNMR化学シフト理論の展開

^{13}C , ^{15}N , ^{17}O 核の化学シフトは反磁性項(σ^d)と常磁性項(σ^p)の和として評価でき、相対的NMR化学シフトの挙動は主として常磁性項(σ^p)により支配されている。したがって、常磁性項(σ^p)を正しく評価することが重要となる。高分子および低分子は結晶中では規則的な構造をとるためにMO Ψ は電子の波動ベクトル \mathbf{k} ($=k_x + k_y + k_z$) の関数 $\Psi(\mathbf{k})$ で表される。

$$\psi_n(\mathbf{k}) = N^{-1/2} \sum_{\nu} \sum_{\mathbf{R}} C_{\nu n}(\mathbf{k}) \phi_{\nu}(\mathbf{r} - \mathbf{R}) \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{R}) \quad (1)$$

ここで、 C は展開係数、 ϕ はAO、 \mathbf{r} は電子の位置、 \mathbf{R} は格子定数、 N は単位セルの総数である。これにより非晶状態に比べて極めて容易に結晶状態におけるMOは定式化できる。この $\Psi(\mathbf{k})$ を用いて *ab initio* MO framework内で三次元高分子結晶のNMR化学シフト理論をSOS(sum-over-states)法により定式化した結果を次式で示す。

$$\sigma_{\alpha\beta}^d(\mathbf{k}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m_e^2} \sum_m \sum_{\nu\nu'}^{occ} C_{\nu m}^* C_{\nu' m} \sum_{\mathbf{R}} \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{R}) \langle \nu^{\mathbf{R}} | r^{-3} (r^2 \delta_{\alpha\beta} - r_{\alpha} r_{\beta}) | \nu'^{\mathbf{R}} \rangle \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \sigma_{\alpha\beta}^p(\mathbf{k}) &= -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m_e^2} \sum_m \sum_n^{occ \text{ unocc}} ({}^1E_m^n - {}^1E_0)^{-1} \\ &\quad \times \left\{ \langle \psi_m(\mathbf{k}) | r^{-3} L_{\alpha} | \psi_n(\mathbf{k}) \rangle \langle \psi_n(\mathbf{k}) | L_{\beta} | \psi_m(\mathbf{k}) \rangle + \langle \psi_m(\mathbf{k}) | L_{\beta} | \psi_n(\mathbf{k}) \rangle \langle \psi_n(\mathbf{k}) | r^{-3} L_{\alpha} | \psi_m(\mathbf{k}) \rangle \right\} \\ &= -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{e^2}{m_e^2} \sum_m \sum_n^{occ \text{ unocc}} ({}^1E_m^n - {}^1E_0)^{-1} \\ &\quad \times \left[\sum_{\nu\nu'} \sum_{\mathbf{R}} C_{\nu m}^* C_{\nu' n} \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{R}) \langle \nu^{\mathbf{R}} | r^{-3} L_{\alpha} | \nu'^{\mathbf{R}} \rangle \right. \\ &\quad \times \sum_{\nu\nu'} \sum_{\mathbf{R}} C_{\nu' n}^* C_{\nu m} \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{R}) \langle \nu'^{\mathbf{R}} | L_{\beta} | \nu \rangle \\ &\quad + \sum_{\nu\nu'} \sum_{\mathbf{R}} C_{\nu m}^* C_{\nu' n} \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{R}) \langle \nu^{\mathbf{R}} | L_{\beta} | \nu'^{\mathbf{R}} \rangle \\ &\quad \left. \times \sum_{\nu\nu'} \sum_{\mathbf{R}} C_{\nu' n}^* C_{\nu m} \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{R}) \langle \nu'^{\mathbf{R}} | r^{-3} L_{\alpha} | \nu \rangle \right]. \quad (3) \end{aligned}$$

ここで、 L は角運動量演算子、 $E_i - E_j$ は一重項—一重項励起エネルギーである。これらの遮蔽定数 $\sigma(\mathbf{k})$ は \mathbf{k} の関数であるために、実測化学シフトと比較するときには第一ブリルアン領域内で状態密度 $D(\mathbf{k})$ で平均を次式のようにしなくてはならない。

$$\sigma_A = \frac{\Omega}{8\pi^3} \int_{BZ} \{ \sigma_A^d(\mathbf{k}) + \sigma_A^p(\mathbf{k}) \} d\mathbf{k} \quad (4)$$

Ω は単位セルの体積である。

これらの化学シフト理論を三次元結晶MOプログラムCRYSTAL88と組み合わせ、三次元高分子結晶のNMR化学シフトを *ab initio* MO framework 内で評価した。計算はWorkstationおよびCRAYコンピュータにより計算した。幾何パラメータは最適化した値を用いた。

3. 高分子結晶への応用

まず、取り上げた三次元高分子結晶はポリエチレン結晶である。ポリエチレンは適当な条件下で、2つの結晶系、すなわち斜方晶および単斜晶をとる。ポリエチレンは結晶中において all-trans zigzag 鎖をとる。図1に示すように、斜方晶では all-trans zigzag 面が互いに垂直、単斜晶では平行となる。この図は all-trans zigzag 鎖に沿って見たものである。これらの結晶系に対応する固体 ^{13}C 化学シフトは33ppmおよび34ppmであり、斜方晶が単斜晶に比べて約1ppm高磁場に現れる。これは固体 ^{13}C 化学シフトを通してポリエチレン、直鎖パラフィンの結晶解析の指針となってきた。これらの化学シフト差がポリエチレンの体積磁化率の差に起因するのか、それとも結晶構造の違いに由来する分子間相互作用の差に起因するのかを本研究で明らかにしよう。図2に *ab initio* MO STO-3G基底で分子間距離の関数として計算した斜方晶および単斜晶系のポリエチレン結晶の ^{13}C 遮蔽定数 σ である。この図から分子間距離が短くなるとともに斜方晶が単斜晶に比べて高磁場に現れることを示している。STO-3Gは分子間相互作用の評価において実測の距離よりかなり短めとなることを考えると、上記の結果はかなりの信頼性が高いものと思われる。このことから観測で得られた約1ppm高磁場シフトは結晶構造の違いに由来する分子間相互作用の差に起因することがわかる。もっと近似レベルを上げた *ab initio* MO法による結果は講演会で紹介する予定である。

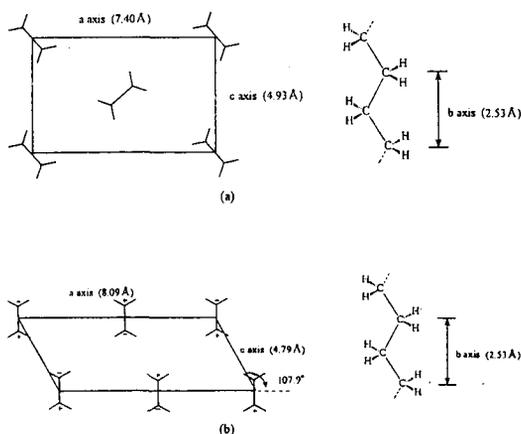


Fig.1 Crystal structures of orthorhombic(ORPE) and monoclinic(MCPE) polyethylenes.

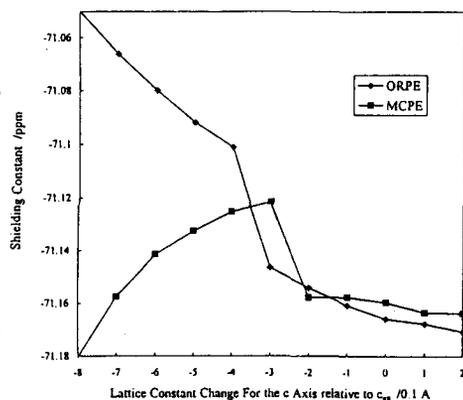


Fig.2 Calculated ^{13}C shielding constant of ORPE and MCPE chains as a function of interchain distance.

参考文献

- 1) a: T. Yamanobe, R. Chujo and I. Ando, *Mol. Phys.*, 50, 1231(1983), b: T. Yamanobe and I. Ando, *J. Chem. Phys.*, 83, 3154 (1985), c: T. Ishii, H. Kurosu, T. Yamanobe and I. Ando, *J. Chem. Phys.* 89, 7315 (1988), d: H. Kurosu, T. Yamanobe and I. Ando, *J. Chem. Phys.* 89, (1989), e: H. Kurosu, I. Ando and T. Yamanobe, *J. Mol. Struct.*, 201, 239(1989), f: I. Ando, T. Yamanobe, H. Kurosu and G. A. Webb, *Ann. Rep. NMR Spectroscopy*, 22, 205 (1989), g: H. Kurosu, T. Yamanobe and I. Ando, *J. Chem. Phys.*, 89, 5216(1989), h: M. Sone, H. Yoshimizu, H. Kurosu and I. Ando, *J. Mol. Struct.*, 317, 111(1994), i: I. Ando, M. Uchida, H. Kurosu and S. Kuroki, *ACS Series: Modelling of NMR Chemical Shift*, in press(1999), j: M. Uchida, Y. Toida, H. Kurosu and I. Ando, *J. Mol. Struct.*, in press(1999).

多核固体 NMR によるヘテロポリ酸($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$)反応場の解析
 (東大院工¹・広島大工²・工学院大³)
 ○内田さやか¹・犬丸啓²・御園生誠³

Analysis of the Reaction Field of Heteropolyacid $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ by
 Multi-Nuclear Solid State NMR

(Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹; Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University²; Department of Environmental Chemical Engineering, Kogakuin University³) Sayaka Uchida¹, Kei Inumaru², and Makoto Misono³

The states and dynamic behaviors of acidic protons and water molecules in a hydrated "pseudoliquid phase" of $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ were studied by ^{31}P , ^1H , and ^{17}O MAS NMR. At 173 K, several peaks appeared in the ^{31}P NMR spectra which were assigned to polyanions ($\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$) having different numbers of acidic proton(s) interacting with them. The relative intensity of the peaks obeyed binominal distribution, which reveals that the acidic protons and water molecules (H_3O^+ and H_5O_2^+) are distributed randomly (uniformly) in the pseudoliquid phase. At 298 K, the ^{31}P NMR peaks coalesced, showing that the acidic protons are migrating among the polyanions above this temperature.

【緒言】ヘテロポリ酸 $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ (Fig. 1)は、固体「超強酸」として種々の反応を促進する。固体ヘテロポリ酸触媒を用いた酸反応には、対カチオンの種類や反応分子の極性の大きさにより、反応が(1)固体表面で進行する場合、(2)反応分子を固体バルクの格子間に取りこんだ三次元反応場で進行する場合(擬液相挙動)とがある¹。擬液相では高い活性とともに固体表面や液相均一系とは異なる選択性が発現する。また擬液相には反応分子が均質かつ高濃度に存在するので、分光法による分子レベルの解析が容易であり、固体 NMR が有力な手段となる。本研究では、ヘテロポリ酸擬液相中の酸性 H^+ 、水分子の挙動を固体 NMR で解析し、反応場の特徴を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

【実験方法】試料は、ヘテロポリ酸六水和物 $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を調製後、真空加熱を行い所定の含水量($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \cdot n\text{H}_2\text{O}$; $0 \leq n \leq 6$)とし、外気にさらすことなくガラス細管に移して封じ切った。NMR 測定は、Chemagnetics-CMX300 型を用い、 ^1H (300 MHz), ^{31}P (121 MHz), ^{17}O (41 MHz) を MAS = 3 – 5 kHz で測定した。パルス幅、待ち時間は、 ^1H : 4.5 μs , 20 – 200 s; ^{31}P : 4 μs , 2000 s (いずれも $\pi/2$ パルス)とした。 ^{17}O は、パルス幅 = 2.0 μs ($\pi/6$ パルス), 待ち時間 = 1 s とした。

Keywords: 多核固体 NMR、ヘテロポリ酸擬液相、プロトンダイナミクス

うちだ さやか・いぬまる けい・みそのう まこと

【結果と考察】

(1) $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n = 6, 0$) の酸性 H^+ 、水分子の状態

$\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (以下 $n = 6$ と略す) では、ポリアニオン ($\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$) は立方晶に配列し、結晶水は酸性 H^+ と 2:1 で結合した H_5O_2^+ として、四つのポリアニオンと等価に水素結合している²。このとき ^{31}P NMR (Fig. 2a) は一本のみシャープに現れた。一方、 ^1H NMR (Fig. 2b) は非常にブロードに現れ、これは、 $^1\text{H} \cdots ^1\text{H}$ 双極子相互作用が強いため、または、 H_5O_2^+ が MAS 速度と同程度で交換しているため³ と考えられる。 ^{17}O NMR (Fig. 2c) ではポリアニオンの末端酸素 ($\text{W} = \text{O}$, 707 ppm)、二種類の架橋酸素 ($\text{W}-\text{O}-\text{W}$; 438, 428 ppm and 397, 378 ppm) が比較的高い S/N で観測された。

$n = 0$ の ^{31}P NMR (Fig. 2d) は $n = 6$ と比較して低磁場に現れ、脱水によりポリアニオン周囲の環境が変化したことを示す。このとき、 ^1H NMR (Fig. 2e) は SSB を伴う一本のピークが見られ、これをポリアニオンのみと結合した“孤立酸性 H^+ ”と帰属した。このとき、ポリアニオン 1 個あたり 3 個の“孤立酸性 H^+ ”が結合している。また、 ^{17}O NMR (Fig. 2f) はブロードになり、 $\text{W}=\text{O}$ ピークは見かけ上消滅した。これは、脱水による結晶性及び結晶構造の対称性の低下⁴により、ポリアニオン周囲の電場勾配が大きくなり、ポリアニオンの最も外側にある $\text{W}=\text{O}$ がより大きな影響を受けたためと推定している。

(2) $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($0 < n < 6$) の酸性 H^+ 、水分子の状態 (^{31}P NMR より)

前項の $n = 6, 0$ の帰属を参考にして、 $0 < n < 6$ の状態を解析した。この領域では、Fig. 3 の (a), (b), (c) に示す三つのプロトン種が存在すると考えられるが、定量的な議論は今までほとんどされていない。

$0 < n < 6$ の 173 K の ^{31}P NMR ではピークが分裂し (Fig. 4a)、これらを孤立酸性 H^+ が 0, 1, 2, 3 個ポリアニオンに結合した状態に帰属した。これらのピークの強度比から、ポリアニオンあたりの孤立酸性 H^+ の数 (m_{av} と略す) が計算できる。さらに、ピークの強度比が二項分布に従うので、孤立酸性 H^+ がポリアニオンにランダムに分配されていることになる⁵。また、水分子と結合した酸性 H^+ ($3 - m_{av}$) と水分子 (n) の比より、ポリアニオンあたりの H_3O^+ 、 H_5O_2^+ 量が計算され、 n に対してプロットした (Fig. 5)。点線は $n = 6$ から水分子がランダムに脱離したと仮定したときの H_3O^+ 、 H_5O_2^+ の計算値であるが、プロットと傾向がよく一致した。よって、 $0 < n < 6$ では水分子が固体内にほぼ均質に分布し、それにより H_3O^+ 、 H_5O_2^+ の量と孤立酸性 H^+ の分布が決定されると考えられる。

また、測定温度を 298 K とすると (Fig. 4b)、 ^{31}P NMR のピークが融合した。よって、室温以上では孤立酸性 H^+ がポリアニオン間を移動していることになる。173 K におけるピークの化学シフトの差より求めた孤立酸性 H^+ の移動速度は約 5 ms/site で、これは擬液相反応の 10^3 倍以上もの速さである⁵。ゼオライト等の固体酸触媒では、

酸性 H⁺は酸点のごく近傍に固定されており⁶、反応が進行するには反応分子が酸点まで移動し吸着する必要がある。一方、擬液相では、酸性 H⁺が反応分子を取りかこむポリアニオン間(10Å 以上)を移動しており、かつその運動が反応のタイムスケールより速い。このことが擬液相中での反応分子のプロトン化を容易にしていると考えられる。

【参考文献】

- (1) For example, Okuhara T.; Mizuno N.; and Misono M., *Advances in Catalysis*, 1996, 41, 113.
 (2) Brown G. M. et al, *Acta. Cryst.*, 1977, B33, 1038. (3) Fenzke D. et al, *J. Magn. Reson.*, 1992, 98, 469. (4) Fournier M. et al, *J. Mater. Chem.*, 1992, 9, 971. (5) Uchida S. et al, *Chem. Lett.*, 1998, 643. (6) For example, Farneth W. E. et al, *Chem. Rev.* 1995, 95, 615.

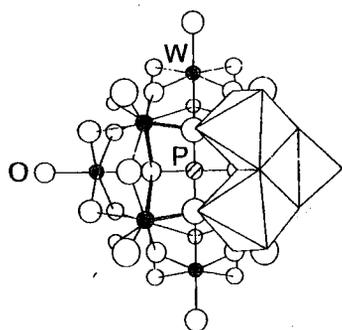


Figure 1. Structure of $PW_{12}O_{40}^{3-}$

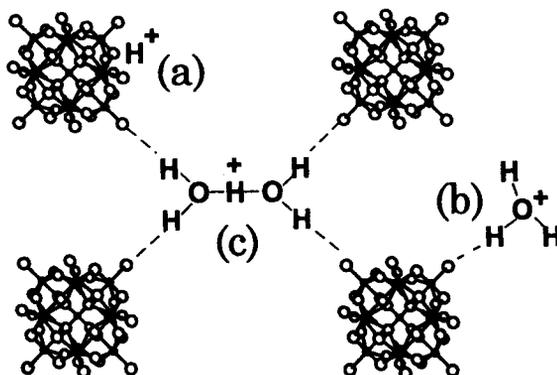


Figure 3. Schematic Illustration of the protonic species in $H_3PW_{12}O_{40} \cdot n H_2O$ ($0 < n < 6$). (a) isolated acidic proton; (b) H_3O^+ ; (c) $H_5O_2^+$

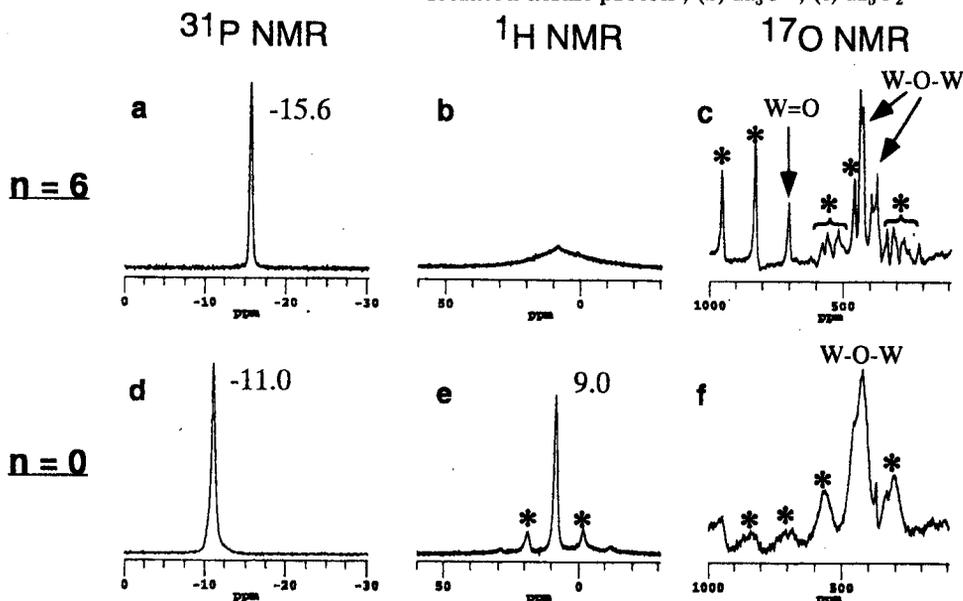


Figure 2. ^{31}P , 1H , and ^{17}O MAS NMR of $H_3PW_{12}O_{40} \cdot nH_2O$ ($n = 0, 6$) at 298 K. MAS rate: 1H , ^{31}P ; 3 kHz. ^{17}O ; 5kHz. (a) ^{31}P , $n = 6$; (b) 1H , $n = 6$; (c) ^{17}O ; $n = 6$; (d) ^{31}P , $n = 0$; (e) 1H , $n = 0$; (f) ^{17}O , $n = 0$. Asterisks denote spinning side bands.

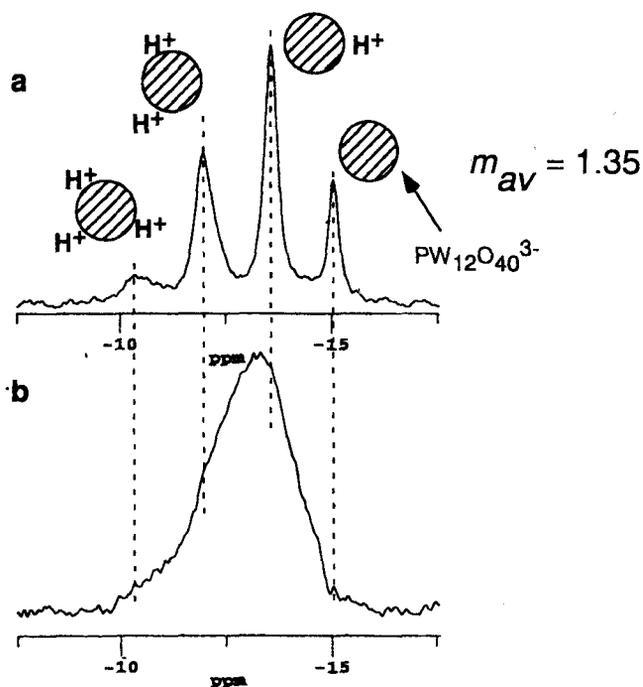


Figure 4. Variable temperature ^{31}P MAS NMR of $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \cdot 2.1\text{H}_2\text{O}$. (a) 173 K ; (b) 298 K. m_{av} stands for the amount of isolated acidic proton per polyanion.

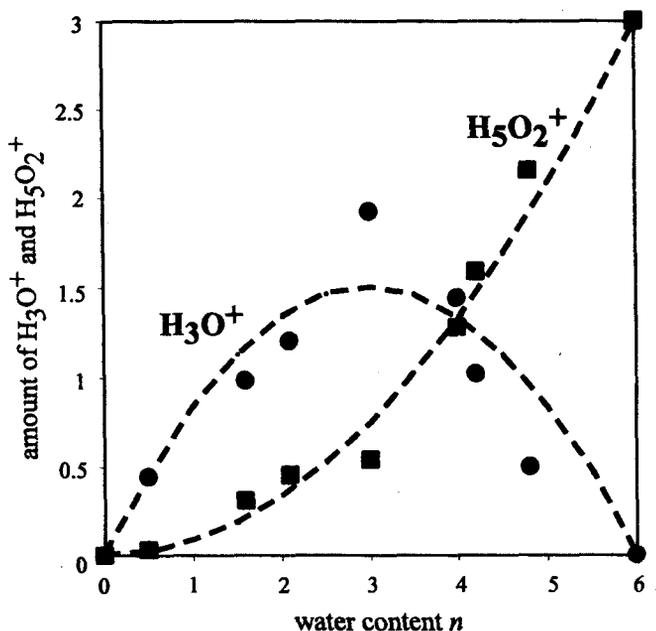


Figure 5. The amount of H_3O^+ and H_5O_2^+ per polyanion plotted as a function of the water content n . Symbols represent values calculated from the relative intensity of the ^{31}P NMR peaks at 173 K. ●: H_3O^+ , ■: H_5O_2^+ . Broken lines are theoretical values assuming random desorption of H_2O molecules from $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

(姫路工大理¹、ウエイン州立大²、カリホルニア大³) ○斉藤 肇¹、辻 暁¹、山口 悟¹、
谷生道一¹、河瀬靖治¹、米林香華¹、河南るり子¹、長谷川潤¹、内藤 晶¹、
Richard Needleman² Janos K. Lanyi³

Dynamic Structure of Membrane Proteins as Revealed by High-resolution Solid-state NMR (Himeji Institute of Technology¹, Wayne State University², University of California, Irvine³) Hazime Saito¹, Satoru Tuzi¹, Satoru Yamaguchi¹, Michikazu Tanio¹, Yasuharu Kawase¹, Koka Yonebayashi¹, Ruriko Kawaminami¹, Jun Hazegawa¹, Akira Naito¹, Richard Needleman², and Janos K. Lanyi³

We illustrated here how conformation and dynamics of ¹³C-labeled bacteriorhodopsin as a typical membrane protein can be revealed by high-resolution solid-state ¹³C NMR spectroscopy. Site-specific assignment of peaks has been made by comparing ¹³C NMR peaks of site-directed mutant with that of wild-type protein. Nevertheless, it turned out that the presence of induced fast isotropic or large-amplitude motion with correlation times shorter than 10⁻⁸ s or slow motion with correlation time of 10⁻³ s result in suppression of peaks either from CP-MAS NMR alone or both CP-MAS and DD-MAS NMR experiments. It proves that this sort of information is very valuable to analyze protein dynamics, in particular.

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌の紫膜にあり、分子量 26000 をもつものの 3 量体として存在している代表的な膜蛋白質である。光駆動ポンプとしての機能の解明の他に、大量発現が困難な G 蛋白質共役受容体分子の構造の特色を有するモデルとしての観点をふくめ、多くの研究者の関心を集めている。その 3 次元構造の研究は、結晶化の困難さから低温電子顕微鏡による研究に頼らざるを得なかったが、結晶化の進歩により 1.55 Å の分解能の X 線回折によるもふくめ、数か所の研究室から報告されている。これらの結果は、膜貫通部分の構造に関してはいずれも類似しているものの、N、C 末端やループにある残基の構造に関しては、結晶化しないしは試料作成条件の違いを反映し、構造が欠落ないしは見えていても必ずしも同様の結果が得られていない。

これに対して、われわれは固体高分解能 NMR による膜蛋白質構造の解析の可能性を検討してきた¹⁻¹⁰⁾。回折法に対して相補的な関係にある NMR の役割は、第一に上記の細胞膜界面にある残基の問題が、disorder によるのか、ダイナミックな揺らぎによるのかを明らかにし、後者の場合にはその時間尺度を明らかにすること、第二により詳細な情報が得られている主鎖に対して側鎖間の相互作用の有無に関する知見を、変異体などの利用を通じて明らかにすることにあると考えられる。これらまでに、われわれの研究室で得られた成果を、以下の主題により再構成し NMR によるアプローチの意義を明らかにする。

1. 分子の揺らぎと NMR 信号の欠落

膜蛋白質のようにその高次構造および揺らぎの程度が不均一な系では、固体高分解能 NMR の標準的手法である交差分極マジック角回転 (CP-MAS) 法のみでは、試料の全領域からの信号を得ることは困難であり、高出力デカップリングマジック角回転 (DD-MAS) による信号の検出も同時に行い、どの程度に信号の欠落があるかを知ることが必要である。実際、図 1 に示すように最下段の周波数の運動がある系においては、空白で示す周波数領域に運動があれば、それによって NMR 信号が欠落し、その結果運動の目安である相関時間 (周波数の逆数) に関する知見が得られる。実際、10⁻⁸ 秒よりも短い等方運動があれば、選択的に CP-MAS NMR に信号の欠落が

固体高分解能 NMR、膜蛋白質、動的構造

さいとうはじめ、つじさとる、やまぐちさとる、たにおみちかず、かわせやすはる、よねばやしこうか、かわみなみるりこ、はせがわじゅん、ないとうあきら、りちやーどにーどるまん、やーのしゅらに

が起こる。この等方性の問題は、必ずしも空間的に等方的でなくても Large-amplitude の揺らぎであってもよい。一方、プロトンデカップリング周波数と干渉する 10^{-5} 秒程度のおそい運動は、等方、異方性を問わず、bR からレチナールを除去したバクテリオオプシン (bO) のように¹⁰⁾、膜貫通ヘリックスにも大幅な信号の欠落がおこる。シッフ塩基との相互作用の有無によって bR の 3D 構造の安定化が起るとすれば、レチナール除去によりその時間尺度が遅いとはいえ、骨格構造がフレキシブルになることにより遅い時間尺度の揺らぎが起こることは興味深い。このような現象は、pH 10 で生じる D85N 変異株の M 様中間体や、A160G などのような変異の導入においても見られ、3D 構造の安定性との関連においても興味ある問題である。

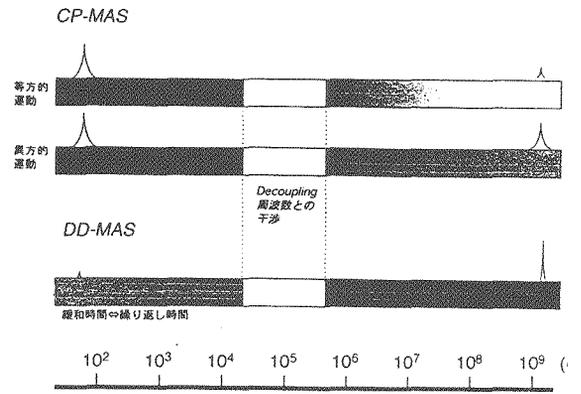


図1 二種類の固体NMRによる信号の欠落とその揺らぎの尺度

2 細胞膜界面にある残基の構造とダイナミクス

細胞界面から突出しているC末端付け根においては、回折法においては検出できない α ヘリックスが存在し得ることを、 ^{13}C NMRから指摘した^{2, 3, 5)}。低温領域では、デカップリング周波数との干渉でその信号が欠落する³⁾など、前節での議論に関連するほか、温度、pHによるその安定性の差異に関する知見も得ることができた。なお、このヘリックス領域の存在は、2価カチオンを通じて細胞質側でのループとの相互作用で、3D構造の安定性に関与しているものと考えられる。

3 アミノ酸側鎖のクロストークとプロトンポンプ

レチナールの異性化によって起こる細胞質側から細胞外側へのプロトンの移動は、その間のプロトン移動に関与する残基の側鎖同士や水との水素結合を通じての相互作用に基づくと考えられる。われわれはこれらの残基に関する種々の変異株のNMRスペクトルピークの変化によって、基底状態の蛋白質においてもこれらの残基間のクロストーク情報が得られることを示した^{8, 9)}。

- 1 S. Tuzi, A. Naito, and H. Saitô *Eur. J. Biochem.*, 218, 837-844 (1993)
- 2 S. Tuzi, A. Naito, and H. Saitô, *Biochemistry*, 33, 15046-15052 (1994)
- 3 S. Tuzi, S. Yamaguchi, A. Naito, R. Needleman, J. K. Lanyi, and H. Saito, *Biochemistry*, 35, 7520-7527 (1996)
- 4 S. Tuzi, A. Naito, and H. Saitô, *Eur. J. Biochem.*, 239, 294-301 (1996)
- 5 S. Yamaguchi, S. Tuzi, T. Seki, M. Tanio, R. Needleman, J. K. Lanyi, A. Naito, and H. Saitô *J. Biochem. (Tokyo)*, 123, 78-86 (1999)
- 6 M. Tanio, S. Tuzi, S. Yamaguchi, H. Konishi, A. Naito, R. Needleman, J. K. Lanyi, and H. Saitô, *Biochim. Biophys. Acta*, 1375, 84-92 (1998).
- 7 S. Tuzi, S. Yamaguchi, M. Tanio, H. Konishi, S. Inoue, A. Naito, R. Needleman, J. K. Lanyi, and H. Saitô, *Biophys. J.*, 76, 1523-1531 (1999).
- 8 M. Tanio, S. Inoue, K. Yokota, T. Seki, S. Tuzi, R. Needleman, J. K. Lanyi, A. Naito and H. Saitô, *Biophys. J.*, 77, 431-442 (1999).
- 9 M. Tanio, S. Tuzi, S. Yamaguchi, R. Kawaminami, A. Naito, R. Needleman, J. K. Lanyi and H. Saitô, *Biophys. J.*, 77, september (1999).
- 10 S. Yamaguchi, S. Tuzi, M. Tanio, A. Naito, J. K. Lanyi, R. Needleman, and H. Saitô, *Biophys. J.*, submitted.

(東工大院生命理工) ○浅川直紀, 櫻井 実, 井上義夫

Structural Study of Polymers by Solid-state Spin-echo NMR

Naoki Asakawa, Minoru Sakurai, Yoshio Inoue

Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan

Phone:045-924-5796 FAX:045-924-5827 e-mail: nasakawa@bio.titech.ac.jp¹

Solid state structure and molecular motion of some five-membered ring π -electron conjugated polymers with high regio-regularity, 100% head-to-head poly(4-methyl-thiazole-2,5-diyl) (HH-P4MeTz) and 100% head-to-head poly(3-methyl-thiophene-2,5-diyl) (HT-P3MeTh), were investigated by the ¹³C and ¹H solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. We performed ¹³C CPMAS measurements of HH-P4MeTz and HT-P3MeTh. Although the previous x-ray crystallography of HH-P3MeTz shows that the backbone of the polymer takes the *s-trans* conformation, it appeared from the isotropic chemical shielding for the methyl-carbon signal at room temperature that there exist another distinctive structure which would probably be attributed to twist of the backbone torsion angle. In addition, an analysis of principal components of chemical shielding tensor for the methyl carbon determined by the two-dimensional spin-echo (2DSE) measurements and *ab initio* MP2 chemical shielding calculation show that the backbone twist is highly correlated with the intramolecular methyl rotation. The ¹H spin-spin relaxation time measurements by two pulse Hahn echo (TPHE) and Carr-Purcell Meiboom Gill (CPMG) sequences indicate that with the assumption of diffusion coefficient of 10^{-11} – 10^{-13} cm²·s⁻¹ for restricted translational motion of modulation wave of microscopic magnetic field gradient (MFG) round the methyl-group in HH-P4MeTz is roughly estimated as the order of 10^7 – 10^8 Oe·cm⁻¹. The large value of MFG might be relevant to electron-nucleus hyperfine coupling.

はじめに

物質の構造や物性を研究する上で核の磁気遮蔽は重要な物理パラメータの一つであり、計算機の性能の近年の急速な発展に伴ってその重要性が益々指摘されてきている。特に、核の磁気遮蔽を二階のテンソル量として積極的に捉えようとする試みは、電子状態や異方的な分子運動など、物質に関する三次元空間的な情報を与え得るので大変興味深い。固体状態あるいは液晶状態にある高分子の核磁気遮蔽テンソル主値の情報を引き出すためには試料の静止スペクトルを取得するか、低速マジックアングル回転 (MAS) を行うのが常套手段である。しかし、電子的環境の異なる核の静止スペクトル間の重なりが大きい場合あるいは試料回転によるスピニングサイドバンド (SSB) 間の重なりが避けられない場合や、化学シフト異方性が小さな核の場合には、これらの方法をそのまま用いて磁気遮蔽テンソル主値の情報を得るのが困難である場合が多い。

そこで、静止スペクトルの解析や低速 MAS では困難とされているような核の磁気遮蔽テンソル主値を決定するための簡便な方法として我々は二次元スピネコー法を用いた幾つかの高分子化合物の構造解析を行ってきた。^{1,2} 紙面の都合上、一次構造制御型 π 電子共役系高分子の構造についてののみ触れるが、これまで、ポリ (L-アラニン) の α および β 炭素の化学シフトテンソル主値の決定やポリペプチド/生体膜コンプレックスにおける ³¹P 化学シフトテンソルの主軸系の方向の決定に用いてきている。

π 共役系高分子は機能性高分子材料として、また擬一次元金属を扱う物性物理学の分野において注目されてきており、実験的または理論的研究が盛んに行われてきている。さらに、 π 共役系高分子はレドックス挙動や導電性のみならず、フォトミネセンス (PL) や三次高調波の非線形光感受率 ($\chi^{(3)}$) などの測定から興味深い光学的性質をもつことが近年わかってきており、オプトエレクトロニクス材料として期待されている。近年、有機金属錯体モノマーを用いた脱ハロゲン化重縮合法により、regioregularity を制御したいいくつかの π 共役系ポリマーの合成が可能となってきた。現在のところ、UV-vis-PL- $\chi^{(3)}$ から分子間 π - π 相互作用が光学的物性を決定している重要な要因であることを示すいくつかの実験結果が得られている。しかし、これらの実験結果のみからは高分子の詳細な分子構造や電子状態に関する情報が得られていないため、更なる多角的な研究が必要である。本研究では、固体 NMR ¹³C 化学シフトテンソルや NMR 緩和時間の測定を通して一次構造を高度に制御したポリ (3-アルキルチオフェン-2,5-ジイル) (P3RTh) とポリ (4-アルキルチアゾール-2,5-ジイル) (P4RTz) の分子構造・電子構造を調べることを目的として研究を行っている。

結果と考察

Head-to-Head (HH)-P4MeTz, Head-to-Tail (HT)-P3MeTh, Random (*rand*)-P3MeTh の ¹³C CPMAS 測定により、メチル炭素の等方平均化学シフトがそれぞれ、20.1ppm (肩ピーク 17ppm), 15.0ppm, 15.0ppm であることがわかった。³ X 線回折の結果より、HH-P4MeTz の結晶格子の単位胞には単一の構造をもつモノマーユニットのみが存在していることが示唆されているが、固体 NMR 測定により電子環境の異なる二種類のメチル炭素が存在していることを見出した。

硫黄原子を含む複素五員環を有するポリ (3-アルキルチオフェン-2,5-ジイル) (P3RTh) と硫黄・窒素原子を含む複素五員環を有するポリ (4-アルキルチアゾール-2,5-ジイル) (P4RTz) は結晶状態において、主鎖は *s-trans* 構造を形成し、

¹ π -electron conjugated polymers, chemical shielding tensor, spin-spin relaxation time, diffusion coefficient, magnetic field gradient

あさかわ なおき, さくらい みのる, いのうえ よしお

アルキル鎖が分子間で end-to-end パッキングすることにより、複素環同士の face-to-face π スタッキングが形成されていることが X 線回折から知られている。しかし、側鎖のアルキル基がメチル基の場合、すなわち P3MeTh 場合には、結晶格子は face centered lattice となり、 π スタッキングは staggered 構造をとることが示されてきている。この staggered 構造は HT-P3MeTh-rand-P3MeTh 共に形成されていると考えられている。メチル炭素の 5ppm のシフト差の原因および HH-P4MeTz における共鳴周波数の異なるメチル炭素の存在の由来を解明するためには化学シフトテンソル主値の決定が必要であると考え、二次元スピネコー実験による化学シフトテンソル主値の決定を行った (Fig.1)。MP2-GIAO 法による磁気遮蔽テンソルの計算から、HH-P4MeTz の側鎖のメチル基の回転は主鎖のねじれと強く関連していて、二種のメチル炭素の信号は主鎖のねじれに起因していることが示唆された。このメチル回転は、回転拡散の場合に起こる化学シフトテンソルの平均化による軸対称化がみられなかったため、この系のメチル基の回転は 3 サイトジャンプのようなホッピング運動であると考えられる。さらにメチル基周りの分子運動や電子構造を調べるために、Two Pulse Hahn-echo (TPHE) 法および Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 法を用いて ^1H スピンスピン緩和時間 (T_2) 測定を行った。Fig.2a に CPMG 法によるエコー時間 2τ に対する磁化強度変化のプロットを示す。Fig.2a に示すように、TPHE の減衰曲線は二成分から構成されている。短いエコー時間の領域 ($2\tau \leq 150\mu\text{s}$) では、 ^1H 信号の線幅は約 20kHz ($T_2^{\text{TPHE}} = 42\mu\text{s}$) であり、エコーの減衰は NMR 信号が尖鋭化するほどには分子運動性が高くない成分 A に主に支配されている。しかしエコーの減衰は、rigid lattice に見られるガウス関数型の依存性は観測されず、 $\exp(-\tau)$ 依存性を示した。エコー時間 $2\tau \geq 150\mu\text{s}$ の領域では、信号は尖鋭化され、約 5kHz の線幅 ($T_2^{\text{TPHE}} = 180\mu\text{s}$) となった。この成分 B も $\exp(-\tau)$ 依存性を示した。今回行った CPMG 測定では、エコー時間が長い場合、TPHE の減衰の遅い成分 B の信号に対する測定となる。TPHE と CPMG の減衰曲線を比較すると、TPHE 法による減衰速度の方が大きく、かつ TPHE の減衰曲線が $\exp(-\tau)$ 依存性をもつことから、今回行った NMR 測定の時間スケールでは、制限的な分子拡散あるいは局所的な磁場勾配 (MFG) 波の拡散 (またはスピンドiffusion) が起きていることが推測される。CPMG 法でのエコー時間 (τ) の逆数に対して ($T_2^{\text{CPMG}})^{-1}$ をプロットしたものを Fig.2b に示す。TPHE 法による実験は $\tau^{-1} \rightarrow 0$ の CPMG 実験とみることができ、Fig.2b にプロットを加えた。制限拡散に対する Robertson の式と Doussal-Sen の式 (a:制限距離 [cm], G:磁場勾配 [$\text{Oe}\cdot\text{cm}^{-1}$] D:拡散係数 [$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$] γ :磁気回転比 [$\text{rad}\cdot\text{ms}^{-1}\cdot\text{G}^{-1}$])

$$\frac{1}{T_2^{\text{TPHE}}} = \frac{a^4 \gamma^2 G^2}{120D} \quad (1)$$

$$\frac{1}{T_2^{\text{CPMG}}(\tau)} = -\frac{17}{13440} \frac{a^6 \gamma^2 G^2}{D^2 \tau} + \frac{1}{T_2^{\text{TPHE}}} \quad (2)$$

(Fig.2b 中の直線)

により実験結果を解析し、 $aG=3.4\text{ Oe}$ 、 $a^2/D=0.08\text{ ms}$ を得た。メチル基の内部回転では TPHE と CPMG 法の結果を説明できず、何らかの並進拡散が起きていると考えられる。HH-P4MeTz は固体状態において分子間 π スタッキングにより強くパッキングしているため、高分子鎖の並進拡散を観測しているとは考えにくい。したがって、今回観測された拡散は局所的な MFG 波の拡散に起因していると考えられる。局所的な MFG 波の起源がメチル水素間スピンドiffusion であり $D \sim 10^{-12}\text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 程度と仮定すると、 $a \sim 1\text{ \AA}$ 、 $G \sim 10^8\text{ Oe}\cdot\text{cm}^{-1}$ となる。G の大きさは非常に大きな値

となり、プロトンによって作り出される局所磁場勾配としては大きすぎるように思われる。巨視的な磁場勾配は小さい場合であっても微視的には大きな磁場勾配をもつことが可能であることが指摘されているが、 π 共役系高分子では、電子スピンの超微細結合が深く関わっているのではないかと考えられるが今後の更なる検討を要する。

¹ Asakawa, N. et al., *Magn. Reson. Chem.*, **37**, 303(1999).

² Asakawa, N. et al., to be accepted.

³ 浅川ら, 第 37 回 NMR 討論会要旨集, P.404(1998).

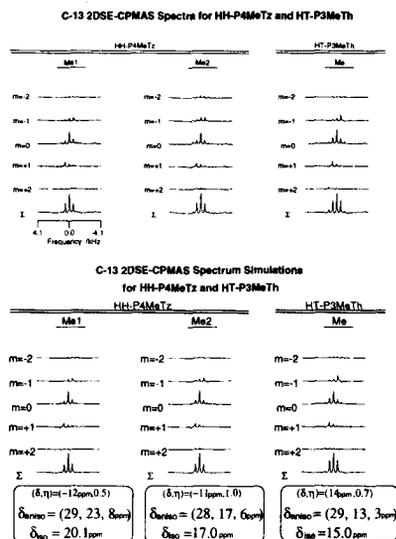


FIG. 1. いくつかの複素五員環 π 電子共役系高分子の ^{13}C 二次元スピネコースペクトル

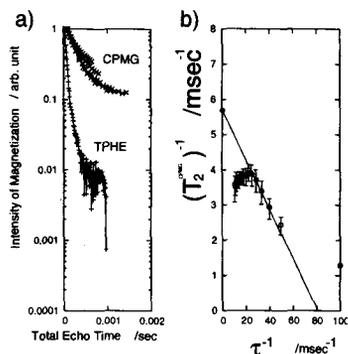


FIG. 2. TPHE と CPMG NMR 法によるスピネコー減衰曲線 (a) と室温下 (295K) における HH-P4MeTz のスピンスピン緩和時間 (T_2) のエコー時間 τ 依存性 (b)

^{129}Xe NMR 化学シフト値によるガラス状高分子の微細孔サイズの評価

(名工大・工) ○吉水広明、宮内 実、鈴木智幸、辻田義治、木下隆利

The Characterization of Size of the Microvoid in Glassy Polymers by ^{129}Xe NMR Chemical Shifts

(Nagoya Institute of Technology) Hiroaki YOSHIMIZU, Minoru MIYAUCHI, Tomoyuki SUZUKI, Yoshiharu TSUJITA, Takatoshi KINOSHITA

In this study, to characterize the size of the microvoids in glassy polymers by the ^{129}Xe NMR chemical shifts, the ^{129}Xe NMR spectra of the ^{129}Xe in glassy polymers were measured at various pressures. The Xe sorption isotherms of the polymers were measured by the quartz crystal microbalance at 25 °C. Since the isotherm of Xe showed the dual-mode sorption type, we could calculate the dual-mode sorption parameters. The ^{129}Xe NMR chemical shifts of Xe in the glassy polymers shifted to low field with increasing the sorption amount of Xe. The good linear relationship between the ^{129}Xe NMR chemical shift and the amount of the Xe sorption into Langmuir site calculated using the dual-mode sorption parameters was obtained. From the results obtained here, it can be said that the size of the microvoid in glassy polymer was determined by the ^{129}Xe NMR chemical shifts.

1. ^{129}Xe NMR 化学シフトは $\delta = \delta(\text{S}) + \delta(\text{E}) + \delta(\text{Xe})$ と分解することができる。ここで $\delta(\text{S})$ は Xe 原子と高分子鎖との衝突による項であり間隙が小さいほど大きくなる。 $\delta(\text{E})$ は電場による分極あるいは Xe 原子からの電荷移動によって引き起こされる項であるが、通常の有機高分子ではこの項は無視してよいと考えられる。 $\delta(\text{Xe})$ は Xe 原子同士の衝突による項で、Xe 密度とともに直線的に増加する。我々はこれまでにガラス状高分子への Xe ガスの吸着特性と ^{129}Xe NMR 化学シフト値の間には明確な相関があり、ガラス状高分子の未緩和体積またはマイクロポイド(微細孔)を評価する上で、 ^{129}Xe NMR 法が有効な手法であることを示してきた¹⁾。ここでは今までに得てきた結果をより詳細に考察するとともに、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値から実際にマイクロポイドのサイズを評価し得ることを示す。

2. 各試料膜を細かく裁断し、テフロン製バルブの付いた NMR 管(Wilmad 社製)に約 2g 充填した後、十分乾燥してから所定圧力に相当する Xe を導入して測定に供した。 ^{129}Xe NMR スペクトルは、日本電子(株)製の GX400NMR 分光計を用い、観測周波数は 110.5MHz にてシングルパルス法で測定した(待ち時間は 10 秒)。 ^{129}Xe NMR 化学シフト値はあらかじめ Xe ガスについて化学シフトの圧力依存性を調べておき、同時に観測される気体 ^{129}Xe のピークを内部基準として補正した(圧力 0 の時を 0ppm とする)。Xe 吸着等温曲線は Quartz Crystal Microbalance (QCM)法により得た。

3. 一般に、ガラス状高分子への気体吸着挙動は次に示す二元吸着モデルで説明される。

$$C = C_D + C_H \quad [C_D = k_D p, \quad C_H = C_H' b p / (1 + b p)] \quad (1)$$

ここで C は吸着量($\text{cm}^3\text{STP}/\text{cm}^3_{\text{polym.}}$)、 C_D は Henry 吸着した気体の量、 C_H は Langmuir 吸着した気体の量、 k_D は Henry 則に従う溶解度定数($\text{cm}^3\text{STP}/\text{cm}^3_{\text{polym.}}\text{cmHg}$)、 C_H' は Langmuir 吸着の飽和定数($\text{cm}^3\text{STP}/\text{cm}^3_{\text{polym.}}$)、b は Langmuir 吸着の親和定数(cmHg^{-1})である。Table 1 に各試料の 25°Cにおける Xe 吸着等温曲線より決定した二元吸着パラメーターをそれぞれのガラス転移温度 T_g (°C)とともに示した。 C_H' は各試料の T_g と測定温度との差、即ち非平衡性の程度と良く符合し、マイクロポイドの量(サイズ×数)を反映していることがわかる。

各試料の Xe 吸着特性はその等温曲線から二元吸着モデルに従うのは明らかで、Langmuir 吸着サイト及び Henry 則に従う溶解サイトそ

Table 1
Dual-mode sorption parameters and glass transition temperature

sample	C_H'	$b \times 10^2$	$k_D \times 10^2$	T_g
PPO	19.1	7.5	1.5	219
TMPC	17.4	6.0	1.5	196
PC	10.1	6.0	1.5	160
PS	4.9	8.6	1.1	100

PPO: polyphenyleneoxide.

TMPC: tetramethylpolycarbonate.

PC: polycarbonate.

PS: polystyrene.

キーワード： ^{129}Xe NMR、化学シフト値、ガラス状高分子、マイクロポイド、二元吸着モデル

よしみず ひろあき、みやうち みのる、すずき ともゆき、つじた よしはる、きのした たかとし

それぞれに Xe は存在する。25°Cにおいて種々の Xe 圧力下で各試料に到着した ^{129}Xe の NMR スペクトルを観測したところ、何れの試料に対しても測定圧力範囲全てで対称性の良い単一ピークを示した。従って、両サイト間の Xe の交換は速いと思われる。

一方、何れの試料膜においても高圧、すなわち吸着量が増加するとともに ^{129}Xe NMR 化学シフト値は低磁場シフトした。この低磁場シフトの原因として試料膜中の Xe 密度の増加が挙げられる。Xe ガスや、電場効果の無いゼオライト系化合物及びゴム状高分子にそれぞれ吸着・溶解した場合では、その ^{129}Xe NMR 化学シフト値が圧力とともに線形に低磁場シフトする。これらは Xe 密度(或は吸着・溶解量)と圧力が線形関係にあるからである。これに対し、ガラス状高分子では圧力とともに線形には低磁場シフトしなかった。Table 1 の値を使って各圧力における C_H を算出し、これに対して ^{129}Xe NMR 化学シフト値をプロットしたところ、良好な直線関係となった(Fig. 1)。従って、実際の ^{129}Xe NMR 化学シフト値は Langmuir 吸着サイトに偏った情報とみるべきである。Langmuir サイトに偏る理由として、両サイトにおける吸着量の増加に対応した Xe 密度の増加の度合いが互いに著しく異なるためと考えられる。実際、Henry 則のみで吸着特性を表現できるゴム状高分子においては、吸着量(=圧力)に対する低磁場シフトは、ガラス状高分子におけるそれよりかなり小さい。

Fig. 1 のプロットを $C_H = 0$ に外挿した値は高分子と Xe との衝突のみがある場合の化学シフト値すなわち $\delta(S)$ であり、これはガラス状高分子のマイクロポイドのサイズと対応づけられる。ここで、空孔のサイズが定量されているゼオライト系化合物での $\delta(S)$ 値とそのサイズの関係²⁾に、ガラス状高分子系で得られた $\delta(S)$ 値を当てはめ、マイクロポイドのサイズを見積もった。結果を同じ高分子についての陽電子消滅法から決定されたマイクロポイドサイズ³⁾とともに Table 2 に示した。両方法で評価された値は概ね一致しており、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値からマイクロポイドのサイズを評価し得ることがわかる。また、ここで得られた $\delta(S)$ 値と C_H' との間に良好な直線関係が見られた(Fig. 2)ので、 C_H' はマイクロポイドのサイズを強く反映しているといえる。

文献：1) 宮内、吉水ら、第 37 回 NMR 討論会要旨集、p.342、1998。吉水、辻田、高分子加工、印刷中。 2) J.Demarquay, J.Fraissard, Chem. Phys. Lett., 136, 314(1987)。J.A.Ripmeester C.I.Ratcliffe, J. Phys. Chem., 94, 7652(1990)。G.Fetter, et. al., Appl. Catalys., 65, L1(1990)。 3) J.Bartos, et. al., Polymer, 37, 3397(1996)。

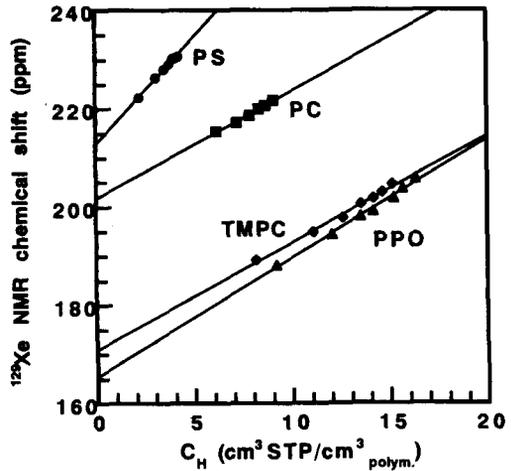


Fig.1 The plot of ^{129}Xe NMR chemical shift vs. amount of Xe sorption into Langmuir sorption site.

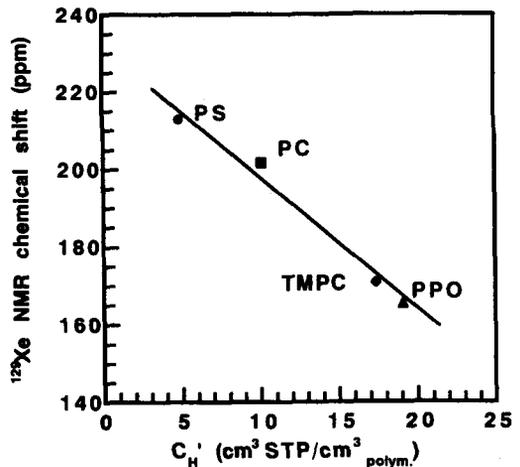


Fig.2 The plot of ^{129}Xe NMR chemical shift vs. Langmuir sorption capacity C_H' of Xe for glassy polymers.

Table 2
The size of microvoid in glassy polymers

sample	size of microvoid (Å)	
	^{129}Xe NMR	positron annihilation*
PPO	6.3	—
TMPC	6.1	6.40
PC	5.2	5.88
PS	5.0	5.76

*ref. 3.

¹京大化研・²マサチューセッツ大 ○梶 弘典^{1,2}・Klaus Schmidt-Rohr²Analyses of Local Structure of Disordered Polymers by Multidimensional
Double-Quantum NMR MethodHironori Kaji^{1,2} and Klaus Schmidt-Rohr²¹Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, JAPAN and²Department of Polymer Science & Engineering, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA

We present static two- and three-dimensional (2D, 3D) double-quantum (DQ) NMR investigations of the conformation in a disordered crystalline polymer, atactic poly(acrylonitrile) (a-PAN) and the local packing in glassy bisphenol-A-polycarbonate (PC). High-quality DQ spectra even for large chemical-shift anisotropies are obtained with radio-frequency jumps, enabling off-resonance evolution with all the pulses on-resonance. The backbone conformation in a-PAN, investigated in a 15% ¹³CH₂-labeled PAN sample, is predominantly in a state close to trans. The deviation from exact trans torsion angles is quantified by measurements on a 100% ¹³CN-labeled and on a ²H/¹³CN-labeled a-PAN sample. For orientation and distance measurements of the local packing in PC, 3D DQ technique is applied to 100% ¹³CO-labeled PC by adding a ¹³C-¹³C dipole coupling dimension to the 2D DQ experiment. The ability to detect the trans state or parallel segments is a crucial advantage of the DQ approach over 2D exchange NMR.

1. 緒言

ガラス状高分子の局所構造の多くはいまだ明確にはなっていない。また、結晶性高分子の中でも、結晶構造が明らかになっていないものがある。我々は最近、結晶性・非晶性を問わず固体材料中の局所的な相対配向を定量的に知ることができる二次元二量子遷移固体 (2D DQ/CSA) NMR 法を開発した。この方法は、¹³C スピン拡散を利用した二次元交換固体 NMR 法と比べ、trans 状態あるいは平行に配列した状態を観測できることに加え、それぞれのコンホメーション(あるいは配向)の存在比を定量的に解析できるという大きな利点がある。本研究では、回折法では明らかになっていない乱れた結晶構造をもつアタクチックポリアクリロニトリル(a-PAN)のコンホメーション、およびガラス状ビスフェノール-A-ポリカーボネート(PC)の局所的なパッキングを、2D DQ/CSA NMR 法により、またこれに ¹³C-¹³C 双極子の軸を加えた三次元 (3D DQ/CC/CSA) NMR 法により検討した。

2. 実験

a-PAN 試料として、¹³CH₂ 炭素をラベルしたアクリロニトリル(AN)(15%)とラベルしていない AN(85%)から重合した試料(¹³CH₂-aPAN)、¹³C≡N 炭素を 100%ラベルした試料(¹³CN-aPAN)、および α 位の ¹H を重水素化した AN(75%)と ¹³C≡N 炭素をラベルした AN(25%)から重合した試料(²H/¹³CN-aPAN)を用いた。PC 試料には、Max-Planck-Institut の Prof. Spiess に提供して頂いた C=O 炭素を 100%ラベルした試料(¹³CO-PC)を用いた。固体 NMR 測定は、Bruker DSX-300 分光計により室温で行った。

キーワード：二量子遷移 NMR、ポリアクリロニトリル、ポリカーボネート、
コンホメーション、パッキング

かじ ひろのり、Klaus Schmidt-Rohr

3. 結果と考察

3.1. a-PAN 図1(a)に $^{13}\text{CH}_2$ -aPAN の実測 2D DQ/CSA NMR スペクトルを示す。シミュレーションの結果、a-PAN のコンホメーションは、trans : gauche = 90 : 10 であることが明らかとなった。しかし、アタクチック高分子の場合、meso dyad と racemo dyad の torsion angle は、必ずしも一致しないと期待される。 ^{13}CN -aPAN に 2D DQ/CSA NMR 法を、 $^2\text{H}/^{13}\text{CN}$ -aPAN に 2D $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ correlation NMR 法を用いることにより、これらの torsion angle を別々に観測することができる。図1(b),(c)にその結果を示す。シミュレーションの結果、meso dyad および racemo dyad に対して、trans の torsion angle がそれぞれ $180^\circ \pm 20^\circ$ および $180^\circ \pm 10^\circ$ であることが明らかになった。

これら、特に、大きな化学シフト異方性の DQ 測定に対して、rf 周波数ジャンプを用いることにより、すべてのパルスを on-resonance に保ったまま t_1 の間のみ off-resonance にすることが可能となり、artifact のないスペクトルを得ることができた。

3.2. PC 図2に ^{13}CO -PC の実測 2D DQ/CSA NMR スペクトルを示す。ガラス状 PC に対し、Schaefer らは局所的に分子鎖が平行に配列した "bundle" モデルを提唱しているが、"bundle" モデルを仮定した場合のシミュレーションスペクトルとは明確に異なっていた。また、完全にランダムな分子鎖のパッキングを考えた場合のシミュレーションスペクトルと比べ、実測スペクトルでは $(\sigma_{11}, \sigma_{22})$ および $(\sigma_{33}, \sigma_{33})$ 部分の強度が小さかった。詳細なシミュレーションの結果、-O-C(=O)-O-面は、主として face-to-face (面が平行にスタック) あるいは face-to-edge でパッキングしていることが明らかとなった。

さらに、3D DQ/CC/CSA NMR 法により、様々な配向相関をもつ核間の距離をそれぞれ分離して測定した。ここでは、二量子成分のみを選択的に観測することができるため、 ^{13}C - ^{13}C 双極子スペクトルの軸から数 Å の距離を解析することが可能である。得られた結果から、face-to-face および edge-to-edge でパッキングした場合の ^{13}C - ^{13}C 間の距離は、それぞれ 4.2 および 4.8 Å と見積られた。

謝辞: PC の研究に協力してくれた J. Rupp, K. Saalwächter および試料を提供して頂いた Prof. H. W. Spiess に深く感謝します。

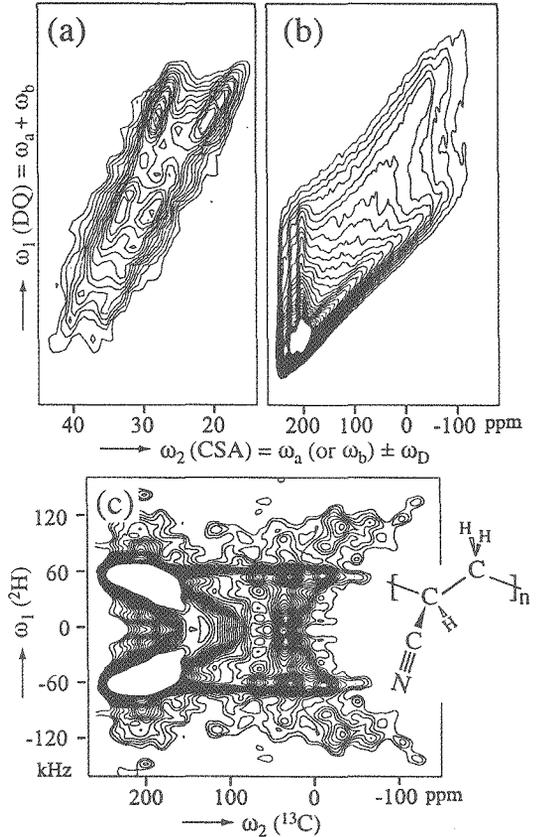


Fig. 1. Experimental 2D DQ/CSA NMR spectra of (a) $^{13}\text{CH}_2$ -aPAN, and (b) ^{13}CN -aPAN. (c) Experimental 2D $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ correlation NMR spectrum of $^2\text{H}/^{13}\text{CN}$ -aPAN.

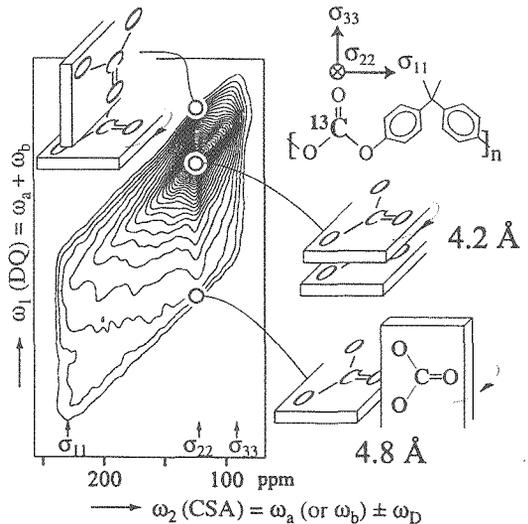


Fig. 2. 2D DQ/CSA NMR spectrum of glassy ^{13}CO -PC.

ポスター発表

(14:00 - 16:00)

ポスター番号	発表日
$3n+1$	10月13日 (水)
$3n+2$	10月14日 (木)
$3n$	10月15日 (金)

Determination of coupling constants ${}^3J(C^\beta, N)$ by DQ/ZQ method

Yasuhiro Kumaki, Kunio Hikichi, and Katsutoshi Nitta

(Faculty of Science, Hokkaido University)

DQ/ZQ method based on HN(CO)CA for determination of ${}^3J(C^\beta, N)$ coupling constants, which are supposed to be related with dihedral angle Ψ , is presented. In the present method the magnitudes and absolute signs of ${}^3J(C^\beta, N)$ coupling constants can be estimated from the f_1 splittings of cross-peaks. We applied this method to human ubiquitin, and investigated the relation between ${}^3J(C^\beta, N)$ coupling constants and its crystal structure-derived Ψ angles.

蛋白質主鎖の二面体角 ψ に関連することが期待される ${}^{13}C$ - ${}^{15}N$ 遠隔スピン結合定数 ${}^3J(C^\beta, N)$ は既に定量的 J 相関法による測定例が報告されている^{(1), (2)}。これらの報告では ${}^3J(C^\beta, N)$ の絶対値が非常に小さいことが述べられているものの、二面体角 ψ との関係については明らかにされていない。

我々は ZQ/DQ 法⁽³⁾を用いたパルスシーケンスを考案し(図 1)、 ${}^3J(C^\beta, N)$ を符号を含めて決定することで、これと二面体角 ψ との関係を明らかにすることを試みた。この方法では得られる $C^\alpha(i)-N(i+1)$ の二量子(DQ)及び零量子(ZQ)由来の交差ピークはそれぞれ f_1 軸方向において $|{}^1J(C^\alpha, C^\beta) + {}^3J(C^\beta, N)|$ 及び $|{}^1J(C^\alpha, C^\beta) - {}^3J(C^\beta, N)|$ の分裂を示し、これら2つの分裂の差から ${}^3J(C^\beta, N)$ の絶対値及び符号が求められる。その他の J による分裂はパルスによって抑えられているか、DQ、ZQ において同等の寄与を示すようになっており、見積もられる ${}^3J(C^\beta, N)$ に対して影響を与えないと考えられる。

この測定法をヒト・ユビキチンに応用し、得られた DQ/ZQ スペクトル(図 2)から ${}^3J(C^\beta, N)$ を求めた。Huらの報告⁽¹⁾では求められた全ての ${}^3J(C^\beta, N)$ の絶対値は 0.3Hz 以下となっている一方で、今回求められた ${}^3J(C^\beta, N)$ はおよそ-1~+3Hz の範囲にわたっていることがわかった。また今回求められた ${}^3J(C^\beta, N)$ を結晶構造⁽⁴⁾における二面体角 ψ に対してプロットした結果(図 3)、 ${}^3J(C^\beta, N)$ の ψ 依存性も見られた。今回求められた ${}^3J(C^\beta, N)$ の誤差、及び Huらの結果との相違の原因については現在考察中である。

参考文献

- (1) J.-S. Hu, and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, **9**, 323 (1997).
- (2) R. Konrat, D. R. Muhandiram, N. A. Farrow, and L. E. Kay, *J. Biomol. NMR*, **9**, 409 (1997).
- (3) A. Rexroth, P. Schmidt, S. Szalma, T. Geppert, H. Schwalbe, and C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10389 (1995).
- (4) S. Vijay-Kumer, C. E. Bugg, and W. J. Cook, *J. Mol. Biol.*, **194**, 531(1987).

ZQ/DQ、スピン結合定数、二面体角 ψ

くまきやすひろ、ひきちくにお、につかつとし

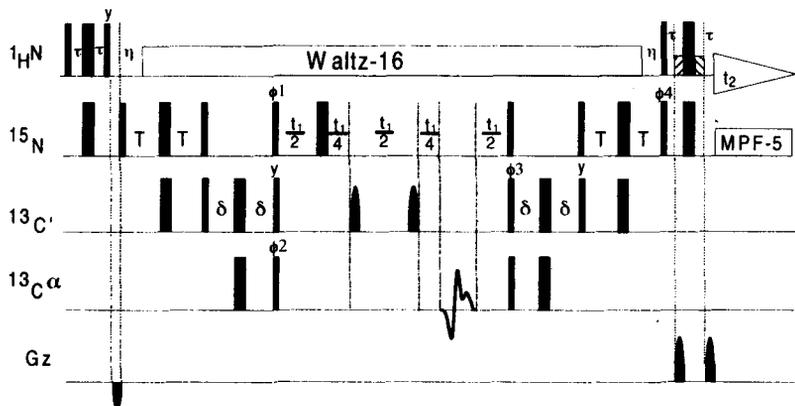


Fig.1
Pulse sequence
for measurement of $^3J(C^\beta, N)$
based on
HN(CO)CA with
DQ/ZQ evolution

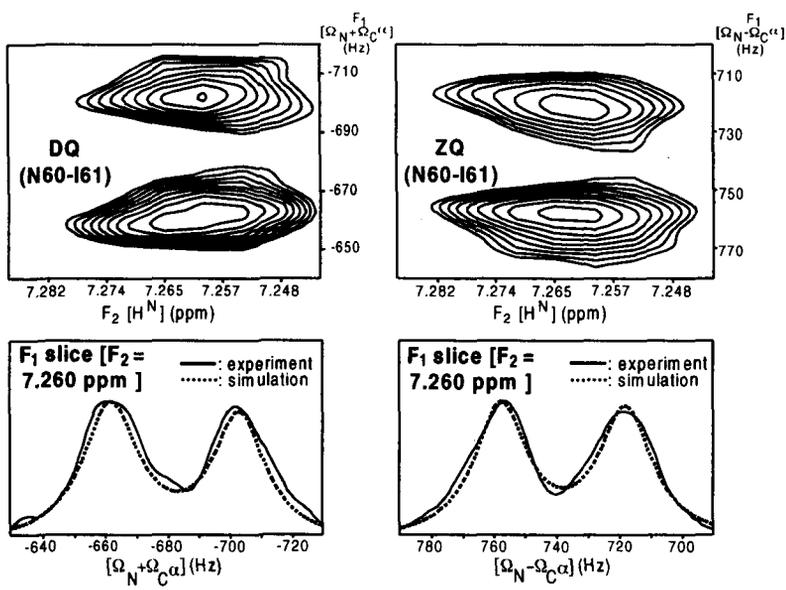


Fig.2 (upper)
Expansion of
DQ/ZQ spectra
including N60/161
cross-peak for
human ubiquitin
(lower) F1 slice
spectra with
simulated ones

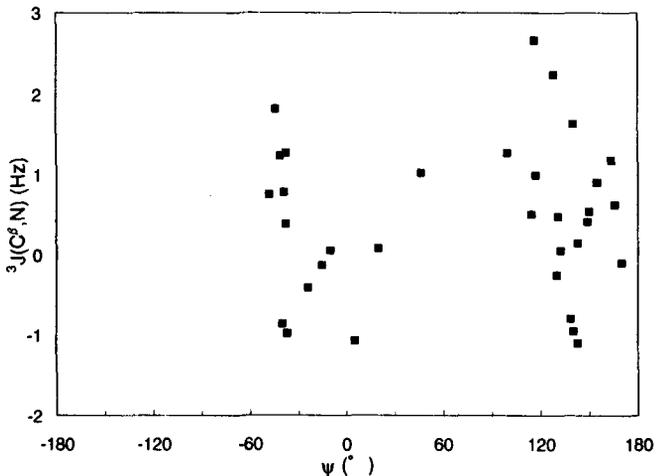


Fig.3 $^3J(C^\beta, N)$
coupling constants
measured human
ubiquitin versus
its crystal structure
-derived Ψ angles

P2 Selective J-HMBC 2D 法による異種核間ロングレンジカップリング定数の測定

(千葉大分析センター、日本電子NMR応研*、雪印乳業生物科学研**)

○徳永達裕、関宏子、内海博明*、中越雅道**、山口健太郎

Determination of Heteronuclear long-range scalar coupling constants by selective J-HMBC 2D

T. Tokunaga, H. Seki, H. Utsumi*; M. Nakakoshi** and K. Yamaguchi

Chemical Analysis Center, Chiba University, *NMR Application Lab., JEOL Ltd.,

**Research Institute of Life Science, Snow Brand Milk Products Co. Ltd.

We present a modified J-HMBC 2D method using selective excitation pulse. Selective excitation pulse is effective for the removal of $^1\text{H}-^1\text{H}$ J-modulation due to $^1\text{H}-^1\text{H}$ coupling. This method is useful and practicable for the determination of heteronuclear long-range coupling constants for strong-coupled proton of multiple spin system. An accurate coupling constants are obtained in comparison with the ordinary J-HMBC 2D method.

はじめに

J-HMBC 2D 法は、展開時間 Δ を変化させた 2 次元データから解析対象とする相関信号の強度を求め、その強度変化が $\sin(\pi J \Delta)$ に依存する原理を利用して最小二乗法近似によりカップリング定数を求める方法である。¹⁾ しかし、カップリングが複雑な信号においては、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ J 変調の影響により信号強度変化が \sin 関数から外れ、正確な値が得られない場合もあった。²⁾ そこで、今回我々は $^1\text{H}-^1\text{H}$ J 変調の影響を排除する目的でプロトン側に選択的励起パルスを利用したパルスシーケンスを新たに開発し、その有効性について検討した。その結果、選択的励起パルスは非常に効果的であることが判明した。特にプロトンのケミカルシフト値が接近し、J モジュレーションの影響が強く作用するため、選択的励起パルスを用いない J-HMBC 2D 法では正確な値が得られにくかった多重スピン系のプロトンに対しても、正確な異種核間ロングレンジカップリング定数が得られる実用的な測定法として使用できる事を確認したので報告する。

実験

装置および試薬

NMR 測定は全て、日本電子 (JEOL) 製の Lambda 600 (^1H -NMR 600 MHz) 装置、プローブはナノラック社製 NHX5FG プローブを用いた。測定溶媒は DMSO- d_6 (99.9ATOM%D, ISOTEC 社製) を用いた。測定サンプルはナカライテスク社製 Harman, free base 20mg を 0.55ml の DMSO- d_6 に溶解させて用いた。

キーワード J-HMBC 2D 選択的励起パルス 異種核間ロングレンジカップリング

とくながたつひろ、せきひろこ、うつみひろあき、なかこしまさみち、やまぐちけんたろう

実験条件

測定温度は 30°C とし、コンスタントタイム (T) を 300 msec に設定し、展開時間 Δ は 10~290 msec まで 20 msec 間隔で 15 点の測定をした。

結果と考察

J-HMBC 2D 法 [Figure 2 (a)] により Harman (1) の ^1H - ^{13}C 間ロングレンジカップリング定数を求めたところ、7 個のプロトンのうち、6, 7, 8 位のプロトンに関わるロングレンジカップリング定数については相関係数が低く精度良い結果が得られなかった。この原因としては、6, 7, 8 位のプロトンは 5 位のプロトンも含めた 4 スピン系の 3 プロトンであり、且つケミカルシフト値が接近しており ^1H - ^1H J 変調の影響をお互いに強く及ぼしあう環境にあることがわかる (Figure 1)。

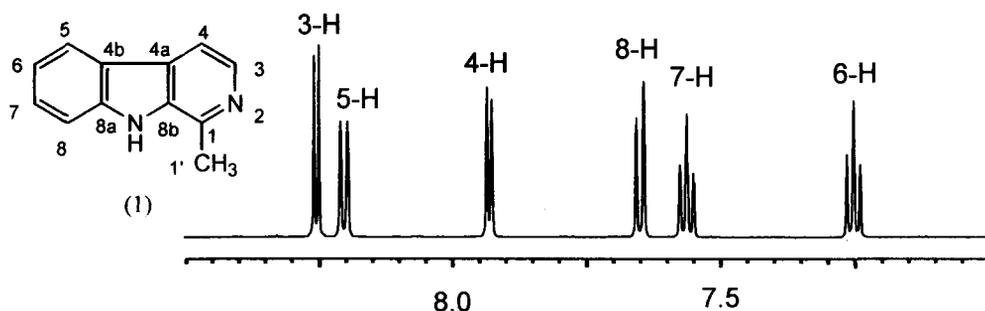


Figure 1 Aromatic region of ^1H NMR spectrum of Harman (1)

そこで ^1H - ^1H J 変調の影響を排除する目的で、プロトン側の 180 度パルスにガウスパルスを用いてプロトンの選択的励起を行う selective J-HMBC 2D 法 [Figure 2 (b)] を考案し、その有効性について検討した。その結果、ケミカルシフト値が離れた 6 位 (δ 7.22) は相関係数の向上が観られ、選択的励起パルスの効果が認められた。しかし、近接したケミカルシフト値を持つ、7 位 (δ 7.53) と 8 位 (δ 7.59) では、選択的励起パルスの効果が認められなかった。この原因としては、7 位 (δ 7.53) と 8 位 (δ 7.59) は、オルトカップリングをしているにもかかわらずケミカルシフト値が近いため、ガウスパルスでは一方のプロトンだけを選択的に励起できず、 ^1H - ^1H J 変調の影響を排除できなかったためと考えられる。そこで、更に励起選択性を高めるため、プロトン側の 90 度パルスに e-burp2 パルス、180 度パルスに I-burp1 パルスを用いる double selective J-HMBC 2D 法 [Figure 2 (c)] を開発し、7, 8 位について測定を試みた。その結果、更に相関係数および精度の向上が観られ、選択的励起パルスの効果が確認された。それぞれの測定法で得られた 5~8 位プロトンに対するロングレンジカップリング定数を Table 1 に示す。

まとめ

J-HMBC 2D 法においては、 ^1H - ^1H J 変調の影響を排除する方法として、選択的励起パルスの

利用は非常に効果的であることが確認され、異種核間ロングレンジカップリング定数測定法として selective J-HMBC 2D 法及び double selective J-HMBC 2D 法は実用的な測定法として使用できることが確かめられた。加えて、特定のプロトンのみを選択励起するため、普通の J-HMBC 2D 法に比較してプロトン側の観測範囲をせばめられることからデータサイズを小さくできるメリットもある。

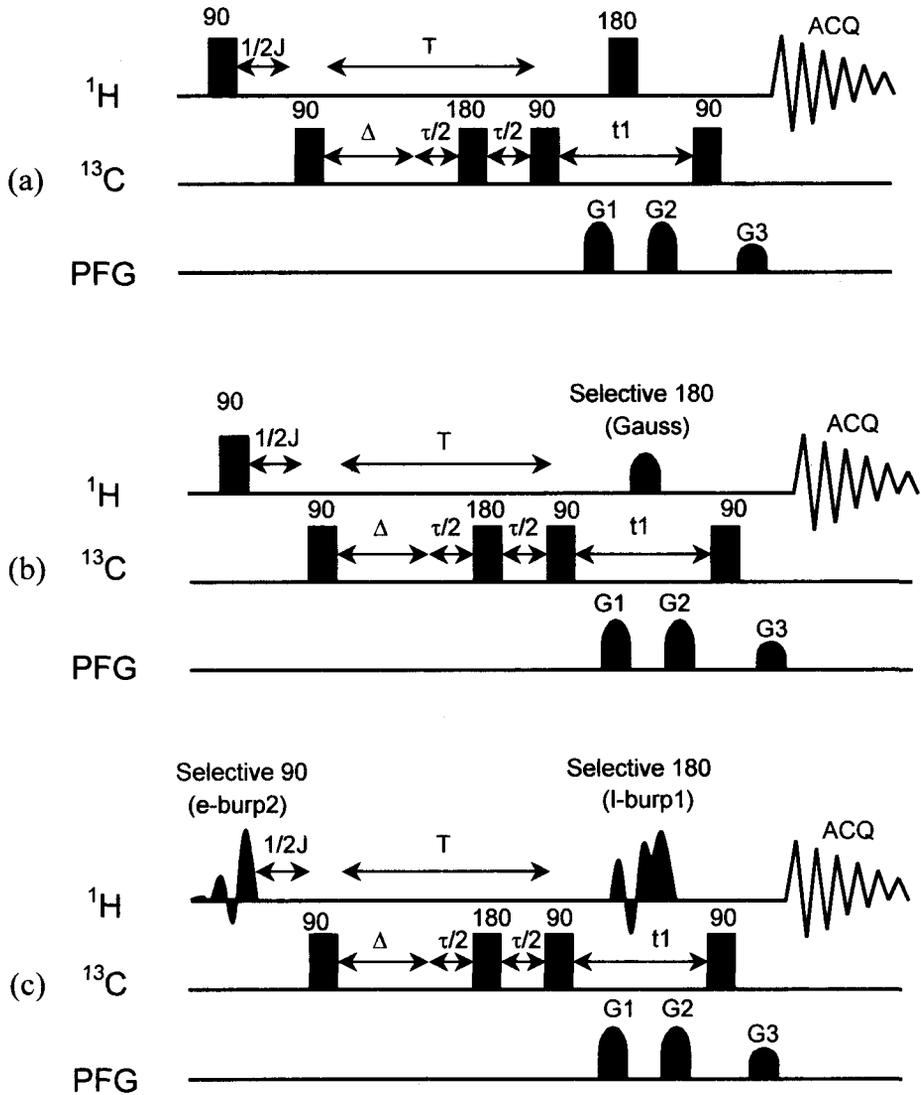


Figure 2 Pulse sequences for J-HMBC 2D (a), selective J-HMBC 2D (b) and double selective J-HMBC 2D (c)

Table 1^{a, b} The ¹H-¹³C long-range coupling constants (Hz) for 5H, 6H, 7H and 8H of Harman (1) obtained by J-HMBC 2D, selective J-HMBC 2D and double selective J-HMBC 2D

position		C-4b	C-5	C-6	C-7	C-8	C-8a
		$\delta_c=121.1$	$\delta_c=121.7$	$\delta_c=119.1$	$\delta_c=127.7$	$\delta_c=111.9$	$\delta_c=140.4$
5H $\delta_H=8.19$	J-HMBC	1.3 (0.988)		1.7 (0.928)	7.2 (0.939)		7.6 (0.989)
	proton-coupled ¹³ C			1.5	7.8		
6H $\delta_H=7.22$	J-HMBC	8.5 (0.858)			2.3 (0.910)	8.1 (0.778)	
	J-HMBC-sel	8.5 (0.960)			2.3 (0.994)	7.9 (0.989)	
	proton-coupled ¹³ C	8.1			2.2	7.8	
7H $\delta_H=7.53$	J-HMBC		8.3 (0.431)	0.6 (0.974)			9.8 (0.978)
	J-HMBC-sel		5.8 (0.591)	1.5 (0.561)			9.7 (0.993)
	J-HMBC-d-sel		8.2 (0.978)	0.2 (0.976)			9.7 (0.964)
	proton-coupled ¹³ C		8.2				
8H $\delta_H=7.59$	J-HMBC	5.4 (0.956)		6.8 (0.884)			
	J-HMBC-sel	5.7 (0.829)		7.6 (0.829)			
	J-HMBC-d-sel	1.2 (0.992)		7.3 (0.994)			
	proton-coupled ¹³ C			7.3			

a) Coupling constants are absolute value

b) The value in parenthesis is correlation coefficient

参考文献

- 1) W. Willker and D. Leibfritz, *Magn. Reson. Chem.*, **33**, 632 (1995).
- 2) 佐藤陽子、徳永達裕、関宏子、内海博明、中越雅道、第37回 NMR 討論会要旨、p186 (1998).

A Method for the NMR Measurement of Micro-Volume without Dedicated Probe

Dept. Chemistry & Biological Sciences, Japan Women's University

S. Takahashi

A novel NMR micro-tube was designed to increase the effective sensitivity, based on a given amount of sample. The sample was pushed concentric to a 5mm outer tube inserting a glass rod at the bottom. The required minimum volume was ca. 20 μ L and its sensitivity was 25% increased from the micro-tube with symmetric geometry, *i.e.* the so-called Shigemi tube (BMS-005). The reduced spectral resolution of its micro-cell was attributed to the microscopic inhomogeneity of the magnetic susceptibility in the glass material used.

NMR 測定における感度の向上は永遠の課題である。与えられた装置で実効感度を上げるには NMR ミクロ試料管を使うしかない。実効感度とは、ここでは溶媒の量とは無関係に溶質の一定量あたりの感度を意味する。ミクロ試料管の利点は、装置とは独立に、溶媒量を減らし濃度を上げることで感度の向上がはかれることである。ミクロ試料管にはいろいろあるが、我々は以前、対称形ミクロ試料管を提唱して本討論会で報告した⁽¹⁾。これは試料溶液の上下に、試料と磁化率の近い物質を対称的に配置する方式で、その物質にガラスが使えるようになり実用化した。近年ガラスの品質が安定してきたので次世代のミクロ試料管への取り組みが可能になった。

現在、実効感度を上げるためにプローブメーカーを中心に、試料管の直径を小さくする方向で競争している。しかし直径ごとに専用プローブを用意することは困難であり、試料管が細くなると試料の充填や回収などの取り扱いが難しくなる傾向がある。本研究は、通常の 5mm プローブで、使用する溶媒の量をさらに微量化し、いままで以上の感度向上が可能かどうかを探った。

[実験] 使用した試料管は(株)シゲミの製品または特注品を使った。装置は Bruker AMX-400WB に 5mm 用の HX-probe を装着した。検出コイル長は 10mm である。

[結果] 1. 市販の対称形ミクロ試料管に 0.1M Glucose 溶液を入れ、サンプル長を 1mm ずつ変えて測定したところ、ピークの高さはサンプル長が 15mm まで、感度はほぼ長さに比例した。サンプル長は短いほど分解能が低下する傾向がみられた。したがって試料の濃度を上げて、検出コイルの長さ以下の液量にしてもスペクトルの

Key Words: NMR, ミクロ試料管, 感度

たかはし せいぞう

にほとんど得ることはないことが分った。ただし、ここでは測定ごとに Matching を取り直し 90 度パルスをも最適化した。Receiver gain は一定に保った。したがって軽水溶液のような Receiver Gain に上限があり、装置の残留ノイズが S/N 比に影響する場合は、液量を少なくし濃度を上げた方が感度は上がる。

2. Z 軸上のサイズの変化で顕著な感度向上が見込めない。XY 方向について検討した。従来マイクロ試料管と言えば直径を小さくして試料の容積を少なくしたが、対称形マイクロ試料管は反対の方向を目指したところに特徴があった。試料管の内径を増やして試料を検出コイルに近づける方法については、薄肉形の試料管で、必要とする液量以上の感度上昇があることを実証済みである。したがってこのアイデアを今回はマイクロ試料管に別の形で適用した。

まず同じ対称形のマイクロ試料管で直径が 5mm のものと 2.5mm のものの感度を比較した。試料は同じ溶液を同じピペットで同一量とり、一方は重水で 200 μ L または 250 μ L に希釈して測定した。Tune-Match や測定条件は双方で最適化した。結果は期待通り 2.5mm の試料管の方が約 5%低下した。これは試料が少なくなったにもかかわらず 90 度パルスが 2%長くなったことで象徴されるように、試料が検出コイルから遠くなり、プローブの Q が低下したためであろう。以前報告したように、試料管を細くしてもガラスの磁化率がより鋭敏に効いてくるので、スペクトル分解能的に得るところはない。

次に薄肉タイプの市販の対称形マイクロ試料管に、試料溶液 30 μ L を入れ、内管を底まで押し込んで、試料溶液を同心円状に押しやった。測定結果は期待に反して分解能が顕著に低下しピーク強度が半分に低下した。そこで内管のガラス部分を 30mm にしたものを使い同様に測定したところピーク強度は 80%まで回復した。これはスペクトル分解能が向上したためで面積強度は変わらない。そしてこのときのデッドボリュームが約 10 μ L 程度と評価された。液量が少なくなればなるほどデッドボリュームの存在は深刻な問題になる。デッドボリュームを少なくする工夫をして試料 20 μ L で測定した結果では、面積強度で約 25%の感度上昇が見られた。分解能の低下は無視できないが 2次元 NMR を測定する分にはいまの程度でも使えると評価した。

[考察] 対称形マイクロ試料管によって、試料管からのアプローチによって実効感度を大きく稼ぐことは終わったのではなかろうか。プローブメーカーが提唱する、細い試料管を使う方法は電気的な要因で感度が向上したと考えられる。同じプローブを使う場合、試料管の改良で感度が上がるとしても、あと高々 25-30%程度であろう。しかし、たとえ感度の上昇がわずかであっても長時間積算する試料に対しては、このようなマイクロ試料管でも使用する価値があろう。測定時間を 30%以上短縮できるからである。

分解能の低下は内管に使うガラスの材質の問題である。ガラスが試料と近接している場合には微視的な磁化率の分布も分解能に大いに影響する。ガラスの巨視的な磁化率を溶媒と一致できても、いまの製造法では微視的な不均一性についてはコントロールできない。ガラスの不均一性の改善は今後の課題である。

(1) 高橋征三、永山国昭：第 26 回 NMR 討論会（大阪）（1987）

P4

脂質二重膜に結合したマガイニン 2 の立体構造

○武田明美、若松馨、+館知也、+松崎勝巳

(群馬大・工・生物化学工、+京大・薬・薬品物性)

Membrane-bound conformation of magainin2

A. Takeda, K. Wakamatsu, T. Tachi*, K. Matsuzaki*

Gunma University, *Kyoto University

Magainin2 is a basic peptide and kills bacterial cells by forming pores in cell membranes containing anionic phospholipids. We analyzed the structure of magainin2 in phospholipid bilayers to understand the mechanism whereby the peptide molecules form pores in the bilayers. Upon the addition DLPC-d64 vesicles, the proton resonances of the peptide broadened without any detectable changes in their chemical shifts, and a number of strong negative inter-residue NOE peaks were observed for all residues except for the N-terminal glycine residue. Though many of the NOEs suggest an α -helical conformation of the peptide, long-range ($|i - j| > 4$) NOEs observed are not compatible with a monomeric structure of the peptide. Molecular dynamics-simulated annealing calculations where two peptide molecules are included gave an antiparallel α -helical dimer structure.

Magainin 2 は *Xenopus laevis* より単離された塩基性の抗菌性ペプチドである。このペプチドは細菌膜に豊富に存在する酸性脂質と静電相互作用で結合し、両親媒性ヘリックスを形成するとともに膜に穴を開ける。Magainin 2 は micelle 中で monomer の α -helix をとることが示されているが、脂質二重膜と結合したときには dimer 等の oligomer の形成を示唆するデータがある。脂質二重膜と micelle ではペプチドの構造や会合状態が大きく変わる可能性があるので、脂質二重膜と結合したペプチドの立体構造をプロトン 2 次元 TRNOE で解析した。本研究では Magainin 2 と同じ活性を持つアナログ [F16W], [F5Y, F16W] を用いた。TRNOE 測定は、ペプチドと脂質との結合が適度に弱い必要があるが、Magainin 2 と酸性脂質との結合は強すぎるので、双イオン性脂質である dilauroylphosphatidylcholine の重水素化物 (DLPC-d64) を用いた。なお、Magainin 2 は双イオン性脂質とも相互作用することが知られている。DLPC-d64 の二重膜を加えると Magainin 2 のシグナルはブロードになり、二重膜と結合し分子運動が遅くなったことを反映して数多くの NOE が観測できた。これらの NOE からペプチド分子全体が α -helix をとることが分かり、また monomer で存在すると仮定すると説明できない遠く離れたプロトン間の NOE が数多く観測された。これらを帰属し構造計算を行ったところ、Magainin 2 は DLPC の二重膜に結合した時に α -helix の逆平行 dimer を形成していることが分かった。

キーワード：TRNOE、膜作動性抗菌ペプチド

著者ふりがな：たけだあけみ、わかまつかおり、たちともや、まつぎかつみ

NMR 距離解析法を応用したシクロスポリン分解物の 光学活性部位の構造解析

(資生堂・医研) ○ 島田治男、川西聡政、本山晃、吉岡桂子、八戸昌秋、
難波隆二郎

Analysis of chiral part of cyclosporin A decomposition compounds using the distance geometry method

(Pharmaceutical Research Center, Shiseido Co.) ○ H. Shimada, T. Kawanishi, A. Motoyama, K. Yoshioka, M. Hachinoe, R. Namba

The primary structures of CSAPER1 and CSAPER2, the decomposition products of cyclosporin A (CsA) were analyzed by MS and NMR, whereby the stereo-structures including chirality were determined by means of the distance geometry method using DADAS90. These compounds were found to be the peroxides of CsA generated due to a newly formed asymmetric carbon within the amino acid residue MeBMT. However, it was difficult to distinguish between the *R* and *S* forms, since no significant difference between the environment surrounding the chiral centers of the two forms, appeared to exist. To overcome this, we developed a calculation process that would differentiate the two forms even under such circumstances. This enabled the unambiguous assignment of CSAPER1 and CSAPER2 as the *R* form and *S* form respectively.

【緒言】

CSAPER1、CSAPER2 はシクロスポリン A (CsA) 分解物として合成された 11 残基の環状ペプチドである。これらの化合物の一次構造を調べるため MS および NMR により解析を行ったところ、両者ともその残基のひとつである MeBMT((4*R*)-4[(*E*)-2-butenyl]-4, *N*-dimethyl-*L*-threonine)が過酸化され、新たに光学活性部位が生じた化合物であることがわかった。これらは互いに鏡像異性体の関係であるが、*R*/*S*を区別することは困難であった。また、解析を行うにあたり、試料が貴重であったため非破壊で容易に回収できる測定法が望まれた。そこで DADAS90 (distance analysis in dihedral angle space) による NMR 距離解析法¹⁾を応用した。この方法を用いて天然物などの光学活性部位の立体構造を決定した例が幾つかあるが²⁾、以下の理由により明確な結果が得られない場合がある。

1. 不斉炭素に結合したプロトンとその周辺のプロトンとの距離が *R*/*S* でさほど違いがない場合、各々で安定構造を作成してしまい、どちらが正しいか判断し難い。
2. 分子全体の安定化を行ってしまうと部分構造内での微妙な差は重要でなくなってしまう、*R*/*S*の判断が不明確になる。

これらの問題点に対して、計算に部分構造を用いる事と、光学活性部位の角度情報を除いて計算し実験値と比較する事で *R*/*S*決定に関して良好な結果を得たため報告する。

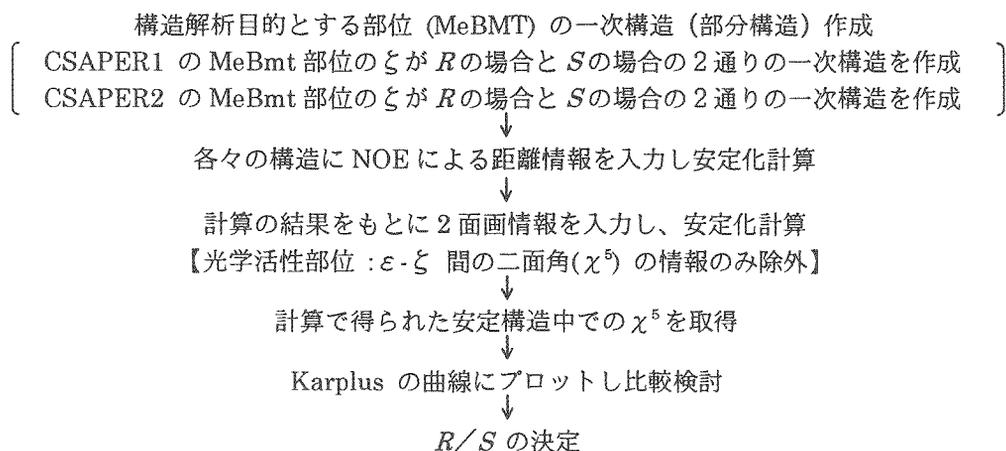
キーワード : シクロスポリン、分解物、距離測定法、鏡像異性体、DADAS90

○ しまだはるお、かわにしときまさ、もとやまあきら、よしおかけいこ、はちのえまさあき、なんばりゅうじろう

【方法】

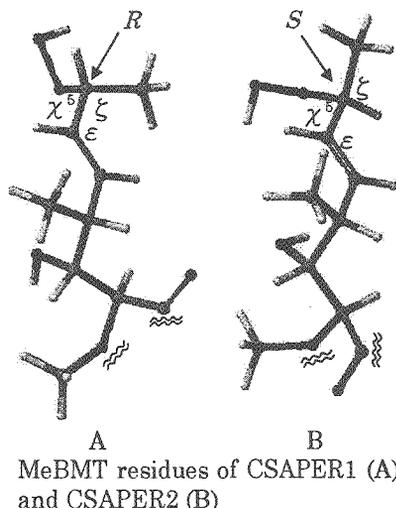
NMR 測定は日本電子製 EX-400 を使用し、計算には日本電子製 EZMOL を使用した。

CSAPER1 約 15 mg および CSAPER2 約 50 mg をそれぞれ重クロホルム 0.6 mL に溶かし試料溶液とした。これらの試料について、FG-DQF-COSY、HC-COSY、TOCSY、FG-HMBC の測定を行い一次構造の解析と $^1\text{H-NMR}$ の帰属を行った。また、TSD-NOE、ROESY により距離情報を取得し、J 分解-2D-NMR 法による $^3J_{\text{HH}}$ の測定結果から 2 面画情報の取得を行った。これらの情報をもとに DADAS90 によるモデリングを行った。モデリングの方法を以下に示す。



【結果と考察】

χ^5 部分は構造的には自由回転が可能であるが、NOE による全体の解析結果から、OOH が環の内側に倒れ込んでいる事がわかり、この部分が束縛されている事がわかった。DADAS90 によるモデリングの結果、CSAPER1 では χ^5 は *R* 体の場合 38° 、*S* 体の場合 94° であった。これらの推定結合定数は、それぞれ 5 Hz、0 Hz であり、実験値が 4.5 Hz であったことから、*R* 体と決定した。また、CSAPER2 では χ^5 は *R* 体の場合 106° 、*S* 体の場合 166° であった。これらの推定結合定数は、それぞれ 0.5 Hz、8.5 Hz であり、実験値が 9 Hz であったことから、*S* 体と決定した。NMR 距離解析法で光学活性部位の解析を行う場合、分子量の増大に伴って *R/S* の判断が不明確になるが、部分構造



を計算に用いる事で明確な結果を得る事ができた。また、構造計算の過程で光学活性部位の角度情報を除いて計算し、最後に実験値と比較する事で明確な結果を得る事ができた。

参考文献

- 1) 廣田穰, 藤田憲一, 船引龍平 : 化学と生物, 33, 319 (1995)
- 2) 金允政, 降旗一夫, 渡邊秀典, 早川洋一, 瀬戸治男 : 農化誌, 67, 467 (1993)

Dodecylphosphocholine ミセル中の PACAP27

(奈良先端大¹、武田薬品開拓一研²、同医化研³) ○井ノ岡博^{1,3}、大瀧徹也²、北原治²、池上貴久¹、遠藤聡史³、北田千恵子²、大儀和宏²、音田治夫²、藤野政彦^{2,3}、白川昌宏¹

PACAP27 in the dodecylphosphocholine (DPC) micelles

Hiroshi Inooka^{1,3}, Tetsuya Ohtaki², Osamu Kitahara², Takahisa Ikegami¹, Satoshi Endo³,
Chieko Kitada², Kazuhiro Ogi², Haruo Onda², Masahiko Fujino^{2,3}, Masahiro Shirakawa¹

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology¹

Discovery Research Laboratories I², Discovery Research Division and

Medicinal Chemistry Laboratories³, Pharmaceutical Research Division, Takeda Chemical Industries Ltd.

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a peptide ligand that belongs to glucagon / secretine family, induces secretion of pituitary hormones and mediates a wide variety of physiological function, such as inductions of catecholamine in adrenal gland and insulin in pancreas. We describe here the conformation of PACAP27 in DPC micelles determined by NMR spectroscopy. In addition, We observed transferred nuclear Overhauser effect (TRNOE) signals of a PACAP analogue bound to the PACAP receptor. Several TRNOE peaks were observed in the spectra, which are not expected for the conformation of the micelle-bound PACAP27, indicating that the conformation of the receptor-bound PACAP analogue is different from that of the micelle-bound form. We also analyzed off-rates between the peptide and the receptor using ^1H T_2 values of the peptide to judge whether quantitative evaluations of the inter-proton distances are possible or not.

PACAP は、視床下部ホルモンの分泌を誘起する下垂体ホルモンであり、副腎におけるカテコールアミン分泌や膵臓におけるインシュリン放出の誘起を行う幅広い機能を有している。その受容体はG蛋白質共役型受容体のひとつで、グルカゴン・セクレチンファミリーに属する。

我々は、受容体結合状態の PACAP の活性構造を知ることを目的に研究を進めている。その一歩として、ミセル結合型の PACAP27 の立体構造を報告する。さらに、受容体結合状態に関しても TRNOE の検出に成功した。この TRNOE ピークはミセル結合型と異なる残基間にも観察された。ミセル結合型の構造とは異なり、受容体との特異的な相互作用により形成される立体構造を反映していると考えられる。さらに TRNOE から定量的なプロトン間距離の見積もりが可能であるか調べるために、繰り返し時間を変えながら T_2 を調べ、解離速度の見積もりをした。その結果充分速い解離速度が得られ、定量的な解析が可能なことが判明した。さらに比較的大きなペプチドのため、非結合状態でも NOE が観察される。これを考慮に入れた緩和行列を用いた取り扱いに関しても議論したい。

Key words PACAP, DPC micelles, off rate

いのおかひろし、おおたきてつや、きたはらおさむ、いけがみたかひさ、えんどうさとし、きたただちえこ、おおぎかずひろ、おんだはるお、ふじのまさひこ、しらかわまさひろ

阪大蛋白研 ○大友崇紀、京極好正、山崎俊夫

Segmental Isotope Labeling of Protein

Institute for Protein Research, Osaka University

○Takanori Otomo, Yoshimasa Kyogoku and Toshio Yamazaki

Peptide segments in a protein, which can include an active site of interest or be a series of parts constituting the entire structure, are now selectively observed by NMR spectroscopy using samples prepared by the intein-mediated ligation method. Two separate inteins were used to ligate NMR-transparent segments to both the ends of an NMR-visible segment, producing a partly visible intact protein molecule. The ^{15}N - ^1H correlation spectrum of a 370-residue maltose binding protein labeled with ^{15}N at a continuous segment comprising residues Gly¹⁰¹ to Ser²³⁸ showed the essential elimination of signal overlapping, the signals being at the same positions as for the uniformly labeled sample.

我々はインテインと呼ばれる自己切断活性を有する蛋白質をもちいることにより、蛋白質の配列にそって半分のみを安定同位体標識する方法を開発した。

(Ref.1, 2) 今回はこれを発展させ、蛋白質を3つの区分に分けることにより、蛋白質のある区分を標識できる方法を開発することに成功した。これには好熱菌由来の2つのインテイン (PI-pfuI, PI-pfuII) を用いた。Figure 1のようにそれぞれのインテインを2箇所に分け、3つの前駆体断片を大腸菌に作らせる。発現させるとほとんどが封入体となるのでこれは塩酸グアニジンで溶解し、3つの断片を混ぜる。これを透析でリフォールディングさせることにより、インテインが構造をもち切断、結合活性を有することができる。反応は70度でおこなう。

この方法は高分子量の蛋白質の解析において威力を発揮することが期待できる。このため我々はMaltose Binding Protein (MBP, 370残基)を用いて実験を行った。MBPの Gly¹⁰¹ から Ser²³⁸ までを ^{15}N で標識したのがFigure 2であり、きれいにこの部位のみが安定同位体標識されている。

- Reference: 1. Yamazaki, T., Otomo, T., Oda, N., Kyogoku, Y., Uegaki, K., Ito, N., Ishino, Y. & Nakamura, H. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5591-5592.
2. Otomo, T., Teruya, K., Uegaki, K., Yamazaki, T. & Kyogoku, Y. (1999) *J. Biomol. NMR* 14, 105-114.

キーワード：区分安定同位体標識、インテイン、高分子量

おおとも たかのり、きょうごく よしまさ、やまざき としお

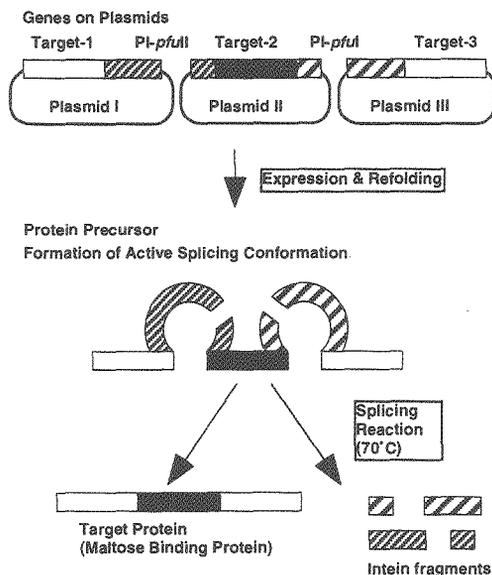


Figure 1.

