

第39回 NMR 討論会

講演要旨集

日時 2000年11月8日(水)～11月10日(金)

会場 こまばエミナース

共催

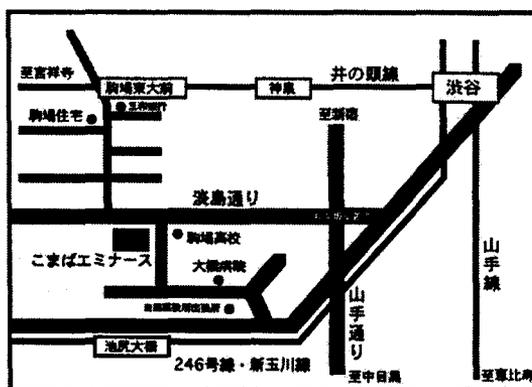
日本化学会・日本分析化学会・日本薬学会・日本生化学会・高分子学会
日本農芸化学会・日本物理学会・日本生物物理学会・日本磁気共鳴医学会

第39回NMR討論会 会場案内

こまばエミナース
(東京都目黒区大橋 2-19-5)

<http://www.komaba-eminence.com/annai.htm>

◇会場案内



◇交通

京王井の頭線駒場東大前駅 (西口) より徒歩 5 分
東急新玉川線池尻大橋駅 (北口) より徒歩 1 2 分
渋谷駅 (南口) よりタクシー 5 分

◇連絡先

理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター
タンパク質構造・機能研究グループ

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22

横山 茂之

TEL: 045-503-9196 FAX:045-503-9195

E-mail: yokoyama@nmr39.riken.go.jp

<http://nmr39.riken.go.jp>

◇当日連絡先

TEL:03-3485-1416 (ホール直通)

第39回NMR討論会プログラム

1日 11月8日(水)

10:00-10:10)

会の挨拶

10:10-10:50)

長 白川昌宏

1. マイクロ秒領域での超高速パルスラベルによる蛋白質の非ヒエラルキー的構造形成過程の研究 2
(岐阜大医¹、フォックス・チェイス癌センター²、阪大蛋白研³)
桑田一夫¹、Ramachandra Shastry²、Heinrich Roder²、後藤祐児³

2. タンパク質複合体の界面残基を同定するNMR測定法の開発 4
(東大院薬) ○嶋田一夫

休憩 -

11:10-12:30) 特別講演

長 阿久津秀雄

IL1 Resolution of structural details of membrane-embedded proteins using solid state NMR methods 6
(Oxford University, UK) Anthony Watts

長 横山茂之

IL2 Structural Proteomics of an Archaeon 7
(University of Toronto, Canada) Cheryl H. Arrowsmith

14:00-16:00)

スターセッション (説明義務ポスター番号: 奇数)

16:00-17:20) 特別講演

長 荒田洋治

IL3 BMRB: the Biomolecular Magnetic Resonance Data Bank 8
(University of Wisconsin-Madison, USA) John L. Markley

長 西村善文

IL4 Structural biological characterization using NMR relaxation approaches 9
(The Rockefeller University, USA) David Cowburn

休憩 -

17:40-18:20)

長 嶋田一夫

3. スカラー結合を利用した水素結合の直接観察法と残余双極子相互作用を利用した新しい測定法 10
(奈良先端大バイオ¹、理研²、日本ブルカー³) 三島正規¹、伊藤紀之¹、Jun-Goo Jee¹、池上貴久¹、
畑中稔²、横山茂之²、伊藤隆²、M. Waelchli³、○白川昌宏¹

4. 溶液マジック角試料回転を利用した溶液中蛋白質のCSA・残余双極子効果の定量的観測 12
(北陸先端大新素材センター) ○楯真一、栗田順一、天谷哲康、島原秀登

2日 11月9日(木)

(9:40-10:40)

長 巨瀬勝美

1. 二量子四極子分裂画像による関節軟骨応力変形の解析 18
(京都府立医大一生理・整形²、テルアビブ大化学³) ○瀬尾芳輝¹、生駒和也¹、日下義章²、H. Shinar³、
G. Navon³

2. 実験動物における薬理学的脳機能イメージング法 22
(国立環境研¹、筑波大医²) ○三森文行¹、熊谷 恵^{1,2}

- 2L3 超偏極¹²⁹Xeガスを用いた器壁による緩和効果の研究 2
 (阪大院¹、国立循環器病セ放射線²、工大院大工研³、工大院電総研⁴)
 ○藤原英明¹、木村敦臣¹、柳川康洋¹、飯田秀博²、平賀隆³、服部峰之⁴