A schematic representation of the segmental isotope labeling in the case of MBP. The precursor peptide fragments were expressed in *E. coli* BL21(λ DE3) transformed with the plasmids. Refolding was performed for formation of the splicing active conformations of inteins as described in the text. For the splicing reaction, heating of the solution to 70°C was required. For central-segment labeling (Target-2, black box), the central fragment was produced in stable isotope-labeled M9 medium and the other fragments in the unlabeled medium.

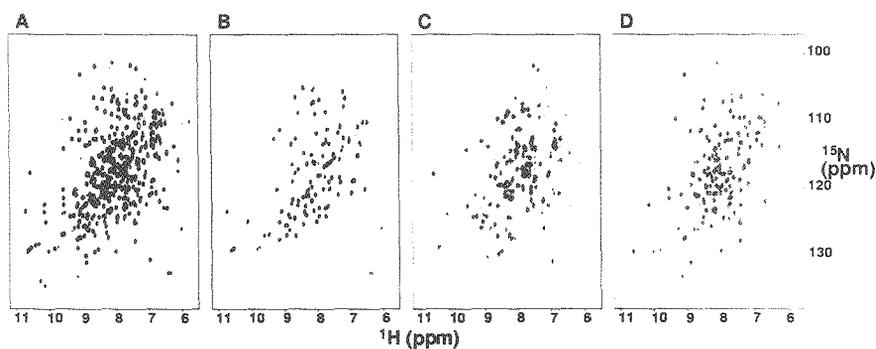


Figure 2.

2D ^{15}N - ^1H HSQC spectra of (A) the uniformly ^{15}N -labeled wild type MBP/maltose complex, and those of MBP segmentally labeled with ^{15}N , (B) for the N-terminal segment, Lys1-Tyr99, (C) for the central segment, Gly101-Ser238, and (D) for the C-terminal segment, Lys239-Lys370.

○長土居 有隆¹、花岡 慎悟¹、酒匂 千晶¹、長井 由木子¹、
前川 利男²、石井 俊輔²、西村 善文¹
¹横浜市大・院・総合理、²理研・LS

Structural Analysis of the Transactivation Domain of ATF-2

○Aritaka Nagadoi, Singo Hanaoka, Tiaki Sakou, Yukiko Nagai, Toshio Maekawa, Shunsuke Ishii and Yoshifumi Nishimura

1. Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University

2. Laboratory of Molecular Genetics, Tsukuba Life Science Center, RIKEN

Activating transcription factor-2 (ATF-2) is a transcription factor that binds to cAMP response element (CRE). ATF-2 contains two functional domains, an N-terminal transactivation domain and a C-terminal DNA-binding domain. Here, the three-dimensional structure of the transactivation domain of ATF-2 has been determined by NMR. The transactivation domain consists of two subdomains: the structure of an N-terminal half (N-subdomain) is well determined, while a C-terminal half (C-subdomain) takes a highly flexible and disordered structure. The architecture of the N-subdomain is very similar to that of the well-known zinc finger motif found in DNA-binding domains, consisting of an antiparallel β -sheet and α -helix.

ATF-2 (Activating Transcription Factor-2 : 別称、CRE-BP1)は細胞内の cAMP の増加に
応答する遺伝子が共通に持っている CRE (cAMP response element: 5'-TGACGTCA-3') 配
列に結合し、転写を調節する蛋白質として同定された。ATF-2 は細胞の増殖に関与し、その
主な発現場所はサル脳、ラットの再生肝やヒトのガン組織である。又、ATF-2 遺伝子を欠損
したマウスを用いた研究では、ATF-2 は骨格形成や中枢神経系の発達に不可欠であることが
報告されている。ATF-2 は 505 アミノ酸残基からなり、2つの機能ドメインを持つ。その機
能ドメインは転写活性化ドメイン (19~106 残基) と DNA 結合ドメイン (350~415 残基)
である。

Keywords: ATF-2, three-dimensional structure, NMR, transactivation domain,
zinc finger

ながどい ありたか、はなおか しんご、さこう ちあき、ながい ゆきこ、
まえかわ としお、いしい しゅんすけ、にしむら よしふみ

DNA 結合ドメインはアミノ酸配列から塩基性ロイシンジッパー構造をとっていることが推定される。ATF-2 は、ロイシンジッパーを介してホモダイマーを形成し、あるいは核内原がん遺伝子産物である c-Jun 蛋白質とヘテロダイマーを形成する。さらに、転写活性化ドメインは2つのサブドメインに分けることができる。N 末端約半分 (N 末サブドメイン:19~56 残基) はアミノ酸の一次配列から Cys2-His2 型の Zn-フィンガーモチーフの存在が示唆されてきた。又、C 末端側 (C 末サブドメイン:57~106 残基) は紫外線照射等のストレスで活性化するキナーゼ JNK (c-Jun N-terminal kinase) 等によりリン酸化される部位 (69 と 71 番目のスレオニン残基) を含んでいる。

ATF-2 の転写調節機構のモデルとして、現在までに以下のように考えている。

JNK を活性化するような細胞ストレスがないときは、ATF-2 は転写不活性型として存在し、転写活性化ドメインと DNA 結合ドメインとの分子内相互作用によりお互いの機能がマスクされている。転写活性化ドメインが JNK の結合とともにリン酸化されると、分子内相互作用が解除され、フリーとなった DNA 結合ドメインは CRE 配列に結合する。その結果、CRE 配列を含む遺伝子の転写が活性化される。

我々は、ATF-2 の転写調節機構の詳細を調べるために、まず ATF-2 の転写活性化ドメイン (19 ~106 残基) の立体構造を多次元 NMR 法により決定した。ATF-2 の転写活性化ドメインは2つのサブドメインでそれぞれ特徴的な構造を形成していた。そのうち、N 末サブドメインの立体構造は過去に DNA 結合モチーフの1つとして報告されてきた Cys2-His2 型の Zn-フィンガーモチーフと非常に類似していた。又、リン酸化部位を含む C 末サブドメインの構造は二次構造 (α ヘリックスや β シート構造) の形成は認められず、変性したフレキシブルな構造となっていた。DNA 結合能のない N 末サブドメインの Zn-フィンガーと過去に報告された DNA 結合蛋白質の Zn-フィンガーを構造比較した結果、DNA と相互作用するアミノ酸残基は N 末サブドメイン中では他のアミノ酸残基 (疎水性等) に置換されていた。さらに、N 末サブドメインの Zn-フィンガーには、溶媒に露出したいくつかの疎水性残基 (Leu26, Leu42, Ala43, Val44, Met51) のパッチが存在していた。このことから、N 末サブドメインの Zn-フィンガーの機能は蛋白質-蛋白質相互作用に関わる Zn-フィンガーであることが示唆された。これに対して C 末サブドメインは特定の二次構造を持たないため構造を安定化にする要素 (疎水性相互作用、静電相互作用、水素結合) が少なく、全体的に揺らいでいることが分かった。C 末サブドメインのアミノ酸配列の検討から、Leu84 から Ser90 の領域で他の転写因子と相互作用可能な両親媒性ヘリックスの形成が示唆された。このように N 末サブドメインに存在する疎水性パッチと C 末サブドメインに予測される両親媒性ヘリックスの存在が、JNK との分子間相互作用あるいは DNA 結合ドメインとの分子内相互作用に関わる重要な領域であると考えられた。

(理研・遺伝生化学¹, 東大院・理², 理研・細胞情報伝達³)○相原秀樹^{1,2}, 伊藤 隆¹, 横山茂之^{2,3}, 柴田武彦¹**Structure determination of the *E. coli* DinI protein**○Hideki Aihara^{1,2}, Yutaka Ito¹, Shigeyuki Yokoyama^{2,3}, Takehiko Shibata¹¹Laboratory of Cellular and Molecular Biology, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), ²Department of Biophysics and Biotechnology, Graduate School of Science, The University of Tokyo, ³Cellular Signaling Laboratory, RIKEN

Abstract

The DinI protein (81a.a.) from *Escherichia coli* is one of the SOS induced proteins, which however negatively regulates the SOS response by inhibiting the activity of RecA. We are studying the solution structure of DinI and its interaction with RecA, to understand the mechanism of action of DinI in atomic detail. Preliminary NMR measurements and biochemical analyses during sample preparation suggested that DinI is a symmetric homodimer. So far, we completed the resonance assignment using ¹³C,¹⁵N-labeled protein, and found that DinI monomer consists of three β -strands and two α -helices. Calculation of the three dimensional structure is on going.

大腸菌 DinI タンパク質(81a.a.)は、SOS 応答によって誘導されるタンパク質のひとつで、RecA のはたらきを阻害することによって SOS 応答を負に制御している。われわれは DinI の立体構造および RecA との相互作用の解析をおこなうことにより、DinI の作用機構を明らかにしたいと考えている。サンプル調整の過程で、ゲルろ過、光散乱、緩和時間測定の結果から、DinI はホモダイマーであることがわかった。これまでに各種多次元 NMR 測定を用いて、主鎖及び側鎖の ¹H, ¹³C, ¹⁵N 核の化学シフトの帰属を完了した。化学シフトインデックス、NOE のパターンから、DinI は 3 本の β -strand と 2 本の α -helix からなる構造をとっていることが示唆された。現在、立体構造解析を進めている。

DinI タンパク質, DNA 組換え, 溶液 NMR, 立体構造解析

あいほらひでき, いたうゆたか, よこやましげゆき, しばたたけひこ

分子間相互作用の解析

(東大院・農¹、理研・遺伝生化学²、理研・細胞情報伝達³、東大院・理⁴)

○板倉健人¹、伊藤 隆²、大野光宏¹、木川隆則³、武藤 裕⁴、柴田武彦²、
横山茂之^{3 4}、正木春彦¹

**Solution structure of the colicin inhibitor protein
and analysis of molecular interaction.**

○Takehito Itakura¹, Yutaka Ito², Mitsuhiro Ohno¹, Takanori Kigawa³, Yutaka Muto⁴,
Takehiko Shibata², Shigeyuki Yokoyama^{3 4}, Haruhiko Masaki¹

¹Department of Biotechnology, The University of Tokyo, ²Laboratory of Cellular and Molecular Biology, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), ³Cellular Signaling Laboratory, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), ⁴Department of Biophysics and Biotechnology, Graduate School of Science, The University of Tokyo

ABSTRACT

Colicin E3/E6 RNases hydrolyze 16S-rRNA of colicin-sensitive *E. coli* and inactivate ribosomes, resulting in cell death. Specific inhibitor proteins (ImmE3 and ImmE6) bind colicin E3 and E6, respectively, in the colicin producing cells, thus preventing the cells from suicide. Whilst the sequences of colicin E3 and E6 are very similar, the interactions of colicin E3/ImmE3 and colicin E6/ImmE6 are highly specific (no "cross talk"). We had reported that a mutant (W47C) of ImmE6 showed altered specificity and exhibited inhibition for both colicin E3 and E6. In order to clarify the role of this residue in the ImmE6/colicin E6 interaction, we determined the high-resolution solution structures of ImmE6 and ImmE6 (W47C). Since these two structures were almost identical, the direct interaction of W47 side chain with colicin E6 must be important. The structure determination of the colicin E6/ImmE6 complex will reveal the detailed mechanism of the specificity determination in this system.

RNase、インヒビター、タンパク質間相互作用、リボソーム、分子認識

いたくらたけひと、いとうゆたか、おおのみつひろ、きがわたかのり、むとうゆたか、しばたたけひこ、よこやましげゆき、まさきはるひこ

はじめに

一般的なコリシンは大腸菌を殺すタンパク質性毒素である。この毒素は腸内細菌由来の Col プラスミドを持つ生産菌が MMC 処理などによる SOS 応答によって生産する。このうちコリシン E3、E4、E6 は 70S リボソーム中の 16SrRNA を特異的に切断する RNase 活性をもつ。Col プラスミドはコリシン遺伝子の下流に免疫インヒビター (Imm) をコードしており、コリシントタンパク質の生産と同時に Imm タンパク質も発現し、宿主大腸菌の自殺を防いでいる。

われわれは、コリシン E6 と E3 の相異アミノ酸すべてが集中する C 末端 RNase ドメイン (CRD) と Imm の発現系を構築した。E3 と E6 は殺菌活性タンパク (CRD)、活性阻害タンパク (Imm) とともに非常に高い相同性を持つにもかかわらず、CRD-Imm 間の阻害特異性は非常に厳密で、たとえば ImmE3 は E6 の活性を阻害しない。このことは E3 と E6 で相異の、あるいはいくつかのアミノ酸が厳密な特異性を与えていることを意味する。そして分子生物学的、生化学的実験から、すでに Imm タンパク質の 47 番目、5 番目のアミノ酸が特異性決定に重要であることがわかっていた。この分子識別に重要な役割を果たしている残基を特異性決定基と称する。実際、ImmE6 の 47 番目のアミノ酸 Trp が ImmE3 型の Cys に変異した変異体がとれており (ImmEV5)、これはコリシン E6 とコリシン E3 の両方に対して阻害活性を持つ。今回、高解像度の ImmE6 と ImmEV5 の溶液中の立体構造を決定し、これらの特異性決定基が、立体構造的にどのように寄与してその阻害特異性を与えているかを検討した。

方法

ImmE6、ImmEV5 とともに主鎖のシグナルの帰属には、 ^{13}C - ^{15}N -二重標識したサンプルを用いた HNCACB、CBCA(CO)NNH によって行った。側鎖のプロトンの帰属は、 ^{13}C - ^{15}N -二重標識したサンプルを用いた H(CCCO)NNH と、 ^{15}N -標識したサンプルを用いた 3D TOCSY-HSQC により行った。側鎖の炭素の帰属は ^{13}C - ^{15}N -二重標識したサンプルを用いた CC(CO)NNH により行った。 ^{15}N -標識したサンプルを用いた 3D ^{15}N -NOESY-HSQC と、 ^{13}C - ^{15}N -二重標識したサンプルを用いた 3D ^{13}C -NOESY-HSQC による距離情報をもとに X-PLOR で構造計算を行った。

結論

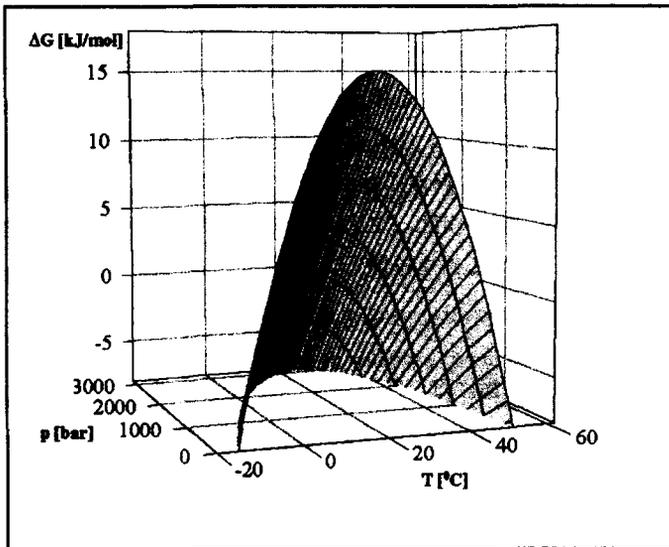
ImmE6 と ImmEV5 はともに 4 本の逆 β シートと、短い平行な 2 本の α ヘリックスをもっており、全く同じ構造モチーフをしていた。特異性決定基は 47 番目も 5 番目もともに β -シート上親水性残基が並ぶ面に位置していた。このことから阻害特異性は Imm の遊離の状態での構造が大きく変化していることに起因するのでは無いと思われる。コリシン E6 と ImmE6 の特異性決定基同士は、結合する相手の分子を見分けているというよりも複合体を形成したあとの構造安定化に関わっているのではないかと考えている。現在、E6-CRD と ImmE6 の複合体の立体構造を決定すべく研究を行っており、これにより、Imm の複合体中の構造と遊離の状態の構造を比較することによって、タンパク質分子間の認識機構に関する新しい知見が得られるだろう。

P11 The three-dimensional energy landscape of *Staphylococcal* Nuclease

Michael W. Lassalle¹, Hiroaki Yamada², Kazuyuki Akasaka^{1,2}

¹The Graduate School of Science and Technology and ²Faculty of Science, Kobe University

To provide a novel insight into the mechanistic and structural details of the unfolding and refolding transitions the multidimensional energy landscape of the protein must be explored to obtain thermodynamic quantities, such as ΔG° , ΔH° and ΔS° . Thermodynamic measurements for *Staphylococcal* Nuclease using high sensitivity differential calorimetry allow to determine the bell shaped *two-dimensional* $\Delta G_D^\circ(T)$ curve (Carra *et al.*, 1994, Carra



& Privalov, 1996). Pressure is another important variable for protein stability. Nevertheless compared to temperature and chemical perturbations, only few studies about protein and pressure effects are available in the literature. *Three-dimensional* energy landscapes are described for proteins such as chymotrypsinogen and metmyoglobin (Hawley, 1971,

Zipp & Kauzmann, 1973). In our present research we introduce the on-line high-pressure glass tube method originally reported by Yamada (Yamada *et al.*, 1994) to determine a *three-dimensional* energy-landscape by NMR. Utilizing the Histidine Peaks at different pressures and temperatures, enable us not only to achieve the thermodynamic quantities mentioned above but also to determine values for thermal expansion factor, $\Delta\alpha$, and isothermal compressibility, $\Delta\beta$. Our measurements reveals that *Staphylococcal* Nuclease exhibit significant deviations from the two state behavior.

Carra, J.H., Anderson, E.A., & Privalov, P.L. (1994) *Protein Science* 3, 944-951.

Carra, J.H., & Privalov, P.L. (1996) *FASEB J.* 10, 67-74.

Hawley, S.A. (1971) *Biochemistry* 10, 2436-2442.

Yamada, H., Kubo, K., Kakiyama, I., & Sera, A. (1994). High-pressure high-resolution NMR measurements on liquid solutions. In *High Pressure Liquids and Solutions* (Taniguchi, Y., Senoo, M. & Hara, K., eds), pp. 49-66, Elsevier, Amsterdam.

Zipp, A., Kauzmann, W. (1973) *Biochemistry* 12, 4217-4228.

¹北大・理・生物科学, ²富山医薬・薬, ³東大・理・物理, ○小橋川 敬博¹, 小柴 琢己¹, 出村 誠¹, 藤谷 直樹¹, 熊木 康裕¹, 引地 邦男¹, 河野 敬一², 桑島 邦博³, 新田 勝利¹

NMR study of highly ordered molten globule

¹Division of Biological sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, ²Division of medicine, Graduate School of Medicine, Toyama pharmacy and medicine University, ³Division of Physics, Graduate School of Science, Tokyo University. ○Yoshihiro Kobashigawa¹, Takumi Koshihara¹, Makoto Demura¹, Naoki Hujitani¹, Yasuhiro Kumaki¹, Kunio Hikichi¹, Kunihiro Kuwajima³, Keiichi Kawano² and Katsutoshi Nitta¹

Elucidating protein folding, molten globule state (MG) has been studied as a model of folding intermediate. Lysozyme and α -lactalbumin is homologous each other. However their equilibrium unfolding mechanisms differ each other. Generally, folding mechanism of lysozyme obeys a two-state manner, on the other hand α -lactalbumin (LA) indicates three-state. Exceptionally, equine milk lysozyme (EML) and canine milk lysozyme (CML) exhibit partially unfolded state during the equilibrium unfolding, which resemble to MG of LA except extreme stability. Study of MG of LA showed that interaction in β -domain is not crucial for stability of MG. On the other hand, our hydrogen exchange study of CML showed that protection of β -domain increased compared to LA or EML. We show here that β -domain also be a stability determinant of MG in lysozyme.

【緒言】リゾチーム(LZ)- α -ラクトアルブミン(LA)スーパーファミリーの変性機構は一般に LZ では 2 状態モデルで近似され、LA では状態変性し、中間体である Molten Globule 状態(MG) が変性過程において蓄積することが知られている。イヌリゾチーム(CML)とウマリゾチーム(EML)はヒト及びニワトリ LZ と異なり LA と同様の現象が観測される。CML の MG はその中でも比較的安定でかなり構造化していることが熱測定や CD 測定などから予想されているがその変性過程の詳細は明らかではない。本研究では蛋白質の構造形成に関する知見を得ることを目的とし、CML の MG および Native 状態 (N)を重水素交換によりアミノ酸レベルで Dynamics および構造特性を調べた。

molten globule、Ca²⁺-binding lysozyme、folding

こばしがわよしひろ、こしばたくみ、でむらまこと、ふじたになおき、くまきやすひろ、ひきちくにお、くわじまくにひろ、かわのけいいち、にったかつとし

【実験】 CMLは大腸菌体内に不溶性顆粒として発現させ、disulfide isomeraseの1種であるthioredoxinを用いてrefoldingを行った⁽¹⁾。帰属はpH 4.5, 30°C, 10%重水中において¹⁵Nラベルしたサンプルを用いて測定したHSQC, 3D TOCSY-HSQC及び3D NOESY-HSQCの一連のスペクトル群を用いて行った。MGにおける重水素交換はpH 2.0, 25°Cにおいて一定時間交換させた後に液体窒素で凍結させることにより停止し、D₂O中においてHSQCを測定した。NMRスペクトルの測定はJEOL α -400, 500及び600を用いた。NMRデータの処理にはNMRpipeを用い、帰属およびピーク体積の算出にはXEASYを用いた。

【結果と考察】CMLのNative状態には環電流効果により0 ppmより高磁場側にシフトしたプロトンのシグナルが存在し、芳香環を含む疎水性コアが存在している。完全にMGであるpH 2.0においても高磁場シフトしたシグナルはブロード化されてはいるものの観測された。これはMGにおいても、環電流効果を及ぼすほどの疎水性コアがまだ残っていることを示しており、MGの安定性にかかわっていると考えられる。これらのシグナルをNative構造における帰属結果を元に残基の同定を行ったところ、V98及びM105に対応することがわかった。LA及びLZのNative状態の構造はA, B, C, Dの4本の α -ヘリックスよりなる α -ドメインと、1本の 3^{10} -ヘリックス及び3本の β -シートよりなる β ドメインにより構成されているが、V98及びM105はいずれも α -ドメイン内のC-ヘリックス上もしくはその周辺残基に由来している。ウシ及びモルモットLAのMGにおいて、 α -ヘリックスの重水素交換からのProtection Factor(PF)はB>A>C>Dの順になっている。また、LAよりも安定なMGを形成することが知られているEMLにおいてはB>A>D>Cの順になっていて、D-ヘリックスの保護がLAよりもかなり強いことが知られている。一方CMLはEMLのMGよりも安定であり、 T_m が20°C以上高いことが知られているが⁽²⁾、 α -ヘリックスの保護の傾向はEMLと同様であった。しかしながらPFは全体的に高くなっていて、揺らぎが小さいことがわかった。立体構造とchemical shift予測プログラムtotal⁽³⁾を用いてV98周辺に存在し、化学シフトに大きく影響を与えと思われる芳香環の同定を行ったところ、W108及びW64が特定された。W108についてはM109と同様に α -ドメイン内のC-ヘリックス近傍に存在していてMGにおいてもコアを形成しているが、W64に関しては β -ドメイン内の α -ドメインとの界面領域にありC-ヘリックス近傍に存在している。LAのMGの研究においては β -ドメインは安定性に寄与しないことが知られていたがCMLのMGでは β -ドメインも安定化に寄与していることがわかった⁽⁴⁾。

(1) Koshiba et al., 1999. *Protein Engn.* 12:429-435.

(2) Koshiba et al., 1999. to be published.

(3) Williamson et al., 1995. *J. Mol. Biol.* 247:541-546.

(4) Kobashiagwa et al., 1999. preparing.

P13

アカザラガイ トロポニン C の NMR による構造解析

(¹東大院・農生科・応生化、²東大・生物生産工セ、³北大・水産、⁴海洋バイオ研、⁵海洋生物利用セ、⁶パリアンジャパン)

○湯本史明¹、永田宏次²、岩崎わかな¹、尾島孝男³、西田清義³、足立恭子⁴、紺野彩⁵、根本暢明⁶、田之倉優¹

NMR study of Akazara scallop troponin C

¹Departments of Applied Biological Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, ²Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, Tokyo, ³Department of Marine Bioresources Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido, ⁴Marine Biotechnology Institute, Shimizu, Shizuoka, ⁵Research Center for the Industrial Utilization of Marine Organisms, Shimizu, Shizuoka, ⁶Varian Japan Technologies Ltd., Tokyo
Fumiaki Yumoto¹, Koji Nagata², Wakana Iwasaki¹, Takao Ojima³, Kiyoyoshi Nishita³, Kyoko Adachi⁴, Aya Konno⁵, Nobuaki Nemoto⁶, Masaru Tanokura¹

Troponin C (TnC) is the calcium binding component of the troponin complex. It is responsible for triggering the contraction of striated muscle. Vertebrate fast skeletal muscle troponin C bind four Ca²⁺ ions, while Akazara scallop TnC (152 amino acids) binds only one Ca²⁺ ion at the site IV. In order to reveal the conformation of Akazara scallop TnC, particularly, the unfunctional EF-hand motifs (I to III), we are doing solution NMR studies of the TnC.

Firstly, we examined the solution conditions for NMR measurements of Akazara scallop TnC using dynamic light scattering. Secondly, we prepared the ¹⁵N/¹³C-labeled protein, and measured the triple-resonance NMR spectra. These data, however, did not have sufficient signal intensities for the backbone assignments. Thirdly, we prepared ¹⁵N/¹³C/²H (40%)-labeled and ¹⁵N/¹³C/²H (90%)-labeled TnCs, and measured the triple-resonance NMR spectra. Using the data, we are now assigning the backbone atoms.

[序論]

アカザラガイの閉殻筋で見出されるトロポニン C (TnC)は Ca²⁺を 1つしか結合しない(脊椎動物骨格筋速筋や遅筋、または心筋に由来する TnCは、Ca²⁺を 4つあるいは 3つ結合する)にもかかわらず、筋収縮のスイッチとしての役割を十分に果たしている。また、その Ca²⁺結合部位は、N 末端から 4 番目の EF ハンドモチーフである。脊椎動物 TnC では N 末端側の 2つあるいは 1つの EF ハンドモチーフへの Ca²⁺結合により機能制御が行われているが、アカザラガイ TnC の場合、C 末端側の EF ハンドモチーフで機能制御が行われていることになる。したがって、アカザラガイ TnC は脊椎動物 TnC とは異なるコンフォメーションをとって機能している可能性があり、この違いや Ca²⁺を結合しない EF ハンドモチーフの役割を明らかにするため、NMR により溶液構造の解析を進めている。

Ca²⁺結合タンパク質、トロポニン C、自己会合、多核多次元 NMR、重水素化

ゆもとふみあき、ながたこうじ、いわさきわかな、おじまたかお、にしたきよよし、あだちきょうこ、
こんのあや、ねもとのぶあき、たのくらまさる

[実験]

大腸菌を用いた発現系により非標識及び安定同位体標識アカザラガイ TnC を発現させ、菌体破碎後、TCA 処理、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行い、実験用試料を得た。NMR スペクトルの測定は Varian Unity INOVA 500 及び INOVA 750 分光計により行い、円偏光二色性スペクトルの測定は JASCO J 700 分光計により行った。

[結果と考察]

最初に、大腸菌を用いた発現系により TnC を調製し、円偏光二色性測定、電気泳動(native PAGE)を行ったところ、TnC が α -ヘリックスに富み、 Ca^{2+} 結合により 2 次構造変化よりもむしろ 3 次構造変化を引き起こすことが示唆された。

また、これまでに脊椎動物骨格筋や心筋に由来する TnC は、 Ca^{2+} を結合することで会合を起こしやすくなることが報告されているが、アカザラガイ TnC においては、 Ca^{2+} 非結合状態においても自己会合を起こしやすい性質であることが、 ^1H NMR 測定の結果から示唆され、動的光散乱測定により確認された。そこで、動的光散乱測定によって溶液中の分子のみかけ分子量を測定し、 Ca^{2+} 非結合型 TnC の NMR 測定における溶液条件の至適化を行った。

次に、 ^{15}N 標識した TnC を調製し、 ^{15}N - ^1H HSQC スペクトルを用いた Ca^{2+} 滴定実験を行ったところ、 $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{TnC}]$ 値の増大にともない、一部のシグナルに化学シフト変化が観察され、また同時にシグナル強度の減少が観られた。このことから、アカザラガイ TnC は Ca^{2+} 結合にともなって、局所的に構造変化を引き起こし、さらに自己会合を起こしやすくなることがわかった。脊椎動物由来 TnC 同様に、アカザラガイ TnC においても、 Ca^{2+} 結合により疎水性残基の分子表面への露出が起こり、その結果として、TnC のみしか存在しないサンプル溶液中では、疎水相互作用により自己会合が起きたと考えられる。

溶液条件を至適化した Ca^{2+} 非結合型 TnC の溶液構造解析を行うために $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 標識した TnC を調製し、3 核 3 次元 NMR 測定(HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, HNCO)を行ったところ、シグナル帰属を行うのに十分な S/N をもつスペクトルが得られなかった。また、 Ca^{2+} 非結合型 TnC は、ゲルろ過クロマトグラフィーにおけるピークの半値幅が、 Ca^{2+} 結合型 TnC に比較して約 50%大きくなっていることから、複数のコンフォメーションをとる可能性が示唆されている。上記の測定は自己会合を抑えた溶液条件において行ったことから、シグナル強度の低さは、 Ca^{2+} 非結合型のアカザラガイ TnC が様々なコンフォメーションをとり、それらの間で交換していることに起因すると考えられる。そこで、 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}^2\text{H}(40\%)$ 及び $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}^2\text{H}(90\%)$ 標識した TnC を調製し、3 核 3 次元 NMR 測定(HN(CO)CA, HNCA, HNCACB, HN(CA)CB, (HCA)CO(CA)NH, HNCO)を行い、タンパク質主鎖のシグナル帰属を進めている。

P14 Lysozyme Aggregation and Solution Properties Studied Using PGSE NMR Diffusion Measurements

((株) 機能水研究所)

William S. Price、○土屋 文彦、荒田 洋治

Water Research Institute, Sengen 2-1-6 Tsukuba, Ibaraki 305-0047 Japan

William S. Price, Fumihiko Tsuchiya and Yoji Arata

The solution behavior of lysozyme was studied as a function of protein concentration, NaCl concentration, pH and temperature using pulsed-gradient spin-echo NMR diffusion measurements. The lysozyme solutions clearly exhibited non-ideal behavior which was sensitive to both the salt concentration and pH. Lysozyme has an isoelectric point of pH 11 and it is often overlooked that at normal pH it has a net positive charge. Since lysozyme is a charged species, the changes in the diffusion coefficients were interpreted considering the competing effects of salt-mediated changes in protein interactions (e.g., electrostatic repulsion) and aggregation. The behaviour is in agreement with Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)-type modelling accounting for the attractive and repulsive forces present. The diffusion data was compared with various self-association models. The diffusion coefficients of the higher oligomers were calculated assuming that the monomers aggregated as hard spheres. Using an isodesmic association model, the equilibrium constant for the self-association of lysozyme at pH 4.6 and 298 K in the presence of 0.5 M NaCl was estimated to be $118 \pm 12 \text{ M}^{-1}$.

Pulsed-gradient spin-echo (PGSE) NMR provides a powerful means for investigating the solution behaviour and aggregation of proteins (Price, 1997; Price, 1998; Price et al., 1999a; Price et al., 1999b). However, careful analysis of the experimental data is needed if correct interpretations are to be made (see Fig. 1).

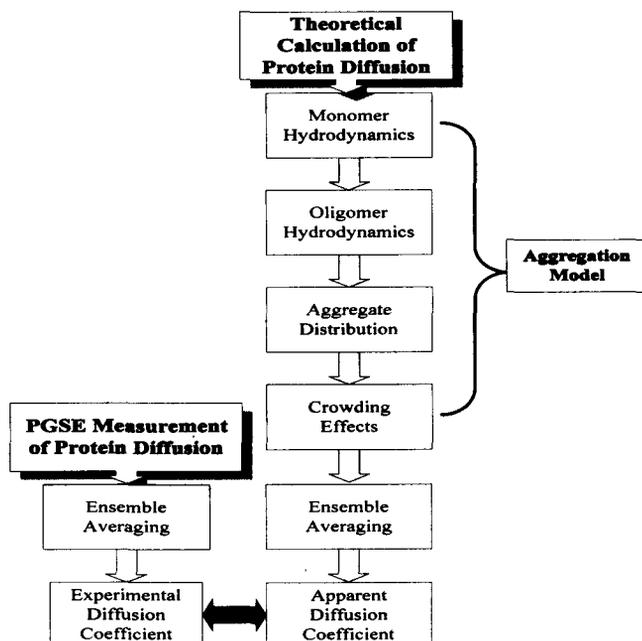


Fig. 1. A schematic diagram of how protein aggregation is studied using PGSE NMR diffusion measurements.

Keywords: Pulse-Gradient Spin-Echo, Diffusion, Lysozyme, Aggregation.

著者ふりがな : ウィリアム シドニー プライス、つちや ふみひこ、あらた ようじ

Since aggregating protein systems are crowded the protein oligomers undergo numerous collisions on the timescale of the PGSE measurement (i.e., the mean-free space is much less than the distance diffused in the course of the PGSE measurement). These collisions result in a narrower distribution of diffusion coefficients than would be expected for an isolated ensemble of molecules of the same mass distribution. In fact only a single apparent diffusion coefficient is observed experimentally in protein diffusion measurements. If the different oligomeric species do not provide separate resonances (as in the case of lysozyme) then the PGSE measurements yield the weight-average diffusion coefficient of all of the different oligomeric species present,

$$\langle D \rangle_w = \frac{\sum_i M w_i n_i D_i}{\sum_i M w_i n_i} \quad [1]$$

where $M w_i$ is the molar mass, D_i is the diffusion coefficient and n_i is the number of the i -th oligomeric species. As a first approximation, the monomer-monomer contact in producing oligomers can be regarded as hard-sphere contact. Whilst there is only one possible geometry for dimer formation, many possibilities exist for higher oligomers. Consequently, we have simplistically taken all oligomers to be hydrodynamically spherical, thus the diffusion coefficient, relative to that of the monomer at infinite dilution, D_1^0 , is proportional to the cube root of the molecular weight. Thus, we have

$$D_i = D_1^0 i^{-\frac{1}{3}} \quad [2]$$

Crowding also results in a protein-concentration dependent decrease of the measured diffusion coefficient. This is a very complex effect and only simplistic models are available., We consider two models, the first a simple model based on scaled particle theory derived by Han and Herzfeld (Han and Herzfeld, 1993),

$$f_c(v_p) = \frac{D}{D_0} = \exp \left(-\frac{\Delta r}{R} \left(3 \frac{v_p}{1-v_p} + \frac{9}{2} \frac{v_p^2}{(1-v_p)^2} + \frac{9}{4} \frac{v_p^3}{(1-v_p)^3} \right) \right) \quad [3]$$

In Eq. [3] v_p is the volume fraction (ml/g) of the protein and Δr is the step size and R is the radius of the diffusing particle. From the Smoluchowski equation $\Delta r/R = 2/3$ (Han and Herzfeld, 1993). The second model is that of Tokuyama and Oppenheim (Tokuyama and Oppenheim, 1994),

$$f_c(v_p) = \frac{\left(1 - \frac{9v_p}{32} \right)}{1 + H(v_p) + \frac{(v_p/v_{p0})}{(1-v_p/v_{p0})^2}} \quad [4]$$

where
$$H(\nu_p) = \frac{2b(\nu_p)^2}{(1-b(\nu_p))} - \frac{c(\nu_p)}{(1+2c(\nu_p))} - \frac{b(\nu_p)c(\nu_p)(2+c(\nu_p))}{(1+c(\nu_p))(1-b(\nu_p)+c(\nu_p))},$$

$$b(\nu_p) = \sqrt{9\nu_p/8}, \quad c(\nu_p) = 11\nu_p/16, \quad \text{and} \quad \nu_{p0} = \left(\frac{4}{3}\right)^3 / (7\ln 3 - 8\ln 2 + 2).$$

In calculating ν_p we have taken the partial specific volume of lysozyme as 0.75 ml/g. As neither of these models account for the presence of an aggregation process, both models progressively overestimate the reduction in diffusion as the concentration (and degree of aggregation) increases.

Thus, the PGSE experiment yields an estimate of the weight average diffusion coefficient that has been decreased by the effects of crowding,

$$\langle D \rangle_w^C = \langle D \rangle_w f_c(C) = \frac{\sum_i c_i i D_i^0 i^{\frac{1}{3}}}{C} f_c(C) = \sum_i \alpha_i D_i^0 i^{\frac{1}{3}} f_c(C) \quad [5]$$

where C is the total protein concentration and c_i and α_i are the concentration and mole fraction of the i -th molecular species, respectively. The measured $\langle D \rangle_w^C$ at a given protein concentration is analyzed using Eq. [5] and a model for the self-association process that provides estimates for the values of c_i (and α_i).

In the present study the solution behavior of lysozyme was studied as a function of protein concentration, NaCl concentration, pH and temperature using PGSE NMR diffusion measurements. The lysozyme solutions clearly exhibited non-ideal behavior which was sensitive to both the salt concentration and pH. Since lysozyme is a charged species (isoelectric point = pH 11), the changes in the diffusion coefficients were interpreted considering the competing effects of salt-mediated changes in protein interactions (e.g., electrostatic repulsion) and aggregation. At low protein and salt concentrations the measured diffusion coefficient first increases with pH. Upon addition of 0.15 M salt the lysozyme diffusion coefficient increases at low pH relative to that of the salt free sample due to the charge shielding effects of the salt and then decreases at higher pH as the conditions become more favourable for self-association. The behaviour is in agreement with Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)-type modelling accounting for the attractive and repulsive forces present. The diffusion data was compared with various self-association models. Using the isodesmic association model, the equilibrium constant for the self association of lysozyme at pH 4.6 and 298 K in the presence of 0.5 M NaCl was estimated to be $118 \pm 12 \text{ M}^{-1}$ (see Fig. 2).

References

1. Han, J. and J. Herzfeld. 1993. Macromolecular Diffusion in Crowded Solutions. *Biophys. J.* 65:1155-1161.
2. Li, M., A. Nadarajah, and M. L. Pusey. 1995. Modeling the Growth Rates of Tetragonal Lysozyme Crystals. *J. Cryst. Growth* 156:121-132.
3. Nadarajah, A., M. Li, and M. L. Pusey. 1997. Growth Mechanism of the (110) Face of Tetragonal Lysozyme Crystals. *Acta Cryst.* D53:524-534.

4. Price, W. S. 1997. Pulsed Field Gradient NMR as a Tool for Studying Translational Diffusion, Part 1. Basic Theory. *Concepts Magn. Reson.* 9:299-336.
5. Price, W. S. 1998. Pulsed Field Gradient NMR as a Tool for Studying Translational Diffusion, Part 2. Experimental Aspects. *Concepts Magn. Reson.* 10:197-237.
6. Price, W. S., F. Tsuchiya, and Y. Arata. 1999b. Protein Aggregation Studies Using PFG NMR Diffusion Measurements. In *Advances in Magnetic Resonance in Food Science*. P. S. Belton, B. P. Hills, and G. A. Webb, editors. Royal Society of Chemistry, London. 35-42.
7. Price, W. S., F. Tsuchiya, C. Suzuki, and Y. Arata. 1999a. Characterization of the Solution Properties of *Pichia farinosa* Killer Toxin Using PGSE NMR Diffusion Measurements. *J. Biomol. NMR* 13:113-117.
8. Tokuyama, M. and I. Oppenheim. 1994. Dynamics of Hard-Sphere Suspensions. *Phys. Rev. E* 50:R16-R19.

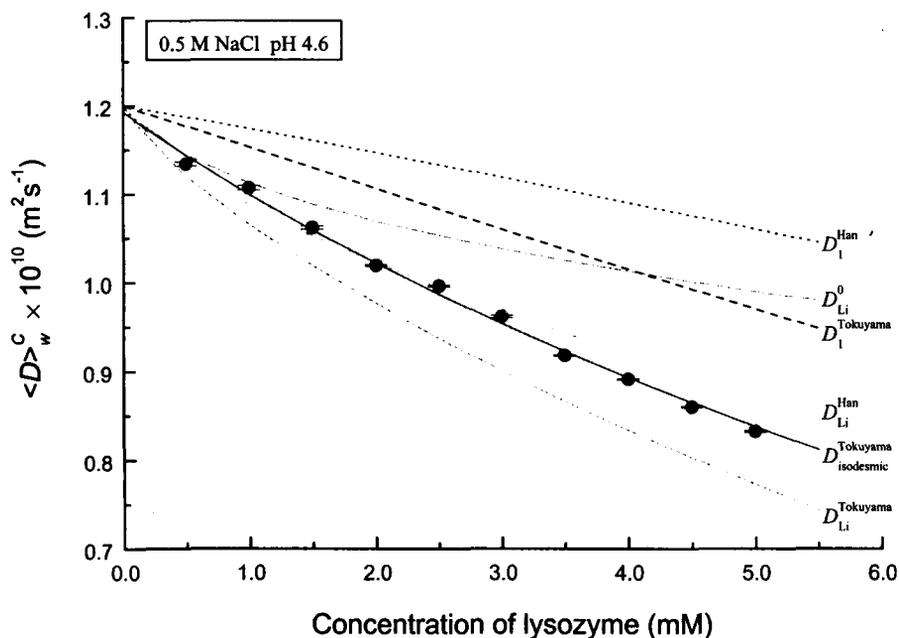


Fig. 2. Change in lysozyme diffusion coefficients at 298 K and pH 4.6 in the presence of 0.5 M NaCl. The dotted and dashed lines represent the monomer diffusion coefficient at infinite dilution corrected using the Han and Herzfeld and Tokuyama and Oppenheim corrections, respectively. The lysozyme must undergo a self association process as the experimental diffusion coefficient is considerably smaller than the crowding effect corrected (with either model) monomer diffusion coefficient. The best fit to the data was obtained using the isodesmic model in conjunction with the Tokuyama and Oppenheim correction (solid line). Also shown are simulations based on the association constants reported by Li et al. (Li et al., 1995; Nadarajah et al., 1997) (---) with Han and Herzfeld correction (-.-) and Tokuyama and Oppenheim correction (- - -).

(横浜市大大学院総合理¹、電通大電子物性²)○鈴木 咲良¹、剣持 直之¹、長土居 有隆¹、三瓶 巖一²、溝淵 潔²、西村 善文¹

Structural Transition of Purine Repressor DNA Binding Domain

¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University²Department of Applied Physics & Chemistry, The University of Electro-Communications○Sakura Suzuki¹, Naoyuki Kenmochi¹, Aritaka Nagadoi¹, Gen-ichi Sanpei², Kiyoshi Mizobuchi²and Yoshifumi Nishimura¹

The purine repressor (PurR) regulates expression of genes that are concerned with purine biosynthesis. PurR consists of 341 amino acids and has two domains both DNA-binding domain (DBD) at the N-terminus and corepressor-binding domain (CBD) at the C-terminus. PurR binds to the DNA specifically from structural transition with existence of a corepressor. To understand the DNA-binding ability of PurR, we purified the mutant protein (V50C) of the DNA-binding domain (56a.a.). The formation of dimerization by disulfide bond of mutant results in binding to the specific DNA with formation of new fourth α -helix. The three-dimensional structure of DNA complex of PurR-V50C has been analyzed in progress by multidimensional NMR spectroscopy.

プリンリプレッサー (PurR) は大腸菌プリン合成に関与する遺伝子発現を制御する蛋白質である。PurRは341アミノ酸残基からなり、N末側の約60残基がDNA結合ドメイン(DBD)そして残るC末側の約280残基がコリプレッサー結合/二量化ドメイン(CBD)である2つのドメインを有している。PurRの特異的なDNA結合能は、PurRのコリプレッサーとして知られるヒポキサチンあるいはグアニンのCBDへの結合と特異的なDNAの存在下で上昇する。DNA複合体中でのPurRの構造は、4本の α -ヘリックスからなるDBDのN末側第1、第2ヘリックスで形成されるヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフであり、第4ヘリックスがDNAのメジャーグループとマイナーグループをそれぞれ認識していた。それに対してDBDのみの構造では第4ヘリックス領域が完全にランダムな構造のままで、特異的なDNAの存在下においてもヘリックス形成は認められなかった。

私達はPurR-DBD単独でDNA複合体を形成させるために、DBD(56a.a.)の点突然変異体(V50C:50番目のValをCysに置換した)を作製した。変異体PurR-V50Cは、ジスルフィド結合による二量体形成と、DNA存在下で第4ヘリックスが誘起されることでDNAとの複合体を形成した。現在、DNA複合体中のPurR-V50Cの構造解析を多次元NMR法で行っている。

キーワード：プリンリプレッサー、DNA結合ドメイン、多次元NMR法、ダイマー

すずき さくら、けんもち なおゆき、ながどい ありたか、さんぺい げんいち、みぞぶち きよし、にしむら よしふみ

P16

HoxD9 ホメオドメインと HMG1BoxA の複合体

○大木進野¹、前田美恵¹、Monica Beltrame³、
Marco E. Bianchi³、甲斐荘正恒^{1, 2}
(CREST¹、都立大・理²、Univ. of Milano³)

NMR study of HoxD9 homeodomain-HMG1boxA complex

S.Ohki¹, M.Maeda¹, M. Beltrame³, M.E. Bianchi³, and M.Kainosho^{1,2}

(CREST¹, Tokyo Metropolitan Univ.², Univ. of Milano³)

NMR study on a complex between HoxD9HD and HMG1boxA is in progress. We optimized the NMR sample condition by monitoring a series of ¹H-¹⁵N HSQC spectra at different pH, temperature, sample and salt concentration, and/or addition of some detergents. A set of 3D-NMR experiments enabled us to assign signals of HoxD9HD in the absence and presence of HMG1boxA. Estimated secondary structure of HoxD9HD is composed of three helices and this is not affected by binding of HMG1boxA. Analysis of chemicalshift perturbation suggests that the first helix of HoxD9 is a binding site to HMG1boxA.

(序) Hox と呼ばれる一群の DNA 結合蛋白質は、転写機構に関与することが良く知られている。これらの蛋白質は互いに相互作用することにより、それぞれの機能を抑制あるいは増幅する。また、Hox 蛋白質は他の蛋白質との結合を介してもその機能を調節している。例えば、HoxD9 の DNA 結合能は HoxD8 の結合により低下するが、HMG1(HMG; high mobility group protein)の結合は DNA 結合能を増幅させる。ここで、HMG1 はクロマチン内に存在する DNA 結合蛋白質である。この HoxD9 と HMG1 の複合体については、それぞれの DNA 結合モチーフであるホメオドメインと HMG ボックスの結合によって形成されることが明らかになっているが、詳細は不明である。本研究の目的は、NMR

ホメオドメイン、HMG ボックス、複合体、DNA 結合

おおきしんや、まえだみえ、Beltrame Monica、Bianchi E. Marco、
かいのしょうまさつね

を用いてこの複合体形成部分の構造に関する知見を得ることである。

(実験) HoxD9 のホメオドメイン (HoxD9HD) と HMG1 の N 末端側の DNA 結合部位である boxA(HMG1boxA)の発現系をそれぞれ構築した。非標識、¹⁵N 標識、¹³C および ¹⁵N 標識された HoxD9HD と HMG1boxA をそれぞれ大量培養し、疎水性クロマトグラフィーと陽イオンクロマトグラフィーを用いて単離精製した。HoxD9HD, HMG1boxA, およびこれらの複合体について、良好な NMR スペクトルが得られる条件を検討した。主鎖の帰属のために、HoxD9HD と HMG1boxA の複合体について一連の安定同位体利用多次元 NMR スペクトルを測定した。この異分子 2 量体と安定な複合体を形成する DNA 配列を検索するために、いくつかの配列の異なる DNA 断片を用いて滴定実験を試みた。

(結果と考察) 試料濃度、塩濃度、pH、温度、デタージェントなどの条件を変えて ¹H-¹⁵N HSQC を測定した。その結果、良好な ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを得る条件を見出した。特に、HoxD9HD-HMG1boxA 複合体は、グリセロールの添加により安定性が増大した。

一連の安定同位体利用多次元 NMR スペクトルを解析した結果、HoxD9HD 単体、複合体中の HoxD9HD の NMR シグナルの帰属をほぼ完了した。NOE の解析結果より、HoxD9HD は 3 本のヘリックスから成る 2 次構造を持つことがわかった。これは他の蛋白質に見い出されているホメオドメインのそれとよく一致していた。さらに、この 2 次構造は HMG1boxA との複合体中でもよく保持されていることが明らかになった。

また、複合体形成に伴う化学シフト変化をプロットした結果、HoxD9HD の第 1 ヘリックスの N,C 両末端部分に他の領域よりも大きな変化が認められた。このことから、複合体の形成には HoxD9HD の第 1 ヘリックスが関与していることが示唆された。

蛋白-蛋白複合体と DNA の相互作用の実験は現在進行中である。

P17

ナトリウムチャンネルの不活性化ゲートとⅢ-Ⅳリンカー中の IFMモチーフを模倣したオリゴペプチドとの相互作用 (京大薬) 黒田義弘、○前田能崇、宮本和英、中川照眞

Interactions of the Sodium Channel Inactivation Gate Peptides with Peptide Mimetics of the Isoleucine, Phenylalanine, and Methionine (IFM) Motif from the Inactivation Gate
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
Yoshihiro Kuroda, ○Yoshitaka Maeda, Kazuhide Miyamoto, and Terumichi Nakagawa

The pentapeptide KIFMK, which contains three clustered hydrophobic amino acid residues of isoleucine, phenylalanine, and methionine (IFM) in the sodium channel inactivation gate on the cytoplasmic linker between domains III and IV (III-IVlinker), is known to restore fast inactivation to the mutant sodium channels having a defective inactivation gate or to accelerate the inactivation of the wild-type sodium channels. Previously, we have investigated the interactions between the pentapeptide KIFMK and the fragment peptide which includes the IFM motif (MP-1A, 1484-1495, Ac-GGQDIFMTEEQK-NH₂) by ¹H-NMR and CD spectroscopies. It has been found that the synthetic pentapeptide KIFMK stabilizes an α -helical conformation around the IFM motif of the III-IVlinker. Presently, in order to ascertain whether the effect of KIFMK on the secondary structure of MP-1A is their sequence-specific interaction, we further studied the interaction of MP-1A and F1489Q substituted MP-2A with KIQMK, KAFKA, KIFMTK, and RIFMR. It was found that the relative orientation and the side-chain structures of the two positively charged amino acids and the phenylalanine residue in the inactivation gate peptide are important in order that the KIFMK stabilizes the helical structure of the inactivation gate peptide.

【緒言】

第37回NMR討論会において、我々は、ナトリウムチャンネルの不活性化ゲートペプチドMP-1A (rat brain II A, G1484-K1495, Ac-GGQDIFMTEEQK-NH₂)とペントペプチド KIFMK との相互作用について検討した[1]。その結果、KIFMK が MP-1A の形成する α -ヘリックス構造を安定化することが確認できた[2]。本研究では、MP-1A と KIFMK との相互作用が各々のアミノ酸配列に関して特異的であるかどうかを検討するために、不活性化ゲートペプチド MP-1A および MP-2A(F1489Q)と IFM モチーフおよびそれを模倣したアミノ酸配列を含む各種のオリゴペプチド(KIQMK, KAFKA, KIFMTK, RIFMR)との相互作用を ¹H-NMR および CD スペクトルを用いて研究した。

ナトリウムチャンネル、不活性化ゲート、IFM モチーフ、KIFMK、NMR

くろだよしひろ、まえだよしたか、みやもとかずひで、なかがわてるみち

【実験】

- ① TFE(CF₃CD₂OH)と水との混合溶媒に、不活性化ゲートペプチド(3mM)、オリゴペプチド(3mM)、およびその両方を溶解させ、pH7.0、300K で、bruker AVANCE 600 により 1D-NMR、COSY、TOCSY(90ms)、NOESY(350ms)の測定を行い、NMRpipe で処理した。
- ② TFE(CF₃CD₂OH)と水との混合溶媒に、不活性化ゲートペプチド(50μM)、オリゴペプチド(50μM)、およびその両方を溶解させ、pH7.0、室温で、日本分光 J-720 円二色性分散計により CD スペクトルを測定した。

【結果と考察】

80%TFE 中において、KIFMK の添加により MP-1A 配列中の側鎖末端メチルまたはメチレンのプロトンは概ね低磁場シフトを、αプロトンおよびアミドプロトンに関しては、高磁場シフトを示した(Fig.1)。この化学シフト変化を、我々は MP-1A の形成するαヘリックス構造の増加によるものと考えた。CD スペクトルからもこの二次構造変化を支持する結果が得られた[2]。同条件下において、以下に示す不活性化ゲートペプチドとオリゴペプチドとの相互作用を検討した。KIQMK および KAFKA の添加により MP-1A 配列中の各プロトンは KIFMK の場合よりは小さいが同じ方向のシフト変化を示した。一方、RIFMR の添加では、KIFMK の場合とは逆のシフト変化を示した。KIFMTK では、MP-1A の化学シフト変化は KIFMK に比べてはるかに小さいものであった。MP-2A と KIFMK では MP-1A と KIFMK の場合とは逆の化学シフト変化を示した。

【結論】

KIFMK による MP-1A の形成するαヘリックス構造の安定化には、オリゴペプチド両端の塩基性アミノ酸残基の側鎖の構造および正電荷の相対配置ならびに不活性化ゲートペプチドにおける IFM モチーフ中のフェニルアラニン残基が重要である。

【参考文献】

- [1] 黒田義弘、前田能崇、宮本和英、等 第 37 回 NMR 討論会要旨集 p.146-149 (1998)
- [2] Y.Kuroda, Y.Maeda, K.Miyamoto, *et al.*, *Biophys. J.*, 77(3), (1999), in press.

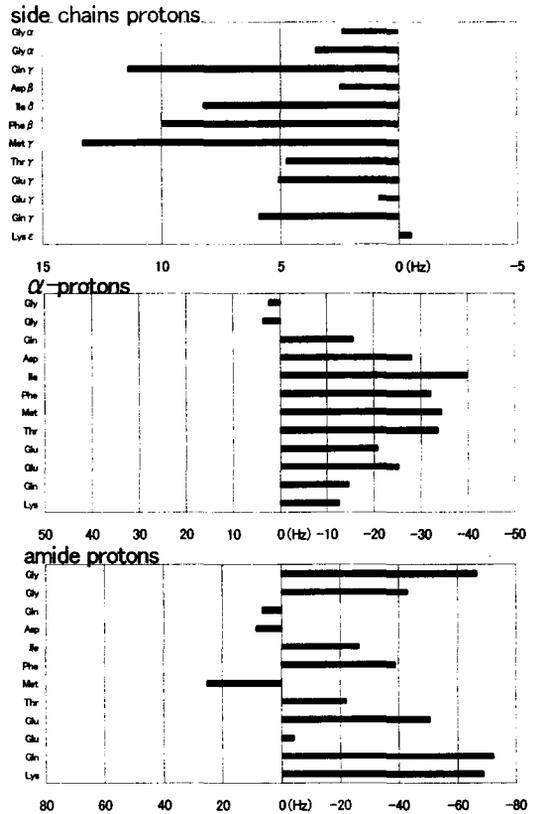


Fig.1 Changes in chemical shifts of MP-1A as a result of the interaction with KIFMK in 80%TFE

P18 Structures and activities of the peptides mimic the active site loop of Streptomyces Metalloproteinase Inhibitor (SMPI)

(Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University¹, CREST², Protein Research Institute, Osaka University³, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology⁴)
Feliciano, M.¹, Ohki, S.², Gonzalez, N.¹, Tate, S.¹, Tamura, K.³, Aimoto, S.³, Hiraga, K.⁴, Oda, K.⁴, Kainosho, M.^{1,2}

Peptides containing the active site loop of Streptomyces Metalloproteinase Inhibitor (SMPI) have been synthesized. Solution structure of these peptides were determined by two-dimensional proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) experiments namely double-quantum coherence correlated spectroscopy (DQF-COSY), total correlation spectroscopy (TOCSY) and nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY). Structural calculations were performed using XPLOR 3.8 program. Structures generated were compared with that of the corresponding part in the intact protein. Experiments are currently being performed to determine the inhibitory activities of these peptides against the target metalloproteinases in the gluzincins family.

I. Introduction:

Streptomyces metalloproteinase inhibitor (SMPI) is a proteinaceous metalloproteinase inhibitor isolated from *Streptomyces nigrescens* TK-23 (Oda et al., 1979). The solution structure of SMPI was found to have two β -sheets consisting of four anti-parallel β -strands which could be considered as two Greek key motifs (Ohno et al., 1998). The scissile bond, C64 and V65, is in the middle of an extended loop found between the first and second β -strands of the second Greek key motif. Since this loop contains the scissile bond, it is considered as the active site of SMPI. Peptides containing this active site loop have been synthesized (Fig.1). It is expected that these peptides will maintain a specific conformation in aqueous solution as stabilized by the disulfide bridge between C64 and C69, which is similar to the one observed in the intact protein.

II. Experimental Methods:

A. NMR Spectroscopy and Structure Calculation

AcKAI and AcKAI2 were either dissolved in 250 μ l 90% H₂O/10% ²H₂O or 100% ²H₂O at pH 3.5 to reach a final concentration of 5.9 mM and 4.1 mM respectively, and then transferred into Shigemi microcells. All homonuclear two-dimensional ¹H-NMR experiments were recorded at 10°C on a Bruker DMX800 spectrometer equipped with a triple resonance probe head and a pulse field gradient coil.

Two dimensional ¹H NMR spectra for H₂O sample, NOESY (200 ms and 300 ms mixing time) and TOCSY (45 ms mixing time) were recorded with the use of excitation sculpting method. For DQF-COSY, gradient pulses to select double-quantum coherence was applied for the efficient suppression of the water resonance. In all the experiments done on the D₂O sample, presaturation was used for the suppression of the residual water resonance.

metalloproteinase. active loop peptides. inhibitory activity. structure

Feliciano, M., おおきしんや, Gonzalez, N., たてしんいち, たむらけいこ,
あいもとさぶろう, ひらがかずみ, おだこうへい, かいのしょうまさつね

All NMR spectra were processed with the NMRPipe package and peak intensities were measured using the PIPP program. The structures were calculated using simulated annealing protocol with the XPLOR 3.8 program.

SMPI No.	59	63	68	72										
Peptide No.	1	5	10	14										
AcKAI	A	R	K	V	T	C	V	R	F	P	C	Y	Q	Y
							└──────────────────┘							
Peptide No.			1					5					8	
AcKAI2			T			C	V	R	F	P	C		Y	
							└──────────────────┘							

Fig. 1. Primary structure of synthesized peptides

II. Experimental Methods:

A. NMR Spectroscopy and Structure Calculation

AcKAI and AcKAI2 were either dissolved in 250 μ l 90% H₂O/10% ²H₂O or 100% ²H₂O at pH 3.5 to reach a final concentration of 5.9 mM and 4.1 mM respectively, and then transferred into Shigemi microcells. All homonuclear two-dimensional ¹H-NMR experiments were recorded at 10°C on a Bruker DMX800 spectrometer equipped with a triple resonance probe head and a pulse field gradient coil.

Two dimensional ¹H NMR spectra for H₂O sample, NOESY (200 ms and 300 ms mixing time) and TOCSY (45 ms mixing time) were recorded with the use of excitation sculpting method. For DQF-COSY, gradient pulses to select double-quantum coherence was applied for the efficient suppression of the water resonance. In all the experiments done on the D₂O sample, presaturation was used for the suppression of the residual water resonance.

All NMR spectra were processed with the NMRPipe package and peak intensities were measured using the PIPP program. The structures were calculated using simulated annealing protocol with the XPLOR 3.8 program.

B. Inhibitory Activity Assay of the Peptides:

Thermolysin, SGMP II, Pseudomonas elastase or vimelysin were incubated at 25°C in 50mM PIPES (pH 7.0), 10 mM CaCl₂, 0.005% Triton X-100. A fluorescent peptide, MOCac-Pro-Leu-Gly-Leu-A₂pr(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ (8 μ M) was added for monitoring the remained enzyme activity. $\Delta I/\text{min}$ was observed for 1 minute and initial velocities were calculated. From the initial velocities, free enzyme concentrations were calculated. Non-linear least square analysis of the data was done using a computer program. The association constants (K_a) were determined by plotting free enzyme concentration against inhibitor concentration and K_i was calculated as K_i = 1/K_a.

III. Results and Discussion:

For the structure determination of AcKAI, calculation of 50 random structures was based on 235 distance and 15 dihedral angle restraints. Thirty-two (32) refined structures gave a backbone r.m.s.d of 0.48 Å. As for AcKAI2, a backbone r.m.s.d of 0.31 Å was obtained for 27 final structures out of 50 randomly generated structures using 113 distance and 9 dihedral angle restraints. For both peptides, none of the structures gave distance and angle violations greater than 0.5 Å and 5.0 degrees respectively. One striking feature found between the structures of AcKAI and AcKAI2 is that the Phe-Pro peptide bond is in *cis*-conformation. It was clearly shown by the presence of strong NOE peak between Phe H α and Pro H α found in the NOE spectrum of each peptide. This is contrast with the corresponding part in SMPI. Based on the structure of SMPI (PDB accession code: 1bhu), Phe67-Pro68 is in the *trans*-conformation.

The conformation along Cys-Val in the structures obtained for both AcKAI and AcKAI2 is similar to that of the conformation along the scissile bond in the intact protein. Superposition of residues Cys-Val-Arg of AcKAI and AcKAI2 with that of corresponding three residues in SMPI gave a r.m.s. difference for backbone atoms of 0.73 Å and 0.57 Å respectively. This means that these parts show significant similarity between SMPI and the two peptides. Because of this finding, it is expected that these peptides will also show comparable inhibitory activities against metalloproteinases which SMPI specifically inhibits. Inhibitory assay experiments are now being undertaken on these peptides. Other similarities or differences between the two peptides and of each peptide with SMPI are still being investigated.

P19

レセプター刺激による活性化に伴う G蛋白質 α サブユニットの構造変化

中島勝弥¹、○大塚 敦¹、千田麻祐子¹、若松 馨¹、田中剛史²、
須貝真理子²、河野俊之²

(群馬大・工・生物化学工¹、三菱化学生命研²)

Conformation change of G protein α subunit upon activation by receptor stimulation

K. Nakajima, A. Ohtsuka, M. Chida, K. Wakamatsu, T. Tanaka*, M. Sugai*, T. Kohno*

*Gunma University, *Mitsubishikasei Institute of Life Sciences*

G protein plays important roles in signal transduction in cell membranes. Upon ligand binding, G protein-coupled receptors promote release of GDP from G protein α subunits, but the associated conformation change in the α subunits has not been elucidated. Although the receptor is known to interact with the C-terminal region of the α subunit, the conformation change in that region alone cannot account for the enhanced GDP release because GDP binding sites are not close to the C-terminal region. We postulate that conformation change in the C-terminal region is transmitted to the GDP binding sites via the ion pair between the C-terminal $\alpha 5$ helix and the $\beta 2/\beta 3$ loop (GDP binding site is located to the N-terminus of the $\beta 2$ -strand) based on the poor receptor-coupling ability of the mutants lacking the ion pair. Analysis using α subunits amino acid-selectively double-labeled with ¹³C and ¹⁵N confirmed the conformation change near the ion pair.

G蛋白質は細胞膜情報伝達においてレセプターとエフェクターとを共役し、細胞外シグナルの細胞内への伝達・増幅を調節する主要な機能を担っている。リガンドの結合したレセプターはG蛋白質 α サブユニットと相互作用してGDPの解離を促進すると考えられているが、 α サブユニットのどの部分にどのような構造変化が起きて促進するのかは不明である。レセプターと結合する α サブユニットの部位はC末端領域の $\alpha 5$ ヘリックスと考えられているが、 $\alpha 5$ ヘリックスはGDPとの結合に直接関与していないのでその構造変化は何らかの方法でGDP結合領域へ伝わるはずである。我々は α サブユニットのC末端の $\alpha 5$ ヘリックスがレセプター刺激によって構造変化を起こし、 $\alpha 5$ ヘリックスと $\beta 2/\beta 3$ ループとの間のイオンペアを介してGDP結合領域に伝えられるという仮説を立てている。実際に、このイオンペアを破壊したミュータントではレセプター刺激によってあまり活性化されなくなった。また、アミノ酸選択的に安定同位体二重標識したG蛋白質 α サブユニットを用いて測定したところ、レセプターと同様にGDPの解離を促進するレセプター低分子モデルで、実際に $\alpha 5$ ヘリックスのイオンペア近傍のシグナルが特異的に変化することを見いだした。

キーワード： G蛋白質、レセプター、アミノ酸選択的ラベル、立体構造変化

著者ふりがな： なかじまかつや、おおつかあつし、ちだまゆこ、わかまつかおり、
たなかたけし、すがいまりこ、こうのとしゆき

Structure determination of HMG2 box B and its binding studies with DNABuichiro Ena¹, Shin-ichi Tate¹, Ken-ichi Yoshioka², Michiteru Yoshida², Masatsune Kainosho¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University¹Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo²

High mobility group (HMG) 2 is a nonspecific DNA binding protein and is considered to play various important biological functions. As some of the HMG proteins, such as SRY or LEF-1 bind to specific sequences, there have been considerable interests to search for the origin of the specificity or nonspecificity of the DNA binding property in terms of three-dimensional structures of the HMG proteins. As there has so far been no structural studies for HMG2, we solved the solution structure of the box B of HMG2 by NMR, and compared it with the structures of the other HMG proteins. The chemical shift perturbation experiments with three different DNA oligomers were carried out, leading us to confirm its sequence nonspecificity in the DNA recognition.

HMG 蛋白質は DNA 複製などの生体中の多くの重要な反応に関わり、HMG-box と呼ばれる共通の DNA 結合部位をもつ。HMG-box には特定の DNA 塩基配列を認識するクラスと、DNA の折れ曲がりのような立体構造上の特徴を認識するクラスが存在する。HMG-box が、どのようにして異なった分子認識機能を果たし得るかに関しては大きな興味を持たれてきたものの、未だに詳しい解明がなされていない。本研究は配列非特異的な認識をする HMG2 box B(78 残基)の立体構造を決定し、DNA オリゴマーとの相互作用解析等を含めて HMG-box の DNA 認識機構に関する知見を得ようとしたものである。

HMG2 box B の立体構造は安定同位体核利用多次元 NMR 法による 1,840 個の距離情報と 64 個の二面角情報をもとに X-PLOR による構造計算を行い、主鎖の重ね合わせの R.M.S.D.が 0.35 Å の精度で決定した。他の HMG-box と同様に 3 本の α -ヘリックスを持つがその空間配置にわずかではあるが差がみられている。DNA オリゴマーとの相互作用による立体構造変化を研究するために、¹⁵N 均一標識した HMG2 boxB を用い、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルに及ぼすオリゴマーの添加効果を検討した。HMG2 boxB では特異的な DNA 結合配列が知られていないために本研究では既知の HMG-box 結合配列を参考にし、立体構造の柔軟性が異なると期待される 3 種類の DNA オリゴマーを選んだ。これらのオリゴマーの添加により boxB の HSQC スペクトル上で広範な化学シフト変化が認められたものの、各複合体間に誘起されたシフト変化に大きな違いは見られず、HMG2 が特定の認識配列を持たないことが確認された。

HMG2 box B、立体構造、DNA オリゴマー添加効果、¹H-¹⁵N HSQC

えな ぶいちろう、たて しんいち、よしおか けんいち、よしだ みちてる、かいのしょう まさつね

P21 マイクロ波温度ジャンプNMR法によるタンパク質フォールディングの研究
(神戸大自然科学) ○川上 勝、赤坂一之

Protein Folding Studied by Microwave Temperature-jump NMR
Graduate School of Science and Technology, Kobe University
Masaru Kawakami and Kazuyuki Akasaka

An efficient microwave Temperature-jump NMR technique utilizing a dielectric resonator was developed and applied to the unfolding study of bovine alpha-lactalbumin (BLA). One-Dimensional temperature-jump NMR spectra indicated that tertiary structure of BLA was largely destroyed within the temperature-jump event. However, some peaks showed gradual high-field shift with time after the jump, indicating an existence of further conformational changes. From assignments of these peaks made by SC-2D NMR spectroscopy, it was found that these signals come from amino acids which form the non-native hydrophobic cluster in the unfolded state. These results indicate a formation of non-native structure in the unfolding process of BLA.

我々は誘電体共振器を導入したマイクロ波温度ジャンプNMR装置の開発を行っている。これまでに、本学会において装置開発の経緯と、本装置によるタンパク質の熱変性過程への応用例を報告してきた(NMR討論会第34~37回要旨集参照)。今回、さらに装置の性能を向上させ、数十ミリ秒という早い反応を追跡することが可能になった。これにより、 α ラクトアルブミンのアンフォールディングに関して新たな知見を得たのでこれを報告する。

試料攪拌用のスクリー部分を改良したことにより、温度ジャンプ後、温度の不均一が解消されるまでの時間がそれまでの50~100ミリ秒から、10ミリ秒にまで短縮された。今回、pH7、尿素4M存在下、 α ラクトアルブミン(BLA)の、40度から60度への温度ジャンプ(15msec)によって引き起こされるアンフォールディング過程を測定した。その結果、ジャンプ直後、そのNMRスペクトルはほぼ熱変性状態のそれと類似しており、すでにBLAの高次構造はほぼ崩壊していることが示唆された。しかしジャンプ後の時間経過に伴い、ゆっくりと($\tau \approx 330$ ms)の時間スケールで高磁場にシフトする残基が有ることが分かった。状態相関2次元NMRにより、これらの残基は、変性状態で非天然の疎水クラスターを形成する残基と帰属された。従って、ジャンプ後のゆっくりとしたシフトは、非天然様の構造を再構成する過程であると思われる。

キーワード：マイクロ波、温度ジャンプNMR、タンパク質、フォールディング

かわかみ まさる、あかさか かずゆき

P22

ジストロフィン WW ドメインと β -ジストログリカンとの相互作用解析

(東大院農¹、東大生物生産セ²、国立精神神経セ神経研³) ○加藤有介¹、永田宏次²、伊藤三恵¹、野口悟³、吉田幹晴³、小沢鉄二郎³、田之倉 優¹

In vitro analysis of the interaction between the dystrophin WW domain and β -dystroglycan PY motif.

○Yusuke Kato¹, Koji Nagata², Mie Ito¹, Satoru Noguchi³, Mikiharu Yoshida³, Ei-jiro Ozawa³, Masaru Tanokura¹

¹Dept. Appl. Bio. Chem. Biotechnol., ²Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo, ³ Dept. Cell Biol., Natl. Inst. Neurosci., NCNP

We have studied the intermolecular interaction *in vitro* by surface plasmon resonance (SPR) and NMR to investigate the structural basis of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. The specific interaction between the dystrophin WW domain and β -dystroglycan PY motif (RSPPPYVP-NH₂) was observed in the SPR measurements. In the ¹H-¹⁵N HSQC spectra, serial addition of the unlabeled β -dystroglycan PY motif to the ¹⁵N-labeled dystrophin WW domain caused the chemical shift perturbations of a part of signals. The assignments of the NMR signals were obtained from the triple-resonance NMR data of the ¹³C/¹⁵N-labeled dystrophin WW domain, and thus we identified the amino-acid residues involved in the intermolecular interaction. Structure calculation of the dystrophin WW domain and detailed analysis of the intermolecular interaction are now in progress.

[目的]

ジストロフィン は細胞膜の裏打ちタンパク質でももに筋細胞に存在し、その変異・欠失により重篤な筋ジストロフィーが引き起こされる。ジストロフィンは β -ジストログリカン (β -DG) と相互作用することによりその機能を発現している。この相互作用にはジストロフィンの WW ドメインの関与が予想されているが未だ実証されていない。本研究では WW ドメインと β -DG との間での相互作用解析・立体構造解析を行うことで、WW ドメインのジストロフィン中での機能を明らかにすることを目的としている。

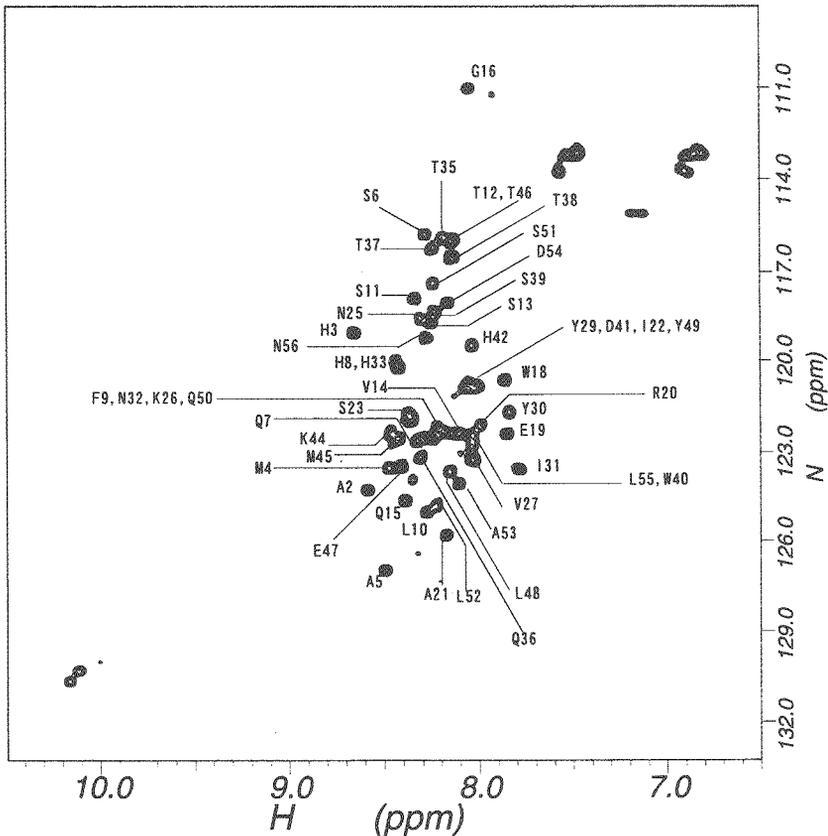
NMR, ジストロフィン, リフォールディング

かとう ゆうすけ、ながた こうじ、いとう みえ、のぐち さとる、
よしだ みきはる、おざわ えいじろう、たのくら まさる

[実験、結果]

立体構造解析のためには大量の試料が必要であるため、T7 プロモータを用いた WW ドメイン大腸菌発現系を構築した。N 末端に 6xHis-tag を持つ発現 WW ドメインを尿素存在下で Ni-NTA agarose (QIAGEN) により精製し、ゲルろ過カラムに通すことでリフォールディングさせ、特異的プロテアーゼを用いて 6xHis-tag を除去した。こうして得られた WW ドメインは pH 中性では溶解度が低かったが、pH を 3.5 まで下げること数 mM まで溶解度が向上し NMR による構造解析が可能となった。そこで pH 酸性領域における WW ドメインの立体構造解析の妥当性を検証した。まず、pH3.5 から pH7.5 の範囲で CD スペクトル(190-240 nm)に顕著な変化はなかったため、この領域で同様の二次構造を持つことが示された。さらに表面プラズモン共鳴(SRP)から、pH3.5 および pH7.0 において WW ドメインと β -DG 由来の RSPPPYVP ペプチド間で相互作用が確認された。また、 ^{15}N ラベル体を用いて ^1H - ^{15}N HSQC による滴定実験を行ったところ、ペプチド添加により特定残基のシグナルの化学シフト変化が観測されたことから相互作用が確認された。現在、 ^{13}C , ^{15}N ダブルラベル体を調製して NMR による立体構造解析を進めている。

Figure
Assignment of Dystrophin WW domain(^1H - ^{15}N HSQC)



(¹三菱化学生命研・構造解析、²理研・遺伝生化学)
 ○田中剛史¹、須貝真理子¹、伊藤隆²、井ノ口馨¹、河野俊之¹

Structural Analysis of Vesl-1S

Takeshi Tanaka¹, Mariko Sugai¹, Yutaka Ito², Kaoru Inokuchi¹, Toshiyuki Kohno¹
¹Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, ²Laboratory of Cellular and Molecular Biology, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

Vesl-1S (186 amino acids) is one of the post synaptic density proteins, whose expression is regulated during long term potentiation (LTP) in the hippocampus. Vesl-1S may contribute to formation of synaptic plasticity by regulating the clustering or assembling of group I metabotropic glutamate receptors or inositol triphosphate receptors. Vesl-1S contains EVH1 domain (30% conservation) at N-terminal 113 residues which binds to proline rich motif, PPXXFr, found in receptors above.

In the present study, we determined backbone assignment and predicted the secondary structure of Vesl-1S using triple resonance 3D NMR spectroscopy on uniformly ¹⁵N / ¹³C labeled Vesl-1S. We also investigated chemical shift perturbation of uniformly ¹⁵N labeled Vesl-1S upon binding peptides derived from receptors above.

Vesl-1S (アミノ酸186残基)は海馬LTPに伴いシナプス後膜で発現誘導され、I型代謝型グルタミン酸レセプターやイノシトール3リン酸レセプターのクラスタリングやアセンブリを制御することでシナプス可塑性に関与していると考えられている。Vesl-1SのN末端側113残基はEVH1ドメインと約30%のアミノ酸相同性があり、この領域でレセプターのPPXXFr配列と選択的に結合するがその機構はこれまで明らかとなっていない。そこで我々はNMRを用いVesl-1Sの立体構造および選択的リガンド認識機構を解明すること目的とした。

<実験>

¹⁵Nユニフォームラベルおよび¹⁵N/¹³CユニフォームラベルしたVesl-1Sを大腸菌を用いた発現系により調製した。測定は90% H₂O - 10% D₂O 100 mMリン酸バッファー (pH 6.5) を用い30°Cで行った。また、PPXXFr配列を持つレセプターの部分ペプチドを化学合成により得た (mGluR: ALTPSPFRD, IP3R: LNNPPKKFRD, RyR: SLRPPHHFSP)。

主鎖シグナルの帰属のために¹⁵N/¹³CユニフォームラベルしたVesl-1Sを用い、¹H-¹⁵N HSQC、HNCA、HN(CO)CA、HNCACB、CBCA(CO)NNH、HNCOの測定を行った。また、¹⁵NユニフォームラベルしたVesl-1Sを用い¹H-¹⁵N HSQCを測定し、レセプターの部分ペプチドによるアミドシグナルのChemical Shift Perturbationを調べた。

キーワード: Vesl-1S, 多次元NMR, 立体構造解析

たなか たけし、すがい まりこ、いとう ゆたか、いのくち かおる、
 こうの としゆき

<結果および考察>

これまでに11個のPro残基を除く175残基のうち158残基(90%)の主鎖¹HN、¹³C α 、¹⁵N核の帰属をすることができた。¹³C β 核は8個のGly残基と11個のPro残基を除く167残基のうち150残基(90%)が帰属できた。

帰属された¹³C α 、¹³C β 核のChemical Shift IndexからVesl-1SのN末端側113残基はMena EVH1ドメインとほぼ相同な2次構造を持ち、C末端側73残基にはランダムコイルが多いことが推測された。このことからVesl-1SのN末端領域はEVH1 foldを形成していることが示唆された。

アミドシグナルのChemical Shift PerturbationからおもにPhe14 - Ile16、Thr20 - Trp24、Tyr68がレセプター部分ペプチドとの結合に関与していることが示唆された。これらの領域は1次構造上Mena EVH1ドメインのペプチド結合領域に相当しているがアミノ酸の相同性は低い。このことからVesl-1SとMenaの異なるペプチド選択性はアミノ酸の相違に起因していることが示唆された。

P24 ω -conotoxin MVIIC 野生型と改変体の 構造比較

(三菱生命研) ○小林邦子、佐々木亨、佐藤一紀、河野俊之

Comparison of structures of the wild type and the analog of ω -conotoxin MVIIC

Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences

Kuniko Kobayashi, Toru Sasaki, Kazuki Sato, and Toshiyuki Kohno

We have compared the structures of the wild type and the analog of ω -conotoxin MVIIC (ω -CTX MVIIC) by $^1\text{H-NMR}$. The peptide ω -CTX MVIIC derived from a venom of the fish-hunting sea snail *Conus magus* has 26 amino acids residues including six cysteine residues which form three disulfide bonds. This peptide blocks P- and Q-type Ca^{2+} currents by binding with high affinity to voltage-sensitive Ca^{2+} channels. It also blocks N-type Ca^{2+} current but its affinity is low. We have made the analog of ω -CTX MVIIC which maintains high affinity to P/Q-type channels but loses affinity to N-type channel. According to the 1D spectra of the amide proton region of the wild type and the analog, chemical shifts did not change in five residues. All these residues are located in the β -strands which form a triple-stranded β -sheet in the wild type. Thus, the analog maintains the core structure of the wild type.

[序]

ω -conotoxin MVIIC (ω -CTX MVIIC) はイモガイの毒液由来のペプチドで、26アミノ酸残基から成り、分子内で3本のジスルフィド結合を形成している。このペプチドは、カルシウムチャネルのP/Q型に結合してイオンの流入を阻害するが、N型に対しても弱い活性を持つ。我々は、 ω -CTX MVIIC をもとにして、選択性の非常に高い改変体の作成に成功した。アミノ酸残基を3個入れ替えた(S17K、S19R、K25R)この改変体は、野生型のP/Q型結合活性はそのまま保持しているが、N型カルシウムチャネルに対する活性は大幅に低下した。野生型と改変体の活性の違いが構造の面

キーワード：カルシウムチャネル阻害、ペプチド、改変体、活性、立体構造

○こばやしくにこ、ささきとおる、さとうかずき、こうのとしゆき

エラスチンタンパク質のコアセルベーション前後 における分子運動性の解析

(名工大・工) ○吉水広明、杉浦雅紀、藤原美穂、
辻田義治、木下隆利

A Study of Molecular Motions in Coacervation of Elastin Protein

(Nagoya Institute of Technology) Hiroaki YOSHIMIZU, Masanori SUGIURA,
Miho FUJIWARA, Yoshiharu TSUJITA, Takatoshi KINOSHITA

We discussed the molecular mobility and the self-diffusion of elastin protein in aqueous solution in order to clarify the coacervation phenomenon which is due to the formation of the dense and dilute phase of elastin in aqueous solution and one of the important role on the formation of elastin fiber in native systems. The spin-lattice relaxation time (T_1) for the methyl protons of the Ala in elastin (50mg/ml) increased with the temperature, and the increase became especially remarkable above 45 °C the coacervation comes about. On the other hand, T_1 for the concentrated elastin aqueous solution (587mg/ml) was short and unchanged at about 45 °C, because this concentration is equal to the coacervate drops, i.e., the dense phase. From the measurements of the self-diffusion coefficients (D) for the two elastin aqueous solutions, the same results were obtained as well as the case of T_1 .

1. エラスチンは大動脈壁、靭帯など持続的に強い力を受ける組織で伸展性、弾力性を示す構造蛋白質である。このエラスチンの水溶液は温度上昇とともに体温付近で均一溶液から不均一溶液に変わる、いわゆるコアセルベーションと呼ばれる現象を示す。本研究では、このコアセルベーション前後における、エラスチンの分子運動性の変化について、NMR 測定より検討した。

2. 実験に用いたエラスチンは牛の頸部靭帯を熱シュウ酸処理により可溶化したものをエラスチンプロダクツ社より購入し、そのまま用いた。NMR 測定は測定温度範囲 25~60°Cで、50 及び 587mg/ml のエラスチン水溶液(溶媒: D₂O)を用いて行った。装置には varian 社製 UNITY 400 plus NMR 分光計を用いた。本研究ではピークが明確で帰属が容易な Ala の C^βメチルプロトン由来のピークに着目した。

3. まず、コアセルベーション前後における T_1^H の温度依存性を検討した。 T_1^H は濃度依存性が大きく、587mg/ml の方が短い値であった。コアセルベーションを起こさない濃度(587mg/ml)では温度による大きな変化は見らないのに対し、50mg/ml では温度とともに長くなった。特に 45°C付近から増加の割合が大きくなり、濁度測定によるコアセルベート液滴の形成温度と一致した。45°Cからの急激な変化は、 T_1^H の非常に長い低濃度相と、コアセルベート液滴、即ち T_1^H の短い高濃度相との間でのエラスチン分子の速い交換を考えることで説明できる。

次に PFG ¹H NMR 測定を行い、エラスチン分子全体の拡散運動性を検討した。得られたスペクトルデータより、不均一系であるコアセルベーション後においてもエラスチン分子の拡散成分は一成分であることが分かった。これは、 T_1^H 測定結果と同様、高濃度相と低濃度相間のエラスチン分子の交換が非常に早いことに起因すると考えられる。またこれは、本実験で得た自己拡散係数と測定条件として用いた拡散時間とからエラスチンの平均拡散行程距離を見積もったところ、それは動的光散乱実験等で報告されているコアセルベート液滴の流体力学半径よりも大きいことから裏付けられる。

キーワード: エラスチン、コアセルベーション、分子運動性、PFG-NMR

よしみず ひろあき、すぎうら まさのり、ふじわら みほ、つじた よしはる、きのした たかとし

P26 Ubiquitin Binding Interface Mapping on Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1) by NMR Chemical Shift Perturbation

(理研遺伝生化学¹, 東京医科歯科大歯², 三菱化学生命研³, 北里大理⁴)

○Sundaresan Rajesh^{1,2}, 伊藤 隆¹, 坂本泰一³, 岩本真理子³, 小寺義男^{3,4}, 土田信夫², 柴田武彦¹, 河野俊之³

Ubiquitin Binding Interface Mapping on Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1) by NMR Chemical Shift Perturbation

○Sundaresan Rajesh,^{1,2} Yutaka Ito,¹ Taiichi Sakamoto,³ Mariko Iwamoto,³ Yoshio Kodera,^{3,4} Nobuo Tsuchida,² Takehiko Shibata,¹ and Toshiyuki Kohno³

¹Laboratory of Cell. & Mol. Biology, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

²Laboratory of Mol. & Cellular Oncology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

³Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, ⁴Department of Physics, Kitasato University

ABSTRACT

Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1, 26kDa) is involved in the processing of Ubiquitin (Ub) precursors and Ub-protein fusions. Complete backbone and side chain assignments of YUH1 was obtained. The global fold of free YUH1 has been determined. The refined solution structure will be presented. Backbone assignments were also obtained for the YUH1-Ub mixture and the YUH1-Ub covalent complex. The Ub binding interface was mapped onto the secondary structure of free YUH1 and extrapolated onto the crystal structure of UCHL3 (human homologue of YUH1). A model for Ub binding to YUH1 (UCHL3) was envisaged. A structural explanation is provided to explain the high specificity of Ubiquitin C-terminal hydrolases in recognizing Ub-linked substrates for cleavage.

INTRODUCTION

Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1, 236 residues), is a member of the Ubiquitin C-terminal Hydrolase family of deubiquitinating enzymes. It functions to maintain the free Ub pool in cells, through hydrolysis of Ub C-terminal extensions. YUH1 shares 30% sequence identity with its human homologue UCHL3. The reaction mechanism is conserved and involves the formation of a thio-ester intermediate with the C-terminal -COOH of Ub. We have undertaken heteronuclear 3D NMR studies to delineate the structural basis for such a high specificity towards Ub and to identify the Ub binding interface on YUH1.

タンパク質タンパク質相互作用, 重水素化, triple-resonance NMR

Rajesh S., いたうゆたか, さかもとたいいち, いわもとまりこ, こでらよしお, つちだのぶお, しばたたけひこ, こうのとしゆき

EXPERIMENTAL METHODS

The backbone $^1\text{H}_\text{N}$, $^1\text{H}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}'$ and ^{15}N resonance assignments of YUH1 were achieved by analysing the 3D HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HCA(CO)NNH, CBCANNH and CBCA(CO)NNH spectra with deuterium decoupling. The side chain ^1H and ^{13}C resonance assignments were achieved using HBHA(CBCACO)NNH, H(CCCO)NNH and CBCA(CO)NNH, CC(CO)NNH spectra respectively. Backbone sequential, intermediate and long range NOEs were obtained using the 3D ^{15}N -separated NOESY-HSQC spectra. 50%- $^2\text{H}/u$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ YUH1 was used for the above experiments. Amino acid selectively labelled YUH1 samples eg., ILV- $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, FY- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -(bg- $^2\text{H}/^{15}\text{N}$)-YUH1 and ILV FY- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$, u - $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ -YUH1 were used to record CC(CO)NNH, H(CCCO)NNH, ^{15}N -separated NOESY-HSQC and ^{13}C -separated NOESY-HSQC spectra.

For YUH1-Ub interaction analysis, multipoint titrations were performed using u - ^{15}N -labelled YUH1 and unlabelled Ub in molar ratios of 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:1.5 and 1:2. A series of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of YUH1 were obtained for each of the steps mentioned above. 3D HNCA, HN(CO)CA, HN(COCA)CB spectra were recorded to assign the backbone resonances of YUH1 in a 1:3 YUH1-Ub mixture and in the 35kDa YUH1-Ub covalent complex.

RESULTS AND DISCUSSION

The secondary structure of YUH1, predicted on the basis of sequential, intermediate and long-range NOEs and CSI av of $^1\text{H}_\text{N}$, $^{15}\text{N}_\text{H}$, $^{13}\text{C}_\alpha$ and $^{13}\text{C}_\beta$ shifts revealed a six strand beta sheet core surrounded by six helices and various long and short loop regions. The global fold representation of YUH1 is shown in figure 1. The secondary structure was identical to that of UCH-L3 (human homologue of YUH1), figure 1. Refinement of YUH1 solution structure using full distance information from 50%- $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ or 50%- $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ -YUH1 is in progress.

Intermediate exchange behaviour for Ub bound YUH1 was construed from the titration experiments, evidenced by line broadening and missing crosspeaks. Chemical shift perturbation of backbone resonances of YUH1 in a 1:3 YUH1-Ub, mixture delineated the Ub binding interface of YUH1. However the large number of exchange broadened residues hampered a clear picture of the Ub binding interface.

A similar set of experiments as explained above was performed on a chemically synthesised YUH1-Ub covalent complex. Almost 92% of backbone ^1H , ^{15}N resonances could be assigned for this 35kDa complex. Backbone ^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}_\alpha$ correlations could not be assigned for 20 residues due to lack of connectivities in the ^{13}C dimension. A slight conformational flexibility around the active site regions may be responsible for the above phenomenon. Consistent with our earlier observation, chemical shift perturbation of YUH1 residues in YUH1-Ub complex clearly identified the Ub binding surface. Mapping these results onto the X-ray structure of UCHL3 revealed an extensive Ub binding surface on UCH family enzymes, stabilised by both electrostatic and hydrophobic forces. A hypothetical model for UCHL3 (YUH1)- Ub binding could be envisaged on the basis of the above results.

ヌクレオチドプールの浄化に關与する酵素ヒト MTH1 の構造解析

伊藤紀幸¹、○三島正規¹、池上貴久¹、山縣ゆり子²、関口睦夫³、中別府雄作¹、白川昌宏¹
 (¹奈良先端大・バイオ、²阪大・薬、³福歯大・生物、⁴九大・生医研・生化、科技団・CREST)

Structural studies of human MTH1, a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase

¹Noriyuki ITO, 〇Masaki MISHIMA, ¹Takahisa Ikegami, ²Yuriko Yamagata, ³Mutsuo Sekiguchi, ⁴Yusaku Nakabeppu and ¹Masahiro Shirakawa (¹School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, ²Dept. of Pharm. Osaka University, ³Dept. of Biology, Fukuoka Dental College, ⁴Med. Inst. of Bioreg., Kyushu Univ. & CREST)

Reactive oxygen is generated during aerobic cellular metabolism. Oxidized form of purine dNTP, 8-oxo-dGTP and 2-OH-dATP are produced by the reactive oxygen and misincorporation of the dNTPs into genomic DNA is known to be mutagenic. The hMTH1 protein is a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase which hydrolyse 8-oxo-dGTP and 2-OH-dATP to nucleoside mono phosphate, thereby preventing misincorporation to genomic DNA. We aimed to reveal the recognition mechanism of hMTH1 based on tertiary structure using solution NMR in this study. The substitution of valine for methionine at the residue 83 of hMTH1 by genetic polymorphism have been known, and the thermostability of M83-hMTH1 has shown to be decreased. We also focus on this discrepancy in terms of tertiary structure.

【序】生体内で発生する活性酸素は、ゲノム DNA のみでなくヌクレオチドプール中に存在する DNA 基質にも酸化的損傷を与える。酸化損傷を受けた DNA 基質は DNA 複製に伴いゲノム DNA 中に取り込まれ、突然変異を誘発する。ヒト MTH1 蛋白質 (以下、hMTH1) はヌクレオチドプール中に生成した損傷 DNA 基質である 8-oxo-dGTP、2-OH-dATP、などを認識し加水分解することによって突然変異を抑制する修復酵素である。本研究では溶液 NMR を用いて hMTH1 の溶液中での立体構造を決定し、分子認識機構の解明を目指す。また、hMTH1 には遺伝的な多型があることが確認されており、体質との相関に興味をもたれている。83 番の Val が Met に変異した変異型 Met83-hMTH1 は熱安定性が低下することが報告されており、この 2 つのサブタイプに構造学的な考察を加えることも本研究の目的である。

【方法】¹⁵N、¹⁵N/¹³C ラベル体の hMTH1 (156 アミノ酸残基) は、大腸菌の大量発現系を用いて作成した。80% D₂O の M9 培地を用いて ¹⁵N、¹³C、²H トリプルラベル体も作成した。NMR 測定は hMTH1 濃度 1-2 mM、50 mM リン酸バッファー (pH 7.4)、40 mM KCl、10 mM DTT、303K で行った。主鎖の帰属には 3D CBCA(CO)NH、CBCANH、HN(CA)CO、HNCO スペクトルを用いた。側鎖の帰属は 3D HCCH-TOCSY、C(CO)NH、H(CCO)NH、¹⁵N TOCSY-HSQC、及び 4D HC(CO)NH スペクトルを用いて行った。距離情報の収集は 4D ¹³C/¹⁵N edited NOESY により行った。

【結果】現在までに主鎖及び側鎖の帰属をほぼ完了した。CSI 法による 2 次構造の予測と中距離の NOE を解析から hMTH1 は 2 つの α ヘリックスと 7 つの β シートからなることが判った。これは同様の活性を持つ大腸菌 MutT タンパク質の 2 次構造トポロジーとほぼ同じである。両者のアミノ酸配列の相同性が 17% と低いことを考えると、この立体構造の類似性は興味深い。また遺伝子多型に影響を受ける 83 番目の残基は β ストランド上に存在する。この残基が Val → Met 置換によって、β シート部分の安定性が損なわれると推定される。hMTH1 は比較的 β シート含量の多い蛋白質であるので、β ストランド間の水素結合の情報は構造決定にとって重要な要素であると考えられる。そこで水素結合を確認する目的で、^{3h}J_{N_α} の展開による HNCO 実験を試みている。展開時間の長い測定であるので重水素化した hMTH1 を用いて TROSY 法による測定を行った。さらに HD 交換実験と比較した結果を本討論会において発表する予定である。

Key words: DNA repair, 8-oxo-dGTP, Nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase, TROSY, Hydrogen bond

いとう のりゆき、みしま まさき、いけがみ たかひさ、やまがた ゆりこ、せきぐち むつお、なかべつぷ ゆうさく、しらかわ まさひろ

P28 骨形成因子 I 型レセプター細胞外ドメインおよびその変異体の溶液構造

(農水省・生物研¹、阪大・薬²、阪大・蛋白研³)

○八田知久^{1,3}、小西博子²、加藤悦子¹、京極好正³、小林祐次²、山崎俊正¹

Solution structures of the extracellular domain of BMP type-I receptor and its mutants

(National Institute of Agrobiological Resources¹, Faculty of Pharmaceutical Science, Osaka University², and Institute for Protein Research, Osaka University³)

○Tomohisa Hatta^{1,3}, Hiroko Konishi², Etsuko Katoh¹, Yoshimasa Kyogoku³, Yuji Kobayashi², and Toshimasa Yamazaki¹

The 3D structure of the extracellular domain of BMP type-IA receptor (sBMP_r1A) has been determined by NMR spectroscopy. Based on this structure, we designed and synthesized three mutant proteins with different binding affinity. One is a chimeric protein in which the nine amino acids (M68-Q76) of sBMP_r1A was substituted by the corresponding sequence of the TGF- β type-I receptor, and the other two are site-directed mutant proteins, Y70A and F75A. Comparison of 3D structures of these mutants led to the conclusion that F75 in the long, flexible loop is critical for the ligand binding of the BMP type-IA receptor.

【序論】

骨形成因子(BMP)は TGF- β スーパーファミリーに属するサイトカインであり、骨形成や細胞の初期発生およびアポトーシスなどに関与していることが知られている。BMP は細胞表面に存在する I 型および II 型レセプターと結合することにより細胞内へシグナルを伝達する。これら I 型、II 型レセプターともに 1 回膜貫通型レセプターであり、Cys に富んだ 100-150 残基の細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内 Ser/Thr キナーゼドメインから構成されている。本研究では、I 型レセプターのリガンド認識機構を解明するために、BMP-IA 型レセプターの細胞外ドメイン(sBMP_r1A、119 残基)の立体構造を NMR を用いて決定した。さらに、得られた構造をもとに数種の変異タンパク質を作成しリガンド認識部位を特定した。

【方法】

sBMP_r1A およびその変異タンパク質はチオレドキシソニウム融合タンパク質として大腸菌内で発現させた後、エンテロキナーゼで酵素消化して合成した。これらのタンパク質の BMP-4 に対するリガンド結合活性は表面プラズモン共鳴センサー(BIAcore)を用いて測定した。安定同位体標識した sBMP_r1A について各種多次元 NMR 測定を行い、NOE、水素結合情報および回転角情報をもとに X-PLOR3.1 を用いて立体構造を決定した。変異タンパク質についても同様に安定同位体標識を行い NMR により立体構造を解析した。

骨形成因子、レセプター、溶液構造、変異体

はった ともひさ、 こにし ひろこ、かとう えつこ、きょうごく よしまさ、
こばやし ゆうじ、やまぎき としまさ

【結果および考察】

sBMP_{1A} について得られた NMR 構造データ (NOE, $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$) を検討することにより、sBMP_{1A} は S-S 結合の存在する Phe25-Leu102 の領域にのみ安定な立体構造を有し、N 末端および C 末端領域は運動性の高いランダムコイル状態にあることが明らかになった。sBMP_{1A} (Phe25-Leu102 の安定構造領域) は、3 本の β 鎖で構成される逆平行 β シート ($\beta 4$:Glu60-Met68/ $\beta 3$:His48-Asp56/ $\beta 5$:Arg87-Arg93) と、2 本の β 鎖で構成される逆平行 β シート ($\beta 1$:Phe25-Ser31/ $\beta 2$:Thr42-Thr45) およびヘリックス (Leu96-Tyr100) で形成される平面との二層構造を有し、比較的平坦な構造をとっている。5 本の S-S 結合の内 3 本はこれら 2 つの層の間に観測され、二層構造の安定化に寄与している。また、sBMP_{1A} には 2 つの柔軟なループが存在する。1 つは $\beta 1$ と $\beta 2$ をつなぐ Loop1 で、1 本の S-S 結合と糖鎖結合部位を含む。もう 1 つは $\beta 4$ と $\beta 5$ をつなぐ Loop2 であり、ループ中央に位置する Cys77 は $\beta 5$ 鎖中の Cys91 と S-S 結合を形成している。Loop1 と Loop2 は逆平行 β シートを挟んで反対側に位置している。

我々は、①sBMP_{1A} の糖鎖はリガンド認識に関与していないこと、②TGF- β I 型レセプターファミリーの一次構造は Loop2 においてアミノ酸組成とシーケンス長に顕著な相違を示すこと、③BMP 類似化合物 DPP の I 型レセプターにおいて、Loop2 中の Cys-Lys が欠損した変異レセプターが機能を消失することを考慮して、BMP I 型レセプターは Loop2 を介してリガンドを認識すると推定した。これを証明するために、sBMP_{1A} の Loop2 中の 9 残基を、これに相当する TGF- β I 型レセプターのアミノ酸シーケンスで置換したキメラタンパク質 (sBMP_{1A}/T β R-I) をデザインし合成した。NMR と CD を用いた溶液構造の解析および BIAcore によるリガンド結合活性の測定から、我々の予想通り、sBMP_{1A}/T β R-I は sBMP_{1A} と同様の立体構造を有するが、BMP-4 に対する結合能をほぼ完全に消失していることが証明された。これらの結果から、BMP I 型レセプターのリガンド認識には Loop2 中の 9 残基のシーケンス (68-76 残基: MKYEGSDFQ) が主要な役割を果たしていることが明らかになった。

さらに詳細にリガンド結合部位を特定するために、Loop2 中の疎水性残基を Ala に置換した Y70A 変異体と F75A 変異体を合成した。両変異体について、NMR と CD による溶液構造の解析および BIAcore によるリガンド結合活性の測定を行ったところ、Y70A 変異体は WT と同様の立体構造と同程度のリガンド結合能を保持していることを明らかにした。一方、F75A 変異体も WT と同様の立体構造を保持しているが、BMP-4 に対するリガンド結合能は完全に消失していた。以上のことから、BMP I 型レセプターの Loop2、特に Phe75 が BMP-4 との結合に直接に関与していると結論される。

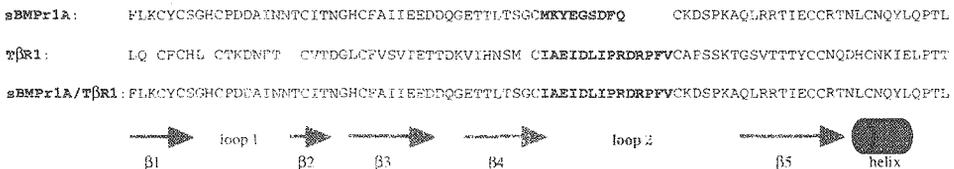


Fig. 1. Amino acid sequences of sBMP_{1A}, T β R-I and their chimeric protein sBMP_{1A}/T β R-I.

P29

HIV-2ヌクレオキャプシドタンパク質の構造機能相関の研究

北里大理¹, 北里大医療衛生², 三菱化学生命研³

○小寺義男^{1,3}, 永井美佐¹, 平山幸司¹, 小松博義², 前田忠計¹,

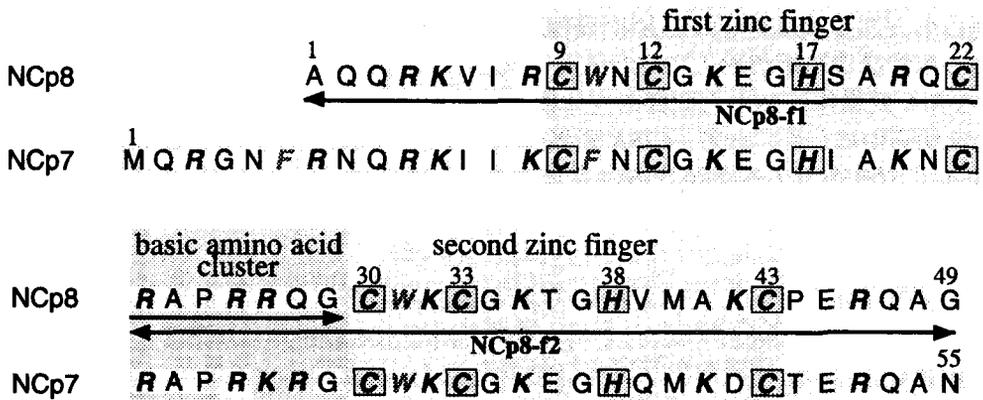
佐藤一紀³, 河野俊之³

Study of the structure-function relationships of the Human Immunodeficiency Virus Type-2 Nucleocapsid protein

¹School of Science, Kitasato University, ²School of Allied Health Sciences, Kitasato University, ³Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences

Yoshio Kodera^{1,3}, Misa Nagai¹, Kouji Hirayama¹, Hiroyoshi Komatsu², Tadakazu Maeda¹, Kazuki Sato³, Toshiyuki Kohno³

The retroviral nucleocapsid (NC) protein is a multifunctional protein essential for RNA genome packaging and viral infectivity. The NC protein, NCp8, of the human immunodeficiency virus type-II (HIV-2) is a 49 amino acid peptide containing two zinc fingers (C-X₂-C-X₄-H-X₄-C) connected by seven amino acid residues, called the "basic amino acid cluster". It has been shown that the basic amino acid cluster is important for the specific binding to viral RNA and other functions. In this study, the three-dimensional structure of the N-terminal zinc finger flanked by the basic amino acid cluster, NCp8-f1, and that of the C-terminal zinc finger flanked by the basic amino acid cluster, NCp8-f2, have been determined. The structure-function relationships will be discussed on the basis of comparison of the structures of NCp8-f1 and NCp8-f2 with those of HIV-1 NC protein and other NC proteins.



HIV-2, ヌクレオキャプシドタンパク質, zinc finger motif, 立体構造

こでらよしお, ながいみさ, ひらやまこうじ, こまつひろよし, まえだただかず, さとうかずき, こうのとしゆき

HIV のヌクレオキャプシドタンパク質 (NC タンパク質) はウイルス RNA の二量体形成を促し, その二量体 RNA を新しいウイルス粒子内にパッケージングする. ウイルス増殖に必要な不可欠なタンパク質である.

図に HIV-2 の NC タンパク質 (NCp8) と HIV-1 の NC タンパク質 (NCp7) のアミノ酸配列を示す. 一次構造上の相同性は約 65 % である. また, 両方とも 14 残基からなる zinc finger motif (ZFM) を 2 つ持ち, N 端側の ZFM と C 端側の ZFM は塩基性アミノ酸に富む 7 残基のアミノ酸 (linker 領域) でつながれている. この linker 領域は NC タンパク質の機能発現にとって重要であることが様々な生化学的な研究によって明らかにされている [1]. NCp7 およびその部分ペプチドの立体構造は既に NMR によって決定されて, 今までに約 10 件の論文で構造機能相関について議論されている [2,3]. にもかかわらず, NC タンパク質がウイルス RNA を認識して結合するメカニズムは明らかにされていない. 当研究ではこの状況を打開するために, HIV-2 のヌクレオキャプシドタンパク質 (NCp8) に注目して研究を進めている.

NCp8, NCp7 の一次構造, 二次構造上の相同性は高い. にもかかわらず機能面において違いがある [4]. 我々は, この違いを立体構造の観点から説明することが NCp7, NCp8 双方のウイルス RNA 認識機構解明につながると考えている.

昨年, NCp8 の N 端側 ZFM と linker 領域を含む 29 アミノ酸残基の部分ペプチド (NCp8-f1: ウイルス RNA を認識する最小の構造単位) の立体構造と機能の関係について論文に発表した [5]. 現在は, linker 領域と C 端側 ZFM を含む 27 アミノ酸残基の部分ペプチド (NCp8-f2) の詳細な立体構造と機能の関係について考察している. NCp8-f2 は NCp7 の相当領域と機能面において違いがある [4] ため, 非常に興味深い部分である.

討論会では, NCp8-f2 と NCp8-f1 の立体構造を NCp7 および他のレトロウイルスの NC タンパク質の立体構造と比較して, NC タンパク質の構造機能相関について議論する.

- [1] J. L. Darlix, M. Lapadat-Tapolsky, H. De Rocquigny and B. P. Roques (1995) *J. Mol. Biol.* 254, 523-537.
- [2] M. F. Summers, T. L. South, B. Kim and D. R. Hare (1990) *Biochemistry* 29, 329-340.
- [3] R. N. De Guzman, Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borer, and M. F. Summers (1998) *Science* 279, 384-388.
- [4] H. Komatsu, T. Tsukahara and H. Tozawa (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38, 1143-54.
- [5] Y. Kodera, K. Sato, T. Tsukahara, H. Komatsu, T. Maeda and T. Kohno (1998) *Biochemistry* 37, 17704-17713.

(北 大 院 ・ 理 ¹、 札 医 ・ 保 健 医 療 ²)

○吉田均 ¹、熊木康裕 ¹、松嶋範男 ²、引地邦男 ¹、中田充夫

**Structural study of tandem repeat sequences within prion protein (PrP)
—NMR analysis of the model peptides**

○H. Yoshida¹, Y. Kumaki¹, N. Matsushima², K. Hikichi¹, M. Nakata¹

Division of Biological Sciences Graduate School of Science, Hokkaido University¹ and School of Health Sciences, Sapporo Medical University²

プリオン蛋白質(PrP)は主に脳・神経繊維で発現する約 200 残基からなる蛋白質である。この蛋白質の構造変化により生じる変異型蛋白質が、クロイツフェルト・ヤコブ病、スクレイピー、牛スポンジ状脳症などの致死性の脳症を引き起こすという仮説が提案され、広く受け入れられている。PrP 蛋白質の生体内での本来の機能についての研究は遅れていたが、1997 年に正常な PrP は銅イオンに結合し脳内での銅イオン濃度調整に関与している可能性が高いことが指摘された。PrP の N 末端側には 8 残基 PHGGGWGQ が 5 回繰り返したタンデムリピートが存在する。この配列のモデルペプチドに銅イオンが結合することが報告され、この領域が PrP の生理的機能を発現することが示唆されている。また、このタンデムリピート領域を含む PrP 全長の立体構造が、1997 年に K. Wuthrich らはマウス PrP、P. E. Wright らはハムスター PrP を用いて NMR 法により解析されている。しかし、タンデムリピート領域はピークの重なりにより距離情報や角度情報が現在まで得られていない。

タンデムリピート領域の構造をより詳細に明らかにすることは、銅イオンとの結合の機構等を理解する上で重要である。本研究の目的は、このタンデムリピート領域の構造を明らかにすることである。ピークの重なりによるピークの帰属のあいまさを解消するために、我々は 1 回及び 2 回単位配列を繰り返したモデルペプチドを作成した。さらに、立体構造の自由度を減少させることを期待して環状化ペプチドも作成した。鎖状および環状のペプチドを低温下で測定することにより安定な構造の形成を促進した。

NMR 測定は、JEOL α 500 および α 600 を用いて行った。DQF-COSY、TOCSY、NOESY を 278K で測定した。測定に用いた全ペプチドにおいて、PHGGGWGQ 単位配列由来のピークの完全帰属に成功した。278 から 313K にかけて TOCSY を測定し、アミド基のケミカルシフトの温度係数を得た。

ケミカルシフトの温度係数、NOE などの構造パラメーターから、GWGQ でターンを形成していることが示唆された。モデルペプチドから得られた構造情報をもとにプリオン蛋白質のタンデムリピートの構造を検討中である。

キーワード：プリオン、tandem repeat、立体構造

よしだ ひとし、くまき やすひろ、ひきち くにお、なかた みつお

P31

小麦胚芽レクチンと糖鎖との相互作用の解析

(工技院生命研¹・バリアンテクノロジーズジャパン²)

○金澤健治¹、石塚靖子¹、根本暢明²、根本直¹、中西洋志¹

Interactions between wheat germ lectin and sugar chains

(National Institute of Bioscience and Human-Technology¹ and Varian Technologies Japan Ltd.²) Kenji Kanazawa, Yasuko Ishizuka, Nobuaki Nemoto, Tadashi Nemoto, and Hiroshi Nakanishi

In order to clarify the interactions between wheat germ lectin (WGA) and N,N'-diacetylchitobiose (GlcNAc)₂ in an aqueous solution we measured T_{1ρ} filtered transferred-NOE (TRNOE) spectra of solution containing both WGA and (GlcNAc)₂. We observed some TRNOE crosspeaks among proton pairs of (GlcNAc)₂. These crosspeaks are too weak to observe without WGA, whereas we observed such stronger crosspeaks in the presence of WGA. These results indicate that (GlcNAc)₂ interacts with WGA somehow and is in chemical exchange between the states free from WGA and bound to WGA.

水溶液中での小麦胚芽レクチン(WGA)と糖鎖との相互作用を研究するため、WGA-N,N ジアセチルキトビオース混合溶液の2次元 T_{1ρ} filtered transferred-NOE (TRNOE) スペクトルを測定した¹⁾。その結果、次のような N,N'-ジアセチルキトビオース分子内の TRNOE ピークが観測された；(1) 同一残基内のアセトアミド基のメチルプロトンとピラノース環2位のメチンプロトンとのクロスピーク及び(2) 非還元末端のアセトアミド基のメチルプロトンと還元末端6位のメチレンプロトンとのクロスピーク。これらのクロスピークは N,N'-ジアセチルキトビオース単独の場合には、強度が極端に弱く、ほとんど認められない。従って、WGA と N,N'-ジアセチルキトビオースとの混合物において上記の TRNOE クロスピークが観測されることから、両者は何らかの相互作用をしていることがわかる。WGA-N, N'ジアセチルキトビオースコンプレックス中の糖鎖の立体構造については、現在、さらに検討を行っている。

1) T. Scherf and J. Anglister, *Biophys. J.*, **64**, 754-761(1993).

キーワード：レクチン、糖鎖、相互作用、TRNOE

かなざわ けんじ、いしずか やすこ、ねもと のぶあき、ねもと ただし、なかにし ひろし

Musashi1 タンパク質の 2 つの RNA 結合ドメインの構造・運動性・相互作用残基と RNA 結合能との関連 (横浜国大・工¹、阪大・医²)

○小林央典¹、渡邊道直¹、菅野玲介¹、永田崇¹、佐伯純一¹、栗原靖之¹、今井貴雄²、榊原伸一²、岡野栄之²、上杉晴一¹、片平正人¹

Structure, dynamics and binding activity of neural RNA-binding protein, Musashi1
Hisanori Kobayashi¹, Michinao Watanabe¹, Reisuke Kanno¹, Takashi Nagata¹, Jun-ichi Saeki¹, Yasuyuki Kurihara¹, Takao Imai², Shinichi Sakakibara², Hideyuki Okano², Seiichi Uesugi¹ and Masato Katahira¹ (¹Department of Chemistry and Biotechnology, Yokohama National University, ²Osaka University Medical School)

Musashi1 is abundantly expressed in the developing mouse central nervous system and its involvement in asymmetric cell division is suggested. Musashi1 has two RNP-type RNA-binding domains (RBD1 and RBD2) and specifically binds to rG/AUU(U)AGU sequence. RBD1 binds to the target RNA much more strongly than RBD2. We have determined the structure of both RBDs. Interactions of both RBDs with the target RNA have been examined by chemical shift perturbation method. Dynamics of both RBDs has also been analyzed. On the basis of these results, the origin of the difference in affinity to the target RNA is discussed in terms of both structural and dynamical aspects.

(序) Musashi1 は神経系に特異的な RNA 結合タンパク質で、細胞の非対称分裂に関与し、神経細胞の分化を制御していると考えられている。Musashi1 はタンデムに連なった 2 つのリボ核蛋白質(RNP)型の RNA 結合ドメイン(RBD1 及び RBD2)を有している。Selex 法により、Musashi1 の標的 RNA 配列が得られている。ゲルシフトの実験によると、RBD1 は標的 RNA 配列に強く結合するが、RBD2 は結合しない。また、2 つのドメインを連結すると、結合能は RBD1 単独の時より 100 倍上昇する。我々はこれまでに RBD2 の立体構造及び標的 RNA との相互作用様式について報告してきた¹⁾。今回は RBD1 の立体構造及び標的 RNA との相互作用様式について報告する。また RBD1 及び RBD2 の運動性の解析についても報告する。そして RBD1 と RBD2 の結合能の差を、立体構造、相互作用様式及び運動性の面から考察する。

(方法) ¹⁵N 標識した RBD1 及び RBD2 は、発現量を増加させるためにビタミン及び金属を加えた培地を用いて発現させ、各種カラムクロマトグラフィーにより精製して得た。NMR スペクトルは Bruker 社 DRX600 を用いて測定した。

(結果と考察) RBD2 に比べると RBD1 は共鳴線がブロードで、又オーバーラップも激しい為帰属が困難であったが、様々な温度で測定を行う事でこの点を克服した。距離及び内部回転角 (ϕ 、

キーワード：RNA 結合タンパク質、構造、運動性、相互作用、Musashi1

こばやしひさのり、わたなべみちなお、かんのれいすけ、ながたたくし、さえきじゅんいち、くりはらやすゆき、いまたかお、さかきばらしんいち、おかのひでゆき、うえずぎせいいち、かたひらまさと

χ_1) 情報に基づき、X-PLOR を用いて RBD1 の構造を決定した。RBD1 の構造は RBD2 と同様に、4 本の鎖からなる反平行 β シートを 2 つの α ヘリックスが裏打ちした、RNP 型 RNA 結合ドメインに特徴的なものであった。但し RBD2 においては、 β シートのねじれが浅く、シートが平面的であった (Fig. 1)。RBD1, RBD2 共に β シート上には 3 つの Phe 残基からなる疎水パッチが、溶媒側に突き出るように形成されており、RNA とのスタッキング相互作用が可能な配置をとっていた。

次に両ドメインと標的 RNA (r(GUUAGUUAGUUAGUU)) との相互作用を、ケミカルシフトパータベーションにより調べた (Fig. 2)。今回の NMR の測定条件下 (高濃度のタンパク質及び RNA, 低イオン強度、界面活性剤非存在) では、RBD1 のみならず RBD2 に関しても標的 RNA との相互作用が検出できた。この様に NMR 法は弱い相互作用のキャラクタリゼーションにも有効であると考えられる。パータベーションは主に β シート側の面 (β シート、ループ及び C 末) に見られたが、ヘリックスの一部にも見られた。疎水パッチを形成する 3 つの Phe 残基のパータベーションを、両ドメイン間で比較したところ、差が見られた (図 2)。この差は両ドメインの結合能の差を反映していて、RBD2 においては、 β シートのねじれが浅い為、疎水パッチ中の Phe 残基と RNA 塩基のスタッキング相互作用に支障をきたしている可能性がある。

両ドメインの ^{15}N T_1 , T_2 及び ^1H - ^{15}N NOE の解析より、RBD1 に関しては若干量の 2 量体が形成されていることが示唆された。今回用いた標的 RNA は、配列中に結合部位を 2 ないし 3 個有している。2 量化した RBD1 は RNA と 2 ヲ所で相互作用し得るが、単量体としてしか存在しない RBD2 は 1 ヲ所でしか相互作用できない。この事も結合能の差をもたらしている可能性がある。

1) Nagata, T., Kanno, R., Saeki, J., Kurihara, Y., Uesugi, S., Imai, T., Sakakibara, S., Okano, H., and Katahira, M. *J. Mol. Biol.*, 287, 315-330 (1999)

Fig. 1 Structure of RBD2

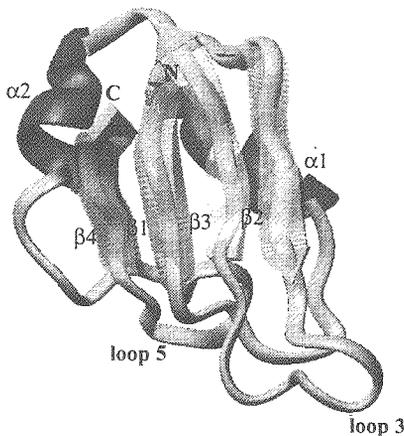
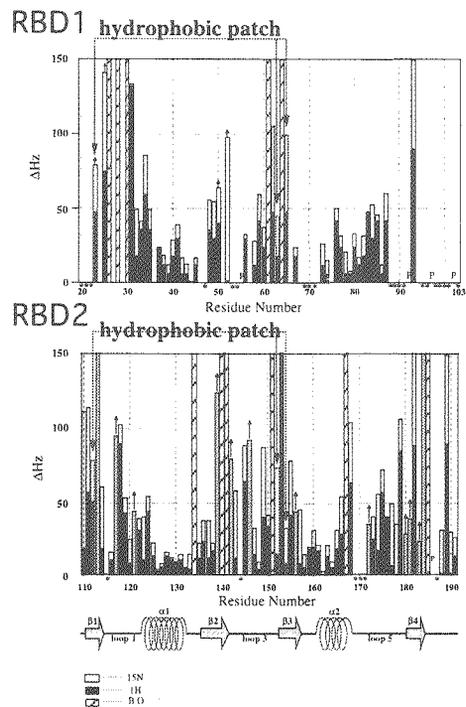


Fig. 2 Chemical shift perturbations on binding to r(GUUAGUUAGUUAGUU)



(東和大学1、福山大学2、日本電子データム3、日本電子4、広島大学5)

○加藤祐子¹、太田雅也²、宗像達夫¹、藤原正子³、藤井直之⁴、
重田征子⁵、松浦史登²

Study of 3D-structure of the H-antigen Pentasaccharide of the Sea-Squart

Tohwa University¹, Fukuyama University², JEOL Datum Ltd³, JEOL Ltd⁴, Hiroshima University⁵

Yuko Kato¹, Masaya Ohta², Tastuo Munakata¹, Masako Fujiwara³, Naoyuki Fujii⁴,

Seiko Shigeta⁵, Fumito Matsuur²

Repeated inhalation of the sprayed particles from the sea-squart, which adheres to oyster shells has been shown to trigger bronchial asthma. It has also been demonstrated both clinically and immunologically to be a typical allergen for allergosis.

In the present study, we attempted to determine the 3D-structure of the antigen pentasaccharide, using HOHAHA, TOCSY, HMQC, NOESY-HOHAHA and ROESY. After accurately determining the conformation of the free antigen pentasaccharide, the binding structure of the antigen to monoclonal antibody could be elucidated by methods such as 2D-NMR Transferred-NOE, in order to clarify the process of molecular recognition between the antigen and antibody.

カキ殻に着生する海洋生物ホヤは、その体液飛沫を繰り返し吸入することで、気管支喘息を惹起する典型的なアレルギー症のアレルゲンであることが臨床学的、免疫学的に明らかにされている。太田らはホヤ喘息の抗原決定基が抗原である糖タンパク質の糖鎖上にあること、更にある特定の糖鎖構造がエピトープとして機能していると考え、白ホヤの4種の抗原の中の1つである H-抗原から、アレルゲン活性を持つ7種類のオリゴ糖鎖を決定した(Ref. 1)。

今回我々は、活性糖鎖が抗体と結合してその機能を発現する際に、糖鎖の立体構造が抗体と induced fit するのか、更にエピトープであるオリゴ糖鎖が、抗体をどの様に分子認識してアレルゲンとしてその機能を発現するのかを解明するために、このホヤ H-抗原は絶好のモデル系と考えた。

HPG-β2-N5a: GalNAc² α1-2Fuc³ α1-3 (GalNAc⁴ β1-4) GlcNAc³ β1-3GalNAc-ol

この Pentasaccharide の立体構造を明らかにするために、1D-HOHAHA, TOCSY, HMQC を、更に分子量が 1000 近くなので ROESY から NOE 情報を得た結果、5糖の単糖の分子間に Fig.1 の様な特徴のある NOE 相関がみられた。なお 3.9 - 4.0 ppm にプロトン 6 個の重なりがあるので、更に NOESY-HOHAHA から assignment の補完を行っている (Ref. 2)。また、単糖分子間の水素結合を調べる。この糖鎖の立体構造は Fig.1 に示す様に、O-glycosidic linkage が 2 個のα結合と 2 個のβ結合から成るリンケージであり、更に、O-glycosidic linkage の dihedral angle, φ, ψ が -180

TOCSY, ROESY, TR-NOE, Allergenic Pentasaccharide, DADAS90 calculation

かとうゆうこ、おおたまさや、むなかたたつお、ふじわらまさこ、ふじいなおゆき、
まつうらふみと、しげたせいこ

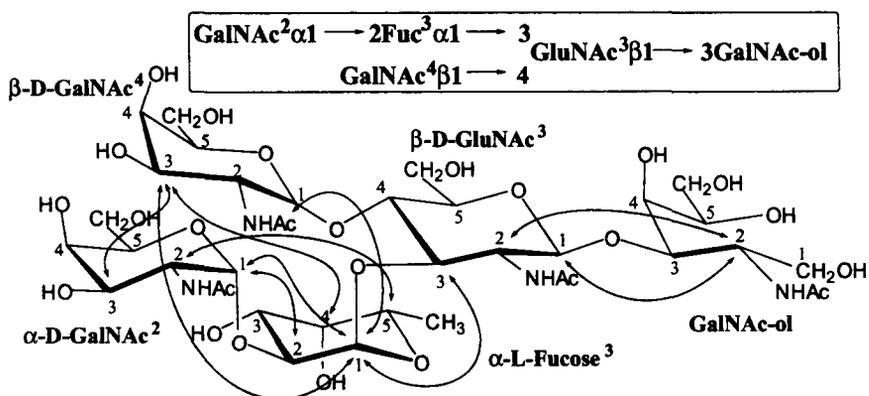


Fig.1 Key ROESY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$) correlations for establishing the 3D structure for HPG- β 2-N5a

~ 180° 回転可能である(Ref. 3)ことを考えると、この 5 糖鎖の立体構造は積層構造をとっていることが示唆された。そこで NOE の距離情報をもとに DADAS90 program(EGMol) で NOE の constrain と van der Waals repulsion から計算をおこなったところ、Fig.2 の様な、Fucose と GalNAc⁴ の 2 糖が積層構造をとり、GalNAc² と Fuc³ は dihedral angle が約 90° 異なる 2 種類の構造がみられた。これについては、活性との相関を含めて現在検討中である。

この積層立体構造は抗原が抗体 (2 分子の IgE) に架橋して結合する過程において、抗体のポケットと結合しやすい重要な機能をもつものと考え、抗原-抗体間のエピトープの分子認識状態を解明する目的から、作製中のモノクローナル抗体と HPG- β 2-N5a 抗原との結合状態を Transferred-NOE で研究していく(Ref. 4)。

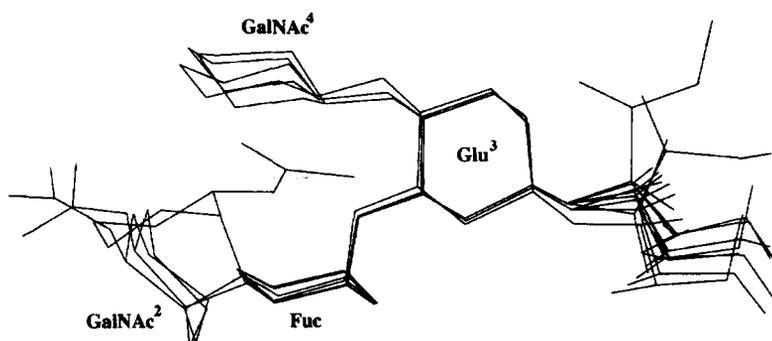


Fig.2 Superposed 10 structures calculated from DADAS 90 for HPG- β 2-N5a

[謝辞] サントリー生物有機化学研究所の岩下孝博士には NMR 測定および貴重なご意見をいただきましたことを、深謝致します。

1. Ohta, M., Shigeta, S., Ono, K., Takao, T., Shimonishi, Y., and Oka, S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1989**, 275, 151-165
2. Uhrfn, D., Brisson, J. R., et al. *J. Magn. Reson.* **1994**, 104, 289-293
3. Milton, M. J., and Bundle, D. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 10547-10548
4. Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 27, 133-143

(都立大・理¹、青学大・理工²) ○狩谷 英里¹、須田 真輔¹、
楯 真一¹、梶 裕之¹、鮫島 達也²、甲斐荘 正恒¹

Solution structure and function of a cystatinA variant, G4V

Department of Chemistry, Faculty of Science
Tokyo Metropolitan University¹
Aoyama Gakuin University²

Eri Kariya¹, Shinsuke Suda¹, Shin-ichi Tate¹, Hiroyuki Kaji¹,
Tatsuya Samejima², and Masatsune Kainosho¹

CystatinA has been known for years to inhibit cysteine proteinases, such as papain, by forming tight but reversible complexes. Although there have been many structural works on cystatinA and related inhibitors, both free and complexed states, by X-ray and NMR, the molecular details of the inhibitory activities, however, are still very controversial. It is especially true for the role of the N-terminal segments of these inhibitors. We found a single amino acid variant, G4V, completely lost its inhibitory activity, but there has been no clear explanations for the result. Here, we have determined the solution structure of G4V cystatinA by NMR and compared it with the wild type cystatinA. Overall structures are similar to each other, yet some notable differences have been observed for the first binding loop of cystatinA. Discussion will be made for the possible consequences of the structural change on the inhibitory activity.

CystatinA はアミノ酸98残基からなるシステインプロテアーゼ阻害蛋白質である。cystatin superfamily と呼ばれる1群のシステインプロテアーゼ阻害蛋白質の family1 に属しており、パpainなどのシステインプロテアーゼと可逆的に複合体を形成することによりその活性を阻害することが知られている。しかしながらその詳しい阻害機構はいまだ分かっておらず、過去に行われた様々な生化学的な実験データからは統一的な説明ができない状況にある。

G4V CystatinA、システインプロテアーゼインヒビター、NMR、立体構造

かりや えり、すだ しんすけ、たて しんいち、かじ ひろゆき、
さめじま たつや、かいのしょう まさつね

本研究では、cystatinA の中で cystatin superfamily における保存アミノ酸となっている Gly4 を Val にアミノ酸置換することにより活性を失わせた G4V 変異体 CystatinA の NMR による立体構造解析を行った。これを野生型 cystatinA の立体構造と比較することにより、cystatinA の阻害活性の機構に関するより詳しい知見が得られるものと期待される。

G4V 変異体 cystatinA の立体構造決定は均一同位体標識体を試料とする通常の多次元 NMR 法を用いて行った。最終的に 1803 個の距離情報と 93 個の 2 面角情報により得られた立体構造を、同様の解析により精密化した野生型の構造と共に下に示す。これより両者間で全体的な構造変化はみられなかったが、アミノ酸変異を導入した N 末端の部分、及びその他の保存配列周辺にも細かな違いが見られた。このような立体構造の変化が阻害機構にどのように関わってくるのか、議論を進めてゆく予定である。



left; the 22 converged backbone structure of cystatinA wild type. right; the 30 converged backbone structure of cystatinA variant, G4V.

P35

システインプロテアーゼ阻害蛋白質 CystatinA の P25S 変異体の立体構造解析

— α ヘリックスに存在する Pro 残基の役割について—

(都立大・理¹、青学大・理工²) ○ 榛葉信久¹、楯真一¹、狩谷英里¹、
須田真輔¹、梶裕之¹、鮫島達也²、甲斐荘正恒¹

Three dimensional structure of cystatin A variant, P25S. - a role for the Pro residue in the middle of an α helix -

Nobuhisa Shimba, Shin-ichi Tate, Eri Kariya, Shinsuke Suda, Hiroyuki Kaji,
Tatsuya Samejima and Masatsune Kainosho

Department of Chemistry, Faculty of Science
Tokyo Metropolitan University
Aoyama Gakuin University

Abstract : The solution structure of a human cystatin A mutant P25S was determined by 2D/3D heteronuclear double- and triple-resonance NMR spectroscopy. The structure is based on a total of 1961 experimental restraints, comprising 1813 distance, 90 ϕ and χ_1 torsion angle restraints, and 58 distance constraints for 29 backbone hydrogen bonds. A total of 42 structures was calculated with X-PLOR, and the atomic rmsd distribution about the mean coordinate positions for residues 10-90 was $0.36 \pm 0.08 \text{ \AA}$ for the backbone atoms and $0.79 \pm 0.08 \text{ \AA}$ for all heavy atoms. The overall structure of cystatin A variant, P25S is compared with the wild-type cystatin A and reveals that the continuous single α helix with a slight kink is retained in spite of the exclusion of the Pro residue known as a helix breaker.

cystatinA はアミノ酸 98 残基からなるシステインプロテアーゼ阻害蛋白質である。野生型 cystatinA の立体構造はすでに報告されており、 α ヘリックスの真中に位置する Pro 残基を境に α ヘリックスが緩やかに湾曲していることが明らかになっている。Pro 残基の特徴としてヘリックスブレイカーとして働くことが知られているが、必ずしも Pro 残基の存在がヘリックスの折れ曲がりに結びつかず、その役割について統一された見解が得られていない。そこで、本研究では、 α ヘリックスに位置している Pro 残基を Ser へと置換した変異体の構造解析を行うことにより、cystatinA の α ヘリックスに存在する Pro 残基の役割を明らかにすることを目的とした。

安定同位体標識した P25S 変異体の立体構造を 1871 個の距離情報と 90 個の 2 面角情報をもとに決定し、野生型と比較した。その結果、 α ヘリックスの真中に存在する Pro 残基を Ser へと置換しても湾曲が抑制できないことが判明した。cyatatinA では、広範囲にわたる相互作用によって α ヘリックスの湾曲が規定されていることが示された。

キーワード：多次元 NMR、蛋白質、立体構造

しんばのぶひさ、たてしんいち、かりやえり、すだしんすけ、かじひろゆき、さめじまたつや、かみのしょうまさつね

(東大・院薬系) ○坂倉正義、榛葉信久、高橋栄夫、(生物工研) 藤井郁雄、(東大・院薬系) 嶋田一夫

NMR study of structural analysis of catalytic antibodies 6D9 and 9C10

○M. Sakakura¹⁾, N. Shimba¹⁾, H. Takahashi¹⁾, I. Fujii²⁾, and I. Shimada¹⁾

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo¹⁾, BERT²⁾

Antibodies 6D9 and 9C10 are catalytic antibodies that activate a prodrug of antibiotic (chloramphenicol monoester) to generate the active drug (chloramphenicol) by catalyzing the hydrolysis of the ester bond. From the results of enzymatic and biological studies for 6D9 and 9C10, it has been indicated that 1) the difference between the affinity for the transition state analogue (chloramphenicol phosphonate) and that of the substrate can explain the catalytic activities for both antibodies, 2) the catalytic activity of 6D9 is 16 times higher than that of 9C10 in spite of the fact that both antibodies exhibit a high sequence homology. In the present paper, we report a NMR study of the ligand binding sites of 6D9 and 9C10. On the basis of the NMR data obtained, we discuss the differences in their structures and catalytic activities.

【序】触媒抗体6D9および9C10は、遷移状態アナログ(TSA)であるChloramphenicol Phosphonateを抗原として得られた抗体であり、Chloramphenicol Monoester (以下基質と呼ぶ) からChloramphenicol への加水分解活性をもつ。これまでの研究により、以下のことが明らかにされている。(1) 両触媒抗体による反応加速は、TSA に対する親和力と基質に対する親和力の差により生じている。(2) 両抗体のアミノ酸1次配列の相同性が高いにもかかわらず、6D9の触媒活性は9C10の触媒活性より16倍高い。(3) 部位特異変異実験により、6D9、9C10の両抗体において保存されているHis27d(L)は、6D9の触媒活性の発現に重要である。(4) 6D9-TSA複合体の結晶構造において、6D9のHis27d(L)がTSAのリン酸エステル基に近接している。以上の結果をふまえて、本研究では、より高い活性を持った触媒抗体をタンパク質工学的に創成することを目指し、6D9、9C10の、TSAと基質の間の化学構造的および立体構造的相異に対する認識機構をNMRにより解析した。

【結果・考察】

[I] 6D9と9C10のリガンド結合様式の解析

6D9、9C10の主鎖アミド窒素に安定同位体標識を行い、リガンド(TSA、基質)結合に伴うNMRシグナルの変化を解析した。この結果、9C10のリガンド結合部位は6D9と同じ領域であることが明らかとなった。また、6D9、9C10に結合した状態のTSA、基質のNOE情報を解析した結果、

6D9 結合状態の TSA で観測される 4-((trifluoroacetyl)amino) phenyl 環と nitrophenyl 環の間の NOE が 6D9-基質, 9C10-TSA, 9C10-基質複合体においても観測された。これらの結果から、6D9, 9C10 のリガンド結合様式は、結晶構造により明らかとなった 6D9-TSA の結合様式とほぼ一致すると考えた。

[II] His27d(L)の活性発現における役割

結晶構造および本 NMR 実験 [I] の結果から、9C10 の His27d(L) も、活性発現部位に存在していることが考えられる。そこで、His27d(L) とリガンドの相互作用を明らかにするために、TSA および基質存在下における 6D9, 9C10 の His 側鎖 NH シグナルの観測を試みた。6D9 については TSA 複合体においてのみ His27d(L) の側鎖 NH シグナルが観測され、TSA 存在下において His27d(L) の側鎖 NH と TSA のリン酸基との間で水素結合が形成されることが明らかとなった。一方、9C10 においては、TSA 存在下においても、側鎖 NH シグナルは観測されず、His27d(L) による水素結合は確認されなかった。

[III] TSA と基質の立体構造の差に対する認識機構の解析

リン酸エステル基のリン原子とエステル基のカルボニル炭素原子は電子軌道が異なる。従って、TSA と基質は抗体結合状態において芳香環の相対配置が異なることが予想される。このような TSA と基質の立体構造の差に対する 6D9, 9C10 の認識機構を明らかにするため、抗体結合状態の TSA の芳香族プロトンに着目して NMR 解析を行った。9C10 結合状態において、TSA の 4-((trifluoroacetyl)amino) phenyl 環由来のシグナルの広幅化が観測されたが、nitrophenyl 環由来のシグナルでは観測されなかった。一方、6D9 結合状態においては TSA の 2 個の芳香環由来のシグナルの広幅化が観測された。芳香環由来のシグナルの広幅化は、芳香環の回転運動が周囲の残基との強固な相互作用によって抑制されたことを示す。この結果から、9C10 は nitrophenyl 基に対する認識が弱く、TSA と基質の立体構造の差を識別できないと考えられる。これに対して 6D9 はリガンド結合部位に存在する芳香族アミノ酸残基によって TSA の 2 個の芳香環を強固に認識することにより、TSA と基質の立体構造の差を識別すると考えられる。

【まとめ】 6D9 は His27d(L) と TSA のリン酸基間の水素結合によって、酸素原子の数、電荷等、化学構造が互いに異なる TSA と基質を識別する。9C10 においてはこのような認識様式は観測されなかった。また、6D9 はリガンドの 2 個の芳香環と強固な相互作用を形成することにより、TSA と基質の立体構造の差を識別する。9C10 では、nitrophenyl 基に対する相互作用が弱いため、TSA と基質の立体構造の差を認識できないと考えた。

触媒抗体、抗原認識部位、chloramphenicol、flip-flop

さかくら まさよし、しんば のぶひさ、たかはし ひでお、ふじい いくお、しまだ いちお

P37 VavのN末端側SH3ドメインは自己のプロリンに富む領域を結合している

(都臨床研¹、CREST/JST²、学習院大理³、北大院薬⁴)

○小椋賢治^{1,4}、永田宏次¹、堀内正隆^{1,2}、戎井悦子¹、湯澤 聡^{1,3}、
島中秀樹¹、稲垣冬彦^{1,2,4}

N-terminal SH3 domain of Vav binds its own proline-rich region

Kenji Ogura^{1,4}, Koji Nagata¹, Masataka Horiuchi^{1,2}, Etsuko Ebisui¹, Satoru Yuzawa^{1,3},
Hideki Hatanaka¹, and Fuyuhiko Inagaki^{1,2,4}
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science¹,
CREST/JST²,
Faculty of Science, Gakushuin University³,
and Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University⁴

An 845 amino acids polypeptide Vav, a product of *vav* oncogene is restrictively expressed in hematopoietic system. Vav comprises a number of domains which are characteristically observed in signal transducing proteins. The N-terminal SH3 domain of Vav (Vav/nSH3) has a proline-rich region (PRR), which may be a ligand to the C-terminal SH3 domain of Grb2.

Uniformly isotope-enriched Vav/nSH3 (78 residues) samples were prepared using *E.coli*. We found a *cis-trans* isomeric equilibrium at Pro33 residue. A [Pro33 → Gly] mutant protein (Vav/nSH3/P33G) was also prepared.

The solution structure of Vav/nSH3/P33G was determined using a series of triple resonance NMR experiments and simulated annealing calculation. An overall folding of Vav/nSH3/P33G was similar to other SH3 domains. We found that the PRR of Vav/nSH3/P33G located in the RT-loop was bound to its own PRR-binding sites. This result suggests that Vav/nSH3 acts as a switch for intra- or inter-molecular recognition.

Vavは血球系細胞にて発現する845アミノ酸からなる蛋白質であり、細胞内シグナル伝達系因子に特徴的なドメインを多く含んでいる。そのなかにはSrc homology-3 (SH3)ドメインが2個存在し、そのうちのN末端側SH3ドメイン (Vav/nSH3) は以下の2点の特徴を有する。(1)他のSH3ドメインと比較してアミノ酸相同性が低い(2)自分自身にプロリンに富む領域 (proline-rich region: PRR) を持ち、このPRR領域がGrb2蛋白質のC末端側SH3ドメインと結合できるといわれている。今回われわれはVav/nSH3のNMRによる立体構造決定をおこなったので報告する。

同位体ラベルVav/nSH3 (78残基) は大腸菌の大量発現系により生産した。得られた蛋白質を濃度1mMにて溶解し、NMR測定試料とした。Varian UNITY INOVA 500またはUNITYplus 600分光計を使用し、各種の多次元NMRスペクトルを測定し Vav、SH3、立体構造

おぐらけんじ、ながたこうじ、ほりうちまさたか、えびすいえつこ、ゆざわさとる、はたなかひでき、
いながきふゆひこ

た。NMRデータ処理には、NMRPipe、Felix95.0、および自家製ピークピック・相関検出プログラムを使用した。立体構造計算にはXPLOR3.1を使用した。

Vav/nSH3のNMRスペクトルを測定したところ、全アミノ酸残基のうち約1/3について信号が二重に観測された。このことは、この蛋白質が溶液中で構造二形を生じていることを意味する。4D NOESYスペクトル解析により、Pro33残基にシストランス異性化平衡があることがわかった。よって、Pro33をGlyに置換した変異体蛋白質 (Vav/nSH3/P33G) を作製し、以後のNMR測定試料とした。

Vav/nSH3/P33Gの立体構造を決定した (図1) ところ、この蛋白質は他のSH3と同様のフォールディングを形成していることがわかった。また、Vav/nSH3に特徴的なPRRはRT-loopの前半部に挿入されていることがわかった。さらに、そのPRRはVav/nSH3の分子表面と相互作用していた。その相互作用部位は、他のSH3ドメインにおいては標的蛋白質のPRRを結合するサイトのうち、サイト2およびサイト3に相当する位置であった (図2)。つまりVav/nSH3は自己のPRRを、PRR結合部位にて認識し、結合していることになる。この珍しい構造は、Vav/nSH3が必要に応じて自己のPRRを相手に受け渡すことによりシグナルを制御するスイッチの役割を担っている可能性を示唆し、Vav分子全体の機能を考えるうえで興味深い。

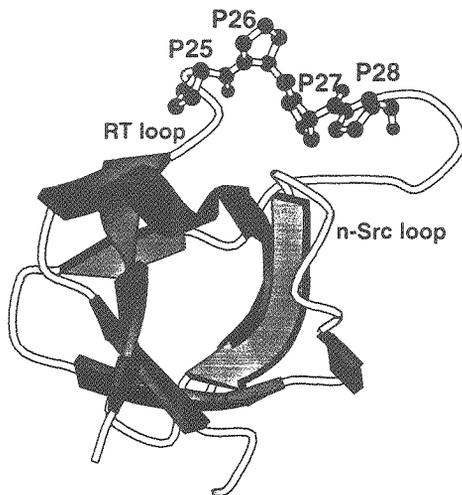


Fig.1 Solution structure of Vav/nSH3/P33G.
The PRR is shown by ball-and-stick model.

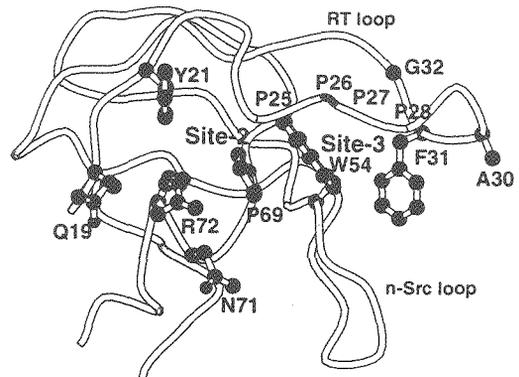


Fig.2 The PRR binding sites of Vav/nSH3/P33G.

P38

サイトカイン LECT2 のリフォールディングと NMR による高次構造解析

○伊藤三恵, 永田宏次¹, 加藤有介, 山越智², 鈴木和男², 田之倉優 (東大・院農生科・応生化,¹同・生物生産工学研究セ,²国立感染研・生物活性物質部)

Refolding and structural analysis of the cytokine LECT2

○Mie ITO, Koji NAGATA¹, Yusuke KATO, Satoshi YAMAGOE², Kazuo SUZUKI², Masaru TANOKURA (Dept. of Appl. Biol. Chem. and Biotechnol., ¹Biotechnol. Res. Ctr., Univ. of Tokyo, ²Dept. of Bioactive Molecules, NIH)

LECT2, leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (133 amino acids), is a chemotactic factor to neutrophils. In order to investigate the structural basis of the chemotactic activity of LECT2, we have prepared recombinant LECT2 and analyzed its structure by CD and NMR. Recombinant (His)₆-LECT2 was produced in *E. coli* as insoluble aggregates. It was refolded on Ni-NTA agarose and purified by column chromatographies. Then we overproduced ¹⁵N- and ¹³C/¹⁵N-labeled (His)₆-LECT2, measured its double- and triple-resonance NMR spectra and analyzed the NMR data. The backbone assignment is in progress. We will present the refolding method, CD and NMR spectral analysis, backbone assignment and secondary structure analysis.

[目的]

LECT2 は好中球走化性因子であり、ヒト好中球の機能を制御するタンパク質として造血器系腫瘍細胞株から単離精製され、遺伝子もクローニングされた。LECT2 はアミノ酸 133 残基、分子量約 16K の塩基性タンパク質で、肝臓に特異的に発現している。本研究は、LECT2 の立体構造に基づいて、その作用機構を解析することを目的としている。今回、(His)₆-LECT2 の、大腸菌を宿主とする大量発現系の構築、巻き戻し法の確立、CD および NMR スペクトルの解析を報告する。

[実験]

(His)₆-LECT2 の大量発現系の検討

LECT2 の N 末端に (His)₆-tag を付加し、これを T7 プロモーターを持つ pET-21(a) ベクターに挿入して発現プラスミドを作成した。生産された (His)₆-LECT2 はインクルージョンボディを形成し、大部分が不溶性となった。可溶性タンパク質として生産させるために、様々な培養条件の検討を行い、さらにチオレドキシシンや GroES/L との共発現、チオレドキシシン融合タンパクの発現系の有効性を検討した。

(His)₆-LECT2 の巻き戻し法の検討

不溶性タンパク質に 8 M 尿素を添加して可溶化し、透析法、希釈法、ゲル濾過カラム法、Ni-NTA-agarose カラム法による巻き戻しを検討した。巻き戻し後の精製は、逆相 HPLC、ゲル濾過クロマトグラフィーで行った。

再生 (His)₆-LECT2 の分析

再生 (His)₆-LECT2 の円二色性 (CD) スペクトル及び核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを、CHO 細胞から発現・精製した LECT2 のものと比較した。CD の測定は JASCO J-700、多核多次元 NMR の測定は、UNITY INOVA 500 分光計 (VARIAN) で測定し

NMR, サイトカイン, リフォールディング

いとう みえ, ながた こうじ, かとう ゆうすけ, やまごえ さとし,
すずき かずお, たのくら まさる

た (^1H - ^{15}N HSQC, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, HNCO 等) 。 NMR データの処理は NMRPipe / NMRDraw および P-ROI を用いて行った。

[結果と考察]

(His) $_6$ -LECT2 の大量発現系の構築を目指し、可溶性タンパクとして発現させるために様々な培養条件の検討や発現プラスミドの改良を試みたが、可溶性画分への発現の増加は見られなかった。そこで、不溶性画分からの可溶化、巻き戻しを試みた。検討の結果、Ni-NTA agarose カラム法で最も効率の良い巻き戻しに成功した。通常の巻き戻し法 (透析法、希釈法) では (His) $_6$ -LECT2 を効率良く巻き戻せなかった。しかし、Ni-NTA agarose 上に固定することで、巻き戻し過程のタンパク質間相互作用が減り、効率の良い巻き戻しに成功した。最小培地 1 リットルあたり約 1 mg 最終生成物として得ることができた。同様の方法で得た再生 (His) $_6$ -LECT2 の円二色性 (CD) スペクトル及び核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを、CHO 細胞から発現・精製した LECT2 のものと比較した。CD スペクトルは 230 nm に β 構造を示唆する特有の山を示すことで一致した (Fig.1)。

さらに、NMR スペクトル (^1H - ^1H NOESY) においても交差ピークの分布が一致したことから、大腸菌由来の (His) $_6$ -LECT2 は CHO 細胞由来の LECT2 と同じコンフォメーションを持つことが示された (Fig.2)。こうして確立した系を用いて、 ^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ で標識した再生 (His) $_6$ -LECT2 を調製し、3 核 3 次元 NMR の測定と解析を行っている。分離の良いスペクトルが得られており、現在、主鎖の帰属を進めている。

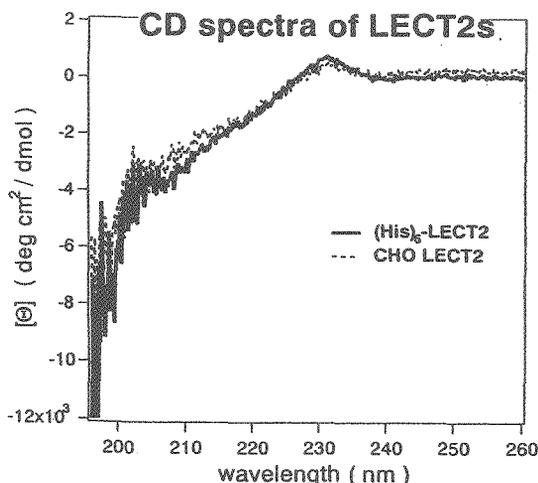


Fig. 1. Circular dichroism spectra of the LECT2 from CHO cells and the (His) $_6$ -LECT2 from *E. coli*.

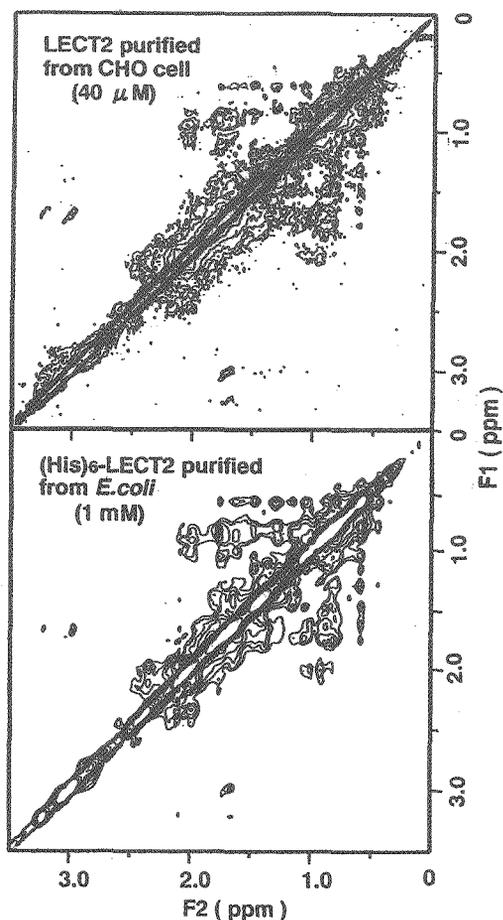


Fig. 2. NOESY spectra of the LECT2 from CHO cells and the (His) $_6$ -LECT2 from *E. coli*.

分子内水素結合をプローブとしたミオグロビンの高次構造変化の解析

(筑波大 化学系) ○竹元賢治、山本泰彦

Effects of heme-protein interaction on the folding of myoglobin

Kenji Takemoto and Yasuhiko Yamamoto

Department of Chemistry, University of Tsukuba

The folding of myoglobin can be studied on the basis of NMR spectral parameters for the signals arising from His imidazole NH protons located at the interfaces between B helix and GH corner and between EF corner and H helix. The studies on reconstituted myoglobins with a series of modified hemins have revealed that structure of EF-H interfaces is influenced by the modifications of the heme side-chains at 2 and 4 positions, whereas that of B-GH interface is essentially unaltered among the reconstituted proteins. The present study suggested the presence of a pathway which transmits structural alteration of the heme active site, induced upon the incorporation of modified hemins, to EF-H interface, that is at least 1.5nm away from the heme.

【序論】私共の研究室では、ミオグロビン(Mb)のBヘリックスとGHコーナー、EFコーナーとHヘリックスとの接触部分に存在しているHisB5 N_δH、HisGH1 N_εH及びHisEF5 N_εHプロトンに由来するシグナルをプローブとして、Mbの局所的な高次構造の研究を行っている¹⁻³⁾。これらのNHプロトンは、それぞれのインターフェースの構造を固定している分子内水素結合のプロトンドナーとなっている(Fig.1)ので、分子内水素結合を通して三次構造変化についての情報を得ることができる。本研究では、いくつかのヘムとの再構成Mbについて測定を行い、得られた結果をMbでの対応する実験結果と比較検討することにより、タンパク質に対するヘムの配向がこれらのインターフェースの構造に与える影響を明らかにした。

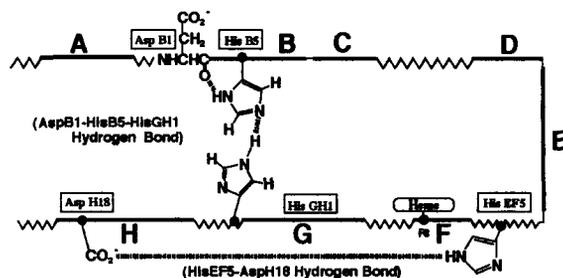


Fig. 1. Schematic representation of the AspB1-HisB5-HisGH1 and HisEF5-AspH18 hydrogen bonds in Mb. The A-H helices are represented by thick lines and the corners, non-helical regions, are indicated by zigzag lines. Internal hydrogen bonds are indicated by broken lines.

【実験】マッコウクジラMbは、市販のものをそのまま使用した。メトMbはMb粉末を水に溶解することにより得た。アポMbは、塩酸-2-ブタノン法により調製した。限外濾過によりタンパク質濃度を約1.0mMに濃縮後、溶媒を10%D₂Oとして、NMR試料とした。NMR測定はBruker社製AC-400Pにより行った。スペクトルは、Jump & Returnパルスを利用して観測した。

ミオグロビン、タンパク質のフォールディング、分子内水素結合、ヒスチジン、水素交換反応
たけもとけんじ、やまもとやすひこ

【結果・考察】メトMb及びアポMbの¹H-NMRスペクトルの低磁場領域には、化学交換性プロトン由来のシグナルが観測される(Fig.2)。NOE相関の観測から、これらのシグナルはB-GH、EF-Hインターフェースの分子内水素結合に關与するHis側鎖NHプロトンに帰属された。アポMbのHisEF5 N_εHのシグナルの線幅はメトMbのものより著しく増大している。この結果は、ヘムの除去によりEF-Hインターフェースの水素結合が弱くなっていることを示している。アポMbではFヘリックスが形成されていないことが示されている⁴⁾ことから、Fig.2の結果はヘムの有無がFヘリックスの形成を通してEF-Hインターフェースの構造に影響を及ぼしていることを示している。

再構成(Reconstituted)Mbのスペクトル(Fig.3)では、タンパク質に対するヘムの2つの配向(Fig.4)に由来するシグナルがGluC3 N_βH及びHisEF5 N_εHに観測された。これらのことから、Cヘリックス及びEF-Hインターフェースの構造はヘムの配向によって変化することが明らかとなった。Cヘリックスの構造変化は、GluC3の主鎖とHemeの4-ビニル基の直接的な相互作用により生じると考えられる。一方、活性部位の構造変化がEF-Hインターフェースの構造に影響を及ぼすということは、HisEF5とヘム鉄が1.5nm以上も離れていることを考慮すると、Mbにおいてもヘモグロビンのアロステリック効果に見られるような、タンパク質の活性部位とその他の部分との間に構造変化を介した情報伝達経路が存在することを示唆している。また、ヘミンの2,4-ビニル基がエチル基に置換されたメゾヘミンと再構成したMbのスペクトルでは、ヘムの2つの配向に由来するHisEF5のシグナルの化学シフトの差が約0.04ppmとなり、再構成Mbでの化学シフト差(約0.10ppm)よりも小さくなった。

さらに、この化学シフト差は、2, 4-位にプロトンをもつデューテロヘミンと再構成したMbのスペクトルでは検出されなかった。一方、B-GHインターフェースに存在するHisのシグナルの分裂は、いずれの再構成Mbにおいても観測されなかった。従って、Mbの活性部位の構造変化に対して、EF-Hインターフェースの構造はB-GHインターフェースよりも大きな影響を受けることが明らかとなった。

【参考文献】

1. Yamamoto, Y. *J. Biochem (Tokyo)*. **120**, 126-132 (1996).
2. Yamamoto, Y. *Eur. J. Biochem.* **243**, 292-298 (1997).
3. Yamamoto, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1343**, 59-66 (1997).
4. Hughson, F.M., Wright, P.E. & Baldwin, R.L. *Science* **249**, 1544-1548 (1990).

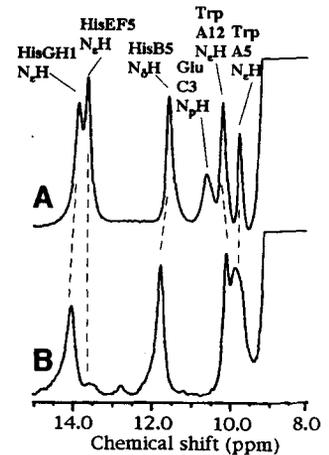


Fig. 2. The downfield portion of ¹H NMR spectra of (A) metMb, pH 9.76 and (B) apoMb, pH 9.56 in 90% H₂O/10% D₂O at 5°C.

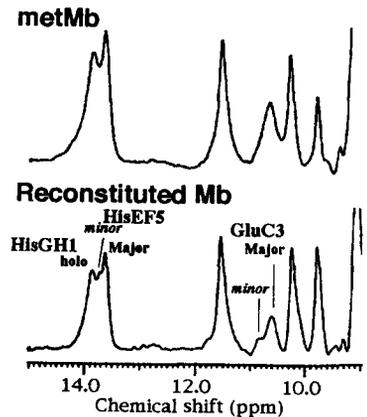


Fig. 3. The downfield portion of ¹H NMR spectra of metMb, pH 9.50 (upper) and Reconstituted Mb, pH 9.50 (lower) in 90% H₂O/10% D₂O at 5°C.

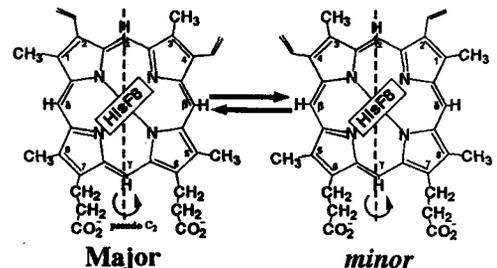


Fig. 4. Two different orientations of heme with respect to HisF8.

(筑波大化¹、長岡高専²) ○平井佑紀¹、山本泰彦¹、鈴木秋弘² **^{19}F NMR Study of Myoglobin Reconstituted with Ring-Fluorinated Hemins**Y. Hirai¹, Y. Yamamoto¹, and A. Suzuki²¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba²Dept. of Materials Eng., Nagaoka Coll. of Tech.

^{19}F NMR spectra of sperm whale myoglobin reconstituted with 2,3-difluoroheme in a variety of iron oxidation, spin, and ligation states have been observed. The C_2 symmetric nature of the electronic structure of the heme is largely distorted in the active site of myoglobin and hence two non-degenerated signals with the average shifts of -69.70, -31.79, 1.21, and 164.11 ppm are observed in the spectra of CO, CN^- , N_3^- , and deoxy forms of myoglobin, respectively. Thus, electronic nature of heme iron of myoglobin is sharply reflected in the shifts of the ^{19}F signals.

【序論】側鎖にフッ素をもつヘムを合成してアポタンパク質と再構成することにより、ミオグロビン(Mb)、ヘモグロビン(Hb)などのヘムタンパク質の活性部位の立体構造や電子構造を ^{19}F NMRにより解析することが可能となる^{1,2)}。この手法は、タンパク質における ^{19}F NMRの一般的な利点以外に、任意の構造のヘムをデザインしてタンパク質に組み込むことができる、活性部位であるヘム近傍の化学的環境を ^{19}F NMRで直接的に観測できる、などの特長をもつ。特に後者に関して、ヘム側鎖として導入したフッ素に由来するシグナルのシフト値が、ヘム鉄の磁氣的性質に依存して著しい影響を受けるため、 ^{19}F シグナルはヘムタンパク質の活性部位の構造化学的研究において鋭敏なプローブとなる。本研究では、Hbにおけるサブユニット間相互作用の ^{19}F NMRによる解析を念頭に置き、フッ素置換ヘム(図の右上参照)で再構成したマッコウクジラMbのNMRスペクトルをヘム鉄の様々な酸化状態、スピン状態、及び配位状態で観測した。

【実験】apoMbは塩酸-2-butanone法によりマッコウクジラMbより調製した。フッ素置換ヘムは0.1N NaOHに溶解させた。また、ヘミンとapoMbの当量はUV-VIS滴定により決定した。再構成反応は氷浴下でヘミン溶液をapoMbに滴下することにより行った。 N_3^- 体、 CN^- 体は、得られたmet型Mbに各配位子を加えることにより調製した。deoxy体、CO体は、それぞれmet型Mbに脱酸素及びCOのパブリングの処理を行ったのち、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ によりヘム鉄を還元することによって調製した。各Mbは限外濾過によって約1.5mMに濃縮し、磁場ロック用の D_2O を加えて測定用試料とした。 ^{19}F の化学シフトは298Kにおけるトリフルオロ酢酸のシグナルを基準として示してある。

【結果と考察】apoMbに2,3-difluoroheminを加えて得られた再構成Mbについて、さまざまな配位状態で観測された ^{19}F NMRスペクトルをモデル錯体のスペクトルとともに次ページに示す。

モデル錯体：Bis-CN体のスペクトル(C)では、分子構造の対称性から2位と3位のフッ素に由来するシグナルは重なって-18.06ppmに観測される。このシグナルのシフト値を絶対温度(T)の逆数に対し

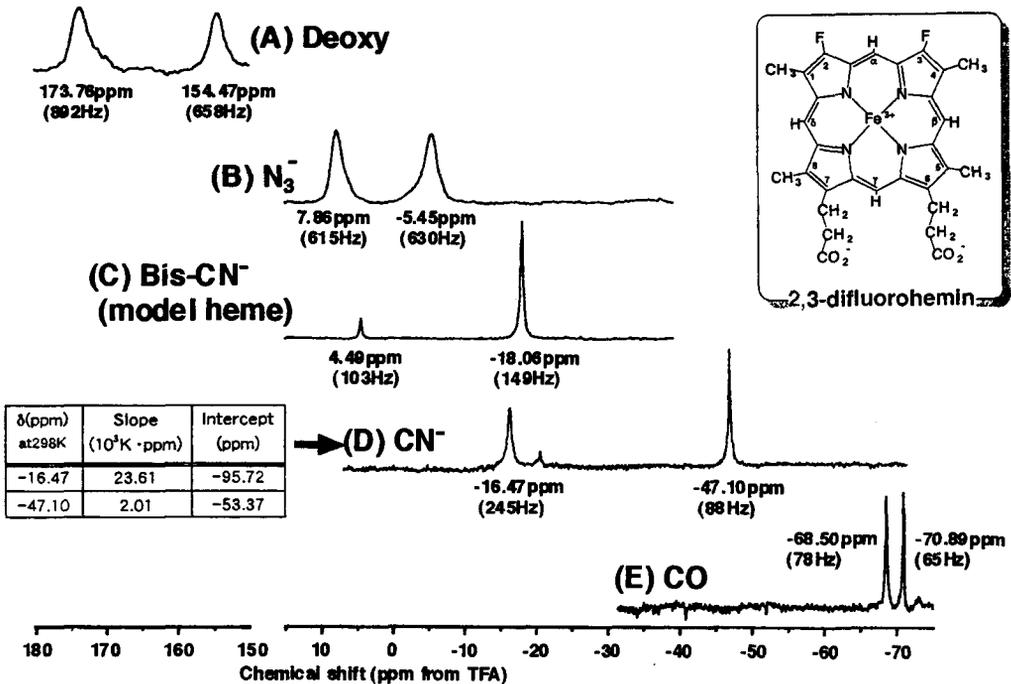
^{19}F NMR、ミオグロビン、常磁性シフト、フッ素置換ヘム、スピン平衡

ひらいゆうき、やまもとやすひこ、すずきあきひろ

てプロット(Curieプロット)し、 $1/T \rightarrow 0$ に外挿することによりy切片(-122.33ppm)が得られた。一般に、観測シフト(δ_{obs})=反磁性シフト(δ_{dia})+擬コンタクトシフト(δ_{pc})+コンタクトシフト(δ_c)と表される。ここで、 δ_c と δ_{pc} は共に $1/T \rightarrow 0$ で0になると考えられていることから、 $\delta_{\text{dia}} = -122.33\text{ppm}$ となる。また、モデル錯体の不對電子による双極子磁場を考慮して定式化されている $\delta_{\text{pc}} (=1.04 \times 10^{-27} (3\cos^2\theta - 1/r^3))$ に $\theta = 90^\circ$, $r = 5.64 \times 10^{-10}(\text{m})$ を代入することにより $\delta_{\text{pc}} = -5.8\text{ppm}$ が求まる。従って、ヘム鉄の不對電子の非局在化による δ_c は110.07ppmと求められる。なお、(C)で4.49ppmのシグナルは副生成物に由来するものと思われる。

フェリ型Mb : CN⁻体のスペクトル(D)とN₃⁻体のスペクトル(B)では、それぞれ2つのシグナルが観測された。(C)で重なっていた2位と3位のフッ素に由来するシグナルが異なる共鳴周波数に観測されるのは、タンパク質との相互作用によりヘムの電子構造のC₂対称性が低下するためである。(D)のシグナル帰属は、活性部位近傍に存在するアミノ酸残基プロトンシグナルを照射して観測される¹⁹F{¹H}NOEをもとに行い、(D)の低磁場側のシグナルが2位のフッ素、高磁場側のシグナルが3位のフッ素に由来することがわかった。また、2つのシグナルのシフト差は30.63ppmであり、ヘムの電子構造の対称性が大きく低下していることがわかる。2位と3位のフッ素の δ_c の差は、HisF8のイミダゾール環の配向から予想される不對電子密度の分布と一致している。(D)のそれぞれのシグナルのCurieプロットの結果を下図の左下に示す。安定な低スピン状態であるCN⁻体のプロットは直線となりCurie則に従ったが、N₃⁻体のプロットはanti-Curieの挙動を示した。この結果は、外部配位子の配位子場強度が中程度であるため、N₃⁻体がS=1/2とS=5/2のスピンの平衡の状態として存在することを反映している。

フェロ型Mb : deoxy体のスペクトル(A)では160ppm付近にシフト差約20ppmで2つのシグナルが観測された。CO体のスペクトル(E)の-70ppm付近に観測される2つのシグナルは、CN⁻体の δ_{dia} をもとに低磁場側のシグナルが3位のフッ素、高磁場側のシグナルが2位のフッ素に帰属された。



¹⁹F NMR spectra of Mb reconstituted with 2,3-difluorohemin. All FID were recorded at 298K. Values in (the parentheses) indicate linewidth.

【参考文献】

- 1) H. Toi, M. Homma, A. Suzuki, and H. Ogoshi, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 1791-1792 (1985).
- 2) A. Suzuki, T. Tomizawa, T. Hayashi, T. Mizutani, and H. Ogoshi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 2923-2933 (1996).

P41

メチル化DNA特異的リプレッサーPCM1のメチル化DNA結合ドメインの立体構造と相互作用

(¹奈良先端大・バイオサイエンス研究科、²熊本大・医学部腫瘍医学講座)

○大木 出¹、下竹 敦哉¹、藤田 直之²、中尾 光善²、白川 昌宏¹

Solution structure of the methyl-CpG-Binding domain of the methylation-dependent transcriptional repressor PCM1

(¹Grad. Sch. of Bio. Sci., Nara Inst. of Sci. and Tech., ²Sch. of Med., Kumamoto-Univ.) ○Izuru OHKI¹, Nobuya SHIMOTAKE¹, Naoyuki FUJITA², Mitsuyoshi NAKAO², Masahiro SHIRAKAWA¹

Mammalian DNA methylation at CpG sites correlates with gene silencing and alterations in chromatin structure. Both effects are the result of an interaction between the methylation sites and protein factors that contain shared methyl-CpG binding domains. We have studied the solution structure of the MBD of MBD1, a component of the methylation-dependent transcriptional repressor MeCP1 by means of multi-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. Interaction between the MBD and a methylated DNA was analysed by chemical shift perturbation experiments and site-directed mutagenesis.

ヒトPCM1/MBD1はジーンサイレンシングに関わるメチル化DNA特異的な転写抑制タンパク質であり、メチル化されたDNAを分子内のメチル化DNA結合ドメイン (MBD) によって認識する。MBDは他にメチル化特異的転写抑制タンパク質であるMeCP2、脱メチル化酵素MBD2、ミスマッチ修復に関与するMED1/MBD4などにみつかっており、他のDNA結合ドメインと配列相同性を持たない。今回、我々はPCM1 MBDの立体構造を多次元NMR法により決定したので報告する。

PCM1のMBDのNMRスペクトルは同種核および異種核多次元NMR法を用いてbruker社のDRX500、DRX800装置で測定した。これらのスペクトルの解析より得られた¹H核間の距離情報および角度情報をもとにXPLOR3.8による徐冷法計算をおこない立体構造を決定した。また得られた立体構造と、メチル化DNAの結合による化学シフト値変化の分布をもとに点変異体を作成し、ゲルシフトアッセイを用いてメチル化DNAとの結合を調べた。

計算により得られたPCM1 MBDは4鎖逆平行βシートとαヘリックスからなるα/β sandwich構造から成り、疎水コアを形成していた残基は全てのMBDファミリー間で保存されていた。また、MBD間で保存された塩基性の残基の多くはタンパク質の一表面に集まっており、メチル化DNAの結合による化学シフト値変化が大きかった領域と重なっていた。点変異体の実験からはMBDのメチル化DNAの結合に重要な5残基を特定することができた。発表では、これらの情報をもとに組み立てたMBDとメチル化DNAの相互作用モデルについて議論する予定である。

キーワード：多次元NMR、DNAのメチル化、メチル化DNA結合ドメイン、蛋白質-核酸相互作用、転写抑制因子

おおいずる、しもたけのぶや、ふじたなおゆき、なかおみつよし、しらかわまさひろ

東大・農¹、東大・生物生産工研セ²、バリアンジャパン³、海洋バイオテクノロジー研究所⁴、積水化学工業水無瀬研究所⁵

○鈴木倫太郎¹、永田宏次²、川上 将¹、根元暢明³、古谷昌弘^{4, 5}、足立恭子⁴、丸山正⁴、田之倉 優¹

Solution structure of FKBP from a thermophilic archaeum

¹Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, ²Biotechnology Research Center, University of Tokyo, ³Varian Technologies Japan LTD., ⁴Marine Biotechnology Institute Co. Ltd., ⁵Sekisui Chemical Co. Ltd., Minase Research Institute

R. Suzuki¹, K. Nagata², M. Kawakami¹, N. Nemoto³, M. Furutani^{4, 5}, K. Adachi⁴, T. Maruyama⁴, M. Tanokura¹

FK506 binding protein (FKBP), a member of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase family of proteins, catalyzes the isomerization of the Xaa-Pro peptide bonds. A number of crystal and solution structures of FKBP have been solved, but their sources have been restricted to mammals. FKBP from the thermophilic archaea have characteristic insertions in amino acid sequences and the functions of these insertions have been unknown. We are investigating the solution structure of FKBP from a thermophilic archaeum, *Methanococcus thermolithotrophicus*(MTFK). Multinuclear, multidimensional NMR techniques were applied to ascertain the solution structure of MTFK and the effects of temperature on the structure.

FK506 binding protein (FKBP)はペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ(PPIase)活性を有しており、Xaa-Proペプチド結合のシス-トランス異性化反応を触媒することでタンパク質のフォールディングを促進する。FKBPの立体構造はヒトなど哺乳類由来のものが解かれているが、真性細菌、古細菌のFKBPの構造は知られていない。好熱古細菌のFKBPには特徴的な挿入配列があり、耐熱性との関係が興味を持たれている。我々は好熱古細菌*M. thermolithotrophicus*のFKBP(MTFK)を用い、25℃と50℃でNMRによる構造解析および耐熱機構の解析を行っている。MTFKは154アミノ酸からなる約16 kDaのタンパク質である。大腸菌で¹⁵N-MTFKを大量発現、精製し、25℃および50℃での¹⁵N-HSQCスペクトルをVarian INOVA 500で測定したところ、温度による変化はほとんどなく、どちらもよく分離しており、高温と低温で構造に大きな変化が起きていないことが示唆された。ついで¹³C, ¹⁵N-MTFKを作成し、25℃で主鎖、側鎖の帰属のためのスペクトルをVarian INOVA 750を用いて測定した。データ処理にはNMRPipe/NMRDrawを、主鎖の帰属にはP-ROIを用いた。主鎖の化学シフトによる二次構造の予測(CSIおよびTALOS)および、NOEパターンから、ヒトのFKBP12と相同性のある部分についてはMTFKも同様の構造を持つことが確認された。また、2ヶ所の挿入配列についても二次構造が予測された。50℃での測定も行ったところ、測定開始から1週間後にはHSQCスペクトルに大きな変化が見られた。変化後のスペクトルは分離が悪く、MTFKは長時間の高温によって大きく立体構造が変化するものと考えられる。

三重共鳴NMR、タンパク質、構造解析、主鎖ダイナミクス

すずきりんたろう、ながたこうじ、かわかみまさる、ねもとのぶあき、ふるたにまさひろ、あだちきょうこ、まるやまただし、たのくらまさる

Automatic analysis of the NMR spectra of molecules dissolved in liquid crystals

 Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University
 Hiroshi Takeuchi and Shigehiro Konaka

A new method was proposed for the analysis of NMR spectra of molecules dissolved in liquid crystals. The use of integrated curves of NMR spectra reduced the number of local minima found in the analysis. Real-coded genetic algorithm was used to optimize spectral parameters. This method was successfully applied to the analysis of the spectra of benzene and biphenyl.

【序】液晶を溶媒とする NMR (液晶 NMR) では、吸収線の帰属を行ない、その周波数に対する最小自乗法により化学シフトと直接結合定数を決定する。しかし、スピンの数が増えると吸収線の数が増え、帰属が非常に困難になる。この点を克服する解析法として、吸収線の周波数に加え強度を用いることにより、吸収線を帰属しない解析 (自動解析) 法が報告されている。この解析法で化学シフトと直接結合定数を決定する場合、一般に多くの局所解が存在するため最適値を求めるのが困難である。本研究では、この点を克服する自動解析法を新たに開発し、その方法の有用性を検討した。

【解析方法】スペクトルの吸収強度を用いて、3重線の化学シフトを求める場合を考える。図 1 に、間接結合定数を 5 Hz として、実測と計算スペクトルの化学シフトの差 $\Delta\delta$ を変化させて R.M.S. エラーを計算した結果を実線で示す。吸収強度を用いると、R.M.S. エラーには 5 つの極小が存在する。そのため、化学シフトの初期値が最適値の近傍にないと、最適値を与えない。しかし、強度のかわりにその積分曲線を用いた解析を行なうと (図 1 の破線)、初期値が最適値から大きく離れていても、容易に最適値を求められる。後にベンゼンを例に、積分曲線を利用した自動解析の有効性を示す。

この積分強度に対する自動解析を行っても、後述するビフェニルのようにスペクトルの吸収線が多くなれば、スペクトルのパラメーターの初期値により、様々な局所解に収束する。この点を回避し、最適値を求めるために、遺伝的アルゴリズム (GA) によるパラメーターの最適値検索を併用した自動解析法を開発した。

【結果】

ベンゼン: 文献 [1] から ZLI 1132 中での直接結合定数を引用し、スペクトルを計算した (図 2)。これを実測スペクトルとみなし、積分曲線に対する最小自乗法で解析を行なった。解析の第 1 段階では、分子構造を固定し、配向パラメーター S_{zz} (z 軸はベンゼン

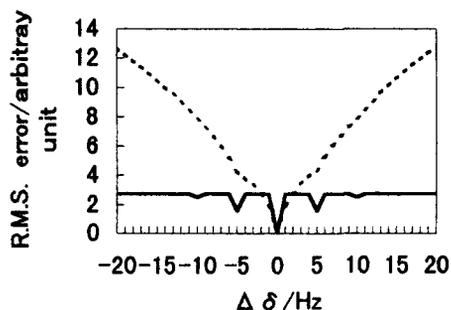


Fig.1. Plot of R.M.S. error against $\Delta\delta$:
 $\Delta\delta = \delta_{\text{obs.}} - \delta_{\text{calc.}}$

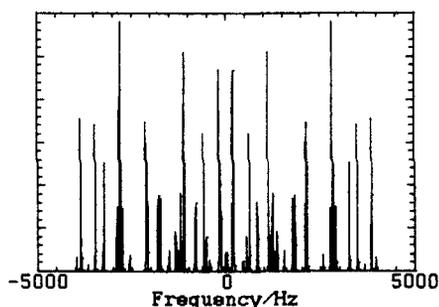


Fig.2. Synthetic $^1\text{H-NMR}$ spectrum of benzene.

液晶 NMR、直接結合定数、自動解析、遺伝的アルゴリズム

たけうち ひろし、こなか しげひろ

環に垂直)と化学シフト δ を最小自乗法により求めた。次に、 S_{zz} と分子構造から計算した直接結合定数 D_{ij} と δ をパラメーターとして解析を進めた。この結果、実測スペクトルを再現した。

ビフェニル(図3):ベンゼンと同様に、文献[2]の化学シフトと直接結合定数(表1)から、実測スペクトルを求めた(図4)。スペクトルを解析する際、化学シフトの初期値として、等方溶液中の値を用いた($\delta_1=0.0$ Hz, $\delta_2=-88$ Hz, $\delta_3=-134$ Hz)。また、ベンゼン環の間の二面角 ϕ は気相での値 44° を初期値にした。配向パラメーター S_{zz} 、 $S_{xx}-S_{yy}$ の初期値は、それぞれ0.3と0.2とした。初めに、これらのパラメーターを積分強度に対する最小自乗法により決定した(表1の解析1)。さらに、得られたパラメータの値を中心にして、二面角について $\pm 5^\circ$ 、化学シフトについて ± 500 Hz、配向パラメーターについて ± 0.1 の検索範囲で、GAにより最適値検索を行なった(解析2)。GAとしては、実数型GAを採用した[3]。交叉確率、突然変異確率を0.8と0.3に設定し、1世代の個体数は10、世代数は100まで計算を行った。選択にはトーナメント方式(サイズは2)を用いた。さらに、解析2で得られた D_{ij} と δ_i の値を検索範囲の中心にして、GAによりパラメーターの最適化を行った。その後、最小自乗法で D_{ij} と δ_i を決定した(解析3)。表1で見られるように、文献値を4 Hz以内で再現することができた。

【考察】ベンゼンのように決定するパラメーターの数が少ない分子については、積分強度を用いた自動解析が有効に働くことがわかった。一方、多くのパラメーターを決定する場合には、積分強度を用いた解析に加え、GAによるパラメーターの最適化が必要である。ビフェニルの場合に見られるように、解析1から解析2への化学シフトの変化はGAの有効性を示している。一般に化学シフトの値は溶媒により変化するため、GAによる化学シフトの最適化が重要であると考えられる。

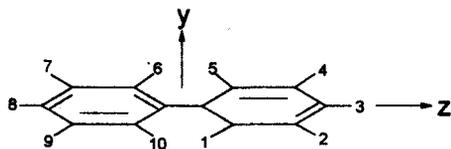


Fig. 3. Molecular model of biphenyl.

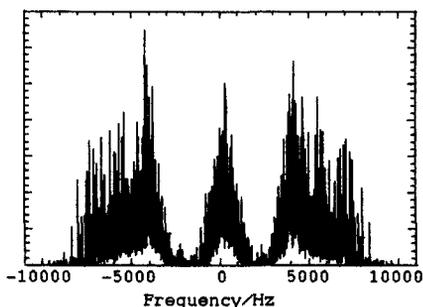


Fig. 4. Synthetic $^1\text{H-NMR}$ spectrum of biphenyl.

表1 ビフェニルの解析結果

	文献[2]	解析1	解析2	解析3		文献[2]	解析1	解析2	解析3
δ_1	0.0	-141.4	-17.4	-0.2	$D_{1,7}$	-270.0	-273.8	-279.8	-270.5
δ_2	13.0	-117.4	41.6	14.3	$D_{1,8}$	-188.4	-188.3	-191.5	-187.8
δ_3	230.8	-41.9	223.2	232.6	$D_{2,7}$	-101.5	-100.2	-101.8	-101.8
$D_{1,2}$	-3174.0	-3152.5	-3169.0	-3174.1	$D_{2,8}$	-76.7	-76.3	-77.1	-74.7
$D_{1,3}$	-404.9	-400.4	-413.9	-406.3	$D_{3,8}$	-60.5	-60.5	-60.8	-59.0
$D_{1,4}$	-9.9	7.9	-14.2	-10.2	ϕ		34.0	33.5	
$D_{1,5}$	178.1	218.4	174.0	180.7	S_{zz}		0.397	0.399	
$D_{2,3}$	-86.9	62.9	-114.0	-84.5	$S_{xx}-S_{yy}$		0.134	0.205	
$D_{2,4}$	177.1	218.4	174.0	180.7	R.M.S.		60.2	6.9	1.0
$D_{1,6}$	-1013.7	-999.2	-999.1	-1011.8					

【参考文献】

- 1) R. Wasser et al., Magn. Reson. Chem., 27, 335(1989).
- 2) G. Celebre et al., J. Chem. Soc. Faraday Trans., 87, 2623(1991).
- 3) R. Wright, Foundations of genetic algorithms, J.E. Rawlins (ed.), p. 205 - 218, Morgan Kaufmann, 1991.

Structural elucidation using LC-NMR and another analytical instrument

(JEOL LTD.) ○Takako Fujimoto, Hiroaki Utsumi

The recent development of practical, direct coupling of HPLC with NMR has enabled the rapid analysis of complex mixtures. Further, LC-MS / NMR will give the scope for the more comprehensive structural information and fully automated analysis. We combined a LC-MS spectrometer to our LC-NMR system. We are now developing a commercial LC-MS / NMR system and investigating related issues such as optimization of measurement conditions.

1. はじめに

LC-NMR は天然物、代謝物、合成物など複雑な混合物の迅速な構造解析を可能とする分析装置として注目されている。そして、さらに MS を接続した LC-MS / NMR はより確実に迅速な構造解析手法として実用化への期待が高まっている。しかしその報告はまだ少ない。そこで、今回 LC-MS と LC-NMR を用いて LC-MS / NMR を構成し、実用化に向けた諸問題（システム上の課題、データ取得における検討項目）の検討と応用調査を目的とした実験を行った。

2. 装置

質量分析計及び核磁気共鳴装置は、日本電子 JMS-LCmate 及び JNM-ECP500 (Nalorac LC プロープ、サンプルボリューム 60ul) を用いた。液体クロマトグラフは島津 10ADvp を使用し、溶離液を UV 検出器出口で約 1:15 に分配させて HPLC と MS、NMR を接続した。カラムには Shim-pack CLC-NH₂ (4.6mmID×150mm) を使用した。移動層にはアイソクラティック条件で D₂O / MeCN を用い、流速は 0.5ml / min とした。LCmate のイオン源には ESI を用いた。

3. 実験と結果

迅速で効率的な測定モードは ON-FLOW 法であるが、NMR の感度を向上させることや応用範囲を広げるためには STOP & FLOW 法を検討する必要がある。例えば UV サイレントな化合物は LC-NMR で STOP & FLOW 測定を行うことが容易ではない。しかし、LC-MS / NMR では MS の TIC を検出信号として用いることができる。一例として糖の LC-MS / NMR データを Fig.1 に示す。サンプルとしてグルコース、マルトース、マルトトリオースの混合物を用いた。濃度は各 10mg / ml である。Fig.1(a)には MS の TIC を示す。糖によってイオン化量が異なるためこの条件で全ての成分について明瞭な TIC を得られなかったが、PC 上のコントロールソフトによって各成分の TIC を検出して STOP & FLOW 測定を行うことができた。

Fig. 1(a)の 2 番目に検出されている成分の MS スペクトル (Fig.1(e)) は m/z 382[M+5+Cl] に相当するイオンが、NMR スペクトル(Fig.1(c))はアノメリックプロトンや糖骨格由来のシグナルが観測されている。MS スペクトルについては糖の水酸基が移動相に使用した重水によって交換されており複雑

なスペクトルとなったが、他のスペクトルとの比較で2番目の成分はマルトースであることが分かった。

LC-MS / NMRはMSとNMRの感度差や使用できる移動相溶媒の種類、各装置の測定条件の最適化などに課題はあるものの迅速で確実な構造解析装置として有用である。特に今回、TICを検出信号として用いるシステムを構築したことにより応用範囲が広がることが期待される。

今後の課題としては、1) 様々なサンプルについて、測定条件の最適化、2) 応用調査、3) 効率的な各データの処理などが挙げられる。

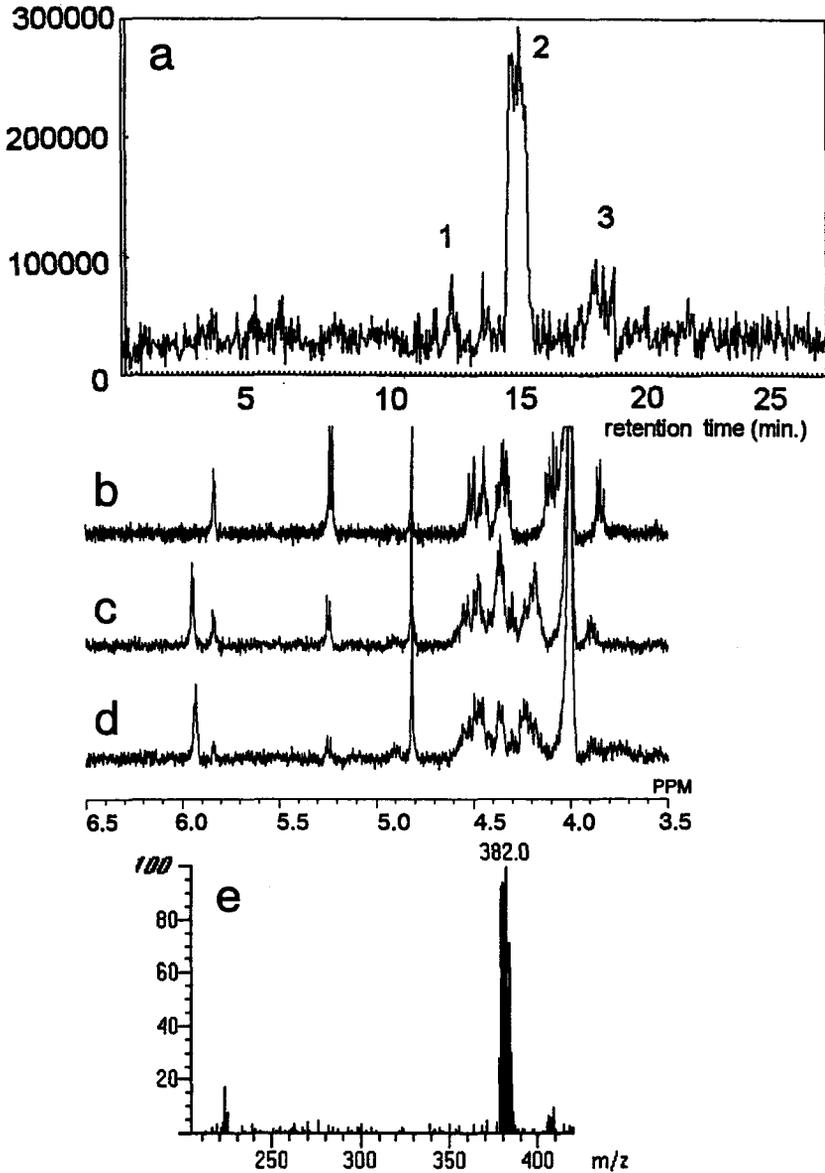


Fig. 1 (a) TIC chromatogram of sugar mixture, (b-d) ¹H-NMR spectrum of component 1-3, (e) ESI(-) spectrum of component 2

NMR Studies of Palladium Pyridinylazole Complexes

¹RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research),²Nara Institute of Science and Technology.Hiroyuki Koshino¹, Akiharu Satake², Tadashi Nakata¹, and Jun Uzawa¹

Several novel π -allylpalladium pyridinylazole, such as pyridinylpyrazole, pyridinylimidazole, and pyridinylpyrrole, complexes were synthesized and characterized by ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR. ¹⁵N NMR data were obtained by ¹H-¹⁵N PFG-HMBC method at natural abundance. These π -allylpalladium pyridinylazole complexes with bidentate nitrogen ligand are convertible from the cationic form into the neutral form under basic conditions. The neutral complexes have high catalytic activity for cyclopropanation of ketene silyl acetals with allylic acetates. ¹⁵N NMR chemical shifts of the ligand moiety and ¹³C NMR chemical shifts of the allyl moiety are a good indication to distinguish the difference between the cationic and the neutral complexes. Relationship of NMR data in a solution and selected bond distances in the solid state structure determined by X-ray together with catalytic activity will be discussed.

有機金属錯体を用いる触媒反応では金属配位子の電子供与能と電荷が反応性を大きく左右する。最近我々はカチオン型 π -アリルパラジウムピリジニルピラゾールまたはイミダゾール錯体が塩基存在下に中性型に変換され、これが酢酸アリルとケテンシルルアセタールのシクロプロパン化反応を触媒することを見いだした。^{1,2,3} この触媒反応はカチオン型ジピリジル錯体などのカチオン型錯体では進行せず、中性型錯体に特徴的であるが、これまでカチオン型と中性型錯体の構造の違いについて詳しくは分かっていなかった。パラジウム錯体が触媒する反応の反応性や選択性を理解するために錯体の構造を詳細に解析することは重要であるので、今回シクロプロパン化反応を触媒するピリジニルアゾリル-パラジウム錯体とその関連する化合物について¹H-¹⁵N PFG-HMBCデータを含む詳細なNMR解析を行ったので報告する。

ピリジニルアゾリル部分のアゾールの構造の違い、あるいはカチオン型と中性型の違いによりパラジウムに配位しているリガンドの窒素の¹⁵N-NMR化学シフトに有意な差がみられた。 π -アリルの¹³C-NMRデータもトランス位の窒素の¹⁵N-NMRデータと関連が認められた。 π -アリル部分のメチレンプロトンに見られるsyn-H \leftrightarrow syn-H,

キーワード：¹⁵N-NMR, PFG-HMBC, パラジウム錯体, ピリジニルアゾール

こしのひろゆき, さたけあきはる, なかただし, うざわじゅん

anti-H \leftrightarrow anti-Hの化学交換速度とパラジウムに配位している部分の化学シフトとの間に興味ある関係が認められた。¹H-NMRおよび¹³C-NMRで観測される π -アリルの化学交換はsyn-anti交換が見られないことから、 σ -アリルを中間体とするのではなくリガンドの窒素とパラジウム間の結合が切れてリガンド側が回転する機構であることが示唆された。なお π -アリル部分の二つのメチレンの帰属は室温あるいは低温でのNOE差スペクトルによって決定した。

本研究で用いたパラジウム錯体の内、中性型 π -アリルパラジウムピリジニルピラゾール錯体は分子間で複合体を形成するが、分子間の相互作用を防ぐためにピリジン部分にメチル基を導入した下図の化合物、 π -アリルパラジウムピリジニルイミダゾール錯体は非常に安定で、酸-塩基処理によって相互に変換可能であり、X線解析も行うことができた。結晶解析で得られた結合角度、結合距離と溶液中でのNMRの化学シフトを比較し、反応性、安定性との関連についても考察を行った。

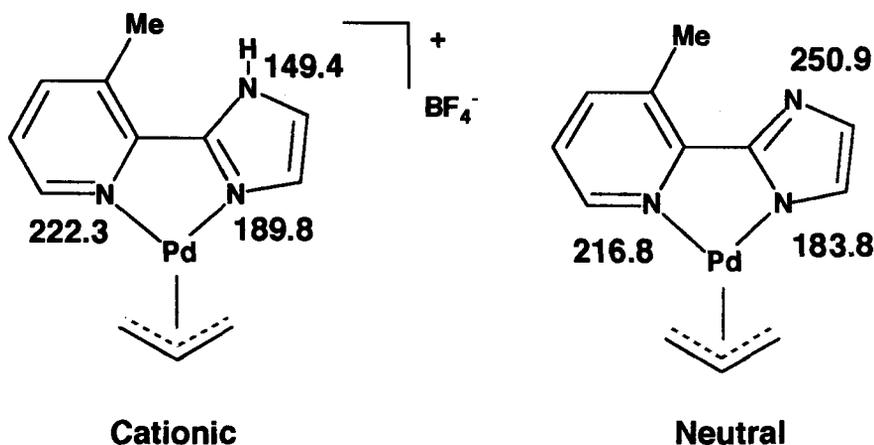


Figure. Structures of cationic and neutral pyridinylimidazole π -allylpalladium complexes, and ¹⁵N-NMR chemical shifts.

参考文献

- 1) A. Satake and T. Nakata, *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 10391-10396.
- 2) A. Satake, H. Koshino, and T. Nakata, *Chem. Lett.*, (1999) 49-50.
- 3) A. Satake, H. Kadohama, H. Koshino, and T. Nakata, *Tetrahedron Lett.*, **40** (1999) 3597-3600.

東大院農・応生化、*東大・分生研

○降旗一夫、*瀬戸治男

Although the cross peaks in conventional HMQC spectra contain information on the H-H J splittings, measurement of H-H J couplings directly from the cross peaks is practically difficult due to the poor resolution in the F_2 or F_1 dimension. In order to solve this problem, we have prepared a new technique, J-resolved-HMQC, by incorporating the J-resolved method into HMQC. This modified technique enables to analyze H-H J couplings of complicated molecules and is effective for analysis of strongly coupled proton spin systems. Its advantages are simple operation, high sensitivity and general applicability.

Heteronuclear 2D-J-分解法はスピン結合と化学シフトを分離観測ができる方法として、二次元NMR導入の初期の段階から紹介されてきた。しかし、天然有機化合物の構造解析の観点からは、構造情報が少ないために、あまり有効には使用されていない。特に、プロトンと炭素の-J分解法はスペクトルの感度が低く、 f_1 軸のデータ点を多くとることが出来ない。そのため、 f_1 軸方向から得られる情報は、 $^1J_{CH}$ の分裂情報に限られ、構造情報として重要な炭素シグナルの上のプロトン-プロトンの fine structureのJ値を読みとることも不可能である場合が多い。

Heteronuclear 2D-J-分解法のこの問題点を解決する一つの方法として、J-resolved HMQC法を検討した。また、その一つの有効利用法として、プロトン-プロトンの high order spin系の解析を試み、良好な結果をえることができたので報告する。

パルス系列

図1にパルス系列J-resolved-HMQCを示す。

J-resolved-HMQC法はHMQC法とプロトン2D-J分解法を組み合わせた測定法である。J分解法 ($-nt_1/2-180(H)-nt_1/2-$)をHMQC法に結合させる場合、プロトン-プロトンのJ分解パラメーターを固定することが出来ない。また、HMQCの t_1 (化学シフト)でJ分解スピン結合 (t_1)を同時に展開する場合は、大きなデータ点を必要とする。この問題の解決のために、scaling パラメーター(n)を導入し、J分解時間変調を nt_1 で展開する。HMQC磁化は化学シフトに対しては t_1 、プロトン-プロトンのスピン結合は $(n+1)t_1$ 、で時間展開する。観測されるスペクトルは、HMQCクロスピーク上において、J分解スペクトルと同様に傾斜したクロスピークをあたえる。また、 f_1 方向のJ分裂したスピン結合定数は、実際の値よりも $(n+1)$ 倍の値として観測される。この方法の特徴は、通常HMQC測定マトリックスの大きさで、 f_1 方向において、J値を観測することが可能となることである。

このJ-分解法パルスシーケンスはHMQC開時間の前後のどちらに導入しても良い。HSQCに導入する場合は展開時間の後にする。decoupled modeが必要な場合は、acquisitionの段階でdecouplingを行う。プロトンシグナルの重なりが激しく、スピン結合が観測できない場合には有効な方法となる。

high order spin系について

プロトン H_A 、 H_B がそれぞれスピン結合し、その化学シフト差がスピン結合定数に等しいかあるいは小さい場合を

キーワード J-resolved HMQC

ふりはた かずお、せと はるお

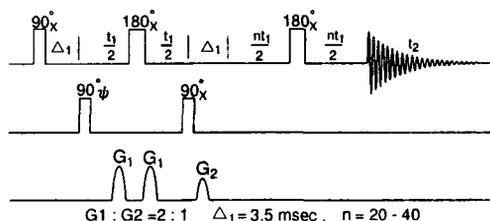


図1. J-resolved HMQC パルス系列

考える (図2-A)。このような場合は H_A 、 H_B の間のスピン結合は high order の関係にあり、 H_A 、 H_B のスピン結合定数を読みとることは困難となる。これに対して、 ^{13}C に結合した H_{A1} と、 H_B との関係において、 H_A 、 H_B が 10Hz でスピン結合し、そして、 H_{A1} と ^{13}C とは 125Hz で結合した場合を考える (図2-B)。 H_A は J_{CH} により大きく分裂し、 H_{A1} と H_{A2} 分裂する。 H_{A1} と H_B の化学シフト差は、スピン結合 $J_{H_A H_B}$ にたいし大きく広がるため、 H_{A1} 、 H_B との関係は、first order のスピン系になる。この ^{13}C に結合したプロトン H_{A1} を検出することにより H_A と H_B のスピン結合定数を読みとることが可能となる。

抗生物質モノゾマイシンへの応用

図3にモノゾマイシンのオレフィン領域 J-resolved-HMQC スペクトルを示す。28、29位のプロトンは化学シフト値が接近しており、high order のスピン系の関係にある。この一次元 NMR スペクトルから、このプロトンの立体配置シーストランスを決めることは危険である。J-resolved HMQC スペクトルにおいて、 H_{28} 、 H_{29} は J_{CH} で大きく 2 本に分裂し、更にもその左サイドの fine structure において、クロスピークが平行に 2 本に走っている。これはプロトンの 2D-J-

分解のクロスピークに対応する。このクロスピークは、 f_1 軸において、 $25 \times J = 375.77\text{Hz}$ と $25 \times J = 158.83\text{Hz}$ で double doublet に分裂していることから、coupling constant は $J_{\text{HH}} = 15\text{Hz}$ 、 $J_{\text{HH}} = 6.4\text{Hz}$ であり、 H_{28} と H_{29} の関係はトランス配位をとることが分かる。12、13位のプロトンの配置の関係も $J_{\text{HH}} = 15\text{Hz}$ からトランス配置である。通常 HMQC 法では、 $t_{1\text{max}}$ が 20msec 位であるのに対して J-resolved-HMBC 法では、観測するスピン結合定数の大きさに応じて、 $nt_{1\text{max}}$ を 333msec (3Hz) から 500msec (2Hz) ぐらいまで時間展開しなければならない。そのため、通常の HMQC 法に比べて、かなりスペクトルの S/N が低下する。実際の測定に当たっては、この S/N の低下を考慮して積算時間を設定することが重要である。

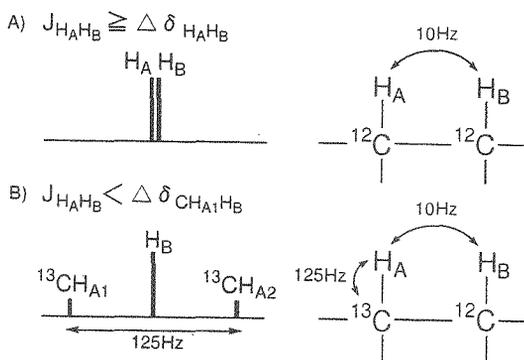


図2. high order spin system 模式図

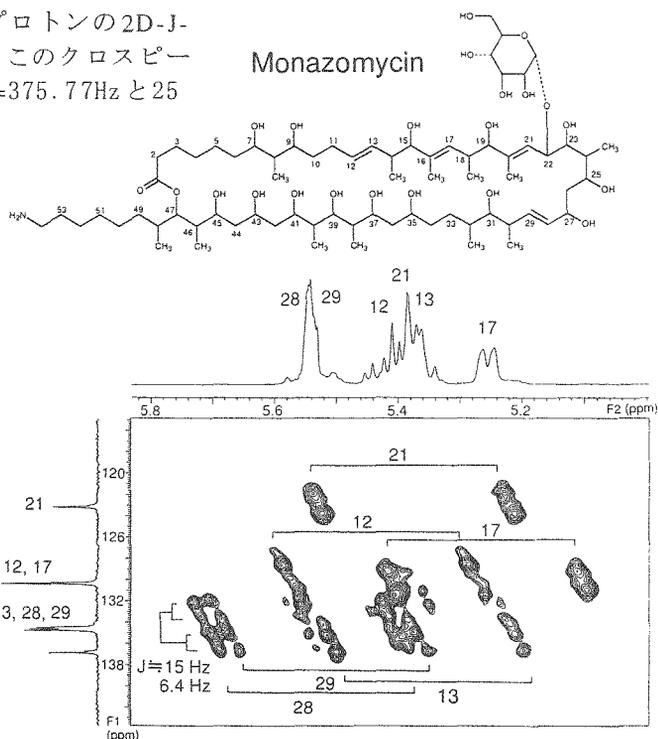


図3. monazomycin J-resolved HMQC スペクトル

$t_1 \times t_2 = 512 \times 1024$ point, $f_1 \times f_2 = 23000 \times 2900$ (Hz)
scans=32, scaling factor(n)=24, $nt_{1\text{max}}=555\text{ms}$

P47 Self-Diffusion of Supercooled Water to 238 K Using PGSE NMR Diffusion Measurements

((株) 機能水研究所)

(William S. Price、○井出博之、荒田洋治)

Water Research Institute

Sengen 2-1-6 Tsukuba, Ibaraki 305-0047 Japan

William S. Price, Hiroyuki Ide, and Yoji Arata

The translational self-diffusion coefficients of supercooled water at atmospheric pressure were examined using pulsed-gradient spin-echo NMR diffusion measurements down to 238 K. As the temperature decreased, the diffusion behaviour became distinctly non-Arrhenius. It was found that the diffusion behaviour when plotted in an Arrhenius form was well-described by a Vogel-Tamman-Fulcher-type relationship in the temperature range of 298 to about 242 K. However, a fractional power law type equation was found to provide a better fit that extended over all of the measured temperature range. Below this temperature range the diffusion coefficient decreased rather steeply and at 238 K the diffusion coefficient was $1.58 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, the lowest value of the water diffusion coefficient so far determined. At this temperature the activation energy for the diffusion was found to be of the order of 44.4 kJ mol^{-1} . The data presented here should allow theoretical models of water to be more stringently tested.

The anomalous behaviour of supercooled water remains poorly understood. Despite its fundamental importance, experimental measurements of the diffusion coefficient of supercooled water have attracted surprisingly little attention (Weingärtner, 1982) given the number of theoretical studies in the field. In the present study the translational self-diffusion coefficients of supercooled water at atmospheric pressure were examined using pulsed-gradient spin-echo (PGSE) NMR diffusion measurements down to 238 K (Price et al., 1999). Thus, we have extended the lower limit of the measurement of the diffusion coefficient of water much closer to the apparent limit (i.e., homogeneous nucleation temperature, T_H) of around 231 K for supercooled water (Angell, 1983). As the temperature decreased, the diffusion behaviour became distinctly non-Arrhenius (see Fig. 1).

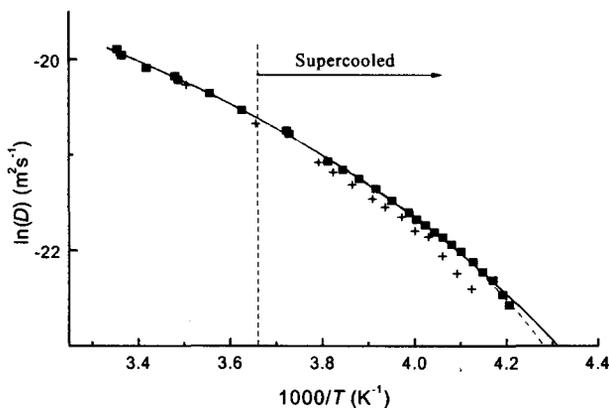


Figure 1 An Arrhenius plot of the diffusion coefficient of H_2O versus temperature. The values obtained in the current work are marked by squares and those from Gillen et al (Gillen et al., 1972) are denoted by crosses. Although the two data sets have different offsets (i.e., at 298.15 K we have $D = 2.3 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ and Gillen et al. obtain $D = 2.23 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$), the overall trend is similar but diverges more at low temperatures. The dashed vertical line denotes 273 K. The results of regressing the VTF equation onto the data is shown by the solid line and similarly the results of regressing the FPL equation onto the data are denoted by the dashed line.