- 休憩 -

(11:00-12:00)

座長 赤坂一之

- 2L4 超並列型MRマイクロスコープの開発—システムコンセプトとシステム設計— 2
 (筑波大理工) ○巨瀬勝美、拝師智之、松田善正

- 2L5 NMRによるリボソーム再生因子の構造解析 3
 (阪大院薬¹、RRF研究所²) ○吉田卓也¹、内山進²、中野博明¹、樫森啓真¹、木島広如¹、大嶋民子¹、
 松原正¹、岡伸一郎¹、島原秀登¹、祭原ゆかり¹、石野哲也²、吉田稔夫²、横瀬一輝²、大久保忠恭¹、
 小林祐次¹

- 2L6 フィブロンネクチンコラーゲン結合ドメイン⁶F1¹F2モジュールペアのモジュール間相対配向の決定：¹⁵N緩和時間、 3
 およびバイセル存在下での¹H-¹⁵N双極子カップリングの応用
 (オックスフォード大¹、旭化成工業²、生物分子工学研³) ○橋本康博^{1,2}、Steven P. Smith¹、Arnaud A. Bocquier³、
 Andy P. Pickford¹、Iain D. Campbell¹、Joern M. Werner¹

(14:30-15:50)

座長 甲斐荘正恒

- 2L7 NMR分光法を用いたSS結合が欠損したリゾチーム変異体の構造変化の研究 3
 (関西学院大¹、神戸大²) ○野田康夫¹、横田篤¹、富永剛史¹、谷阪喜昭¹、橘秀樹²、瀬川新一¹

- 2L8 NMRデータとJAMモデルによるscTCRの溶液構造精密化 4
 (京大院理¹、ハーバード医²) ○北尾彰朗¹、Brian Hare²、Gerhard Wagner²

座長 寺尾武彦

- 2L9 グライム化合物CH₃O-(CH₂CH₂O)_n-CH₃(n=2~50)およびリチウム塩をドープした電解液における溶媒、リチウム 4
 イオンとアニオンの自己拡散係数
 (工大院物質研¹、ユアサコーポレーション²) ○早水紀久子¹、杉本恭子¹、齋藤 剛¹、相原雄一²、
 坂東寿則²

- 2L10 NMR量子コンピュータによる蛋白質・核酸の高次構造予測序論 4
 (大工研、阪大院理) ○福見俊夫

- 休憩 -

(16:20-18:00)

座長 斉藤 肇

- 2L11 光・マイクロ波誘導核偏極 4
 (CREST¹、京大院理²) ○武田和行¹、竹腰清乃理²、寺尾武彦²

- 2L12 天然存在比¹³C-REDORによる複数原子間距離の同時測定 5
 (姫路工大¹、北里大薬²、味の素中研³) 西村勝之¹、海老澤計慶²、鈴木栄一郎³、斉藤肇¹、○内藤晶¹

座長 神藤平三郎

- 2L13 システインテトラペプチド-鉄錯体の溶液構造 5
 (山口大医療短大) ○右田たい子

- 2L14 高圧NMRが明らかにする葉酸結合型Dihydrofolate Reductaseの活性型構造 5
 (神戸大自然科学¹、広島大²) ○北原亮¹、Sareth Sina¹、山田博昭¹、大前英司²、月向邦彦²、赤坂一之¹

- 2L15 古細菌由来転写延長因子NusA蛋白質の二量体構造 6
 (生命工研構造生物¹、科技団CREST²) ○山崎和彦^{1,2}、Mark D. Allen²、鈴木理^{1,2}

(18:30-20:30)

懇親会 (こまばエミナース3階 鳳凰の間)

第3日 11月10日 (金)

(9:30-10:50)

座長 安藤 勲

L1 $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ 多次元固体NMRによる完全標識ペプチド・マストパンXのシグナル帰属と構造解析 64
 (横浜国大工¹、三菱生命研²、群馬大工³、阪大蛋白研⁴) ○藤原敏道¹、柳下元¹、福島径¹、俵山みどり¹、戸所泰人¹、佐々健太郎¹、松木陽¹、河野俊之²、若松馨³、阿久津秀雄^{1,4}

L2 固体NMRによる熱硬化性樹脂シリルカルボラン複合ジエチルベンゼンシリレンポリマーの熱硬化メカニズムの解析[3] 66
 (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、岡田和廣²、杉本俊哉²

長 堀井文敬

L3 固体NMRによる家蚕絹の繊維化前の構造と繊維化機構の解明 70
 (東京農工大工¹、バリアンテクノロジーズジャパン²、生研機構³) ○芦田淳^{1,2}、亀田恒徳^{1,3}、山根努^{1,3}、中澤靖元¹、大郷耕輔¹、朝倉哲郎¹

L4 膜タンパク質活性部位変化による広領域構造変化の ^{13}C NMRによる検出 74
 (姫路工大) 河瀬靖治、谷生道一、吉良敦史、山口悟、辻暁、内藤晶、○斉藤肇

休憩

(11:10-12:30)

長 内藤 晶

L5 カルモジュリンのメチオン側鎖のダイナミクスと水和 76
 (北大院工¹、Univ. of Calgary²) ○村井亮平¹、平沖敏文¹、H. J. Vogel^{1,2}、堤耀廣¹

L6 核酸-金属イオン相互作用の多次元NMR分光法による解析 78
 (愛媛大理¹、工技院融合研²、筑波大応生³) ○森田勇人¹、田中好幸²、田中俊之³、多比良和誠²、林秀則¹

長 河合剛太

L7 HIV-Tatタンパク質に対するRNAアプタマーの分子認識における水素結合と構造の役割 80
 (横浜国大工¹、工技院生命研²、東大院工³) ○片平正人¹、松上明正¹、大橋肅¹、小林伸一郎¹、上杉晴一¹、山本利香²、A 西川諭²、多比良和誠³、Penmetcha Kumar²

L8 ^9Be NMRピーク分離法による環状イミド三リン酸イオンの微視的錯平衡解析_ Be^{2+} イオンの窒素原子への直接的相互作用_ 82
 (神戸大工¹、神戸大院自然科学²) ○牧秀志¹、辻戸正彦²、成相裕之²

(14:00-16:00)

ミスターセッション (説明義務ポスター番号: 偶数)

(16:00-17:00)

長 神田大輔

L9 NMRによるフェレドキシソル溶液構造の決定とFNR分子認識機構の解明 86
 (農水省生物研¹、広島大²、阪大蛋白研³) ○加藤悦子¹、手島圭三²、栗栖源嗣³、楠木正巳³、長谷俊治³、山崎俊正¹

L10 多次元NMR法による2量体型不凍タンパク質の機能解析 88
 (北工研¹、富山医薬大²) 三浦和紀²、扇谷悟¹、星野保¹、三浦愛¹、近藤英昌¹、○津田栄¹

L11 Grb2の構造と機能 92
 (北大薬¹、CREST²、都臨床研³) ○稲垣冬彦^{1,2}、小椋賢治¹、湯澤聡²、西田元彦²、川崎政人²、畠中秀樹³

ミスターセッション演題

溶液測定法の開発]

'1 高圧NMR法による超臨界二酸化炭素中の溶質-溶媒相互作用 96
 (東北工研、CREST) ○金久保光央、相澤崇史、劉子敬、生島豊

'2 T_2 測定における温度上昇 98
 (北大院工) ○平沖敏文、堤耀広

[溶液応用 (蛋白質、ペプチド)]