Keywords: Pulse-Gradient Spin-Echo, Diffusion, Supercooled water

著者ふりがな : ウィリアム シドニー プライス、 いで ひろゆき、 あらた ようじ

We found that above 242 K, our data was well described by an empirical Vogel-Tamman-Fulcher (VTF)-type relationship,

$$D = D_0 \exp\{-B/(T - T_0)\} \quad [1]$$

where T is temperature, T_0 is often related to the glass transition temperature and D_0 and B are fitting constants. By regressing Eq. [1] onto the data, the following values were obtained, $D_0 = 4.00 \pm 0.87 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, $B = 371 \pm 45 \text{ K}$ and $T_0 = 169.7 \pm 6.1 \text{ K}$. The result is plotted in Figure 1. A dynamic scaling behaviour (i.e., fractional power law; FPL) of the form

$$D = D_0 T^{1/2} \left(\frac{T}{T_s} - 1 \right)^\gamma \quad [2]$$

where γ is a fitting parameter and T_s represents a low temperature limit where D extrapolates to zero was also regressed onto the data (see Figure 1) and was found to provide a better fit to the data at lower temperatures than the VTF equation. This power law behaviour constitutes the grounds for the stability limit conjecture, which assuming a true singularity at T_s , predicts that there is no continuity of states between the liquid and solid states (Speedy, 1982a; Speedy, 1982b). The parameters of best fit are given by $D_0 = 7.66 \pm 0.24 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, $T_s = 219.2 \pm 2.6 \text{ K}$ and $\gamma = 1.74 \pm 0.10$.

By taking the derivative of Eqs. [1] and [2] we are able to obtain the apparent activation energy for the diffusive process with temperature; see Figure 2.

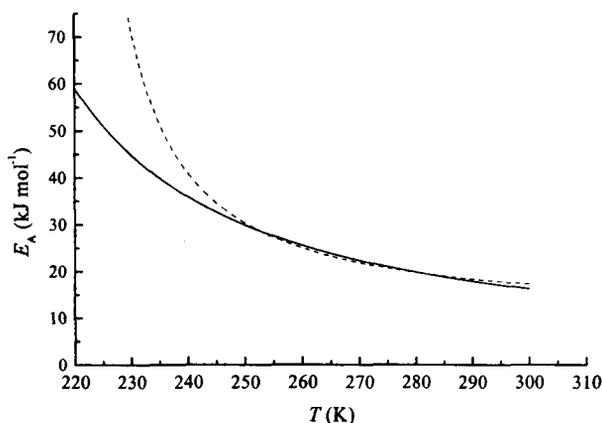


Figure 2 A plot of the E_A for diffusion according to the differential of the VTF equation (solid line) and the FPL equation (dashed line). The curve derived from the VTF equation underestimates E_A for temperatures below 240 K, however the curve derived from the FPL equation rapidly increases below about 250 K.

The activation energy increases with decreasing temperature and exceeds 36 kJ mol^{-1} ($8.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) if E_A is determined from the VTF equation or 41 kJ mol^{-1} ($9.8 \text{ kcal mol}^{-1}$) if determined from the FPL equation for temperatures below 240 K. In fact, by using the lowest two temperatures we can calculate that at around 238 K, E_A is of the order of 44.4 kJ mol^{-1} ($10.6 \text{ kcal mol}^{-1}$). At lower temperatures the values extrapolated for E_A from the two different equations diverge dramatically since at T_s (i.e., 219.2 K) the FPL equation implies a singularity.

Our results show that the diffusion of supercooled water follows a smooth trend down to at least 238 K with the data, particularly at the lowest temperatures, being better

described by a fractional power law than the VTF equation. This further supports the view that water is not approaching a glass transition (Prielmeier et al., 1987) and thus that there is no continuity of states between the supercooled liquid and solid phases.

References

1. Angell, C. A. 1983. Supercooled Water. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 34:593-630.
2. Gillen, K. T., D. C. Douglass, and M. J. R.Hoch. 1972. Self-Diffusion in Liquid Water to -31 °C. *J. Chem. Phys.* 57:5117-5119.
3. Price, W. S., H. Ide, and Y. Arata. 1999. Self-Diffusion of Supercooled Water to 238 K Using PGSE NMR Diffusion Measurements. *J. Phys. Chem.* 103:448-450.
4. Prielmeier, F. X., E. W. Lang, R. J. Speedy, and H.-D. Lüdemann. 1987. Diffusion in Supercooled Water to 300 MPa. *Phys. Rev. Lett.* 59:1128-1131.
5. Speedy, R. J. 1982b. Limiting Forms of the Thermodynamic Divergences at the Conjectured Stability Limits in Superheated and Supercooled Water. *J. Phys. Chem.* 86:3002-3005.
6. Speedy, R. J. 1982a. Stability-Limit Conjecture. An Interpretation of the Properties of Water. *J. Phys. Chem.* 86:982-991.
7. Weingärtner, H. 1982. Self-Diffusion in Liquid Water. A Reassessment. *Z. Phys. Chem.* 132:129-149.

(旭硝子(株)・中央研究所) ○笹倉 英史, 森澤 義富

Fluorine two dimensional NMR methods using pulse field gradient

○Hideshi Sasakura, Morizawa Yositori

Research Center, Asahi Glass Co., Ltd.

We present new methods which are fluorine 2D-NMRs using pulse field gradient(PFG); PFG-HC{F}-HMQC, PFG-FC{H}-HMQC, PFG-FC{H}-HSQC and PFG-F{H}-COSY. It is possible to reduce the time needed for 2D measurement by adopting PFG to fluorine 2D-NMR methods, and perform high sensitivity by detecting the high gyromagnetic ratio nucleus, such as fluorine, or proton. We show 2D spectra of 1,1,2,2,3-pentafluoropropane(PFP) and 2,2,3,3-tetrafluoro-1-propanol(TFP) for model compounds.

1. はじめに

我々は、工業材料や医薬原体・中間体で有用な含フッ素有機化合物の構造解析を、簡便にかつ迅速に行なうために、CF{H}-J 分解法, CH{F}-J 分解法, CF{H}-COSY 法, CH{F}-COSY 法および F{H}-COSY 法の C/F/H トリプルレゾナンス 2 次元法と、それらを組み合わせた構造解析法を報告してきた。

しかしながら、フェーズサイクリングを行なうパルスシーケンスのため積算時間が長く、また CF-COSY 法のように低周波数核である ^{13}C 核をを観測核とする 2 次元法は感度が悪い。さらに ^{13}C 核よりも観測周波数が高い ^{19}F 核が F1 軸側になるので、分解能を上げるためには F1 軸側のポイント数増やさなくてはならず、さらに測定時間が長くなるという問題もあった。

これらの問題を解決するために、必要なコヒーレンス情報を選択的に取り込めるフィールドグラジエント法を ^{19}F 核に適用し、異種核測定には ^{19}F 核や ^1H 核を観測核とするインバース 2 次元法を検討した。

今回は、PFG を用いた C/F/H トリプルレゾナンス HMQC 法および HSQC 法, PFG を用いた F{H}-COSY 法について報告する。

2. 方法

モデル化合物として、Lancaster 社製 1,1,2,2,3-ペンタフルオロプロパン(PFP, 純度:98%)および Lancaster 社製 2,2,3,3-テトラフルオロ-1-プロパノール(TFP, 純度:97%)を用い、測定には約 30% 重クロロホルム溶液として使用した。装置は、日本電子社製核磁気共鳴装置 ECP-400, プロローブは 5mm ϕ サンプル管用 PFG-CFH トリプルレゾナンスプロローブを用いた。デカップリングパルスとして、 ^1H 核には WALTZ, ^{13}C 核と ^{19}F 核には MPF を用いた。

3. 結果および考察

3.1 PFG を用いた HC{F}-HMQC スペクトル

フッ原子を含む化合物の PFG を用いた HC-HMQC スペクトルを、Fig.1(a)のパルスで検討し Fig.2(a)のスペクトルを得た。水素原子とフッ素原子の両方が結合している炭素原子の相関ピークは、F2 軸側に J_{HF} で分裂し、F1 軸側に J_{CF} で分裂する。そこで Fig.1(b)に示す様にトリプル側で ^{19}F 核を完全デカップリングすると、2 つのカップリングが消失したスペクトルが得られた (Fig.2(b))。解析にカップリング情報が必要な場合、FID を取り込む時のみ ^{19}F 核をデカップリング (Fig.1(c)) すると、 ^{13}C 核の展開時間に分裂した CF カップリングの情報を残したスペクトルが得られた (Fig.2(c))。

キーワード:トリプルレゾナンス、パルスフィールドグラジエント、フッ素化合物、フッ素核
○ささくらひでし、もりざわよしとみ

3.2 PFG を用いた FC{H}-HMQC スペクトルおよび FC{H}-HSQC スペクトル

F 核観測の異種核 2 次元 NMR 法を検討した。Fig.3 および 4 に TFP の FC{H}-HMQC スペクトル, FC{H}-HSQC スペクトルを示す。両スペクトルとも積算回数: 2 回, F2 軸側のポイント数: 128, 繰り返し待ち時間: 1.5 秒で, 測定時間は約 8 分であった。

PFP の FC{H}-HSQC スペクトルは, FC{H}-HMQC スペクトル(Fig.5)と比較してかなり S/N の悪い結果となった。この原因は, HSQC 法が HMQC 法と比較してより複雑なパルスシーケンスを用いるために励起帯域が狭く, ^{19}F 核の観測幅が 55kHz と広い化合物の測定では, S/N が悪くなったことが考えられる。

3.3 PFG を用いた F{H}-COSY スペクトル

積算回数 1 回で測定すると, PFG を用いない COSY の場合, 種々のコヒーレンスの相関ピークが現れたが, PFG を併用すると $^{\text{J}}\text{J}_{\text{FF}}$ による相関ピークのみが現れるスペクトルが得られた。

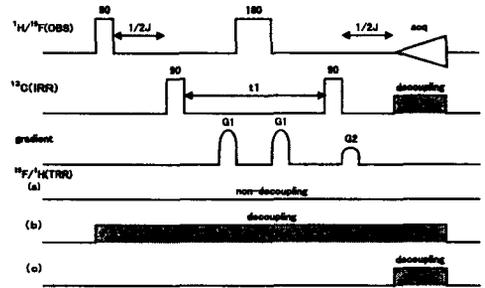


Fig.1 Pulse sequence of PFG-HMQC

- (a) ^{19}F non-decoupled
- (b) ^{19}F complete decoupled
- (c) ^{19}F decoupled during acquisition time

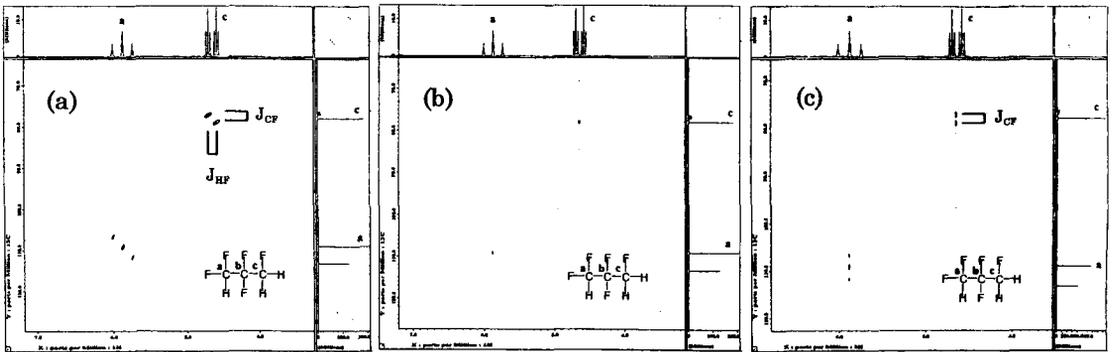


Fig.2 HC{F}-HMQC spectra of PFP

- (a) ^{19}F non-decoupled, (b) ^{19}F complete decoupled, (c) ^{19}F decoupled during acquisition time

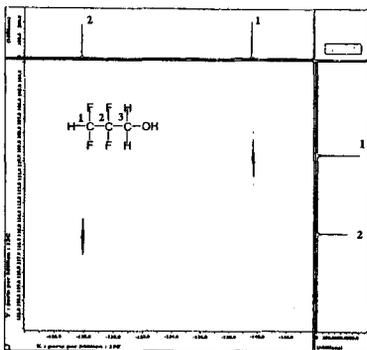


Fig.3 FC{H}-HMQC spectrum of TFP

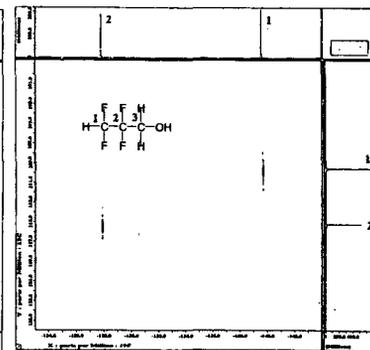


Fig.4 FC{H}-HSQC spectrum of TFP

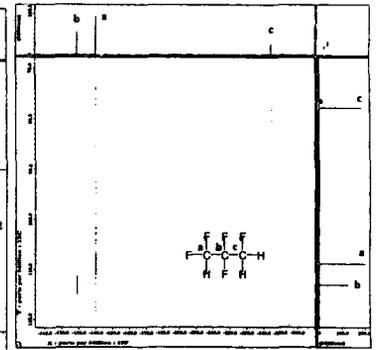


Fig.5 FC{H}-HMQC spectrum of PFP

リチウム塩を含む有機電解液の無限希釈付近の自己拡散係数と電気伝導率の研究

(物質工学工業技術研究所¹, ユアサコーポレーション(株)², 機能水研究所³)
早水紀久子¹, ○杉本恭子, 相原雄一², William.S.Price³

Studies on the Ionic Conductivity and the Self Diffusion Coefficients at Infinite Dilution for Organic Electrolytes Including Lithium Salts

Kikuko Hayamizu, Kyoko Sugimoto, Yuichi Aihara, and William S. Price
(National Institute of Materials and Chemical Research, Yuasa Corporation)

The self diffusion coefficients (D) of the lithium, anion, and solvent in four organic electrolyte solutions, which are important in lithium batteries, were measured by the pulsed-gradient spin-echo (PGSE) NMR method in the dilute region. The salt concentration dependence of the D values of all the species, the ion transport numbers, and the solvation numbers around the ions are discussed. The equivalent conductivities were calculated from the ion diffusion coefficients using the Nernst-Einstein equation. The infinite dilution values extrapolated from the experimental measurements are in very good agreement with the equivalent conductivities measured using the AC impedance method. To our knowledge, this is the first experimental verification of the validity of the Nernst-Einstein equation at infinite dilution.

はじめに：リチウム電池に用いられる有機電解液の特性は有機溶媒とリチウム塩の組み合わせに大きく依存するが、イオン伝導機構等は未だに解明されていない。実用的な濃厚溶液の電気伝導率は、希薄溶液の電気伝導率解析から得られる極限モル伝導率 (Λ_0) と電解液のイオン会合定数 (K_A) の兼ね合いで決まるともいえる。今回、無限希釈に近い濃度範囲で4種類の有機電解液中のリチウム、アニオン、溶媒の自己拡散係数を ^7Li , ^{19}F , ^1H -NMR で PGSE (Pulsed-Gradient Spin-Echo) 法により測定し、拡散現象より解析を行った。

実験：塩濃度 0.0001 から 0.5 M の有機電解液 $\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2 / \gamma$ -butyrolactone (GBL), $\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2 / \text{propylene carbonate}$ (PC), $\text{LiBF}_4 / \text{GBL}$, $\text{LiBF}_4 / \text{PC}$ を 5 mm ϕ サンプル管に高さ 5 mm 入れて測定した。測定温度は 30 $^\circ\text{C}$ である。

結果と考察：リチウム、アニオン、溶媒の自己拡散係数を塩濃度の平方根に対してプロットして図1に示した。既に我々が報告しているように^{1, 2}、自己拡散係数は4種の電解液で溶媒が最も速く、次にアニオン、そして、ファンデルワールス半径の最も小さなリチウムが最も遅かった。

PGSE-NMR, 自己拡散係数、有機電解液、リチウム

はやみずきくこ、すぎもときょうこ、あいはらゆういち、ウイリアム プライス

塩濃度減少につれて全ての拡散係数は速くなるが、その程度は BF_4 でもっとも大きかった。リチウムとアニオンの D を溶媒の D に対してプロットすると、それぞれが良い相関を示すことより、イオン移動は溶媒に依存していることが明確である。

図2に示すように、リチウムとアニオンの自己拡散係数を基に Nernst-Einstein (N-E)式より求めた当量伝導率を塩濃度の平方根に対してプロットすると直線関係が得られた。これを無限希釈度へ外挿した値は、交流複素インピーダンス法で測定した極限モル伝導率とほぼ一致した。これは N-E 理論式を実証した数少ない例の一つである。

塩濃度依存を示す自己拡散係数より輸率、溶媒和についても興味深い結果を得た。また、拡散係数の温度変化についても検討を行った。

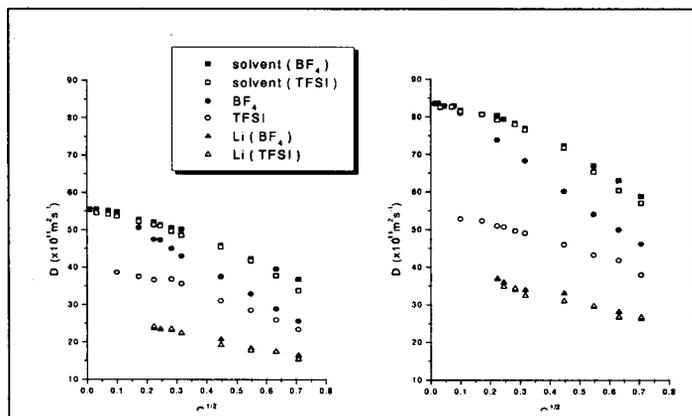


Fig.1 Plots of the diffusion coefficients versus the square root of the salt concentrations for PC (left) and GBL systems (right) at 30°C.

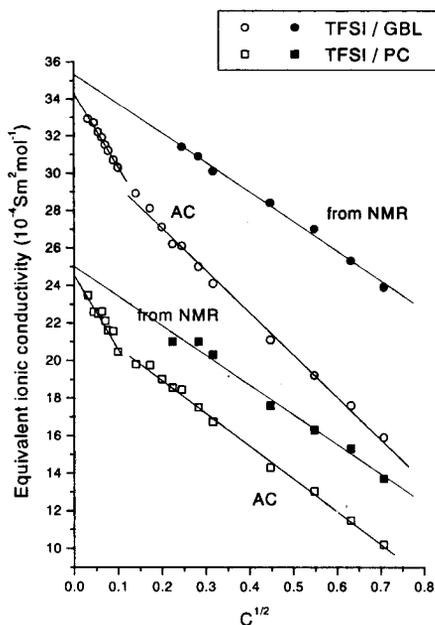


Fig. 2 Plots of the equivalent conductivities of the GBL and PC electrolytes including TFSI versus the square root of the salt concentrations at 30 °C . The conductivities calculated from the diffusion coefficients using the Nernst-Einstein equation are denoted by solid symbols, and conductivities measured directly by the AC impedance method are denoted by open symbols.

1. K. Hayamizu, Y. Aihara, S. Arai, and W. S. Price, Solid State Ionics, 107,1 (1998)

2. K. Hayamizu, Y. Aihara, S. Arai, and C. G. Martinez, J. Phys. Chem. 103, 519 (1999)

アミノ酸 (L-Leu)-フェナントロリン-混合配位子白金錯体の
構造とオリゴ DNA との相互作用

中央大・理工 1, 東薬大 2, ○松木 陽 1, 神藤平三郎 2, 佐久間千勢子 2,
千喜良誠 1

NMR Study On Interaction Between Pt Complex [Pt(Phen)(Leu)]
And Oligomeric DNA

Interaction between oligomeric DNA(DO1) and Pt complex containing amino acid (Leucine) and phenanthroline [Pt(phen)(Leu)] was investigated by CD and NMR methods. DO1 (ca. 2mM) was titrated by stock solution of the complex. CD intensity at 250 nm slowly saturated around DO1:Pt=1:4 (in mol). Comparison with typical CD spectra of canonical B-form and A-form DNA suggested that the complex induced to the DO1 a partial transition from B- to A-form. The titration changed proton NMR signals in both chemical shift and line width. All but C₃ H₂', H₂" sugar protons, C₃ H₆ base proton have unanimously shifted to higher field. High field shift of C₉ H₁', H₂', H₂"', H₃' sugar protons, C₉ H₅ base proton, G₄ H₈ base proton G₁₀ H₈ base proton were relatively big. As all these protons are in major groove at C₉/G₄ and G₁₀/C₉ step, it suggest that complex binds in between third and fourth base pair and then caused the conformational change there.

遷移金属はタンパク中に取り込まれて酵素として働くものを始め、生物の営みに重要な役割を担っている。また知的創薬の立場からタンパクの DNA 結合モチーフ中のアミノ酸側鎖が DNA 上のある部分を特異的に認識するメカニズムに大きな関心が寄せられる一方、「小型分子」によって特異的部位認識を行おうとする試みも続けられている。金属錯体の中でもフェナントロリンなど、大きな疎水平面を持つ配位子を含むものはインターカレートという特徴的な仕方で DNA と結合する事で関心を集め多くの議論がなされてきた。当研究室では遷移金属を中心に持つ様々な混合配位子金属錯体について研究し多くの知見を得てきたが、種々のアミノ酸を含む二価の銅錯体 Cu(II)(Phen)(amino acid)と DNA ファイバーの ESR 測定では、これらの錯体が DNA らせん軸に対して強い配向性をもって結合する、インターカレート型結合である事が強く示唆された。

今回このようなフェナントロリンを含む金属錯体について DNA との結合構造の詳細や、結合によって引き起こされる DNA の構造の歪み、糖環部分のバックリングの変化などを詳しく考察する目的で、主に NMR のいくつかの手法を用いて研究を行った。ESR から NMR に手法を転じるに伴って中心金属は二価の銅から同じく二価の白金に変更して検討した。平面配位の二価の白金錯体ではガンの治療薬として有名なシスプラチンがある。シスプラチンはその強い抗癌性一方で、多くの副作用をもたらす治療法に大きな制限を加えている。シスプラチンはその結合により構造を歪められた DNA 分子と、それを認識して、ある種のタンパクが作用する事でその効果を発揮するらしい事が最近報告され、錯体の結合によって DNA に引き起こされる構造の変化も興味あるテーマである。

NOE, 交換性プロトン, DNA, 白金錯体, フェナントロリン

まつきよう、しんどうへいさぶろう、さくまちせこ、ちきらまこと

オリゴDNAの配列には最もスタンダードな配列で、以前より良く研究されているd(CGCGAATTCGCG)₂ (DO1)を用いた。白金錯体にはフェナントロリンの他に必須アミノ酸の一つであるロイシンを選択した。錯体は以前に報告された方法に沿って合成し⁽¹⁾、オリゴDNAは Sawady technology Co., Ltd.より購入した。

[CDの測定]

DO1を20mMリン酸緩衝液(pH=7.0, 30mM NaCl)で希釈し、同じ緩衝液で希釈した錯体溶液をDO1:Pt=1:5付近まで順次滴下し、CDスペクトルを観測した。錯体のCD帯のない250nm付近のCD強度の錯体濃度による変動をプロットした結果、DO1:Pt=1:4~5付近で緩やかに飽和に向かう傾向を見せた。一方、CD帯の全体の特徴はDNAがB-formからA-formに遷移していく時に見せる変化によく似た推移を見せた。

[NMRの測定]

NMR測定はJEOL A-400で行われ、交換性プロトンからの情報も加味するため、今回はすべて軽水中で測定された。DO1溶液は最終的に約2mMの溶液にした。(90% 20mM phosphate buffer pH=7.0, 10% D₂O, 30mM NaCl) 錯体溶液はDO1:Pt=5:1から1:1まで5段階にわけて滴定した。各ステップごとにNOESYとTOCSYによって独立してシグナルの帰属を行い、塩基のH5,H6,H8,H2、糖環のH1',H2',H2'',H3',H4'について化学シフトの変動を観察した。スペクトルは滴定各ステップごとにNOESY(100ms-mix,250ms-mix),TOCSY(120ms-mix)、全て1024ポイント×256カラム、30℃で測定され、データはガウス関数でトランケートしたのち、シフト値の決定用には4K×4Kポイント、ピークボリューム計算用には2K×2Kポイントにゼロフィルした。シフト値の決定には竹NMR(free-ware; <http://bake.kuchem.kyoto-u.ac.jp/bun/pgm/index.html>), ピークボリューム計算にはnmr2(New Methods Research Inc, NY), SwaN-MR(free-ware; <ftp://qobruue.usc.es/nmr/>)を使用した。

[結果、考察]

DNA溶液へのPt錯体溶液の滴下により、DNAのプロトン化学シフト値とシグナルの線幅は共に大きく変化した。線幅は滴定に従ってほぼ直線的に広がるが、CDスペクトルから得た飽和曲線から錯体の結合部位は数カ所以上あると思われるので、異なった部位に錯体を結合した数種の化学種間の交換によるものと思われる。配列上どの残基も糖環のH1',H2'は全体的に大きくシフト値が変動するが、中でも配列の端の残基程大きくシフトし、塩基のH6,H8も同じ傾向を見せる。これはDNA分子の末端効果と言われ、通常の二本鎖構造からの逸脱が原因と思われる。また、塩基対形成に参加するイミノプロトンもG₁₂/C₁ペアでは全く観測されないで、塩基対形成は末端で損なわれている。その他のプロトンで特徴的なシフトを見せたのはC₃糖環のH2',H2'',H4',塩基のH6で、どのシグナルも高磁場シフトする中でC₃に関与するこれらのプロトンは大小の差こそあれ、一致して低磁場シフトを見せた。更にC₉糖環のH2',H3', G₄塩基のH8, G₁₀塩基のH8も、他のプロトンに比較して大きな高磁場シフトを見せた。これら8つのプロトンは共にC₃,G₄と、それらと塩基対形成した相手鎖のG₁₀,C₉の部分に集中している。この事から錯体はDO1の端から3番目と4番目の塩基対間に結合する事が可能で、それにより付近の電子環境や二本鎖の構造を変化させることが示唆された。

(1)R.Mital and T.S.Srivastva, *J.Inorg.Biochem.*,40,111,1990.

(工技院生命研¹、東京理科大基礎工²、武庫川女子大薬³)
 ○堤遊^{1,2}、山垣亮¹、石塚靖子¹、中西洋志^{1,2}、小泉京子³

Structure analysis of saccharide substituted cyclodextrins by higher field NMR spectroscopic method

(National Institute of Bioscience and Human-Technology¹, Science University of Tokyo², Mukogawa Women's University³) Yu Tsutsumi^{1,2}, Tohru Yamagaki¹, Yasuko Ishizuka¹, Hiroshi Nakanishi^{1,2}, Kyoko Koizumi³

Recently, saccharide substituted cyclodextrins are increasingly interested in medical drug and food industry. ¹H NMR spectral analyses of saccharide substituted cyclodextrins were performed by using a 800 MHz NMR spectrometer. The ¹H NMR spectra of three positional isomers of diglucosyl β -CD were measured and compared with each other. 6¹,6²-diglucosyl- β -CD shows relatively well resolved signals and considerably different signal patterns from those of 6¹,6³- and 6¹,6⁴-diglucosyl- β -CDs. The results suggest different structures of CD rings among those three positional isomers.

シクロデキストリン(CD)は、様々な包接錯体を形成することがよく知られているが、最近、種々の糖鎖置換CDが天然から分離されたり、合成されたりしており、医薬・食品材料分野で注目されている。これらの糖鎖置換CD誘導体の同定や構造解析は従来困難であった。今回、我々はグルコースが2個 β -CD環に置換した3種類の置換位置異性体(6¹,6²-ジグリコシル- β -CD(I)、6¹,6³-ジグリコシル- β -CD(II)、及び6¹,6⁴-ジグリコシル- β -CD(III))についてその同定、構造解析を800MHz NMR分光器を用いて行ったのでその結果について報告する。これらのすべてグルコース基で構成されているCD誘導体の500MHz ¹H NMRスペクトルはシグナルの重複が激しく、解析が困難であった。800MHzの高磁場磁石を用いて¹H NMRスペクトルを測定すると、シグナルの一部が分かれてくるため解析がやや容易になる。Iの¹H NMRスペクトルにおいて分枝の2個のグルコース残基のシグナルは、CD環のグルコース残基のシグナルと大きく異なることがわかった。また、2個のグルコースによって置換されているCD環中の根元の2個のグルコース残基の対応する¹Hシグナル(特に1位と6位)が大きく異なることを見出された。NMRの詳細な解析からこれらのCD誘導体の構造について議論を行う。

800MHzNMR、シクロデキストリン、糖鎖置換シクロデキストリン、置換位置異性体

つつみ ゆう、やまがき とおる、いしづか やすこ、なかにし ひろし、
 こいずみ きょうこ

P53 パルスNMRを用いた $^1\text{H T}_2$ 測定による多糖水溶液の水素結合構造の研究

(東水大) ○松川真吾・渡部徳子

Hydrogen Bonding Structure of Polysacchride Solution Observed by $^1\text{H T}_2$ NMR Measurement

Shingo Matsukawa and Tokuko Watanabe

Dept. of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries,
Konan, Minato-ku, Tokyo108-8477

$^1\text{H T}_2$ for water in gellan solutions have been measured in order to elucidate the hydrogen bonding structure and structural change of gellan molecule. From the results of the temperature dependence, it was found that $^1\text{H T}_2$ for water significantly changes with the conformational change of gellan, such as random coil-double helix transition or the formation of aggregates of gellan molecules, which alters the proton exchange rate between water molecule and hydroxyl groups of gellan. For the solution with K^+ , it was suggested that the hydrogen bonding between gellan molecules is accelerated by the shielding effect of K^+ ions and reinforces the double-helix structure and the aggregates of double-helices. For the solution with Ca^{2+} , it was suggested that ionic bonds are formed between carboxylic acids of gellan and Ca^{2+} , and reinforce the aggregates of double-helices.

(緒言)

ある種の多糖が示す高次構造形成において、高分子-高分子間および高分子-溶媒(水)間の水素結合が重要な役割を担っている。このような水素結合構造の変化は水分子と糖鎖水酸基との間での化学交換速度を大きく変えるので、水分子の $^1\text{H T}_2$ に敏感に反映される。本研究では、D-グルコース、D-グルクロン酸、D-グルコース、L-ラムノースを繰り返し単位とする多糖であるジェランのランダムコイル-ヘリックス転移およびゾル-ゲル転移を取り上げる。ジェランは、水素結合による2分子間の相互作用によって2重螺旋を形成し、さらに、KやCaなどのイオンの存在下では、この2重螺旋同士の相互作用によってゲル構造を形成する。この時のジェランの高次構造の変化をCD測定によりモニターしながら、水分子の $^1\text{H T}_2$ の変化より、水素結合構造の変化を詳細に研究する。

(実験)

Na型ジェラン(低金属イオン、三栄源)は1(w/w)%になるように、蒸留水に懸濁し、40℃で20時間、70℃で2時間、90℃で30分間加熱した後、金属イオンを添加し、さらに90℃で30分間加熱し、所定の温度、時間で保存後に用いた。金属イオンの添加濃度はNa, K; 0~100mM, Ca, Mg; 0~8mMとした。NMR緩和時間及びCD

キーワード ; パルスNMR、 $^1\text{H T}_2$ 、プロトン交換速度、ジェラン、コイル-ヘリックス転移

まつかわしんご わたなべとくこ

の温度依存性は 71°C~15°C の範囲で 0.5°C/min で降温し、さらに、昇温させながら行った。¹H T₂ NMR の測定は bruker 社製の minispec PC-120 を用いて、共鳴周波数は 20MHz、2τ=1ms で行った。CD 測定は、日本分光社の J-720 を用いて波長 240-195nm の範囲を 20nm/min で測定した。

(結果と考察)

カチオン濃度依存性 1 価の金属イオン(Na,K)を添加した場合には、濃度増加に伴い、初め、緩和時間がほぼ同じであるが、ある濃度のところで急激に変化した後、また一定になる傾向が見られた。この急激な変化は、高分子鎖の構造変化に伴って水和構造や交換速度が変わったことによると考えられる。2 価の金属イオン(Ca,Mg)を添加した場合は、緩和時間の変化は連続的であり、水素結合構造の変化が連続的に起きていることを示している。

温度依存性 Fig. 1 に K⁺ を添加した試料の 202nm におけるモル楕円率[θ]₂₀₂と ¹HT₂ の温度依存性を示した。[K⁺]が増えると降温過程において[θ]₂₀₂に見られるジェラン鎖の構造転移点(T_{CD})が高温へと変化している。[K⁺]=40mM 以下の試料ではこれは ¹HT₂ の急激な変化点(T_{NMR})と一致しており、水素結合構造の変化を伴っていることを示している。[K⁺]=80mM の試料については、T_{CD} よりも高温側に T_{NMR} がみられ、ジェラン鎖の構造変化の前に水素結合構造変化が起きることを示している。続く昇温過程では、[K⁺]=40mM においては、¹HT₂ の変化は[θ]₂₀₂ の変化に対応した遅れを見せており、ヘリックス構造の消失と共に ¹HT₂ を短くするような水素結合構造が消失していると考えられる。[K⁺]=80mM においては、65°C 以上では[θ]₂₀₂ の変化よりジェラン鎖はランダムコイル状態であると考えられるが、¹HT₂ は小さな値のままである。従って、低温で形成された水素結合構造が残っていると考えられる。Ca²⁺ を添加した試料についても、温度変化に伴うジェラン鎖の構造変化と水素結合構造の変化を考察した。

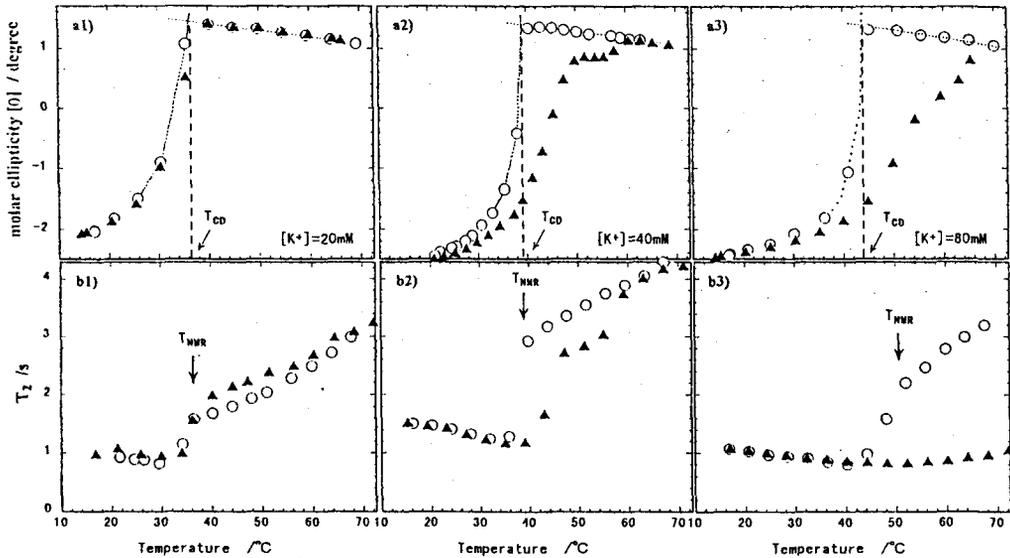


Fig 1 Temperature dependence of [θ]₂₀₂ (a1 - a3) and ¹HT₂ (b1 - b3) for 1% gellan solution with K⁺ of 20 (a1, b1), 40 (a2, b2) and 80 mM (a3, b3) on cooling (○) and heating (▲).

P54

液晶NMR法におけるMAS/NMAS C-13 スペクトルの利用。
2-ビニルオキシピリジンについて
(阪大・医) ○藤原 英明、 木村 敦臣、
(阪大・薬) A. V. Vashchenko

MAS/NMAS C-13 Spectra in Liquid Crystal NMR. Observation and Analysis of the Spectra in 2-Vinyloxyppyridine

○Hideaki Fujiwara,¹ Atsuomi Kimura,¹ and A. V. Vashchenko²

School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University¹

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University²

A version of the liquid crystal NMR spectroscopy, MAS/NMAS LC-NMR, has been applied to ^{13}C spectroscopy to extend the applicability of the MAS/NMAS method. The sample used in this study is 2-vinyloxyppyridine and the ^{13}C NMR data analysis supported rigid framework for the pyridine and vinyloxyl group.

【序】 直接結合定数 (D_{ij}) のNMR分光法における有用性は、最近の低配向性液晶系としてディスク形りん脂質希薄溶液であるbicelle の登場により、広く興味を持たれるようになった。我々は以前から、通常液晶の高い配向性試料について、Magic Angle Spinning (MAS) および Magic Angle 近くで角度を変えたNear Magic Angle Spinning (NMAS) の利用により、配向性をみかけ上小さくしてスペクトル解析を容易とすることを提唱した (*J. Am. Chem. Soc.*, 120, 9656-61 (1998))。この方法は、これまでHに適用していたが、本研究では ^{13}C への応用の有効性を示す。昨年の本討論会では、2-vinyloxyppyridine の ^1H の液晶NMR解析を行ったが、今回はこの化合物が液晶中に配向した時の ^{13}C スペクトルを取り上げ、MAS/NMAS 液晶NMRスペクトルの解析を行った。その結果、C-H直接結合定数が決定でき、それより分子全体の配向パラメーターも決定することが出来た。

【実験】 用いた液晶はMerck製ZLI1167である。これに2-vinyloxyppyridine を3%溶かした溶液を試料とした。NMRの測定はVarian UNITY-400WB により行い、MAS実験には固体CP/MASプローブを利用した。測定温度は26℃である。

【結果と考察】 ^{13}C MAS/NMAS スペクトルの測定例を図1に示す。Magic Angle からのずれが小さい時は、 ^1H スペクトルは1次の分裂パターンを示し、この場合は、 ^{13}C の各ピークも1次の分裂の法則に従い、空間的に近くにある ^1H との相互作用により、 $J_{ij} + D_{ij}$ の幅で2本に分かれる単純なパターンを示した。実際にスペクトルから読み取れるのは $J+D$ の絶対値であるので、 J が既知 (等方溶液の値として、通常溶媒や、液晶でも高温測定で観察可能) としても分裂幅から D は一義的には決まらない。しかし、最適化構造を用いて、分子全体の配向パラメーターを最少二乗プログラムSHAPE で決定する際に、 D の符号が適切でない標準偏差が小さくならないことから、妥当な D の値が決定できた (表1)。

ピリジン環の運動と側鎖のビニル基の運動が一体となっていない場合は、ピリジン環のみ

液晶NMR、直接結合定数、Magic Angle Spinning, 2-Vinyloxyppyridine, 配向パラメーター

ふじわら ひであき、 きむら あつおみ、 A. V. Vashchenko

の炭素のDから得られる配向パラメーターは、ビニル基も含めた全ての炭素のDから求めた配向パラメーターと異なるはずであるが、今回の解析結果からは両者に大きな違いはなく、分子全体として運動し配向していると見なされることが分かった：ピリジン環のみの場合は、 $S_{xx} = -0.00492$, $S_{zz} = 0.01040$, $S_{xy} = 0.00934$ (6個の D_{CH} を使用、 $rms = 4.0$ Hz)、これに対して、全ての13個の D_{CH} を使用した場合は、 $S_{xx} = -0.00448$, $S_{zz} = 0.01046$, $S_{xy} = 0.00957$ ($rms = 7.7$ Hz)。これには、昨年の本討論会で報告(番号P51)したように、H α プロトンとピリジン環窒素の間の分子内水素結合によるコンホメーションの安定化効果が大きく寄与していると考えられる。

^{13}C MAS/NMAS スペクトルの解析が適正に行われたことは、上で得られた配向パラメーターを用いて 1H スペクトルの計算を行い、実測スペクトルと比較することにより確かめられる(図2)。図2では、 ^{13}C からの予測スペクトルは実測と良く対応することが分かる。

Table 1 Observed D_{CH} Values(Hz, Magic Angle $+2.7^\circ$)

C6H6	C6H45	C5H5	C4H5	C4H4	C4H3	C3H4	C3H3	CaHx	CaHA	CbHB	CbHA	CbHB
-71.4	44.9	310.3	13.7	105.9	23.0	47.8	-48.9	-66.5	22.7	50.3	-78.0	135.2

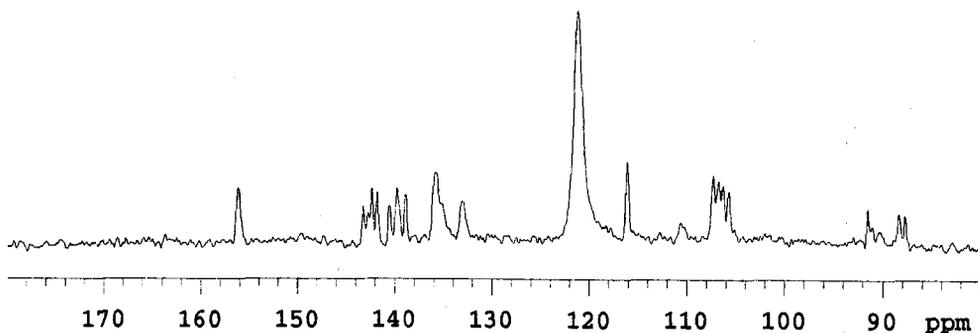


Fig. 1 NMAS ^{13}C spectrum measured at an angle of Magic Angle $+2.7^\circ$.

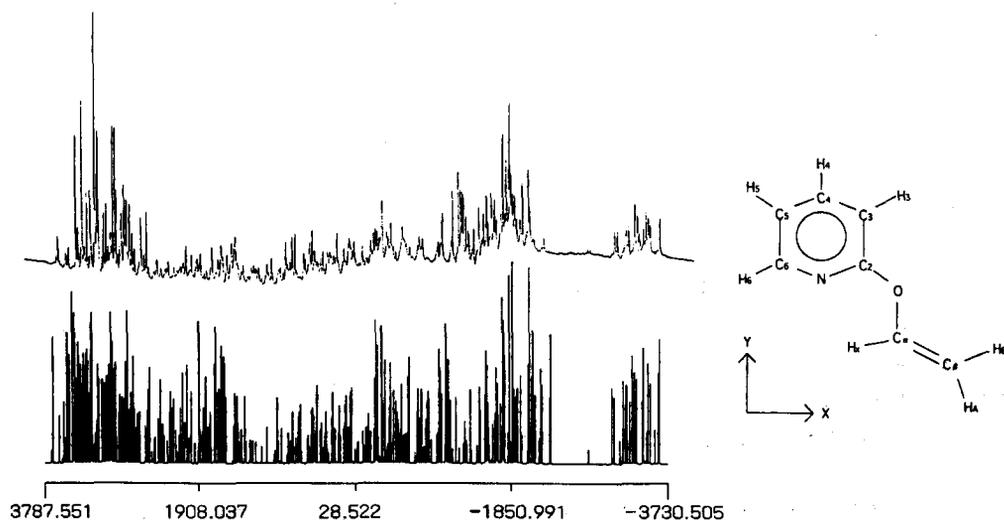


Fig. 2 1H spectra predicted from the ^{13}C spectra (lower) and observed(upper).

²H-NMR Spectra of some solvents in Wood

Jun UZAWA¹, Toshiyuki SHIBATA¹ and Akiko MINAMISAWA²
RIKEN¹ and Faculty of Science, Japan Women's University²

The main molecule which constitutes wood is cellulose and what is abounding next is lignin. Though cellulose has many hydrophilic groups, lignin is hydrophobic. We considered that much information on wood might be obtained by using not only water but hydrophobic solvents and alcohols. A clear inflection point similar to the fiber saturation point in wood (*Chamaecyparis obtusa* Endlicher) /water was observed in a plot of the deuterium quadrupole splitting $\Delta\nu_Q$ of oriented CD₃OH in wood vs. the methanol concentration. The inflection point was somewhat different between a wet and a dried sample. In addition, $\Delta\nu_Q$ of CD₃OH in the wood was definitely dependent on the alignment angle between the Longitudinal direction of the wood and the static magnetic field. From the anisotropy of $\Delta\nu_Q$ the rotation axis of the CD₃ group in methanol, that is the vector along the C-O bond, was found to be aligned parallel to the Longitudinal direction of the wood. The order parameter was very small ($S_{\infty}=0.005$).

1. 序論

昨年度の本討論会で、木材の物性を調べるには一つ的手段としてNMRがあり、広幅NMR、²H-NMRおよびCP/MASにより種々の情報が得られることを発表した。木材は成長する軸方向にセルロースが並び、他の様々な化合物と混ざり合っている。この中には疎水基を多く持つ分子もあり、水ばかりでなく、疎水性の溶媒や両親媒性溶媒との相互作用やこれらの運動も興味ある。本年はヒノキとアルコールおよびシクロヘキサンとの相互作用について²H-NMRにより研究した。その結果、木材がそれぞれの溶媒を吸収する速度の違い、芯に近い部分と辺材に近い部分の運動状態の違い、配向したメタノールの分裂幅と木材の方向性の解析からオーダーパラメータも得られたのでこれらを報告する。

2. 実験

試料として木曽産のヒノキを用いた。木材は成長方向 (Longitudinal direction)、接線方向 (Tangential direction)、半径方向 (Radial direction) をもっている。これを吸収速度の実験には、外径5mmの管に入るように削り長さ約35mm (成長方向) とした。角度依存性の実験では、外径10mmの管に入り、方向が変えられるように立方体にして用いた。装置は角度依存性の測定は電磁石のFX100型装置 (²H共鳴は15.24MHz) を使い、その他はα400型 (61.37MHz) を用いた。

3. ヒノキが各種溶媒を吸収する速度

試料管底部にそれぞれの溶媒を入れて、試料と溶媒が接触したときからの経過時間によるスペクトル変化を調べた。全体の経過の中で、溶媒の吸収速度 (6分経過後のそれぞれのヒノキが吸収した量である強度変化により算出した) は重水、メタノール、シクロヘキサンの順に速くなり、芯より辺が速く、常湿より絶乾の方がいずれも速かった。

重水と重メタノールは配向した²Hの信号が約20分経過後にはみられるが、重シクロヘキサンでは蒸発過程の最後までみられない。重水と重メタノールでは液体に近い自由な

キーワード: ²H-NMR、木材、アルコール、異方性、オーダーパラメータ

著者ふりがな: うざわ じゅん、しばた としゆき、みなみさわ あきこ

状態の成分(A)、配向した成分(C)、配向してはいないが完全に自由でもない中間的な等方的に運動する成分(B)の、大きく分けて三種類の状態が観測される。吸収過程では自由な状態の成分(A)から増加し、次に(B)と(C)が増加する。蒸発過程では最初に(A)が減少し、次に(B)が減少し、最後に(C)が蒸発することがわかった。

4. メタノールの木材への配向

試料管に入れたヒノキに CD_3OH を加えながら、スペクトル変化をみた。核四重極分裂の値と加えたメタノールの量の関係を絶乾と常湿でプロットすると、水における繊維飽和点と同様の変曲点が見られた。さらに、メタノールの各濃度におけるスペクトルを内蔵の波形分離プログラムを使って、配向成分とその他の成分を分離し、各濃度に対する各成分の強度変化を調べた。配向した成分(C)とは別に等方的に運動する成分(A)と(B)があり、芯の部分は等方的に運動する成分の比率が多いことがわかった。

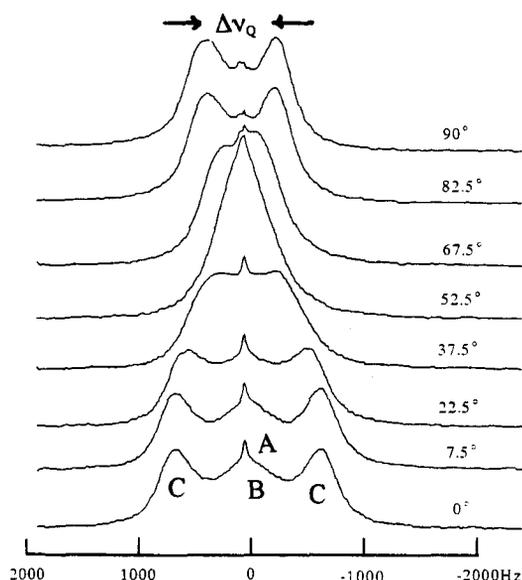


Fig.1 Angular dependent 2H NMR spectra of CD_3OH in wood(Longitudinal to Tangential).

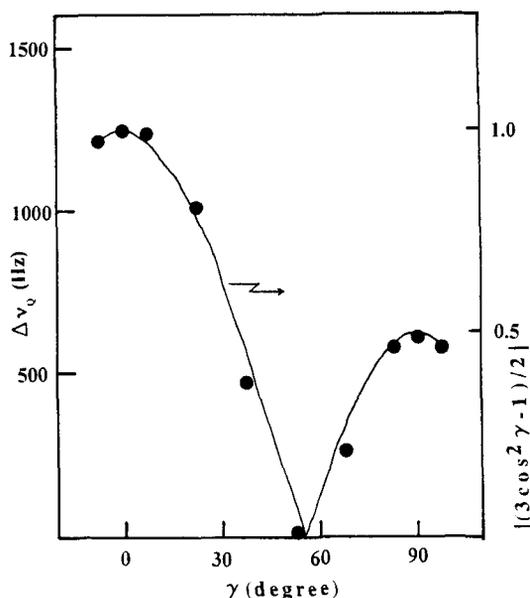


Fig.2 Variation of the Δv_Q with angle γ . Calculated line and observed value ●

次に磁場と成長方向との角度によるスペクトル変化をFig.1に示す。ここで、静磁場方向と成長方向のなす角を γ とし、これが一致したときを 0° とした。一般に、分子軸と磁場の方向を一致させたとき、 2H スペクトルはダブルットになる。図より $\gamma=0^\circ$ のとき、トリプレットライクになっているが、前項で検討したように真ん中のラインは別の成分と考えることができる。成分(C)の分裂幅を Δv_Q とおき、オーダーパラメータを S_{CD} とおくと、 CD_3 基の回転軸(C-O結合方向)が木材の成長方向と一致しているとき、

$$\Delta v_Q = \frac{3}{4} (e^2qQ/h) (3\cos^2\gamma - 1) S_{CD} \quad (1)$$

となる。ここで実線を $| (3\cos^2\gamma - 1) / 2 |$ の計算曲線とし、測定値は●で示すとFig.2となり、良く一致している。ここで、 $\gamma=0^\circ$ のときの分裂幅は1.25KHzであるから、4重極子結合定数を170KHzとおけば、 $S_{CD}=0.005$ となった。エタノールの場合、配向する量は少なく、分裂幅は約560Hzである。この値はメタノールに比べると約1/2であるが、C-C bondが一つ増え回転の自由度が大きくなったためと考えられる。

Direct determination of ^{13}C chemical shift anisotropies of liquid crystals

by combining OMAS NMR and rotor-synchronous pulses

Yusuke Nishiyama, Atsushi Kubo, and Takehiko Terao

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

Abstract: The chemical shift anisotropies of liquid crystals are directly determined by a rotor-synchronous π pulse train under off-magic-angle spinning (OMAS). When a liquid crystal with positive (negative) magnetic susceptibility anisotropy is spun around the axis inclined from the static magnetic field by the angle ε inclined larger (smaller) than the magic angle, the directors are randomly distributed in a plane perpendicular to the spinning axis. The orientation dependence of NMR resonance frequency is averaged by the spinning over a half-rotor cycle. A rotor-synchronous π pulse per a quarter-rotor-cycle re-introduces the orientation dependence, and the resulting FID is expressed by the 0th Bessel function of the first kind $J_0(2C_2t/\pi)$, where C_2 is a coefficient related to the chemical shift anisotropy. The value of C_2 can be determined from the spectrum obtained by the Hankel transformation of the FID.

はじめに

^{13}C NMR 化学シフト異方性は液晶分子の部位ごとの運動性を反映し、さらに OMAS や静止状態において ^{13}C NMR シグナルは先鋭化されて観測されるため液晶相の解析に便利である。OMAS や静止状態におけるピークと MAS や等方相におけるピークのシフト差から化学シフト異方性がもとまるため、ピークの対応関係を得ることが重要である。しかし、筆者の知る限りこのピークの対応関係を得る一般的手法は存在せず、対応関係の決定は困難な仕事であった。そこで OMAS のみから化学シフト異方性を決定する手法を開発する。

化学シフト粉末パターンの復活

磁化率の異方性 $\Delta\chi$ が正 (負) の液晶を静磁場と試料回転軸のなす角 ε がマジックアングル θ_m より大きい (小さい) 角度で高速回転すると、ディレクターが試料回転軸に対して垂直に分布することが知られている。このとき NMR 共鳴周波数は試料回転周期の半分 $\tau_r/2$ で時間依存するようになる。NMR 共鳴周波数のディレクターの配向角 ϕ (図 1) 依存性は試料回転により平均化され、NMR シグナルは先鋭化したピークとして現れる。ここで、 $\tau_r/4$ ごとに π パルスを照射すると試料回転による平均化が妨げられ観測を $\tau_r/2$ おきに行うことにより NMR 共鳴周波数の ϕ 依存性が次のように復活する。

$$\bar{\omega}(\phi) = \frac{2}{\pi} C_2 \cos(2\phi) \quad [1]$$

ここで C_2 は次のように化学シフト異方性をあらわす。

$$C_2 = \frac{1}{2} \gamma B_0 (\sigma_{zz} - \sigma_{xx}) \sin^2 \varepsilon \quad [2]$$

キーワード：液晶、化学シフト異方性、オーダーパラメーター、OMAS

著者ふりがな：にしやま ゆうすけ、くぼ あつし、てらお たけひこ

[1]のような共鳴周波数のとき、FIDは0次の第一種Bessel関数 $J_0(x)$ を用いて次のように与えられる。

$$F(t) = J_0\left(\frac{2}{\epsilon} C_2 t\right) \quad [3]$$

これをFourier変換すると $\pm 2C_0/\pi$ で発散する幅広の線形を示す。線形フィットすることにより化学シフト異方性をもとめるが、やや操作が煩雑である。

線形解析

[3]式より、FIDはBessel関数のみを含む。そこで、 $0 < t < t_{\max}$ の区間でFID $F(t)$ をBessel関数で展開する。この展開は数学的にはHankel変換とよばれており離散的な表記は、

$$F(t) = \sum_{m=1}^{\infty} I(\alpha_m) J_0\left(\frac{\alpha_m}{t_{\max}} t\right) \quad [4]$$

となる。ここで α_m は0次の第一種Bessel関数のゼロ点であり近似的に $\alpha_m \approx (m - 1/4)\pi$ とほぼ等間隔になる。展開係数は

$$I(\alpha_m) = \frac{2}{t_{\max}^2 [J_1(\alpha_m)]^2} \int_0^{t_{\max}} t dt F(t) J_0\left(\frac{\alpha_m}{t_{\max}} t\right) \quad [5]$$

で与えられる。[5]式からスペクトル $I(\alpha_m)$ は $2C_2/\pi$ の位置のみにピークを持つことが期待される。

実験

実験は75.56 MHzの ^{13}C 共鳴周波数、 $\epsilon = \pi/2$ 、33 kHzの ^1H デカップルパワーを用い、試料として $\Delta\chi > 0$ のネマティック液晶p-methoxybenzylidene-p-n-butylaniline (MBBA)を用いて行った。パルスシーケンスを図2に示した。実験結果を図3に示す。時間領域のFIDは図3(a)であり、Fourier変換したスペクトルが図3(b)である。このように幅広のスペクトルが復活していることがわかる。図3(c)に図3(a)をHankel変換したスペクトルを示す。化学シフト異方性の大きさのところに先鋭化したピークとして現れていることがわかる。

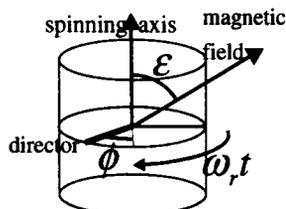


図1. 静磁場と試料回転軸、ディレクターの角度関係

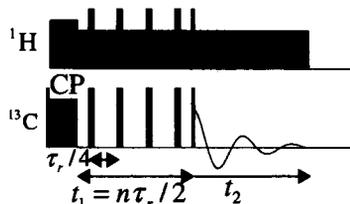


図2. 実験に用いたパルスシーケンス。 t_1 次元で粉末パターンを復活させ2次元展開して観測した。

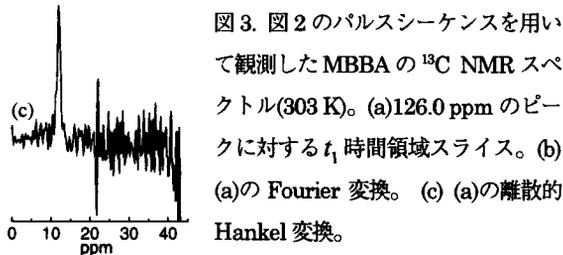
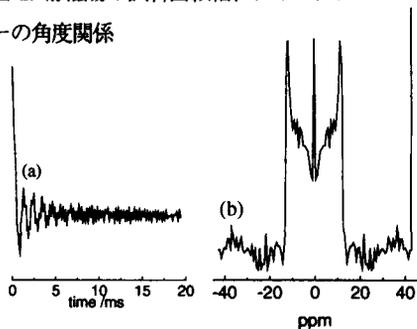


図3. 図2のパルスシーケンスを用いて観測したMBBAの ^{13}C NMRスペクトル(303 K)。(a)126.0 ppmのピークに対する t_1 時間領域スライス。(b) (a)のFourier変換。(c) (a)の離散的Hankel変換。

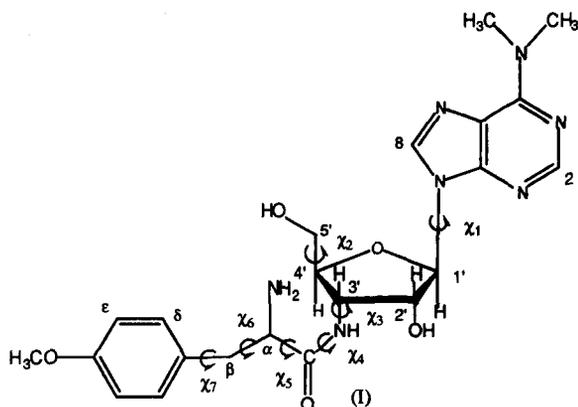
¹Tranter, C. J., Integral Transforms in Mathematical Physics. 2nd Ed. London: Methuen, New York: Wiley (1951).

*Conformational Analyses of Puromycin in a Solution and a Lyotropic Liquid Crystal*Makiko Sugiura¹, Atsuomi Kimura², and Hideaki Fujiwara²,¹Kobe pharmaceutical University,²School of Allied Health Science, Faculty of Medicine, Osaka University

Conformation of puromycin, a broad-spectrum antibiotic, has been investigated in a CD₃OD solution and a lyotropic liquid crystal. The selective relaxation method in which the selective non-inversion relaxation time (T_1^{SN}) and non-selective relaxation times (T_1^{NS}) are measured has been applied to the conformation in a solution. On this method, inter-proton distances have been estimated for several pairs of protons. For a lyotropic liquid crystal, the magic angle spinning and ROESY experiment (ROESY/MAS) has been used and the information of inter-proton distances has been extracted from ROE peak strength. These informations of inter-proton distances in the different media have been analyzed according to the distance geometry algorithm. The resulting conformations in the different media are compared to each other.

【はじめに】ピューロマイシン (I) は、タンパク質合成を阻害することで知られているヌクレオシド系抗生物質である。すなわち、その構造がアミノアシル t-RNA の 3' 末端と類似していることから、リボソーム内でアミノアシル t-RNA と置き換わることによりポリペプチド鎖の伸張を阻害するとされている。しかしその類縁化合物では、その活性に差があることから、作用部位でのコンホメーションが活性を議論するカギになっていることが示唆される。すでにこのものは、固体での X-線結晶解析及び主に ¹H 化学シフト・結合定数を用いた水溶液中でのコンホメーション解析が行われているが、作用部位でのコンホメーションを知る手がかりを得る目的で、水溶液より極性の低い重メタノール (CD₃OD) 中及びリोटロピック液晶中でのコンホメーション解析を試みた。重メタノール中については選択的緩和法により水素間距離を、液晶中については ROESY/MAS 法によって水素間距離情報を得て、それらの距離情報を用いてディスタンスジオメトリー計算を行い、最適コンホメーションを組み立てた。

【実験】市販のピューロマイシン・2塩酸塩 (I・2HCl) を用い、CD₃OD 溶液については 13 mM 濃度に調製し、脱ガス・密封して NMR 測定用サンプルとした。リोटロピック液晶は、パーフルオロオクタン酸セシウム塩 (CsPFO) を重水に溶かして調製し (40:60 by wt%), それに I を溶解 (0.8 wt%) して測定用サンプルとした。液



ピューロマイシン, 選択的緩和法, ROESY/MAS, リोटロピック液晶中, コンホメーション

すぎうら まきこ, きむら あつおみ, ふじわら ひであき

晶の確認は²D NMR によって行った。

NMR の測定は, Varian VXR-500 (¹H:500 MHz, ¹³C:125.7 MHz, ²D:76.7 MHz) を用い, Non-selective T_1 (T_1^{NS}) 及び $^{13}C T_1$ の測定は通常の IR 法で, Selective non-inversion T_1 (T_1^{SNI}) の測定はあらかじめ Gaussian-shaped パルスで選択的に特定の信号を反転させた後 $180^\circ - \tau - 90^\circ$ となるパルスシーケンスを用いて行った。ROESY/MAS の測定はナノプローブを用いた。

【結果と考察】 T_1^{NS} , T_1^{SNI} の測定から σ_{ij} を, $^{13}C T_1$ の測定から τ_c を求め, それらから H-H 間距離を得た。一方, I を CsPFO 液晶に溶解した液晶溶液は, ²D NMR により, RT~32°C で異方性の液晶状態を, 33°C 以上で等方性のミセル状態をとることを確認し, 液晶状態 (26°C), ミセル状態 (35°C) それぞれについて MAS 条件下で ROESY スペクトルを測定した。

Table The inter-proton distances estimated by selective relaxation method and ROE peak strength on ROESY/MAS measurements.

		CD ₃ OD Solution	Liq. cryst.	Micellar
Hi	Hj	$r_{ij}(\text{\AA})$	ROE	ROE
8	1'	2.63~2.70	s	s
8	2'	2.56~2.63		w
8	3'	~3.28	m	w
8	5'b		w	
8	δ			m
8	ϵ			m
1'	2'	2.43~2.69		
1'	4'	2.70~2.91		w
1'	NH		w	m
1'	δ		w	w
3'	5'a	2.69		
3'	5'b	2.46		
3'	NH			w
3'	α	~2.83		
4'	NH		w	w
4'	α	2.94		
4'	δ	3.80~4.14	w	m
5a	NH			
NH	α		w	m
α	β	2.42		w
α	β'	2.60		
α	δ	2.43~2.56	m	m
β	β'			s
β	δ	2.68		w
β'	δ	3.10		m
δ	ϵ	2.37~2.54	s	s
ϵ	OMe		s	s

s: strong m: medium w: weak

液晶状態で 11 個ミセル状態で 18 個の ROE ピークを得た。これら (Table) の距離情報を持って, 可変目的関数法により最適コンホメーションを得る計算を行った。CD₃OD 溶液については, 得られた距離情報に $\pm 0.1\text{\AA}$ を上限, 下限とし, ROESY/MAS 測定からのデータは, Strong: 1.7~2.5 \AA , medium: 1.7~3.0 \AA , weak: 2.0~4.5 \AA とした。糖のパッカリングについては, S または N に固定し, $\chi_1 \sim \chi_7$ を可変にして計算を行った。

得られたコンホメーションは, グリコシル結合の配向はいずれの場合も syn となり, またペプチド部分については, 重メタノール溶液中のものは比較的伸びた形を, 液晶中では折れ曲がったコンホメーションで存在することが示唆された。詳細については現在検討中である。

磁場配向酸性生体膜DMPGに結合したメリチンの
 固体高分解能NMRスペクトル解析
 (姫路工大理) ○則定 和志、内藤晶、永尾隆、辻暁、斉藤肇

Analysys of high resolution solid state NMR spectra
 obtained from melittin bound to magnetically
 oriented DMPG acidic lipid bilayer
 Department of Life Science, Himeji Institute of Technology
 ○Kazushi Norisada, Akira Naito, Takashi Nagao,
 Satoru Tuzi, and Hazime Saito

Melittin is a major component of bee venom, and consists of 26 amino acid residues. We found that DMPC acidic biomembrane interacts with melittin under the acidic condition to show lytic and fusion action by solid state ^{31}P NMR. At the temperature higher than 30°C , DMPG-melittin bilayers exhibit magnetic ordering with the bilayer surface parallel to the magnetic field. The structure of melittin bound to membrane, and the effect of negative charges were investigated by means of solid state ^{13}C NMR spectroscopy. The results indicate that melittin is located at the membrane surface, and the center part is inserted into the bilayers. We also found that negative charges at bilayer surface substantially restrict the motion of melittin.

<序> メリチンは蜂毒の主成分であり、26アミノ酸残基から構成されている。メリチンの膜結合構造を決定することは溶血活性や電位駆動型イオンチャンネルの機構を解明する上で重要である。我々はメリチン-DMPC磁場配向膜を用いてDD(dipolar decoupling)法slow MAS法、MAS法を適用することで中性リン脂質DMPC中でメリチンが2本の α -ヘリックスがPro¹⁴で連結された構造をとっていることを明らかにした。本研究ではこれらの方法を酸性リン脂質DMPG(dimyristoyl phosphatidyl glycerol)に適用して、メリチンと生体膜表面に存在する特に負電荷との相互作用が膜結合構造に与える効果を明らかにすることを試みた。

<実験> 特定のアミノ酸残基のカルボニル基を ^{13}C 標識したメリチンをDMPG二重膜に組み込み、20mM酢酸、100mM NaClを含む pH5.0緩衝液で水和した試料を調製して ^{13}C -NMR測定を行った。カルボニル炭素の磁場配向の状態の化学シフト値 δ を双極子デカップリング法(DD)で、化学シフトの等方値 δ_{iso} を双極子デカップリング-マジックアングル角度回転法(DD-MAS)で、非配向状態の粉末線形をslow-MAS法でそれぞれ測定した。いずれも測定は 40°C で行った。(Fig. 1)

<結果と考察> メリチンを組み込んだリン脂質二重膜の ^{31}P -NMRスペクトルを測定したところ、強磁場中では δ_{\perp} の位置に信号が現れたことから脂質二重膜表面が液晶相で磁場に平行に配向していることが判明した。さらに光学顕微鏡観察の結果、メリチンは膜融合作用によって巨大な一重ないし、数重膜リポソームが形成されることが分かった。したがって強磁場中でリン脂質二重膜は巨大な長楕円形のリポソームを形成し、その長軸を磁場の方向に向けて配向しているものと考えられる。

まず、N端とC端の α -ヘリックスがそれぞれヘリックス軸のまわりに自由回転しているモデルで全体構造を求めた(Fig. 2)。この時 α -ヘリックス軸とカルボニル炭

固体高分解能NMR、磁場配向、メリチン、酸性生体膜、立体構造決定
 のりさだかずし、ないとうあきら、ながおたかし、つじさとる、さいとうはじめ

素のC=O軸 ($\delta 22$ と平行) は平行であるという仮定を用いた。この結果N-端のヘリックスは脂質二重膜面に平行に配向しており、C-端のヘリックスは膜面に垂直に配向していることが分かった。次に、ヘリックス軸回りの異方的な運動を考慮するため two site jump model によるスペクトルのシュミレーションを行った。この結果、 90° 程度の振幅の運動により自由回転の場合と同じ程度に線幅が先鋭になることが分かった。さらに slow MAS NMR スペクトルの特徴的スペクトル線形をシュミレートすることが可能であった。この結果はヘリックス軸まわりの異方的な運動の存在を示唆している。しかし、slow MAS のシュミレーションスペクトルの線幅を two site jump wobbling model で解析したところ実測よりも広くなることから、メリチンはヘリックス軸まわりの運動に加えて、線形に大きな影響を与える他の運動成分が存在することを示唆している。またN端のヘリックスとC端のヘリックスでは運動の振幅が異なっていることがスペクトル解析から分かった。この様に磁場配向二重膜を用いてカルボニル炭素の化学シフトテンソルを解析することにより膜結合メリチンの動的構造についての詳細な解析が可能になってきた。

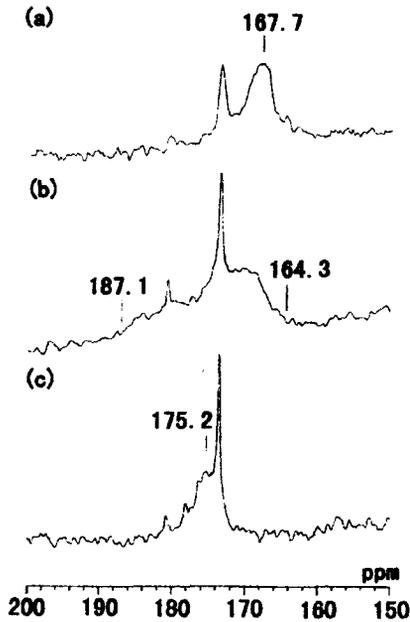


Fig. 1: ^{13}C NMR spectra of melittin, DMPC bilayers at 40°C
 (a) oriented (b) slow MAS
 (c) MAS (2000Hz)

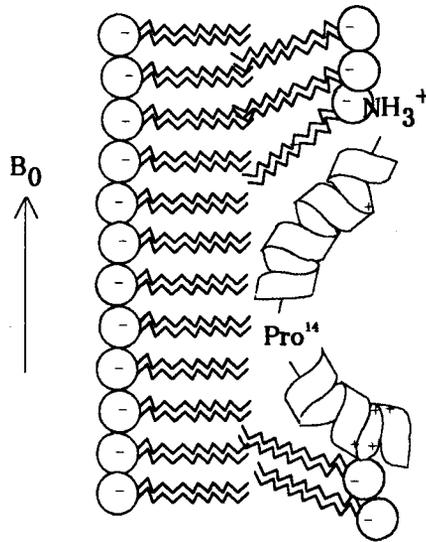


Fig. 2: Schematic representation of melittin bound to DMPG bilayer

多核種NMRによる高分子電解質中のイオンの拡散と 高分子マトリックスの拡散状態の解析

(物質工学工業技術研究所¹、ユアサコーポレーション²、機能水研究所³)

○早水紀久子¹、相原雄一²、杉本恭子¹、W. S. Price³,

The diffusion phenomena of ions and matrix polymers studied by multi-nuclei PGSE NMR method.

K. Hayamizu, Y. Aihara, K. Sugimoto, and W. S. Price

National Institute of Materials and Chemical Research, Yuasa Corporation, and Water Research Institute

The diffusion coefficients in the lithium polymer electrolytes are measured for the lithium, anion, and matrix polymer. The polymer is the cross-linked block polymer of PEO and PPO and the salt is $\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$. The anions in the electrolytes clearly shows so-called "anomalous" diffusion where the apparent diffusion coefficients vary systematically depending on the interval of the pulsed gradients. Also the diffusion curves of the matrix polymers are not straight lines and can be analyzed by two components. The diffusion mechanisms of the anion and the lithium are precisely discussed.

リチウム塩をドーブした高分子電解質は次世代の全固体リチウム二次電池への応用のために活発な研究開発が行われているが、高分子中でのイオン伝導機構はまだ明らかにされていない。一般的には大きなイオン伝導度をもつ種々の高分子電解質を作製することに主眼が置かれ、リチウムイオンとアニオンのどちらが伝導度に寄与しているかも明らかでない。ここでは架橋したポリエチレンオキサイド (PEO) とポリプロピレンオキサイド (PPO) のブロックポリマーに $\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ をドーブした高分子電解質のリチウムとアニオンの自己拡散係数をパルス磁場勾配NMR法で30℃～80℃の範囲で測定した。

パルス磁場勾配法NMRでは2つの磁場勾配の間の時間 Δ を変えても自由拡散であるならば拡散係数の測定値は変化しない。これは溶液やゲルの系で成り立つことを我々は報告している。しかしながら固体系で Δ を変えながらアニオンの拡散を測定すると見かけの拡散係数値が系統的に変化することが分かった。この実験結果は、均一系の'ordinary' diffusion に対してフラクタルなネットワーク中を無極性の小さな分子が拡散する 'anomalous' diffusion と呼ばれる現象に近く、見かけの自己拡散係数を Δ でプロットした曲線を $\langle r^2(t) \rangle = 6D\Delta \alpha t^\kappa$ としてシミュレーションできるが、定義による $\kappa \leq 1$ は必ずしも成立せず温度が高いうちは κ は1近くなるが、室温付近ではマイナスになる。これは電荷をもつイオンの拡散であること、系全体では中性が保たれているを考慮すれば、理論式に合わないことは当然であろう。拡散半径が小さい場合 (Δ が小さいことに対応) には拡散係数は大きく、小さな領域では激しく位置を変えているが、 Δ が大きくなると平均的にゆっくりと位置を移動しているといえる。測定が容易であるアニオン拡散と、リチウムやポリマーの拡散と関連づけて討論する。

PGSE NMR、自己拡散係数、イオンの拡散、架橋高分子の拡散

はやみずきくこ、あいはらゆういち、すぎもときょうこ、Price W.S.

Structural and Dynamic Behavior of Alkali Metal Ions in Dextran Sols and Gels by ³⁹K-NMR, solid state ¹³C- and ²³Na-MAS/NMR Spectroscopy.

Tokuko Watanabe

Biomaterial Chemistry, Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

Formation of three dimensional network structure of polysaccharide chains in dextran solution is enhanced only in the presence of K⁺ ions. The author reported that K⁺ ions are captured by ionophore-like cages introduced by three dextran chains via potassium ion bonding which is a type of the ion-dipole interaction. In this paper chemical shift and linewidth of ³⁹K-NMR resonance is analyzed by a fast exchange model between three species, i.e., K⁺aq (free ion in the solution), K⁺glu (nonspecifically bound to OH group of glucose) and K⁺cage (specifically trapped in the cage) to obtain fraction of each species in the systems with varying K⁺ ion concentration in dextran T70(30w/w%) aqueous solution or with varying T70 dextran concentration in 1.5 M KCl aqueous solution. The result by solid state ¹³C- and ²³Na-MAS/NMR showed the polysaccharide chain in dextran/K⁺ gel have an extreme uniform conformation and motional freedom of molecule as like as a plastic polymer in cubic phase.

[序] 著者らはデキストランは非イオン性多糖であるにもかかわらず K⁺イオンを選択的に捕捉し、水を内包した弾力性のある3次元網目構造を形成することを示した⁽¹⁾。K⁺イオン以外のアルカリ及びアルカリ土類金属イオンに対してはこの様な機能は認められない。先のNMR 討論会において3本の糖鎖によって形成される6個の酸素原子がつくるクラウンエーテル様のポケットに K⁺イオンが取り込まれることおよびゲル骨格ドメインの密度やポアサイズを推定し報告した。本報告においては、デキストラン/水/KCl and/or NaCl 共存系における3次元網目構造形成過程のダイナミックスと Na⁺イオンの共存効果について議論する。

[実験] デキストラン T70 (Pharmasia、分子量約 70000) の水溶液 (高分子濃度 1~35w/w%) に 80℃で塩化カリウムを 0.1~2.5 Mの濃度範囲で加え、よく攪拌する。室温まで冷却する過程で網目構造が形成され初め、静置する事により徐々に平衡状態に到達する。NaCl は 0.5 から 2.5 Mまでの範囲で KCl 添加時に同時に加えられた。

NMR の測定は MSL400 (Bruker) により 23℃で行った。³⁹K-, ²³Na-および ¹³C-核の共鳴周波数はそれぞれ 18.7, 105.8, および 100.58 MHz である。²³Na-および ¹³C-核の NMR には固体 MAS 法 (回転速度 5000rpm) を用いた。

[結果と考察] Fig.1 に 1.5M KCl 水溶液にデキストランを徐々に加えたときの ³⁹K-NMR の化学シフトと T₂緩和速度及び存在する化学種の組成を示す。化学種の組成は水和された K⁺イオン (K⁺aq, ○)、グルコース環中の OH 基と非特異的に結合している K⁺イオン (K⁺glu, ◇)、糖鎖のポケットに捕捉された K⁺イオン (K⁺cage, 田) の3種の

デキストラン、水、³⁹K-NMR、²³Na-NMR、糖鎖

○わたなべ とくこ

化学種間の早い交換による平均化がおきているとして最小二乗法により解析された結果である。デキストラン濃度の増加と共に初期状態の (K^+_{aq}) だけの状態から徐々に (K^+_{glu}) が増加し、ポケットを形成するに十分なデキストラン濃度に達すると (K^+_{cage}) 種が急激に増加し、系において連続的な架橋が形成されて行く様子が明らかとなった⁽²⁾。T70(30w/w%)水溶液に KCl を添加した場合には、糖鎖のポケットに捕捉された K^+ イオン濃度は 1.5 M 以上には増えず余分の K^+ イオンは他の2つの化学種として存在しており、架橋構造に対する推定⁽¹⁾が証明された。

Fig.2 に ^{13}C -MASNMR スペクトルを示す。金属イオンの添加により僅かにコンホメーション変化がみられるが、系におけるグルコース環のコンホメーションは極めて一樣なこと、cubic phase にあるプラスチック結晶様の運動性を示すことなどについて T_1 緩和時間の結果や ^{23}Na -MAS/NMR の結果も合わせて議論する。また、水プロトンの T_2 緩和時間の測定から Na^+ イオンの共存により K^+ イオンにより形成される網目構造の熱安定性が 40°C 高くなる理由についても考察する。

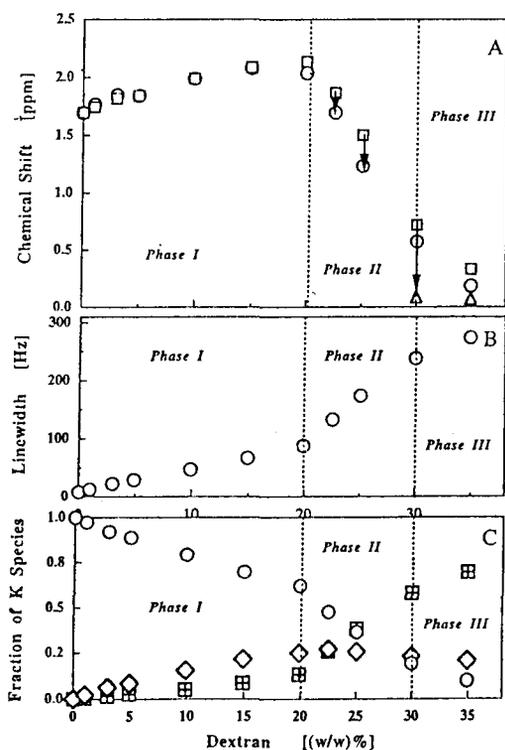


Fig. 1 Influence of the T70 dextran concentration on the chemical shift (A) and the linewidth (B) of typical ^{39}K -NMR spectra (23°C) and on the calculated fraction of the coexisting K^+ species (C).

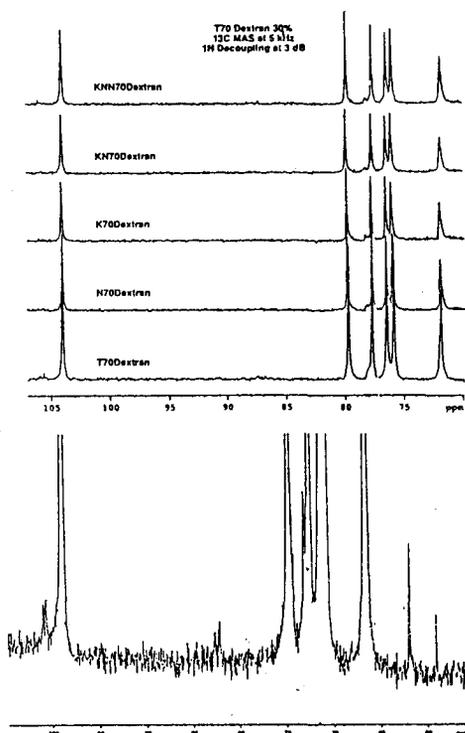


Fig. 2 ^{13}C -NMR spectra measured at 23°C at 5 kHz of MAS. (A) 1H decoupling at 3 dB, NS=1024, (B) 1H decoupling at 6 dB, NS=16384.

[謝辞] 本研究は文部省科学研究費基盤研究C及びFraunhofer IBMT との共同研究のもとに行われた。

[文献] (1) T. Watanabe, A. Ohtsuka, N. Murase, P. Barth and K. Gersonde, Magn. Reson. Med., **35**, 697 (1996).
(2) T. Watanabe, J. Leisen and K. Gersonde, (to be submitted)

自発的磁場配向膜を用いた膜結合生理活性ペプチドの 高分解能構造解析

(姫路工大・理) ○内藤 晶・永尾 隆・小畑真紀・辻 暁・斉藤 肇

Structure determination of biologically active peptide bound to magnetically oriented lipid bilayers

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

Akira. Naito, Takashi. Nagao, Maki. Obata, Satoru. Tuzi, and Hazime. Saitô

Structure and dynamics of dynorphin bound to dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) bilayers and the property of the magnetic ordering in the lipid bilayers were investigated by means of solid state ^{31}P and ^{13}C NMR spectroscopy. It is found that dynorphin-DMPC lipid bilayer systems form magnetically oriented bilayer phase with the bilayer surface parallel to the magnetic field. Structure and dynamics of membrane bound dynorphin were further determined using this magnetically oriented lipid bilayer systems. The ^{13}C chemical shift values of dynorphin bound to membrane were measured in the fast MAS, slow MAS and static conditions and the results indicate that the N-terminus region forms α -helix with the axis direction perpendicular to the bilayer surface and the center and C-terminus regions are located in the bilayer surface.

【序】 磁場配向脂質二重膜に結合している生体分子においては磁気異方的相互作用の観測が可能となり、膜結合生体分子の構造に関する高分解能情報を与えることが期待できる。我々は両親媒性生理活性ペプチドダイノルフィンがリン脂質二重膜に結合することで、自発的に磁場に配向する新しい磁場配向系を最近見いだした。さらにこの磁場配向脂質二重膜に強く結合する膜結合生体分子の二次構造や膜配向状態の決定にカルボニル炭素の化学シフトテンソルの解析が有用であることを明らかにした。この自発的磁場配向膜を用いて膜結合生体分子の膜配向構造情報を得るための基礎と応用について報告する。

【実験】 生理活性ペプチドであるダイノルフィンおよび同位体標識ダイノルフィンはペプチド合成機により固相法で合成した。モル比 1:5 のダイノルフィンと DMPC をメタノールに溶かし、有機溶媒を完全に除去してから、pH7.5 の 20 mM Tris 緩衝液で水和して、脂質二重膜小胞体を作成した。NMR 測定は Chemagnetics 社製固体専用 CMX-400 NMR 分光器を用いて、高出力デカップリングパルス照射下、静止試料、低速 MAS、高速 MAS の条件で測定を行った。

【結果】 ダイノルフィン/DMPC 二重膜系における静止 ^{31}P NMR スペクトルの温度変化を観測したところ、40 °C では -12 ppm の位置に先鋭な信号が現れ、20 °C では軸対称粉末線形を示し、0 °C では 0 ppm の位置に再び先鋭な信号が現れた。温度を再び 40 °C に上昇することによって、より先鋭な信号が -12 ppm に現れた。この結果は 40 °C において脂質二重膜が楕円形小胞体を形成し膜面を磁場に平行に向けて配向していることを示している。さらに一旦温度を下げてから、上昇させた場合により高い磁場配向状態の形成が観測された。

磁場配向脂質二重膜、楕円形小胞体、固体高分解能 NMR、両親媒性ペプチド、化学シフトテンソル

ないとう あきら、ながお たかし、おばた まき、つじ さとる、さいとう はじめ

磁場配向二重膜に結合したダイノルフィンの二次構造および膜配向の状態を解析するため、膜結合[1-¹³C]Gly³-ダイノルフィンの¹³C NMR測定を行った。

図1に[1-¹³C]Gly³-ダイノルフィン/DMPC磁場配向二重膜の¹³C NMRスペクトルを示す。高速MASで得られた¹³C等方化学シフト値からGly³近傍でα-ヘリックス構造を取っていることが分かった。磁場配向状態の¹³C化学シフト値は等方化学シフト値から5.3 ppm高磁場に信号が現れた。また、低速MASの実験で得られた軸対称粉末線形の線幅が15.9 ppmと大きく減少していることから、ダイノルフィンは膜と強く結合しているものの、ヘリックス軸まわりで揺らぐ大きな振幅の運動を持つことを示唆している。

【考察】 [1-¹³C]Glyのカルボニル炭素の化学シフトテンソルの主値はα-ヘリックスを形成する場合($\delta_{11}=243$ ppm, $\delta_{22}=178$ ppm, $\delta_{33}=98$ ppm)であることが知られており、 δ_{22} 軸はC=O結合方向に一致する。さらにC=O結合方向はヘリックスを形成する場合ヘリックス軸にほぼ平行である。加えて、ヘリックス軸周りで揺らぐ振幅の大きな運動が存在している場合、ヘリックス軸と磁場のなす角 θ と化学シフト値との間に

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{iso}} + (1/3)(3\cos^2\theta - 1)(\delta_{\parallel} - \delta_{\perp}) \quad (1)$$

の関係が成立する。ここで、 δ_{obs} は配向状態の化学シフト値、 δ_{iso} は高速MASによって得られる等方化学シフト値、 $\delta_{\parallel} - \delta_{\perp}$ は低速MASによって観測される異方的化学シフト値である。[1-¹³C]Gly³の各実測化学シフト値から(1)式を用いて $\theta=90^\circ$ が得られ、ダイノルフィンのGly³近傍のヘリックス軸は膜面に対してほぼ垂直に挿入されていることが判明した。ダイノルフィンの中央部には親水性アミノ酸残基が多く存在することを合わせて考慮すると、図2に示す様にダイノルフィンはN端を膜内に挿入し、中央からC端にかけて膜外に露出した状態で膜に結合している構造が考えられる。

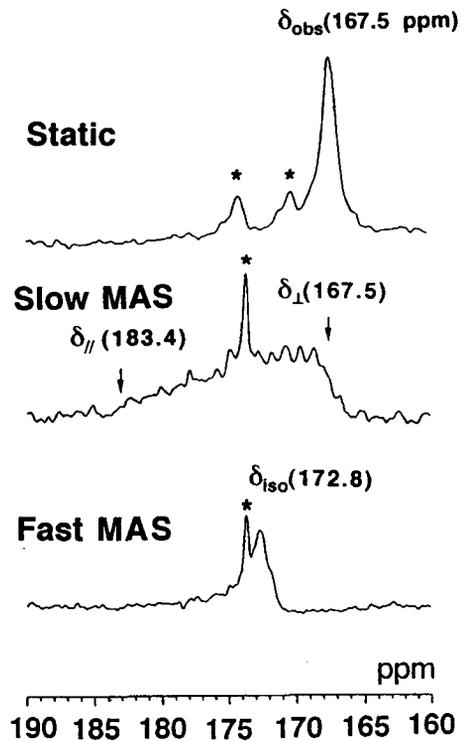


Fig. 1 ¹³C NMR spectra of dynorphin-DMPC bilayer system. *: ¹³C=O of DMPC.

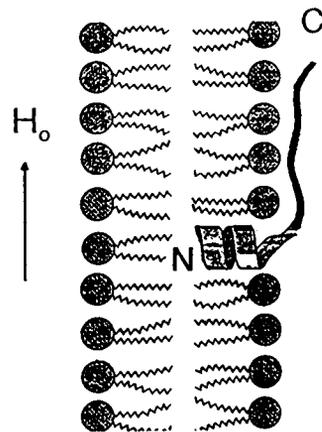


Fig. 2 Schematic representation of the structure of dynorphin bound to lipid bilayers.

Substituent Effects of the NMR Chemical Shifts on Aromatic Amides

Department of Applied Chemistry¹; Instrumental Analysis Center²

Yokohama National University

79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240-8501

○Tomoaki Yuzuri¹, Seiko Kondo¹, Hiroko Suezawa², Kazuhisa Sakakibara¹,
Minoru Hirota¹

We have been investigated the substituent effects of the NMR chemical shifts on the various series of the aromatic amides (benzanilides, acetanilides, etc.). Especially, amide's ¹⁵N-NMR chemical shifts are very sensitive for substituents on the aromatic rings. The Hammett plots of chemical shifts are separate into two regression lines with *meta* and *para* derivatives in amide's ¹⁵NH and ¹³C=O. The slope of Hammett plot usually shows positive value, but we found the negative slope in some case. Also, we dealt with Taft's DSP equation and Yukawa-Tsuno's equation. Amides ¹⁵N chemical shifts are influenced by resonance effect, so that resonance demand is very large. These substituent effects are caused by the inductive and resonance effect from the ring substituents and the π -polarization from the dipole of the substituent.

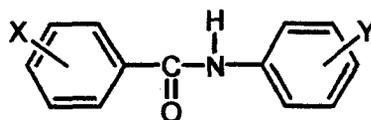
【目的】

我々はこれまで様々な系列の芳香族アミド類のNMR化学シフト値に対する置換基効果について研究してきた。特にアミド窒素の¹⁵N核の場合には置換基効果に対し敏感であり、分子内にどのような双極子構造およびこれに導かれる局所分極構造をとるかによって説明してきた。NMRの化学シフトのHammettプロットは通常正の傾きを示すが、この化合物系列では負の傾きを示す原子があり、また、メタ体とパラ体で異なったプロットを与えることがわかった。この電子的置換基効果は、置換基からの誘導効果、共鳴効果とともに、置換基の双極子による π 分極の結果として生じる現象と説明できる。また化学シフト値をHammettプロットする他、二元置換パラメータ解析も行い、電子的置換基効果に対する知見を得ることを目的とした。

【実験】

化合物は、全て置換アニリンを適当な溶媒に溶解させ、対応する有機酸の酸塩化物(有機酸に塩化チオニルを作用させ調製する)を滴下することにより合成した。

NMR測定は、JEOL FX-90Q、JEOL EX-270を用い、室温、濃度0.2M(¹⁵N)、0.05M(¹³C、¹H)で、主にジメチルスルホキシド-d₆で行った。

X or Y: *m-p*-15 substituents

X or Y Bezanilide

アニリド、NMR化学シフト、置換基効果、Hammettプロット、局所分極

○ゆずり ともあき、こんどう せいこ、すえざわ ひろこ、さかきばら かずひさ、
ひろた みのる

【統計処理方法】

(1) Hammettプロットによる解析

$$\delta \text{ (化学シフト値)} = \rho \cdot \sigma + \delta_0$$

σ : Hammett定数、 ρ : 傾き = 置換基効果の大きさの尺度

(2) TaftのDSP式 (二元置換パラメータ式) による解析

Hammettプロットにおけるメタ、パラ体での分離という特異的な置換基効果をさらに検討する目的で、化学シフトに対する誘導効果 (I 効果) と共鳴効果 (R 効果) の寄与を定量的に見積もるために、TaftのDSP式を用いて、その係数 ρ_I 、 ρ_R から置換基がNMR核に及ぼすI効果とR効果の寄与の割合を定量的にI (%), R (%)として求めた。

$$\text{DSP式} \quad \delta \text{ (化学シフト値)} = \rho_I \cdot \sigma_I + \rho_R \cdot \sigma_R + \delta_0$$

(3) 湯川-都野式による解析

DSP解析の結果を踏まえ、メタ体に対してパラ体がどれだけR効果を受け易いのかを、化学シフトに対して湯川-都野プロットを行い、共鳴要求度 r として定量的に評価した。(メタ体とパラ体のずれがなければ $r=1$)

$$\text{湯川-都野式} \quad \delta p = \rho_m (\sigma p^0 + r \Delta \sigma_R) + \delta_{0,m}$$

【結果および考察】

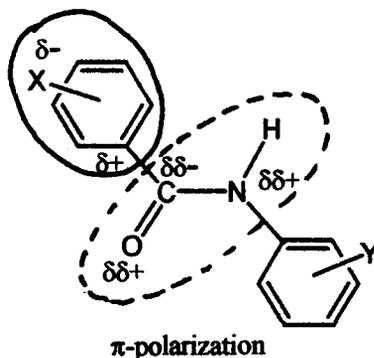
化合物系列により異なるが、ここではX置換ベンズアニリドについてのデータを示した。

方法 (1) よりHammettプロットの分離は右の ρ_p と ρ_m から、 ^{15}N 核で大きく、他の化合物系でも同様であった。方法 (2) では観測核により多少異なるが、メタ体ではI効果の寄与が大きい。特にY側の置換基を変化させた場合、パラ体ではR効果がかなり大きく、窒素原子上の孤立電子対が置換基と芳香環を通して直接共鳴できるためと考えた。方法 (3) から共鳴要求度 r が ^{15}N 核の場合、 ^{13}C 、 ^1H 、核に比べ極めて大きく、パラ体でR効果が非常に大きいという (2) の結果と一致している。

またX置換ベンズアニリド系では、 ^{13}C OでHammettプロットの傾きが負になっているが、右図のように、Xが電子吸引基になるとX置換基を含む芳香環に δ^- 、 δ^+ のように双極子ができ、これが隣接するアミド結合の共役 π 電子系に対して、X=Hの場合を基準としたときに $\delta \delta^-$ 、 $\delta \delta^+$ という向きの局所分極を生じる。このため、電子吸引基となるほど ^{13}C O化学シフトが高磁場シフトすると説明される。他の系列でもこの現象が観測される原子があるが、化学シフトの置換基効果は通常は共鳴効果の方が相対的に大きいので、局所分極の効果は相対的に小さく、Hammettプロットの傾きは正である。

X置換ベンズアニリドにおける解析

方法	観測核		
(1)	^{15}N	$\rho_p = 3.77$	$\rho_m = 1.35$
	N^1H	$\rho_p = 0.42$	$\rho_m = 0.39$
	^{13}C	$\rho_p = -2.39$	$\rho_m = -3.32$
(2)	^{15}N	I (%) = 32.0	R (%) = 68.0
	N^1H	I (%) = 34.3	R (%) = 65.7
	^{13}C	I (%) = 77.2	R (%) = 22.8
(3)	^{15}N	$r = 7.31$	
	N^1H	$r = 1.43$	
	^{13}C	$r = -1.49$	



Ab initio SCF and Møller-Plesset perturbation calculations have been carried out for the dihedral angle dependence of the vicinal proton-proton coupling constants, ${}^3J_{\text{HH}}$, in ethane, methylamine, and methanol molecules. The four contributions to ${}^3J_{\text{HH}}$ have been computed with the four different basis sets. The Fermi contact (FC) contribution was largest and the spin-dipole (SD) contribution was smallest. The orbital paramagnetic (OP) and diamagnetic (OD) contributions provided comparable magnitudes of opposite signs. Only the FC contribution showed basis set dependence and large second-order correlation effect. The second-order correlation in the FC term amounted to a half of its SCF value in magnitude with opposite sign. However, the third- and fourth-order correlations in the FC contribution were negligible. The calculated SCF values of ${}^3J_{\text{HH}}$ were higher than the experimental couplings, but the correlated ${}^3J_{\text{HH}}$ values were small compared to the experimental ones.

TABLE I. Calculated and experimental Fourier coefficients(Hz) for the individual contribution to ${}^3J_{\text{HH}}$ in ethane.^a

Basis set Fourier coefficients	[5s3p1d/4s1p]				[7s4p2d/11s2p]			
	C_0	C_1	C_2	C_3	C_0	C_1	C_2	C_3
SCF values								
FC	9.79	-1.04	7.50	-0.07	10.26	-0.95	7.92	-0.05
SD	0.08	0.13	0.09	0.00	0.09	0.14	0.09	0.00
OP	1.18	-1.26	-0.05	-0.01	1.41	-1.50	-0.05	0.00
OD	-1.55	1.62	0.09	0.01	-1.56	1.63	0.09	0.01
total	9.51	-0.54	7.64	-0.07	10.19	-0.68	8.06	-0.04
Second-order correlation in FC	-4.14	0.55	-1.37	-0.11	-4.30	0.58	-1.36	-0.11
Third-order correlation in FC	-0.13	-0.12	-0.14	0.00				
Fourth-order correlation in FC	0.30	-0.04	0.02	0.01				
Total correlated value ^b	5.54	-0.15	6.16	-0.18	6.06	-0.26	6.59	-0.14
Experimental value ^c	8.02	-1.20	7.00					

^a Used geometry is $R_{\text{CC}} = 0.1534$ nm, $R_{\text{CH}} = 0.1093$ nm, and $\angle\text{HCH} = 109^\circ 45'$.

^b The third- and fourth-order correlations of [5s3p1d/4s1p] are used for [7s4p2d/11s2p].

^c Taken from J. San-Fabián, J. Guilleme, E. Díez, P. Lazzeretti, M. Malagoli, and R. Zanasi, *Chem. Phys. Lett.* **206**, 253 (1993).

キーワード: 核スピン結合定数、理論計算、電子相関効果

○ばばたけひさ、ふくいひろゆき



Development of a compact MR Microscope using a 1.0 T Permanent Magnet

Tomoyuki Haishi, Yoshimasa Matsuda, Takaaki Uematsu, Katsumi Kose

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8573, JAPAN

The limit of spatial resolution in NMR microscopy is believed to be $\sim (10 \text{ micron})^3$ under a best condition: large amount of NMR sensitive nuclei (protons), narrow line width, and use of a high magnetic field ($\sim 10 \text{ T}$). However, there are a lot of useful MR microscope applications in which spatial resolution around a hundred micron cube is sufficient. In such cases, permanent magnets have several advantages over superconducting magnets in cost, maintenance, sample access, space, and portability. However, because high field ($\sim 1.0 \text{ T}$) permanent magnets using high performance magnetic material (e.g. *NdFeB* magnets) have a large temperature coefficient (-0.1 \%/degree), long term drift of the resonance frequency should be overcome if several hours' measuring time is required. In the present study, we have developed a compact MR microscope with a 1.0 T permanent magnet by achieving a stable field-frequency relation and acquired MR microscopic images at 50 microns in-plane pixel size and 200 microns voxel volume less than a hour.

<はじめに>

MR マイクロスコープ(MRM)の空間分解能の限界は、多量の水素原子核、細い線幅、そして超伝導磁石を用いた高磁場($\sim 10 \text{ T}$)を用いた最良の条件下で、 $\sim (10 \text{ }\mu\text{m})^3$ 程度であろう。いっぽうで、MR マイクロスコープは $\sim (100 \text{ }\mu\text{m})^3$ 程度の空間分解能でも十分に有益な応用が数多く存在し、静磁場発生に永久磁石を用いれば、導入コスト、メンテナンス費用、試料へのアクセス、そして可搬性などの点において超伝導磁石と比較して有利である。ところが、高磁場永久磁石(1.0~1.5 T)をMRMで用いる場合の歳差運動周波数の温度ドリフトは、永久磁石を用いた臨床用MRI(0.2~0.3 T)と比較した場合、同一温度変化に対して数倍も大きなものとなる。よって、本研究では、静磁場強度とRFユニットの中心周波数との安定な関係を確立するための技術開発を行い、永久磁石を用いたコンパクトなMRMシステムを構築した。

<装置>

Fig.1に、本研究で開発を行ったMRMの全体像を示す。Fig.1(右側)は、本システムのMRIユニット(総重量約80 kg, 可搬型)であり、1.5 T臨床用MRIの静磁場を利用したMRMシステム¹⁻³⁾のために開発されたものを用いた。各ユニットは19インチラックに収められており、上段から、(1)パルス系列および画像再構成を制御するPC(Windows95)、(2)高周波変調・検波ユニット(周波数帯域35~65 MHz)、(3)3軸勾配磁場電源($\pm 15 \text{ V}$, $\pm 5 \text{ A}$)、そして(4)RFパワーアンプ(50 W)である。Fig.1(左側)は、高磁場永久磁石(1.0 T at $22 \text{ }^\circ\text{C}$, 住友特殊金属製)であり、サイズは62w cm \times 75h cm \times 75d cm, ギャップは61 mm, 均一領域は12 ppm (20 mm dsv), 総重量は約1,400 kgである。また、鉄-ネオジウム-ボロン系(*Nd-Fe-B*)の磁性材料を用いているため、磁場の温度係数は約 $-0.1 \text{ \%/}^\circ\text{C}$ という比較的大きい値となっている。これは、この磁石での歳差運動周波数が、 1°C の温度変化で約40 kHzも変動することを示している。また、3軸勾配磁場プローブとして、(a)外径10 mmおよび(b)外径20 mmのサンプル用試験管のものを開発した。なお、それらの勾配コイルの効率は、それぞれ、(a) $G_x: 2.9 \text{ G/cm/A}$, $G_y: 2.8 \text{ G/cm/A}$, $G_z: 2.6 \text{ G/cm/A}$, (b) $G_x: 1.2 \text{ G/cm/A}$, $G_y: 1.1 \text{ G/cm/A}$, $G_z: 1.7 \text{ G/cm/A}$ であった。

マイクロスコープ, 永久磁石, navigator echo

はいしともゆき, まつだよしまさ, うえまつたかあき, こせかつみ

<共鳴磁場-周波数コントロール>

永久磁石の温度ドリフトによって変動する静磁場強度(歳差運動周波数)と, MRI ユニットの中心周波数の関係を一定に保持するために, (1)温度コントロールユニットと(2) NMR ロックを併用した. (1)温度コントロールユニットは, ポリスチレン板(30 mm 厚)による磁石全体の断熱と, ラバー・ヒーター(20×20 cm²), Pt 抵抗体温度センサー(100 Ω), そして温度コントローラ電源で構成される. また, NMR ロックは, 位相敏感検波されたスピン・エコー信号(TE = 6 ms)によって, 歳差運動周波数と MRI ユニットの中心周波数との周波数シフト f_{shift} を計測し, 高周波発振器(FSW01, DST 製)の発振周波数 f_0 を更新する“ナビゲーター・エコー法”を用いた.

<撮像実験と結果>

開発を行った MRM システムの評価のために, 撮像実験を行った. 被写体は内径 9.0 mm の試験管に挿入したセロリである. パルスシーケンスは TR/TE = 500/15 ms の 2D-SE 法で行った. FOV は(12.8 mm)², 画素サイズは(50 μm)², スライス厚は 2 mm, 画素数は 256², 信号積算回数は 4 回, 画像取得時間は約 8 分であった. また, 直径約 19.5 mm のサクランボ(山形産)の撮像も, 3D-GE 法を用いておこなった. TR/TE = 100/5 ms, FOV は(25.6 mm)³, 画素サイズは(200 μm)³, 画素数は 128³, 信号積算回数は 1 回, 画像取得時間は約 27 分であった. なお, 撮像時間が比較的短かったため, ナビゲーター・エコー法は用いなかった.

Fig.2 に, 本システムで撮像したセロリの断層像を示す. このように, 8 分程度で面内で 50 μm の空間分解能の画像を取得する事が出来た. また, Fig.3 に, 三次元画像として取得されたサクランボの断層像 1 枚を示す. この様な画像も容易に取得する事ができた.