- P 3 **Drosophila Sex-lethal** タンパク質の2タイプのRNA認識
(東大院理¹、千葉工大工²、神戸大理³、生体分子工学研⁴) 金仁実¹、武藤裕¹、伊藤拓宏¹、井上真¹、北村彩¹、Seung-Wook Chi¹、武田佳宏¹、河合剛太²、坂本博³、志村令朗⁴、横山茂之¹ 10
- P 4 G蛋白質共役型受容体(GPCR)と結合するペプチドリガンドの立体構造解析
(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}、大瀧哲也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 10
- P 5 メチル化DNA特異的リプレッサー-hMBD1のメチル化DNA結合ドメインの立体構造と相互作用
(奈良先端大バイオ¹、熊本大医²) ○大木出¹、下竹敦哉¹、藤田直之²、Jee Jun-Goo¹、池上貴久¹、中尾光善²、白川昌宏¹ 10
- P 6 Human Lysozymeの構造と運動に与える低温効果の解析
(北大院理¹、富山医薬大²、千葉県工試³、北海道工研⁴、バリアンジャパン⁵) ○久米田博之¹、三浦和紀²、小橋川敬博¹、岡千寿³、三浦愛⁴、根本暢明⁵、新田勝利¹、津田栄⁴ 10
- P 7 遠位相互作用を利用したAbp1/DNA複合体の立体構造解析
(理研GSC¹、理研細胞情報伝達²、京大ウイルス研³、藤田保衛大⁴、東大院理⁵) ○菊地淳¹、岩原淳二²、木川隆則^{1,2}、村上洋太³、岡崎恒子⁴、横山茂之^{1,2,5} 10
- P 8 タンパク質基本構造の解明研究
(理研GSC¹、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、松田貴意¹、元田容子¹、松田夏子¹、沈新春¹、横山茂之^{1,2,3} 11
- P 9 Interaction of Yeast Ubiquitin Hydrolase with Ubiquitin: An NMR Study of the 35 kDa Covalent Complex
(理研遺伝生化学¹、三菱化学生命研²、北里大理³) ○Sundaresan Rajesh¹、坂本泰一²、田中剛史²、須貝真理子²、小寺義男^{2,3}、柴田武彦¹、河野俊之²、伊藤隆¹ 11
- P 10 残余双極子結合の測定によるgalectin-3の構造とリガンド結合
(国際基督教大¹、Lund University, Sweden²、University of Georgia, USA³) ○梅本公子¹、Leffer, H.²、Prestegard, J. H.³ 11
- P 11 ラン藻 *Anabaena variabilis* M3のRNA 結合タンパク質 RbpA1の溶液構造解析
(愛媛大理¹、阪大蛋白研²、埼玉大理³、福井工大工⁴) ○村上智英¹、森田勇人¹、山崎俊夫²、佐藤直樹³、京極好正^{2,4}、林秀則¹ 11
- P 12 硫酸還元菌チトクロムc₃の酸化型および還元型における¹⁵N緩和解析
(横浜国大工¹、阪大蛋白研²) ○福岡由記¹、原田英里砂¹、藤原敏道¹、阿久津秀雄^{1,2} 11
- P 13 テロメア蛋白質hRap1のMyb様ドメインの構造解析
(横浜市大院総合理¹、阪大蛋白研²) ○花岡慎悟¹、長土居有隆¹、相本三郎²、西村善文¹ 12
- P 14 ナトリウムチャンネルのIII-IV linker領域中におけるIFM motifの構造解析
(京大院薬¹、京都工繊大²) ○宮本和英¹、金折賢二²、中川照真¹、黒田義弘¹ 12
- P 15 ペプチド-ペプチド相互作用による二次構造変化に関する研究
(京大院薬) 黒田義弘、○前田能崇、中川照真 12
- P 16 プロメラインインヒビターのpH滴定曲線の構造的解析と静電物性相関
(群大工¹、東薬大生命科学²、東大農³) ○秦野賢一¹、小島正樹²、田之倉優³、高橋健治² 12
- P 17 ペプチド・蛋白質のbicelleへの組み込みとNMR測定
(群大工¹、三菱化学生命研²) ○落合研次¹、森川友仁¹、野口真路¹、林和彦¹、楠英樹¹、窪田健二¹、須貝真理子²、河野俊之²、若松馨¹ 12
- P 18 NMR法によるSDSミセルとインフルエンザヘマグルチニン由来の膜融合ペプチドの相互作用解析
(工技院生命研¹、バリアンジャパン²) ○千葉かおり¹、根本暢明²、中西洋志¹ 13
- P 19 Ves1/Homerタンパク質、Ves1-1Sの溶液構造解析
(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 13
- P 20 SSIの低温変性状態に対する圧力効果
(神戸大自然科学¹、神戸大理²) ○笹川拓明¹、田村厚夫¹、神村耕二¹、山田博昭²、赤坂一之¹ 13
- P 21 残基間^{3h}J_{NC'} スカラカップリング観測によるプロテインG水素結合への圧力効果
(神戸大自然科学¹、神戸大理²、NIH³) ○李華¹、山田博昭²、赤坂一之^{1,2}、Angela M. Gronenborn³ 13