<まとめ>

メンテナンスが不要で設置面積の小さな NMR マイクロスコープを実現するために, 高磁場(1.0 T)の永久磁石を用いた MRM システムを開発した. 永久磁石の温度ドリフトを克服するために, 磁石の断熱, 温度コントロール, そしてナビゲーター・エコー法を併用した結果, RF ユニット発振器の共鳴周波数へのロックの精度は~20 Hz 以下となった. 温度係数の大きな永久磁石を用いても, 3D 画像のような長期間の撮像が可能であると結論した.

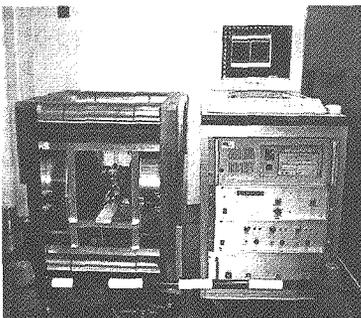


Fig.1: MR Microscope using a 1.0 T Permanent Magnet

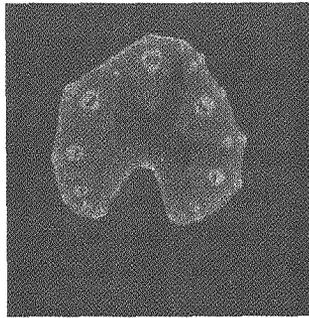


Fig.2: Cross sectional image of a celery stem acquired with 2D-SE (TR/TE = 500/15). FOV: (12.8 mm)², Image matrix: 256², matrix size: (50 μm)². Slice thickness: 2 mm, NEX: 4.

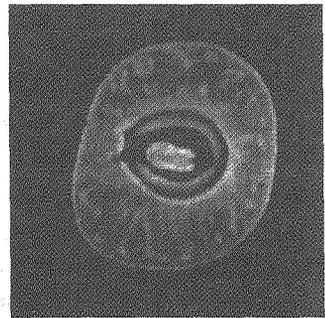


Fig.3: Cross sectional image of a cherry fruit acquired with 3D-GE (TR/TE = 100/5). FOV: (25.6 mm)³, Image matrix: 128³, matrix size: (200 μm)³, NEX: 1.

<参考文献>

- 1) K. Kose, et al, 6th ISMRM abstract book, pp.1924, 1998.
- 2) 巨瀬勝美・他, 第3回 NMR マイクロイメージング研究会講演要旨集, pp.40-43, 1998.
- 3) K. Kose, et al, 7th ISMRM abstract book, pp.2036, 1999.

(北海道農試) 金子順一、(テクノサイエンスラボ) 下川繁三

¹H nuclear spin-lattice relaxation of *Autographa gamma* and *A.nigrisigna* pupae:
effects of chilling conditions and temperatures.Hokkaido National Agricultural Experimental Station, Jun'ichi Kaneko
Technoscience Lab., Shigezo Shimokawa

Autographa gamma responds to a short chilling(hardening) during the pupal stage with raised cold-hardiness while the closely related species of *A.nigrisigna* has no such ability (Kaneko, 1996). Nuclear spin-lattice relaxation time (T_1) of water and saturated alkyl group in the pupae of these two species was measured to detect any change in these substances occur by hardening. T_1 values of saturated alkyl group in *A.gamma* has not of water became significantly to decrease with chilling, indicating possibly an increase in unsaturated bonds in fatty substances. In *A.nigrisigna* no change due to chilling was detected both in T_1 values of water and saturated alkyl group.

ガンマキンウワバ(ガンマ)とタマナギンウワバ(タマナ)は鱗翅目夜蛾科キンウワバ亜科に属し、キャベツ、ニンジンなど、多種類の野菜の害虫として知られている。特にガンマは長距離移動性害虫としてヨーロッパでは有名である。タマナは日本に土着していたのに対し、ガンマは1960年代に大陸から移動してきたと考えられる。現在ガンマは北海道で越冬しているが、タマナは越冬出来ず、毎年本州から飛来して来ているらしい。ガンマが短期間の予冷(ハードニング、この場合10℃1日+5℃5日)によりどのステージでも耐寒性(0℃に置いたときの生存率)が大きくなるのに対し、タマナではそれほど大きくなる。今回はこの両種の耐寒性の違いの元になっている分子生理学的メカニズムを明らかにするため、両種の蛹の¹H核スピン—格子緩和時間(T_1)を測定した。20℃、15L9Dで飼育した個体を、測定前に以下の3通りの低温度に処理し、室温、5℃、0℃の各温度で測定した。但し予冷温度は20℃を対照として、①10℃1日+5℃5日②0℃5日③10℃1日+5℃5日+0℃5日。その結果、ガンマは低温処理により、化学シフト1.3ppm付近にある飽和アルキル基の T_1 値は、測定温度に関わらず有意差を示した。これに対しタマナではその差は観測されなかった。1.3ppm付近の信号は主として脂質中の飽和アルキル基(TGA トリアシルグリセロール)を示すと考えられるので、ガンマでは短期間の予冷中にTGAの不飽和化が起きている可能性が示唆される。

ガンマキンウワバ、タマナギンウワバ、ハードニング、¹Hスピン—格子緩和時間
かねこ じゅんいち、 しもかわ しげぞう、

(北大医循内)○福田 洋之、佐久間一郎、北畠 顕

(中外製薬)鈴木 好幸、深澤 正徳、黒丸 修

(テクノサイエンス ラボ)下川 繁三

The Inhibitory Effect of CP-060S on Sodium Overload during Myocardial Ischemia

Hiroyuki Fukuda¹, Yoshiyuki Suzuki², Masanori Fukazawa², Osamu Kuromasu²,Shigezo Shimokawa³, Ichiro Sakuma¹, Akira Kitabatake¹Dept. of Cardiovascular Medicine, School of Medicine, Hokkaido University¹,Chugai Pharmaceutical², Technoscience Lab³

We examined the effects of CP-060S, a newly developed Ca²⁺ channel blocker, which also inhibits non-inactivating Na⁺ current, on intracellular Na⁺ and high energy phosphates during ischemia using ²³Na and ³¹P NMR spectroscopy. Isolated rat hearts subjected to 48 min of zero-flow ischemia were infused with 3 μM CP-060S prior to ischemia. We also used CP-060R (3 μM), an optic isomer of CP-060S having much less Ca²⁺ channel blocking activity. The intracellular Na⁺ accumulation at end-ischemia was significantly inhibited in CP-060S (208 ± 9 %) and CP-060R (221 ± 22 %) compared with vehicle (266 ± 16 %) (p < 0.01). The depletion of ATP during ischemia was significantly inhibited in CP-060S. In conclusion, CP-060S improved sodium homeostasis and energy metabolism during ischemia by inhibiting non-inactivating Na⁺ current rather than Ca²⁺ channels.

【はじめに】心筋虚血再灌流時の心筋傷害の一因として、虚血時の細胞内ナトリウムの増加が Na⁺/Ca²⁺ exchange を活性化した結果生じる Ca overload があげられている。細胞内ナトリウム増加の原因として従来考えられてきた主な機序として、1)心筋細胞内 ATP の減少により Na⁺/K⁺ ATPase による細胞内ナトリウムの細胞外への排出が阻害される事、2)細胞内アシドーシスの進行に伴い Na⁺/H⁺ exchange が活性化され、細胞外からのナトリウム流入が増加する事、があげられている。一方、Na channel の関与については、虚血により細胞膜の脱分極が急速に進行し Na channel が不活性化されるため Na overload の原因とはならないとされてきた。しかし近年、虚血時、低酸素時にこの不活性化過程が阻害され、持続的ナトリウム流入(non-inactivating Na⁺ current)が引き起こされると報告され、Na channel の関与が虚血時 Na overload の原因の一つとして示唆されている。そこで今回われわれは non-inactivating Na⁺ current 抑制作用を持つ新しいカルシウム拮抗薬、CP-060Sが心筋虚血時に細胞内ナトリウム代謝、エネルギー代謝を改

Keywords: CP-060S, non-inactivating Na⁺ current, ²³Na-NMR, ³¹P-NMR, ラット灌流心

ふくだひろゆき、さくまいちろう、きたばたけあきら、すずきよしゆき、ふかざわまさのり、くろまるおさむ、しもかわしげぞう

善し心筋保護作用を発現するかについて検討した。

【方法】雄 Wister-Kyoto rat (350-450 g)の心臓を Langendorff 法にて灌流した。灌流液は non-phosphate Krebs-Henseleit buffer (in mM) (NaCl 114, KCl 4.7, MgSO₄·7H₂O 1.2, NaHCO₃ 24, EDTA·2Na 0.5, CaCl₂ 1.5, pH 7.4)を用いた。左心室に latex balloon を挿入し心機能を測定した。右心室には pacing lead を挿入し 4 Hz にて pacing を行った。

²³Na-NMR 測定時には ²³Na-NMR のシフト薬である 4 mM Thulium(III)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis-(methylene phosphate) (TmDOTP⁵⁻)を用いた。

NMR 装置は Bruker 社製 MSL-200 を用い、NMR プローブは Morris 社製 multinuclear probe を使用した。²³Na-NMR は測定周波数 52.9 MHz、90° pulse、積算回数 548 回、繰り返し時間 200 μ sec で 2 分間の測定とした。³¹P-NMR は測定周波数 80.01 MHz、60° pulse、積算回数 120 回、繰り返し時間 1.9 秒、4 分間で測定した。

CP-060S 3 μM を虚血 16 分前より投与した(CP-060S 群、n=7)。虚血時間は 48 分間とし、再灌流は行わなかった。対象として、vehicle(vehicle 群、n=8) および non-inactivating Na⁺ current 抑制作用のみを有する CP-060R 3 μM(CP-060R 群、n=5)を用いた。

【結果】 Fig.1 は ²³Na-NMR スペクトル全体像と細胞内 Na⁺部分の拡大図である。Tm(DOTP)⁵⁻により細胞内外の Na peak が良好に分離されている。Fig.2 は各グループの細胞内 Na⁺の変化を示す。vehicle 群では、虚血開始とともに細胞内 Na⁺は急速に増加し虚血 48 分では 266 ± 16 % に上昇したのに対し、CP-060S 群(208 ± 8 %)、CP-060R 群(221 ±

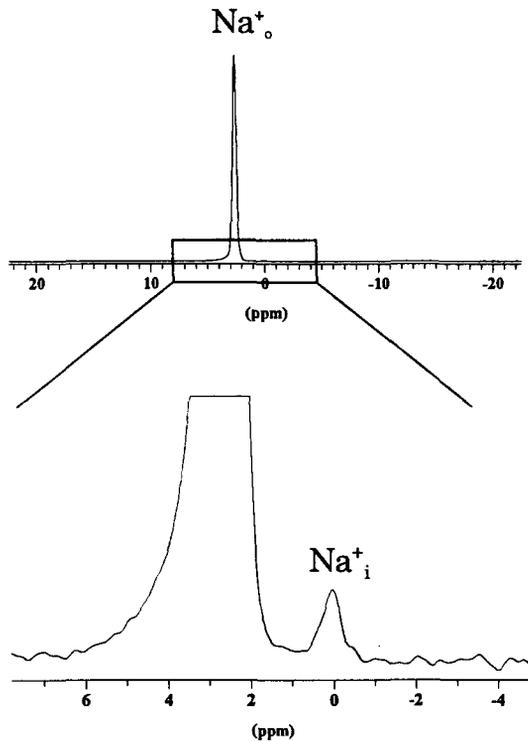


Fig.1 ²³Na-NMR spectrum of rat heart perfused with Tm(DOTP)⁵⁻

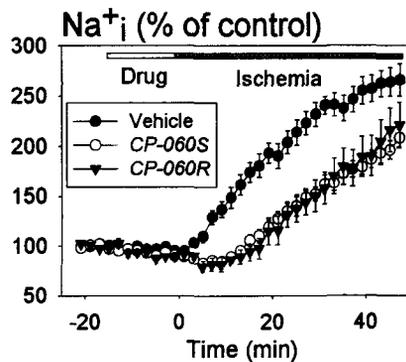


Fig.2 Mean Na⁺ data for vehicle, CP-060S 3 μM and CP-060R 3 μM

22 %)では有意にその増加が抑制されていた。CP-060S 群と CP-060R 群には有意な差は認めなかった。

Fig.3 は細胞内 ATP の変化を示す。vehicle 群では虚血開始後 30 分で、すでに ATP が観察されなくなっているが CP-060S 群では虚血 48 分後でも ATP は $5.5 \pm 2.7 \mu\text{mole/gdw}$ と有意にその減少が抑制されていた。

Ischemic contracture は vehicle 群で虚血開始後 19.1 ± 2.4 分より始まったが、CP-060S 群では 37.5 ± 2.3 分、CP-060R 群では 37.5 ± 1.2 分と有意にその出現が遅延していた。

【考察】 CP-060S および CP-060R は虚血中の細胞内 Na^+ の増加を有意に抑制した事から虚血中に non-inactivating Na^+ current が Na overload の一因として寄与している可能性が推測される。また CP-060S は Ca 拮抗作用と non-inactivating Na^+ current 阻害作用を併せ持つが、non-inactivating Na^+ current 阻害作用のみを有する CP-060R と細胞内 Na^+ 増加抑制作用がほぼ同程度である事より、CP-060S の細胞内 Na^+ に対する作用は主に non-inactivating Na^+ current 阻害作用によるものと考えられる。また CP-060S は虚血中の細胞内エネルギー代謝を改善したが、これは細胞内 Na^+ の増加が抑制されたために Na^+/K^+ ATPase による ATP の消費が減少したためではないかと推測された。

【結論】 CP-060S は心筋虚血時の non-inactivating Na^+ current 阻害により細胞内 Na^+ の増加を抑制し、心筋保護作用を有するものと推測された。

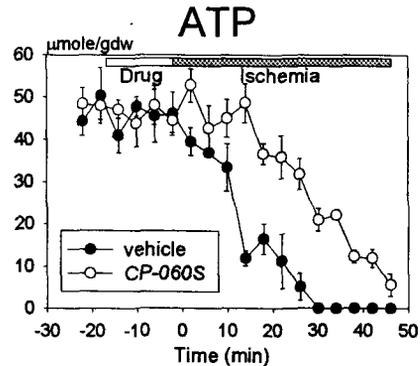


Fig.3 Mean ATP data for vehicle and CP-060S $3\mu\text{M}$

P67 スピン偏極 Xe ガスの MRI 実験

¹電子技術総合研究所、²産業医科大学、³秋田県立脳血管研究センター、⁴大阪大学医学部
○服部峰之¹、平賀隆¹、守谷哲郎¹、木下良正²、飯田秀博³、木村敦臣⁴、藤原英明⁴

Hyperpolarized Xe gas MRI experiments

Mineyuki Hattori¹, Takashi Hiraga¹, Tetsuo Moriya¹, Yoshimasa Kinoshita², Hidehiro Iida³, Atsuomi Kimura⁴ and Hideaki Fujiwara⁴.
¹Electrotechnical Laboratory, Tsukuba, 305-8568; ²University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, 807-8555; ³Research Institute for Brain and Blood Vessels, Akita, 010-0874; ⁴Osaka University, Suita, 565-0871.

An apparatus for hyperpolarization of noble gas nuclear spins using high-power diode laser arrays was constructed. The stray field of the horizontal superconducting magnet was used for the optical pumping processes. The high-power diode laser arrays (795nm, 20W) was applied for effective excitation of Rb vapor. We achieved ~1% polarization of ¹²⁹Xe for sealed Rb and Xe and N₂ gas mixture and performed magnetic resonance imaging experiments.

【序論】 ³He, ¹²⁹Xe の核スピンの希ガスについては、Happer らが行った光ポンピングしたアルカリ金属原子とのスピン交換による偏極を行って、NMR 信号を飛躍的に増強できる[1]。MRI への応用として、肺などの体内の空洞の画像が得られている[2]。ここでは、ガラス管に封入された Xe ガスについてスピン偏極を行い、¹²⁹Xe について MRI 計測を行った。

【実験】 Rb 金属は、ガラスアンプルに封入された製品（フルウチ化学:99.99%）を、ステンレスパイプ内に入れた状態で内部を真空にして配管内部を洗浄した後、外部からステンレスパイプの上からアンプルごとつぶし、拡散ポンプで 10⁻⁶Torr にひきながら、先に配置した偏極用ガラス管（外径 50mm, 容量約 200 ml）へ蒸留した。Xe, N₂ ガス（日本酸素:99.995%高純度ガス）を、マスフローコントローラー（MKS:M-310-01C, M-100-11C）で、流量（Xe:~1sccm, N₂:~0.1sccm）を制御して 800Torr 導入した。偏極用ガラス管を液体窒素で冷却して、Xe が固体となり減圧の状態になっているところで、Xe, N₂ ガスを封じ込んだ。光ポンピング過程に、MRI 計測に利用した動物用横型磁石（磁場強度/ボア径:4.7T/400mm）及び、高分解能 NMR の縦型磁石（9.4T/89mm）の漏洩磁場（~120G）の利用を試みた。ライスター熱風器の先に銅線を骨組みにしてアルミホイルで覆い炉を作り偏極用セルを設置し、~100℃に保った。励起光には、GaAlAs ダイオードレーザー（Optopower:OPC-A020-795-CSPS:795.11±1nm,20W）を使用した。ビーム（エミッタサイズ 200µm×1µm）をλ/4 波長板（CVI:QWPO-795-10-4-R15）を通して回転偏光にした後、シリンドリカルレンズで一軸方向（1µm）だけ拡大し入射した。MRI 測定は、自作の表面コイル、サドルコイルを使用した。表面コイルで信号強度の減衰をとったところ、T₁として、約 40 分を得た。サドルコイルは外形 60mm である。図 1 に MRI 画像を示す。撮像シーケンスは FLASH を用いた。

【まとめ】 封じ込み型の光ポンピング装置において、ダイオードレーザーアレイ（795nm, 17W）を励起源に用いて Rb の光ポンピングを行い、¹²⁹Xe 核スピンを偏極させたところ、10 分程度で平衡状態の偏極率 1% を得た。このガラスチューブについて MRI 実験により Xe ガスに由来する画像を取得することができた。

【参考文献】

- [1] Walker T. G. et. al. (1997) Spin-exchange optical pumping of noble-gas nuclei, Rev. Mod. Phys. **69**: 629-642
- [2] Albert M. S. et. al. (1998) Development of hyperpolarized noble gas MRI, Nucl. Instr. and Meth. A **402**: 441-53

キーワード: ¹²⁹Xe, スピン偏極, 光ポンピング, MRI

はっとりみねゆき、ひらがたかし、もりやてつお、きのしたよしまさ、いっただひでひろ、きむらあつおみ、ふじわらひであき

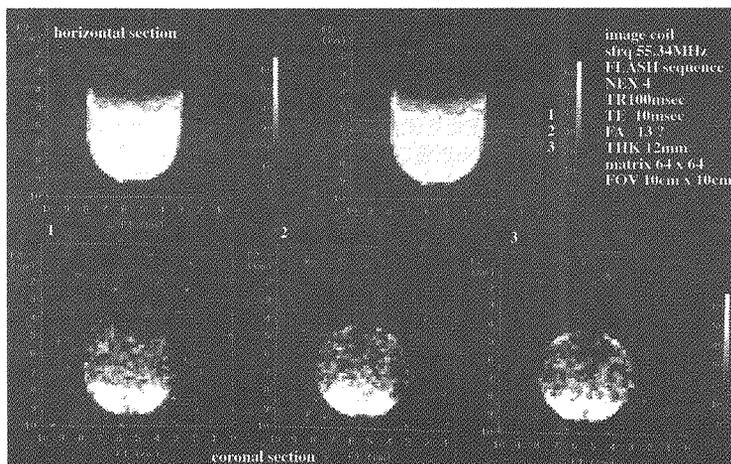


図 1. 偏極 Xe の MR イメージング画像

Rapid MRI measurements by phase-encoded rotating-frame imaging method with phase sweep detection

Mineyuki Hattori, Hideaki Shimizu, and Tetsuo Moriya

Electrotechnical Laboratory, Tsukuba, Ibaraki 305-8568, JAPAN

Phase-encoded rotating-frame imaging method with incrementing a phase of the reference signal during the detection period is applied to the measurements of the spatial distribution of NMR active nucleus. A new faster two-dimensional rotating frame imaging method is proposed. The spectrometer system including the probe with a saddle coil and a surface coil and the additional synthesizer were constructed. Demonstration experiments using a phantom sample of water were performed.

【序論】回転座標系イメージング実験においては、表面コイルからの距離(x_1, x_2)に依存した、ラジオ波磁場強度の勾配を位置情報のエンコードに利用する。Hoult による回転座標系ズーグマトグラフィ[1]は、 x 軸方向のラジオ波磁場勾配と z 軸方向の静磁場勾配を用いた二次元イメージングであるが、ラジオ波磁場勾配パルスの長さを段階的に変えた、多数回の励起を繰り返している。この振幅変調を基本とした、高速型の回転座標系イメージング法は、繰り返し待ち時間をとらないで断続的にラジオ波磁場勾配パルスを印加し、nutaton 信号を擬 FID として得る実験として、提案されている[2]。位相変調回転座標系イメージング法では、一軸方向に勾配をもった x 軸 θ 度パルスにより $y-z$ 軸上にフリップ角分布として展開した後、 y 軸 90° パルスにより $x-y$ 面上に倒し(位相変調)、 θ を段階的に変えた一連のこのシーケンスを行い、一次元の化学シフト分布を得ている[3]。我々は、図 1 に示すような検出器の位相を連続的に掃引しながら、この位相エンコードされた

信号を一回の励起で高速に取り出す方法を提案し、検出位相が掃引できる分光計を製作した[4]。

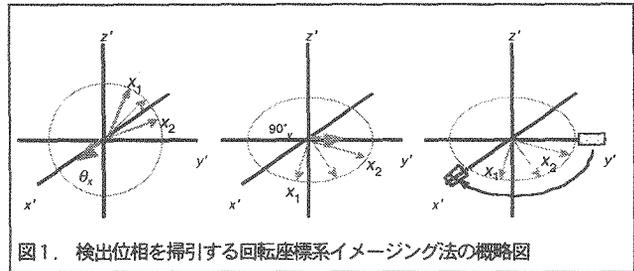


図1. 検出位相を掃引する回転座標系イメージング法の概略図

【課題】均一ラジオ波磁場照射用・検出用の鞍型コイルと、直交配置に置かれた表面コイルによる実験[2,5]では、試料を回転して投射再構成法を行っている。しかし、取り込みを行うたびに回転するための時間が必要なので、高速なものとはなり得ない。ここでは、二系統の表面コイルを用意し、これらに印加する RF の強度を変化させて、検出器の位相を連続的に掃引しながら位相エンコードされた信号を取り出す方法[4]を適応し、投影再構成法を行い、試料の回転を伴わないで一連の励起で二次元イメージング実験を行う。プローブ・分光計は、一軸用のもの[4]に直行する表面コイルのための RF チャンネルを一系統追加して、 x, y の二軸に対応した。うち一組のコイルが標準のプロトン用照射・検出コイルと同軸配置になるのでデカップリングが必要になる。

【まとめ】二系統の表面コイルの利用と検出器の位相を連続的に掃引しながら位相エンコードされた信号を取り出す方法により、試料の回転の必要のない、高速化が可能な回転座標系イメージング法を行った。ラジオ波磁場勾配は、静磁場勾配に比べると、立ち上がり、立ち下がりに要する時間が格段に短いという特徴がある。位置情報エンコードの手法の検討を進め、この特徴を活かした、高速イメージング法を提案できた。

【参考文献】

- [1] D. I. Hoult, J. Magn. Reson. 33, 183 (1979).
- [2] R. Raulet, D. Grandclaude, F. Humbert, and D. Canet, J. Magn. Reson. 127, 259 (1997).
- [3] M. J. Blackledge, B. Rajagopalan, R. D. Oberhaensli, N. M. Bolas, P. Styles, and G. K. Radda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4283 (1987).
- [4] M. Hattori, H. Shimizu, and T. Moriya, Proc. 29 AMPERE & 13 ISMAR, 563 (1998).
- [5] F. De Luca, B. C. De Simone, N. Luger, and B. Maraviglia, J. Magn. Reson. A102, 287 (1993).

キーワード：回転座標系、イメージング、ラジオ波磁場勾配

はっとりみねゆき、しみずひであき、もりやてつお

P69 超小型ポータブル MRI ユニットの開発

(筑波大学物理工学系) ○巨瀬勝美, 拝師智之

Development of a Compact and Portable MRI Unit

K. Kose and T. Haishi, Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

A compact and portable MRI unit is developed to extend the possibility of MRI. A note PC was used for the system controller and console: ISA board units (pulse programmer and synthesizer) were connected via a PC card - ISA bus bridge unit and a PC card AD converter was inserted in the PC card slot. Because the size of the MRI unit except the PC was 45 cm (W) x 30 cm (H) x 40 cm (D) (about 30 kg in weight), a very compact and portable MRI system can be built using a compact magnet.

1. はじめに

MRI システムを小型・軽量化し, さらにポータブルとすることにより, さまざまな分野における MRI の広範な応用が期待される. われわれは, このコンセプトに基づき, これまで, 小型ポータブル MRI ユニットの開発し, 「臨床用 MRI の静磁場を利用した MR Microscope (MRMICS)」や, 「永久磁石を用いたコンパクトな MR Microscope」などを構築した (前回および今回の発表を参照). 本研究では, MRI ユニットのさらに小型化することを検討し, その結果, 体積が従来の約 1/3 の MRI ユニットの開発に成功した.

2. システム設計の方針

MRI ユニットとは, MRI のエレクトロニクス部分であり, これに, 対象に合わせた磁石, 勾配コイル, RF コイルを組み合わせることで, 目的に応じた MRI システムを容易に構築できる. Fig.1 にわれわれが開発した, 従来のタイプのポータブル MRI ユニット (総重量約 80kg, 上段より PC, RF 信号ユニット, 勾配コイル電源, 送信機) を示す. MRI ユニットは, さらに, RF コイルや勾配コイルに電力を供給するパワーユニット (送信機と勾配コイル電源) と, それらを制御し, 信号検出を行う小信号ユニット (PC と RF ユニット) に分けられる. 本研究では, この MRI ユニットの基本的性能を維持しつつ小型化を行う上で, 特に PC の小型化に重点をおいた.

PC を小型化する場合に, いわゆる「ノート PC」はコスト・パフォーマンスの上で最良の選択であると思われるが, MRI システムにおいては, 以下の二つのシステム構築手法が考えられる. 第一は, パルスプログラマやデー



Fig.1 Portable MRI Unit developed in the previous study

キーワード : MRI, NMR イメージング, MR microscopy, Portable MRI
こせ かつみ, はいし ともゆき

タ収集系を制御する専用の（リアルタイム OS を装備する）コンピュータユニットを用い、それをイーサネット、USB、SCSI などのような汎用のインターフェイスを介してノート PC と接続する手法である。この方法は、システムの負荷が分散されることにより、高い性能を実現でき、遠隔操作も可能であるが、システムがやや複雑になり、小型化と低価格化という観点からは不利である。第二は、ノート PC の唯一の拡張バスである PC カードスロットを利用して計測・制御を行う方法である。この方法は、使用できるカードが制限されるという不利な点はあるが、システムの単純さ、小型化・低価格化という観点からは有利であり、また、PC 本体のネットワーク機能を利用すれば、遠隔操作も可能である。

3. 超小型ポータブル MRI ユニット

Fig.2 に、本研究で開発した MRI ユニットの示す。本システムでは、ノート PC から PC カードを経由して ISA ボードに実装されたパルスプログラマとシンセサイザボードを制御し、AD 変換器としては、PC カードに実装されたもの（AD12-8(PM), コンテック）を使用した。ISA ボードは、PC カード-ISA バスブリッジ（UPC-1471Wc, インタフェース）を経由して制御した。また、小信号ユニット（右図上部）とパワーユニット（右図下部, RF:50W, G:各 50W）はそれぞれ一体化し、従来のポータブル MRI ユニットに比べ、約 1/3 の体積（約 30 kg）を実現した。



Fig.2 Portable MRI Unit developed in this study

Fig.3 に、本システムの PC カード AD コンバータを用いて撮像したファントムの画像を示す。PC カード用の AD コンバータユニットで、2 チャンネル以上の同時サンプリングを実現しているものは入

手できなかったが、図に示すように、サンプリング時間のずれ（8.5 μ s）は、一次の位相シフトで正確に補正できるため、同時サンプリングができない本 AD コンバータでも MRI の信号収集は可能であった。なお、本 AD コンバータは、16k ワードの FIFO バッファを装備しているため、高速の FLASH シーケンス（TR=10ms 程度）でも、Windows98

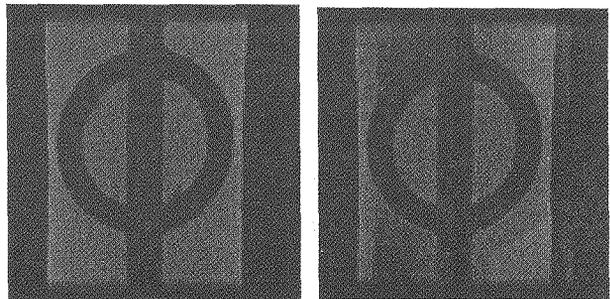


Fig.3 Delay time (8.5 μ s in 20 μ s sampling) corrected image (left), uncorrected (right).

上でリアルタイムに画像再構成・表示が可能であった。

4. むすび

過度のシステムの小型化は、逆に使いにくさと高コスト化を招くが、MRI ユニットの合理的な程度の小型化は、MRI の将来の応用を考える上でのキーテクノロジーであり、これにより、MRI の応用の可能性が大きく開けてくると期待される。 ■

(日本女子大学理¹, 国立精神神経センター神経研², 生理研³)
 ○高橋征三¹, 横田真希子¹, 酒井彦一¹, 荻野孝史², 村上政隆³

The time-dependent change in $^1\text{H-NMR}$ of sea urchin eggs after fertilization

Dept. Chem. & Biol. Sci., Japan Women's University¹, Nat. Inst. Neuroscience, NCNP², Nat. Inst. Physiol. Sci.³

S. Takahashi¹, M. Yokota¹, H. Sakai¹, T. Ogino² & M. Murakami³

$^1\text{H-NMR}$ of sea urchin eggs were measured and chased their time-dependent changes after fertilization. It was found that glycine was substantially decreased in its intensity with time, while broad methyl and methylene resonance from membrane lipids were increased. The latter result indicates that the mobility of lipid molecules increases after fertilization. The present result also suggests that the pool of metabolites vary their amount during the course to cell division. However, $^{31}\text{P-NMR}$ did not show a symptom of increase in pH, which is consistent to the previous results of NMR but contradict to other biochemical results.

微生物や、細胞、組織にいたる種々の生体試料の研究が一時期盛んに行われたが、その多くは $^{31}\text{P-NMR}$ によっていた。 $^{31}\text{P-NMR}$ では細胞内 pH 以外に他の生化学的方法をこえる結果を得ることが難しい。他方、 $^1\text{H-NMR}$ を使って代謝物の変化を追跡した報告は少ない。本研究では $^1\text{H-NMR}$ による代謝研究の可能性を探るために、ウニ卵の受精後の変化を追跡した。ウニ卵は多量に取れるだけでなく受精後におこる細胞分裂の同調性が高く扱いやすい。

ウニ卵については、受精後の細胞内 pH が変わらないとする報告と低下するという報告があるが、決着はついていない。他の生化学的方法からは、むしろ上昇するとされている。 $^1\text{H-NMR}$ については、 H_2O の緩和時間が卵割前後で変化するという報告があるが、細胞内成分の変化についての報告例はない。

[実験] 5mm の標準 NMR 試料管に 1mm の PE チューブを挿入した還流系を構築しリザーバーとの間を還流した。ポンプは各チャンネルごとに流量が微調できる ISMATEC の 4 チャンネルペリスタポンプを使った。受精の様子はリザーバーからスペクトルの測定時間にあわせて卵を採取し Olympus 製光学顕微鏡で 100 倍に拡大して撮影した。 $^1\text{H-NMR}$ は Bruker AMX-400 を使い 20℃ で 7.5 分ごとに測定した。

Key Words: ウニ, 卵, 受精, $^1\text{H-NMR}$, 経時変化

たかはし せいぞう, よこた まきこ, さかい ひこいち, おぎの たかし,
 むらかみ まさたか

[結果] 1. 受精には種々のストレスが影響した。受精して約 40 分後の卵割は最適状態では 80%以上の確率(受精率)だが測定条件下では 60 - 70%であった。重水濃度が報告とちがい受精率に影響した。また十分に通気した状態でも卵の濃度は低いほど受精率は上昇した。pH 変化や老廃物の蓄積が原因でないことが確認できたので、卵同志の衝突または接触がストレスになるらしい。NMR 測定には 100 - 150 mg/mL 濃度で重水濃度 2.5%の海水を使った。

還流速度も受精率に影響した。還流すると一部の卵の受精膜が剥離するので、機械的ストレスが問題であると判断し 2.5mL/m の流量を採用した。NMR 試料管内にフィルターを挿入して卵をトラップし、海水だけを還流するシステムは、卵がゆっくりとペリスタポンプを通過するよりもストレスが大きいことが分った。

2. NMR 試料管内の液量変化や還流速度がシムに影響したので、酸素を吹き込む流量を制御し液量が変わらないシステムを考案した。受精卵は測定濃度では 3-5 mmHg の酸素を消費するが、系の酸素濃度はその 10 倍以上を確保した。また受精卵は未受精卵に比べて酸素消費量が増大した。

3. 得られた ¹H-NMR スペクトルは Alanine のメチル基の doublet が明瞭に観察た。そして各スペクトルごとに分解能が多少変動したが、以下の結論を得た。すなわち

- (1) Glycine の面積強度が時間とともに徐々に減少した。しかし細胞周期の特定の時期に、とくに大きな変化がおこる現象はなかった。Alanine についても同様の傾向がみられたが、脂質のピークと重なるので、今回は結論を留保した。これは 2次元 NMR 測定が明確な結論を与えると期待される。

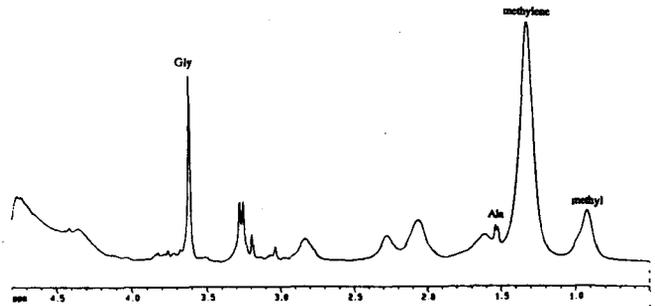


図 ウニ受精卵の ¹H-スペクトル

- (2) 細胞膜の脂質に由来する methyl および methylene ピークが時間とともにシャープになった。しかも幅広い methyl 信号の中で高磁場側の成分から変化が始まり、全体に広がった。これは時間とともに膜の流動性が増大し、しかも飽和脂肪酸が先に動き始めることを示唆する。
- (3) ¹H-NMR と ³¹P-NMR の同時測定を試みたが、細胞内 pH が上昇する傾向は見られなかった。pH に関する明瞭な結論を得るためには、還流系を改良して、卵へ与えるストレスを少なくし、受精率をあげる工夫が必要であろう。

[考察] 卵には脂質含量が多くポリエチレンと磁化率が近いいためか、PE チューブを挿入した系はガラス管を挿入した場合よりも高分解能でスペクトルを得た。その結果、明瞭に細胞内成分を ¹H-NMR で分離測定できた。いままで細胞分裂のときには細胞内代謝成分に有意の変化はないと考えられてきた。従来の見解に再検討を迫るものものであり、¹H-NMR による細胞内成分の測定が、従来の生化学的方法を補完する有用な情報を与えることを示した。受精による酸素消費量の増大は、エネルギー代謝回転の増大を意味し、今後、飽和移動実験で証明して行きたい。

Multidimensional high-resolution solid-state NMR for isotropic chemical shift correlation of ¹³C/¹⁵N-labeled molecules

Faculty of Engineering, Yokohama National University

○Y. Todokoro, K. Sasa, T. Fujiwara, H. Akutsu

We are developing solid-state NMR methods which provide more structural information for isotope-labeled biomolecules. However the low resolution and sensitivity are obstacle to the application of solid-state NMR experiments. By the combination of isotope-labeled samples and multidimensional NMR under MAS, we have improved the resolution and sensitivity. In this study 3D pulse sequences were designed to obtain spectra for ¹³C-¹³C-¹³C chemical shift correlation and ¹⁵N-¹³C-¹³CO chemical shift correlation. The RFDR ¹³C-¹³C mixing sequence was used in the former correlation experiment, the APHHCP ¹⁵N-¹³C and RFDR ¹³C-¹³C mixing sequence were used in the later correlation experiment. Their extensions to 3D correlation enhanced the spectral resolution.

【序】 固体 NMR において、タンパク質や核酸などの生体高分子の構造を解析するためには、その分解能と感度が悪いことが障害となっており、今まで用いられてきたものでは不十分である。そこで我々は安定同位体標識と多次元 NMR を組み合わせることで、分解能と感度を向上させる測定法の開発を試みた。本研究では生体高分子の共有結合に沿ってシグナルを同定するために、マジック角回転する試料について ¹³C-¹³C-¹³C の相関と ¹⁵N-¹³C-¹³CO の相関を得るパルス系列(3 次元 ¹³C-¹³C-¹³C 双極子相関法と 3 次元 ¹⁵N-¹³C-¹³CO 双極子相関法) の開発を行った。

【実験】 本実験では Chemagnetics CMX400 Infinity 核磁気共鳴装置を用いた。測定のプロント数は 16*16*512 とした。

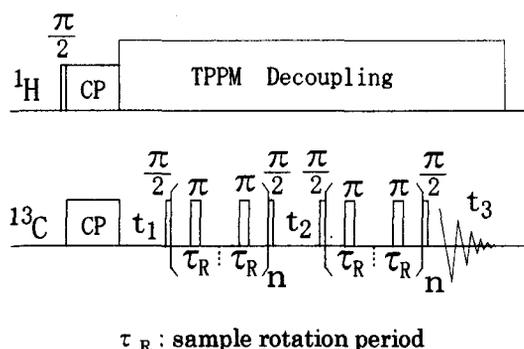


Fig.1 Pulse Sequence for 3D ¹³C-¹³C-¹³C chemical shift correlation

【3次元 ¹³C-¹³C-¹³C 双極子相関法】 Fig.1 は 3 次元 ¹³C-¹³C-¹³C 双極子相関法のパルス系列である。まず交差分極 (CP) で ¹H から ¹³C に磁化を移動させ、 t_1 において ¹³C の化学シフトで展開させる。次に RFDR において試料回転速度に同期した 180 度パルスを繰り返し照射し、¹³C 同種核双極子結合した ¹³C 間を磁化移動させ、 t_2 において ¹³C の化学シフトで展開させる。再び、RFDR で ¹³C 間を磁化移動させ、そして、 t_3 において ¹³C を観測する。¹H デカップリングは TPPM (Two Pulse Phase Modulation) デカップリングを用いた。

3 次元 ¹³C-¹³C-¹³C 双極子相関法 (Fig.1) をフルラベルバリンに適用した。実験条件は試料回転速度 9kHz、RFDR の混合時間は始

キーワード：固体 NMR、MAS、多次元、RFDR、安定同位体標識

とどころやすと、ささけんたろう、ふじわらとしみち、あくつひでお

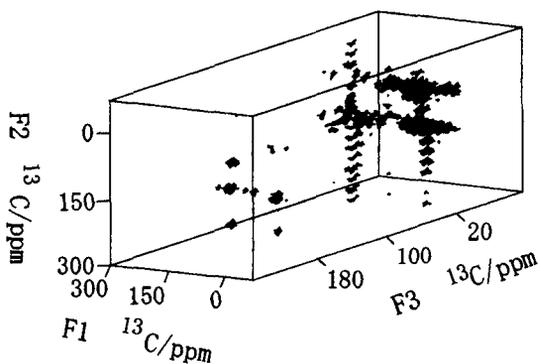


Fig.2 3D ^{13}C - ^{13}C - ^{13}C chemical shift correlation Spectrum of Valine

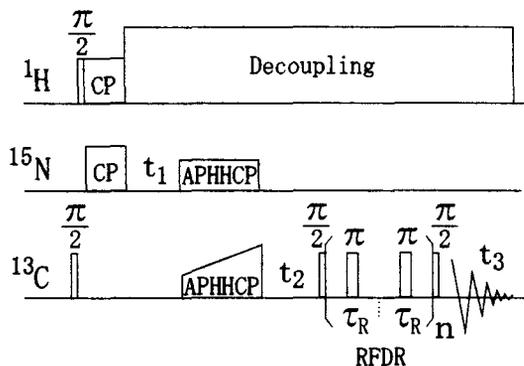


Fig.3 Pulse Sequence for 3D ^{15}N - $^{13}\text{C}^\alpha$ - ^{13}CO chemical shift correlation

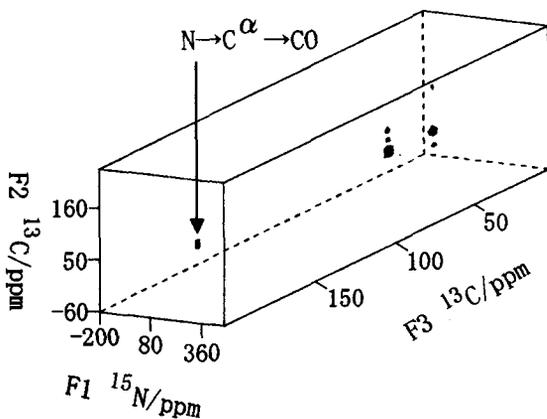


Fig.4 3D ^{15}N - $^{13}\text{C}^\alpha$ - ^{13}CO chemical shift correlation Spectrum of Alanine

め ($\text{CO} \rightarrow \text{C}^\alpha$) が 1.76ms、後 ($\text{C}^\alpha \rightarrow \text{C}^\beta$) が 2.20ms とした。測定時間は約 24 時間であった。

Fig.2 に 3 次元立体図を示した。この図の F3 軸をそれぞれ CO 、 C^α 、 C^β 、 $\text{C}^{\gamma 1}$ 、 $\text{C}^{\gamma 2}$ の共鳴周波数でスライスした ^{13}C - ^{13}C (F1-F2) 平面を見ると、ポイント数が 16×16 と少ないので、分解能が十分ではなかったが、 $\text{CO} \rightarrow \text{C}^\alpha \rightarrow \text{CO}$ 、 $\text{C}^\alpha \rightarrow \text{C}^\beta$ 、 $\text{C}^{\gamma 1} \rightarrow \text{C}^{\gamma 2}$ 、 C^β 、 $\text{C}^{\gamma 1} \rightarrow \text{C}^\alpha \rightarrow \text{C}^{\gamma 1}$ 、 $\text{CO} \rightarrow \text{C}^\beta \rightarrow \text{C}^\beta$ などのクロスピークが観測できた。

[3 次元 ^{15}N - $^{13}\text{C}^\alpha$ - ^{13}CO 双極子相関法]

Fig.3 は 3 次元 N - C^α - CO 双極子相関法のパルス系列である。まず CP で ^1H から ^{13}C に磁化を移動させ、 t_1 において ^{15}N の化学シフトで展開させる。次に APHHCP (Adiabatic-Passage Hartmann-Hahn Cross Polarization) で Hartmann-Hahn 条件を満たすようなラジオ波を中心として掃引して、双極子結合した ^{15}N から ^{13}C に磁化移動させ、 t_2 において ^{13}C の化学シフトで展開させる。RFDR で ^{13}C 同種核双極子結合した ^{13}C 間を磁化移動させる。そして、 t_3 において ^{13}C を観測する。

APHHCP を用いた 3 次元 ^{15}N - $^{13}\text{C}^\alpha$ - ^{13}CO 双極子相関法 (Fig.3) をフルラベルアラニンに適用した。実験条件は試料回転速度 5kHz、混合時間は APHHCP ($\text{N} \rightarrow \text{C}^\alpha$) が 4.4ms、RFDR ($\text{C}^\alpha \rightarrow \text{CO}$) が 1.6ms とした。測定時間は約 24 時間であった。

Fig.4 に 3 次元立体図を示した。アミノ基の ^{15}N の化学シフト、 $^{13}\text{C}^\alpha$ の化学シフト、 ^{13}CO の化学シフト間の相関ピークが観測できた。

[まとめ] 本研究において 3 次元 ^{13}C - ^{13}C - ^{13}C 双極子相関法と 3 次元 ^{15}N - $^{13}\text{C}^\alpha$ - ^{13}CO 双極子相関法により、3 次元化することができ、 ^{13}C - ^{13}C - ^{13}C と ^{15}N - $^{13}\text{C}^\alpha$ - ^{13}CO の相関が見られるようになった。このことにより分解能を向上させることができた。しかし、今回の実験では F1 軸と F2 軸はポイント数が少なく、分解能が十分ではない。短時間でより高い分解能で生体高分子を測定するためには選択励起や測定する周波数を絞るなどの工夫をして、デジタル分解能をあげる必要がある。

**A new solid-state NMR experiment for determination of all ψ angles
in a fully ^{13}C -labeled peptide by a single 2D-correlation spectrum.**

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

○ Jun Mizokami, K. Takegoshi, and Takehiko Terao

We propose a new 2D-correlation experiment in solids enabling us to determine all ψ angles in a fully ^{13}C -labeled peptide. The proposed experiment employs ^{13}C - ^{13}C J couplings to create zero-quantum coherence (ZQC). The uses of the J coupling is desirable for high selectivity of a residue. The ZQC is evolved under several anisotropic interactions to determine the ψ angle. The method was successfully applied to fully ^{13}C -labeled L-alanine to obtain its ψ angle within 1 degree to a neutron data.

ペプチドの主鎖の構造は、 ϕ ψ ω の三つの二面体角(図1)で記述できる。本発表では、主鎖を ^{13}C でフルラベルしたペプチドにおいて、全ての ψ 角を一回の2次元 NMR 実験で決定する方法を開発し検討した。多くの炭素をラベルした試料で、個々の C=O 等のピークを区別して S/N 良く観測するためには、2次元のうちの1次元は MAS 下で ^1H デカップリングを用いた高分解能測定を行う必要がある。従って、 ψ 角決定に必要な C-H 双極子相互作用、および、C=O \cdot C $_{\alpha}$ の異方的化学シフト相互作用(図2)は残りの1次元に何らかの形で押し込める必要がある。

我々は、初期磁化として J 結合を用いて $^{13}\text{C}=\text{O}$ 、 $^{13}\text{C}_{\alpha}$ のゼロ量子コヒーレンス(ZQC)を作成した。ここで双極子相互作用ではなく、J 結合を用いたことにより、直接結合している ^{13}C 、 ^{13}C 間の ZQC のみが選択的に励起される。これにより、不必要なピークが入り混じることも無く、容易にスペクトルの解析ができる。作成した ZQC は t_1 時間の間、C-H 双極子相互作用と ^{13}C の化学シフト異方性の下で時間推進させ、 ψ 角の情報をエンコードした。その際に、H-H 双極子相互作用を消去しつつ C-H 双極子相互作用を残すため、 ^1H 側に FSLG2[1]パルス照射した。これらの相互作用の大きさと相対配向は、ZQC の回転サイドバンド(SSB)の強度に反映される。

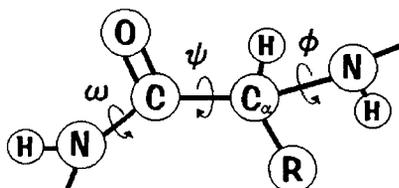


Fig.1. Dihedral angle ϕ , ψ , and ω in peptide.

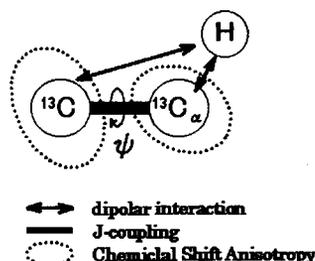


Fig.2. Spin system and interactions to be considered.

キーワード: 二面角 ψ 、ゼロ量子遷移、ペプチド、固体NMR

○みぞかみ じゅん、たけごし きよのり、てらお たけひこ

実験には炭素を全て ^{13}C で置換した L-alanine を使い、ChemMagn 社の CMX-300 に Doty 社製 5 ϕ MAS プローブを用いて測定した。TPPM の強度は 82kHz、FSLG2 の強度は 54kHz、MAS 速度は 3.5kHz で実験を行った。 t_1 として、15 μs 刻みで 180 点測定した。図3に、C=O の位置の ZQC のスペクトルを示す。既に得られている化学シフトテンソル値[2]や、分子構造[3]を用いて、 ψ 角を変えながらマルチステップ法によるシミュレーションを行い、図4のような RMSD を得た。得られた ψ 角は中性子散乱で得られた角度+1 度であり、極めて精度良く ψ 角が得られることを示すことが出来た。

この手法では、2次元側に通常の高分解能スペクトルが用いられているため、各ペプチドの C=O や C_α のうちの一方のピークが分離されてさえいれば、ZQC の SSB の分離測定、すなわち、 ψ 角の決定が可能になる。また、ZQC を用いているために、1次元上で重なっているピークも ZQC スペクトルでは分離することが期待される。従って、この手法により、多重ラベルした大きなペプチドの全ての ψ 角を1回の実験で決定できると考えている。

本手法のスペクトルの解析には C=O の化学シフトテンソルの配向が必要である。C=O の化学シフトテンソルの分子の局所構造に対する配向は良く確立されている。しかしながら、一般的には、ペプチドの C=O の化学シフトテンソルの方向は正確にはわかっているわけではない。そこで、C=O の化学シフトの代わりに、C-N の双極子相互作用を用いることも検討している。このような多重ラベル試料を用いた ϕ 、 ψ 角の決定は、3次元以上の高次の NMR 法を用いることが出来れば、より直接的な実験で可能になると考えられるが、S/N や固体 NMR の T_2 などを考慮すると、3次元以上の実験は実用的ではなく、本研究のような多量子遷移を1次元に用いた2次元法が有効ではないかと考えている。

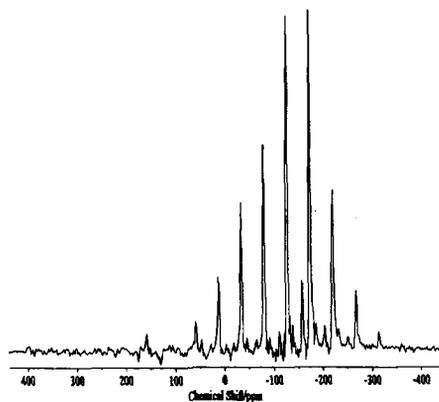


Fig.3. ZQC spinning side band pattern of C=O.

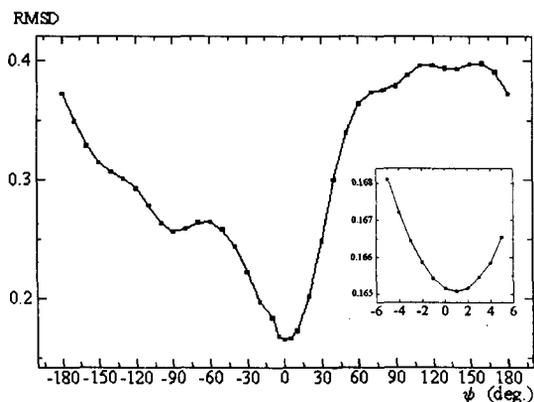


Fig.4. RMSD between the experimental and simulated spectra.

References

- [1] A. Bielecki, A.C. Kolbert, and M.H. Levitt, *Chem. Phys. Lett.* 155, 341(1989).
- [2] A. Naito, S. Ganapathy, and C.A. McDowell, *J. Chem. Phys.* 74,3190(1981)
- [3] M.S. Lehmann, T.F. Koetzle, and W.C. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* 94,2657(1972)

Deuterium NMR Study of Disordered Structure in the Glassy Crystal Pentachlorotoluene

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University,
Kyoto 606-8502, Japan

○Shinji Ichikawa, Atushi Kubo, Fumio Imashiro, and Terao Takehiko

Abstract:

We have been studying the orientational correlation between neighboring molecules in a glassy crystal pentachlorotoluene by using deuterium magic-angle hopping quadrupole-order spin diffusion NMR experiments. In the course of the study, we found it necessary to evaluate the dipolar and quadrupolar line-widths of the single-crystal deuterium NMR spectra when we determine the orientational correlation from the cross-peak intensities. The dipolar line-width was calculated from the crystal structure data. We assumed that the molecule possesses a small-angle static orientational disorder and calculated its contribution to the quadrupolar line-width. The angular dependence of the experimental line-width at 135 K was well fitted by this model. We determined the root mean square rotational displacements to be around 1° . These results will be employed to analyze the spin diffusion experiments.

[序論]

我々は、ガラス性結晶ペンタクロロトルエンにおいて、近傍分子間における配向の相関を調べるために、単結晶重水素NMRにおいて選択的スピン拡散の実験を行ってきた。前々回のNMR討論会では、低温135 Kでスピン拡散によるクロスピークが観測できたことを報告した[1]。

この結果を解析するには、スピン拡散のシミュレーションが必須であるが、スピン拡散は磁化の交換を行う相互のスピン共鳴周波数のオフセットの大きさに敏感である。つまり線幅に依存する。

一方で、単結晶の重水素NMRスペクトルのピークは 135 K において、近傍スピンの双極子相互作用による影響から見積もられるよりも幅広い。そこで、近傍分子間の配向の相関を解析するには、この大きな線幅の原因を解明することが必要であった。我々はこの原因が、分子が結晶中で平衡位置からそれぞれずれた位置にありそのため四極子相互作用の大きさに分布が生じていることにあると考え、以下に述べるような解析を行い、大きな線幅を説明することが出来た。また、線幅の磁場に対する角度依存性から、分子を剛体と考えたときの分子の回転変位の大きさを見積もった。このようにして得た双極子による線幅及び四極子による線幅を用いてスピン拡散の解析を行った。

[理論：分子の微小角回転による線幅]

分子が結晶中で平衡位置からそれぞれ微小角回転した状態で存在していると仮定する。このとき、個々の分子に含まれる重水素核の共鳴周波数に分布が生じ、そのため重水素核のスペクトルの線幅が広がる。剛体分子の静的回転による平衡位置からのずれを回転変位と呼ぶとき、回転変位に伴う重水素核の線幅の増大は、回転変位の固定されている結晶の向きと、磁場のなす角度に依存して変化することになる。この関係は以下のように式に表すことができる。

分子が回転しているとき、その角度が十分小さければ、角速度との類似からその回転 ω は、Fig. 1. の x 軸 y 軸 z 軸まわりの回転

ω_x ω_y ω_z の重ね合わせで表せる。

$$\omega = \omega_x \mathbf{i} + \omega_y \mathbf{j} + \omega_z \mathbf{k}$$

回転変位の分布を表すために平均二乗変位を用い、回転変位テンソル L を次のように定義する。

$$L = \overline{\omega \cdot \omega^T}$$

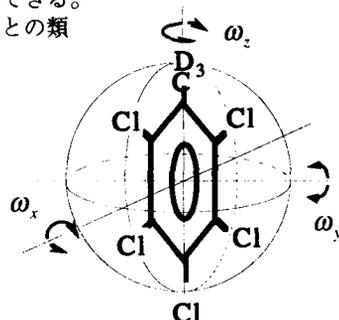


Fig. 1. Rotational displacement.

重水素NMR、ガラス性結晶、スピン拡散、線幅、disorder

いちかわしんじ、くぼあつし、いましてろふみお、てらおたけひこ

分子の微小回転に伴う、観測周波数 f の変化率 ∇f は、

$$\nabla f = \frac{\partial f}{\partial \omega_x} \mathbf{i} + \frac{\partial f}{\partial \omega_y} \mathbf{j} + \frac{\partial f}{\partial \omega_z} \mathbf{k}$$

で表せ、分子が十分に小さい角度 ω だけ回転したとき、観測周波数の変化の大きさ Δf は

$$\begin{aligned} \Delta f &= \nabla f^T \cdot \omega \\ &= \frac{\partial f}{\partial \omega_x} \cdot \omega_x + \frac{\partial f}{\partial \omega_y} \cdot \omega_y + \frac{\partial f}{\partial \omega_z} \cdot \omega_z \end{aligned}$$

と表すことができる。よって、分子の回転変位による観測周波数の平均二乗変化 $\overline{(\Delta f)^2}$ は

$$\begin{aligned} \overline{(\Delta f)^2} &= \overline{\left(\frac{\partial f}{\partial \omega_x} \cdot \omega_x + \frac{\partial f}{\partial \omega_y} \cdot \omega_y + \frac{\partial f}{\partial \omega_z} \cdot \omega_z \right)^2} \\ &= \text{Tr} \left\{ \begin{pmatrix} \omega_x^2 & \omega_x \cdot \omega_y & \omega_x \cdot \omega_z \\ \omega_y \cdot \omega_x & \omega_y^2 & \omega_y \cdot \omega_z \\ \omega_z \cdot \omega_x & \omega_z \cdot \omega_y & \omega_z^2 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 f}{\partial \omega_x^2} & \frac{\partial^2 f}{\partial \omega_x \partial \omega_y} & \frac{\partial^2 f}{\partial \omega_x \partial \omega_z} \\ \frac{\partial^2 f}{\partial \omega_y \partial \omega_x} & \frac{\partial^2 f}{\partial \omega_y^2} & \frac{\partial^2 f}{\partial \omega_y \partial \omega_z} \\ \frac{\partial^2 f}{\partial \omega_z \partial \omega_x} & \frac{\partial^2 f}{\partial \omega_z \partial \omega_y} & \frac{\partial^2 f}{\partial \omega_z^2} \end{pmatrix} \right\} \\ &= \text{Tr} \{ L \cdot (\nabla f \cdot \nabla f^T) \} \end{aligned}$$

で表すことができる。 $(\nabla f \cdot \nabla f^T) = G$ と表し、テンソル G を角度変化に由来する勾配テンソルと呼ぶ。角度変化に由来する勾配テンソル G は、静磁場に対して角度依存性を持つので、分子の回転変位による観測周波数の平均二乗変化つまりスペクトルの線幅も、磁場に対して角度依存することになる。角度依存性の式はオイラー変換を何度か行うことで導出できるが、結果が長くなるのでここでは省くことにする。この式を用いたシミュレーションの結果を以下に示す。

[結果及び考察]

結晶の b 軸を静磁場の方向からマジック角だけ傾けてセットし、結晶を b 軸周りに回転させたそれぞれの位置で四極子エコースペクトルを取り、重水素核の回転パターンを得た。この試料でメチル基のとおりうる配向はベンゼン環周りに六つあり、この配向が乱雑に分布している[2]。

Fig. 2. は、それぞれの配向に対応した六つのダブルレットのうちの一つのピークにおける、線幅の磁場に対する角度依存性のグラフである。Fig. 2. 中で ΔV_{dD} , ΔV_{dCl} はそれぞれ、近傍の重水素核、塩素核からの双極子相互作用による線幅への寄与の大きさを表している。これらの値は、結晶構造のデータ[3]から計算して求めた。回転変位テンソル L の成分 ω_x , ω_y , ω_z をフィッティングによって

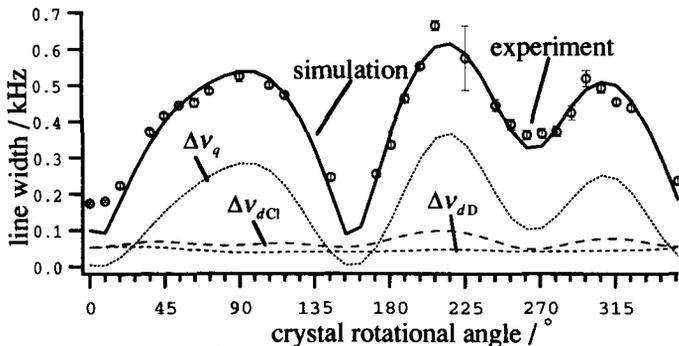


Fig. 2. The rotational angle dependences of line width.

[参考文献]

- [1] 市川真史、久保厚、今城文雄、寺尾武彦、第36回NMR討論会要旨集, 312, (1997)
- [2] A. Kubo, A. Yogo, F. Imashiro, and T. Terao, *J. Phys. Chem.*, **100**, 39, (1996)
- [3] C. P. Brock and Y. Fu, *Acta Cryst.*, **B53**, 613-619, (1997)

求め、それぞれ 0.309, 0.306, 0.056 の値 (単位は deg^2) が得られた。 $(\frac{\partial f}{\partial \omega_z} = 0$ なので ω_z を含む項は無視した。)これより、平均すると、分子配向には 1° 程度の回転変位があることがわかった。 0° 及び 150° 付近で線幅が細くなっている。これは静磁場の方向が四極子テンソルの三つの主軸のうちの一つの方向を向いているため、勾配テンソルの値が小さくなっているからである。

^{13}C - ^{13}C polarization transfer by resonant interference recoupling under magic-angle spinning in solid-state NMR
(Kyoto-u) K. Takegoshi, S. Nakamura, and Takehiko Terao

A new mechanism (Resonance Interference Recoupling, RIR) for ^{13}C - ^{13}C polarization transfer under magic-angle spinning (MAS) is proposed and studied both theoretically and experimentally. By applying a pulse technique called FSLG- $\overline{m2mm}$ to ^1H , which is based on frequency-switched Lee-Goldburg sequence, the spin part of the ^{13}C - ^1H dipolar interaction is modulated with a particular frequency to interfere with the ^{13}C - ^{13}C dipolar interaction.

序論

炭素 13 のような希釈スピン間での磁化移動は分子の構造情報を得る方法として用いることができるために、これまで理論的にも実験的にも研究されてきている。MAS 下で効率の高い磁化移動を生じるためには、MAS 法により取り除かれた双極子相互作用を復活させること、及び、高分解能な ^{13}C 間の磁化移動がエネルギー保存則を守る必要がある。我々は、(1)炭素にラジオ波照射を行わず、(2)MAS 周波数の制限を少なくして、(3)高分解能を保ったまま観測を行うことのできる新しい手法を提案する。本方法では ^1H 駆動法と異なり、水素核に ^1H - ^1H 双極子相互作用を取り除くための FSLG- $\overline{m2mm}$ [1] というパルスを照射する。FSLG- $\overline{m2mm}$ 照射下では、 ^{13}C - ^1H 双極子相互作用は空間部分が MAS 周波数による変調を、スピン部分が FSLG- $\overline{m2mm}$ による変調を受ける。一方、 ^{13}C - ^{13}C 双極子相互作用は空間部分が MAS 周波数により、スピン部分が化学シフト等方値差による変調を受けている。この ^1H - ^{13}C と ^{13}C - ^{13}C の双極子相互作用の変調周波数が一致したときに ^{13}C - ^{13}C 双極子相互作用が復活することを理論的に示して、実験により確かめた [2]。

理論

^1H - ^1H 双極子相互作用は FSLG- $\overline{m2mm}$ により取り除かれているので無視して、また簡単のために化学シフト異方性がないものとして、二つの炭素核 (S_1 と S_2) と一つの水素核 (I) から成る系を考えた。 ^{13}C - ^{13}C 双極子相互作用 $H_D^{SS}(t)$ は MAS 周波数 ν_R と化学シフト等方値差 Δ による変調を受けており、スピン演算子と変調周波数の成分からの部分は、

$$H_D^{SS}(t) = S_{1+} S_{2-} \exp\{2\pi i t(\Delta + n\nu_R)\} + S_{1-} S_{2+} \exp\{-2\pi i t(\Delta - n\nu_R)\} \quad (n = \pm 1, \pm 2) \quad (1)$$

と表すことができる。一方、 ^1H - ^{13}C 双極子相互作用 $H_D^{SI}(t)$ は FSLG- $\overline{m2mm}$ による変調周波数 ν_{mod} と MAS 周波数 ν_R による変調をうけて、

$$H_D^{SI}(t) = I_x S_{iz} \exp\{2\pi i t(\nu_{\text{mod}} + m\nu_R)\} + I_x S_{iz} \exp\{-2\pi i t(\nu_{\text{mod}} - m\nu_R)\} \quad (m = \pm 1, \pm 2) \quad (2)$$

キーワード: スピン拡散、MAS、FSLG、固体 NMR

たけごし きよのり、なかむら しんじ、てらお たけひこ

と表せる ($i=1, 2$). Secular average Hamiltonian 理論を適用すると、一次の時間平均ハミルトニアンは等しい周波数を持つ $H_D^{SS}(t)$ と $H_D^{IS}(t)$ の非可換な項として与えられる。結局、双極子相互作用の復活条件 (RIR 条件) は

$$|\nu_{MOD} + n\nu_R| = |\Delta + m\nu_R|, \quad (n, m = \pm 1, \pm 2) \quad (3)$$

と求められる。

実験

実験には、[1, 3- ^{13}C]L-アラニンを用いた。磁化移動実験は t_1 次元での反平行炭素磁化 $\langle S_{1z} - S_{2z} \rangle$ の時間発展を観測することにより行った。

結果と考察

[1, 3- ^{13}C]L-アラニンにおいて、 ^1H -駆動法、RIR 法、R2 法による 3 つの磁化移動実験を行い、RIR 条件において磁化移動が促進されることを下図に示した。MAS 周波数は、 ^1H -駆動法と RIR 法には $\nu_R = 10.85$ kHz、R2 法には $\nu_R = 11.79$ kHz をそれぞれ用いた (9.7T の磁場において、化学シフト等方値差 $\Delta = 11.79$ kHz である)。 ^1H 駆動法は効率が低くなっている。一方、RIR 法では $\nu_R - \nu_{MOD} = \Delta - m\nu_R = 0.94$ kHz の RIR 条件を満たすように FSLG-242 パルスを ^1H 側に照射することにより、 ^1H -駆動法に比べて約 2.5 倍の磁化移動効率が観測されて、適切に磁化移動の効率が促進されていることを確かめることができた。R2 では $\nu_R = \Delta = 11.79$ kHz に調整することにより、最も効率良く磁化移動が行われている。しかしながら、この条件下では ^{13}C の線形は特徴的な双極子パターンを示すために高分解能という利点が失われている。

ここで用いた [1, 3- ^{13}C]L-アラニンは、大きな化学シフト等方値差と小さな ^{13}C - ^1H 双極子相互作用のために、R2 法には適して RIR 法と ^1H 駆動法では難しい試料であると言える。にも関わらず RIR 法において磁化移動効率が促進したことは RIR 法の有効性を示していると考えられる。R2 法の適用が難しい化学シフト差が小さい場合においても RIR 法の適用は可能であること、また、R2 条件では高分解能の利点を生かせなく、RIR 法では FSLG- $m2mm$ パルスを ^1H デカップリングに切り替えることにより高分解能で磁化移動を観測できることなどいくつかの利点がある。ポスターはこのような点についての実験例も発表する。

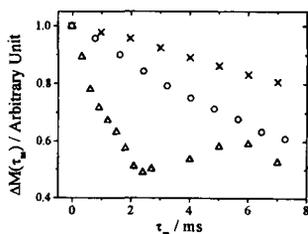


Fig. Mixing time dependence of the difference of magnetization between the C=O and CH_3 carbons in [1,3- ^{13}C] L-alanine for three different polarization transfer approaches: ^1H -driven (\times), R2 (Δ), and RIR (\circ). $\nu_R = 10.85$ kHz for ^1H -driven and RIR, and 11.79 kHz for R2. For RIR, the condition of $\nu_R - \nu_{MOD} = \Delta - \nu_R = 0.94$ kHz is fulfilled.

参考

1. K. Takegoshi and T. Terao, Solid State N. M. R. 13(1999) 203-212
2. A preliminary report of this work is found in
K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, Chem. Phys. Lett. 307(1999) 295-302,

固体 ^{13}C - ^2H 2次元相関 MAS NMR 法による 常磁性シフトテンソルの決定

(京大院理) ○伊藤俊樹、久保 厚、寺尾武彦

Determination of the paramagnetic shift tensor

by ^{13}C - ^2H 2D MAS NMR

(Kyoto Univ.) T. Itoh, A. Kubo, T. Terao

Abstract:

A new solid-state MAS NMR method to determine paramagnetic shift tensors is proposed. This pulse sequence consists from a normal anti-echo sequence and a t_1 -time reversed echo sequence, and a TEDOR (Transferred-Echo DOuble Resonance) sequence is used in the mixing time. By this method, the sidebands of ^{13}C and ^2H are correlated on the plane of the 2D MAS NMR spectrum and these sidebands should be purely absorptive. When the projection is taken on the diagonal line, the zero-quantum coherence transition between ^{13}C and ^2H can be observed and then the broadening of the spectrum caused by the BMS (bulk magnetic susceptibility) effect can be removed. Even if several peaks are overlapping with each other by the BMS effect in a normal 1D MAS spectrum, this method enables the separate detection of peaks. From the sideband patterns of the zero-quantum transition, we can obtain the information on paramagnetic shift tensors. The method will be tested on ^{13}C - ^2H fully labeled $\text{Pr}(^{13}\text{C}^2\text{H}_3^{13}\text{COO})_3 \cdot ^2\text{H}_2\text{O}$.

【序論】

常磁性固体の粉末試料には、微結晶の表面で不連続に変化する磁化率のために、不均一磁場が生じる(BMS効果)。このため、MAS NMRにおいても化学シフトや常磁性シフトの等方値に分布が生じ、分解能が悪い。しかし、不均一磁場によるピークの広幅化は、異種核間で2次元相関MAS NMRスペクトルを観測したときには、化学シフトを軸にとった2次元平面上で傾き1の直線に平行に生じる。従って、2次元スペクトルをその直線に対して垂直な直線に投影すれば、広幅化がキャンセルされた先鋭化したスペクトルが得られる。通常の1次元スペクトルでは複数のサイトのピークが重なり合っている試料でも、この方法によれば、各サイト毎に分離されたゼロ量子遷移のサイドバンドパターンを観測することができ、化学シフトや常磁性シフトの異方性に関する詳細な情報を独立に得ることが可能となる。

著者らは、 ^{13}C 及び ^2H で完全標識した酢酸プラセオジウム1水和物 $\text{Pr}(^{13}\text{C}^2\text{H}_3^{13}\text{COO})_3 \cdot ^2\text{H}_2\text{O}$ を試料として用い、炭素-重水素間の2次元相関スペクトルを測定し、昨年のNMR討論会にて報告した[1]。2次元相関スペクトルでは、結晶学的に非等価な3つの酢酸基に相当する信号を分離、観測し、それぞれのピークのシフト等方値を決定することができた。今回は、炭素、重水素のそれぞれのサイドバンドを2次元スペクトルの平面上にて相関づけ、炭素-重水素間のゼロ量子遷移のサイドバンドパターンを3つのメチル基毎に独立に得ることを試みた。そのためのパルス系列を新たに考案した。

【パルス系列】

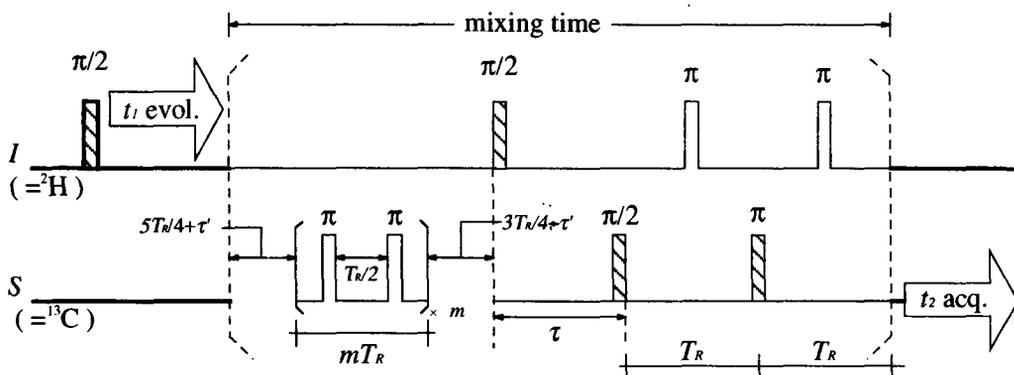
2次元スペクトルにおいて、異種核(今回の実験では ^{13}C と ^2H)のそれぞれのサイドバンドの相関をとるために、今回新たにパルス系列を作成した(FIG.1)。このパルス系列は、

- ・混合期間中のパルス系列としてTEDOR (Transferred-Echo DOuble Resonance)系列[2]を用い、 ^{13}C - ^2H 間の双極子相互作用を復活させ、 ^{13}C 核と ^2H 核との相関をとっている。

Keywords: 常磁性固体、常磁性シフト、異種核間2次元相関MAS NMR、ゼロ量子遷移

いとう としき、あつし くほ、てらお たけひこ

・ 2次元スペクトル上の全てのスピニングサイドバンドを純粋な吸収線形で得るために必要な、 t_1 次元時間順行、 t_1 次元時間逆行2種類のパルス系列からなる[3]。 t_1 次元時間順行のパルス系列では、 t_1 発展期間中にIスピンの上昇演算子成分を観測し、 t_1 次元時間逆行のパルス系列では下降演算子成分を観測するよう、位相相しにて選択する。混合時間全体が、順行系列では回転周期(T_R)の整数倍、逆行系列では整数倍- t_1 となるよう、 τ を調節した。さらに、混合時間中の平均ハミルトニアンが、それぞれ $H_{mix}(t_1)$ 、 $H_{mix}(-t_1)$ となるよう π パルスの位置を調節した。 t_1 次元時間順行で得られたFIDを g 、 t_1 次元時間逆行で得られたFIDを g^* とすると、 $(g+g^*)/2$ を2次元の実数データ、 $(g-g^*)/2i$ を虚数データとして2次元フーリエ変換することにより、2次元スペクトルを得る。



$$\tau = \begin{cases} T_R & : \text{the normal anti-echo sequence} \\ nT_R - t_1 & : \text{the } t_1\text{-time reversed echo sequence} \end{cases}$$

("n" is chosen appropriately to restrict τ to be $0 < \tau \leq T_R$.)

$$\tau = \begin{cases} \tau & : \text{the normal anti-echo sequence} \\ \tau - T_R/2 & : \text{the } t_1\text{-time reversed echo sequence} \end{cases}$$

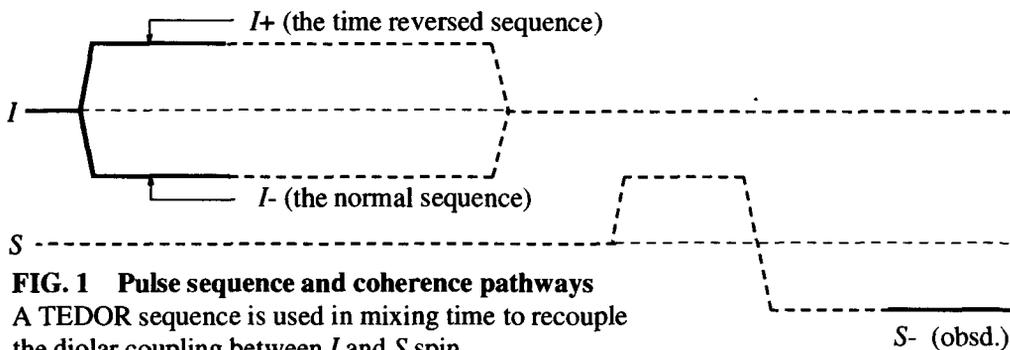


FIG. 1 Pulse sequence and coherence pathways

A TEDOR sequence is used in mixing time to recouple the diolar coupling between I and S spin.

S- (obsd.)

References:

- [1] 伊藤俊樹, 久保厚, 寺尾武彦, 第 37 回 NMR 討論会講演要旨集, 293 (1998)
- [2] A. W. Hing, S. Vega, and J. Schaefer, *J. Magn Reson. A* **103**, 151 (1993)
- [3] G. J. Boender and S. Vega, *J. Magn Reson.* **133**, 281 (1995)

高速MAS下における ^{15}N - ^1H / ^{13}C - ^1H 相関NMR 法によるペプチドの ϕ 角決定法の開発

(京大院理) ○今泉孝幸、竹腰清乃理、寺尾武彦

Two-dimensional correlation NMR in solids for determining peptide ϕ angles under fast magic-angle spinning

(Dep. of Chem., Kyoto Univ.) ○Takayuki Imaizumi, K. Takegoshi, and T. Terao

The FSLG-242 pulse sequence was used to recouple heteronuclear dipolar interactions under fast MAS in a peptide H-N-C-H spin system to determine its dihedral angle ϕ . The ^{15}N - ^1H dipolar interaction is correlated to the ^{13}C - ^1H dipolar interaction in a two-dimensional spectrum. Simulation of the two-dimensional spectra for given ϕ values was done by using the zeroth-order average Hamiltonian, and it is shown that the pattern is sensitive to the ϕ angle. RMSD between the simulated and the experimented spectra was calculated, and the best ϕ angle is in good agreement with that obtained by the X-ray study.

〔序論〕 ペプチドの主鎖の構造決定に重要な H-N-C-H の二面体角 ϕ (Fig.1)を精密に決定する方法としてこれまでに主に (1) MAS 下で N-C の多量子 NMR を N-H、C-H 双極子相互作用や化学シフト相互作用の下で時間推進させ、回転サイドバンドパターンに反映させる方法[1]と (2) C-H と N-H の双極子相互作用を個別に復活し二次元相関スペクトルを測定する方法[2]が提案されている。(1)の方法では、充分な数の回転サイドバンドを生じるためには

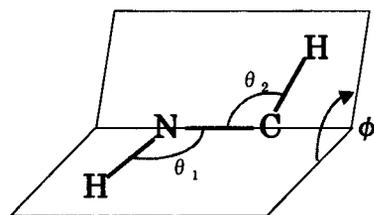


Fig.1. Peptide ϕ angle representation with bond angles θ_1, θ_2 in H-N-C-H system

MAS の回転を遅くせねばならない ($\sim 2.5\text{kHz}$)。また Ishii の方法[2]でも高速な MAS 回転を行うことは出来なかった。

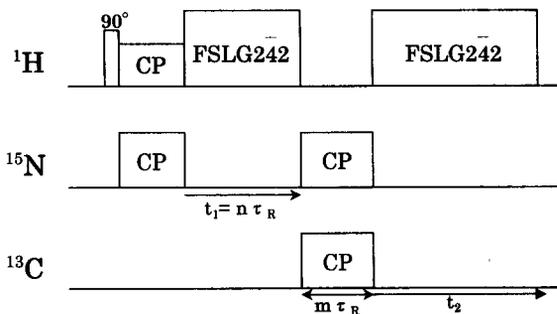


Fig.2. Pulse sequence for 2D experiment using the FSLG-242 pulse

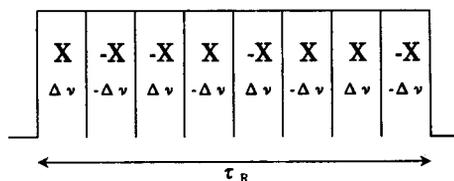


Fig.3. The FSLG-242 pulse for recoupling heteronuclear dipolar interactions. X and ν represent a phase and an offset frequency, respectively. τ_R describes one rotor period.

キーワード：二面角 ϕ 、ペプチド、固体 NMR

○いまいずみたかゆき、たけごしきよりの、てらおたけひこ

MAS 回転が遅いと多数の同位体置換を行った試料では同種核双極子相互作用を消去しきれずに高分解能スペクトルを得ることが困難になる。そこで、我々は近年開発した C-H や N-H 双極子相互作用を高速 MAS 下で復活することの出来る FSLG-242 パルス法[3]を (2) の手法に用いることで、高速 MAS 下で $^{15}\text{N}\text{-}^1\text{H}/^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$ 双極子相互作用の相関スペクトルを測定し ϕ 角を求めた。

〔実験〕 試料には N-アセチル-[100% ^{15}N , 1,2- ^{13}C]DL-バリンを用いた。パルス系列を Fig.2 に、また FSLG-242 パルスを Fig.3 に示す。実験は Chemagnetics 社製 CMX-300 分光器に自作の ^{15}N 用 NMR 送受信機を組み込み、Doty Sci.社製 CP-MAS 三重共鳴(5 mm)プローブを用いて行った。共鳴周波数は ^{13}C が 75.553MHz で ^{15}N が 30.448MHz である。MAS 回転周波数は 14.188kHz で $\pm 20\text{Hz}$ 以内に保った。また ^1H の FSLG 照射強度は 105kHz であった。

〔結果と考察〕 いろんな ϕ 角に対して 0 次のアベレージハミルトニアンを用いて二次元パターンを計算した。角度 θ_1 、 θ_2 及び核間距離 C-H、N-H は X 線回折結果[4]を用いた。Fig.4 に代表的な 4 つの角度についての計算スペクトルと実験スペクトルを示す。二次元相関パターンや $F_1, F_2=0$ のスライススペクトルなどが ϕ 角に敏感であることが判った。実測のスペクトルは X 線で決定された値[4] $\phi \sim 154^\circ$ 近傍でよく再現されている。

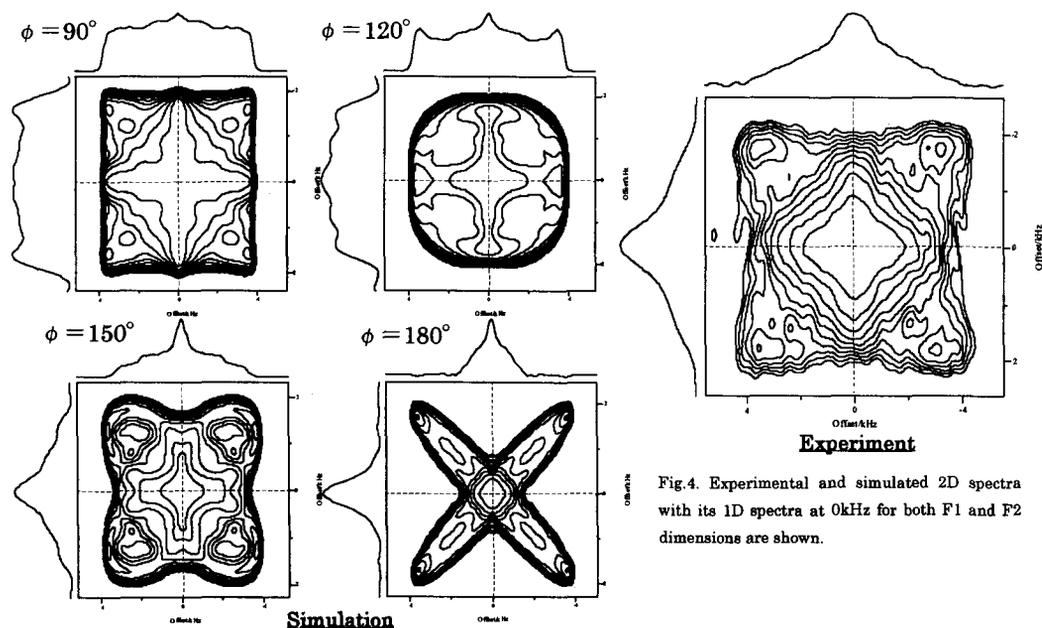


Fig.4. Experimental and simulated 2D spectra with its 1D spectra at 0kHz for both F1 and F2 dimensions are shown.

References

- [1] For example, M. Hong, J.D. Gross, and R.G. Griffin, *J. Phys. Chem.* B101, (1997) 5869.
- [2] Y. Ishii, K. Hirao, T. Terao, T. Terauchi, M. Oba, K. Nishiyama, and M. Kainosho, *Solid State NMR* 11, (1998) 169.
- [3] K. Takegoshi and T. Terao, *Solid State NMR* 13, (1999) 203.
- [4] P.J. Carrol, P.L. Stewart, S.J. Opella, *Acta Crystallogr., Sect. C* 46, (1996) 243.

P78 同位体ラベル絹シーケンスモデル化合物の2次元粉末パターン解析

(東京農工大工) ○中澤靖元、中井利仁、芦田 淳、岩館満雄、大郷耕輔、朝倉哲郎

Two Dimensional Powder Pattern Analyses of Isotope Labeled Silk Model Peptides

The backbone torsion angles (ϕ and ψ) of alanine residue in sequential model peptides for *Bombyx mori* silk fibroins with Silk I form (before spinning) were determined with 2D spin-diffusion solid state ^{13}C NMR. Especially, 2D spin-diffusion solid state ^{13}C NMR coupled with stable isotope labeling of the samples is very useful in determination of ϕ and ψ values of non-oriented peptide samples.

緒言

家蚕絹の繊維化前の構造、Silk I について、無配向系でも原子座標レベルの構造解析が可能な固体 NMR の研究手法を用いて、解析を進めるために、ここでは、2次元粉末パターン固体 NMR 解析から、Silk I 構造の解析を行った。

荘司らは、家蚕絹フィブロインのオリゴペプチドモデル、 $(\text{Ala-Gly})_{12}$ が⁵、Silk I 型構造をとることを報告している¹⁾。そこで、我々は、Silk I 型の $(\text{Ala-Gly})_{12}$ を合成し、1 2 残基目の Gly カルボニル基と 13 番目の Ala カルボニル基が ^{13}C 同位体ラベルされた $(\text{Ala-Gly})_{12}$ と、13 残基目の Ala カルボニル基と 14 番目の Gly カルボニル基が ^{13}C 同位体ラベルされた $(\text{Ala-Gly})_{12}$ を得、各々、13 残基目の Ala 残基の内部回転角と 14 残基目の Gly 残基の内部回転角を決定することを試みた。

実験

合成に用いる安定同位体ラベルアミノ酸の Fmoc 基の導入は Fmoc-OSu を用いて塩基性条件下で反応させ、90%の収率で得られた。ノンラベル $(\text{AG})_{12}$ 及び、 $[1-^{13}\text{C-Gly}_{12}, 1-^{13}\text{C-Ala}_{13}] (\text{AG})_{12}$ は Pioneer Peptide Synthesis System (PE Biosystems 社製)によって Fmoc 固相合成法により合成した。合成スケールは 0.2mmol、合成モードはキャッピングを用いた。合成後、クリベージを 3 時間行い、ジエチルエーテルを用いてペプチドを析出させた。得られた粗ペプチドを 9M LiBr に溶解後、不溶物を吸引濾過により除去し、分画 1000 の透析膜を用いて透析を 3 日間行った。透析開始後 3 時間は 3M LiBr を用い、濃度勾配をかけている。透析膜内に生成した目的物は吸引濾過により取り出し、減圧乾燥した。Silk I 型の確認は IR スペクトルを KBr 錠剤法によって測定し、全ての吸収が Silk I 型の吸収と一致することを確認した。また、粉末 X 線測定を行い、その結果も Silk I 型の回折像と一致していることを確認している。

絹シーケンスモデル化合物、絹の安定同位体ラベリング、2次元粉末パターンスペクトル、シルク I 構造

なかざわやすもと、なかいとしひと、あしだじゅん、いわだてみつお、おおごうこうすけ、あさくらてつお

^{13}C 二次元スピン拡散 NMR 測定は Varian Unity INOVA 400 によって Off MAS(68°) 条件で行った。積算回数は 1188 回、ミキシングタイムは 2s、試料回転速度は 6KHz、室温で測定した。シミュレーションは 2-spin 系でのスペクトルの理論をもとに作製した Fortran プログラムを SGI 社製の OCTANE を用い、二面角を 20° 間隔で計算した。1 サンプルに要する計算時間は約 30 分であった。

結果と考察

化学シフト異方性の大きいカルボニルをダブルラベルした [$1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Gly}_{12}$, $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Ala}_{13}$] (AG)₁₂ (Silk I 型) の ^{13}C 二次元スピン拡散 NMR スペクトルパターンは、13 番目のアラニン残基の内部回転角(ϕ , ψ)に著しく依存するので、Silk I 型構造中のアラニン残基の内部回転角を決定できる。測定結果を Figure 1 に示した。対角成分と共に、特徴的な非対角成分が観測された。内部回転角を 20° 間隔で変化させて行ったシミュレーションと対応させることによって、13 番目のアラニン残基は、 $\phi=-40^\circ\sim-80^\circ$, $\psi=110^\circ\sim150^\circ$ をとることがわかる (Figure 2)。この結果は、以前当研究室において、40 個のタンパク質について、PDB 座標と ^{13}C 化学シフトのデータベースを基に作成した化学シフトの等高線マップを用いて計算した Silk I 型の化学シフトの範囲ともよく一致することがわかった²⁾。現在、 [$1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Ala}_{13}$, $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Gly}_{14}$] (AG)₁₂ (Silk I 型) の合成を行い、14 番目のグリシン残基の内部回転角についてもスピン拡散 NMR を用いて解析を行っている。

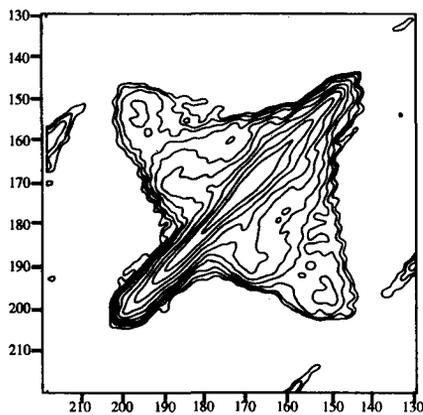


Figure 1 ^{13}C 2D spin-diffusion NMR spectra of [$1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Ala}_{13}$, $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Gly}_{14}$] (AG)₁₂

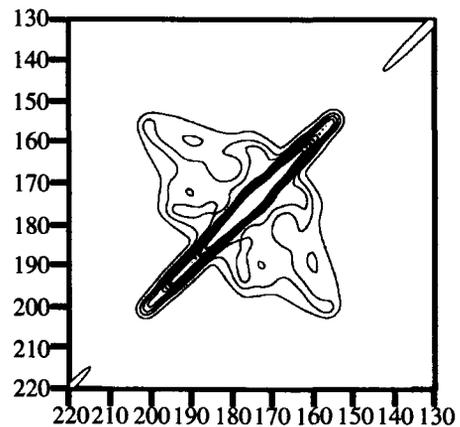


Figure 2 ^{13}C 2D spin-diffusion pattern simulation for [$1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Ala}_{13}$, $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-Gly}_{14}$] (AG)₁₂ ($\phi, \psi = (-60, 130)$)

なお、本研究は一部、生研機構基礎技術推進事業により行われた。

参考文献

- 1) 第 48 回高分子学会予稿集 48 巻 4 号 p785(1999)
- 2) Tetsuo Asakura, Mitsuo Iwadate, Makoto Demura and Michael P. Williamson; *Int. J. Biol. Macromol.* 24 167-171(1999)

A new solid-state NMR technique is proposed to recouple ^{14}N - ^{13}C heteronuclear dipolar interactions under magic angle spinning (MAS). Cw rf irradiation is applied at the "overtone" frequency between the $| -1 \rangle$ and the $| 1 \rangle$ states of a ^{14}N ($I = 1$) spin. Under MAS, the transition moment is modulated with a frequency equal to the MAS frequency, because the moment depends on the relative orientation of the principal-axis system of the ^{14}N quadrupolar interaction with respect to the irradiation field[1]. Hence, the modulatory resonance (MORE) recoupling condition is satisfied, and the ^{14}N - ^{13}C dipolar interaction is recovered due to interference of the dipolar interaction and the moment-modulated rf irradiation[2].

^{14}N にLarmor周波数の2倍のラジオ波を照射すると状態 $| 1 \rangle$ と $| -1 \rangle$ のあいだの overtone 遷移が生じる [1]。Overtoneの遷移モーメントの大きさは照射するラジオ波に対する ^{14}N の四重極相互作用の主軸系の相対的な向きに依存するため、MAS下において強度一定の overtone 周波数のラジオ波を照射したとき、遷移モーメントはMASの回転周波数で周期的に変化する成分を持つ。これらの成分に対しては modulatory resonance (MORE) recoupling の条件 [2] が満たされているために、 ^{14}N - ^{13}C 双極子相互作用が復活すると考えられる。

実験には *L*-alanine と *N*-acetyl-*D,L*-valine を用い、 ^1H の共鳴周波数は 199.80485MHz、 ^{13}C は 50.24533MHz、MAS 回転速度は 5.0kHz で、 ^{13}C の高分解能 NMR 測定を ^{14}N の overtone 照射下で行った。図 1 にシミュレートした MAS 下の ^{14}N overtone NMR スペクトル [3] を示した。実線は四重極結合定数を 1.148MHz、非対称パラメータを 0.276 として、破線は四重極結合定数を 3.21MHz、非対称パラメータを 0.41 として計算した。これらは各々、*L*-alanine および *N*-acetyl-*D,L*-valine の ^{14}N の値である。スペクトルの横軸は Larmor 周波数の 2 倍 (28.856MHz) からの offset を表している。図 2 に ^{14}N overtone (照射周波数 28.876MHz、または 28.980MHz) を照射したときおよび照射していないときの *L*-alanine の ^{13}C のスペクトル、図 3 に ^{14}N overtone (照射周波数 28.876MHz、または 28.980MHz) を照射したときおよび照射していないときの *N*-acetyl-*D,L*-valine の ^{13}C のスペクトルを示す。*L*-alanine および *N*-acetyl-*D,L*-valine の C_α -N 双極子相互作用はそれぞれ 28.876MHz および 28.980MHz のラジオ波を照射したときに復活しており、図 1 のシミュレーションから予想される周波数とはほぼ一致していることが示された。

照射する周波数を変えて測定を行い、照射する overtone の周波数と復活する双極子相互作用の大きさ、たとえば ^{13}C の線幅との関係を調べることにより間接的に ^{14}N overtone NMR スペクトルを得ることができると考えられる。Overtone 遷移の共鳴周波数は四重極相互作用の一次のシフトの影響を受けず、二次のシフトの影響を受ける。したがって四重極相互作用によるピークの線

キーワード: ^{14}N overtone、 ^{14}N - ^{13}C 双極子相互作用、MAS、ペプチド

○やのともみ、たけだかずゆき、たけごしきよのり、てらおたけひこ

幅は ω_q^2/ω_0 のオーダーとなるので高分解能のスペクトルが得られるはずである。このようにして得られたスペクトルより ^{14}N の四重極相互作用に関する情報、つまり分子の構造に関する知見を得ることを現在検討している。

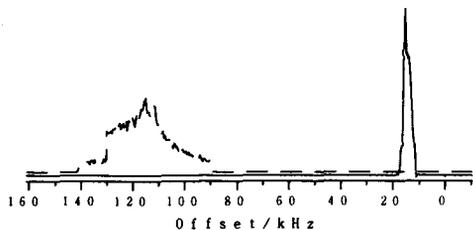


Figure 1. The simulated ^{14}N overtone NMR spectra of *L*-alanine (solid) and *N*-acetyl-*D,L*-valine (broken) under MAS in a 4.7T static field.

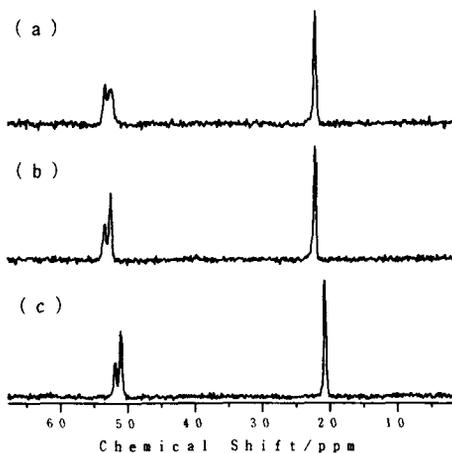


Figure 2. The ^{13}C NMR spectra of *L*-alanine under the ^{14}N overtone irradiation at 28.876MHz(a), 28.980MHz(b) and without irradiation(c).

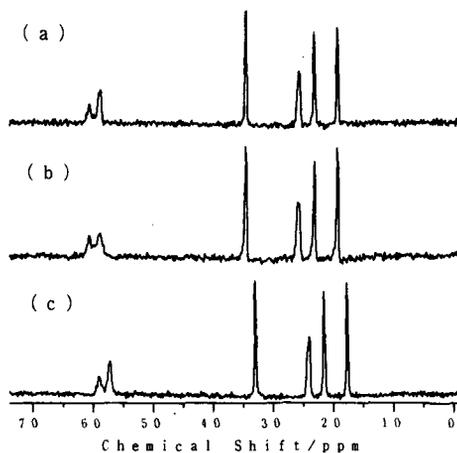


Figure 3. The ^{13}C NMR spectra of *N*-acetyl-*D,L*-valine under the ^{14}N overtone irradiation at 28.876MHz(a), 28.980MHz(b) and without irradiation(c).

References

- [1] R. Tycko and S. J. Opella, *J. Chem. Phys.* **86**, 1761 (1987).
- [2] K. Takegoshi, K. Takeda, and T. Terao, *Chem. Phys. Lett.* **260**, 331 (1996).
- [3] K. Takegoshi, and K. Hikichi, *Chem. Phys. Lett.* **194**, 359 (1992)

P80

Study of dynamic nuclear polarization due to photoexcited triplet states

(京大院理) ○武田和行、竹腰清乃理、寺尾武彦

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

○Kazuyuki Takeda, K. Takegoshi, and Takehiko Terao

In order to achieve drastic enhancement in NMR signals, dynamic nuclear polarization (DNP) due to photoexcited triplet states has been carried out in 0.3T at room temperature in *p*-terphenyl which is doped with pentacene. In the experiment, huge electron spin polarization of the photoexcited triplet state of pentacene is transferred to proton spins by the integrated solid effect (ISE). In a *p*-terphenyl crystal with the pentacene concentration of 0.1mol%, the proton NMR signal amplitude has been enhanced ~700 times as compared to that of the same amount of protons in thermal equilibrium. On the other hand, analyzing the buildup curve of the proton magnetization, the enhancement factor has been obtained as ~70000. This inconsistency may be attributed to that only a small part of the sample experiences the polarization enhancement; the laser for the pentacene excitation cannot penetrate whole the sample and the photoexcited molecules exist only near at the surface of the sample. To confirm it, 1-D imaging of the nuclear spin polarization is carried out by applying field gradient along the laser direction. A home-made probe is also described for our experiment, which consists of an X-band loop-gap resonator for microwave irradiation, a ^1H - ^{13}C doubly-tuned circuit, and a magnetic field modulation coil both for the field sweep in the ISE and for the field gradient in the polarization-imaging experiments.

☆ Key words: photoexcited triplet state, dynamic nuclear polarization (DNP), signal enhancement

○たけだ かずゆき、たけごし きよのり、てらお たけひこ

Investigating the local structure of [1-¹³C]Ala labeled silk fibroins of *S.c. ricini* using solid state NMR

(ETH¹、北大院理²、東京農工大工³) J.D. van Beek¹、L. Beaulieu¹、
○出村誠²、朝倉哲郎³、B. H. Meier¹

Investigating the local structure of [1-¹³C]Ala labeled silk fibroins of *S.c. ricini*
using solid state NMR

J.D. van Beek¹, L. Beaulieu¹, ⁰Makoto Demura², Tetsuo Asakura³, B. H. Meier¹

¹ Laboratory for Physical Chemistry, ETH Zürich, CH-8092 Zürich, Switzerland, ² Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo, 060-0810

Japan, ³ Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

Abstract: Torsion angle distribution in a fibrous protein, *Samia cynthia ricini* silk fibroin, was investigated using solid state NMR. ¹³C uniform labelling at alanine carbonyl carbon of *S.c. ricini* silk fibroin was performed by feeding of [1-¹³C]Ala in order to analyze repeating polyaniline domains of (Ala)_n, with n=10-14. Two-dimensional (2D) double quantum/single quantum correlation experiment (DOQSY) was used for the evaluation of the relative tensor orientations of two neighbouring amino acids in the same chain. By calculating basis spectra across a grid of (ϕ , ψ) angles from -180° to +180° and fitting these to the experimental spectrum, the distribution of torsion angles is obtained.

The elucidation of the secondary structure in solid fibrous proteins is still a challenging task. Here we will concentrate on silk proteins which form nature's high performance fibers. These materials are usually semicrystalline and some structural information on the microcrystalline domains can be obtained by X-ray diffraction. For the non-crystalline domains, only limited information from spectroscopic studies is available. Due to the large molecular weight, the highly repetitive primary structure of the protein, and the structural heterogeneity of the solid protein (in our case the silk thread), the signals from the individual amino acids cannot be resolved in a solid-state NMR spectrum and the classical approach to NMR structure determination cannot be taken. Here we present an alternative NMR-spectroscopic approach that does not require spectral resolution and that is able to directly map the probability density function (PDF) of the dihedral angles (ϕ , ψ) for each amino-acid separately. No long-range order is requested and both crystalline and non-crystalline domains are sampled. The method will be demonstrated on two samples of silk from the wild silkworm *Samia cynthia ricini* but it should be generally applicable to solid samples of fibrous proteins. We find that in native fibers, the alanine residues prefer a β -sheet structure, in films, the α -helical conformation is favored.

絹フィブロイン、安定同位体ラベル、固体 2D DOQDY NMR、二面角

van Beek J.D., Beaulieu L., でむらまこと、あさくらてつお、Meier B. H.

Silks are interesting systems to study the structure-function relationships of as they are all composed of a limited number of amino acids. The primary and secondary structure as well as a different packing in the solid phase are responsible for the functional differences in the materials. For the discussion of the structure-function relationship, it is a prerequisite to know the distribution of secondary structure elements, e.g. it is widely assumed that the high mechanical performance of spider dragline silk is connected to the β -sheet conformation of the poly-alanine domains which are embedded as small crystallites in the fiber matrix.

Although coming from a silkworm, the primary structure of the silk from the wild silkworm *Samia cynthia ricin* resembles that of spider silks as it has repeating poly-alanine domains of $(Ala)_n$, with $n=10-14$, interleaved with glycine-rich domains. It is a particularly interesting material for the study of function-structure relationship as the silk has the same function as in the *Bombyx mori* silkworm but the structural characteristics of the dragline silk. In the present context, the material has been selected because it has been suggested that it exists (for a fixed primary structure) in two different secondary structures. Previous solid state NMR studies have shown clear differences between cast films of the liquid silk from the gland and native fibers. Based on isotropic-chemical-shift analyses α -helical and β -sheet type conformation have been predicted respectively for the two states. Furthermore α -helical structures have been seen when the liquid silk from the gland was dissolved in water.

Here we evaluate the distribution of secondary structure elements for the alanine residues using solid-state NMR techniques. The experiments presented are based on the anisotropy of the chemical-shielding interaction in solid-state NMR which is described by a second rank tensor. By feeding the silkworms alanine labelled with ^{13}C at the carbonyl position, only these nuclei are observed. The principal axis of the chemical shielding tensor (CSA) are known to be oriented, with respect to a molecular-fixed coordinate system, as follows: the principal axis associated with the most shielded CSA principal value is perpendicular to the peptide plane (spanned by the O=C-N fragment) and the principal axis associated with the intermediate component of the CSA tensor is, within 0° to 12° , colinear with the C=O vector. Therefore, the measurement of the relative orientation of the CSA allows one to determine the molecular geometry, in the case of the protein backbone most conveniently expressed by the three angles (ϕ, ψ, ω) , where ω can usually be assumed to equal 180° . We report, in this contribution, how a related experiment can be used to evaluate the distribution of (ϕ, ψ) angles in silk. As first proposed by Schmidt-Rohr, we will use a two-dimensional (2D) double quantum/single quantum correlation experiment (DOQSY) for the evaluation of the relative tensor orientations. Using short double-quantum preparation times allows, in approximation, to selectively extract the correlation signals of two neighbouring amino acids in the same chain (having a distance, depending on (ϕ, ψ) between 2.7 Å and 3.7 Å) therefore revealing the distribution of (ϕ, ψ) angles. The double-quantum excitation and reconversion both scale with the internuclear distance as, yielding a signal intensity dependence of in the limit of short excitation/reconversion times. This strong dependence allows one to suppress contributions from more remote $^{13}C=O$ in the same chain and in other chains. By calculating basis spectra across a grid of (ϕ, ψ) angles from -180° to $+180^\circ$ and fitting these to the experimental spectrum, the distribution of torsion angles is obtained.

東工大院理工 °安藤 慎治、英ダーラム大 R. K. Harris, S. A. Reinsberg

Phase Structure and Cross Polarization Dynamics in Fluoropolymer
as Studied by Solid State $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ CP/MAS NMR.

Shinji Ando^{*}, *Robin K. Harris*[†], and *Stefan A. Reinsberg*[†]

^{*}Dept. Org. Polym. Mat., Tokyo Institute of Technology, Ookayama Meguro-ku, Tokyo, 152-5882 Japan

[†]Dept. Chemistry, University of Durham, South Road, Durham, DH1 3LE, United Kingdom

Tel : +81-3-5734-2137, Fax : +81-3-5734-2889, e-mail : sando@polymer.titech.ac.jp

^{19}F NMR / ^1H NMR / CP-MAS / poly(vinylfluoride) / Relaxation parameter / Phase structure /

The relaxation parameters and cross polarization (CP) dynamics between ^1H and ^{19}F in a semicrystalline fluoropolymer, poly(vinylfluoride) (PVF), have been investigated using ^{19}F MAS, $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS, and $^{19}\text{F} \rightarrow ^1\text{H}$ CP/MAS NMR. PVF shows more complicated ^{19}F MAS and $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS spectra than poly(vinylidene fluoride), which is due to the variations in regioregularity and the conformational effects in the crystalline phase. From the variable spin-lock time and contact time experiments, the ^{19}F signals assigned to the crystalline phase show significantly shorter T_{HF}^* , and longer T_{ip}^{F} and T_{ip}^{H} compared with those assigned to the amorphous phase. These arise from the strong dipolar interactions between H and F and the restricted molecular motion in the crystalline phase. In a $^{19}\text{F} \rightarrow ^1\text{H}$ CP/MAS spectrum, two components are observed in the main signal, and the effective CP parameters (T_{FH}^* , T_{ip}^*) indicate that the component at the lower frequency principally originates from the crystalline phase.

1. はじめに：フッ素化ビニルポリマーには、ポリフッ化ビニリデン($-(\text{CF}_2-\text{CH}_2)_n-$:PVDF)やポリトリフルオロエチレン($-(\text{CF}_2-\text{CFH})_n-$:PTFE)のように自発分極を有する結晶相を持つものがあることから、コポリマーも含めこれまで広範な分光学的研究がなされてきた。固体 NMR による分析も、近年 ^{19}F -高速 MAS や $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ -CP/MAS スペクトルが得られ、その緩和時間 (T_1 , T_{ip}) や CP ダイナミクスの解析から相構造や分子運動性に関する情報が得られつつある¹⁻⁷。現在、我々は天然存在比がともに高い ^1H と ^{19}F 間の交差分極について理論と実験の両面から研究を進めているが^{6,7}、本発表では半結晶性高分子であるポリフッ化ビニル($-(\text{CFH}-\text{CH}_2)_n-$:PVF)について得られた結果を示す。

2. 測定：Goodfellow 社から購入した PVF フィルムを 120°C で DMF に溶解し、MeOH 中に沈殿させて得た粉末を測定試料として用いた。NMR 分光器は Chemagnetics 社製 CMX-200 (APEX $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ Dual-tune プロブ)、測定条件は、観測周波数 ^{19}F : 188.3MHz, ^1H : 200.1MHz, $\pi/2$ パルス: 3 μs 、スピロック磁場: 83 kHz、繰り返し時間: 3.5 s、MAS 回転数: 13.5 kHz である。照射磁場の均一性を保つため、4mm ϕ のジルコニア製ローター中にスペーサを 2 個追加し、試料長を 3 mm に限定した。また、測定は室温で行った。

3. 結果と考察：

3-1. PVF の ^1H デカップル ^{19}F -MAS NMR.

PVF の ^1H デカップル ^{19}F -MAS スペクトルを図 1 に示す。PVF は一次構造が多様であり(Head-to-head, Tail-to-tail 結合の存在)、複数の結晶成分を含むため、PVDF に比べ複雑なスペクトルとなる。また、系中に多くの ^1H 核を有するため、結晶部の観測には十分な強度の ^1H デカップリングが必要である。スペクトルには、結晶部に由

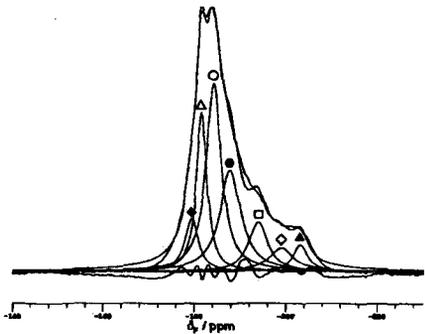


Fig.1 ^1H -decoupled ^{19}F MAS spectrum of PVF and its deconvolution by Lorentzian functions.

含フッ素高分子, 固体 ^{19}F -NMR, CP/MAS, 相構造, 交差分極
あんどうしんじ, R. K. ハリス, S. A. ラインズバーグ

来る3つの成分(●, ▲, ◆)と非晶部に由来する4つの成分(○, △, □, ◇)が観測される。非晶部の信号は溶液スペクトルとほぼ同じ位置に現れる。各信号は ^{19}F スピロック実験から得られる回転系のスピ格子緩和時間: T_{ip}^F により区別され(図2)、結晶部(22~33ms)は非晶部(14~15ms)に比べて明らかに長い T_{ip}^F を示しているが、両者の差はPVDFに比べて小さい。また、スピロック時間: t_{sl} が20ms以下では結晶部と非晶部に顕著なスピ拡散の効果は見られない。一方、 ^1H をスピロックしたのち短時間(0.2ms)のCPで ^{19}F へ磁化を移すことにより各成分の T_{ip}^H を ^{19}F の分解能で求めることができる。結晶部(14ms)は非晶部(7~9ms)に比べて1.8倍の T_{ip}^H を示しており、 T_{ip}^F の結果と符合する。

3-2. PVFの $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS NMR.

PVFの $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS スペクトルは、図1と同型であり、信号強度のコンタクト時間: t_{cp} 依存性から得られるCP曲線(図3)の2変数によるフィッティング(増加の時定数 T_{HF}^* , 減衰の時定数 T_{ip}^*)から、結晶部($T_{HF}^* = 0.04\text{ms}$, $T_{ip}^* = 8.9 \sim 10.1\text{ms}$)は非晶部($T_{HF}^* = 0.07 \sim 0.08\text{ms}$, $T_{ip}^* = 11.1 \sim 13.5\text{ms}$)に比べて短い T_{HF}^* と長い T_{ip}^* を示す。結晶部の短い T_{HF}^* は、非晶部に比べてH-F間の双極子相互作用が強く、 $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ の磁化移動が速いことを示している。また、コヒーレントな磁化移動に起因する信号強度の振動が結晶部の信号についてのみ見られ、その周波数から $\text{H} \leftrightarrow \text{F}$ 間距離 $= 2.0\text{\AA}$ と計算された。この値は $-\text{CHF}-$ 結合における $\text{H} \leftrightarrow \text{F}$ 間距離と一致する。

3-3. PVFの $^{19}\text{F} \rightarrow ^1\text{H}$ CP/MAS NMR.

PVF中の ^{19}F は ^1H の1/3量であるが、 $^{19}\text{F} \rightarrow ^1\text{H}$ のCPが可能である。CP測定では ^1H チャンネルのBG信号が消去されるため、 ^1H の高分解能スペクトルが得られる(図4)。図中において中央ピークには2成分が存在し(○, △)、それぞれ異なる T_{FH}^* と T_{ip}^* を示す。各成分の線幅、信号強度と T_{FH}^* の値から結晶部の信号は△の信号により多く含まれていると考えられる。

謝辞) 本研究は日本学術振興会の特定国派遣研究者事業の援助を受けて行ったものです。

- 1) R. K. Harris, S. A. Carss, R. D. Chambers, P. Holstein, A. P. Minoja, and U. Scheler, *Bull. Magn. Reson.*, **17**, 37-45 (1995).
- 2) S. A. Carss, U. Scheler, R. K. Harris, P. Holstein, and R. A. Fletton, *Mag. Res. Chem.*, **34**, 63-70 (1996).
- 3) P. Holstein, U. Scheler, and R. K. Harris, *Mag. Res. Chem.*, **35**, 647-649 (1997).
- 4) P. Holstein, U. Scheler, and R. K. Harris, *Polymer*, **39**, 4937-4141 (1998).
- 5) G. Monti and R. K. Harris, *Magn. Reson. Chem.*, **36**, 892-900 (1998).
- 6) S. Ando, R. K. Harris, P. Holstein, and S. A. Reinsberg, *J. Magn. Reson. (in press)*.
- 7) S. Ando, R. K. Harris, P. Holstein, and S. A. Reinsberg, *Magn. Reson. Chem. (in press)*.

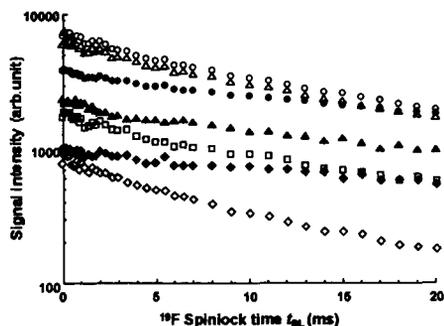


Fig.2 Spin-lock time dependence of ^{19}F signal intensities in the ^{19}F spin-lock exp. of PVF.

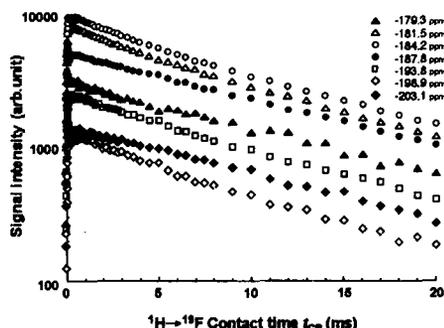


Fig.3 Contact time dependence of ^{19}F signal intensities in the $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP exp. of PVF.

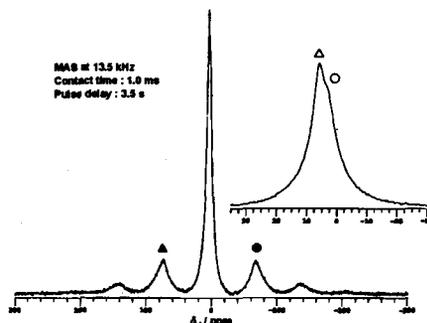


Fig.4 ^1H decoupled $^{19}\text{F} \rightarrow ^1\text{H}$ CP/MAS spectrum of PVF and the expansion of the center signal.

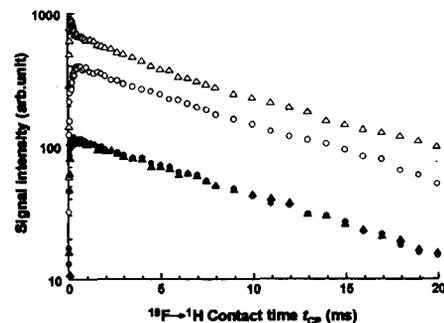


Fig.5 Contact time dependence of ^1H signal intensities in the $^{19}\text{F} \rightarrow ^1\text{H}$ CP exp. of PVF.

(名工大) 丸田 睦、山本勝宏、○嶋田繁隆

Structure and Molecular Motion of PEO chains tethered on a silica surface
Nagoya Institute of Technology, Atsusi Maruta, Katsuhiko Yamamoto, Shigetaka Shimada.
Structure and Molecular Motion of PEO chains tethered on a silica surface are studied by solid ^{13}C CP/MAS/DD NMR and spin labeling methods. Chemical shift of ^{13}C NMR line corresponding to PEO chains tethered on the silica surface increases with an increase of grafting ratio (GR). Molecular mobility of the chains is also found to be an increasing function of GR from temperature dependencies of line width of the spectra. These results suggest that the tethered PEO chains are adsorbed as 'train segments' at low GRs, whereas the chains protrude from the surface as 'tail' segments at high GRs. The 'train' and 'tail' structures are confirmed by spin labeling of the chain ends. The low molecular density of the 'tail' segments gives an extremely high mobility.

序) 高分子のシリカ表面における吸着、脱着機構、吸着鎖の構造に関する研究は吸着量、赤外吸収スペクトル、ESRスペクトルなどを用いて多く研究されてきた。我々は主にESRを用いて多孔質シリカ、無孔質シリカに吸着した高分子鎖の構造と分子運動を調べた。又シリカ表面に成長した高分子グラフト鎖のトレイン、テール構造と分子運動の関連を追求した。今回、シリカ表面に成長したポリエチレンオキサ이드 (PEO) グラフト鎖の末端にスピンラベルしESR法により末端局部部位の構造を調べた。又、固体NMR法によりPEOグラフト鎖全体の構造と分子運動を評価した。分子運動の速さは分子内相互作用 (分子自身の屈曲性) と分子間相互作用の二つの因子によって決まる。ここでは後者としてはPEO鎖間の相互作用及びPEO鎖とシリカ分子との相互作用があげられる。グラフト率 (グラフト鎖がシリカ表面を覆う程度) によりそれらの因子が微妙に変化することが考えられPEO鎖の構造と分子運動に与える影響は非常に興味深い。

実験) 無孔質シリカ (70~230mesh、比表面積、 $376.5\text{m}^2/\text{g}$ 、Nacalai Tesque, Inc.) を通常の方法により不純物を除去し用いた。PEOとしては主にPEO2000 (数平均分子量、 $M_n=2000$ 、 $M_w/M_n < 1.2$) を用いた。ガラスアンプルにシリカ、PEOを入れ真空封入し $100\sim 200^\circ\text{C}$ で1~2時間熱処理し、脱水反応によりPEO鎖をグラフト化させた。シリカの重さに対するグラフト化したPEOの重さいわゆるグラフト率は熱分析により求めた。グラフト鎖末端に3carboxy PROXYLでスピンラベル化しESRにより末端部位の構造、分子運動を評価した。又、CP/MAS/DD ^{13}C NMR法によりグラフト鎖全体の構造と分子運動を評価した。

シリカ表面、グラフト鎖、凝集構造、分子運動、固体NMR、

また あつし、やまもと かつひろ、しまだ しげたか

結果と考察) ケミカルシフトのグラフト率依存性

結晶性ポリマーであるPEOの ^{13}C NMRのケミカルシフト値(σ 値)として約72.0ppm(結晶領域)と約71.2ppm(非晶域)が知られている。今回シリカ表面にPEOをグラフト化させCP/MAS/DD ^{13}C NMRを測定したところ、グラフト率(GR)が低い場合、感度は悪いがバルクの σ 値より小さい70.2ppmが得られた。GRが高くなるにつれ感度の増大とともにスペクトルは低磁場シフトし(σ 値は大きくなり)71.2ppmに近づいた(図1)。又、その低い σ 値は測定温度の上昇とともに明らかに、ある温度域で高磁場シフトし何らかの構造転移が起きていることを示す。まず、結晶に相当する吸収72.0ppmは観測されず結晶化は起きていない。次に低い σ 値はPEO鎖がシリカ表面に吸着しいわゆるトレイン構造をとり、シリカ分子との強い相互作用をとることによる。GRが高くなるとグラフト鎖同志が接触を始め表面に吸着するPEOセグメントが少なくなる。最終的にはすべてのグラフト鎖がテール構造をとる。即ち、ポリマーブラッシュの様にシリカ表面から立ち上がった構造となり、PEOバルクの非晶構造とは異なるが σ 値はPEO鎖同志の相互作用によって決まるようになる。又、 σ 値の温度変化はトレイン-テール構造転移による。

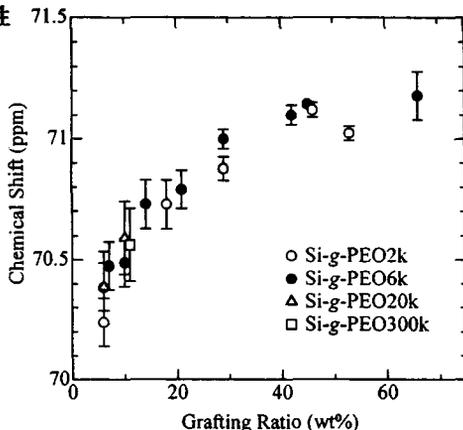


Fig 1. Chemical shift of PEO tethered on silica surface vs. grafting ratio.

線幅の温度変化による分子運動性

グラフトPEO鎖の ^{13}C NMRスペクトルの線幅に関する測定温度依存性を観測した。図2に示すようにある温度域で温度とともに増加し最大値をとった後、Motional Narrowingにより減少する。その増大は分子運動の周波数が $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ のデカップル周波数に近づく時に起こる。図2の例でわかるように線幅の最大値を示す温度はGRが高くなるとともに低くなった。この事実は低いGRの場合PEO鎖はトレイン構造をとりシリカに強く吸着している為に分子運動は束縛されているが、GRが高くなるとともにテール構造をとる為に分子運動は非常に速くなることを示している。引地らの提出した理論式でシミュレーションにより(図の実線は計算)分子運動の活性化エネルギー、緩和時間などを求めたところ、トレイン鎖は明らかに大きな活性化エネルギーと遅い緩和時間をもつことがわかった。又、例えばグラフト率47%の場合、その最大を示す温度は高周波数での観測にもかかわらずPEOのガラス転移温度より相当に低い。この非常に速い運動はグラフトPEO鎖の密度が低いために分子間相互作用が極端に弱くなっていることによる。

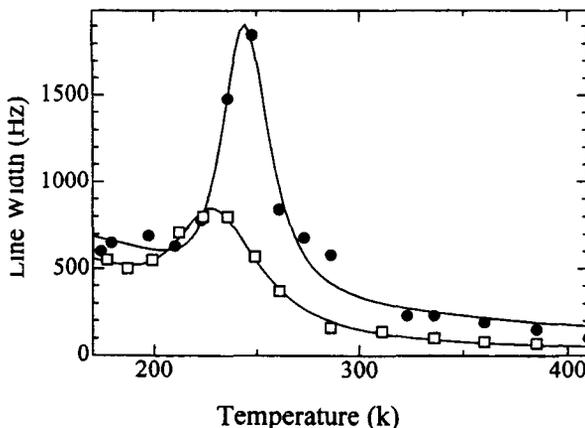


Fig 2. Line width of PEO NMR line vs. temperature. (\square :GR=47%, \bullet :GR=5%)

(金沢大理) ○飯島隆広、水野元博、須原正彦

 ^2H NMR Studies on Paramagnetic Crystals of $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$

Takahiro Iijima, Motohiro Mizuno, and Masahiko Suhara

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa, 920-1192

The temperature dependence of ^2H NMR spectrum and the spin-lattice relaxation time T_1 were measured for $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$. The temperature variation of the ^2H NMR spectrum could be explained by the 3 site jump of $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ around C_3 axis. The quadrupole interaction parameters ($e^2Qq/h, \eta$), the paramagnetic shift parameters ($\nu_{D\parallel}, \nu_{D\perp}$) and the rate of the reorientation of $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (k) were estimated by the spectral simulation. From the temperature dependence of k , the rate at infinite temperature and the activation energy for the reorientation of $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ were obtained as $k_0 = 6 \times 10^{16} \text{ s}^{-1}$ and $E_a = 89 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectively. The shallow minimum of T_1 caused by the 180° flip of water molecule was observed at ca. 290 K. $k_0 = 2 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$ and $E_a = 33 \text{ kJ mol}^{-1}$ were obtained for the 180° flip of water molecule.

《序》 常磁性 $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ 結晶は $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンや $[\text{SiF}_6]^{2-}$ イオンの order-disorder による構造相転移を起こす。この相転移は $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンや H_2O 分子の運動と関係していると予想される。常磁性化合物における分子やイオンの運動の研究では ^2H NMR スペクトルの解析は有効な手段となる。本研究では粉末試料で ^2H NMR のスペクトル及び T_1 を測定し、 $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンや H_2O 分子の局所構造や運動、及び Fe^{2+} イオンの電子スピンのダイナミクスを調べた。

《実験》 ^2H NMR は Chemagnetics 社製 CMX-300 分光器を用い、共鳴周波数 45.825 MHz で測定した。 ^2H NMR スペクトルの測定には $90_x^\circ - \tau/2 - 180_y^\circ - \tau/2 - 90_y^\circ - \tau/2 - 180_y^\circ - \tau/2 - \text{acq}$ パルス系列を用いた。

《結果と考察》 Fig. 1(a) に 363-433 K における ^2H NMR 実測スペクトルの温度依存性を示す。スペクトルは共鳴周波数を中心に左右非対称であり、核四極相互作用に加え常磁性シフトがスペクトルの線形に寄与していると考えられる。363 K のスペクトルは水分子の速い 180° フリップが起こっていることを示している。温度上昇とともにスペクトルの線幅が減少していることから更に $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの運動が起こっていることが分かる。そこで $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの C_3 軸まわりの再配向運動モデルでスペクトルのシミュレーションを行ったところ、Fig. 1(b) に示すように実測スペクトル

 ^2H NMR、核四極相互作用、分子運動

いじまたかひろ、みずのもとひろ、すはらまさひこ

をうまく再現できた。シミュレーションの結果得られた核四極相互作用パラメーター ($e^2Qq/h, \eta$)、常磁性シフトパラメーター ($\nu_{D\parallel}, \nu_{D\perp}$)、 $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの再配向運動の速さ (k) を図中に示す。Fig. 2 に k の温度依存性を示す。フィッティングから $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの再配向運動の頻度因子、活性化エネルギーはそれぞれ $k_0 = 6 \times 10^{16} \text{ s}^{-1}$ 、 $E_a = 89 \text{ kJ mol}^{-1}$ と見積もられた。Fig. 3 に 103-433 K における ^2H NMR T_1 の温度依存性を示す。約 290 K 付近の浅い極小は水分子の 180° フリップに伴う電場勾配の揺動による緩和 ($T_{1\text{mol}}$) で説明できる。約 230 K 以下の低温領域では $\text{Fe}^{2+}\text{-}^2\text{H}$ の磁気双極子相互作用による緩和 ($T_{1\text{mag}}$) が支配的であると考えられる。理論式を用いてフィッティングを行った結果、水分子の 180° フリップの頻度因子、活性化エネルギーはそれぞれ $k_0 = 2 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$ 、 $E_a = 33 \text{ kJ mol}^{-1}$ と見積もられた。

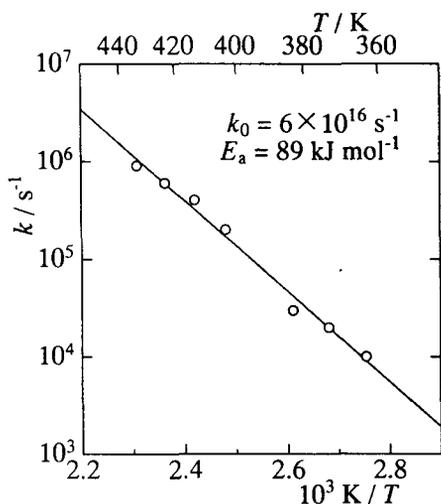


Fig. 2. Temperature dependence of the jumping rate (k) for the reorientation of $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.

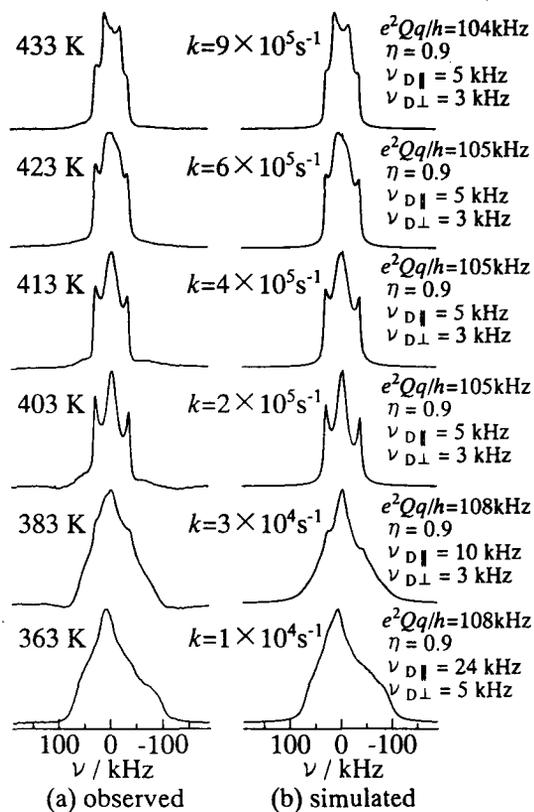


Fig. 1. Temperature dependence of ^2H NMR spectrum in $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$.

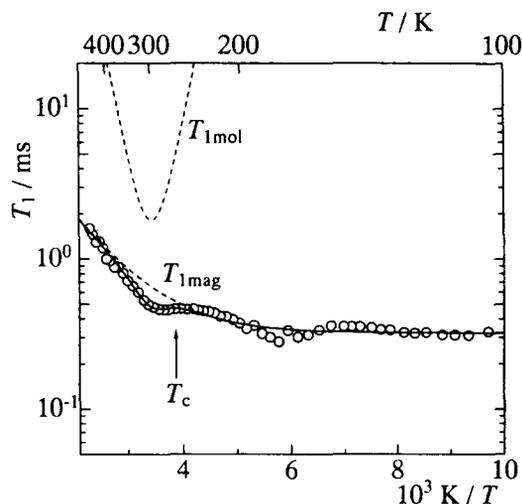


Fig. 3. Temperature dependence of ^2H NMR T_1 in $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$. The broken lines show the theoretical curves of $T_{1\text{mol}}$ and $T_{1\text{mag}}$. The solid line shows the theoretical curve of T_1 .

Structural Analysis of Polymers Using ^2H MAS NMR MethodsS.Kuroki¹, S.Ono¹, I.Ando¹, H.Kimura², and K.Yamauchi³¹Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology,²Advanced Materials Laboratory, Japan Chemical Innovation Institute,³Bruker Japan Co.,Ltd.

High resolution ^2H MAS NMR spectra of $\text{C}_{32}\text{H}_{66}$ were observed at various temperatures in order to discuss the structural change over a wide range of temperatures. Although a broad signal was observed at the crystalline phase, two sharp signals which come from the CH_3 groups and the CH_2 groups at chain-end parts appeared with increasing temperature.

The spectra of the rotator phase is very similar with that of the noncrystalline phase, but the chemical shifts of internal CH_2 were different. This result comes from that internal CH_2 groups take all trans conformation at the rotator phase and there is a fast transition between trans and gauche isomers of internal CH_2 group at the noncrystalline phase.

緒言

^2H 核の固体 NMR は通常粉末スペクトルの線形から分子の運動性を解析する手段として利用されてきた。一方、 ^1H CRAMPS 法は固体状態で ^1H の高分解能スペクトルが得られる有用な手法であるが、試料中の磁場の不均一性と化学シフトのスケーリングにより、異なる試料間の微小な化学シフトの変化の議論は困難が伴う。 ^2H 核の MAS NMR 法も 10kHz 程度の回転により高分解能スペクトルを得ることができ、等方平均化学シフトを求めることができる。また、比較的安価に特定部位を選択的にラベルできるので、高分子などの局所的な構造に関する情報を得ることが可能であると考えられる。そこで、本研究では温度を上げるにしたがって、結晶相→回転相→等方相と相転移する $\text{C}_{32}\text{H}_{66}$ を用いその相転移に伴う ^2H MAS NMR スペクトルの変化を観測した。

実験

測定は CP/MAS アクセサリーを付属した Bruker 社製 DSX300NMR 分光器を用いて、 ^2H DD/MAS NMR スペクトル (46.07MHz) および ^{13}C DD/MAS NMR スペクトル (75.48MHz) を測定した。試料は約 12kHz で回転させた。 ^2H 90° パルスは 2.85 μs 、 ^{13}C 90° パルスは 4.0 μs で、化学シフトは $^2\text{H}_2\text{O}$ を外部基準として 4.8ppm とした。

^2H MAS NMR スペクトル、 $\text{C}_{32}\text{H}_{66}$ 、相転移、回転相、コンホメーション

くろきしげき、おのしんのすけ、あんどういさお、きむらひであき、やまうちかずお

結果と考察

DSC 測定の結果、 $C_{32}H_{66}$ は $62.75^{\circ}C \sim 65.07^{\circ}C$ の間に回転相領域を持っていることがわかった。これは $C_{32}H_{66}$ の回転相領域、 $66.10^{\circ}C \sim 69.38^{\circ}C$ と比較すると、低温でかつその温度範囲が狭いことがわかる。Fig.1 に $23^{\circ}C \sim 53^{\circ}C$ の $C_{32}H_{66}$ の 2H MAS NMR スペクトルと ^{13}C DD/MAS NMR スペクトルを示した。図中の温度は表示温度で試料の実際の温度とは異なっている。石川らの ^{13}C NMR の結果¹から、この測定条件では、 $49^{\circ}C \sim 51^{\circ}C$ で回転相をとっていることがわかる。 $23^{\circ}C$ では半値幅 5ppm 程度の広幅な信号が観測されているが、温度の上昇にしたがって鋭い 2 本の信号が広幅な信号の中に観測されるようになる。そのうち、高磁場側の信号は末端の CH_3 基の信号で、もう一本は末端に近い CH_2 基の信号と考えられる。この結果は温度の上昇とともに結晶領域において CH_2 鎖が末端から溶解していく様子が観測されていると理解できる。

$49^{\circ}C \sim 51^{\circ}C$ における回転相領域のスペクトルの線形は等方相領域におけるスペクトルの線形と類似している。しかし、拡大してみると、回転相で、主信号の位置は 1.17ppm、等方相では 1.27ppm に観測されている。回転相で分子鎖はトランスコンホメーションを保っているのに対し、等方相ではトランスゴーシュの速い交換をしていると考えられ、この化学シフトの違いはそこから生じたと考えられる。このような微小な化学シフトの変化は 1H CRAMPS スペクトルで議論するのは困難である。他の系についても研究が進行中である。

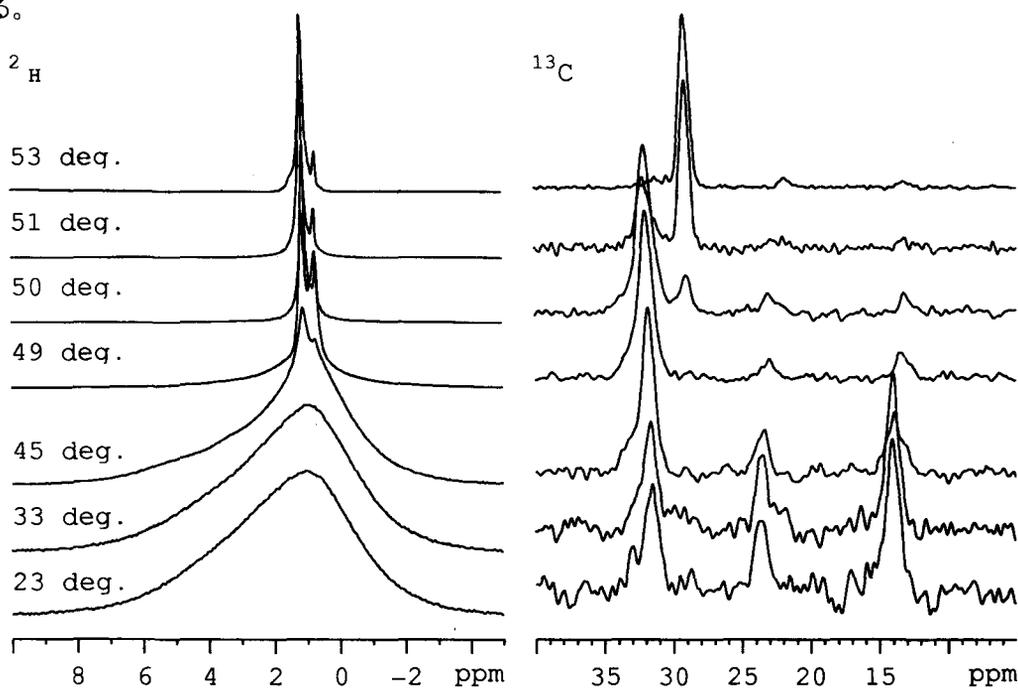


Fig.1 2H and ^{13}C DD/MAS NMR spectra of $C_{32}H_{66}$ at various temperatures.

文献

- 1) S. Ishikawa, H. Kurosu, and I. Ando, *J. of Molecular Struct.* 248(1991)361-372.

¹⁹F固体NMRによるバクテリオロドプシンの構造解析(2)

((財) サントリー生有研) ○岩下 孝、関谷紀子、金鍾文、吉原和雄、石黒正路

Structure Analysis of Bacteriorhodopsin using ¹⁹F Solid-State NMR (2)

○Takashi Iwashita, Noriko Sekiya, Jong Moon Kim, Kazuo Yoshihara, Masaji Ishiguro
Suntory Institute for Bioorganic Research

The structural information is very important for understanding the function of the protein, and a comparatively new study field of structural biology is being formed. The membrane protein has affected with an important vital functions. For instance, many of various receptors which play an important role in the biological activity are the type of protein in which α -helix penetrates many times through the membrane. The bacteriorhodopsin is a photoreceptor in which seven α -helices exist in the membrane, and has the function of the proton pump. The fluorinated bacteriorhodopsin with synthetic chromophore containing CF₃ group is measured by ¹⁹F solid-state NMR to estimate the distance between fluorine atoms of chromophore and protein.

【緒言】

タンパク質の機能を理解する上でその構造情報は非常に重要であり、構造生物学という比較的新しい学問分野を形成しつつある。現在では結晶化が可能なタンパク質についてはX線結晶解析によって詳細な構造が明かとなり、リガンドとの複合体のような複雑な系についても解析された例が増えつつある。また、水溶性のタンパク質については分子量が数万ダルトン程度のもので安定同位体ラベル技術と組み合わせた多次元NMRの手法によって構造が解かれるようになってきている。膜タンパク質はある意味ではこの中間に位置しており、しかも重要な生命現象と深く関わりあっている。例えば、生物活動において重要な役割を担っている様々な受容体の多くは、 α -ヘリックスが膜を何回も貫通した型の膜タンパク質である。バクテリオロドプシンは α -ヘリックス構造を持っている光受容体であり、プロトンポンプの機能を持っている。またロドプシンなどのGTP結合タンパク質の関与する受容体(G Protein Coupled Receptor; GPCR)も膜貫通領域は α -ヘリックスが7回膜を貫いたバクテリオロドプシンとよく似た構造を持っている。即ち、バクテリオロドプシンは情報伝達ではなくプロトンポンプ活性という生理機能を有し α -ヘリックスが7回膜を貫通した構造を持っている GPCRと類似のタンパク質である。このタンパク質はバ

キーワード：¹⁹F固体NMR、膜タンパク質、バクテリオロドプシン、安定同位体標識

いわした たかし、せきや のりこ、きむ じょんむん、よしはら かずお、いし
ぐろまさじ

クテリアの培養が容易であり、試料の大量調製が出来ることと構造の類似性から、GPCR構造研究のモデルとなる。また、バクテリオロドプシンはその分子中にシッフ塩基を介して結合しているクロモフォア（レチナル）を持っており、多くのタンパク質対リガンド間の相互作用研究のモデルともなる。このクロモフォアを化学的に外してバクテリオオプシンとし、さらに合成クロモフォアと再構成させることにより合成バクテリオロドプシンの生成が可能である。昨年に引き続き、バクテリオオプシン部分とクロモフォアの両者に標識原子 (^{19}F) を導入してその間の距離を見積もることを目標に実験を行った。

【実験】

合成培地に5-F-トリプトファンを加えてバクテリアを培養し、膜画分をシヨ糖勾配遠心法を用いて精製してラベル化バクテリオロドプシンを得た。ラベル化バクテリオロドプシンはヒドロキシアンモニウム存在下、光照射によってバクテリオオプシンとした。Fig.-1に示す2-CF₃-all trans retinalを化学合成し、バクテリオオプシンと再構成して合成バクテリオロドプシンを得た。 ^{19}F 固体NMRはCMX-300 Infinityを用い、フッ素の共鳴周波数282MHz, プロトンの共鳴周波数300MHzで測定した。

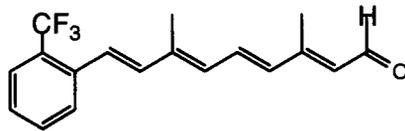


Fig.-1 2-CF₃-all trans retinal

【結果および考察】

バクテリオロドプシンには8個のトリプトファンが含まれており ^{19}F 固体NMRでは-125ppm付近に重なって見える。また、人工クロモフォアのベンゼン環上CF₃グループは約-60ppmに観測される。人工クロモフォアに近いトリプトファンのイミダゾール環上Fとの間の磁化移動を2次元MELODRAMAで観測した。

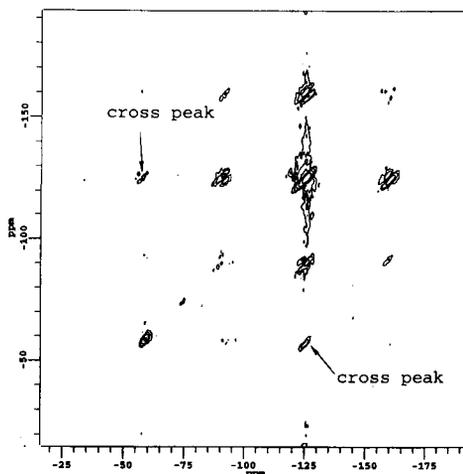


Fig.-2 2D MELODRAMA spectra of 5-F-tryptophane bacteriorhodopsin containing 2-CF₃-all trans retinal.

Study on Miscibility of P(VDF/TrFE)/at-PMMA Blend. II

Yoshitsugu Kaneta, Fumiaki Ishii and Akihiro Tsutsumi

Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060-8628.

The miscibility and the molecular motions of P(VDF₇₃/TrFE₂₇)/at-PMMA with copolymer weight percents (ϕ_w) of 40,30,20 and 10wt% at 135°C were investigated from ¹H-¹³C cross relaxation and DSC methods. Two kinds of the glass transition for each blend were observed around 50 and 90°C, which were attributed to the spinodal phase separation. Each glass transition temperature against ϕ_w was minimal at 20wt%. In the other hand, the ¹H NMR spin-lattice relaxation time $T_{1\rho}$ in the rotating frame for each group of both polymers was maximal from $\phi_w=20$ to 30wt%. These findings mean that the molecular motion of each polymer took place more largely since the free volume of the segments is the largest at $\phi_w=20$ wt%

1) 強誘電体高分子であるビニリデンフロライド (VDF) とトリフロロエチレン (TrFE) の共重合体 (P(VDF/TrFE)) はポリメチルメタクリレート (at-PMMA) とのブレンドでキャストフィルムを T_m 近傍の 130~140°C で熱処理すると、共重合体の重量%が 50wt% 以上では巨大単結晶が生成するが、50wt% 以下では両ポリマーがよく相溶した無定形ブレンドとなると云われている。¹⁾ しかし、これらの無定形相の相溶状態に関する詳しい報告はない。本研究の目的は、¹H-¹³C CP/MAS NMR と DSC 法を用い、共重合体重量分率が 50wt% 以下の P(VDF₇₃/TrFE₂₇)/at-PMMA ブレンドのスピンodal相分離機構やその相溶状態について考察することである。

2) 試料は P(VDF/TrFE) の重量分率が 40、30、20、10 のブレンドのキャストフィルムを作成し、各々のフィルムを 135°C で熱処理 (0~12hr) し、急冷凍結したものである。NMR 測定は、Bruker 社製 MSL200 を用い、¹H-¹³C CP/MAS NMR 法で行った。¹H と ¹³C 核の共鳴周波数は各々 200MHz と 50.288MHz、MAS は 3.5kHz、測定温度 303K であった。DSC は、セイコー電子株式会社製示差走査熱量計 (DSC220) を用い、-20°C~132°C の間を走査速度 $R_s=5、10、20^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温と降温を行った。

3) Fig 1. は 10 °C /min 昇温時の P(VDF/TrFE)/at-PMMA ブレンド重量分率 40/60 の DSC 曲線である。ガラス転移挙動が二つの温度域で観測され、

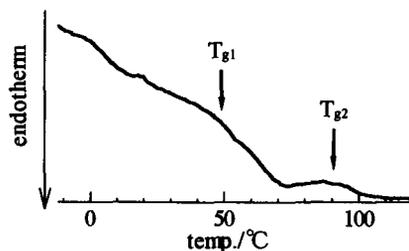


Fig 1. Thermogram of P(VDF/TrFE)/at-PMMA blend 40/60 obtained at the heating rate of 10 °C/min

P(VDF/TrFE)、at-PMMA、ブレンドの相溶性、ガラス転移温度、回転系スピン格子緩和時間

かねた よしつぐ、いしい ふみあき、つつみ あきひろ

それぞれ、ガラス転移温度 $T_{g1}=50.8^\circ\text{C}$ 、 $T_{g2}=92.1^\circ\text{C}$ である。このことは 135°C の熱処理でスピノーダル分解により、 T_{g1} と T_{g2} 無定形相に相分離したことを意味している。²⁾ また、 T_{g1} が T_{g2} より低温であることは、 T_{g1} の分子鎖セグメントの自由体積が T_{g2} のものより大きいことによっている。

Fig 2. は T_g の P(VDF/TrFE) 重量分率 ϕ_w (wt%) 依存性である。 T_g の値は各走査速度 $R_g \rightarrow 0$ に外挿して求めた値である。 T_{g1} と T_{g2} ともに $\phi_w=20\text{wt}\%$ で最小となっている。このことは、相分離した T_{g1} と T_{g2} 無定形相の自由体積が $\phi_w=20\text{wt}\%$ で最大となっていることを示している。³⁾

Fig 3. は、 $1/T$ に対する C=O 基 (PMMA) の $T_{1\rho}$ (Hz) の片対数プロットである。 $T_{1\rho}$ (Hz) は 87°C と 32°C に 2 つの極小化が起きている。ここで、この極小化を α_1 、 α_2 過程とする。実線は、 $1/T_{1\rho}$ (Hz) = $M_2 \tau_c / (1 + 4\omega^2 \tau_c^2)$ 、 $\tau_c = \tau_{c0} \exp(\Delta H/RT)$ の理論式で最適化したもので、実験値とよく一致している。求めた活性化エネルギー ΔH は、 α_1 過程では 19.5kcal 、 α_2 過程では 19kcal で、2 次能率 M_2 は、 α_1 過程で $1.2 \times 10^8 \text{Hz}^2$ 、 α_2 過程で $8.2 \times 10^8 \text{Hz}^2$ であった。この α_1 と α_2 過程の $T_{1\rho}$ の極小温度 32°C と 87°C は、Fig 2. の 2 つのガラス転移温度 T_{g1} と T_{g2} とよく一致している。PMMA や P(VDF/TrFE) の他の基においても、同じ温度域で極小化が見られた。これらのことは、 α_1 と α_2 極小過程が T_{g1} と T_{g2} ブレンドの自由体積に依存した、無定形相のミクロブラウン運動によっていることを意味している。

Fig 4. は at-PMMA における CH_2 基の $T_{1\rho}$ (Hz) の ϕ_w 依存性である。 $T_{1\rho}$ の値は $\phi_w=20\text{wt}\%$ で最大となっている。これは Fig 2. の各 T_g の最小と一致している。しかし、測定温度である室温が α_2 温度域であることより、この $T_{1\rho}$ の ϕ_w 依存性は T_{g1} 無定形相のものに対応し、その自由体積が最大となる $\phi_w=20\text{wt}\%$ 付近で、ポリマーの分子運動が最も激しくなっていることを意味している。

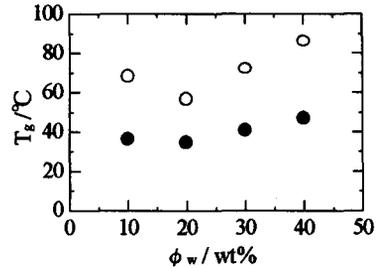


Fig 2. The ϕ_w dependence of glass transition temperature T_g for P(VDF₇₃/TrFE₂₇)/at-PMMA blend 40/60. ● T_{g1} ; ○ T_{g2}

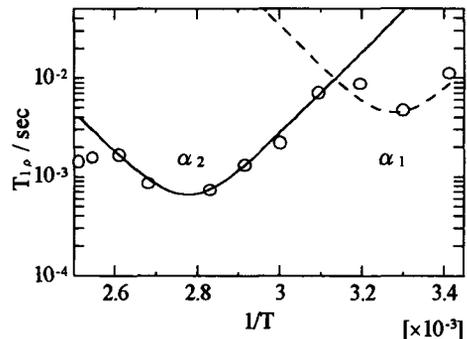


Fig 3. The inverse temperature $1/T$ dependence of $\ln T_{1\rho}$ for OCH_3 group in P(VDF₇₃/TrFE₂₇)/at-PMMA 40/60 blend

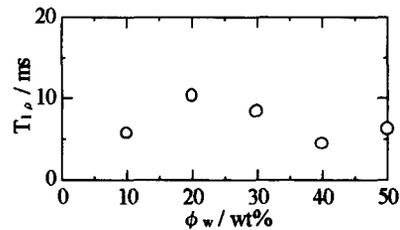


Fig 4. ϕ_w dependence of $T_{1\rho}$ for P(VDF₇₃/TrFE₂₇)/at-PMMA 40/60 blend (CH_2)

References

- 1) Y. Wen and H. Ohigashi, Polymer Preprints, Japan vol. 44, 3423. (1995)
- 2) T. Hideshima and M. Okano, Solid State Physics (Academic Press, New York, 1963) vol. 14, 343.
- 3) S. Akiyama, Bulletin of the Chemical Society of Japan, vol. 45, 1381 (1972).

(京大化研¹、熊本大理²) ○桑原 和弘¹、堀井 文敬¹、小川 芳弘²Solid-State NMR Analyses of the Structure and Dynamics for
the Monoclinic and Hexagonal Crystals of α,ω -alkanediol(Institute for Chemical Research, Kyoto University¹, Faculty of Science, Kumamoto University²)Kazuhiro Kuwabara¹, Fumitaka Horii¹, and Yoshihiro Ogawa²

The structure and dynamics for the monoclinic and hexagonal crystals of 1,20-eicosanediol (HO-(CH₂)₂₀-OH) have been investigated by solid-state NMR spectroscopy. The calculation of the ¹³C chemical shift in the CP/MAS ¹³C NMR spectra has revealed that 3 % *gauche* conformations are included in the hexagonal phase of inner CH₂ sequences for 1,20-eicosanediol. *T*_{1C} measurements show that every CH₂ carbon has the same mobility in the monoclinic phase. In contrast, more external CH₂ carbons are much more mobile in the hexagonal phase. However, no remarkable change in chemical shift is observed for the hydroxyl groups in the ¹H CRAMPS spectra between the monoclinic and hexagonal phases. These results reveal that the two-site exchange proton jump motion for the hydroxyl groups, as a result of molecular rotation around the C-O bond, occurs in the hexagonal phase together with the overall and partial random rotation of each chain around the molecular axis.

1. 緒言

1,20-eicosanediol (HO-(CH₂)₂₀-OH) は、分子の末端が水素結合で結ばれたメチレン鎖からなる。室温においては、結晶化条件により、単斜晶あるいは斜方晶の結晶構造をとる。いずれも 95 °C 近傍で六方晶へと転移するが、同様な結晶転移挙動を示す *n*-アルカン¹およびポリエチレン²と比較することは、水素結合が結晶転移に及ぼす影響を考える上で興味深い。本研究では、1,20-eicosanediol の各結晶相における構造およびダイナミクスに関して、固体 NMR 法による解析を行った。

2. 実験

1,20-eicosanediol (純度 99.8 %) を 1 % トルエン溶液から徐冷して結晶化し単斜晶の試料を得た。固体 ¹³C NMR 測定は、JEOL JNM-GSX 200 分光計により 4.7 T の静磁場下で行った。ま

キーワード：固体 NMR、結晶構造、相転移、分子運動、水素結合

くわばら かずひろ、ほりい ふみたか、おがわ よしひろ

た、 ^1H CRAMPS 測定は、Chemagnetics CMX-400 分光計により 9.4 T の静磁場下で行った

3. 結果と考察

CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルにおける化学シフト値より、六方晶における内部メチレン鎖には、約 3 % の *gauche* コンホメーションが含まれていることが明らかになった。図 1 には、各温度で得られた各メチレン炭素の T_{1C} の値を示す。単斜晶においては各メチレン炭素の T_{1C} の値は同じであるが、六方晶においては OH 基に近いメチレン炭素ほど T_{1C} の値が小さく分子運動性が大きいことが分かる。これらの実験結果より、単斜晶においては OH 基の水素結合はよく保たれているが、六方晶においては末端 OH 基から分子運動が誘起されていると結論できる。

図 2 には、1,20-eicosanediol に対して、各温度で得られた ^1H CRAMPS スペクトルを示す。OH 基の水素原子の化学シフトに注目すると、単斜晶から六方晶への転移において変化は認められない。すなわち、六方晶において水素結合部分から分子運動が誘起されていても、OH 基の水素原子の電子密度は単斜晶と変わらないことが分かる。 T_{1C} 測定と ^1H CRAMPS 測定の結果は、六方晶の OH 基において図 3 に示すような C-O 結合回りの回転による 2-サイト交換のジャンプ運動が起きていることを示す。

1,20-eicosanediol の六方晶においては、OH 基の 2-サイト交換ジャンプ運動が起こることにより、*n*-アルカン¹⁾同様の分子鎖全体のランダムな回転運動が可能になると考えられる。しかし、水素結合による拘束が強い場合は、ポリエチレンの六方晶²⁾と同様 *gauche* 欠陥が導入されることにより、部分的な分子鎖軸回りの回転運動が可能になると考えられる。

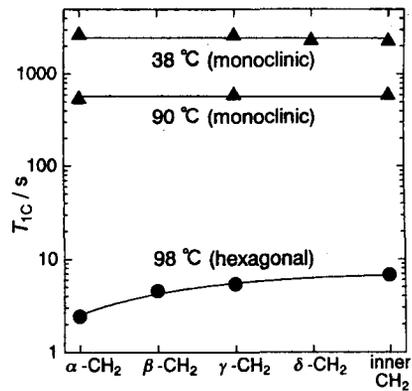


Fig. 1. Plot of the T_{1C} values for 1,20-eicosanediol chains.

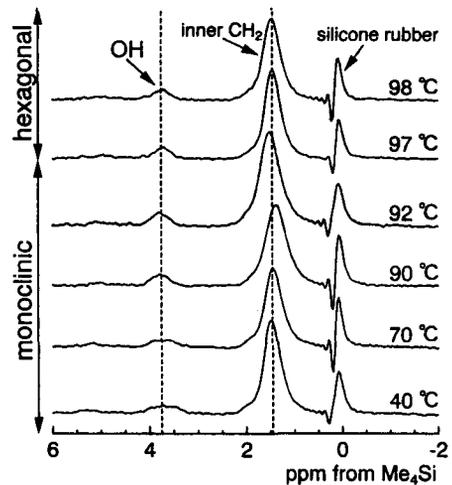


Fig. 2. ^1H CRAMPS NMR spectra of 1,20-eicosanediol.

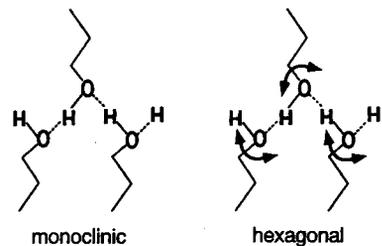


Fig. 3. Schematic representation of hydroxyl groups in the monoclinic and hexagonal phases.

1) Kitamaru, R.; Horii, F.; Nakagawa, M.; Takamizawa, k.; Urabe, Y.; Ogawa, Y. *J. Mol. Struct.* 1995, 355, 95. 2) Kuwabara, K.; Horii, F. *Macromolecules*, in press (see ASAP).

固体高分解能¹³C NMRによるバクテリオロドプシン細胞外側プロトンチャンネル構造の解析

¹姫路工大・理、²ウェイン州立大、³カリフォルニア大
○谷生道一¹、辻 暁¹、山口 悟¹、河南るり子¹、内藤 晶¹、
Richard Needleman²、Janos K. Lanyi³、斉藤 肇¹

Solid-state ¹³C NMR studies of the extracellular proton channel in bacteriorhodopsin

¹Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

²Department of Biochemistry, Wayne State University

³Department of Physiology and Biophysics, University of California, Irvine

○Michikazu Tanio¹, Satoru Tuzi¹, Satoru Yamaguchi¹, Ruriko Kawaminami¹,
Akira Naito¹, Richard Needleman², Janos K. Lanyi³ and Hazime Saito¹

We have recorded ¹³C NMR spectra of [3-¹³C]Ala-labeled wild-type bacteriorhodopsin (bR) and mutants at residues in the extracellular proton channel. D85N, E194Q and E204Q exhibited the conformational changes of the extracellular surface at bR as seen from the displacements of Ala126 and Ala196 peaks. Y83F, which lacks the van der Waals contact between the side-chains of Tyr83 and Ala126, resulted in the conformational change at Ala126 but not at Ala196. Unexpectedly, no conformational change at Ala126 was observed in R82Q and R82Q/D85N. These results indicate that the conformational change at Ala126 was induced by neutralization of electric charge at Asp85 as a result of reorientation of the side-chain of Arg82 toward that of Tyr83, where Ala126 is located.

[序論] バクテリオロドプシン (bR) は248残基のアミノ酸から構成されるプロトンポンプ膜蛋白質であり、発色団のレチナールがLys216にシッフ塩基結合している。bRに光を照射するとレチナールの異性化が起こり、プロトン化シッフ塩基からAsp85へのプロトン移動に始まる一連の光サイクルを行う。bRのプロトンポンプ機構については、部位特異的変異導入による活性測定および極低温での三次元立体構造解析から多くの知見が得られているが、その分子機構の詳細は未だ不明である。我々はこれまで、固体高分解能¹³C NMRを用いてbRの高次構造とダイナミクスについて解析を行って来た。特にプロトンポンプに重要である残基の変異導入bRの解析から、Glu204-Asp85-Val49-Thr46-Asp96間で、水素結合および電荷依存の相互作用が存在していることを示した[1]。本研究ではこの解析をさらに進めるため、特に細胞外側プロトンチャンネル領域に焦点を合わせ、プロトン放出に関わるAsp85、Arg82、Glu204およびGlu194のbR高次構造への寄与について解析をした[2]。

[実験] [3-¹³C]Ala標識野生株 (WT) および変異株bRは、[3-¹³C]Alaを含む合成培地で各高度好塩菌を培養することで得た。精製した標識bRを含む試料は、5 mM HEPES、10 mM NaCl、0.025 % (w/v) NaNO₃ (pH 6または7) の緩衝液に懸濁しNMR測定試料とした。100.6 MHz 固体高分解能¹³C NMR測定は、交差分極マジック各回転法 (CP-MAS) を用いた。測定条件は、MAS回転数; 2600 Hz、接触時間; 1 ms、取り込み時間; 50 ms、繰り返し時間; 4 s、¹Hおよび¹³Cのπ/2パルス; 5 μs、積算回数; 10000-12000回、測定温

固体高分解能¹³C NMR、バクテリオロドプシン、プロトンポンプ、情報伝達、膜蛋白質

たにおみちかず、つじさとる、やまぐちさとる、かわみなみりこ、ないとうあきら、
Needleman Richard, Lanyi Janos K., さいとうはじめ

度は20℃で遮光状態で行った。

[結果と考察] Fig. 1に[3-¹³C]Ala標識D85N (pH 7)の¹³C CP-MAS NMRスペクトルを示す(点線; WT, pH 7)。これより蛋白質中心部に位置するAsp85のAsnへの変異は、bR高次構造に著しい変化を起こすことが分かる。D85NとWTのNMRスペクトルは、低pH(1~2)においてその線形がほぼ同じになることから、中性において見られる構造変化は主にAsp85の電荷の消失によることが分かった。興味深いことに、D85Nでは細胞外側膜表面領域に位置するAla126およびAla196の信号が、WTに比べ、それぞれ低磁場および高磁場シフトしており、構造変化が起きていることが分かる。同様の変化はプロトン放出に関与する残基の変異株、E194QおよびE204Qでも観測された。これらの結果は蛋白質中心部の変化が細胞外側膜表面領域まで伝わっていることを示しており、[1-¹³C]Val標識bRの結果とも一致する[1]。

この蛋白質細胞外側チャンネルでの情報伝達には、蛋白質中心部と細胞外側膜表面領域の中間に位置し、Asp85のpK_aおよびプロトン放出機能に関わっているArg82の関与が予想される。Fig. 2に[3-¹³C]Ala標識R82Q(A; pH 6)およびR82Q/D85N(B; pH 7)の¹³C CP-MAS NMRスペクトルを示す(点線; WT, pH 7)。R82QのAsp85は、pH 6ではほぼプロトン化しているため(Asp85のpK_a=7.8)、85残基

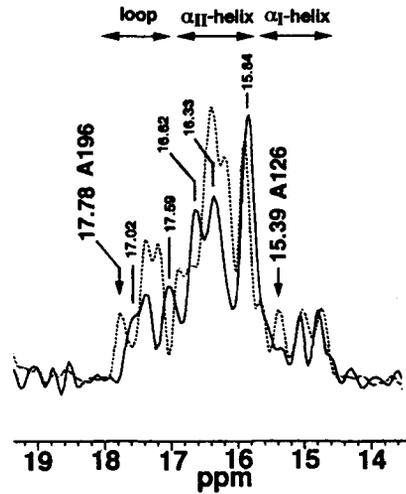


Fig. 1 ¹³C CP-MAS NMR spectra of [3-¹³C]Ala labeled D85N(—) and WT(.....) at pH 7.

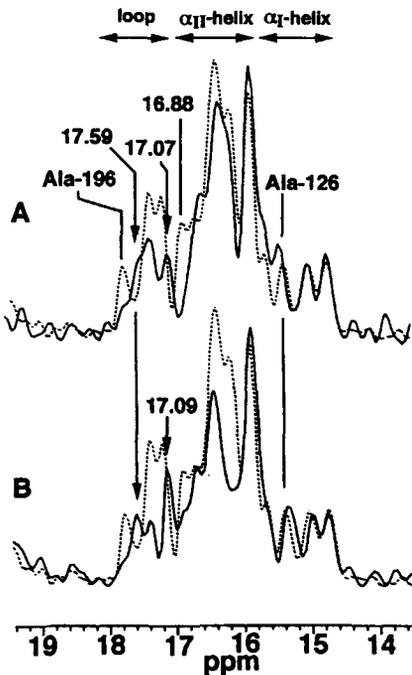


Fig. 2 ¹³C CP-MAS NMR spectra of [3-¹³C]Ala labeled R82Q(A) at pH 6 and R82Q/D85N(B) at pH 7, compared with that of WT at pH 7(.....).

に関してはD85Nとほぼ同じ条件になる。Fig. 2から各変異株のNMRスペクトルは、D85Nのそれと類似していることが分かる。しかしD85Nと異なり、両変異株ではAla126のNMR信号にほとんど変化していない。R82QにおけるAla126の信号はpH 6-8の範囲でほとんど変化しないことから、Fig. 1のD85Nで誘起されたAla126の構造変化にはArg82側鎖が関わっていることが分かった。これまで報告されているbRの三次元構造モデルではArg82とAla126の間にTyr83が存在しており、[3-¹³C]Ala標識Y83Fの¹³C NMRスペクトルにおいてもAla126の信号変化が観測されることから、Ala126の構造変化にTyr83側鎖の変化が必要であることが示唆された。これらの結果は、D85NにおけるAla126の構造変化はArg82側鎖がTyr83側鎖へと向くことで誘起することを示唆する。このような変化は、光サイクルにおけるAsp85のプロトン化にも誘起されると考えられる。

References

- [1] Tanio et al., *Biophys. J.* 77 (1999) 431-442.
- [2] Tanio et al., *Biophys. J.* 77 (1999) in press.

固体高分解能 ^{13}C NMR によるバクテリオロドプシン膜貫通部位の構造-機能相関の解析

(姫路工大・理¹、ウェイン州立大²、カリフォルニア大³) ○辻 暁¹、河南 りり子¹、長谷川 潤¹、内藤 晶¹、Richard Needleman²、Janos K. Lanyi²、斉藤 肇³

Structure-Function Relationship in the Transmembrane Region of Bacteriorhodopsin; A Solid-State ^{13}C NMR Study (Himeji Institute of Technology¹, Wayne State University², University of California, Irvine³) Satoru Tuzi¹, Ruriko Kawaminami¹, Jun Hasegawa¹, Akira Naito¹, Richard Needleman², Janos K. Lanyi², and Hazime Saito¹

^{13}C NMR signals for the each alanine residues in bacteriorhodopsin (bR), a membrane protein of *Halobacterium salinarium* which has a function of photo-induced proton pump, have been recorded and assigned to individual residues by observing [3- ^{13}C]Ala-labeled wild type and mutant bR in membrane suspension with solid-state ^{13}C NMR. In this study, we focused the structure of the transmembrane hydrophobic region of bR containing the active site of photo-reaction. To separate the signals from transmembrane region, the signals from hydrophilic moiety of bR were suppressed by 30-40 μM of Mn^{2+} , NMR relaxation reagent. The signals of Ala215 next to the retinal binding residue Lys216, and Ala81 close to the proton channel were assigned. Changes of electric charge of the sidechain of Asp85 caused by point mutations were found to induce large conformational changes of the transmembrane α -helices.

本研究室では、固体高分解能 ^{13}C NMR 法の膜蛋白質高次構造と機能の解析への応用を目的として、高度好塩菌の光プロトンポンプ機能を持つ膜蛋白質、バクテリオロドプシン (bR) の解析を進めている。これまでに生体膜懸濁液中の bR 試料について、アラニン残基側鎖メチル炭素への生合成的 ^{13}C 標識を行い、特定のアラニン残基由来の信号を分離、帰属しうる分解能のスペクトルを得ることができることを示してきた。これにより、生理的条件に近い常温、中性条件を含む種々の溶液条件において膜蛋白質の局所的コンホメーションと運動状態の情報を得、生体膜中における膜蛋白質の構造と機能の相関を議論することができる^{1,2,3}。ここでは、bR の膜貫通部位に位置する残基の分離観測と帰属を目的として NMR 緩和試薬を利用した信号の単純化を行うとともに、得られた信号から膜貫通領域中心部に位置する光反応とプロトン輸送の活性中心の機能に関連した立体構造の解析を行った。

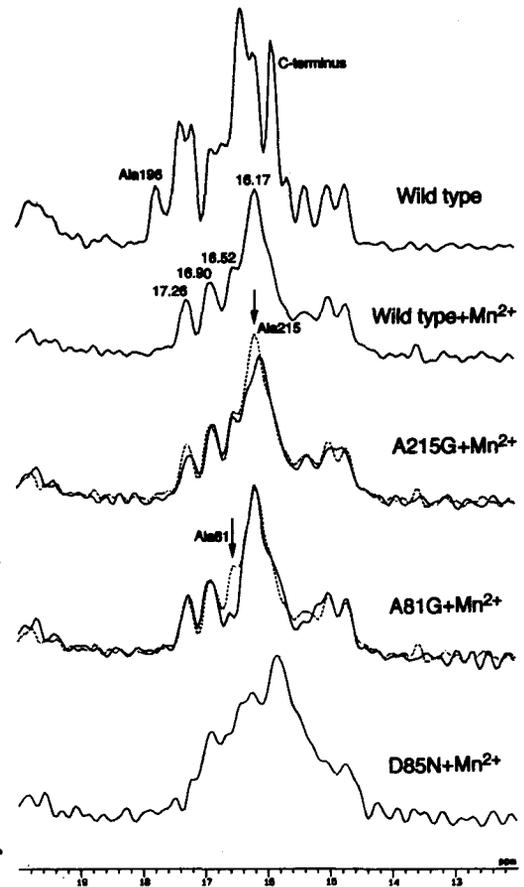
生体膜中の bR は生理条件下において表面部位に二価カチオン (Ca^{2+} , Mg^{2+}) を結合している¹。二価カチオンとして、NMR 緩和試薬である Mn^{2+} を添加し、 Ca^{2+} , Mg^{2+} と置換することにより、蛋白質周囲の環境への影響を最小限に抑えつつ、蛋白質の親水表面 (膜外部分) に由来する信号を広幅化、消去し、疎水的膜貫通部位の信号を選択的に観測することができる¹と期待される。 Mn^{2+} 処理により単純化されたスペクトルの個々のアラニン残基への帰属は部位特異的変異導入による残基の置換により行った。

固体高分解能 ^{13}C NMR、膜蛋白質、バクテリオロドプシン、プロトンポンプ、立体構造

つじさとる、かわみなみりこ、はせがわじゅん、ないとうあきら、Needleman Richard, Lanyi Janos K.、さいとうはじめ

試料となるバクテリオロドプシンは[3-¹³C]Ala を含む合成培地で高度好塩菌 *Halobacterium salinarium* を培養することにより同位体標識し、生体膜(紫膜)のまま精製、膜懸濁液として測定した。緩和試薬による処理は、測定時、紫膜懸濁液(5 mM HEPES pH 7.0, 10 mM NaCl, 0.025 % NaN₃) に終濃度 30~40 μM となるよう MnCl₂ を添加して行った。

図 1 に示すように、Mn²⁺処理により、野生型 bR の CPMAS スペクトルから C-末端部位(15.89 ppm)、Ala196(17.75 ppm) を含む膜の細胞外側および細胞内側両表面由来の信号が消滅し、新たに 17.26, 16.90 および 16.48 ppm(shoulder) に信号が観測されている。また、16.39 ppm の信号が消え、16.15 ppm の信号が独立に観測できる。レチナル結合部位(Lys216) に隣接し、直接活性部位の構造を反映すると予測される Ala215 の信号は、変異導入による蛋白質表面の信号変化のために、未処理のスペクトルでは帰属できないが、Mn²⁺処理により表面部位の信号を除くことで、



16.2 ppm に帰属することができた。Ala215 は回折法による bR の構造モデルではヘリックスのキック部位に位置するが、基底状態では通常の α-ヘリックス構造に対応する化学シフトを示すことがわかる。また、細胞外側のプロトン輸送経路に位置し、直接輸送に関与する Arg82 に隣接する Ala81 は Mn²⁺処理により 16.53 ppm に独立の信号として帰属できる。プロトン輸送の活性部位に位置する Asp85 を Asn に置換し、側鎖の荷電を消失させた場合、Mn²⁺処理のスペクトルにおいて主要な信号である 16.2 ppm 付近の信号強度が低下し、15.8 ppm に共鳴をもつ信号に移っている。同様のシフトは中性において Asp85 の一部がプロトン化しているミュータント、Arg82->Gln でも観測され、プロトン輸送チャネル内の残基の荷電状態が膜貫通ヘリックスの二面角を変化させていることがわかる。また、Asp85->Asn では Mn²⁺結合状態が野生型と異なり、光反応時、Asp85 の荷電状態変化により膜貫通ヘリックス構造の変化、膜貫通部位の極性の変化による二価カチオン結合部位の変化が示唆される。

- 1) Tuzi, S., Yamaguchi, S., Tanio, M., Konishi, H., Inoue, S., Naito, A., Needleman, R., Janos, J. K., and Saito, H. (1999) *Biophys. J.*, 76, 1523-1531.
- 2) Tanio, M., Inoue, S., Yokota, K., Seki, T., Tuzi, S., Needleman, R., Lanyi, J. K., Naito, A., and Saito, H. (1999) *Biophys. J.*, 77, 431-442.
- 3) Tanio, M., Tuzi, S., Yamaguchi, S., Kawaminami, R., Naito, A., Needleman, R., Lanyi, J. K., and Saito, H. (1999) *Biophys. J.*, 77, in press.

固体高分解能NMRによるパパインと複合体を形成した基質類似
ペプチドの高次構造およびダイナミクスの解明
(姫路工大・理) ○上平 美弥、内藤 晶、辻 暁、斉藤 肇

Determination of conformation and dynamics of peptide inhibitor
bound to papain as studied by solid state ^{13}C NMR
Department of Life Science, Himeji Institute of Technology
M. Kamihira, A. Naito, S. Tuzi, and H. Saitô

We determined the conformation and dynamics of inhibitor peptide (Gly-Gly-Tyr-Arg) bound to papain in the crystalline state by ^{13}C high resolution solid state NMR. The secondary structure of the peptide bound to papain showed distinct structure from that of unbound state as manifested from the chemical shifts observed in the ^{13}C CP-MAS spectra, and assigned to α -helix like structure around Gly². Spinning side band patterns and $T_{1\rho}^{\text{C}}$ values showed that the peptide backbone is quite rigid in the binding state as same as the papain backbone. However, weak spin diffusion was observed between papain and the inhibitor peptide as revealed from the $T_{1\rho}^{\text{H}}$ values.

<序>

タンパク質と複合体を形成したペプチドの固体高分解能NMRによる観測は、感度や装置上の制限により、現在それほど多くなされていない。一方で、固体NMR測定では、試料の状態や分子量に制限がないことから、タンパク質複合体の系に有用である。本研究では、システインプロテアーゼであるパパインと複合体を形成した4アミノ酸残基からなるインヒビター (Gly-Gly-Tyr-Arg) の高次構造およびダイナミクスを調べることを目的とした。

パパインは212残基からなり、活性部位にCys²⁵-SH基をもつ。活性部位近傍の1次構造が他のシステインプロテアーゼと保存されていることから、生体内で働く分解酵素のモデルとしてもよく用いられている。パパイン、およびパパインと数種類のインヒビターの複合体構造は、X線回折により数多く報告されているが、本研究で用いられたペプチドとの複合体構造はまだ決定されていない。このペプチドは低pHでパパインと結合し中性条件で解離することから、活性型パパイン精製のアフィニティーリガンドとして用いられている。

<実験>

インヒビターペプチド (I:[1- ^{13}C]Gly-[^{15}N]Gly-Tyr-Arg, II:Gly-[1- ^{13}C]Gly-Tyr-Arg, III:Gly-Gly-Tyr-Arg) は、ABI431Aペプチド合成機によりFmoc固相法で合成した。

パパインは市販の結晶から、アフィニティークロマトグラフィーにより活性型 (Cys²⁵がSH基) のみに単離した。活性型パパインは、0.1 M 酢酸-酢酸Na緩衝液, 2 mM EDTA, 5 mM Cys (pH 4.3)に溶かし、同じ緩衝液に溶かした5倍モル当量のペプチドを添加後、37℃で15分間反応させた。複合体の結晶は、沈澱剤として10% v/v エタノール, 0.4 M NaCl、外液としてエタノール:H₂O=2:1を用い、蒸気拡散法で得た(4℃)。

NMR測定は、Chemagnetics社製CMX400 NMR分光器により ^{13}C の共鳴周波数を100.6MHzとして測定した。測定温度は4℃で行った。主にCP-MAS法とTOSS⁽¹⁾を併用し、緩和時間測定は、Torchiaの方法⁽²⁾により行った。

固体高分解能NMR、酵素基質複合体、ダイナミクス、

かみひら みや、ないとう あきら、つじ さとる、さいとう はじめ

＜結果・考察＞

図1にパpain-インヒビターペプチド (I~III) 複合体結晶の ^{13}C CP-MASスペクトルを示す。 ^{13}C 標識ペプチド複合体と非標識ペプチド複合体の差スペクトル (図1D,E) から、 Gly^1 、 Gly^2 のカルボニル信号がそれぞれ174.6、172.7 ppmであることがわかった。また信号強度からインヒビターがパpainとほぼ1 : 1で結合していることがわかった。ペプチドの凍結乾燥粉末の ^{13}C CP-MASスペクトルで観測された化学シフト値が、それぞれ167.7、170.9 ppmであることから、酵素に結合することにより非結合状態とは異なる特定の構造をとっていることがわかる。化学シフト値と2次構造の相関関係³⁾より Gly^2 については α -ヘリックス構造様の2面体角をもつことが考えられるが、 $\text{Gly}^1 \text{C}=\text{O}$ の174.6 ppmについては報告されている2次構造に対応する値に比べて大きく低磁場にシフトしており、酵素との相互作用により特殊な2次構造を形成している可能性がある。

パpain-インヒビター (I)複合体結晶について低速のMAS(1500Hz)によりサイドバンドパターンを観測すると、 $\text{Gly}^1 \text{C}=\text{O}$ の120 ppmに及ぶ非常に幅広い化学シフト異方性が観測された。酵素の主鎖非標識信号についても同様の大きな異方性が観測された。また、 $\text{Gly}^1 \text{C}=\text{O}$ のスピン格子緩和時間

(T_1^C) は86secと非常に長く、酵素主鎖の T_1^C 値 (90 sec; 172.6 ppm) とほぼ同じであった。これらの結果から、複合体中のインヒビターペプチドは、運動の制限された堅い状態であることがわかる。しかし、プロトンの回転座標系でのスピン格子緩和時間 ($T_{1\rho}^H$) は、 $\text{Gly}^1 \text{C}=\text{O}$ での観測 (174.5 ppm) は4.6 msであるのに対し、パpain主鎖 (172.8 ppm) が53.8msと非常に大きな違いが得られた。 $\text{Gly}^1 \text{C}=\text{O}$ で観測された値は、アミノ基の運動が緩和過程に影響を与えていると考えられるエンケファリンの $T_{1\rho}^H$ 値と類似しており⁴⁾、酵素とペプチドの間のスピンの拡散が制限されていることがわかった。

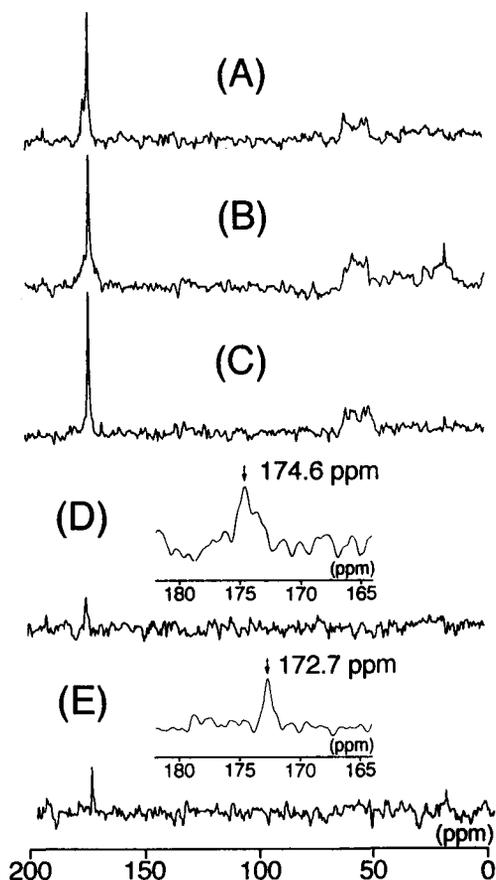


Fig.1 : ^{13}C CP-MAS spectra of papain- (A)I, (B) II and (C) III complex in the crystalline state and the difference spectra (D): (A) - (C), and (E) : (B) - (C)). The insets of (D) and (E) show expansion of the respective peaks.

1. Dixon, W.T. (1982) *J. Chem. Phys.* **77**, 1800.
2. Torchia, D. A. (1974) *J. Magn. Reson.* **30**, 613.
3. Saitô, H., and Ando, I. (1989) *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **21**, 209.
4. Kamihira, M., Naito, A., Nishimura, K., Satoru, T., and Saitô, H. (1998) *J. Phys. Chem.*, **102**, 2826.

固体高分解能¹³C NMRによるバクテリオロドプシンのフォールディングにおける高次構造変化の解析

姫路工大・理¹、ウェイン州立大²、カリフォルニア大³

○山口 悟¹、辻 暁¹、内藤 晶¹、Richard Needleman²、Janos K. Lanyi²、斉藤 肇¹

Folding of Bacteriorhodopsin: studied by ¹³C Solid state NMR

Himeji Institute of Technology¹, Wayne State University², University of California Irvine,³

We compared ¹³C NMR spectra of [3-¹³C]Ala- and [1-¹³C]Val-labeled bacterio-opsin (bO), produced either by (a) bleaching bR or (b) from a retinal-deficient strain, with those of bacteriorhodopsin (bR), in order to gain insight into the conformational changes of the backbone that to lead to correct folding after retinal is added to bO *in vitro*. The observed spectra of bO turned out to be different between the two types of preparations: the secondary structure of the former (a) is not strongly deviated from that of bR except for the presence of suppressed peak-intensities, whereas the backbone of the latter (b) consists of mainly α-helical form but very broad ¹³C NMR signals indicate that its tertiary structure is different from bR. Nevertheless, this structure is changed to the form identical to that of bleached bO from native bR, after it was regenerated *in vitro* followed by bleaching with hydroxylamine. This means that insertion of retinal is indispensable for the correct folding of bR as a template *in vitro*. According to careful evaluation of intensity changes between CP-MAS and DD-MAS spectra, the F-G loop and some transmembrane helices of bleached bO acquired motional freedom.

【はじめに】

バクテリオロドプシン(bR)は高度好塩菌の細胞膜中に存在する膜内在性の蛋白質で7本の膜貫通ヘリックス、それらをつなぐループと発色団であるレチナールによって立体構造が形成される。bRは脂質二重膜中で三量体を作り、その三量体が六法晶系を形成して紫膜となる。bRのフォールディングには数多くの反応速度論による解析が行なわれているが、その過程における立体構造変化のデータは得られていない。本研究は①bR、②NH₂OHによってブリーチしたバクテリオオプシン(bO)、③レチナール欠損株(E1001)から精製したbOの3種類の蛋白質を[3-¹³C]Alaまたは[1-¹³C]Val標識を行い、固体高分解能NMRを用いて、bOとbRの立体構造およびゆらぎの違いからbRのフォールディングに関して新たな知見を得ることを目的とした。

【実験1；試料調製】

高度好塩菌S-9株のbRとレチナールを発現しないE1001株のbOの[3-¹³C]Ala、[1-¹³C]Val標識試料をそれぞれ調製した。さらにNH₂OHによって[3-¹³C]Ala-bRをブリーチしたbOも調製した。これらの試料は5mM HEPES、10mM NaCl、pH7緩衝液に懸濁し、遠心沈降を行い、ペレットをそのままNMR試料管に導入した。測定中に水分が漏れることを防ぐために、試料管のキャップは接着剤で封じた。

固体高分解能NMR、バクテリオロドプシン、フォールディング、膜蛋白質

○やまぐち さとる、つじ さとる、ないとう あきら、Needleman Richard、Lanyi JK、さいとう はじめ

【実験2 ; NMR測定】

Chemagnetics CMX-400 NMR spectrometerを用いて、Cross Polarization Magic Angle Spinning (CP-MAS)法とSingle Pulse Excitation with Dipolar Decoupled Magic Angle Spinning (DD-MAS)法で測定を行った。 ^1H と ^{13}C の $\pi/2$ plus lengthはそれぞれ $5\mu\text{s}$ 、繰り返し時間、Contact time、スピニング周波数はそれぞれ4s、1ms、2.6kHzとした。 $-10^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ の範囲で温度変化を行い、測定は全て暗順応状態で行われた。

【結果と考察】

NH_2OH によってブリーチすると16.19ppm、16.41ppmの α_{II} -helixの信号と16.88ppmのランダムコイルの信号強度がDD-MAS(A)、CP-MAS(B)共に減少していることが観測された。(Figure1)この現象は蛋白質の揺らぎが上昇し、 ^1H のdecoupling周波数程度($10^4 \sim 10^5\text{Hz}$)の運動成分を獲得したことによると考えられる。しかし、信号強度減少の割合がCP-MASスペクトル(B)のほうが大きいことから、運動性が上昇し、Cross Polarizationの割合が減少した残基の影響が重なっていることがわかった。この残基は 10^4Hz 程度の運動性の成分を持つ。同様の信号強度の減少が17.13ppmのループ部位についても観測された。この結果はレチナル除去といった蛋白質内部に変化が外側ループにまで影響を及ぼしている事をあらわしている。

一方、レチナルを発現しないE1001株から精製したbOはFigure1Bとは全く異なり、 α_{II} -helix領域にブロードな信号を示した。(Figure2)このbOにレチナルを再構成させるとWTと同じスペクトルを示す。さらにブリーチを行うとFigure1Bと同じスペクトルを示す。これらのことからFigure2のbOは不均一な構造をとっていることが容易に想像出来、いったんレチナルが結合することによって均一な構造をとることがわかった。さらにいったんレチナルが結合すると、この構造はレチナルを除去しても維持されることがわかった。

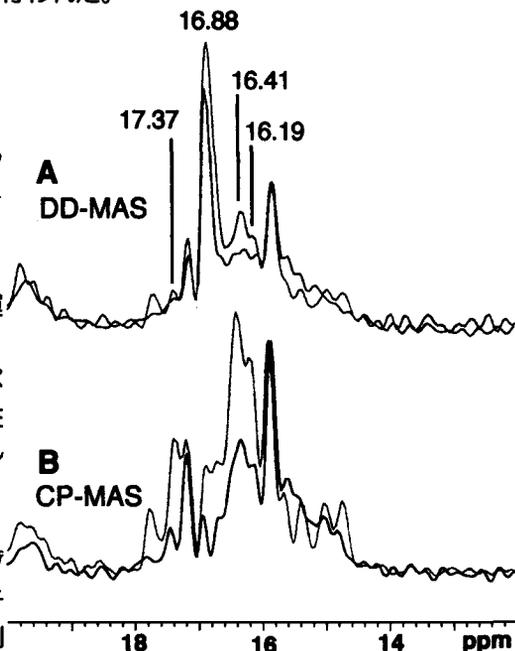


Figure1 ^{13}C NMR spectra of $[3-^{13}\text{C}]$ Ala-labeled bO (black traces) and bR (gray trace) recorded by DD-MAS(A) and CP-MAS(B) methods.

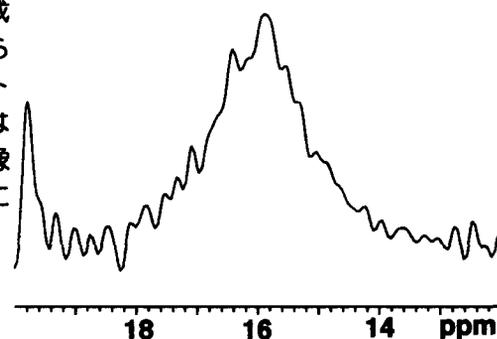


Figure2 ^{13}C NMR spectrum of $[3-^{13}\text{C}]$ Ala-labeled bO from retinal-deficient E1001 mutant.

***in situ* High-Pressure ^{129}Xe NMR Study of Free Volume in Polymers**Bunsow Nagasaka^{1,2}, Taro Eguchi¹, Hirokazu Nakayama³, Nobuo Nakamura¹, and Yasuo Ito⁴¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University²Material Analysis Research Laboratories, Teijin Ltd.³Kobe Pharmaceutical University⁴Research Center for Nuclear Science and Technology, The University of Tokyo**Abstract**

Pressure dependence of the ^{129}Xe NMR chemical shifts for xenon adsorbed in polymers has been investigated using a newly designed *in situ* high-pressure probe. The experiment found that the supercritical fluid state is never realized for the xenon trapped in the free volume of polymers even beyond the critical condition of bulk xenon ($P_c=5.8$ MPa, $T_c=289.8$ K). The average pore size of free volume in each of polymers, PC, LDPE, PPO, and PTFE, was studied by ^{129}Xe chemical shift and positron annihilation measurements. A unique correlation that $\delta^{-1} \propto r$ is first established between the ^{129}Xe NMR chemical shift (δ) and the pore size (r) which is deduced from the positronium annihilation lifetime (PAL).

テフロン (PTFE) 中の自由体積に取り込まれた Xe について、室温における ^{129}Xe 化学シフトの圧力依存性と新規開発した高圧 NMR プローブを用いて測定周波数 55.6 MHz で調べた。Fig. 1 に示すように Free Xe gas のピークは臨界点 ($P_c=5.8$ MPa, $T_c=289.8$ K) 近傍から密度の急激な上昇に伴い低磁場シフトするのに対し、自由体積内の Xe は緩やかな直線的圧力依存性を示し、約 7 MPa で両ピークが交差する。したがって、自由体積内の Xe は臨界点を越えても free Xe (超臨界流体) との交換は十分に遅く (2 ms 以上)、超臨界流体とは異なる状態にあることがわかる。さらに減圧方向の測定からも、一旦取り込まれた Xe は容易にぬけないことが確認できた。

キーワード：高圧 NMR, ^{129}Xe NMR, 高分子, 自由体積, ポジトロン

ながさかぶんそう, えぐらたろう, なかやまひろかず, なかむらのぶお, いたうやすお

また数種のポリマー (PC, LDPE, PPO, PTFE) に吸着させた ^{129}Xe の化学シフトと 0 MPa に補外した値は、それぞれ陽電子消滅法で見積もったポアサイズとの間に良い相関があることがわかり (Fig. 2)、この化学シフトがXeとポアの壁との衝突過程における平均自由行程で説明ができることがわかった[1]。化学シフトの逆数と 0 ppm^{-1} に補外した値[2]を使って、自由体積のサイズとポア形状について考察し、spherical cavity model と cylindrical tunnel model と比較すると本研究で用いたポリマーの場合は前者の方が有効であることがわかった。

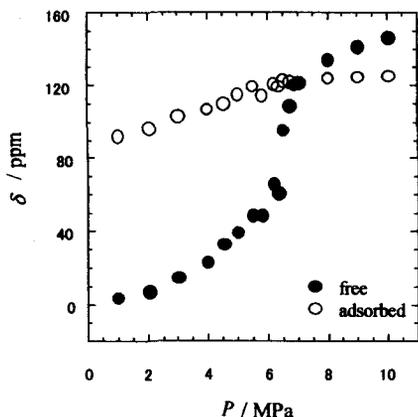


Fig. 1 Pressure dependence of chemical shift in the ^{129}Xe NMR spectra of xenon adsorbed in PTFE (Teflon) at 298 K and resonance frequency of 55.6 MHz.

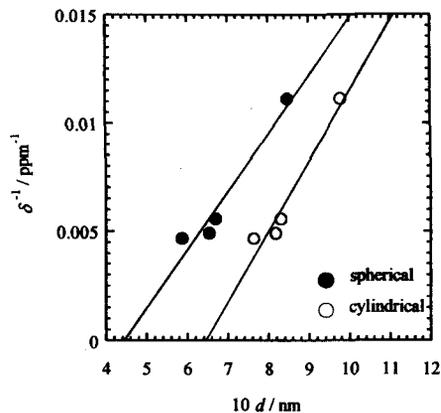


Fig. 2 Pore size dependence of the ^{129}Xe NMR chemical shift of xenon adsorbed in polymers. Average pore diameter for each polymer was deduced from the PAL experiments on the basis of the spherical cavity model (closed circle) and the cylindrical tunnel model (open circle).

References

1. B. Nagasaka, T. Eguchi, H. Nakayama, N. Nakamura, and Y. Ito, *Rad. Phys. Chem.*, (1999), in press.
2. C. Dybowski, N. Bansal, and T.M. Duncan, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **42**, 433 (1991).

Selective Spin Diffusion NMR Analyses of the Local Structure of Polymers

Institute for Chemical Research, Kyoto University

Kenji Mausda and Fumitaka Horii

We have tried to characterize the local structure of solid polymers by selective ^1H spin diffusion NMR spectroscopy. To detect the spin diffusion from protons bonded specific carbons to other protons, a new spin diffusion NMR experiment is proposed. By employing the DANTE pulse sequence after the conventional cross polarization (CP), a specific ^{13}C magnetization is spin-locked along a certain axis in the rotation frame and the ^1H magnetization closely associated with this ^{13}C magnetization is generated by the selective inverse CP method. After the ^1H spin diffusion is allowed to proceed in the laboratory frame for a giving time, effects of the spin diffusion are recorded as changes in ^{13}C magnetizations produced by the selective ^1H - ^{13}C CP process.

1. 緒言

本研究において、選択的 ^{13}C および ^1H スピン拡散 NMR 法により種々の高分子の局所構造を明らかにするためのアプローチを行った。ここで、特定の核間における ^1H スピン拡散を観測するため、cross polarization (CP)によって得られた ^{13}C 磁化を、DANTE パルス¹⁾により選択励起した後、逆 CP により選択的に ^1H 磁化を励起、この核からの ^1H スピン拡散過程を、再び CP により ^{13}C 磁化として観測するパルス系列を作製し、測定を行った。この測定により、特定の ^1H 核の周囲の ^1H 核環境に関する情報が得られる。

2. 実験

99% ^{13}C 濃縮 D-グルコースを通常の D-グルコースに対して 1/9 の割合で添加した Hestrin-Schramm 培地で、*Acetobacter xylinum* を培養することにより、C4 炭素を ^{13}C 濃縮したバクテリアセルロースを得た。試料は 50 wt% 含水させ、測定に供した。固体 ^{13}C NMR 測定は、Chemagnetics CMX400 分光計により、9.4T の静磁場下で行った。

3. 結果と考察

図 1 に示すパルス系列を作製し、選択的な ^1H スピン拡散を観測した。図 1 のパルス系列では、

選択的スピン拡散、逆 CP、選択励起、局所構造

ますだけんじ、ほりいふみたか、

まず1回目の $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ のCP後に DANTE のパルス系列を採用することにより、特定の ^{13}C 磁化のみを回転座標系の適当な軸にスピロックする。そして、選択的に得られた ^{13}C 磁化に関して $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ の逆CPを行うことにより、特定の

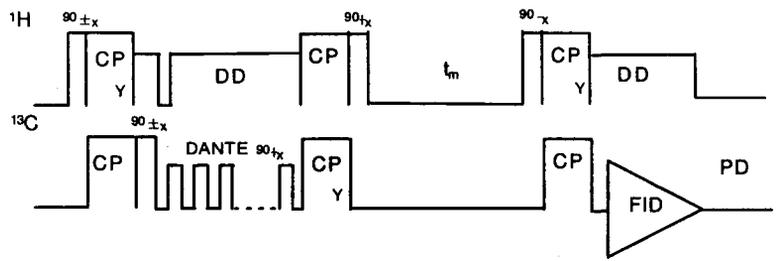


Figure 1 Pulse sequence for ^1H spin diffusion measurements, combined with the DANTE pulse sequence and the cross polarization.

^{13}C 核に結合した ^1H 核の磁化を励起することを可能にする。こうして得られた ^1H 磁化に関して、適当な時間(t_m)の間 ^1H スピン拡散を行う。その後、再び選択的な $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ のCPを行い ^{13}C 磁化として ^1H スピン拡散による寄与を観測する。

図2に示したパルス系列を用いて3種の t_m について測定したバクテリアセルロースの ^{13}C NMR スペクトルを示す。DANTE パルスにより C_{4D} 共鳴線を選択的に励起し、2,3 回目のCPはCP中における ^1H スピン拡散による寄与を抑えるため、それぞれ $32\ \mu\text{s}$ とした。ここで、 t_m の増大に伴い、 C_{4D} 共鳴線の強度が著しく減少している。これは、周囲との ^1H スピン拡散が $t_m=0.2\text{ms}$ という非常に短い時間のオーダーで著しく起こっていることを示している。

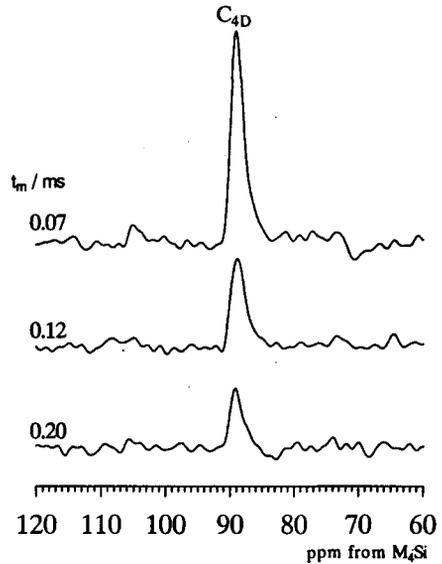


Figure 2 ^1H spin diffusion measurement of bacterial cellulose by the pulse sequence shown in Figure 1.

以上に示したパルス系列を用いることにより、特定の ^1H 核の局所構造に関する情報を得ることが出来ると期待できる。発表においては、PETなどの非晶性高分子に関する結果も合わせて示す。

また、2,3 回目のCPをWIM-24のパルス系列で置き換え、 t_m における ^1H スピン拡散を異種核関の相関により求める方法についても検討中である。

1) Moris, GA. And Freeman, R., *J. Magn. Reson.* 29,433 (1978).

¹³C-NMR Study on Sol-Gel Transition of Gellan Gum Aqueous Solution

○T. Izumikawa, T. Hiraoki, and A. Tsutsumi

Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering Hokkaido University, Sapporo 060-8628

¹³C-NMR measurements were made on the aqueous solution of gellan gum in the temperature range of the sol-gel transition. It was found that the remarkable decrease of spectral intensity occurs by the sol-gel transition. Chemical shift showed various changes at each carbon. A large down field shift for the carbonyl carbon of D-glucuronic acid and a very small down field shift for C₁ carbons of D-glucose of L-rhamnose were observed with decreasing temperature. On the other hand, other signals shifted toward high field side with various quantities. All these changes were continuous with variations of temperature, no discontinuity being observed by the sol-gel transition. Spin-lattice relaxation time (T₁) showed that all ring carbons have a correlation time less than 2 × 10⁻⁹s where T₁ shows the minimum.

Gellan gum は微生物の培養により得られる電解質高分子多糖であり、その化学構造は Fig.1 に示すとおりである。その水溶液は、形態の変化をとともなうゾル - ゲル転移を示す。このゲルは他の多糖ゲルに比べて透明で耐熱性のあるゲルを作り、金属カチオン、特に Ca²⁺、Mg²⁺などの2価カチオンを添加するとゲル形成が顕著に促進されることが知られている。本研究では gellan gum のゲル化に伴う分子形態や分子運動の変化を調べるために、2価カチオン含有量の少ない試料について ¹³C-NMR のスペクトル強度、化学シフト、スピン - 格子緩和時間 T₁ 等の測定を行った。

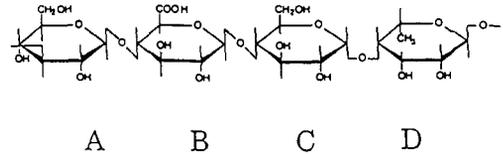
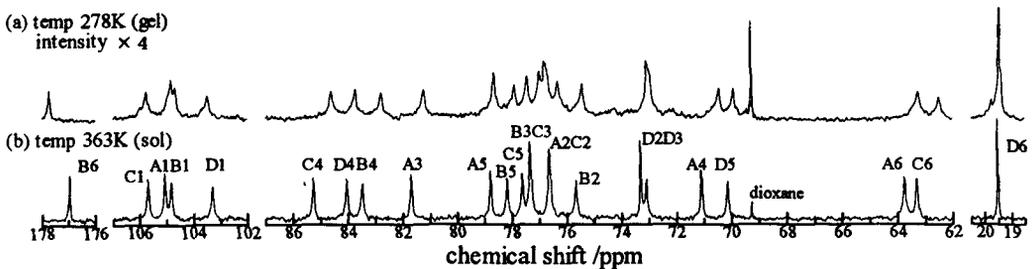


Fig.1 Chemical structure of gellan gum

測定に用いた 3.0wt% gellan gum 水溶液は、gellan gum 粉末を重水を 10% 含む蒸留水中で添加して 90℃、1 時間攪拌して作製した。¹³C-NMR の測定はその溶液を 5 φ 管に封入したのち、Bruker DSX-300 (共鳴周波数 75.48MHz) を用いて行った。スペクトルは complete ¹H decoupling で、T₁ は inversion recovery 法で測定をした。

Fig.2 に 278 K (ゲル状態)、363 K (ゾル状態) における gellan gum 水溶液の

Fig.2 ¹³C-NMR spectral of gellan gum solution (3.0wt/v%). (a) 278K, (b) 363K.

キーワード : ¹³C-NMR、gellan gum、ゾルゲル転移

いずみかわたいすけ、ひらおきとしふみ、つつみあきひろ

^{13}C -NMR スペクトルを示す（内部基準 dioxane:69.3ppm）。図のようにゲル化による線幅の広がりや化学シフト変化が見られる。

Fig.3 に D6 (CH_3), A3 におけるピーク強度の温度変化を示す。スペクトル強度は 30~40°C 付近で急激に減少している。このようなスペクトル強度の急激な変化は他のピークでも同様に起こっている。これは、ゾルゲル転移によって運動が制限されて線幅が広がることによるものであり、この温度域でゾルゲル転移が起こっていることを意味し、以前に行われている DSC 等の実験結果とも一致している。

解離性の B6 (COO^-) の化学シフトは温度低下とともに大きく低磁場シフトした (90°C で約 0.8 ppm)。A3, A4, A6, B4, C4, C6 は温度の低下とともに明らかな高磁場シフトを示すが、各糖を結ぶ炭素 C1, D1 の化学シフトは逆にやや低磁場シフトする。一方、A5, B2, B5, C5, D4, D5, D6 などはずかには高磁場側にシフトするが、シフト量は小さい。Fig.4 に A4, A5 基の化学シフトの温度変化を示す。いずれの場合も化学シフトは温度変化と共に連続的に変化している。

次に、分子運動の情報を得るためにスピン-格子緩和時間 T_1 の測定を行った。Fig.5 に D6(CH_3), A3 に対する T_1 の温度変化を示す。その他のピークはいずれも A3 と類似の温度変化となったが、ゾルゲル転移付近での劇的な変化は見られない。多糖はそれ自身の剛直な構造から分子運動が遅いことが期待されるが実験結果から相関時間は 283K で 2.0×10^{-9} sec、363K で 2.4×10^{-10} sec とかなり速い。一方、D6 はその他の炭素よりさらに長い T_1 値となった。相関時間は 10^{-11} sec 程度となり、運動は C_3 軸回転により非常に速いことが示唆される。

以上のことを考察した結果について発表する予定である。

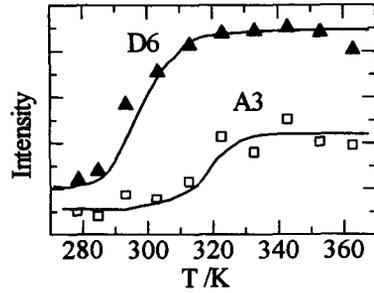


Fig.3 Temperature dependence of spectral intensity. (\blacktriangle) D6, (\square) A3.

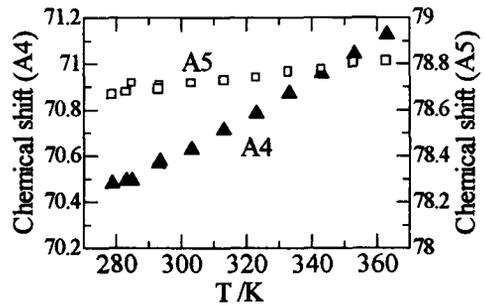


Fig.4 Temperature dependence of chemical shift. (\blacktriangle) A4, (\square) A5.

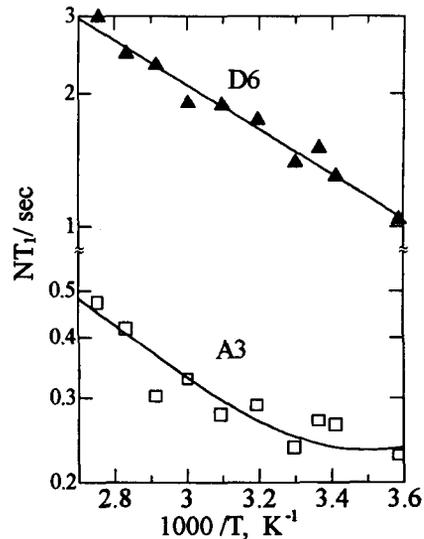


Fig.5 Temperature dependence of NT_1 . (\blacktriangle) D6, (\square) A3.

優先富化現象を示す化合物の固体NMRによる 結晶構造の比較

(¹理研、²京大院人間環境学)

○高橋 弘樹¹、仲村 高志¹、田村 類²、鶴澤 洵¹

Comparison of the crystal structure of the compounds showing *Preferential Enrichment* by solid state NMR method.

RIKEN, Division of Molecular Characterization; Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University

○ Hiroki Takahashi¹, Takashi Nakamura¹, Rui Tamura² and Jun Uzawa¹

Comparison of the crystal structure of the compounds of (±)-trimethyl and dimethyl ammonium p-benzenesulfonate derivatives, NNMe₂, NBMe₃, NTMe₂ and NOMMe₃ is described. The first two racemates showed the phenomenon of the Preferential Enrichment, but the last two failed to do. Crystal structure of three racemates (NNMe₂, NBMe₃ and NTMe₂) were determined by X-ray crystallographic analysis. Crystal system of NBMe₃ and NNMe₂ are triclinic, while that of NTMe₂ is monoclinic. We have investigated whether these crystal systems are distinguishable or not by means of solid state NMR.