P 2 2	溶解度の限られている蛋白質の主鎖シグナルの効率的帰属 (生物分子工学研 ¹ 、CREST堀田プロジェクト ²) ○廣明秀一 ¹ 、清水真人 ² 、武藤隆則 ¹ 、森川耿右 ¹ 、堀田凱樹 ² 、神田大輔 ¹	142
P 2 3	抗腫瘍性抗生物質C-1027の三次元構造 (筑波大応生/TARAセ ¹ 、東北大院理 ² 、大鵬薬品 ³) ○田中俊之 ¹ 、石塚みどり ¹ 、福田純子 ² 、平間正博 ² 、大谷敏夫 ³	144
P 2 4	E11残基の置換がウシミオグロビンの活性部位構造に及ぼす影響の解析 (筑波大化 ¹ 、慶應大医 ²) ○桑原愛 ¹ 、山本泰彦 ¹ 、島田秀夫 ² 、石村巽 ²	146
P 2 5	位置特異的 ¹³ C標識グルコースを用いたNMRスペクトル解析法 (都立大理) ○江奈武一郎、甲斐荘正恒	150
P 2 6	Streptomyces metalloproteinase inhibitor (SMPI) の活性ループ部位ペプチドの阻害活性と立体構造 (都立大理 ¹ 、CREST ² 、阪大蛋白研 ³ 、京都工繊大 ⁴) Tashiro, M. ¹ 、Feliciano, M. ¹ 、Ohki, S. ² 、Gonzales, N. ¹ 、Tate, S. ¹ 、Tamura, K. ³ 、Aimoto, S. ³ 、Hiraga, K. ⁴ 、Oda, K. ⁴ 、Kainosho, M. ^{1,2}	152
P 2 7	hU2AF ⁶⁵ のRNA結合ドメインと標的RNAの相互作用 (東大院理 ¹ 、HHMI, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical Center ²) 伊藤拓宏 ¹ 、武藤裕 ¹ 、金仁実 ¹ 、Michael.R.Green ² 、横山茂之 ¹	154
P 2 8	立体選択的 ² H/ ¹³ C化芳香族アミノ酸の蛋白質NMRへの応用 (CREST ¹ 、東京都立大学 ² 、理研GSC ³) ○大木進野 ¹ 、寺内勉 ^{1,2} 、土屋征司 ² 、早野俊哉 ^{1,3} 、甲斐荘正恒 ^{1,2}	156
P 2 9	新規タンパク質SKLPの立体構造決定 (東京都立大理 ¹ 、CREST ² 、京都工繊大 ³) ○狩谷英里 ¹ 、大木進野 ² 、磯辺俊明 ¹ 、平賀和三 ³ 、小田耕平 ³ 、甲斐荘正恒 ^{1,3}	158
P 3 0	ヒトシスタチンA二量体の立体構造解析 (東京都立大理 ¹ 、CREST ²) ○大野綾子 ¹ 、田代充 ¹ 、児嶋長次郎 ² 、楯真一 ¹ 、須田真輔 ¹ 、梶裕之 ¹ 、甲斐荘正恒 ^{1,2}	160
P 3 1	細胞分裂に関するYhhp蛋白質の構造と性質：CPXPモチーフにおける点変異の効果について (東薬大 ¹ 、名大農 ² 、農水省生物資源研 ³) ○泊輝久 ¹ 、神藤平三郎 ¹ 、田代桜子 ¹ 、水野猛 ² 、加藤悦子 ³ 、山崎俊正 ³	164
P 3 2	二次元NMR法によるリボヌクレアーゼT ₁ の熱変性過程の解析 (東薬大 ¹ 、中央分析センター ²) ○松浦久恵 ¹ 、佐久間千勢子 ² 、前田正洋 ¹ 、小島正樹 ¹ 、高橋健治 ¹	166
P 3 3	ダニアルゲンDer f 2の立体構造と抗体認識 (日本女子大理 ¹ 、都臨床研 ² 、アサヒビール食薬研 ³ 、北大院薬 ⁴) ○市川さおり ^{1,2} 、島中秀樹 ² 、高井敏朗 ³ 、西山千春 ³ 、結城敏文 ³ 、小椋賢治 ⁴ 、奥村康 ³ 、稲垣冬彦 ⁴	168
P 3 4	高等植物のHis-Aspリン酸転移情報伝達系B型レスポンスレギュレータDNA結合ドメインの立体構造 (農水省生物資源研 ¹ 、名大農 ²) ○細田和男 ¹ 、八田知久 ¹ 、加藤悦子 ¹ 、水野猛 ² 、山崎俊正 ¹	170
P 3 5	GABA _A 受容体相関タンパク質-GABARAP-の立体構造解析 (富山医薬大薬 ¹ 、北大院理 ² 、九大院歯 ³) ○河野隆英 ¹ 、三浦和紀 ¹ 、藤谷直樹 ^{1,2} 、兼松隆 ³ 、平田雅人 ³ 、新田勝利 ² 、河野敬一 ¹	172
P 3 6	イヌミルクリゾチームの折り畳み中間体の重水素交換反応による解析 (北大院理 ¹ 、北工研 ² 、バリアンジャパン ³) ○小橋川敬博 ^{1,2} 、水口峰之 ¹ 、出村 誠 ¹ 、小柴琢己 ¹ 、久米田博之 ^{1,2} 、根本暢明 ³ 、津田栄 ² 、新田勝利 ¹	174
P 3 7	RecAのDNA結合部位の解析 (理研遺伝生化学 ¹ 、科技団CREST ²) ○美川務 ^{1,2} 、伊藤隆 ^{1,2} 、八森由貴子 ¹ 、齋藤雅子 ¹ 、柴田武彦 ^{1,2}	178
P 3 8	¹⁵ N緩和測定によるGTP結合型Rasの動的構造の解析 (理研GSC ¹ 、理研遺伝生化学 ² 、理研細胞情報伝達 ³ 、東大院理 ⁴) ○畑中稔 ¹ 、伊藤隆 ^{1,2} 、高杉憲司 ² 、横山茂之 ^{1,3,4}	180
P 3 9	大腸菌DinIの高次構造とRecAとの相互作用 (理研遺伝生化学 ¹ 、科技団CREST ² 、東大院理 ³ 、理研細胞情報伝達 ⁴ 、理研GSC ⁵) 相原秀樹 ^{1,2,3} 、 ○伊藤隆 ^{1,2} 、美川務 ^{1,2} 、横山茂之 ^{3,4,5} 、柴田武彦 ^{1,2}	182