1. はじめに

我々は、不斉な二級水酸基を持つアンモニウムスルホン酸塩(NBMe₃, NNMe₂)が、単純な再結晶により新しい光学分割現象[優先富化 (Preferential Enrichment)]を示すことを見出している。また、ベンゼンスルホン酸のパラ位に電子供与性の置換基を持つ化合物 (NOMMe₃, NTMe₂) では優先富化現象が起こらないことが分かっている。これらの化合物のうち(±)-NBMe₃, (±)-NNMe₂, (±)-NTMe₂は X線結晶構造解析により、その結晶構造が明らかになっている。優先富化現象を示した化合物の結晶は両者ともほぼ同じ結晶構造であった[三斜晶系 (*P* $\bar{1}$)]。

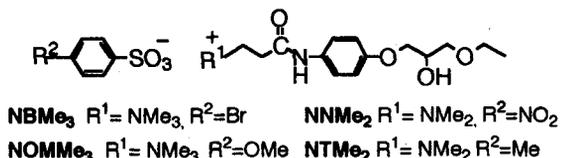


Fig. 1

キーワード：優先富化、結晶構造、光学異性体、固体NMR

○たかはしひろき、なかむらたかし、たむらるい、うざわじゅん

一方、優先富化現象を示さない化合物ではこれとは異なる結晶構造[単斜晶系 ($P2_1/c$)]であった。今回、これら結晶構造の違いを ^{13}C CP/MAS NMRによって区別できるか否かを検討した。

2. 結果と考察

^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを示す(Fig.2)。すべての化合物でスペクトルは異なっていた。中でも、**NOMMe₃**は他の化合物と較べて低磁場側で大きな違いが見られる。トリメチル体の Me_3N 基は1本のシグナル (53.1ppm) であるのに対し、ジメチル体では Me_2N 基が2本のシグナルをあたえ二つのメチル基が非等価であった (**NTMe₂**:41.6, 43.0ppm; **NNMe₂**: 43.0, 48.0ppm)。**NBMe₃**と**NNMe₂**の様に結晶構造が同じであっても固体NMRスペクトルは異なることが分かった。このことから**NTMe₂**と**NNMe₂**のスペクトルの違いは、結晶構造だけではなく分子構造の変化も影響しているといえる。

溶液中の主鎖の ^{13}C NMRの化学シフトは、ベンゼンスルホン酸の置換基の違いによる差がほとんどないことから、固体状態ではこの置換基の違いが主鎖の化学シフトに顕著な影響を与えることが分かった。この様に、分子構造の微妙な変化で得られるスペクトルが異なるため、結晶構造の違いを固体NMRで区別することは難しい。しかし、スペクトルを詳細に解析することにより、結晶中での分子間の相互作用を検討できると考えられる。

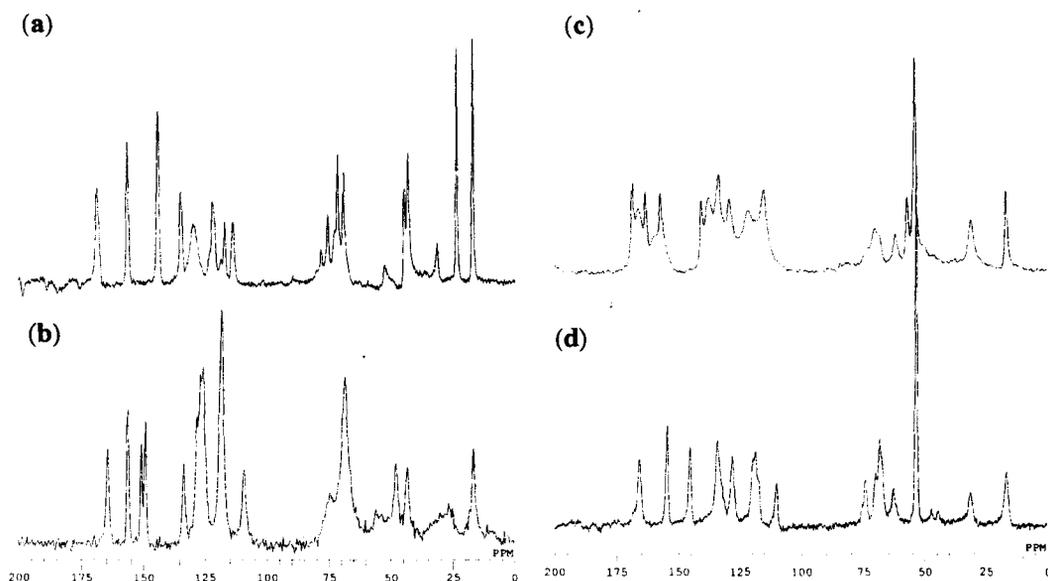


Fig. 2 ^{13}C -CP/MAS spectrum of (a) (±)-NTMe₂, (b) (±)-NNMe₂, (c) (±)-NOMMe₃ and (d) (±)-NBMe₃.

Imaging of the ^1H NMR Second Moment with ^{13}C Chemical Shift Resolution

M. Nonaka, S. Matsui, and T. Inouye
*Institute of Applied Physics, University of Tsukuba,
Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan*

We propose a method of ^1H -NMR second moment imaging combined with the heteronuclear correlation experiment using ^1H - ^{13}C cross polarization. It is well known that many of the multi-component polymer materials possess the so-called nano-heterogeneity in their molecular mobility, which can not be resolved in conventional imaging experiments. The combination of the ^{13}C chemical shift resolution with the ^1H second moment molecular mobility imaging of these materials gives rise to the microscopic resolution (~ 100 nm) in addition to the macroscopic resolution (~ 100 μm) usually obtained by using the field gradients. The method is demonstrated by preliminary experiments on model samples comprising mixed adamantane and hexamethylbenzene powders.

我々は、固体材料における分子運動性の空間分布を測定する方法として、プロトン NMR の2次モーメントを画像コントラストとするイメージング法を開発してきた(1)。この方法は、時間領域のスピンエコー信号から curve fitting により直接2次モーメントを求めるため、一般に長大な測定時間を必要とする多次元実験においても、比較的短時間で測定が完了するという特長を持っている。しかし、通常のイメージング法では、空間分解能が $100\mu\text{m}$ 程度であるため、この分解能以下のマイクロなレベルにおいても分子運動性に分布が存在する場合には、これを空間的に分解するのは不可能である。実際、多くの高分子材料には、いわゆる nano-heterogeneity が存在し 100nm レベルで分子運動性が分布している(2)。このような高分子材料に対しても真に有効な2次モーメントイメージングを行うには、約3桁の空間分解能の向上が必要となる。磁場勾配の強化により、これを実現するのは非常に困難である。そこで我々は、異種核 (^1H - ^{13}C) 相関を用いれば、 ^{13}C 化学シフトにより nano-heterogeneity が分離できること(2)に着目し、2次モーメントイメージング法に ^{13}C 化学シフト分解能を導入する試みを行った。

図1に ^{13}C 化学シフト分解 ^1H 2次モーメントイメージング法のパルス系列を示す。全ての測定は、2次モーメントが変化しないような比較的低速な MAS の下で行う。 90° パルスにより ^1H の横磁化を準備した後に、適切な refocusing パルスあるいはパルス系列によりスピンエコーを発生させる。次にエコーピーク付近の適当な時点、数ヶ所よりスピンロッキングのための RF パルスを印可する。これにより、エコーの形の情報を次の CP 過程にエンコードし、CP で得られる ^{13}C の信号強度に反映させる。2次モーメントはエコーの形から curve fitting により求める(1)。 ^{13}C の信号は ^1H デカップリング下でサンプリングし ^{13}C 化学シフト情報を得る。信号のサンプリングに先立ち、本パルス系列では、位相エンコード用の磁場勾配が MAS 軸方向に印可されており、1次元のイメージング情報が得られる。多次元イメージングを行うには、MAS を考慮して複数の磁場勾配を印可する必要がある(3)。

Keywords : 固体イメージング、2次モーメント、分子運動性、 ^{13}C 化学シフト、異種核相関

のなかまさゆき、まついしげる、いのうえたもん

今回の実験では、nano-heterogeneity を有する高分子材料のモデルサンプルとして、adamantane と hexamethylbenzene の粉末を適切な比率で混合したものを用いた。2次モーメントの値は各々、約 $1G^2$ 、 $2G^2$ である。図1のスピネコーとしては、マジックエコー(1)ではなくソリッドエコーを用いた。マジックエコーは MAS に対する感受性が高く、正確な2次モーメントを与えない場合があるためである。MAS 周波数は、約 800Hz とした。ベンゼン環 ^{13}C からの信号は、スペクトル上で微弱であるので無視した。他の ^{13}C は化学シフト異方性がゼロあるいは非常に小さいので、今回用いたサンプルでは TOSS の必要はない。全ての実験は CMX 300 Infinity を用いて行った。

References:

- (1) S. Matsui, M. Nonaka, T. Nakai, and T. Inouye, *Solid State NMR* 10,39-44 (1997).
野中正幸、松井茂、中井利仁、井上多門 第36回NMR討論会講演要旨集 371-374(1997)
- (2) K. Schmidt-Rohr, J. Clauss, and H. W. Spiess *Macromolecules* 25,3273-3277(1992).
- (3) S.Matsui, K.Sekihara, H. Shiono and H.Kohno *J. Magn. Reson.* 77 182-186 (1988)

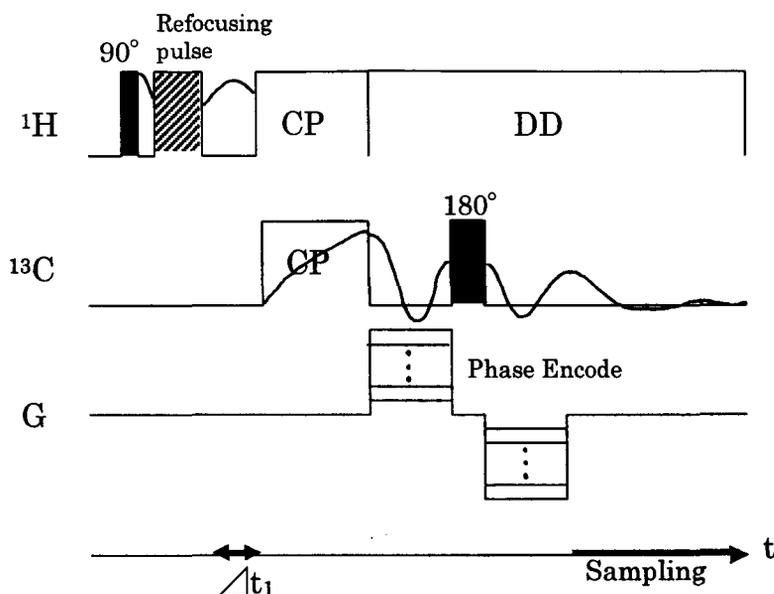


Fig.1 Pulse sequence for ^1H NMR second moment imaging with ^{13}C chemical shift resolution. Spatially 1D version is shown. The sample undergoes relatively slow MAS. A spin echo is produced by the refocusing pulses. The echo shape, which is used to extract the second moment, is encoded into the CP process and correlated with the ^{13}C chemical shifts.

[¹H-¹³C] 2次元 NMR によるシルクフィブロイン モデルペプチド [Ala-Gly]₁₂ の固体構造解析

(群馬大工¹、日本電子²) ○岸 哲史¹、木村 英昭¹、尾崎 拓男¹、
杉沢 寿志²、出口 健三²、莊司 顯¹

Conformational Analysis of Silk Fibroin Model Peptides [Ala-Gly]₁₂ In the Solid-State by [¹H-¹³C] 2D NMR

Satoshi Kishi¹), Hideaki Kimura¹), Takuo Ozaki¹), Hisashi Sugisawa²), Kenzo Deguchi²
and Akira Shoji¹) (¹) Dept. Biological Sciences, Gunma Univ., Kiryu, Gunma 376-8515;
²) JEOL Ltd., Musashino, Akishima-shi, Tokyo 196-0021)

Bombix mori silk fibroin has a characteristic -Gly-Ala- repeating sequence as primary structure. The crystalline domains of *B. mori* can exist in two different secondary structures (silk I and silk II forms). We have obtained in the past the conformation-dependent chemical shifts of the two forms of silk fibroin by the ¹H CRAMPS and ¹³C and ¹⁵N CP-MAS NMR measurements. Especially, although ¹H CRAMPS NMR method is very useful for conformational analysis, it is sometimes difficult to obtain its exact ¹H chemical shifts, because of its poor resolution. In this study, we have succeeded in separating the H_α chemical shifts of Ala and Gly residues of silk fibroin model peptides [Ala-Gly]₁₂ by two-dimensional heteronuclear-correlation (HeteCo) NMR method in solids.

[結言]

固体蛋白質の立体構造を解明する研究手法は、特に繊維状蛋白質の構造・機能相関を調べる上で大変重要である。このような立場から我々は、そのモデルペプチドの固体高分解能 NMR による立体構造の研究を行ってきた。そしてこれまでに蛋白質または合成ポリペプチドの二次構造と ¹H、¹³C、¹⁵N NMR 化学シフト値との相関を明らかにしてきた¹⁻³⁾。この中で、¹H CRAMPS (combined rotation and multiple pulse spectroscopy) 法は以前よりも分解能が良くなったとはいえ、¹³C や ¹⁵N 比べるとスペクトルが広幅化しており、ピークの重なりのため正確な化学シフト値の決定やピーク帰属が困難であることが多い^{4,5)}。そこで本研究では、この欠点を補いより正確な化学シフト値を得るため [¹H-¹³C] 二次元異種核間化学シフト相関 NMR⁶⁾ の測定を行った結果、満足する結果が得られた。またこの方法は蛋白質の立体構造の解明に有効な手段になることは言うまでもない。

Keywords : 化学シフト、¹H CRAMPS NMR、[¹H-¹³C] 二次元 NMR、シルクフィブロイン

きしさとし、きむらひであき、おざきたくお、すぎさわひさし、でぐちけんぞう、しょうじあきら

[実験]

[Ala-Gly]₁₂ の試料は PerSeptive Biosystems 社製 9050 plus 型全自動固相ペプチド合成装置を用いて合成した。合成して得た試料（シルク II 形）を臭化リチウム水溶液で処理することによりシルク I 形試料を得た。固体高分解能 ¹³C 及び ¹⁵N CP-MAS NMR スペクトルは JEOL EX-270WB 分光計、¹H CRAMPS NMR、[¹H-¹³C] HeteCo 二次元 NMR スペクトルは Bruker DSX 300 分光計を用いて測定した。

[結果・考察]

[Ala-Gly]₁₂ の臭化リチウム水溶液によるシルク I 形からシルク II 形への立体構造変化は ¹³C、¹⁵N NMR の化学シフト値から確認した。[¹H-¹³C] HeteCo 二次元 NMR スペクトル (Fig. 1) を測定した結果、各アミノ酸残基の α プロトン、β プロトンを分離して帰属することが可能となった。この結果から当初シルク I、II 形では Ala の α プロトンの化学シフト値のみが変化すると考えられていたが Gly の α プロトンも変化していることが明らかとなった。また、天然の家蚕シルクフィブロインについても [¹H-¹³C] HeteCo 二次元 NMR スペクトルを測定した。天然シルクは Ser 残基が含まれるためその α プロトンピークが観測でき、この化学シフト値がシルク I、II 形で非常に興味深い変化を示した。さらに、このことに加えて、これら繊維状蛋白質に多く含まれる Gly 残基に串着目し、[Gly]_n ホモポリペプチドの [¹H-¹³C] HeteCo 二次元 NMR スペクトルを測定し、その特性について比較検討した。

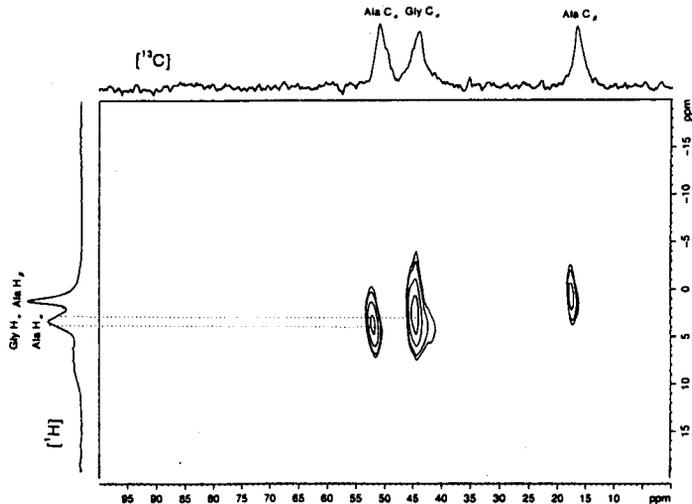


Fig. 1 [¹H-¹³C] 2D heteronuclear-correlation NMR spectrum of [Ala-Gly]₁₂ (silk I form).

[参考文献]

- ¹ H. Saito, et al. *Macromolecules* 1984, 17, 1405.
- ² A. Shoji, et al. *Macromolecules* 1984, 17, 1472.
- ³ A. Shoji, et al. *Journal of Molecular Structure* 1998, 441, 251.
- ⁴ A. Shoji, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7604.
- ⁵ H. Kimura, et al. *Macromolecules* 1998, 31, 7398.
- ⁶ D. P. Burum and A. Bilecki, *Journal of Magnetic Resonance* 1991, 94, 645.

Dynamics of Polypeptide Main Chain Studied by Solid State ^2H -NMR

Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Hokkaido University
 Sapporo 060-8628, Japan

○Nobuyuki Morikoshi, Shunsuke Kubota, Toshifumi Hiraoki and Akihiro Tsutsumi

Effects of copolymer compositions on the motion of peptide group in the α -helical polypeptides were investigated with the solid state ^2H -NMR using copolymers of methyl glutamate (MG) and stearyl glutamate (STG) that are deuterated at main chain amide protons. The temperature dependence of the quadrupolar splitting and T_1 showed that the peptide plane oscillates around $\text{C}^\alpha - \text{C}^{\alpha_{i+1}}$ bond. The oscillation is most rapid for ST compositions 20~40 [mol%]. Such a tendency corresponds well to the composition dependence of side chain movement, indicating that the main chain movement is strongly affected by the side chain movement.

[目的] 固体中で α ヘリックス構造をとるポリペプチド側鎖についての分子運動の研究はこれまで多くなされてきたが、主鎖に関する研究例は少ない。我々は最近、ペプチド ^1H を重水素置換したポリ(γ -ベンジル L-グルタメート) (PBLG)の ^2H -NMR 測定により、ペプチド平面が微小振動していることを明らかにした。そこで、今回は、比較的短い側鎖を持つメチルグルタメート(MG)と、長い側鎖を持つステアerylグルタメート(STG)からなるコポリマーを用い、コポリマー組成のペプチド微小振動への影響を検討するため、 ^2H -NMR スペクトルと、スピン-格子緩和時間(T_1)の測定を行った。

[実験] コポリマーには、MG に対する STG の組成比が 0,25,38,62,90[mol%] のものを用意した。ペプチド N-H の重水素化は、コポリマーをクロロホルムと三フッ化酢酸- d_1 の割合が 7:3 の混合溶媒中に溶解した後、エタノールにより沈殿、乾燥させて行った。 ^2H -NMR スペクトルは、Bruker DSX-300 により、温度範囲-50~140[$^{\circ}\text{C}$]で、四重極エコー法を用い測定した。 T_1 測定は-20~110[$^{\circ}\text{C}$] で Inversion Recovery 法で行った。

キーワード: 主鎖ダイナミクス、固体重水素NMR、ポリグルタメート、四重極緩和、ペプチド微小振動

○もりこし のぶゆき、くぼた しゅんすけ、ひらおき としふみ、つつみ あきひろ

[結果] スペクトルには、 $N\text{-}^2\text{H}$ 内の電場勾配テンソルの主軸系に相当する 3 つの分裂 $\Delta \nu_{xx}$, $\Delta \nu_{yy}$, $\Delta \nu_{zz}$ が現れた。PMG(100%MG)に対する分裂幅の温度依存性は、Fig-1 のように、 $\Delta \nu_{xx}$ は一定であるのに対し、他の成分は温度とともに減少している。このことからペプチド平面は X 軸($C^{\alpha}_1\text{-}C^{\alpha}_{i+1}$ 方向)周りに微小振動していることが分かる。この傾向は、他のサンプルについても同様である。分裂幅から見積もった平均振幅角は、測定温度範囲でおよそ 9~14[deg]であり、コポリマーの組成によって変化が見られる(Fig-2)。また、 T_1 の測定結果から、室温での微小振動の RATE は、 $1.0\sim 3.2\times 10^6$ [Hz](Fig-3)、活性化エネルギー(ΔE)は、 $10.7\sim 12.0$ [KJ/mol] (Fig-4)と求めた。MG 組成 20~30[mol%] の範囲で、RATE が増加し、 ΔE が減少していることから、この範囲でペプチド平面の微小振動が一番激しいことが分かった。この結果は、ESR スピンプロープ法による、側鎖運動の組成依存性の結果と一致している。この事から、主鎖の運動は、側鎖の運動と強い相関を持つことが分かった。

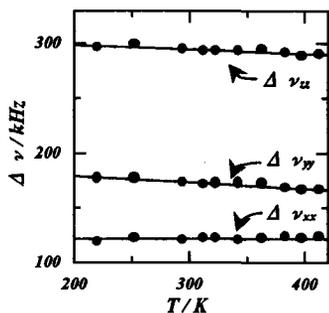


Fig-1 Temperature dependence of quadrupolar splitting for PMG.

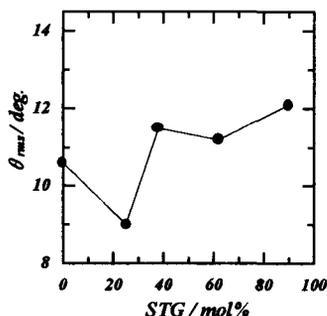


Fig-2 Composition dependence of root mean square vibration angle at 295K.

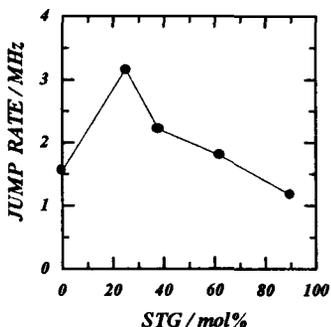


Fig-3 Composition dependence of the jump rate at 295K.

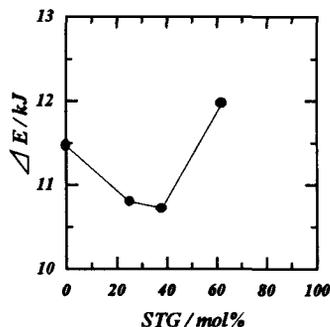


Fig-4 Composition dependence of the activation energy.

北大院工 ○越 大亮、石井文明、堤 耀広

Phase separation in P(VDF/TrFE)/at-PMMA blends, studied by ^1H - ^{13}C cross relaxation method. II

D.Koshi, F.Ishii and A.Tsutsumi

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo 060-8628.

The spinodal phase separation and the crystallization process of P(VDF/TrFE)/at-PMMA blends with copolymer weight percent (ϕ_w) of 60 wt.% at $135^\circ\text{C} > T_{\text{LCST}}$ (lower critical solution temperature) were studied from ^1H - ^{13}C CP/MAS NMR and DSC methods. Comparing theory with experiment for the annealing time (t_{ANN}) dependence of the inverse ^1H spin-lattice relaxation time ($1/T_{1\rho\text{H}}$), the glass transition temperature (T_g), the Curie temperature (T_c) for each group of both polymers, it was found that the blend initially underwent spinodal decomposition between $t_{\text{ANN}}=0$ and 2min, crystallized between $t_{\text{ANN}}=2$ and 20min and that both the crystal and amorphous phases were more stable by the interfacial growth.

1) はじめに

強誘電体高分子 poly(vinylidene fluoride/trifluoroethylene), P(VDF/TrFE)と無定形高分子 atactic poly(methylmetacrylate), at-PMMA とのブレンドは、P(VDF/TrFE)の融点より高温では相溶するが、融点以下では相図が下限臨界共溶温度(LCST)型で、LCST から融点の間でスピノーダル分解を起こし、LCST 以下では相溶する。大東ら¹⁾はこの P(VDF/TrFE)重量百分率 50wt%以上のブレンドのキャストフィルムを 135°C で熱処理すると、ブレンド中に巨大単結晶が生成することを見つけた。新居ら²⁾は 135°C における単結晶生成機構を明らかにするために動力学的研究を行ない、もとのキャストフィルムが不安定な共重合体結晶と無定形相に相分離していたことから、熱処理の初期では結晶と無定形相とも界面成長が起き、中期では結晶の不安定化、後期では結晶分子鎖方向の厚化から、より安定結晶になることを明らかにした。本研究は、 ^1H - ^{13}C CP/MAS NMR 法と DSC 法を用いて、キャストフィルムを相溶状態の 150°C から 135°C に急冷し、スピノーダル分解及び共重合体結晶形成機構を明らかにすることを目的とする。

2) 実験

試料は VDF 73mol%の P(VDF₇₃/TrFE₂₇)と at-PMMA との wt%比 60/40 のブレンドである。測定試料は、各ポリマーを DMF(dimethylformamide)溶媒に溶かしてブレンドキャストフィルムを作製し、そのフィルムを 150°C で相溶させ、 135°C に急冷し $t_{\text{ANN}}[\text{min}]$ 保持した後、 T_g 以下の 0°C に急冷凍結させたものである。保持時間は $t_{\text{ANN}}=0, 30\text{s}, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180\text{min}$ である。各試料の ^{13}C NMR スペクトルや回転系における ^1H スピン-格子緩和時間 $T_{1\rho\text{H}}$ は ^1H - ^{13}C CP/MAS NMR 法で、強誘電的相転移温度 T_c 、ガラス転移温度 T_g と比熱 ΔC_p は DSC 法で測定された。

Keyword : P(VDF₇₃/TrFE₂₇)/at-PMMA ブレンド、スピノーダル分解、結晶化、回転系の ^1H スピン-格子緩和時間

○こし だいすけ、いしい ふみあき、つつみ あきひろ

3) 結果と考察

Fig.1 は $t_{ANN}=30\text{ s}$ と 5min の昇温時の DSC 曲線である。30 s においては 48°C にガラス転移温度 T_g が観測され、 100°C 付近で吸熱、発熱が起きている。5min では、 T_g は 30s のものと殆ど変わらないが、高温域に強誘電的相転移の吸熱ピークが観測されている。Fig.2 は、 t_{ANN} に対する T_g および T_c の関係である。 T_g の値は $t_{ANN}=0\sim 2\text{min}$ までは殆ど一定であるが、 $t_{ANN}=5\text{min}$ を過ぎると T_c は t_{ANN} とともに僅かに増加するのに対し、 T_g は $t_{ANN}=20\text{min}$ 以降急激に減少している。ここで、 $t_{ANN}=0\sim 2\text{min}$ を A、 $t_{ANN}=2\sim 20\text{min}$ を B、 $t_{ANN}=20\text{min}$ 以降を C 過程とする。A 過程では T_g は 1 つで、その値が PMMA の $T_g=105^\circ\text{C}$ と P(VDF/TrFE) の $T_g\cong 0^\circ\text{C}$ の中間域にある。これはブレンドが無定形でよく相溶していることを示している。B 過程では T_c の出現により無定形相内で P(VDF/TrFE) の分子鎖が結晶化し始め、C 過程では T_c および T_g の変化は結晶相および無定形相がはっきりと相分離し、それぞれ安定化したことを意味している。

観測された ^{13}C NMR スペクトルでは、PMMA の CH_3 , $>\text{C}<$, OCH_3 , CH_2 , $\text{C}=\text{O}$ 基のピークが 16, 44, 51, 54 と 177ppm に、P(VDF/TrFE) の CH_2 , CHF , CF_2 基のピークが 37, 86 と 119ppm にそれぞれ存在していた。Fig.3 は、PMMA の $\text{C}=\text{O}$ 基の $1/T_{1\rho\text{H}}$ と t_{ANN} との関係である。ただし、 $T_{1\rho\text{H}}$ は、各基のピーク強度の実験値を交差緩和の理論式で最適化して求めた。 $\text{C}=\text{O}$ 基に対する $1/T_{1\rho\text{H}}$ は $t_{ANN}=2\text{min}$ まで増加し、その後減少、そして $t_{ANN}=20\text{min}$ から再び増加している。両試料の他の基に対しても同様であった。これらの変化域はガラス転移温度の A, B, C 過程とそれぞれ一致している。この一致は、結晶核形成にブレンドのスピノーダル分解が関与していることを意味していた。詳細は発表時に報告する。

文献

- 1) Y.Wen and H.Ohigasi, *Polymer Preprints, Japan*, 45, No.11, 3109 (1996)
- 2) F.Ishii, S.Nii and A.Tsutsumi, *Polymer Preprints, Japan*, 47, No.5, 863 (1998)

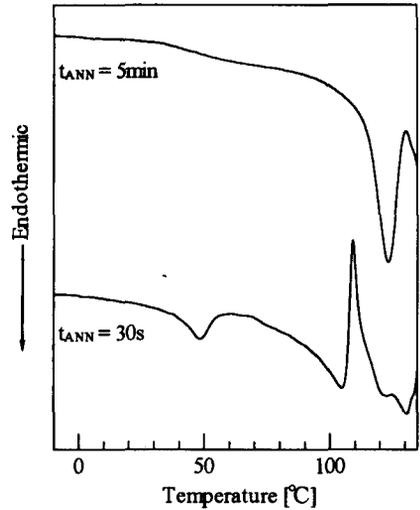


Fig.1 DSC thermograms of P(VDF₇₃/TrFE₂₇)/at-PMMA (60/40) blends for $t_{ANN}=30\text{ s}$ and 5min at $10^\circ\text{C}/\text{min}$ on heating.

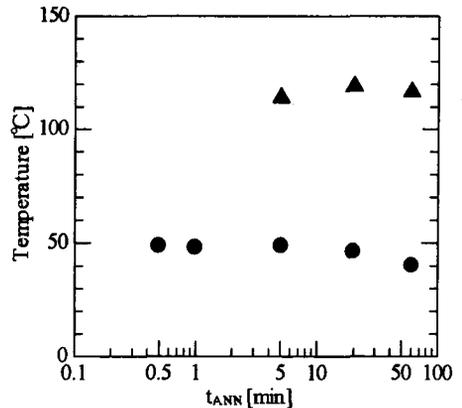


Fig.2 T_g and T_c as a function of annealing time t_{ANN} . ●, T_g ; ▲, T_c .

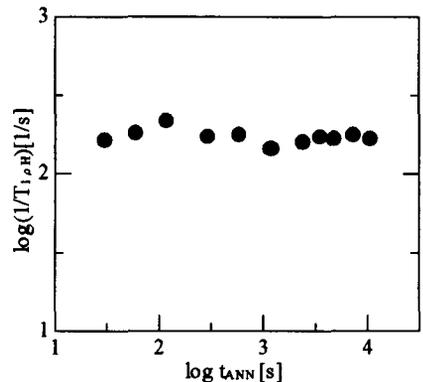


Fig.3 The annealing time dependence of $1/T_{1\rho\text{H}}$ for $\text{C}=\text{O}$ group in P(VDF₇₃/TrFE₂₇)/at-PMMA (60/40) blends.

P101

Eu-ドーブ- Y_2O_2S で、最近接YにEuが置換された
 ^{89}Y シグナルの帰属

(三菱化学横浜総研¹・化成オプトニクス²・東京水産大³)

○原園としえ¹・安達隆二²・渡部徳子³

Assignment of ^{89}Y signals substituted by Eu at the next nearest
neighboring Y sites in Y_2O_2S

(Mitsubishi Chemical Co.¹, Kasei Optonix², Tokyo University of Fisheries³)

○Toshie Harazono¹, Ryuji Adachi², Tokuko Watanabe³

^{89}Y MAS (Magic angle spinning) NMR has been investigated to study the local environment of Y sites in a red phosphor, Eu doped- Y_2O_2S (Eu- Y_2O_2S). Assignment of the resonances to different Y local environments was made on the basis of signal intensities, chemical shifts, and spin-lattice relaxation times in conjugation with the crystal structural data which was obtained by a Rietveld method. Besides the main peak in pure Y_2O_2S , four peaks caused by Y^1 -Eu species and ten peaks caused by Eu- Y^1 -Eu species, where one and two of fifteen next neighboring Y atoms are substituted by Eu, respectively, were distinguished in Eu- Y_2O_2S . Y atoms (Y^n ($n \geq 2$)) which are farther from second and more nearest neighboring from Eu were observed at the same resonance position for all samples investigated with that of pure Y_2O_2S .

著者らはテレビのブラウン管用赤色蛍光体として用いられているEuドーブ- Y_2O_2S ($Y_2O_2S:Eu$)の物性を ^{89}Y -MAS NMRを用いて調べている。第36回NMR討論会で、Euをドーブした時に現れる新たな4本のシグナルは、最近接Y原子を1個のEu原子で置換した、Eu(-O-, -O-)Y, Eu(-S-, -S-)Y, Eu(-O-, -S-)Y, Eu-S-Yに帰属されることを報告した。¹⁾ 今回、Euの濃度の濃いサンプルで現れる10本のシグナルが、最近接Y原子を2個のEu原子で置換されたYに帰属されたので、報告する。 ^{89}Y は天然存在比100%、核スピンの、 $I = 1/2$ 、であるにもかかわらず、共鳴周波数が4.9 MHz (H:100MHz)、¹Hに対する相対感度が 1.18×10^{-4} と感度の低い低周波数核であり、また、緩和時間が長い(数時間)。

試料及び測定方法：本研究で用いた試料は従来の方法で作成した。²⁾ 不純物濃度はSeiko-SPS-1200A ICP とRigaku 3370 蛍光X線で定量した。不純物は、すべて1ppm以下の濃度で

^{89}Y MAS NMR, Eu, Y_2O_2S , Euドーブ- Y_2O_2S ,

○はらぞの としえ・あだち りゅうじ・わたなべ とくこ

あった。 Y_2O_2S の単結晶は、これまでに作られていないため、結晶構造はRIGAKU RINT-1500 X線回折装置を用いたリートベルト法で決定した。³⁾ 固体NMRの測定はBruker社製MSL-300固体NMR装置に低周波数用CP-MASプローブを装着して行なった。測定条件は以下の通りである。共鳴周波数：14.706MHz, 90°パルス：11 μ s、回転数：5000 rps、0 ppm: 1.5 M $Y(NO_3)_3$ 水溶液、デットタイム：150 μ s、くり返し時間：1000 - 150000 s。

結果、及び、考察：

Y_2O_2S は図1に示した様な六方晶系の結晶構造をしている。この中でYは C_{3v} の対称性を持ち、3個のSと4個のOと結合している。リートベルト法により求めたY-Yの距離、個数、及び、結合様式を表1に示した。³⁾ ここで、 Y^1 は Y^0 に対して第1(最)近接Y、 Y^2 は第2近接Yに対応する。 Y^0 をEuで置換した時の結晶図を図2に示した。図の中に示されている数字は表1の Y^0 をEuで置き換えた時の \underline{Y} に対応している。図3はEu濃度が1.0mol%のサンプルの⁸⁹Y MAS NMRスペクトルである。ピーク①、②、④、⑤はスピン-格子緩和時間、 \underline{Y} の個数、 $Y^0-\underline{Y}$ の距離より、それぞれ $Y^1(-O,-O)Eu$ 、 $Y^1(-S,-S)Eu$ 、 $Y^1(-O,-S)Eu$ 、及び、 Y^1-S-Eu と帰属され、③は、Euから見て第2近接以上のYに帰属された。^{1, 3)} 一方、Eu濃度が高いサンプルでは、図3に示した(a)から(j)の10本のピークが現れる。これらのシグナルは、常磁性シフトの加成性 (Δ をメインピークからのシフト差とすると、 $\Delta(Eu(-O,-O)Y^1(-O,-O)Eu) = \Delta(Y^1(-O,-O)Eu) + \Delta(Y^1(-O,-O)Eu)$) とスピン-格子緩和速度の加成性 ($1/T_1(Eu(-O,-O)Y^1(-O,-O)Eu) = 1/T_1(Y^1(-O,-O)Eu) + 1/T_1(Y^1(-O,-O)Eu)$) から、高周波数側より $Eu(-O,-O)Y^1(-O,-O)Eu$ 、 $Eu(-O,-O)Y^1(-S,-S)Eu$ 、 $Eu(-S,-S)Y^1(-S,-S)Eu$ 、 $Eu(-O,-O)Y^1(-O,-S)Eu$ 、 $Eu(-O,-S)Y^1(-S,-S)Eu$ 、 $Eu-S-Y^1(-O,-O)Eu$ 、 $Eu-S-Y^1(-S,-S)Eu$ 、 $Eu(-O,-S)Y^1(-O,-S)Eu$ 、 $Eu(-O,-S)Y^1-S-Eu$ 、及び、 $Eu-S-Y^1-S-Eu$ と帰属された。なお、Euが3個置換した Y^1 種は観測されなかった。

References

- 1) 原園、安達、渡部、第36回NMR討論会要旨集、p. 67、駒場エミナース、1997.
- 2) 蛍光体ハンドブック、p.171、蛍光体同学会編、オーム社、1987.
- 3) T. Harazono, R. Adachi, N. Kijima, T. Watanabe, Bull. Chem. Soc. Jpn., in press.

Table 1. The type of the bridge between Y^0 and Y , the interatomic distance of $Y^0 - Y$, and the number of Y .

No. of Y	$Y^0 - Y$ bond	(1)	(2)
1	$Y^0(-O,-O)Y^1$	3.61	3
2	$Y^0(-S,-S)Y^1$	4.31	3
4	$Y^0(-O,-S)Y^1$	3.78	6
5	Y^0-S-Y^1	5.73	3
6	$Y^0(-O,-S)Y^1(-O,-O)Y^2$ $Y^0(-O,-O)Y^1(-O,-S)Y^2$	5.23	3
7	$Y^0(-O,-S)Y^1(-O,-O)Y^2$ $Y^0(-O,-O)Y^1(-O,-S)Y^2$	6.46	6
8	$Y^0-S-Y^1(-S,-S)Y^2$ $Y^0(-S,-S)Y^1-S-Y^2$ $Y^0(-O,-O)Y^1(-O,-O)Y^2$ $Y^0(-O,-S)Y^1(-O,-S)Y^2$	6.55	6
9	$Y^0(-S,-S)Y^1(-O,-O)Y^2$	6.59	1
10	$Y^0(-O,-O)Y^1(-S,-S)Y^2$	6.59	1
11	$Y^0(-O,-S)Y^1(-S,-S)Y^2$ $Y^0(-S,-S)Y^1(-O,-S)Y^2$ $Y^0-S-Y^1(-O,-S)Y^2$	6.87	6
12	$Y^0-S-Y^1-S-Y^2$ $Y^0(-O,-S)Y^1(-O,-S)Y^2$	7.57	6
13	$Y^0(-O,-O)Y^1(-S,-S)Y^2$ $Y^0(-O,-O)Y^1-S-Y^2$	7.60	6
14	$Y^0(-S,-S)Y^1(-O,-O)Y^2$ $Y^0-S-Y^1(-O,-O)Y^2$	7.60	6
15	$Y^0(-O,-S)Y^1(-O,-O)Y^2$ $(-O,-S)Y^3$ $Y^0-S-Y^1-S-Y^2(-O,-O)Y^3$	8.39	6
16	$Y^0-S-Y^1(-O,-S)Y^2$ $Y^0(-O,-S)Y^1-S-Y^2$	8.71	6

(1) Distance of $Y^0 - Y / \text{\AA}$

(2) Number of Y

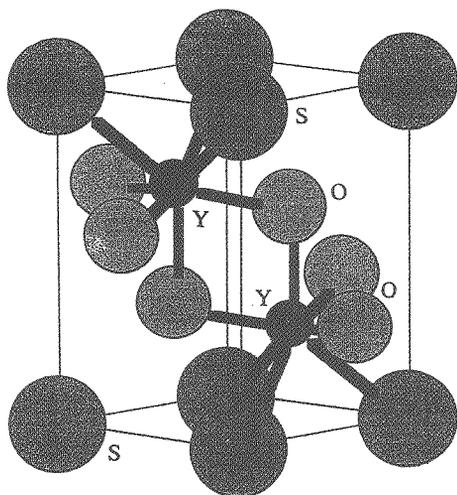


Fig. 1. Schematic crystal structure of Y_2O_2S unit cell.

Table 2. The bond style, the chemical shift, and T_1 of Y^1 .

Peak No.	Bond style of Y^1	(1)	T_1 / s
①	$Eu(O,O)Y^1$	367	18.2
②	$Eu(S,S)Y^1$	330	38.2
④	$Eu(O,S)Y^1$	231	34.4
⑤	$Eu-S-Y^1$	142	148.4
a	$Eu(O,O)Y^1(O,O)Eu$	454	/
b	$Eu(O,O)Y^1(S,S)Eu$	406	11
c	$Eu(S,S)Y^1(S,S)Eu$	368	/
d	$Eu(O,O)Y^1(O,S)Eu$	306	/
e	$Eu(O,S)Y^1(S,S)Eu$	267	16
f	$Eu(O,O)Y^1-S-Eu$	216	/
g	$Eu(S,S)Y^1-S-Eu$	176	43
h	$Eu(O,S)Y^1(O,S)Eu$	168	/
i	$Eu(O,S)Y^1-S-Eu$	75	27
j	$Eu-S-Y^1-S-Eu$	-11	/

(1) Chemical shift / ppm

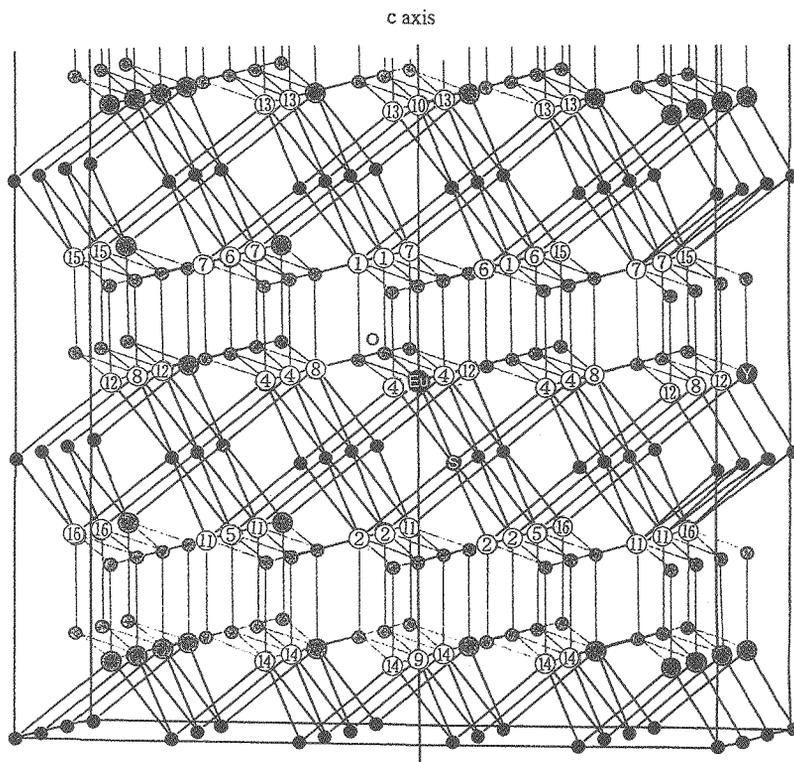


Fig. 2. Eu doped Y₂O₂S. The labeled symbolically 1, 2, 4, 5, ..., 16 are corresponding to the species with same No. indicated in Table 1.

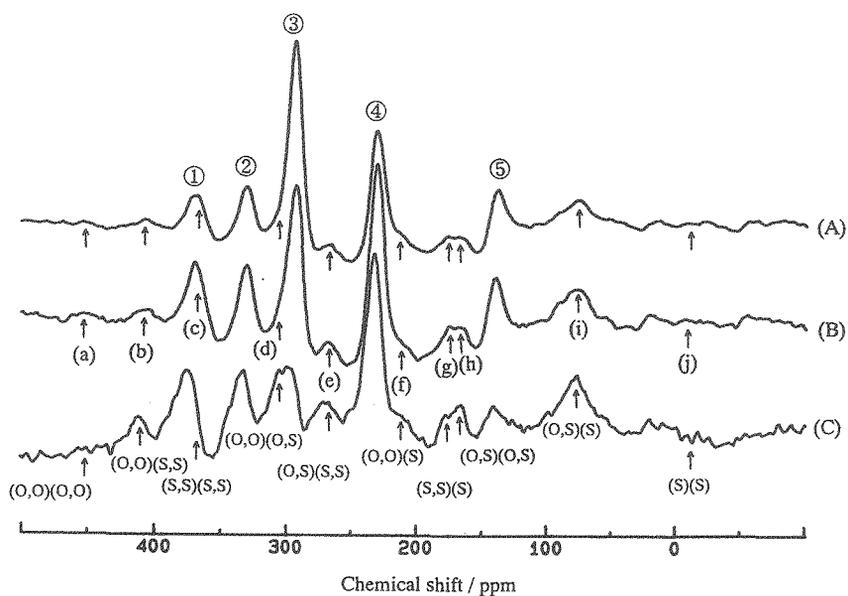


Fig. 3. The ⁸⁹Y MAS spectrum of Eu-Y₂O₂S with 10 mol% content of Eu. recycle time: (A); 249 s, (B); 50s, (C); 2s.

Pore Structure Analysis of Mesoporous Material (National Institute of Materials and Chemical Research) Xiulan Xie and Shigenobu Hayashi

Surface structure and pore size distribution of a mesoporous material FSM-16 have been studied. Concentration of surface hydroxyl groups for FSM-16 is estimated from ^{29}Si and ^1H MAS NMR, which is about 3.2 nm^{-2} . O_2 molecules contribute to ^{29}Si spin-lattice relaxation of Q^2 and Q^3 as well as Q^4 , suggesting thin wall thickness. ^1H MAS NMR spectra indicate the presence of isolated and hydrogen-bonded hydroxyl groups, both of which are silylated. A rather homogeneous spatial distribution of surface hydroxyl groups is demonstrated by the analysis of the line width in ^1H static spectra. Pore size and pore wall thickness are determined by ^1H NMR measurements on water saturated FSM-16 samples, which are in good agreement with literature values obtained by N_2 adsorption isotherms and TEM on a similar sample. In benzene saturated samples, a non-freezing surface layer of benzene is much thicker than that of water, which indicates a stronger interaction between benzene and the FSM-16 surface.

Introduction Mesoporous materials such as FSM-16 and MCM-41 have highly-ordered cylindrical channels, the diameter of which is of the order of nanometer. Since no materials had the ordered mesopores of the above size before the discovery of FSM-16 and MCM-41, those mesoporous materials have attracted much attention. Detailed structural knowledge of these materials is limited, because they are non-crystalline in an atomic scale, although they have a long-range order.

In the present work, we have studied surface structures and pore size distributions in FSM-16 by means of NMR. ^{29}Si and ^1H MAS NMR and surface silylation are applied to the surface studies, while pore size distributions are determined from the freezing/melting behavior of confined H_2O and C_6H_6 .

Experimental A FSM-16 sample was supplied by Toyota Central R&D Labs. with a code LS10-550 (calcined at 823 K, and named FSM-16(T)). Trimethylsilylation of FSM-16(T) was carried out using chlorotrimethylsilane and hexamethyldisiloxane at room temperature for 18 h with stirring under N_2 . The sample after silylation was named silyl-FSM-16.

NMR measurements were carried out by Bruker ASX400, MSL400 and ASX200 spectrometers with static magnetic field strengths of 9.4, 9.4 and 4.7 T, respectively. ASX400 was used for the measurements of ^{29}Si MAS spectra (with Larmor frequency of 79.50 MHz), MSL400 for ^1H MAS spectra (400.14 MHz), and ASX200 for ^1H static spectra (200.13 MHz).

^1H NMR、Mesoporous Material、FSM-16、Confined molecule、Pore size distribution

しー しゅーらん・はやし しげのぶ

Results and Discussion

1. Solid state NMR

Concentration of surface hydroxyl groups for FSM-16 is estimated from quantitative analyses of ^{29}Si and ^1H MAS NMR spectra, which is about 3.2 nm^{-2} . The concentration of surface hydroxyl groups obtained through ^{29}Si NMR is not affected by surface adsorbed H_2O , and then more reliable than those extracted from the weight loss in the TG analyses and from ^1H MAS NMR. In silyl-FSM-16 the silylated fraction of the hydroxyl groups is 47%, and the concentration of the trimethylsilyl (TRMS) group is 1.5 nm^{-2} .

O_2 molecules play an important role in ^{29}Si relaxation, similarly to the relaxation in zeolites. Mobile surface protons such as H_2O and methyl groups also contribute to the relaxation as well as paramagnetic impurities such as Fe^{3+} do. The fact that T_1 of Q^4 becomes shorter with O_2 introduction indicates that the wall is not very thick, since most of the Q^4 sites locate inside the pore wall.

^1H MAS NMR spectra indicate the presence of isolated and hydrogen-bonded hydroxyl groups. The surface silylation reduces the signal intensity in both the isolated and hydrogen-bonded hydroxyl groups.

The analysis of the line width in ^1H static spectra demonstrates that surface hydroxyl groups are homogeneously distributed in FSM-16(T).

2. ^1H liquid-state NMR

2.1. H_2O adsorption

Adsorption was carried out by sealing the samples with a ratio of 0.08 g of H_2O to 0.05 g of the original sample. ^1H NMR spectra were recorded before and after freezing the outside-pore solvent to estimate the amount of the inside-pore species. H_2O adsorption capacity is approximately 0.9 g/g for FSM-16(T) and 0.3 g/g for silyl-FSM-16. The relatively low H_2O adsorption capacity for silyl-FSM-16 means its hydrophobic surface.

Fig. 1 shows ^1H liquid-state NMR signal intensity of the H_2O saturated FSM-16(T) sample as a function of temperature for one cooling (open

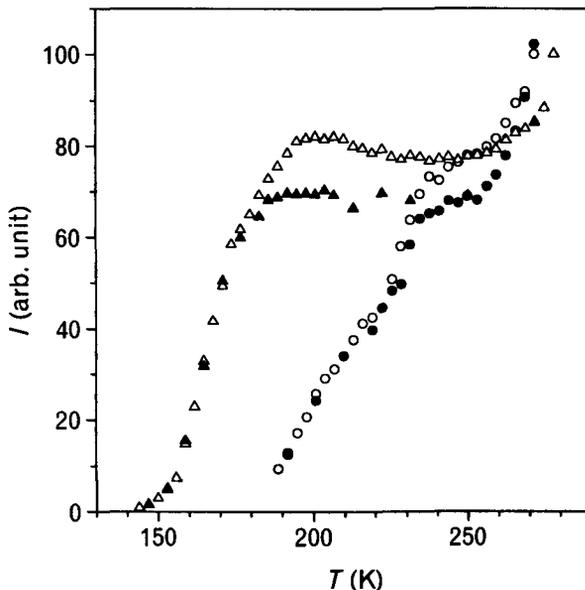


Fig. 1. ^1H liquid-state NMR signal intensity of pore H_2O (\circ , \bullet) and benzene (\triangle , \blacktriangle) as a function of temperature in FSM-16(T) saturated with H_2O and benzene, respectively, measured at $\nu_L=200.13 \text{ MHz}$. Open marks (\circ , \triangle) and solid marks (\bullet , \blacktriangle) correspond to cooling and re-warming of the sample, respectively.

circles)-warming (solid circles) cycle. The curves show characteristic behavior of confined water, having two distinguished regions. In the region I, the curve shows hysteresis upon cooling and re-warming. This hysteresis effect is typical for a freezing phenomenon in which a part of water becomes ice. In the region II, the magnetization decreases smoothly with decreasing temperature without hysteresis effects, and this region corresponds to the temperature response of non-freezing surface layer. The dI/dR_p curves for pore size distributions are depicted in Fig. 2. Filled marks correspond to the

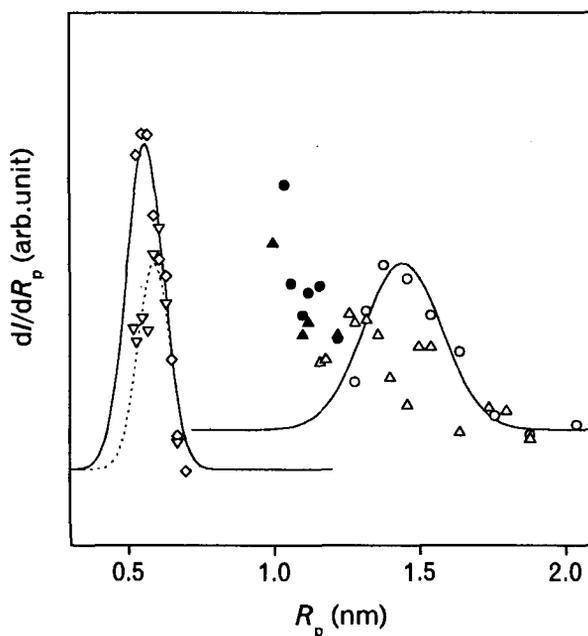


Fig. 2. Pore size distributions in FSM-16(T) (\circ , \bullet) and silyl-FSM-16 (\triangle , \blacktriangle), determined from ^1H liquid-state NMR of the H_2O saturated samples. Corresponding results determined from ^1H liquid-state NMR of the C_6H_6 saturated samples are also plotted as a function of the effective pore radius for FSM-16(T) (\diamond) and silyl-FSM-16 (∇). Lines are fittings to the data points indicated by open marks, while the data points with solid marks correspond to signals of the non-freezing surface layer.

non-freezing surface layer. Open marks correspond to the free pore water, and they are used for analysis.

The pore radii R_p are 1.47 nm for FSM-16(T), while the pore wall thickness are 1.34 nm. FWHMs of the pore size distribution are about 0.31 nm for FSM-16(T).

The pore size distribution in silyl-FSM-16 is rather broad and might contain two peaks at 1.3 and 1.5 nm.

The width of the distribution is about 0.5 nm. The pore wall thickness is in the range 1.7 ~ 1.3 nm. The silylated fraction is 47%. The pore size and the pore wall thickness remains almost unchanged at the place where no silylation takes place, whereas the pore radius is reduced to 1.3 nm and the pore wall thickness is increased to 1.7 nm for the silylated portion. Surface silylation causes a reduction in the pore radius of approximately 0.2 nm.

2.2. C_6H_6 adsorption

C_6H_6 adsorption capacities are about 1.0 and 0.8 g/g for FSM-16(T) and silyl-FSM-16, respectively. The ^1H liquid-state NMR signal intensity is plotted in Fig. 1 for the C_6H_6 saturated FSM-16(T) sample also. The curves show behavior similar to that of confined water, *i.e.*, two distinguished regions are observed,

where the region *I* has hysteresis effect involving a phase transition at 183 K and the region *II* represents a non-freezing surface layer of C_6H_6 . The effective pore size distribution is plotted in Fig. 2.

A non-freezing surface layer of C_6H_6 has a thickness of 0.91 nm in FSM-16(T), which is much thicker than that of H_2O . This fact indicates a stronger interaction between benzene molecules and the FSM-16 surface. We have observed similar phenomenon when cyclohexane is used.

In the case of silyl-FSM-16, the effective pore radius observed in the freezing/melting phenomenon of confined C_6H_6 is 0.59 nm, which agrees well with the value for FSM-16(T) (0.56 nm). Silyl-FSM-16 has a distribution in its pore size, as described above. The portion without surface TRMS groups has a non-freezing surface layer with a thickness of 0.9 nm, similarly to that of FSM-16(T). On the other hand, at the portion with TRMS groups, the non-freezing surface layer has a thickness of 0.7 nm, or the confined C_6H_6 does not freeze because of the small effective pore size.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Shinji Inagaki of Toyota Central R&D Labs. for providing us a FSM-16 sample. X. X. wishes to acknowledge the STA Fellowship given by the Science and Technology Agency of Japan.

抗癌薬ジフェニルヒダントイン結晶における
フェニル基の動的挙動と水素結合ネットワーク
(群馬大工) 横山貴司、○武田 定、丸田悟朗

Dynamic property of phenyl groups and hydrogen-bond network of
diphenylhydantoin in the crystalline phase as studied by solid-state ^2H - and
 ^{15}N -NMR

Takashi Yokoyama, *Sadamu Takeda*, Goro Maruta

Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma
376 8515, Japan

Dynamic property of phenyl groups and NHO hydrogen bond structure of diphenylhydantoin were investigated by solid-state ^2H NMR and ^{15}N CP/MAS NMR in the high and low temperature crystalline phases. Simulation of ^2H NMR spectrum indicated a quenching of 180° flip motion of the phenyl groups by increasing temperature at phase transition point. The activation energy of the motion is three times larger in the high temperature phase than in the low temperature phase. Change of hydrogen-bond network between the two crystalline phases was detected by ^{15}N CP/MAS NMR spectrum.

ジフェニルヒダントイン (Fig. 1) は抗癌薬として広く用いられているが、かさばったフェニル基の配向や運動性と水素結合がこの薬としての効力と関係するとも言われている。本研究では結晶相におけるフェニル基の動的挙動と NHO 水素結合構造との関係を重水素核固体 NMR と ^{15}N -CP/MAS NMR により調べた。

フェニル基を重水素化した試料と水素結合を作る窒素を ^{15}N で 99% エンリッチした試料は、それぞれ重水素化ベンズアルデヒド、 ^{15}N 尿素を原料として合成した。NMR 測定は 122~375 K の間で Bruker DSX300 を用いて行った。重水素核 NMR スペクトルは四極子エコー法により測定し、吸収線形のシミュレーションにより運動モードとその速さを決定した。

この結晶は 187 K で 1 次の構造転移をおこすが、低温結晶相でも温度上昇とともにフェニル基の運動が一旦速くなる。この運動はフェニル基の結合軸まわりの 180° フリップでほぼ説明でき、その活性化エネルギーは 7.4 kJ/mol と求められた。ところが転移点を越えると、この運動は 2 桁ほど遅くなる。さらに温度を上昇させると、この運動は再び速くなっていくという特異な挙動をすることが解った。この高温相での活性化エネルギーは 25.8 kJ/mol となり、低温相のそれに比べると 3 倍以上大きくなっている。 ^{15}N -CP/MAS NMR スペクトルには、高温相では分子内の異なる窒素原子に対応して -235 と -275 ppm (CH_3NO_2 基準) 近傍に 2 つの信号が現れるが、低温相ではそれぞれの信号が 4 ppm 程度分裂し、分裂した一方が明らかに広い線幅を示す。低温相での水素結合ネットワークの構造は単純ではなさそうであるが、この水素結合ネットワーク構造の変化とフェニル基の運動性の特異な変化とが連動している。

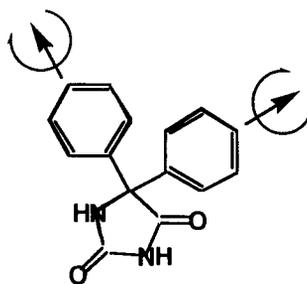


Fig. 1 Molecular structure of
diphenylhydantoin

ジフェニルヒダントイン、フェニル基の運動、重水素核
NMR、NHO 水素結合、 ^{15}N -CP/MAS NMR

よこやま たかし、たけだ さだむ、まるた ごろう

P104 水溶性チタンオキシカルボン酸錯体の¹³C-NMRによる評価 および複合酸化物合成への展開

(東工大・応セラ研) ○多田大、垣花真人
(東工大・資源研) 中村義之

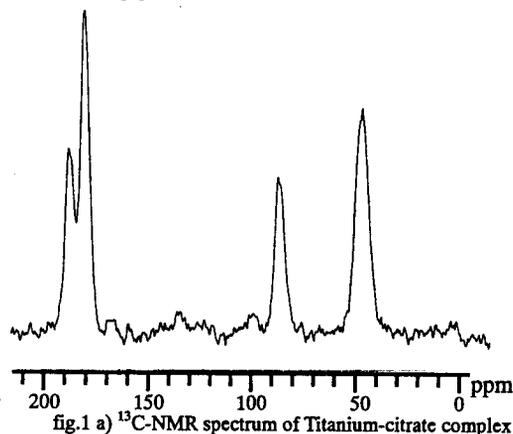
¹³C-NMR of a water-soluble titanium oxo-carboxylic acid complex
and its application towards the synthesis of functional
multi-component titanium oxides

(Materials and Structures Laboratory, Tokyo Institute of Technology)
○Masaru TADA and Masato KAKIHANA
(Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology)
Yoshiyuki NAKAMURA

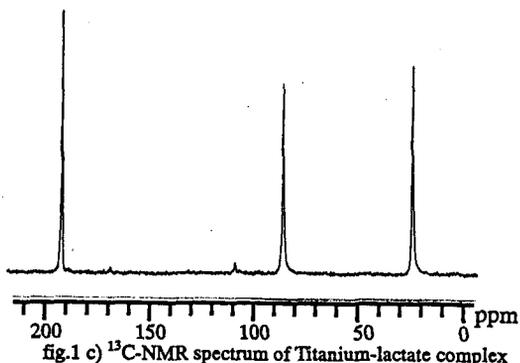
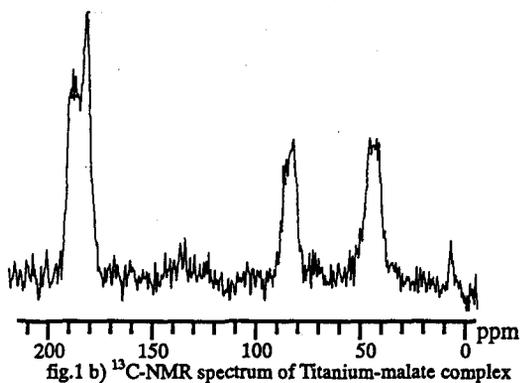
The water-soluble Ti oxo-carboxylic acid (lactic acid (LA) malic acid(MA) citric acid(CA)) complexes were successfully prepared. They were found to be highly resistant to hydrolysis. The ¹³C-NMR spectra of solids with various ratio of Ti/(LA,MA,CA) indicate formation of Ti-LA, Ti-MA and Ti-CA complexes. The ¹³C-NMR spectra of those compounds also let us suggest that those complexes form with a stoichiometry close to Ti:LA=1:2, Ti:MA=1:1 and Ti:CA=1:1 where alcohol group OH- in those acids was fully deprotonated to yield an alkoxide oxygen atom with a strong nucleophilic nature. Both Ti-CA and Ti-MA complexes were utilized for the synthesis of SrTiO₃ as an example.

BaTiO₃ や PbTiO₃ に代表されるチタンを含む複合酸化物は、強誘電性など電気的性質において種々の特性をもつ重要な工業材料として知られる。優れた電気的特性を得るためには、組織や組成を分子レベルで制御しなければならないので、近年いわゆるゾルーゲル法に代表される化学的プロセスを重視した溶液法の発展が目覚ましい。しかし、これらチタンを含む複合酸化物の合成の際に出発原料として用いられるチタンアルコキシドは、(1) 非常に不安定であり、空気中の水と容易に反応して加水分解する。さらに (2) 値段が非常に高いなど、実用的に難点があり工業化への展開を妨げている。近年、我々は水に対して高い溶解度を持ち、かつ加水分解に対して安定である新しいチタンクエン酸錯体の開発に成功した[1]。さらに最近、チタンリンゴ酸錯体及びチタン乳酸錯体の合成にも成功した。

水に対して安定なチタンオキシカルボン酸錯体を研究するため、クエン酸(CA)、乳酸(LA)、リンゴ酸(MA)でそれぞれ安定化させたチタンオキシカルボン酸化合物の固体¹³C-NMR測定を行った結果を、fig.1 a)-c) に示す。すべての化合物において85ppm付近にピークが見ら



キーワード：固体¹³C-NMR、オキシカルボン酸錯体
ただまさる、かきはなまさと、なかむらよしゆき



れる。Fig.2のようにこのピークは本来 75ppm 付近に現れる水酸基と結合している炭素に帰属されるものだが、水酸基から水素が解離することによりこのようなシフトが起きると報告されている[2]。上述の理由より、すべてのチタンオキシカルボン酸化合物の水酸基から水素が解離していることが判明した。さらに固体 ^{13}C -NMR 測定を行った結果、水酸基から水素が解離したことに起因するピーク (85ppm 付近) とそうでないピーク (75ppm 付近) の挙動から、ある特定のチタン-オキシカルボン酸比 (Ti:LA=1:2 Ti:MA=1:1 Ti:CA=1:1) で合成したサンプルに関しては単一相の錯体を得られていると予想された。また本研究では、コンデンサーや光触媒としても用いられている SrTiO_3 の合成をこれらの水溶性チタン錯体を用いて試みた。

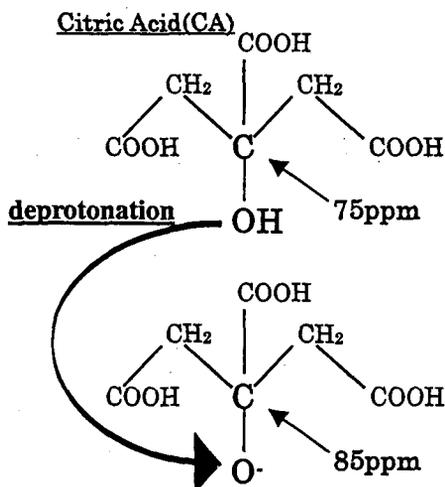


fig.2 relation between deprotonation and chemical shift

ex. citric acid

参考文献

- [1] 多田大, 垣花真人, 中村義之, 第 37 回 NMR 討論会講演要旨集 pp.382
- [2] Masato Kakihana, Tadashi Naguro, Makoto Okamoto, and Hidetake Kakihana, *Journal of Physical Chemistry*, [91] 6128 (1987)
- Masato Kakihana, Momoko Arima, and Yoshiyuki Nakamura, *Chemistry of Materials*, vol. 11, 2 pp.438-450

P105 REDOR 法による同位体ラベル絹シーケンスモデル 化合物の分子間配置の決定

(東京農工大工) ○亀田恒徳、中井利仁、数原順子、小松耕平、
中澤靖元、朝倉哲郎

Structural Analysis of Silk Fibroin Model Peptides Using REDOR Technique

T. Kameda, T. Nakai, J. Kazuhara, K. Komatsu, Y. Nakazawa,
and T. Asakura

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei,
Tokyo 184-8588, Japan,

The REDOR technique was applied to determination of Silk I structure of ^{13}C and ^{15}N double labeled silk model peptides, $(\text{Gly-Ala})_{12}$, and to determination of the intermolecular arrangement of the silk model peptides.

家蚕絹の繊維化前の構造は、Silk I と名付けられているが、単結晶はもとより、配向させることもできないため、構造解析は十分に進んでいない。^{1,2)} しかしながら、Silk I 構造の解明は、繊維化機構の解明と関連して、極めて重要である。さらに、絹の優れた物性発現は、絹分子鎖の配列制御と関連しており、絹分子鎖の分子間配置を決定することも、また研究の key となる。いずれも、絹に学ぶ新たな繊維の創成のための基礎となる。そこで、無配向系でも原子座標レベルの構造解析が可能な研究手法を用いて、解析を進める必要がある。ここでは、Silk I 型の ^{13}C , ^{15}N 同位体ラベル部位をかえた 2 4 量体 $(\text{Ala-Gly})_{12}$ を 4 種、合成（合成の詳細は、当研究室の別発表参照）し、REDOR による ^{13}C と ^{15}N 原子間距離の決定を通して Ala および Gly 残基の内部回転角を決定するとともに、絹分子鎖間配置の情報を得るために、GlyAlaGlyAlaGly の ^{13}C シングルラベルペプチドと ^{15}N シングルラベルペプチドの混合物について、REDOR 実験を行った。

なお、本研究は一部、生研機構基礎技術推進事業、および文部省科学研究費補助金によって行われた。

参考文献

- 1) T. Asakura, M. Iwadate, M. Demura, M. P. Williamson, *Int. J. Biol. Macro.*, **24**, 167 (1999).
- 2) SA. Fossey, G. Nemethy, KD. Gibson, HA. Scheraga, *Biopolymers*, **31**, 1529 (1991).

ペプチド、絹シーケンスモデル化合物、REDOR、分子間距離
かめだ つねのり なかい としひと かずはら じゅんこ こまつ こうへい
なかざわ やすもと あさくら てつお

(東京農工大) ○亀田恒徳

(ユタ大) G. McGeorge, A. M. Orendt, and D.M. Grant

Chemical Shift Tensor for Crystalline State of Valinomycin

Tsunenori Kameda[†], G. McGeorge[‡], A. M. Orendt[‡], and D. M. Grant[‡],[†]Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei,
Tokyo 184-8588, Japan,[‡]Department of Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA

Two different crystalline system, namely, triclinic and monoclinic, of valinomycin have been studied by ^{13}C CP-MAS NMR spectroscopy. Although the two modifications of the crystal are so remarkably similar, there are distinct differences in the isotropic chemical shift, δ_{iso} , between the two spectra. The chemical shift tensor components; δ_{11} , δ_{22} , and δ_{33} for the triclinic crystal were examined by the FIREMAT experiment. From the observed spectra, it was found that the behavior of δ_{iso} for *L*- and *D*-valine (Val) carbonyl carbons are predominately governed by the intermediate component, δ_{22} , independent of the *D* and *L* enantiomers. Moreover, it was found that the smallest shift component, δ_{33} , for *L*-lactic acid (Lac) and *D*- α -hydroxyisovaleric acid (Hyi) C_α -O carbon was significantly displaced depending upon the nature of individual amino acid residues, and the behavior of δ_{iso} for both *L*-Lac and *D*-Hyi C_α -O carbons was predominately governed by the δ_{33} component.

緒言

これまでの研究から、ペプチドおよびポリペプチド中のアミド基カルボニル炭素が示す化学シフトテンソルの主値は、水素結合構造およびアミノ酸残基の種類に関わりなく、 δ_{11} (ペプチド平面に平行で、かつC=O結合方向とほぼ垂直方向を向いている) と δ_{33} (ペプチド平面に垂直方向を向いている) の和がほぼ一定 ($\delta_{11} + \delta_{33} = 337.5\text{ppm}$) となることがわかっている[1]。その結果、等方平均化学シフト (δ_{iso}) の変化は δ_{22} (C=O結合方向とほぼ平行) によって支配されることが示された ($\delta_{\text{iso}} = (1/3) \times \delta_{22} + 112.5\text{ppm}$)。同様の傾向は、ポリペプチドのアミド ^{15}N にも見られ、 $\delta_{11} + \delta_{33}$ の和はPoly(β -benzyl *L*-aspartate)のコンホメーションに因らずほぼ一定であることが報告されている[2]。このような関係を詳細に検討することは、固体NMR化学シフトによる構造解析研究に役立つだけでなく、分子の電子構造を知る上でも興味もたれる。そこで本研究では、すでにX線回折法によって結晶構造が既知であるValinomycin (Fig. 1) を試料として用い、エステルカルボニル炭素、および C_α 炭素の化学シフトテンソルの主値を決定し、 δ_{iso} の挙動との関係を調べた。ValinomycinはVal, HyiおよびLac残基の計12個が環状に結合した化合物である。そのため、 ^{13}C NMRスペクトルは非常に多数のピークが出現し複雑になるため、通常の1次元NMRスペクトルでは同位体ラベルやスピニングサイドバンド法を用いても主値を正確に決定することは困難となる。そこで、近年、Aldermanらによって開発されたFIREMAT法[3]を導入して化学シフトテンソル主値を決定した。

化学シフトテンソル、FIREMAT、ペプチド、Valinomycin

かめだつねのり G. McGeorge A. M. Orendt D. M. Grant

実験

Valinomycin (Sigma Chemical Co.) をエタノール/水混合溶液、およびn-オクタン溶液中から結晶化することによって斜方晶、および単斜晶型の結晶を得た。これらの結晶粉末試料をCMX-400NMR (Chemagnetics) を用いて測定した。 ^{13}C 等方平均化学シフトは、TOSSおよびTPPMデカップリングを組み合わせたCP-MAS法によってスピニング速度4 kHzで観測した。また斜方晶試料について、 ^{13}C 化学シフトテンソルの主値をFIREMAT法を用いることによって決定した。

結果と考察

Fig.2には、斜方晶型を有するValinomycinの等方平均化学シフトスペクトルおよびFIREMAT法で測定したサイドバンドスペクトルを示した。サイドバンドスペクトルは、Val残基のカルボニル炭素、およびHyi、Lac残基の C_α 炭素についてのみ示した。これらのサイドバンドスペクトルから化学シフトテンソルの主値を決定した。LおよびD-Val残基カルボニル炭素の δ_{22} ($\text{C}=\text{O}$ 結合方向を向いている)を δ_{iso} についてプロットしたところ直線関係が見られ、また δ_{11} と δ_{33} の和は、すべてのVal残基についてほぼ一定であった。このことから δ_{iso} の挙動は主に δ_{22} が支配しているといえる。さらに、HyiおよびLac残基の C_α 炭素については、 δ_{33} と δ_{iso} との間に直線関係が見られ、 δ_{11} と δ_{22} の和は残基の種類と無関係に、ほぼ一定であった。以上の結果から、Val残基のエステルカルボニル炭素、およびHyiおよびLac残基の C_α 炭素についても、アミド基カルボニル炭素やアミド窒素に見られた傾向と同様に、 δ_{iso} の挙動は3つの主値の1つが優先的に支配し、それ以外の2つの主値の和はほぼ一定となり δ_{iso} の挙動には影響を与えないことがわかった。

参考文献

- 1) T. Kameda et al., *J. Mol. Struct.* **384**, 17 (1996).
- 2) M. Ashikawa, et al., *Macromolecules* **32**, 2288 (1999).
- 3) D.W. Alderman et al., *Mol. Phys.*, **95**, 113 (1998).

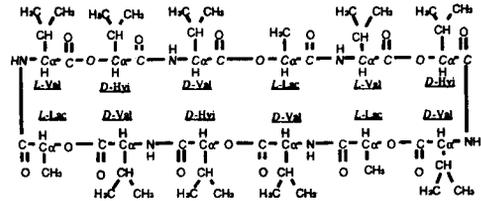


Fig.1 Spectra obtained by Fourier transforming a ^{13}C 2D FIREMAT spectrum of Valinomycin forming triclinic. (a)

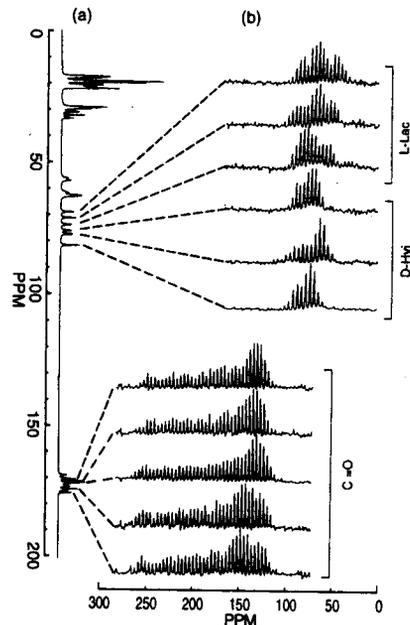


Fig.2 Spectra obtained by Fourier transforming a ^{13}C 2D FIREMAT spectrum of Valinomycin forming triclinic. (a) Replicated projection of the 2D spectrum onto the evolution axis (guide spectrum). (b) Acquisition dimension slice corresponding to the eleven peaks.

Structural Analysis of Boron Compounds using ^{11}B -MQMAS-NMR
 Nippon Steel Corporation^[1], JEOL Ltd.^[2] ○Koji Kanehashi^[1], Koji Saito^[1],
 Hisashi Sugisawa^[2]

The ^{11}B -MQMAS(Multiple Quantum Magic Angle Spinning)-NMR method was applied to the structural analysis of B_4C and BN. Chemical structural information about B_4C and BN, that eliminated the second-order quadrupolar interaction completely, was obtained. The chemical shift was calculated by means of the isotropic shift and the center of balance on the MAS shift. The quadrupolar coupling constant was evaluated using the chemical shift and the isotropic shift. As a result, the ^{11}B dipole-dipole interaction was concluded to be more dominant than the quadrupolar interaction for B_4C .

Three peaks were observed in BN when ^{11}B -MAS-NMR was used. As a result of measurement with MQMAS-NMR in BN, only one peak existed. So it has been found that BN is strongly affected by the quadrupolar interaction.

【緒言】

炭化ホウ素(B_4C)は高強度、高耐熱性などの特徴を有することから、研磨剤や原子炉の制御材として用いられており、 ^{11}B -NMR および ^{13}C -NMR による構造解析がこれまで盛んに行われてきた^{1)~5)}。特に ^{11}B -NMR に関して、 ^{11}B 核の核四極子結合定数(e^2qQ/h)が得られており、線幅の広がり核四極子相互作用よりも ^{11}B 同核双極子相互作用が支配的であるとの考察がなされている⁵⁾。しかし、それらの結果は 2 次の核四極子相互作用を含んでいるため、直接的な証拠ではなかった。この問題を克服する方法として、DOR、DAS の他に MQMAS-NMR が Frydman⁶⁾により提案されている。今回我々は B_4C および BN に対して、通常の MAS プローブでの測定が可能な MQMAS-NMR を適用した。MQMAS 測定条件を最適化し、2 次の核四極子相互作用を完全に消去することによって、いくつかの興味深い結果が得られたので報告する。

【実験】

一連の ^{11}B -NMR スペクトル測定には、Chemagnetic CMX-300(7.0 T, ^{11}B 観測周波数 96.4 MHz)分光器を使用した。 B_4C 、BN はそれぞれ電気化学工業(株)、昭和化学(株)から購入した。通常の MAS-NMR では、シングルパルス法を用いた。MQMAS-NMR においては、Hypercomplex シーケンスを適用し⁷⁾、純粋吸収スペクトルを得た。 B_4C および BN の $\pi/2$ パルスはそれぞれ 1.1 μs 、1.5 μs であり、MQMAS においては 3 量子励起パルス、1 量子変換パルス共に π あるいは 2π パルスを用いた。また、 B_4C に関しては、数 100 kHz に及ぶサイドバンドの影響を低減するために、回転速度とサンプリング速度の同期をとった。また、 ^{11}B -NMR の化学シフト基準は、 $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$ を 0 ppm とした。測定後の 2D-FID は傾いているため、Shearing 変換を行い、位相補正処理を行った。 B_4C の MQMAS 測定条件は以下の通りである。

- ・回転数；17 kHz
- ・データポイント； $32 \times 64(a \times b) \rightarrow 64 \times 128$ にゼロフィル
- ・パルス繰り返し時間；1 s ($T_1=0.4$ s)
- ・積算回数；60 回

^{11}B -MQMAS-NMR、核四極子相互作用、 B_4C 、BN

かねはしこうじ、さいとうこうじ、すぎさわひさし

【結果・考察】

Fig.1にB₄Cの¹¹B-MAS-NMRスペクトル(回転速度17 kHz)を示す。核四極子相互作用に起因するサイドバンドが500 kHz以上にわたり出現しており、ほぼ対称な1本のピークが観測された。

B₄Cの¹¹B-MQMAS-NMRスペクトルをFig.2に示す。B₄Cの結晶構造から推察すると、B-BおよびB-Cの2サイトのホウ素が存在するが、¹¹Bの2次の核四極子相互作用の影響を完全に排除した結果、1量子軸と同様に等方軸のスライスピークもほぼ対称な線形であったことから、異なる2つのBサイトは化学シフトがほぼ一致した、電子的に非常に似通った環境に存在していると考えられる。また、1量子軸と等方軸のクロスピークの線幅を比較したところ、等方軸のピークのほうがわずかにナローイングしていた。スケールリングファクターを考慮すると、等方軸のピークは1量子軸のピークに対して1/2程度の線幅になっていることが分かった。1量子軸の重心 ω_g および等方軸のシフト値 ω_{3M} から化学シフト値 $\Delta\sigma$ を計算すると、 $\Delta\sigma = -3.35$ ppmであった。この値を用いて四極子結合定数 $Cq (= e^2qQ/h)$ を求めた結果(過去の文献に従い、非対称因子 $\eta = 0$ とした⁸⁾)、 $Cq = 0.11$ MHzであった。この値はこれまでの文献値と同程度である¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾。

以上の結果より、B₄Cの¹¹B-NMRスペクトルの線幅の広がり、¹¹Bの核四極子相互作用よりもむしろ¹¹B-¹¹Bの双極子-双極子相互作用に起因していることが明らかとなった。

さらに発表当日は、BNについて同手法を適用した結果も併せて報告する。

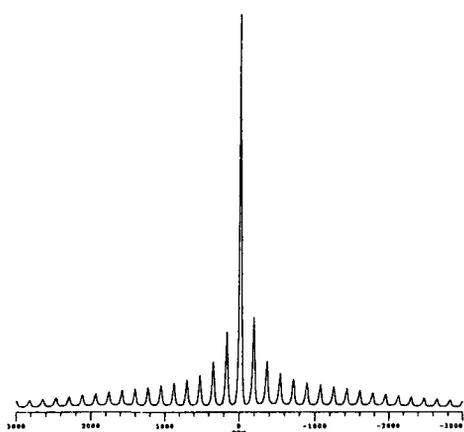


Fig.1 ¹¹B-MAS spectrum in B₄C (spinning at 17 kHz)

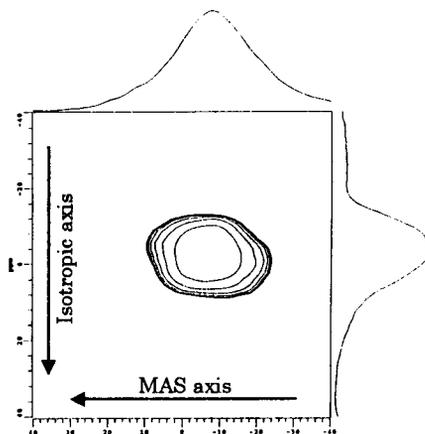


Fig.2 ¹¹B-MQMAS spectrum in B₄C (spinning at 17 kHz)

【文献】

- 1) A. H. Silver, *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 31 (1959) 247.
- 2) T. V. Hynes, *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 54 (1971) 5296.
- 3) R. J. Kirkpatrick, *et al.*, *AIP Conf. Proc.*, 231 (1991) 261.
- 4) J. Conard, *et al.*, *J. Less-Common Met.*, 117 (1986) 51.
- 5) T. Harazono, *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 69 (1996) 2419.
- 6) L. Frydman, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 5367.
- 7) D. Massiot, *et al.*, *Solid State NMR*, 6 (1996) 73.
- 8) M. H. Cohen, *et al.*, in *Solid State Physics*, edited by F. Seitz, *et al.*, (Academic Press, Inc., New York, 1957), Vol. 5.

Relationship between the Crystallization Rate of Amorphous Drugs and
Molecular Mobility Measured by the ^1H -NMR Relaxation Time

(National Institute of Health Sciences)

Yukio Aso, Sumie Yoshioka and Shigeo Kojima

The molecular mobility of amorphous nifedipine, phenobarbital and flopropione was assessed by ^1H nuclear magnetic relaxation measurement. As temperature increased, the marked decrease in the spin-lattice relaxation time in rotating frame ($T_{1\rho}$) of the amorphous drugs was observed. The $T_{1\rho}$ of nifedipine markedly started to decrease at a temperature about 10°C below the T_g , whereas the $T_{1\rho}$ of phenobarbital started to decrease at a temperature 10°C above the T_g , suggesting that the molecular mobility of nifedipine is higher than that of phenobarbital. This speculation was supported by the finding that solid echo decay signal of nifedipine was described by a sum of Gaussian decay process and Lorentzian decay process even at temperatures below T_g , supporting the speculation. The higher molecular mobility of nifedipine indicated by NMR relaxation measurement was consistent with the higher crystallization rate of nifedipine below the T_g .

はじめに

水に難溶性の医薬品を非晶質化することによりその溶解速度や生物学的利用率を改善する試みが広く行われている。このような医薬品では化学的な安定性ととも、結晶化のような物理的な安定性についても考慮しなければならない。非晶質の医薬品や添加剤を含有する医薬品の化学的、物理的不安定性は結晶に比べ非晶質固体が高い分子運動性を有するためと考えられており、分子運動性を評価することは結晶化などの医薬品の安定性を予測する上で非常に重要と考えられる。ここでは、非晶質ニフェジピン、フェノバルビタール、フロプロピオンの3モデル医薬品の ^1H NMR 緩和時間の温度依存性の違いに基づいて、ガラス転移温度以下の温度において他の2つの医薬品より速やかに結晶化するニフェジピンがより高い運動性を持つことを明らかにし、NMR 緩和時間によって測定される分子運動性が医薬品の安定性予測に有用であることを明らかにした。

実験

 ^1H NMR による緩和時間の測定

結晶ニフェジピン、フェノバルビタール、あるいはフロプロピオン 0.6g を外径 10mm の NMR 試料管に入れ、 $180\sim 190^\circ\text{C}$ に約 15 分間保ち融解した後、液体窒素に入れ冷却し、非晶質化した。 T_1 、 $T_{1\rho}$ および T_2 を JNM-MU25 スペクトロメータ (日本電子) を用いて測定した。 T_1 の測定は

キーワード：運動性、結晶化、非晶質

あそゆきお、よしおかすみえ、こじまげお

inversion-recovery 法、 T_2 の測定は solid echo 法によって測定した。 $T_{1\rho}$ は 10Gauss のスピニング強度で測定した。

結晶化速度の測定

非晶質医薬品はモデル 2920 型 DSC(TA インストルメント)のなかで融解急冷することによって調製した。結晶ニフェジピン、結晶フェノバルビタールあるいは結晶フロプロピオン約 5 mg を DSC のサンプルパンにはかり、ピンホールをあけたふたでシールした。サンプルパンを差走査熱量計(DSC, TA2920, TA Instrument)にセットし、融解した後、約 $-40^\circ\text{C}/\text{min}$ で -40°C まで冷却した後、 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ で室温まで昇温した。サンプルパンを速やかに五酸化リンの入った容器に移し、一定温度(5~ 75°C)の恒温槽に入れ保存した。保存した試料について -40°C まで冷却し $20^\circ\text{C}/\text{min}$ の昇温速度で DSC サーモグラムを測定した。 $120\sim 140^\circ\text{C}$ に見られる結晶化に基づく発熱ピークから結晶化熱を測定した。

結果および考察

非晶質ニフェジピン、フェノバルビタール、フロプロピオンの $T_{1\rho}$ は Fig. 1 に示すように T_g 付近の温度で急激に変化した。ニフェジピンでは T_g より約 10°C 低い温度から $T_{1\rho}-T_g/T$ プロットの傾きが変わり始めるのに対し、フェノバルビタールでは T_g より 10°C 高い温度でプロットの傾きが変わり始めた。ソリッドエコーパルスシーケンスを用いて測定したフェノバルビタールやフロプロピオンのエコーの減衰は T_g 以下の温度ではガウス型の減衰を示し、 T_g より高い温度でガウス型とロレンツ型の減衰の和であらわされたのに対し、ニフェジピンプロトンのソリッドエコーの減衰信号は T_g 以下の温度であってもガウス型とロレンツ型の減衰の和であらわされた。これらの結果はニフェジピンが T_g 以下の温度においてフェノバルビタールやフロプロピオンより大きな分子運動性をもつことを示すものと考えられる。

DSC において観測される結晶化熱と保存時間の関係を Avrami-Erofeev 式に当てはめて算出した非晶質医薬品の結晶化速度の温度依存性は Fig. 2 に示すように薬物によって異なった。ニフェジピンは T_g より 40°C 低い 5°C においても結晶化が観測されたのに対し、フェノバルビタールやフロプロピオンの場合、 T_g より $20\sim 30^\circ\text{C}$ 低い温度で通常の実験時間スケールでは測定が困難なほど結晶化速度が小さくなった。 T_g 以下の温度領域における医薬品の結晶化速度の違いは NMR 緩和時間の測定から示された分子運動性の差によって説明することができると考えられ、NMR 緩和時間によって測定される分子運動性が医薬品の安定性予測に有用であることが明らかとなった。

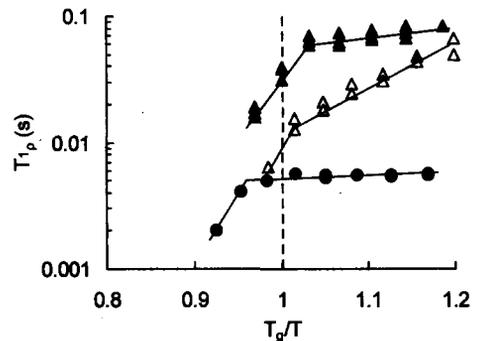


Fig. 1 $T_{1\rho}$ of amorphous nifedipine (\blacktriangle), phenobarbital (\bullet) and flopropione (\triangle) as a function of scaled temperature, T_g/T

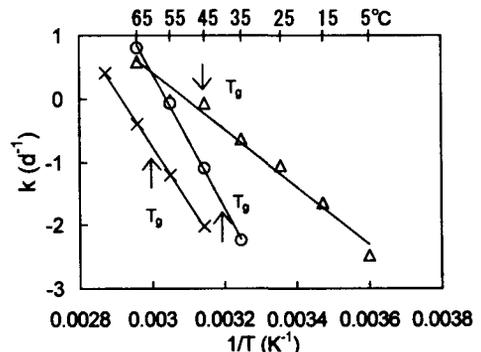


Fig. 2 Temperature dependence of crystallization rate
 \triangle nifedipine, \circ phenobarbital, \times flopropione

P109 ^1H , ^{11}B , ^{13}C , ^{29}Si NMR法による熱硬化性樹脂カルポラン複合 含ケイ素ポリマーの熱硬化メカニズムの解析

○木村英昭¹、沖田晃一¹、一谷基邦²、岡田和廣²、杉本俊哉²
(化学技術戦略推進機構¹, 積水化学工業²)

Thermosetting Mechanism Study of Organosilicon Polymer Containing Carborane by ^1H , ^{11}B , ^{13}C , ^{29}Si NMR Spectroscopy

Hideaki Kimura¹, Kouichi Okita¹, Motokuni Ichitani²,

Kazuhiro Okada² and Toshiya Sugimoto²

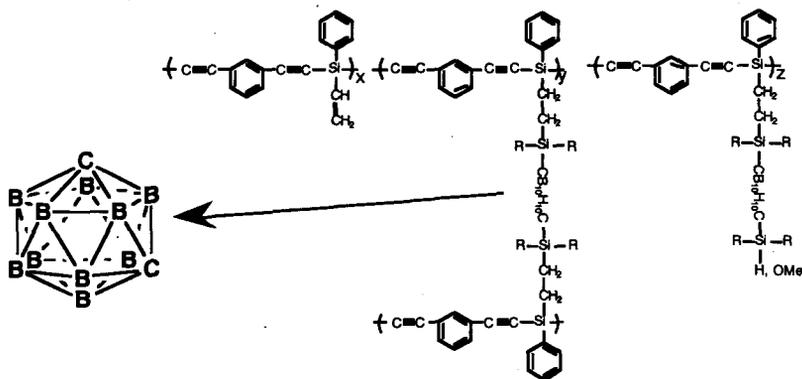
(Advanced Materials Lab., Japan Chemical Innovation Institute¹, and Sekisui Chemical Co., Ltd.)

Abstract: The thermosetting mechanism of an organosilicon polymer containing carborane has been studied utilizing the solid-state and high-resolution ^1H , ^{11}B , ^{13}C , and ^{29}Si NMR method.

The polymer having $\text{C}=\text{C}$ bonds in the main chain and $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{Si}-\text{H}$ bonds, and carborane in the bulky side chain, shows a very highly thermal stability in air by curing. From ^1H , ^{13}C , and ^{29}Si NMR spectra of the polymer, it was found that the intermolecular cross-linking reactions of the polymer was due to (1) the diene reaction between $\text{Ph}-\text{C}=\text{C}$ and $\text{C}=\text{C}$ and (2) the addition reaction between side chain terminal and $\text{Ph}-\text{C}=\text{C}$ and between $\text{CH}=\text{CH}_2$ and $\text{Si}-\text{H}$, and a very highly thermal stable structure is formed.

含ケイ素高分子は高耐熱性を示すことが知られている。特に、MSP [$-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{Si}(\text{Ph})\text{H}-$]_n は実用的応用が検討され、その熱硬化機構は当研究所において黒木らが固体NMRを用いて明らかにした^{1,2)}。

我々は、さらに耐熱性に優れた性質をもつ含ケイ素高分子材料の開発をめざし、化学式(1)に示すようなポリマーを合成した³⁾。



化学式(1)

キーワード： ^1H , ^{11}B , ^{13}C , ^{29}Si NMR、耐熱・難燃性ポリマー、架橋構造

きむらひであき おきたこういち いちたにもとくにおかだかずひろ すぎもととしや

このポリマーの硬化反応には主鎖のC=C結合と側鎖のビニル基が重要であると推定される。しかし、その詳細な架橋反応機構について、特に、ビニル基が架橋にどのように関与するかについては全く確証がなく不明である。

そこで本研究では、カルボラン複合ケイ素ポリマーの熱硬化構造の解析を固体高分解能 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{29}Si NMR法及び2次元 ^1H - ^{13}C シフト相関NMR法により行った。

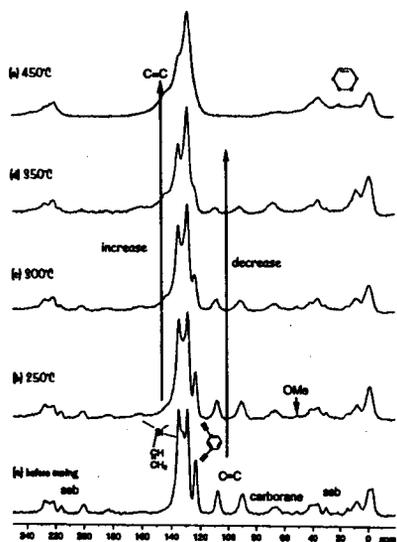


Figure 1. 75.6 MHz ^{13}C CP/MAS spectra of organosilicon polymer containing carborane cured at various temperatures: (a) before curing; (b) 250°C; (c) 300°C; (d) 350°C; (e) 450°C

Fig. 1にこのポリマーの ^{13}C CP-MAS NMRスペクトル及び帰属を示した。C=C結合の信号が処理温度と共に減少し、450°Cまでには完全に消失している。それに対して、C=C結合の信号は処理温度と共に増大している。また、2次元 ^1H - ^{13}C シフト相関NMR法によって帰属が確認されたビニル基の信号も処理温度と共に減少する一方で、メチレン領域(19.8 ppm)に新たな信号が出現している。メチレン基の生成は、 ^1H NMRスペクトルからも確認できる。これらの結果から、主鎖のC=C結合と側鎖のビニル基及び側鎖のビニル基同士の付加反応があると考えられる。この反応では、分子中にシクロヘキセン環が形成される推定される。

^{13}C CP-MAS+Dipolar Dephasing NMRスペクトルからは、ナフタレンの4a, 8a炭素の信号が観測された。この結果から、主鎖のC=C結合同士のジエン反応が起こり、分子中にナフタレン環が形成されたと推定される。

この2つの硬化反応の結果、高い熱安定構造が作られると結論した。どちらの反応も、150°C以下では進行せず、特に250°C~450°Cの熱処理温度で進行し、450°Cまでには完全に終了する。

謝辞 本研究は、産業技術開発制度の一環として、財団法人化学技術戦略推進機構が新エネルギー産業技術総合開発機構から委託を受けて実施したものである。

文献

- 1) S. Kuroki, K. Okita, T. Kakigano, J. Ishikawa, and M. Itoh, *Macromolecules* **31**, 2804, (1998).
- 2) 黒木重樹, 柿ヶ野武明, 石川淳一, 伊藤正義, 沖田晃一, 高分子論文集, **54**, 229 (1997)
- 3) M. Ichitani, K. Yonezawa, K. Okada, and T. Sugimoto, *Polymer Journal* in press.

High Temperature Imaging Probe

○Yoshiaki Yamakoshi¹, Ken-ichi Hasegawa¹, Koji Saito²¹JEOL Ltd. AKISHIMA-CITY, TOKYO, JAPAN²NIPPON STEEL CORPORATION ADVANCED TECHNOLOGY RESERCH LABORATORIES,
FUTTSU-CITY, CHIBA, JAPAN

A high temperature micro-imaging probe was developed for material science, in particular for polymer. It is very interesting subject to observe the morphology of polymer materials around the glass transition temperature, TG.

We have designed a special high temperature micro-image probe for 400 WB Super conducting magnet-NMR system to observe the polymer like coal which has TG, more than 400 °C.

Its specifications are as follows.

1. Sample tube size is 5mm O.D.
2. Maximum sample temperature is more than 500 °C.
3. Maximum field gradient strength is 240 G/cm.

This imaging probe is composed of High Temperature probe and Field Gradient Coil

1. High Temperature Micro-imaging Probe

観測核 1H 専用、400WB 用 試料管径φ 5mm 高温プローブ部である。特に高温温度可変に特徴を持つ。最高試料到達温度は、500°Cである。Fig.1 にプローブの外観を示す。

fig.1のごとく、本プローブはFG コイルユニット内に収容し一体としてSCMに実装、測定を行う。

温度可変用ヒータにはシーズヒータを用いている。VT制御には、窒素ガスを使用している。Fig.2のようにセラミック棒に電熱線（シーズ線）を螺旋巻きしたVTヒータをガラス真空2重管よりなるVT配管に組み込み、高熱交換率を得ている。

高温VT制御時の断熱対策としては、熱リークはヒータからの輻射熱伝導（ $\propto \sigma T^4$ ）が支配的になるので、VT配管の外側はアルミ фольドとセラミックファイバーの多層構造を取り、低減させている。さらに同調回路部に対して、内部ボディに埋設した銅パイプに冷却水を循環させ、温度上昇を抑止している。

温度は、VT配管内に組み込んだ熱電対によりガスの温度をモニターして、別途用意するコントローラにてPID制御が可能である。温度到達テスト結果をfig.3に示す。

2. Field Gradient Coil

高温イメージングプローブのFGコイルユニット部である。

主な仕様は下記の通り。

コイル寸法	: 外径φ 71mm、内径φ 40mm
コイル線材	: 特注平角銅線（高電流密度、高熱伝導性）
最大磁場勾配強度	: 240 gauss/cm
<10% 線形	: φ 20mm
冷却方式	: 水冷式
設計手法	: Fourier-Bessel 展開法 [1],[2],[3]

高温、イメージング、5mm、勾配磁場、400WB

やまこし よしあき、はせがわ けんいち、さいとう こうじ

水冷には熱接触を考慮して3次元加工した銅パイプ（内径 1.4mm×外径 2.0mm）を使用。また、コイルと水冷管を予め真空脱泡した低粘度エポキシ樹脂でモールドイングし、FG パルス印加時に発生するコイル振動の低減を図っている。

Acknowledgment

コイル製作に関し、株式会社アサヒ電気研究所（東京都練馬区）に協力を得た。

References

1. Turner, R. and Bowley, R.M., J.Phys.E.19,540(1986)
2. Turner, R., J.Phys.D:Appl.Phys.19,L147(1986)
3. Mansfield, P. and Chapman B.J. Magn, Reso.72,211(1987)

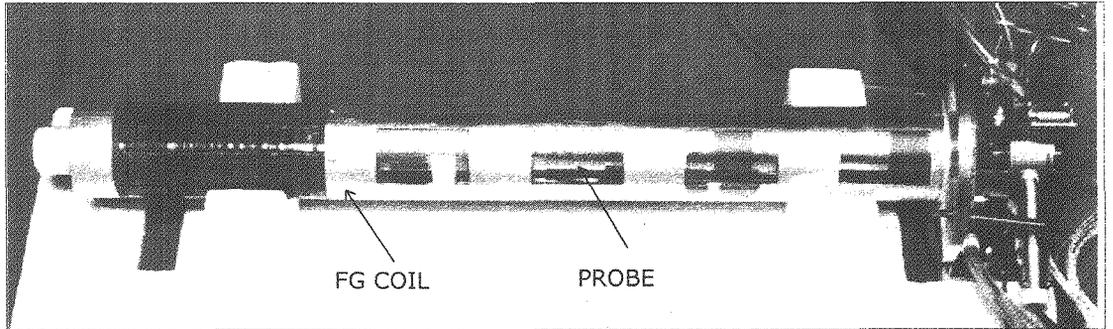


Fig.1 PROBE,FG COIL

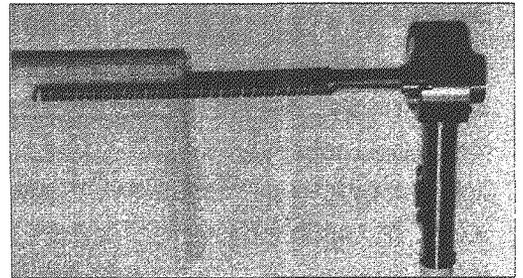


Fig.2 VT HEATER

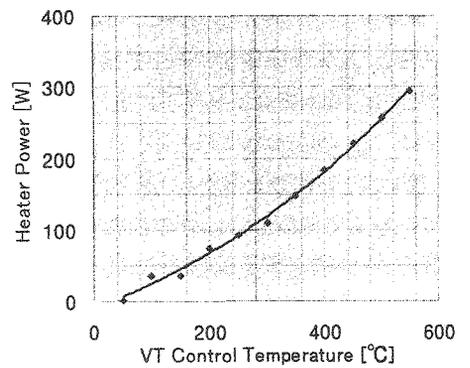
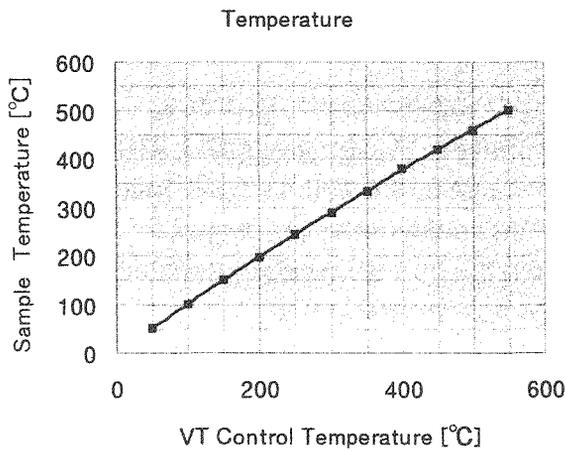


Fig.3 Hi-Temperature Test

P111 超臨界流体用 NMR サンプルチューブの開発

(日本電子) ○江口剛史、杉沢寿志、櫻井智司

Development of NMR Sample Tube for Supercritical Fluid

(JEOL Ltd.) ○Takefumi Eguchi, Hisashi Sugisawa, Satoshi Sakurai

The research on chemical reaction in supercritical fluid, has promised future to discover new molecular catalytic reactions, to develop the chemical recycle technology in environment science, and etc. In the filed, the NMR spectroscopy is expected to be the most powerful tool to analyze basic molecular reaction processes like as in the liquid phase synthesis. But, an ordinary NMR sample tube can not allow the supercritical condition which requires high pressure and high temperature. In order to overcome the difficulty, we are developing new commercial type NMR sample tube for such purpose. Our final target is water in supercritical fluid.