P 4 0	epsinのENTHドメインのNMRによる構造解析 (理研GSC ¹ 、広島大医 ² 、東大院理 ³) ○小柴生造 ¹ 、木川隆則 ¹ 、菊池章 ² 、横山茂之 ^{1,3}	18
P 4 1	緩和時間測定によるYeast Ubiquitin Hydrolase(YUH1)の動的構造解析 (理研遺伝生化学 ¹ 、三菱化学生命科学 ²) ○高杉憲司 ¹ 、Sundaresan Rajesh ¹ 、須貝真理子 ² 、河野俊之 ² 、柴田武彦 ¹ 、伊藤隆 ¹	18
[溶液応用 (核酸)]		
P 4 2	大腸菌tmRNAにおけるtrans-translationに必要なシュードノットの立体構造 (千葉工大工 ¹ 、弘前大農学生命科学 ²) ○行木信一 ¹ 、白倉裕美 ¹ 、藤井倫子 ¹ 、姫野依太 ² 、武藤あきら ² 、河合剛太 ¹	18
P 4 3	バルジアウト残基を含むRNAのresidual dipolar couplingを利用した構造解析 (千葉工大工 ¹ 、Dept. of Chem. and Biochem., University of Colorado ²) ○染谷龍彦 ¹ 、坂本泰一 ¹ 、森村香織 ¹ 、富士原和也 ¹ 、Paul Hanson ² 、Arthur Pardi ² 、河合剛太 ¹	19
[溶液応用 (蛋白質、ペプチド、核酸以外)]		
P 4 4	PGSE-NMRを用いたイオン性液体の拡散挙動解析 (横浜国大 ¹ 、工科院物質研 ²) ○野田明宏 ¹ 、早水紀久子 ² 、渡邊正義 ¹	19
P 4 5	j-hmhc法によるフロリジン包接体におけるO-グリコシル結合の解析 (工科院生命研 ¹ 、日本電子 ²) ○石塚靖子 ¹ 、根本直 ¹ 、金澤健治 ¹ 、中西洋志 ¹ 、内海博明 ² 、鴨修 ²	19
P 4 6	¹⁵ N NMR法による環状イミドリ酸イオンの分子内水素結合挙動研究 (神戸大工 ¹ 、神戸大院自然科学 ²) ○牧秀志 ¹ 、植田佳樹 ² 、成相裕之 ²	19
P 4 7	1,3,5-Tri-alkyl-置換ベンゼンの立体障害-溶媒シフトと緩和時間による検討- (電通大) ○前田真悟、丸森俊男、丸山勝也、仁木國雄、鈴木冲	19
P 4 8	LC-NMR-DOSYの応用 (東レリサーチセンター) ○川口謙、木村一雄	20
P 4 9	生体高分子水溶液の緩和時間測定における化学交換の影響 (東京水産大学) ○松川真吾、渡部徳子	20
P 5 0	種々の非対称スルフィリミンの不斉S原子に隣接するメチレンプロトンのNMR的非等価性に関する検討 (東工大資源研 ¹ 、関東学院大工 ²) 中村義之 ¹ 、○卯辰直也 ² 、池田勝也 ² 、岡村敦史 ² 、尾辻 雅 ² 、山本保 ²	20
P 5 1	TRNOE法によるムスカリン性アセチルコリン受容体に結合したメタコリンの構造解析研究 (理研GSC ¹ 、科技団CREST ² 、東大院医 ³ 、東大院理 ⁴) ○濱田季之 ¹ 、廣田洋 ^{1,2} 、古川浩康 ³ 、芳賀達也 ^{2,3} 、武藤裕 ⁴ 、横山茂之 ^{1,4}	20
P 5 2	塩化マグネシウムおよび塩化カルシウム水溶液中における水分子の回転運動におよぼす圧力効果 (立命館大理工) ○文野浩一、谷口吉弘	21
[液晶、膜、不均一系]		
P 5 3	NMR緩和時間測定によるハイドロゲル網目サイズの予測 (国立衛研) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄	21
P 5 4	スピネコーおよび π パルス列を用いた ¹³ C OMAS NMRによるコレステリック液晶の異方的分子拡散係数の測定 (分子研 ¹ 、京大院理 ²) ○西山裕介 ¹ 、久保厚 ¹ 、寺尾武彦 ²	21
P 5 5	液晶NMR自動解析法における遺伝アルゴリズムとスペクトルの積分変換の利用 (北大院理) ○竹内浩、井上香織、安藤夕太、小中重弘	22
[計算、シミュレーション、データ処理]		
P 5 6	時間依存型非断熱遷移理論によるI _N Sスピン系の分極移動制御 (分子研) ○三嶋謙二、中村宏樹	22
P 5 7	試料二重回転下でのREDOR (分子研) ○桑原大介	22
P 5 8	化学シフトに対する相対性効果 (北見工大) ○馬場雄久、福井洋之	22