超臨界流体用 NMR サンプルチューブ開発の目的

臨界点を超える温度と圧力下に置かれた流体は、超臨界流体となる。超臨界流体は、気体相と液体相の中間的な物性を持つ。これらの物性(密度、溶解度、粘性、誘電率、自己拡散係数)は、通常状態における物質とは大きく異なり圧力または温度をパラメータとして、広い範囲で連続的にコントロールできる。これが超臨界流体の応用にとって重要な特徴である。このような物理的な性質を利用した抽出法や分離法が開発され、既に、食品や化学工業の分野では利用されている。また、この性質を利用した分析手法として SFC(Supercritical Fluid Chromatography)法がある。

最近注目を浴びつつある研究分野として、超臨界流体中での化学反応の研究がある。これは、超臨界流体が、高い溶解性や高拡散性ととも密度を連続的にコントロールできるという、通常の溶液に無い特徴を持っているからである。超臨界流体を化学反応場としてとらえるならば、通常の溶液中での化学反応とは異なる、新しい反応研究の分野が構築される可能性がある。さらに、地球環境保全のための化学リサイクル技術に対して、超臨界流体の応用が期待されている。これらの分野の研究は、まさに始まったばかりであるが、今後の大いなる発展が期待されている。

液体中での化学反応の研究に対して NMR の果たしている役割の大きさは、言うまでもない。これと同じ役割を、超臨界流体中での化学反応の研究において期待されても当然である。問題は、超臨界流体にするには、試料を高温高圧下に置かなければならないことである。通常使用している溶液 NMR 用の試料管は、このような状態に耐え得ないし、圧力と温度を自由にコントロールすることもできない。

我々はこの問題を解決し、超臨界流体中での化学反応という今後大きく発展するだろう化学分野に NMR を適用するために、超臨界流体用 NMR サンプルチューブの開発を行った。

我々が目標とする超臨界流体

代表的な物質の臨界点(臨界温度と臨界圧力)を Fig.1 に示した。

これらを全て扱える NMR サンプルチューブを開発することが目標であるが、我々は、比較的容易に扱える超臨界 CO₂ を最初のターゲットとし、最終的な目標を超臨界水に置いている。

これを達成するために要請される NMR サンプルチューブの仕様としては、高温(400℃以上)、高圧(250気圧以上)に長期間耐えられることである。これに加えて、超臨界水のような非常に強い溶解力を持つ強

酸性の流体にも耐えられることである。

開発のポイント

上記の超臨界流体をターゲットとし、その目的を達成するため以下の4点を開発のポイントに置いた。

1. NMRサンプルチューブが強い溶解性を持った超臨界流体にも耐えられる。
2. 市販のNMR装置に大きな改造を加えずとも使用できる。
3. 極力NMR性能を維持する。
4. シンプルな圧力伝達システムを作る。

今回開発したNMRサンプルチューブ

1. 構成: Fig.2 に示す様に①圧力伝達チューブ②配管接続部品③配管接続部品④ホルダ⑤NMRサンプルチューブで構成されている。
2. 圧力経路: 圧力発生器からの圧力媒体を受け①圧力伝達チューブを通し、②③配管接続部品を経てNMRサンプルチューブを固定している④ホルダを介して予め試料を詰めていた⑤NMRサンプルチューブに伝達する。
3. 特徴:
 - 3-1 プローブと独立しているので色々なプローブに取り付けが可能である。
 - 3-2 NMRサンプルチューブは耐酸性に優れ、NMR測定面から妨害因子の少ないジルコニア及びサファイアを材質とした。

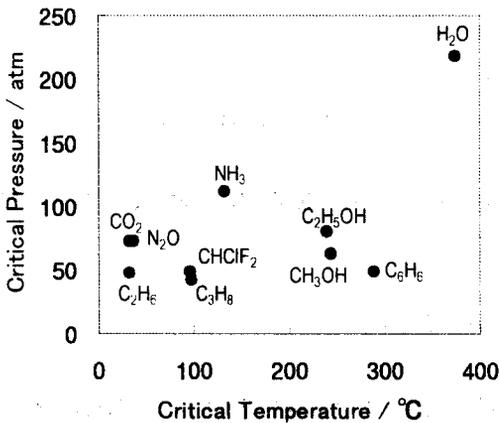


Fig.1 Distribution of Critical points over typical compounds.

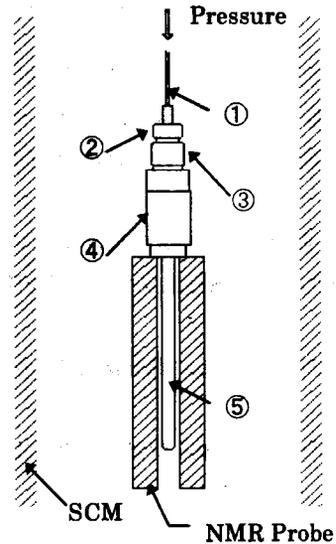


Fig.2 NMR Sample Tube for Critical Fluid

キーワード: 超臨界流体、NMR サンプルチューブ、超臨界水、SFC、高温高压
えぐち たけふみ、すぎさわ ひさし、さくらい さとし

**Application of Low Noise Preamplifiers using GaAs HEMT technology
for High Field NMR**

(JEOL LTD.)○Hiroto Suematsu, Akira Kohda, Noriaki Kurihara

Ultra-low noise preamplifiers using GaAs HEMT technology have been developed to observe NMR signals for spectrometers from 300MHz to 800MHz(1)(2).

This technology has been applied for the detection of ^1H and ^{13}C signals under 800MHz field.

We obtained preamplifiers with noise figures of 0.2dB~0.4dB at those frequencies.

The sensitivity of ^1H and ^{13}C at 800MHz are shown in [Fig.1] and [Fig.2], respectively.

We also improved on the probe-head at 600MHz.

This improvement of preamplifier and probe-head resulted in the sensitivity improvement shown in [Fig.3].

我々は 300MHz から 800MHz までの NMR 装置にて NMR 信号を感度良く観測するため、化合物半導体(GaAs High Electron Mobility Transistor)を使用した高感度前置増幅器を開発してきた¹⁾²⁾。

今回はその技術を 800MHz NMR における ^1H および ^{13}C 信号観測に適用した。

前置増幅器自体の雑音指数は常温にて 0.2dB-0.4dB である。

800MHz 装置における ^1H 感度(0.1%EB), ^{13}C 感度(ASTM)をそれぞれ[Fig.1][Fig.2]に示す。

また更に 前置増幅器の改良に加え、プローブ本体の改良により、600MHz 装置における ^1H 感度(0.1%EB)も大きく改良出来た。結果を[Fig.3]に示す。

ポスターでは更に詳しい電気試験データと NMR データを示す。

最後に、データの掲載を快諾いただきました 工業技術院生命工学工業技術研究所 中西洋志先生に深く感謝いたします。

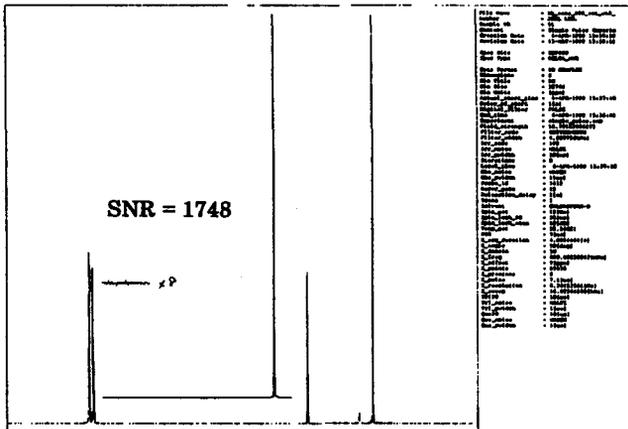
参考文献

(1)末松, 栗原, 第 36 回 NMR 討論会要旨(1997)

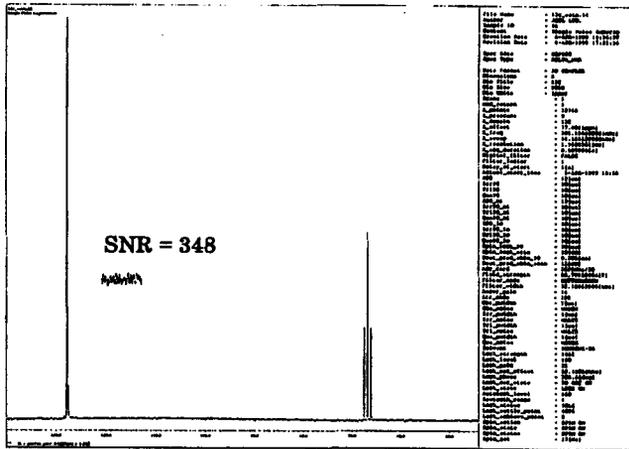
(2)末松, 栗原, 第 37 回 NMR 討論会要旨(1998)

高磁場、感度、化合物半導体、前置増幅器

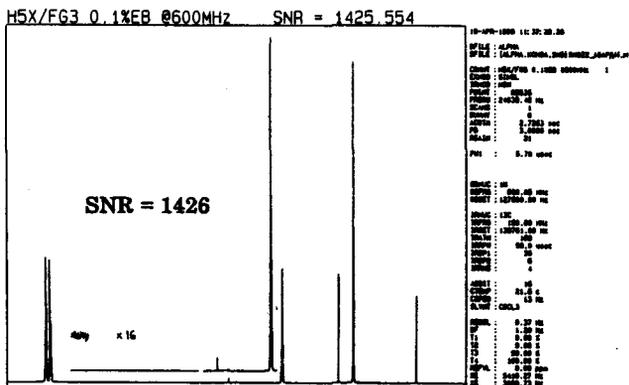
すえまつ ひろと、こうだ あきら、くりはら のりあき



[Fig.1]1H sensitivity at 800MHz with inverse FG probe



[Fig.2]13C sensitivity at 800MHz with inverse FG probe



[Fig.3]1H sensitivity at 600MHz with inverse FG probe

RF router for 2H FG-shimming

(JEOL.Ltd) ○Yoshiki Kida, Naoyuki Fujii

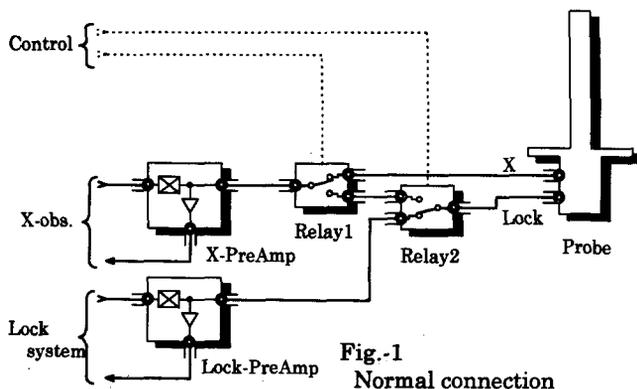
A RF router for 2H gradient shimming is developed. This hardware device routes RF between the observe channel(transmitter, receiver) and the lock channel of a probe. As a result, operators can get excellent magnetic field homogeneity very quickly and fully automatically without any cable re-connection.

1. 目的

水素核で FG-shimming を行う方法は、分解能の自動調整方法として有効であるが、ノイズレスな単一の水素核信号が得られる試料でなければ適用できず汎用的手法となり得ない。一般の測定試料の溶媒の重水素核信号で FG-shimming を行う事ができれば、汎用的分解能自動調整に極めて有効な手段となる。このため NMR 分光計の多核観測系を、重水素核専用のロック系に自動で接続する事ができる RF ルーターを開発して、重水素核信号での FG-shimming を評価したので報告する。

2. 装置の構成と動作

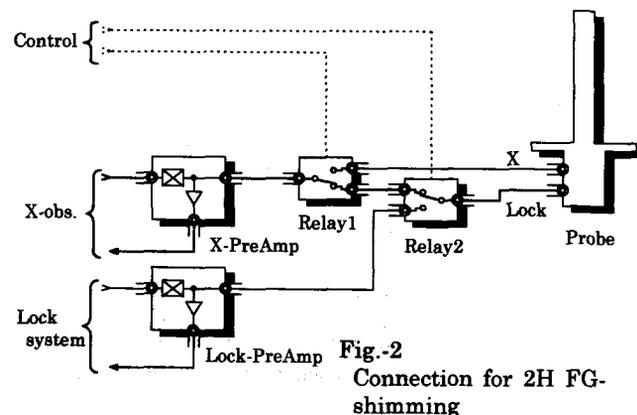
Fig.-1 で示すように、プローブと多核観測系プリアンプおよびロック系プリアンプの間に、高周波切替え用リレーを設置する。これらは通常 Fig.-1 のように接続されているが、制御コンピュータから 2H 核 FG-shimming の実行命令を受け取ると Fig.-2 のように接続が切り替わる。



3. 結果

Fig.-3、Fig.-4 に、ロック系を用いて行った 2H FG-shimming の実行結果を示す。実験に用いた試料は 0.1%エチルベンゼン/CDC13 で、JNM-ECP400 FT NMR 装置を用いた。

Fig.-3 はシムの Z1 から Z6 までの項を全てゼロに設定した時のスペクトルで、この状態から FG-shimming を開始した。Fig.-4 は開始から 100 秒後のスペクトルで、実用に十分な分解能が短時間に得られる事がわかる。



キーワード: NMR ロック、シミング、FG
きだ よしき、 ふじい なおゆき

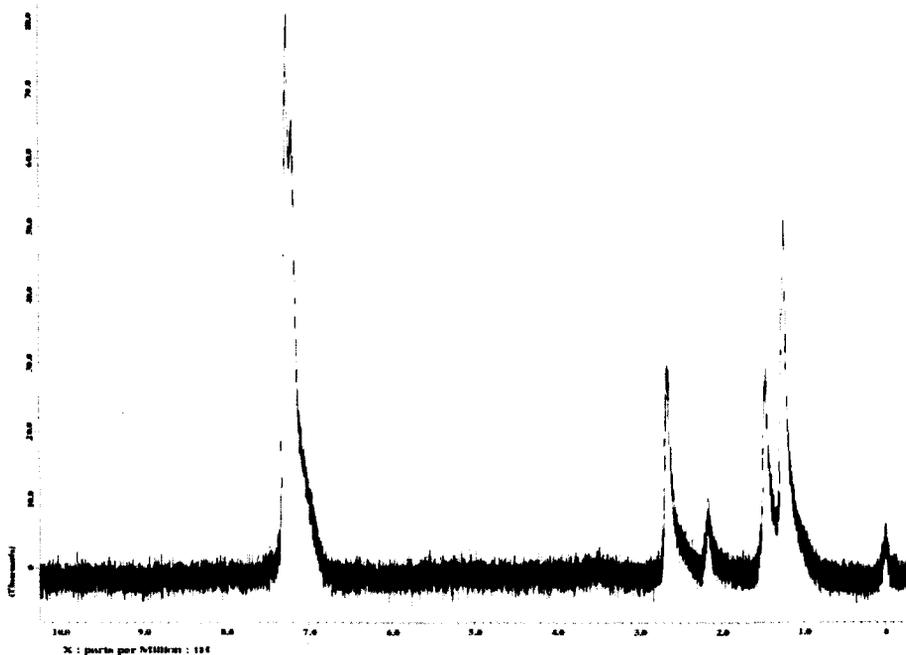


Fig.-3
 1H Spectrum after setting "zero" to all Z1-Z6 shims.

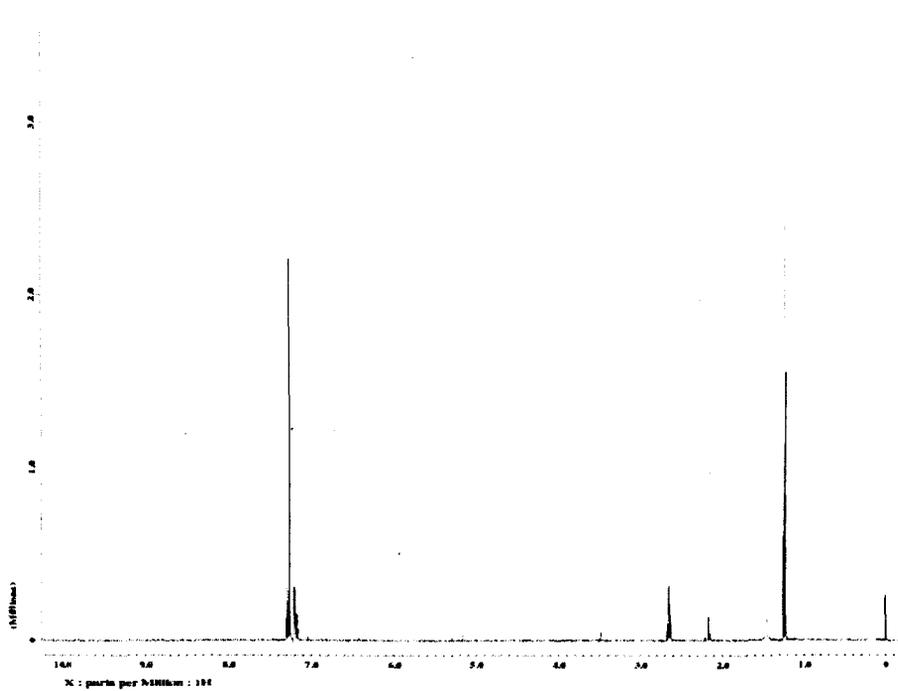


Fig.-4
 1H-NMR spectrum after 2H gradient shimming

P114

乾燥空気を用いた固体NMRにおける長時間低温測定を試み
(バリアンテクノロジーズジャパン) ○芦田 淳、串田克彦

The Low Temperature Solid State NMR Experiments with the Dry Air

(Varian Technologies Japan) ○Jun Ashida, Katsuhiko Kushida

Generally, we use liquid Nitrogen, and Nitrogen gas to perform low temperature NMR experiments. However it is very difficult to run a low temperature MAS NMR experiment for a long time if there is no Nitrogen gas supplies in your lab., especially at the industries' site.

We will report a new technique for the low temperature solid state MAS NMR using compressed dry air. We could run a 7mm MAS rotor at 5kHz, and at low temperature ($\sim -40^{\circ}\text{C}$) over continuous 5 days without any damages to the system. The advantages of this technique are; (1)Easy. No need to prepare a lot of nitrogen gas cylinders, no need to refill liquid nitrogen during the experiment. (2)Safety. No worry about suffocation.

【序】

一般にNMRの低温測定では、液体窒素および窒素ガスを用いることが多い。しかし実験室に窒素ガスが供給されていない場合には、長時間連続測定を行うためには、窒素ポンペを何本も用意しなければならない。さらに固体MAS NMRではポンペ1本で1時間くらいしかもたないため、ポンペ交換などの作業が必要であり、特に企業においては安全性の問題などもありオーバーナイトなどの長時間の測定は困難である。今回はエアテック（株）の協力で、大流量のガスを -100°C 付近まで冷やすことのできる冷却器を用いて、液体窒素や窒素ガスを用いずに固体試料のMAS下での低温長時間連続測定を試みた。

【装置】

NMR分光計は^{UNITY}INOVA400、プローブはJakobsen 7mm HX MASを用いた。冷却器はPolycold Systems Inc.のPGS-150を用いた。この冷却器自体は熱測定などの分野ではすでに広く用いられており、また溶液NMRでも最近用いられるようになってきている。次ページにコンプレッサーからプローブまでの乾燥空気の流れを示す。

固体NMR、低温測定

○あしだ じゅん、くしだ かつひこ

【テスト結果】

7mm φ のローターを用いて、回転速度 5kHz、設定温度 -40℃ で連続 120 時間装置を働かせることができた。また、5mm φ ローターで回転速度 10kHz では、設定温度を -65℃ に下げることができた。

【利点・欠点】

操作性：冷却器のスイッチを入れるだけなので、液体窒素・窒素ガスボンベなどの準備の手間がいない。

安全性：窒素ガスを使用しないので、換気のあまりよくない測定室でも窒息の心配がない。

測定温度：冷却器を磁石にあまり近づけることができないため、transfer tube が長くなってしまい冷却器の出口では -90℃ 程度まで下がっていてもプローブ内では 7mm φ だと -50℃、5mm φ だと -65℃ 前後にまで上昇してしまう。

測定時間：途中で液体窒素などの冷却溶媒がなくなる心配がないため、これまで以上の長時間測定が可能と思われる。ただし冷却器内での凍結には注意が必要。

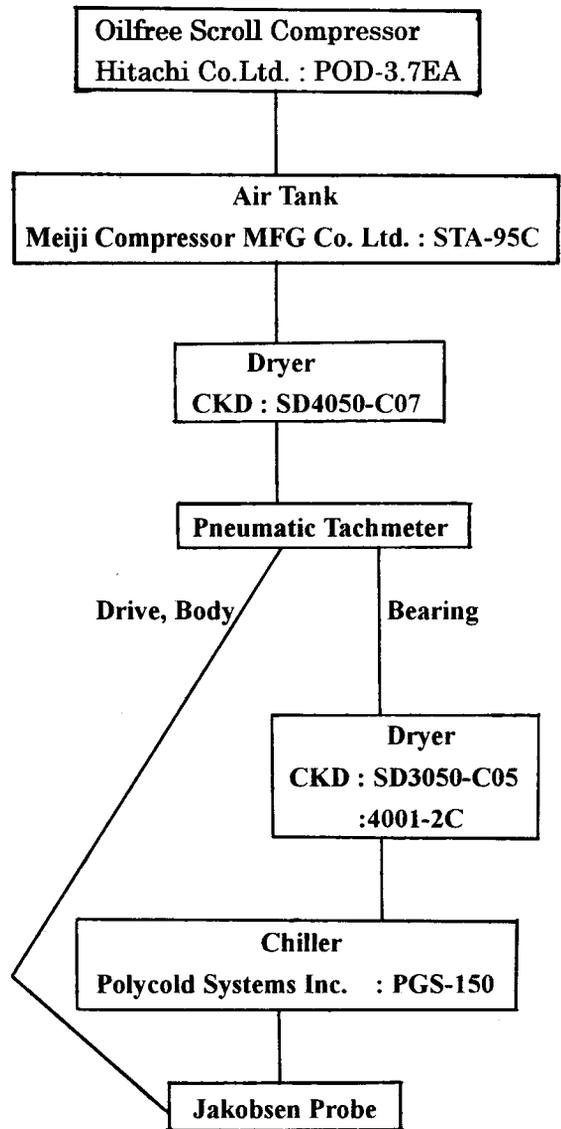


Fig. The Flowchart of Dry Air

この技術は、S/N の悪い試料の低温での(CP)MAS 測定や、 $T_{1\rho}$ 、 $T_{1\rho}$ 測定、2次元測定などの長時間測定には非常に有効であり、上に述べたような問題点の改善がはかれると、今後これらの測定が容易に行われるようになるものと期待される。

最後に、今回の実験を行うにあたって、冷却器・乾燥器一式をお貸しいただいた(株)エアテックの米沢氏に感謝いたします。

Improvement of air bearing for magic angle spinning

Katsuya Hioka, JEOL Ltd.

We discuss air bearing for the magic angle spinning. Air bearing for the higher speed spinning required following three conditions; 1)the rotor with low density and the tough material, 2)the air bearing system with low viscous resistance, 3)the air bearing system preventing the whirl phenomenon. We improved the rotor and the stator. We achieved the higher speed spinning with the same air consumption of the conventional air bearing.

本報告では、MAS用空気軸受について議論する。固体高分解能NMRにはMASが必須の手法であるが、測定手法と応用分野の拡大および高磁場化にとってMASの高速化は重要である。空気の摩擦などによる過度な試料の温度上昇なく、このような高速回転を得るためには、非常に精密な空気軸受が必要とされる。そこで従来の空気軸受に考察を加え、軸受の構造にいくつかの改良を試みた。実験は、直径6 mmの静圧タイプのスピナーを使用した。

空気軸受で高速回転を達成するために必要な条件は、①ロータの材質は密度が小さくかつ高強度であること、②軸受の空気粘性抵抗が小さいこと、③軸受が振れ回り現象を発生しにくい構造であること、の3点である。これらのうちで最も悪い条件が、軸受の最高回転速度を決定する。

上述の条件を満たすために、ロータとステータに改良を施した。その結果、従来の軸受と同等の空気消費率を維持しながら、MAS速度のより高速化を達成することが可能となった。改良の詳細と実験データはポスターで紹介する。

キーワード：MAS、空気軸受

ひおか かつや

Construction of pulsed-field gradient NMR apparatus and its
application to a measurement of the diffusion coefficients in solid
materials

(ONRI, AIST) ○ Tomoko Akai

An apparatus for the pulsed field gradient NMR has been constructed for the purpose of a measurement of diffusional coefficients in solid. A pulse current generator for the gradient field generation was designed to produce any intensity of pulsed current up to 50A. It was possible to control the intensity of field gradient up to 7[T/m].

【緒言】パルス磁場勾配NMRは原子の拡散係数を測定する方法として古くから知られている^{1) 2)}。しかし、拡散の遅い固体材料においては強い磁場勾配を発生させて測定を行う必要があるためその実験が難しく、ごく一部の研究者によって行われていたに過ぎなかった。ところが、最近、工業材料中の拡散係数が実用上重要な物性と関連していることや、ナノレベルの周期構造やイメージングへ応用できる可能性が報告されたことで^{3) 4)}強い磁場勾配を発生できる装置の開発が注目されつつある。現在のNMR装置には、感度・分解能の観点から均一性の良い高磁場が得られる超伝導マグネットが主に用いられている。しかし強い磁場勾配を発生することのできる四極コイルをマグネットボア形状の空間的な制限から用いることができないという欠点があるため、固体材料中の感度の良い¹H,⁷Liなどの測定には電磁石を用いた装置のほうが有利であると言える。本研究においては、市販の電磁石パルスNMR装置に簡便に組み込むことのできるパルス磁場勾配測定用ユニットを作製し、固体の拡散係数の測定が可能なパルス磁場勾配NMR装置を作製することを試みたので報告する。

【装置及び結果】

Fig.1 に作製したパルス磁場勾配測定システムの概略図を示す。前述の周期構造等の観察までの拡張を考えた場合、磁場勾配の強さGを任意に設定できたほうが有利と考えられるので、今回、磁場勾配発生用のパルス電流発生装置は任意の電流値が発生できる定電流制御方式とし(OPアンプLF356を主に使用)、1Aから50Aまで任意にパソコンソフト上で設定できるように設計した。この電流発生装置はパルスNMR装

パルス磁場勾配NMR, 拡散係数, プロトン, リチウム

あかいともこ

置（日本電子製 JNM-EM）からの TTL5V レベルの信号でトリガーされ、設定された所定の電流値のパルス電流を設定された時間 δ s、間隔 Δ s で発生することができる。磁場勾配測定用のプローブヘッドはすでに報告されているデザインのものに参考にして作製した⁹⁾。磁場勾配発生用のコイルは長さ 12cm、内径 12mm の巻き数 10 及び 16 の四極コイルを用いた。RF 検出用のコイルはテフロン皮膜導線を用いた。RF 検出用の回路はプローブ外に接続されたマッチングボックスを用いて 20MHz に同調した。

拡散係数測定用のエコーは単純な Stejskal-Tanner らのものを用いた。磁場勾配の較正は水の ¹H の信号を用いて行った。Fig. 2 に設定電流値と得られた磁場勾配の値を示す。設定された電流値に磁場勾配は比例しており、磁場勾配の値が広範囲で制御されていることがわかる。現在、他の標準物質等での拡散係数測定を行っているところであり当日報告する予定である。

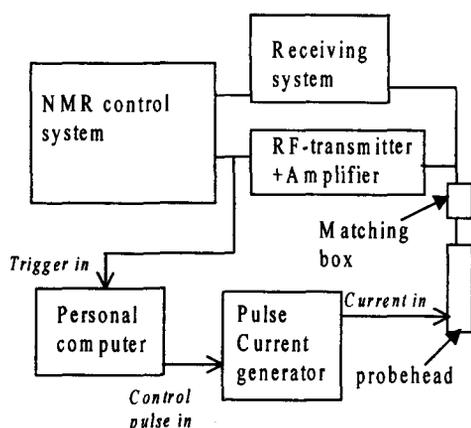


Fig.1 Block diagram of the constructed pulsed field gradient NMR system.

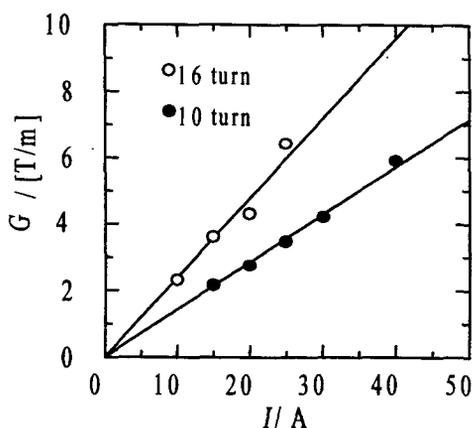


Fig. 2 Generated intensity of pulsed magnetic field gradient vs. current input.

【謝辞】 パルス磁場勾配NMR装置の設計についてご指導いただきました分子科学研究所大石修博士・宮島清一博士（現宮島醤油）に感謝いたします。また、パルス電流発生装置を設計・製作していただきました北斗電子工業赤穂昌基氏に感謝いたします

【参考文献】

- 1) E. O. Stejskal et al., J. Chem. Phys., 42, 288 (1965)
- 2) J. Karger et al., Adv. Magn. Reson., 12,1 (1988)
- 3) R. T. Callaghan et al., Nature, 351, 467 (1991)
- 4) R. M. Cotts, Nature, 351, 443 (1991)
- 5) G. Odberg et al., J. Magn. Reson., 10,111 (1974)
- 6) O. Oishi and S. Miyajima, J. Magn. Reson., J. Magn. Reson., A123,64 (1996)

P117 コンビナトリアル合成における高分解能 MAS 溶液プローブの応用
(東レリサーチセンター) ○川口 謙、木村一雄、三重堀茂樹、丸山季浩

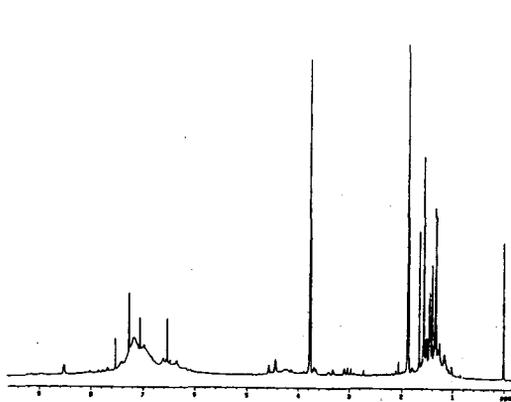
Application of High-Resolution Liquid MAS Probe to Combinatorial Synthesis

Toray Research Center, Inc., K. Kawaguchi, K. Kimura, S. Miehoru, T. Maruyama

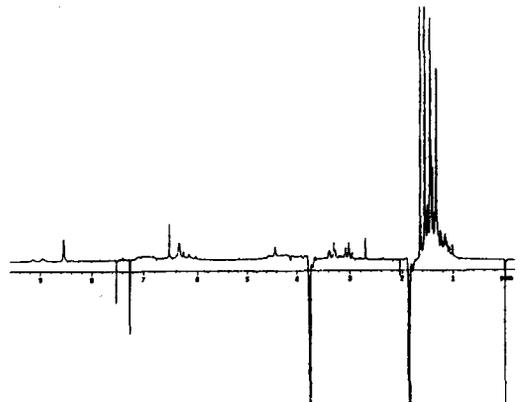
A high-Resolution Liquid MAS Probe, which is called a Nanoprobe, is used for small amount compounds in liquid state normally, but we have used the probe for evaluation of solid-phase-synthesis because the probe has magic angle spinning ability. We tried to measure ^1H NMR spectra of samples covalently bound to polystyrene-based solid-phase-synthesis resins. We found the inversion recovery method is very useful for the analysis of the spectra.

高分解能 MAS 溶液プローブ (ナノプローブ) は本来、微量溶液試料用に開発されたプローブであるが、マジック角回転を用いているため、固相合成のような不均一系でも比較的、高分解能スペクトルが測定できる。このことを利用して、ポリスチレン樹脂担体に結合している化合物を、樹脂から切り離すことなく直接に NMR 観測することを試みた。

下図左は上記のナノプローブで測定した ^1H NMR スペクトルである。試料は重クロロフォルムに懸濁し、膨潤した状態になっている。試料を約 2500Hz で回転している。懸濁状態にあるにもかかわらず、NMR シグナルが比較的高分解能で観測できる。下図右は、左図の状態のものを Inversion Recovery 法で測定したものである。合成溶媒に由来する不純物が区別でき、また、樹脂由来のシグナルも抑えられる。Inversion Recovery 法は、樹脂に共有結合した化合物のシグナルの解析に有用であり、構造確認に応用できる。



^1H NMR spectrum using nano-probe.



Inversion Recovery spectrum using nano-probe.

コンビナトリアル合成、高分解能 MAS 溶液プローブ、固相合成、構造確認

かわぐち けん、きむら かずお、みえほり しげき、まるやま としひろ

P118 ホワイトノイズ解析によるNMRの感度向上法

(神奈川大学*、大工研**) ○藤原 鎮男*、福見 俊夫**

1. はじめに

我々の組織する量子コンピュータ研究会（ホームページ <http://datakeeper.cc.u-tokyo.ac.jp:81/>）の第8回研究会において、藤原はブラウンフォアファール線の考えでNMRの感度を上げられること、関連してホワイトノイズ解析の利用可能性を指摘し、福見が既に行ってきたホワイトノイズ解析^{1, 2}を適用し得ると応じた。その後検討を重ね、原理的にNMRの感度を約 10^6 向上させることが可能であることを見出し、理論の構築をすると共に、実験の方策を得たので報告する。

2. 経緯

NMRはゼーマンレベルのエネルギー差が熱エネルギーに比べて小さいため磁場と平行なスピンと反平行なスピンの占拠数の比率が約 10^{-6} と小さく、実効的にシグナルを与える磁化が全スピンの 10^{-6} 程度であるために他の分光法に比べて著しく感度が低い。これまではS/N比を上げるために計算機によってシグナルを積算する方法がとられて来たがS/N比は積算回数の平方根に比例するため大きなシグナルを得るためには長時間を要するという欠点があった。ここで、原子吸光のように全てのスピンを下のレベルに下げることができれば著しい感度の向上が望めるという発想が芽生えた。

2. ホワイトノイズ解析

ブラウン運動は

$$B(t) = \sqrt{\frac{x^2 + y^2 + z^2}{t}}$$

と定義でき、その相関関数は

$$\langle B(t_1)B(t_2) \rangle = \min(t_1, t_2)$$

により与えられる。上式で平方根の中の分母が時間の一乗であるのに対して、分子が距離の二乗であることに注意して欲しい。

ホワイトノイズはブラウン運動の時間微分として形式的には以下のように与えられる。

$$\frac{dB(t)}{dt} = \dot{B}(t) = \sqrt{\delta}$$

デルタ関数の平方根になるのは上に注意したブラウン運動の性質によっている。

つまり、形式的に言えばデルタ関数が

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta t} = \delta$$

であるのに対し、ホワイトノイズはブラウン運動の飛行距離が有限であるので比例項として無視できて

$$\dot{B}(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \sqrt{\frac{1}{\Delta t}} = \sqrt{\delta}$$

である。つまり、デルタ関数は無限大であるので、有限な飛行距離を掛け算しても無限大は変わらない。

従って、ホワイトノイズはデルタ関数を乱雑に寄せ集めたようなきわめてシグギュラーなものであり、一種の座標軸と見なすことができる。

ここで $\dot{B}(t)$ が座標軸であるという立場に立って、ホワイトノイズによる微分

$$\frac{\partial}{\partial \dot{B}(t)}$$

を考えると、これはブラウン運動の汎関数に作用させたときに消滅演算子となり、その共役作用素

$$\left(\frac{\partial}{\partial \dot{B}(t)} \right)^*$$

は積分作用素として生成演算子となる。

ブラウン運動の汎関数を構成することは難しい問題を含んでいるが、文献(1)では、調和振動子に対してブラウン運動の汎関数としてのエルミート多項式を発見的に導いている。なお、文献(1)、(2)では確率過程とその時間軸を反転させた双対過程として生成・消滅演算子を導いているが、作用素論的解析が大勢をしめるようになった現状に合わせた。

一般にスピンをブラウン運動の汎関数として定式化することは難しい。スピンは相対論的量子力学により導かれるものであるが、プリンストン大学のエドワード・ネルソンによって指摘されたように相対論的ブラウン運動は意味をなさない。このことはアインシュタインによって再三警告されたように、ブラウン運動をする粒子の速度は測定不可能であることに由来する。

そこで、ブラウン運動の汎関数としての個数演算子を

$$N(B(t)) = \left(\frac{\partial}{\partial \dot{B}(t)} \right)^* \frac{\partial}{\partial \dot{B}(t)}$$

と定義すると

$$\frac{\partial}{\partial \dot{B}(t)} N(B(t)) | \downarrow_N \rangle$$

により、ホワイトノイズによる微分を作用することができ、これによって全てのスピンを下位の順位に下げることが可能である。ここに、 N はほぼアボガドロ数の整数である。ただし、ホワイトノイズはヒルベルト空間よりも大きな空間で定義されるので初等的な微分・積分の演算は出来ない。

つまり、

$$\dot{B}(t) \in L^*, \forall t \in R,$$

$$L \subset H \subset L^*$$

で、演算は双線形な空間 L と L^* のあいだを行ったり来たりしておこなわなければならない。この H はヒルベルト空間である。しかし、ここではホワイトノイズによる微分が消滅演算子になることで十分であろう。ここで、どんな時間幅をとってもその中に加算無限個のデルタ関数が存在するを用いている。もし、時間を固定すると上式は

$$\left(\frac{\partial}{\partial \dot{B}(t)} \right)^N N(B(t)) | \downarrow_N \rangle$$

と書かねばならない。

ここで以下のことを注意する必要がある。 δ 関数のフーリエ変換はそれ自体でスペクトルは白色であるが、ここで用いられているホワイトノイズ $\dot{B}(t)$ は時系列として与えられることが重要である。つまり、上にも記したようにここで言うホワイトノイズは δ 関数を乱雑に集めたようなものであることによっている。即ち、ある時間帯に定義されるホワイトノイズによる微分は加算無限個の消滅演算子であることが重要なポイントである。これによって全てのスピンを下の順位に下げることが可能にしているのである。大切なことは、これが常温で（縦緩和との競合にはなるが）可能であることである。従って、これは高分解能NMRの感度向上を可能とするものである。

同様に、微分作用素の共役演算子であるホワイトノイズによる積分は全てのスピンを上の順位に上げることを可能にする。

4. NMRにおけるフラウンフォーファー線

以上の解析により、スピンをホワイトノイズで時系列的に微分して、全てのスピンを下のレベルに下げた後、普通のホワイトノイズを照射することによりNMRでも原子吸光のようなフラウンフォーファー線を得ることが可能となる。これにより、NMRの感度を熱力学的限界を超えて約 10^6 向上させることが

できる。

当然のことながら、従来のパルス・フーリエ変換の手法はそのまま使用することが出来、その感度は約 10^6 向上する。

5. おわりに

上に見たように、ホワイトノイズ解析による作用素解析に基づいてNMRの感度を約 10^6 向上させ得ると言う可能性を示した。このことは、単にNMRで微量分析を可能とするに留まらず、MRIの感度を常温で非侵襲的に向上させることにもなる。つまり実時間でfMRIを撮ることを可能にするため臨床下での応用、例えばfMRIを実時間で見ながら手術を行う、内臓の動きを実時間で見ると見る、血流を実時間で見ると見る、等臨床医学において革新的応用分野を開くなどその効果は計り知れない。残念ながら、今のところ、ブラウン運動の汎関数としてのスピンをホワイトノイズで微分する電気回路の設計は未解決である。しかしながら、以上のように、NMRの感度を大幅に向上させようという可能性を示したので、より多くの人々が興味をもってくれるならば具体的装置としての高感度NMR分光計の進展が期待できると考える。

文献

- 1) T.Fukumi, Phys. Rev. A, **40**, 530 (1989).
- 2) T.Fukumi, J. Math. Phys., **33**, 3822 (1992).

索引と名簿

キーワード索引

<数字, アルファベット>

11B	P109	DADAS90	P5	MTH1	P27
11B-MQMAS-NMR	P107	DADAS90 calculaton	P33	Multiconformation解析	1L11
129Xe NMR	3L2, 3L9, P93, P67	Diffusion	2L4, P14, P47	Musashil	P32
13C	1L9, P95, P109	DinIタンパク質	P9	NADPHオキシダーゼ	1L8
13C化学シフト	P97	disorder	P74	navigator echo	P64
14N overtone	P79	DNA	P50	NHO水素結合	P103
14N-13C双極子相互作用	P79	DNA octamer	2L1	NMR	
15N-CP/MAS NMR	P103	DNAオリゴマー添加効果	P20		1L5, 2L3, P3, P17, P34, P83
15N-NMR	P45	DNAのメチル化	P41	NMRイメージング	2L7, 3L4
19F NMR	P40	DNA結合	P16	NMRサンプルチューブ	P111
19F固体NMR	P86	DNA結合ドメイン	P15	NMRロック	P113
1H NMR	2L8, P71, P102	DNA修復	1L3	NMR化学シフト	3L5
1H T ₂	P53	DNA組換え	P9	NMR距離解析法	P5
1H-13C HSQC	2L6	DPC micelles	P6	noe	P50
1H-15N HSQC	1L1, P20	Ecteinasidin729	2L1	NOE-restrained refinement法	
23Na-NMR	P66	energy landscape	P11		2L1
29Si NMR	P109	ESR	P83	non-inactivating Na current	
2D-NMR	2L1	Eu	P101		P66
2H MAS NMR法	P85	Eu-Y ₂ O ₂ S	P101	off rate	P6
2H-NMR	P55, P84	expansion factor	P11	OMAS	P56
2-ピニルオキシピリジン	P54	FG	P113	P(VDF ₇₃ /TrFE ₂₇)/at-PMMA	
2次モーメント	P97	FIREMAT	P106	ブレンド	P100
2次元NMR	P48, P98	flip-flop	P36	P(VDF/TrFE)	P87
2次元粉末パターンスペクトル		fluctuation	1L9	PACAP	P6
	P78	folding	P12	PB1ドメイン	1L8
	P66	FSLG	P75	PCモチーフ	1L8
31P-NMR	P66	FSM16	3L1, P102	PEOグラフト鎖	P83
39K-NMR	P60	G4V cystatinA	P34	PFG-HMBC	P45
400WB	P110	gellan gum	P95	PFG-NMR	P25
5mm	P110	G蛋白質	P19	PGSE NMR	P49, P59
89Y-MAS NMR	P101	H-D交換速度	1L7	Pore size distribution	P102
<i>A. nigrisigna</i>	P65	high pressure NMR	1L9, P11	Pulse-Gradient-Spin-Echo	
<i>ab initio</i> tight-binding MO法		HIV-2	P29		2L4, P14, P47
	3L5	HIVプロテアーゼ阻害剤	1L11	RalGEF	1L2
Aggregation	P14	HMG2boxB	P20	REDOR	P105
Allergenic-Pentasaccharide	P33	HMGボックス	P16	RFDR	P72
Artifactual attenuation	2L4	IFMモチーフ	P17	RNA	1L4
Artifactの消去	1L1	<i>in vivo</i>	2L5, 2L6	RNase	P10
at-PMMA	P87	in-situ NMR	3L1	RNA結合タンパク質	1L4, P32
ATF-2	P8	J-HMBC 2D	P2	RNA結合ドメイン	1L4
Autographa gamma	P65	J-resolved-HMQC	P46	ROESY	P33
B4C	P107	KIFMK	P17	ROESY/MAS	P57
Bem1p	1L8	KNI-272	1L11	SH3	P37
BN	P107	LC-NMR	P44	SR-MAS測定	2L10
Ca ²⁺ -binding lysozyme	P12	Lysozyme	P14	Supercooled water	P47
Ca ²⁺ 結合タンパク質	P13	MAS	P54, P72, P75, P79, P115	T ₁ 強調画像	2L7
Cdc24	1L8	MAS液晶NMR法	1L11	thermodynamic quantities	P11
chloramphenicol	P36	Mesoporous material	P102	TOCSY	P33
compressibility	P11	metalloproteinase	P18	triple-resonance NMR	P26
Confined molecule	P102	Mismatch	2L4	TRNOE	P4, P6, P31
CP-060S	P66	molten globule	P12	TROSY	1L1, 1L3
		MRI	P67, P69	Valinomycin	P106
		MRMICS	2L5	Vav	P37

Ves1-1S	P23	化学シフト異方性	P56	勾配磁場	P110
X-PLOR	2L1	化学シフト値	3L9	勾配磁場コイル	2L5
Y ₂ O ₂ S	P101	化合物半導体	P112	抗菌ペプチド	1L5
YhhP	1L6	架橋高分子の拡散	P59	抗原認識部位	P36
zinc finger motif	P29	回転系スピン格子緩和時間		構造	P32
ZQ/DQ	P1		P87、P100	構造解析	P8、P42、P44、P52、P85
π電子共役系高分子	3L8	回転座標系	P68	構造確認	P117
<あ行>		改変体	P24	酵素-インヒビター複合体	P91
アミノ酸選択的ラベル	P19	拡散係数	P116	高圧NMR	1L2、P93
アルカリプロマイド水溶液		核四極子相互作用	P84、P107	高圧プローブ	3L1
	2L3	核双極子相互作用	2L9	高温	P110
アルコール	P55	活性	P24	高温イメージング	3L4
イオンの拡散	P59	活性ループ・ペプチド	P18	高次構造	P91
イメージング	P68、P110	感度	P112	高磁場マグネット	P52
インテイン	P7	緩和時間	1L7	高分解能MAS溶液プローブ	
インヒビター	P10	含フッ素高分子	P82		P117
ウニ	P71	帰属	1L3	高分子	3L10、P85、P93
エラスチン	P25	逆CP	P94	高分子結晶	3L5
オーダーパラメーター	P56	局所構造	P94	高分子量蛋白質	P7
オキシカルボン酸錯体	P104	局所磁場分離NMR	3L8	固相合成	P117
圧力	2L3	金属水素化物	3L3	骨形成因子	P28
圧力変性	1L2	区分安定同位体標識	P7		
安定同位体ラベル	P81	空気軸受	P115	<さ行>	
安定同位体標識	2L2、P72、P86	結晶化	P100、P108	サイトカイン	P38
異種核間2次元相関MASNMR		結晶構造	P88、P96	ゼラン	P53
	P76	絹シーケンスモデル化合物		シクロスポリン	P5
異種核間ロングレンジカップリ			P78、P105	シクロデキストリン	P52
ング定数	P2	絹の安定同位体ラベリング		システインプロテアーゼインヒ	
異種核相関	P97		P78	ビター	P34
異方性	P55	絹フィブロイン	P81	ジフェニルヒダントイン	P103
遺伝的アルゴリズム	P43	固相合成	2L10	シフト試薬	1L10
運動性	P32、P108	固体 ¹ H NMR	P82	シミング	P113
永久磁石	P64	固体 ¹³ C NMR	1L10、P104	シリカ表面	P83
液晶	P56	固体 ¹⁹ F NMR	P82	シルクI構造	P78
液晶NMR	P43、P54	固体 ²³ Na NMR	P60	シルクフィブロイン	P98
温度ジャンプNMR	P21	固体2D DOQDY NMR	P81	シングルポイントイメージング	
		固体NMR	2L9、3L5、3L1、		3L4
			3L7、3L8、3L10、P72、P75、	スピノーダル分解	P100
			P73、P77、P88、P96、P114	スピン-格子緩和時間	3L3
<か行>		固体イメージング	P97	スピン-格子緩和速度	2L3
ガラス状高分子	3L9	固体構造解析	P98	スピニング	3L8
ガラス性結晶	P74	固体高磁場NMR	2L8	スピン-格子緩和時間	P65
ガラス転移温度	P87	固体高分解能 ¹³ C NMR		スピン拡散	P74、P75
カルシウムチャネル阻害	P24		P89、P90、P92	スピン結合定数	P1
グルコース	2L6	固体高分解能NMR		スピン交換	3L2
グルタミン酸	2L6		P58、P61、P91	スピン平衡	P40
ゲル	P60	固体重水素NMR	P99	スピン偏極	3L2、P67
コアセルベーション	P25	交換性プロトン	P50	スプラインギング	1L4
コイル-ヘリックス転移	P53	交差分極ダイナミクス	P82	ゼロ量子遷移	P73、P76
コンビナトリアル合成	P117	光ポンピング	3L2、P67	ゾルゲル転移	P95
コンホメーション	P57	光学異性体	P96	細胞分裂	1L6
化学シフト	2L8、P98	光学活性	P5	三重共鳴NMR	P42
化学シフトテンソル		光励起三重項状態	P80	酸性生体膜	P58
	3L8、P61、P106				

四重極緩和	P99	P27, P35, P41, P72	プロトン	P116
脂質二重膜	1L10	多次元NMR法	プロトンダイナミクス	3L6
脂質非対称分布	1L10	楕円形小胞体	プロトンポンプ	3L7, P89, P90
磁化移動	2L9	耐熱・難燃性ポリマー	プロトン交換速度	P53
磁場配向	P58	代謝変化	ヘテロポリ酸擬液相	3L6
磁場配向二重膜	P61	大腸菌	ペプチド	2L8, P24, P73, P77, P79, P105, P106
自己拡散係数	P49, P59	蛋白質	ペプチド微小振動	P99
自動解析	P43	蛋白質-核酸相互作用	ポータブル	P69
自由体積	P93	蛋白質-DNA複合体	ポジトロン	P93
主鎖ダイナミクス	P42, P99	超臨界	ホメオドメイン	P16
受精卵	P71	超臨界流体	ポリグルタメート	P99
修復酵素	P27	直接結合定数	ポリペプチド	3L8
重水素NMR	P74	低温処理	配向パラメーター	P54
重水素化	1L3, P26	低温測定	白金錯体	P50
重水素核NMR	P103	転写活性化ドメイン	非晶構造	3L10
常磁性シフト	P40, P76, P101	転写抑制因子	非晶質	P108
常磁性固体	P76	電子状態	微細孔サイズ	3L9
情報伝達	P89	糖鎖	微量試料	P3
触媒抗体	P36	糖鎖置換異性体	不活性化ゲート	P17
信号増大化	P80	動的核偏極	複合体	P16
水素	3L3	同位体効果	分解物	P5
水素拡散	3L3	ナトリウムチャンネル	分子運動	P83, P84, P88
水素結合	P88	ヌクレオキャプシドタンパク質	分子運動性	P25, P97
水素交換反応	P39		分子間距離	P105
石炭	3L4	内部運動性	分子内水素結合	P39
線幅	P74	二面体角	分子認識	P10
選択的スピン拡散	P94	二量子遷移NMR	変異体	P28
選択的緩和法	P57	熱架橋構造	変性構造	1L2
選択的励起パルス	P2	脳機能		
選択励起	P94	脳代謝		
前置増幅器	P112			
阻害活性	P18	<は行>	<ま行>	
相互作用	P31, P32	バクテリオロドプシン	マイクロスコープ	2L5, P64
相構造	P82	3L7, P86, P89, P90, P92	マイクロ波	P21
相転移	P88	パバイン	マジック角試料回転	2L9
		パラジウム錯体	マンガン	2L7
		パルスNMR	ミオグロビン	P39, P40
<た行>		パルスフィールドグラジエント	マイクロ試料管	P3
ダイナミクス	P91		メチル化DNA結合ドメイン	
ダイマー	P15			P41
タンデムリピート	P30	パルス磁場勾配NMR	メリチン	P58
タンパク質	1L2, P21, P22, P42	ヒスチジン	モデルペプチド	P30, P98
タンパク質タンパク質相互作用	P26	ビタミンD ₃	膜タンパク質	P86
タンパク質のフォールディング	P39	ピューロマイシン	膜作動性抗菌ペプチド	P4
タンパク質の基本構造	2L2	ピリジニルアゾール	膜作動性分子	1L10
タンパク質核酸	1L1	フェナントロリン	膜蛋白質	3L7, P89, P90, P92
タンパク質間相互作用	P10	フェニル基の運動	水分子	2L3
デキストラン	P60	フォールディング	無細胞タンパク質合成系	2L2
トリプルレゾナンス	P48	フッ素核	木材	P55
多核固体NMR	3L6	フッ素置換ヘム		
多核多次元NMR	P13	プリオン	<や行>	
多次元NMR	2L2, 3L10, P23,	プリンリプレッサー	優先富化	P96
		ブレンドの相溶性	有機電解液	P49
		フローセル	溶液	P22

溶液NMR	P9
溶液構造	1L6, P18, P28
溶液構造解析	P13
溶液高磁場NMR	1L1
＜ら行＞	
ラジオ波磁場勾配	P68
ラット脳	2L7
ラット灌流心	P66
リオトロピック液晶	P57
リチウム	P49, P116
リフォールディング	P38
リボソーム	P10
レクチン	P31
レセプター	P19, P28
立体構造	1L4, 1L5, P20, P24, P27, P29, P34, P35, P37, P90
立体構造解析	P9, P22, P23, P58
立体構造変化	P19
両親媒性ペプチド	P61

著者索引

<アルファベット>

S. Aimoto P18
 K. Hiraga P18
 K. Oda P18
 K. Tamura P18
 B. Bandyopadhyay 3L3
 L. Beaulieu P81
 Monica Beltrame P16
 Marco E. Bianchi P16
 Bernhard Blumich 2SL2
 M. Feliciano P18
 McGeorge Gary P106
 N. Gonzalez P18
 David M. Grant P106
 Michael R. Green 1L4
 Robin K. Harris P82
 Christian Herrmann 1L2
 Mei Hong 3SL1
 Hans R. Kalbitzer 1L2
 Purnima Khandelwal 2L9
 Werner Kremer 1L2
 Janos K. Lanyi
 3L7, P89, P90, P92
 Michael W. Lassalle P11
 Till Maurer 1L2
 B. H. Meier P81
 Gaetano Montelione 1L9
 Richard Needleman
 3L7, P89, P90, P92
 Anita M. Orendt P106
 William S. Price
 2L4, P14, P47, P49, P59
 Sundaresan Rajesh P26
 Stefan A. Reinsberg P82
 Kenneth L. Rinehart 2L1
 Klaus Schmidt-Rohr 3L10
 Brian D. Sykes 3SL2
 J. D. van Beek P81
 Alexander Vashchenko P54
 Hans J. Vogel 2SL1
 Andrew H.-J. Wang 2L1
 Gerhard Wider 1SL1

Peter Wright 1L2
 Rong Xiao 1L9
 Xiulan Xie P102
 Xiang-lei Yang 2L1

 <あ行>
 相沢智康 1L5
 相原秀樹 P9
 相原雄一 P49, P59
 赤井智子 P116
 赤坂一之 1L2, 1L9, P11, P21
 秋山昌広 1L3
 阿久津秀雄 2L9, P72
 浅川直紀 3L8
 朝倉哲郎 P78, P81, P105
 芦田 淳 P78, P114
 阿曾幸男 P108
 足立恭子 P13, P42
 安達隆二 P101
 荒田洋治 2L4, P14, P47
 安藤 勲 2L8, 3L5, P85
 安藤慎治 P82
 阿武 泉 2L5
 飯島隆広 P84
 飯田秀博 P67
 伊倉光彦 1SL2
 池上貴久 1L3, P6, P27
 石井俊輔 P8
 石井文明 P87, P100
 石井祐子 1L6
 石黒正路 P86
 石塚靖子 P31, P52
 石原康利 2L6
 泉川大輔 P95
 板倉健人 P10
 市川真史 P74
 市川さおり 1L8
 一谷基邦 P109
 井出博之 2L4, P47
 伊藤紀幸 1L3, P27
 伊藤俊樹 P76
 伊藤 隆 P9, P10, P23, P26
 伊藤隆司 1L8
 伊藤拓宏 1L4
 伊藤三恵 P38
 伊藤泰男 P93

稲垣冬彦 1L8, P37
 犬丸 啓 3L6
 井上匡子 1L2
 井上多門 P97
 井上義夫 3L8
 井ノ岡 博 P6
 井ノ口 馨 P23
 今泉孝幸 P77
 今井貴雄 P32
 今城文雄 P74
 岩崎わかな P13
 岩下 孝 P86
 岩館満雄 P78
 岩本真理子 P26
 上杉晴一 P32
 植松孝明 2L5, P64
 鶴澤 洵 P45, P55, P96
 内田さやか 3L6
 内田雅人 3L5
 内海博明 P2, P44
 梅田匡朗 2L6
 江口剛史 P111
 江口太郎 3L1, P93
 江奈武一郎 P20
 戎井悦子 1L8, P37
 遠藤聡史 P6
 大木 出 1L3, P41
 大儀和宏 P6
 大木進野 P16, P18
 大郷耕輔 P78
 大瀧徹也 P6
 太田雅也 P33
 大塚 敦 P19
 大友崇紀 P7
 大野光宏 P10
 岡野栄之 P32
 岡本和也 2L6
 小川芳弘 P88
 沖田晃一 P109
 荻野孝史 P71
 小椋賢治 1L8, P37
 尾崎拓男 P98
 小沢鏝二郎 P22
 尾島孝男 P13
 小田正記 2L6
 小野真之介 P85

小畑真紀	P61	串田克彦	P114	坂本泰一	P26
音田治夫	P6	久保 厚	P56, P74, P76	佐久間一郎	P66
<か行>		窪田俊介	P99	佐久間千勢子	P50
甲斐莊正恒		熊谷 恵	2L7	櫻井智司	P111
1L1, P16, P18, P20, P34, P35		熊木康裕	1L5, P1, P12, P30	櫻井 実	3L8
垣花真人	P104	栗原範明	P112	酒匂千晶	P8
梶 弘典	3L10	栗原靖之	P32	佐々木 亨	P24
梶 裕之	P34, P35	黒木重樹	2L8, 3L5, P85	笹倉英史	P48
数原順子	P105	黒子弘道	3L5	佐々健太郎	P72
片平正人	P32	黒田義弘	P17	佐竹彰治	P45
加藤悦子	1L6, P28	黒丸 修	P66	佐藤一紀	P24, P29
加藤祐子	P33	桑島邦博	P12	鮫島達也	P34, P35
加藤祐輔	1L5	桑原和弘	P88	三瓶巖一	P15
加藤有介	P22	剣持直之	P15	重田征子	P33
金澤健治	P31	小泉京子	P52	柴田武彦	P9, P10, P26
金松知幸	2L6	国府田 明	P112	柴田俊之	P55
金子順一	P65	河野俊之		嶋田繁隆	P83
金田嘉次	P87		P19, P23, P24, P26, P29	嶋田一夫	P36
金橋康二	P107	小金沢望	1L5	島田治男	P5
上平美弥	P91	越 大亮	P100	清水昭夫	2L3
亀田恒徳	P105, P106	越野広雪	P45	清水秀明	P68
狩谷英里	P34, P35	小柴琢己	P12	下川繁三	P65, P66
川上 将	P42	小嶋茂雄	P108	下竹敦哉	P41
川上 勝	P21	児嶋長次郎	1L1	莊司 顯	P98
河瀬靖治	3L7	巨瀬勝美	2L5, P64, P69	白川昌宏	1L3, P6, P27, P41
川口 謙	P117	小寺義男	P26, P29	神藤平三郎	1L6, P50
川西聡政	P5	小中重弘	P43	榎葉信久	P36, P35
河野敬一	1L5, P12	小西博子	P28	末松浩人	P112
河南るり子	3L7, P89, P90	小橋川敬博	P12	須貝真理子	P19, P23
菅野玲介	P32	小林邦子	P24	杉浦眞喜子	P57
木川隆則	2L2, P10	小林央典	P32	杉浦雅紀	P25
岸 哲史	P98	小林祐次	P28	杉沢寿志	P98, P107, P111
北田千恵子	P6	小林好真	1L10	杉本恭子	P49, P59
北畠 顕	P66	古牧育男	3L4	杉本俊哉	P109
北原 治	P6	小松耕平	P105	鈴木咲良	P15
北原 亮	1L2	小松博義	P29	鈴木秋弘	P40
氣田佳喜	P113	紺野 彩	P13	鈴木和男	P38
木下隆利	3L9, P25	<さ行>		鈴木智幸	3L9
木下良正	P67	齋藤公児	3L4, P107, P110	鈴木 理	1L7
金 鐘文	P86	斉藤 肇	3L7, P58, P61,	鈴木政人	1L5
木村敦臣			P89, P90, P91, P92	鈴木好幸	P66
1L11, P54, P57, P67		佐伯純一	P32	鈴木倫太郎	P42
木村一雄	P117	酒井彦一	P71	須田真輔	P34, P35
木村英昭	P85, P98, P109	榊原伸一	P32	須原正彦	P84
京極好正	P7, P28	坂倉正義	P36	住本英樹	1L8
				関 英子	2L2

関 宏子	P2	寺沢宏明	1L8	長谷川 潤	3L7, P90
関谷紀子	P86	土井隆行	2L10	畠中英樹	1L8, P37
瀬戸治男	P46	徳永達裕	P2	八戸昌秋	P5
		戸所泰人	P72	八田知久	1L6, P28
<た行>		豊岡秀訓	2L7	服部峰之	3L2, P67, P68
高橋征三	P3, P71			花岡慎悟	P8
高橋孝志	2L10	<な行>		濱田季之	2L1
高橋栄夫	P36	内藤 晶	3L7, P58, P61,	林 繁信	3L3, P102
高橋弘樹	P96		P89, P90, P91, P92	早水紀久子	2L4, P49, P59
竹内 浩	P43	長井由木子	P8	原園としえ	P101
竹腰清乃理		中井利仁	P78, P105	樋岡克哉	P115
	P73, P75, P77, P79, P80	永井美佐	P29	引地邦男	P1, P12, P30
武田明美	P4	永尾 隆	P58, P61	土黒一郎	2L10
武田和行	P79, P80	中尾光善	P41	平井佑紀	P40
武田 定	P103	中川照眞	P17	平沖敏文	P95, P99
竹元賢治	P39	中越雅道	P2	平賀 隆	3L2, P67
多田 大	P104	永阪文惣	3L1, P93	平山幸二	P29
館 知也	P4	中澤靖元	P78, P105	深澤正徳	P66
橘 和夫	1L10	中島勝弥	P19	福田洋之	P66
楯 真一		永田宏次		福見俊夫	P118
	P18, P20, P34, P35		P13, P22, P37, P38, P42	藤井郁雄	P36
館野 賢	1L7	永田 崇	P32	藤井一馬	2L8, 3L5
田中剛史	P19, P23	中田 忠	P45	藤井直之	P33, P113
谷生道一	3L7, P89	中田充夫	P30	藤田直之	P41
谷生道一	3L7	長土居有隆	P8, P15	藤谷直樹	1L5, P12
谷口吉弘	2L3	中西洋志	P31, P52	藤野政彦	P6
田之倉 優		中別府雄作	1L3, P27	藤本孝子	P44
	P13, P22, P38, P42	中村新治	P75	藤原鎮男	P118
田村 類	P96	仲村高志	P96	藤原敏道	2L9, P72
田谷内政人	1L5	中村亘男	3L1, P93	藤原英明	
千喜良 誠	P50	中村義之	P104		1L11, P54, P57, P67
千田麻裕子	P19	中山尋量	3L1, P93	藤原正子	P33
塚田裕三	2L6	難波隆二郎	P5	藤原美穂	P25
辻 暁	3L7, P58, P61,	西田清義	P13	文野浩一	2L3
	P89, P90, P91, P92	西村善文	P8, P15	降旗一夫	P46
辻田義治	3L9, P25	西山裕介	P56	古谷昌弘	P42
土田信夫	P26	新田勝利	P1, P12	星野宏和	1L5
土屋文彦	P14	根本 直	P31	堀井文敬	P88, P94
堤 耀広		根本暢明	P13, P31, P42	堀内正隆	1L8, P37
	P87, P95, P99, P100	野口 悟	P22		
堤 遊	P52	野中正幸	P97	<ま行>	
津野久幸	2L10	則定和志	P58	前川利男	P8
出口健三	P98			前田忠計	P29
出村 誠	1L5, P12, P81	<は行>		前田美恵	P16
寺尾武彦	P56, P73, P74,	拝師智之	2L5, P64, P69	前田能崇	P17
	P75, P76, P77, P79, P80	長谷川憲一	3L4, P110	牧田智譽子	1L11

真木寿治	1L3	山口健太郎	P2
正木春彦	P10	山口 悟	3L7, P89, P92
増田憲二	P94	山越 智	P38
松井 茂	P97	山腰良晃	P110
松浦篤志	1L5	山崎和彦	1L7
松浦史登	P33	山崎俊夫	P7
松川真吾	P53	山崎俊正	1L6, P28
松木 陽	P50	山田寿美	1L6
松崎勝巳	P4	山田博昭	1L2, 1L9, P11
松嶋範男	P30	山本勝宏	P83
松田貴意	2L2	山本泰彦	P39, P40
松田夏子	2L2	湯沢 聡	1L8, P37
松田善正	2L5, P64	湯本史明	P13
丸田 睦	P83	横田真希子	P71
丸田悟朗	P103	横地政志	1L8
丸山 正	P42	横山茂之	1L4, 2L2, P9, P10
丸山季浩	P117	横山貴司	P103
三重堀茂樹	P117	吉岡桂子	P5
三島正規	1L3, P27	吉岡研一	P20
水野 猛	1L6	吉岡澄江	P108
水野元博	P84	吉岡 大	2L5
溝上 潤	P73	吉田 均	P30
御園生 誠	3L6	吉田幹晴	P22
溝渕 潔	P15	吉田充輝	P20
三森文行	2L7	吉原和雄	P86
南澤明子	P55	吉水広明	3L9, P25
宮内 実	3L9	米沢光治	P109
宮澤光博	1L5	米林香華	3L7
宮本和英	P17		
武藤 裕	1L4, P10	<ら行、わ行>	
宗像達夫	P33	李 華	1L9
村上政隆	P71	若松 馨	P4, P19
村田道雄	1L10	渡部徳子	P53, P60, P101
元田容子	2L2	渡邊英宏	2L6
本山 晃	P5	渡邊道直	P32
森越信之	P99		
森澤義富	P48		
守谷哲郎	3L2, P67, P68		
<や行>			
矢野友海	P79		
矢吹 孝	2L2		
山内一夫	2L8, P85		
山垣 亮	P52		
山縣ゆり子	P27		
山口絵未	2L2		

参加者名簿

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
Bernhard Bluemich	Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie, ITMC, RWTH, 〒 Worringer Weg 1, D-52056 Aachen, Germany	bluemich@erato.mc.rwth-aachen.de	+49-241-80-8420	+49-241-8888-185
M. Feliciano	東京都立大学理学部化学科 〒192-0397 八王子市南大沢1の1	ohki@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-4873
Mei Hong	Department of Chemistry, Iowa State University 〒 Ames, IA 50010, USA	mhong@iastate.edu	515-294-3521	515-294-0105
Sundaresan Rajesh	理化学研究所 遺伝生化学研究室 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2-1	rajesh@louise.riken.go.jp	048-467-9540	0480467-5692
Brian D. Sykes	Department of Biochemistry, University of Alberta 〒 Edmonton, Alberta, Canada T6G 2H7	brian.sykes@ualberta.ca	(780)492-5460	(780)492-0888
Hans J. Vogel	Department of Biological Sciences, University of Calgary 〒 Calgary, Alberta, T2N 1N4, Canada	vogel@ucalgary.ca	1-403-220-6006	1-403-289-9311
Markus R. Waelchli	日本ブルカー株式会社 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	mrw@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
Gerhard Wider	Molekularbiologie & Biophysik, ETH Hoggerberg 〒 CH-8093 Zurich, Switzerland	gsw@mol.biol.ethz.ch	0041-1-6333455	0041-1-6331073
相沢智康	北海道大学理学研究科生物科学専攻 〒060-0810 札幌市北区北1 0 条西 8 丁目	aizawa@sci.hokudai.ac.jp	011-706-2771	011-706-2771
相原秀樹	理化学研究所、遺伝生化学研究室 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	aihara@louise.riken.go.jp	048-467-9538	048-467-5692
相原雄一	(株) ユアサコーポレーション研究開発部第5部 〒250-0001 神奈川県小田原市扇町4-5-1	yuichi.aihara@nifty.ne.jp	0465-32-2245	0465-32-2241
赤坂一之	神戸大学大学院自然科学研究科分子集合科学専攻 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1	akasaka@kobe-u.ac.jp	078-803-5687	078-803-5688
秋田裕介	筑波大学理工学研究科 〒305-0005 つくば市天久保2-1-1筑波大学学生宿12-211	akita@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5214	なし
阿久津秀雄	横浜国立大学工学部物質工学科 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	akutsu@ynu.ac.jp	045-339-4232	045-339-4251
朝倉哲郎	東京農工大学工学部生命工学科朝倉研究室 〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16	asakura@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733	042-383-7733
芦田 淳	パリアンテクノロジーズジャパン 〒108-0023 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	jun.ashida@varianinc.com	03-5232-1238	03-5232-1264
阿曾幸男	国立医薬品食品衛生研究所 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1	aso@nihs.go.jp	03-3700-1141	03-3707-6950
安藤 勲	東京工業大学大学院理工学研究科物質科学専攻 〒152 東京都目黒区大岡山 2 - 1 2 - 1	lando@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889	03-5734-2139
安藤慎治	東京工業大学大学院理工学研究科有機高分子物質専攻 〒152-8552 目黒区大岡山 2 - 1 2 - 1	sando@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2137	03-5734-2889
飯島隆広	金沢大学大学院自然科学研究科物質構造科学専攻 〒920-1192 金沢市角間町	ijima@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp	076-264-5686	
伊倉光彦	Ontario Cancer Institute, University of Toronto 〒 610 University Av., Toronto, Ontario, Canada M5G 2M9	mikura@oci.utoronto.ca	(416)946-2025	(416)946-2055

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
池田牧子	帝人(株)構造解析研究所 〒191-8512 東京都日野市旭ヶ丘4-3-2	m.ikeda@teijin.co.jp	042-586-8121	042-586-8123
泉川大輔	北海道大学大学院工学研究科量子物理工学専攻 〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	taisuke@eng.hokudai.ac.jp	011-706-6642	
板倉健人	東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 〒354-0014 埼玉県富士見市水谷1-1-2-27	itakura@mcb.bt.a.u-tokyo.ac.jp	03-5841-3078 直	0492-55-6243
市川真史	京都大学大学院理学研究科化学専攻分子構造化学研究室 〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町	ichi@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
井出博之	(株)機能水研究所 〒305-0047 茨城県つくば市千現2-1-6	ide@wri.co.jp	0298-58-6186	0298-58-6144
射手園佳子	日本ロシュ研究所 〒247-8530 鎌倉市裾原200	yoshiko.itezono@roche.com	0467-47-2209	0467-45-6815
伊藤敦俊	千葉大学 薬学部 製剤工学研究室 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33	atutosi@p.chiba-u.ac.jp	043-290-2938	043-290-2939
伊藤俊樹	京都大学大学院理学研究科化学専攻分子構造化学分科 〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町	tottsu@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
伊藤拓宏	東京大学理学系研究科生物化学専攻 〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1	t_ito@y-sun.biochem.s.u-tokyo.ac.jp	03-5841-4394	03-5841-8057
伊藤紀幸	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 〒619-0101 奈良県生駒市高山町8916-5	no-itou@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5577	0743-72-5579
伊藤三恵	東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1	aa671102@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp	03-5841-5166	03-5841-8023
井上香織	北海道大学大学院理学研究科化学専攻構造化学研究室 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	inoue@sci.hokudai.ac.jp	011-706-3506	無し
井上匡子	神戸大学大学院自然科学研究科分子集合科学専攻 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1	kyokoino@kobe-u.ac.jp	078-881-1212	078-803-5688
井ノ岡 博	武田薬品工業(株)医薬品化学研究所 〒532-8686 大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号	lnooka_Hiroshi@takeda.co.jp	06-6300-6401	06-6300-6306
今泉孝幸	京都大学大学院理学研究科化学専攻分子構造化学研究室 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	tak@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
井町美佐子	日本ブルカー株式会社 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	mi@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
岩下 孝	(財)サントリ-生物有機科学研究所 〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1	iwashita@sunbor.or.jp	075-962-3742	075-962-2115
岩瀬由紀子	福岡大学薬学部 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1	wase@fukuoka-u.ac.jp	092-871-6631	092-863-0389
植垣隆浩	三菱化学(株)横浜総合研究所 分析物性研究所 〒227-8502 横浜市青葉区鶴志田町1000	uechan@rc.m-kagaku.co.jp	045-963-3166	045-963-4261
植木定雄	日本ブルカー株式会社 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	su@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
上杉晴一	横浜国立大学工学部 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台7 9-5	uesugi@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	045-3394265	045-339-4265

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
上田貴洋	大阪大学大学院理学研究科化学専攻構造物理化学研究室 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-1-6	ueda@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5779	06-6850-5785
植松孝明	筑波大学 物理工学系 〒305-8573 茨城県つくば市天王台1-1-1	uematsu@mrilab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5214	0298-53-5214
鶴澤 洵	理化学研究所 分子構造解析室 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	uzawa@rikennmr.riken.go.jp	048-467-9361	048-462-4627
江口剛史	日本電子株式会社 第一設計技術本部第二グループ 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	t-eguchi@jeol.co.jp	042-542-2239	042-546-8760
江口太郎	大阪大学大学院理学研究科 〒560-0043 豊中市待兼山町1-1-6	eguchi@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5778	06-6850-5785
江奈武一郎	東京都立大学大学院理学研究科化学専攻 〒141-0022 東京都品川区東五反田3-18-9-202	ena@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	
海老沢計慶	味の素(株)中央研究所分析研究部 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1	clm_ebisawa@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7249	044-210-5872
恵良田知樹	北海道大学工学研究科 〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	erata@dove-mc.eng.hokudai.ac.jp	011-706-6566	011-706-6566
大木 寛	広島大学大学院理学研究科 〒739-8526 東広島市鏡山1丁目3-1	hohki@sci.hiroshima-u.ac.jp	0824-24-7419	
大木進野	東京都立大学理学部化学科有機第1研究室 〒192-0397 八王子市南大沢1の1	ohki@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-4873
大胡 雄	東京都立大学大学院理学研究科化学専攻(有機1) 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	oog@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	
大塚 敦	群馬大学工学部生物化学工学科 〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	m8b321@edu.cc.gunma-u.ac.jp	0277-30-1439	0277-30-1439
大津直子	味の素(株)中央研究所分析研究部 〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町1-1	clm_ootu@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7249	044-210-5872
大友崇紀	大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 吹田市山田丘3-2	otomo@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8598	06-6879-8800
大野 靖	日本たばこ産業(株)医薬総合研究所 〒569-1125 大阪府高槻市紫町1-1	yasushi.ono@ims.jti.co.jp	0726-81-9700	0726-81-9725
小川 潔	旭化成工業株式会社ライフ総研 製剤研究所 〒410-2321 静岡県田方郡大仁町三福632-1	a9086781@uf.asahi-kasei.co.jp	0558-76-7085	0558-76-2947
荻野孝史	国立精神・神経センター 神経研究所 〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1	ogino@ncnp.go.jp	042-341-2711	042-42-7521
小椋賢治	北海道大学大学院薬学研究科構造生物学分野 〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目	ogura@pharm.hokudai.ac.jp	011-706-3750	011-706-4979
折戸尚子	(株)科学技術研究所分析部 〒140-001 東京都品川区北品川3丁目10-2	hiraoki@eng.hokudai.ac.jp	03-3474-6662	03-3474-6650
甲斐荘正恒	東京都立大学大学院理学研究科化学専攻 〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1	kainosho@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2544	0426-77-2525
垣田信吾	協和発酵 東京研究所 〒194-8533 町田市旭町 3-6-6	skakita@kyowa.co.jp	042-725-2555	042-726-8330

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
梶 弘典	京大化研 〒606-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学化学研究所	kaji@mail.pse.umass.edu	0774-38-3152	0774-38-3148
加藤悦子	農業生物資源研究所 染色体操作研究室 〒305-8602 つくば市観音台2-1-2	ekatoh@abr.affrc.go.jp	0298-38-7072	0298-38-8399
加藤祐子	東和大学東洋学研究所 〒828-0082 福岡県豊前市大河内312番地	yukato@bronze.ocn.ne.jp	0979-84-5005	0979-84-5004
金子順一	北海道農業試験場虫害研究室 〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘1番地	jkpure47@cryo.affrc.go.jp	011-857-9280	011-859-2178
金田嘉次	北海道大学大学院工学研究科量子物理学専攻 〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	kaneta@eng.hokudai.ac.jp	011-706-6642	
金橋康二	新日本製鉄(株)技術開発本部先端技術研究所解析科学研究所 〒293-8511 千葉県富津市新富20-1	kanehasi@re.nsc.co.jp	0439-80-2264	0439-80-2746
上平美弥	姫路工業大学理学部生命科学科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1	kamihira@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182	0791-58-0182
亀田恒徳	東京農工大学工学部生命工学科朝倉研究室 〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16	tkameda@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733	042-383-7733
狩谷英里	東京都立大学 大学院 理学研究科 化学専攻 〒206-0803 東京都稲城市向陽台 4-2 みはらしの家 D-107	kariya@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	
川口 謙	(株)東レリサーチセンター、構造解析研究室 〒248-8555 鎌倉市手広1111番地	Ken_Kawaguchi@trc.toray.co.jp	0467-32-9976	0467-32-0414
川崎政人	北海道大学大学院薬学研究科構造生物学分野 〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目	kawasaki@pharm.hokudai.ac.jp	011-706-3750	011-706-4979
川島裕之	資源環境技術総合研究所エネルギー資源部 〒305-8569 つくば市小野川16-3	hk@nire.go.jp	0298-58-8413	0298-58-8408
川村多聞	北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	tamon@gogh.sci.hokudai.ac.jp	011-706-3809	無し
木川隆則	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	kigawa@jota.riken.go.jp	048-467-9798	048-467-9785
菊地 淳	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	kikuchi@jota.riken.go.jp	048-467-9798	048-467-9795
岸 哲史	群馬大学工学部生物化学工学科(荘司研) 〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	m8b310@edu.cc.gunma-u.ac.jp	0277-30-1443	0277-30-1443
氣田佳喜	日本電子(株)分析機器技術本部 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	ykida@jeol.co.jp	042-542-2236	042-546-8068
木村雅晴	住友化学工業(株)生物環境科学研究所 〒5548558 大阪市此花区喜日出中3-1-98	kimuram@sumitomo-chem.co.jp	06-6466-5171	06-6466-5459
木村敦臣	大阪大学医学部保健学科医用物理学講座 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-7	kimura@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-879-2577	06-879-2577
木村一雄	(株)東レリサーチセンター、構造解析研究室 〒248-8555 鎌倉市手広1111番地	Kazuo_Kimura@trc.toray.co.jp	0467-32-9976	0467-32-0414
木村由美子	日本大学薬学部分析センター 〒274-8555 千葉県船橋市習志野台7-7-1	kimura@pha.nihon-u.ac.jp	047-465-7362	047-465-7362

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
串田克彦	バリアンテクノロジーズジャパン 〒108-0023 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	katsuhiko.kushida@varianinc.com	03-5232-1238	03-5232-1264
熊木康裕	北海道大学大学院理学研究科高分解能核磁気共鳴装置研究室 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	kumaki@gogh.sci.hokudai.ac.jp	011-706-3572	011-706-4992
黒木重樹	東京工業大学大学院物質科学専攻 〒152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	skuroki@polymer.titech.ac.jp	03-3726-1111	03-5734-2889
黒田義弘	京都大学薬学研究所 〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町	yokuroda@pharm.kyoto-u.ac.jp	075-753-4530	075-753-4578
桑野晴光	自宅 〒194-0043 東京都町田市成瀬台1-17-9	hiraoki@eng.hokudai.ac.jp	042-725-4693	042-725-4693
桑原和弘	京都大学化学研究所材料物性基礎研究部門III 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	kuwabara@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3152	0774-38-3148
神田大輔	生物分子工学研究所 構造解析研究部門 〒565-0874 大阪府吹田市古江台6丁目2-3	kohda@beri.co.jp	06-6872-8218	06-6872-8219
河野俊之	三菱化学生命科学研究科構造解析研究室 〒194-8511 東京都町田市南大谷11号	tkohno@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6285	042-724-6296
越 大亮	北海道大学大学院工学研究科量子理工学専攻 〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	koshi@eng.hokudai.ac.jp	011-706-8642	
越野広雪	理化学研究所分子構造解析室 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	koshino@postman.riken.go.jp	048-462-1111	048-462-4627
児嶋長次郎	東京都立大学理学部化学科 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	kojima@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-1111	0426-77-4873
巨瀬勝美	筑波大学理工学系 〒305-8573 つくば市天王台1-1-1	kose@bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5335	0298-53-5205
小寺麟男	北里大学理学部 〒229-8555 相模原市北里1-15-1	kodera@kitasato-u.ac.jp	042-778-9540	042-778-9953
小橋川敬博	北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	kob@sci.hokudai.ac.jp	011-706-2985	:011-706-4992
小林邦子	(株)三菱化学生命科学研究科 構造解析研究室 〒194-8511 東京都町田市南大谷11号	kuniko@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6285	042-724-6296
小林好真	東京大学大学院理学系研究科化学専攻 〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1	sohta@chem.s.u-tokyo.ac.jp	03-5841-4646	03-5841-8059
小林央典	横浜国立大学工学部物質工学科上杉・片平研究室 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	hisanori@mac.bio.bsk.ynu.ac.jp	045-339-4264	045-339-4264
小松一男	(株)資生堂研究所 基盤研究センター 〒223-8553 横浜市港北区新羽町1050	komatsu_kazuo@po.shiseido.co.jp	045-542-5296	045-545-2811
斉藤 肇	姫路工業大学理学部生命科学科 〒678-1297 兵庫県上郡町光都3丁目2-1	saito@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0181	0791-58-0182
齋藤公児	新日本製鐵(株)先端技術研究所 〒293-8511 富津市新富20-1	saito@re.nsc.co.jp	0439-80-2270	0439-80-2746
坂倉正義	東京大学大学院薬学系研究科 〒113-0033 文京区本郷7-3-1	sakakura@mol.f.u-tokyo.ac.jp	03-5841-4814	03-3815-6540

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
坂田 雄一	三菱化学株式会社 筑波研究所 物性分析研究室 〒300-0332 茨城県稲敷郡阿見町中央 8-3-1	3806479@cc.m-kagaku.co.jp	0298-87-0946	0298-87-3257
佐久間千鶴子	東京薬科大学中央分析センター 〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1	sakumac@ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4041	0426-76-4041
笹倉英史	旭硝子(株) 中央研究所 〒221-8755 横浜市神奈川区羽沢町1150	sasakura@agc.co.jp	045-374-8816	045-374-8872
佐藤明啓	藤沢薬品工業株式会社基盤技術研究室 〒532-8514 大阪市淀川区加島 2丁目1番6号	akihiro_sato@po.fujisawa.co.jp	06-6390-1326	06-6304-1192
佐藤 一	日本ブルカー株式会社 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	one@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
沢辺 紀子	東京理科大学薬学部 〒162-0826 新宿区市ヶ谷船河原町12番地	bunkouns@ps.kagu.sut.ac.jp	03-3260-4272	03-3268-3045
柴田俊之	理化学研究所生体高分子物理研究室 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1	toshiba@postman.riken.go.jp	048-467-9388	048-462-4647
嶋田繁隆	名古屋工業大学(材料工学科) 〒466-8555 名古屋市昭和区御膳所町	shimada@mse.nitech.ac.jp	052-735-5263	052-735-5294
島田治男	資生堂医薬品研究所分析研究ユニット 〒236-8643 横浜市金沢区福満2-12-1	shimada_haruo@po.shiseido.co.jp	045-788-7276	045-788-7280
下川繁三	テクノサイエンス ラボ 〒069-0854 江別市大麻中町22-18	sigebo@ma4.seikyoku.ne.jp	011-386-4855	011-386-4855
荘司 顯	群馬大学工学部生物化学工学科 〒378-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	shoji@bce.gunma-u.ac.jp	0277-30-1443	0277-30-1443
白川昌宏	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 〒630-0101 生駒市高山町8916-5	shira@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5571	0743-72-5579
榛葉 信久	味の素(株) 中央研究所分析研究部 〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1	clm_sinba@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-7249	044-210-5872
末松 浩人	日本電子(株) 分析機器技術本部 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	suematsu@jeol.co.jp	042-542-2236	042-546-8068
菅瀬 謙治	(財) サントリー-生物有機科学研究所 〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1	sugase@sunbor.or.jp	075-962-3742	075-962-2115
杉浦真喜子	神戸薬科大学中央分析室 〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1	makiko-s@kobepharma-u.ac.jp	078-441-7591	078-441-7592
鈴木 榮一郎	味の素(株) 中央研究所分析研究部 〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1	clm_suzuki@te10.ajinomoto.co.jp	044-244-5832	044-210-5872
鈴木 崇洋	筑波大学理工学研究科 〒270-0101 千葉県流山市東深井449-10-205	suzuki@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5214	
鈴木 倫太郎	東京大学農学生命科学科応用生命工学専攻 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1	aa77113@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp	03-5841-5446	03-5841-8023
関 宏子	千葉大学 分析センター 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33	seki@cac.chiba-u.ac.jp	043-290-3810	043-290-3813
高瀬 茂弘	藤沢薬品工業株式会社 探索研究所 合成 〒300-2698 つくば市東光台 5-2-3	shigehiro_takase@po.fujisawa.co.jp	0298-47-8611	0298-47-8313

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
高橋 清大	北海道大学理学部生物科学科生体高分子解析学第一講座 〒060-0810 北海道札幌市厚別区上野幌1条4丁目5-12	takahasi@gogh.sci.hokudai.ac.jp	011-706-3809	
高橋 征三	日本女子大学理学部物質生物科学科 〒112-8687 東京都文京区目白台2-8-1	t_seizo@jwu.ac.jp	03-3943-3131	03-3942-6116
高橋 弘樹	理化学研究所 分子構造解析室 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	tah@postman.riken.go.jp	048-467-9396	048-462-4627
高山 俊夫	神奈川大学工学部応用化学科 〒221-8686 横浜市神奈川区六角橋3-27-1	takayama@cc.kanagawa-u.ac.jp	045-481-5661	045-413-9770
高山 陽子	塩野義製薬株式会社創薬研究所物理化学部門 〒553-0002 大阪市福島区麗洲5-12-4	yohko.takayama@shionogi.co.jp	06-6458-5861	06-6458-0967
竹内 浩	北海道大学大学院理学研究科化学専攻構造化学研究室 〒060-0810 札幌北区北10条西8丁目	a10881@hop.hucc.hokudai.ac.jp	011-706-3506	011-706-4924
竹腰 清乃理	京都大学大学院理学研究科化学 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
武田 明美	群馬大学工学部生物化学工学科 〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	m8b321@edu.cc.gunma-u.ac.jp	0277-30-1439	0277-30-1439
武田 定	群馬大学工学部 〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	stakeda@chem.gunma-u.ac.jp	0277-30-1382	0277-30-1380
武田 和行	京都大学大学院理学研究科 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	takeda@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
竹元 賢治	筑波大学大学院化学研究科 〒305-8571 茨城県つくば市天王台1-1-1	takemoto@first.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369	0298-53-7369
多田 大	東京工業大学 応用セラミックス研究所 垣花研 〒226 横浜市緑区長津田町4259	robert1@rlm.titech.ac.jp	045-924-5310	045-924-5309
田中 剛史	三菱化学生命科学研究所構造解析研究室 〒194-8511 東京都町田市南大谷11号	takeshi@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6285	042-724-6296
田中 彬嗣	九州大学大学院薬学研究科 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1	hiraoki@eng.hokudai.ac.jp	092-642-6551	092-642-6551
谷生 道一	兵庫県立姫路工業大学理学部生命科学科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3丁目2-1	tanio@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182	0791-58-0182
田之倉 優	東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1	amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp	03-5841-5185	03-5841-8023
田村 友美	日本ブルカー株式会社 〒564-0051 大阪府吹田市豊津17-5	tot@bruker.co.jp	06-6339-7008	06-6339-7010
土屋 文彦	機能水研究所 研究部 〒305-0047 つくば市千環2-1-6 つくば研究支援センター内D-5	tsuchiya@wri.co.jp	0298-58-6186	0298-58-6144
手塚 亮典	バリアンテクノロジーズジャパン 〒108-0023 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	akinori.tezuka@varianinc.com	03-5232-1238	03-5232-1264
出村 誠	北海道大学大学院 理学研究科生命科学専攻 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	demura@sci.hokudai.ac.jp	011-706-2771	011-706-2771
寺尾 武彦	京都大学大学院理学研究科化学教室 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4011	075-753-4000

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
寺北 晃	武田薬品分析代謝研究所 〒532-8686 大阪市淀川区十三本町2-17-85	Terakita_Akira@takeda.co.jp	06-6300-6068	06-6300-6086
寺沢宏明	財団法人 東京都臨床医学総合研究所 生理活性物質 〒113-8613 東京都文京区本駒込3-18-22	terasawa@rinshoken.or.jp	03-3823-2101	03-3823-1247
堂本竹雄	日本ブルカー株式会社 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	td@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
土江松美	大阪市立大学理学研究科 〒657-0031 神戸市灘区大和町3-2-12-105 (自宅)	matsumi@sci.osaka-cu.ac.jp	06-6605-2597	06-6605-2522
徳永達裕	山之内製薬株式会社分析代謝研究所分析研究室 〒305-8585 つくば市御幸が丘21番地	tokunaga@yamanouchi.co.jp	0298-54-1624	0298-52-9585
戸所泰人	横浜国立大学工学部物質工学科阿久津・藤原研究室 〒241-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	m99db088@ynu.ac.jp	045-339-4224	045-339-4251
内藤 晶	姫路工業大学 理学部 生命科学科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1	naito@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0180	0791-58-0182
永井敦子	理化学研究所 分子構造解析室 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	anagai@postman.riken.go.jp	048-462-1111	048-462-4627
中井利仁	徳島大学工学部共通講座 〒770-8506 徳島市南常三島町2-1	nakai@pm.tokushima-u.ac.jp	088-656-9224	088-656-7752
永井美佐	北里大学理学部 〒228-8555 相模原市北里1-15-1	mnagai@walrus.sci.kitasato-u.ac.jp	042-778-9541	042-778-9553
永阪文憲	帝人(株) 構造解析研究所 〒191-8512 東京都日野市旭ヶ丘4-3-2	bunsow@kk.hino.teijin.co.jp	042-586-8121	042-586-8123
中澤靖元	東京農工大学工学部生命工学科朝倉研究室 〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16	yasumoto@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733	042-383-7733
中田真一	秋田大学工学資源学部環境物質工学科 〒010-8502 秋田市手形学園町1-1	snakata@ipc.akita-u.ac.jp	018-889-2437	018-889-2437
中西洋志	工業技術院生命工学工業技術研究所生体物質部 〒3058566 茨城県つくば市東1-1	nakanisi@nibh.go.jp	0298-54-6136	0298-54-6135
中村 義之	東京工業大学 資源化学研究所 〒226 横浜市緑区長津田町4259	ynakamur@res.titech.ac.jp	045-924-5110	045-924-5309
中村新治	京都大学大学院理学部化学教室分子構造研究室 〒606-01 京都市左京区北白川追分町	nakashin@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
中村巨男	大阪大学大学院理学研究科 〒560-0043 豊中市待兼山町1番16号 共通教育化学棟内	nobuo@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5791	06-6850-5785
西川紀恵	明治製菓(株) 薬品総合研究所創薬研究所薬物設計G 〒222-8567 横浜市港北区師岡町760	norie_nishikawa@meiji.co.jp	045-545-3125	045-545-3199
西崎知子	三共株式会社 〒140-8710 東京都品川区広町1-2-58	tomonz@shina.sankyo.co.jp	03-3492-3131	03-5436-8567
西山裕介	京都大学大学院理学研究科化学教室分子構造化学講座 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	nishi@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4014	075-753-4000
沼田泰夫	帝人(株) 構造解析研究所 〒191-8512 東京都日野市旭ヶ丘4-3-2	y.numata@teijin.co.jp	042-586-8121	042-586-8123

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
根本 直	工業技術院生命工学工業技術研究所生体物質部 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1	nemoto@nibh.go.jp	0298-54-6126	0298-54-6135
根本暢明	バリアンテクノロジーズジャパン 〒108-0023 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	nobuaki.nemoto@varianinc.com	03-5232-1238	03-5232-1264
野口 滋	第一製薬(株)製薬技術研究所 〒134-8630 江戸川区北葛西1-16-13	noguczow@daiichipharm.co.jp	03-3680-0151	03-5696-8339
野中正幸	筑波大学物理学系井上松井研究室 〒305-8573 茨城県つくば市天王台1-1-1	nonaka@ctlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5048	0298-53-5048
則定和志	兵庫県立姫路工業大学理学部生命科学科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3丁目2-1	norisada@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182	0791-58-0182
拝師智之	筑波大学物理学系巨瀬研究室 〒305-8573 つくば市天王台1-1-1	haishi@mlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-521	0298-53-5205
長谷川憲一	日本電子株式会社 基礎研究所 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	hasegawa@jeol.co.jp	042-542-2244	042-546-8088
長谷川 淳	第一製薬(株)創薬基盤研究所 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1-16-13	haseg71@daiichipharm.co.jp	03-3680-0151	03-5696-8336
八田知久	農水省農業生物資源研究所生体工学部染色体操作研究室 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2	ha@protein.osaka-u.ac.jp	0298-38-7072	0298-38-8399
服部峰之	通産省 工業技術院 電子技術総合研究所 超分子部 〒305-8568 茨城県つくば市梅園1-1-4	mhattori@etl.go.jp	0298-54-5537	0298-54-3364
馬場雄久	北見工業大学 〒090-8507 北海道北見市公園町165	take@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-26-0862	0157-26-0862
濱島 斉	三和化学研究所創薬研究所 〒511-0406 三重県員弁郡北勢町塩崎3-6-3番地	hamajima@mb4.skk-net.com	0594-72-6221	0594-82-0072
濱田季之	理化学研究所、ゲノム科学総合研究センター、蛋白質構造・機能研究G 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	thamada@jota.riken.go.jp	048-467-9798	048-467-9785
林 繁信	物質工学工業技術研究所基礎部固体NMRグループ 〒305-8565 茨城県つくば市東1-1	hayashi@nimc.go.jp	0298-54-4515	0298-54-4524
早水紀久子	物質工学工業技術研究所 〒305-8565 つくば市東1-1	hayamizu@nimc.go.jp	0298-54-4525	0298-54-4525
原 雄一	中外製薬(株) 製剤技術研究所 〒171-8545 東京都豊島区高田3-41-8	harayui@chugai-pharm.co.jp	03-3987-1193	03-3987-5169
原園としえ	三菱化学横浜総合研究所 〒227-8502 横浜市青葉区鴨志田町1000	harazono@rc.m-kagaku.co.jp	045-963-3166	045-963-4261
原田治幸	京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 〒606-8501 京都市左京区吉田本町京都大学工学研究科分子工学専攻	haruyuki@mds.moleng.kyoto-u.ac.jp	075-753-5937	075-751-7611
香山英幸	三共・バイオメディカル研究所 〒140-8710 品川区広町1-2-5 8	haru@shina.sankyo.co.jp	03(3492)3131	03(5436)8567
樋岡克哉	日本電子(株)分析機器技術本部 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	hioka@jeol.co.jp	042-542-2236	042-546-8068
土黒一郎	東京工業大学大学院理工学研究科応用化学専攻高橋研 〒152-8558 東京都目黒区大岡山2-12-1	ihijikur@o.c.titech.ac.jp	03-5734-2111	03-5734-2884

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
平井佑紀	筑波大学化学系山本研究室 〒305-8571 茨城県つくば市天王台1-1-1	hexagram@first.tsukuba.ac.jp	(0298)53-7369	(0298)53-7369
平冲敏文	北海道大学工学研究科量子物理学専攻 〒060-8628 札幌市北区北13西8	hiraoki@eng.hokudai.ac.jp	011-706-6640	011-716-6175
平山幸司	北里大学理学部 〒228-8555 相模原市北里1-15-1	hirayama@walrus.sci.kitasato-u.ac.jp	042-778-9541	042-778-9553
福井洋之	北見工業大学 〒090-8507 北海道北見市公園町165	fukui@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-26-9402	0157-24-7719
福田洋之	北大医学部循環動態内科学 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目	hirofuku@med.hokudai.ac.jp	011-716-1161	011-706-7874
福見俊夫	大阪工業技術研究所 首席研究官 〒563-3 大阪府池田市緑丘1-8-31	fuku@onri.go.jp	0727-51-9670	0797-51-9633
藤井直之	日本電子(株)分析機器技術本部応研センター 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	nfujil@jeol.co.jp	042-542-2241	042-546-8068
藤倉一繁	バリアンテクノロジーズジャパン 〒108-0023 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	kazushige.fujikura@varianinc.com	03-5232-1238	03-5232-1264
藤本孝子	日本電子(株)分析機器技術本部応用研究センターNM応用研究グループ 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	tfujimot@jeol.co.jp	042-542-2241	042-542-8068
藤原英明	大阪大学医学部医用工学講座 〒565-0871 吹田市山田丘1-7	fujiwara@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-6879-2573	06-6879-2573
藤原敏道	横浜国立大学工学部物質工学科 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	tfjwr@ynu.ac.jp	045-339-4224	045-339-4251
藤原靖弘	京都薬科大学構造有機化学教室 〒607-8414 京都市山科区御陵中内町5	fujiwara@mb.kyoto-phu.ac.jp	075-595-4637	075-595-4766
文野浩一	立命館大学理工学部化学科(分子物性化学研究室) 〒664-0881 兵庫県伊丹市昆陽7-70	k-fumi@mail.se.ritsumei.ac.jp	077-566-1111	077-561-2659
降旗一夫	東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1、	furihata@mcb1.iam.u-tokyo.ac.jp	03-5841-5460	03-5841-8485
古田浩祐	杏林製薬(株)中央研究所 創薬研究一部 〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木字御手洗2399-1	fvbb0981@mb.infoweb.or.jp	0280-56-2201	0208-57-1293
星野鉄哉	日立化成工業株式会社総合研究所 〒300-4247 茨城県つくば市和台48	HCN00727@nifty.ne.jp	0298-64-4000	0298-64-4008
堀井文敬	京大化研 〒611-0011 宇治市五ヶ庄	horii@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3150	0774-38-3148
前田史郎	福井大学工学部生物応用化学科 〒910-8507 福井市文京3-9-1	maeda@acbio.acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8635	0776-27-8747
前田能崇	京大院薬 〒6068501 京都市左京区吉田下阿達町46-29	f30w0164@ip.media.kyoto-u.ac.jp	0757534531	
碓崎 守	バリアンテクノロジーズジャパン 〒108-0023 東京都港区芝浦4-16-36	mamoru.makizaki@varianinc.com	03-5232-1236	03-5232-1264
増田勝彦	三菱化学(株)医薬開発研究所物性分析A 〒314-0255 茨城県鹿嶋郡波崎町砂山14	2505186@cc.m-kagaku.co.jp	0479-46-4621	0479-46-6113

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
増田憲二	京都大学化学研究所材料物性III 〒611-0011 宇治市五ヶ庄	masuda@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3149	0774-38-3152
松田善正	筑波大学第三学群基礎工学類物理工学専攻 〒305-0005 茨城県つくば市天久保2-1-1 平砂8-118	matsuda@mlrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5214	0298-53-5214
三島正規	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 〒630-0101 奈良県生駒市高山町8916-5	m-misima@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5573	0743-72-5579
水野 敬	京都大学大学院理学研究科化学専攻 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	mizuno@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	075-753-4000
溝上 潤	京都大学大学院理学研究科化学専攻分子構造化学研究室 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	mizokami@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4015	無
三森文行	国立環境研究所 環境健康部 〒305-0053 つくば市小野川16-2	mitumori@nies.go.jp	0298-50-2352	0298-50-2574
村林秀樹	株式会社 武田分析研究所 〒532-8888 大阪市淀川区十三本町2-17-85	Murabayashi_Hideki@takeda.co.jp	06-6300-6540	06-6300-6047
森 輝雄	三菱化学(株)横浜総合研究所分析物性研究所 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地	3707337@cc.m-kagaku.co.jp	045-963-3186	045-963-4261
森越信之	北海道大学大学院工学研究科量子物理学専攻 〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	morikosi@eng.hokudai.ac.jp	011-706-6642	
諸橋昭雄	萬有製薬(株)つくば研究所構造性物NMR 〒300-2611 茨城県つくば市大久保3番地	morhsiak@banyu.co.jp	0298-77-2000	0298-77-2029
八島秀仁	日本ブルカー株式会社 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	yas@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
矢野友海	京都大学大学院理学研究科化学専攻分子構造化学研究室 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	yano@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4014	075-753-4000
山内一夫	日本ブルカー株式会社 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	yam@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
山口 悟	姫路工業大学理学部生命科学科生体物質構造学II 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3丁目	satoru@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182	0791-58-0182
山口 徹	塩野義製薬株式会社研究所 〒553-0002 大阪市福島区鷺洲5-12-4	tohru.yamaguchi@shionogi.co.jp	06-6458-5861	06-6458-0987
山口友行	(株)リコー中央研究所基盤技術研究センター 〒224 横浜市都築区新栄町16-1	toya@rdc.rioh.co.jp	045-590-1651	045-593-1896
山腰良晃	日本電子株式会社 第1設計技術本部2グループ 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	yamakosi@jeol.co.jp	042-542-2239	042-546-8760
山崎和彦	工業技術院生命工学工業技術研究所分子生物部 〒305-8566 つくば市東1-1	kyamasak@nibh.go.jp	0298-54-6536	0298-54-6534
山崎俊夫	大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 吹田市山田丘3-2	yamazaki@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8598	06-6879-8600
山田英二	北海道大学工学部NMR研究室 〒060-8628 札幌市北区北13西8	eiya@eng.hokudai.ac.jp	011-706-6795	011-757-1981
山本昭彦	日本ブルカー株式会社 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	ay@bruker.co.jp	0298-52-1236	0298-58-0322

氏名	勤務先 住所	E-mail	TEL	FAX
山本泰彦	筑波大学化学系 〒305-8571 茨城県つくば市天王台1丁目1番1号	yamamoto@staff.chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369	0298-53-7369
禪 知明	横浜国立大学 工学部 物質工学科 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	T-YUZURI@synchem.bsk.ynu.ac.jp	045-339-3964	045-339-3964
吉田 均	北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻生体高分子解析学講座1 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	yoshida@gogh.sci.hokudai.ac.jp	011-706-3809	
好田真由美	協和発酵工業(株)東京研究所 〒194-8533 東京都町田市旭町3-6-6	myoshida@kyowa.co.jp	042-725-2555	042-726-8330
吉野明広	名古屋工業大学工学部応用化学科 〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町	yoshino@ach.nitech.ac.jp	052-735-5241	052-735-5247
吉水広明	名古屋工業大学材料工学科有機材料コース 〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町	yosimizu@mse.nitech.ac.jp	052-735-5272	052-735-5272
李 華	神戸大学大学院自然科学研究科 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1	li@kobe-u.ac.jp	078-803-5687	078-803-5688
若松 馨	群馬大学工学部生物化学工学科 〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	m8b321@edu.cc.gunma-u.ac.jp	0277-30-1439	0277-30-1439
和田 武	日本ブルカー株式会社 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	wad@bruker.co.jp	0298-52-1234	0298-58-0322
渡邊永治	立教大学理学部化学科秋山研究室 〒171-8501 豊島区西池袋3-3-4-1	eiji-jun@umin.ac.jp	03-3985-2368	03-5992-3434
渡辺てるみ	三共株式会社分析代謝研究所 〒140-8710 東京都品川区広町1-2-5 8	terumi@shina.sankyo.co.jp	03-3492-3131	03-5436-8567
渡部徳子	東京水産大学食品生産学科 〒108-8477 東京都港区港南4-5-7	tokuko@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0643	03-5463-0643
堤 耀広	北海道大学大学院工学研究科量子物理工学専攻 〒060-8628 札幌市北区北13西8	atsutsu@eng.hokudai.ac.jp	011-706-6639	011-716-6175