P 5 9	核双極子線幅シミュレーターの試作 (理研 ¹ 、金材技研 ² 、科技団CREST ³) ○端健二郎 ¹ 、清水禎 ^{2,3} 、後藤敦 ^{2,3} 、北澤英明 ^{2,3}	228
	[医用 / <i>in vivo</i> NMRとイメージング]	
P 6 0	デジタルシグナルプロセッサを用いたMRI信号発生器の開発 (エム・アール・テクノロジー ¹ 、筑波大理工 ²) ○宇津澤慎 ¹ 、拝師智之 ² 、巨瀬勝美 ²	230
P 6 1	<i>in vivo</i> ¹³ C-MRSによる脳内代謝の定量化に関する基礎的検討(1) (東芝医用機器・システム開発センター ¹ 、国立精神・神経センター武蔵病院 ² 、創価大生命研 ³) ○岡本和也 ¹ 、渡邊英宏 ¹ 、梅田匡朗 ¹ 、大槻泰介 ² 、小田正記 ³ 、金松知幸 ³ 、塚田裕三 ³	232
P 6 2	¹ H DQF-NMR法を用いたコラーゲン線維配向の定量化と動的粘弾性の関係：家兎stress-shieldingモデルを用いて(京府医大第1生理 ¹ 、整形外科 ²) ○生駒和也 ^{1,2} 、瀬尾芳輝 ¹ 、日下義章 ² 、山崎隆仁 ² 、高宮尚武 ² 、平澤泰介 ² 、丸中良典 ¹	234
P 6 3	ハルバツハ型永久磁石を用いたコンパクトMRマイクロスコープの開発 (筑波大理工 ¹ 、エム・アール・テクノロジー ² 、住友特殊金属 ³) ○拝師智之 ¹ 、松田善正 ¹ 、宇津沢慎 ² 、山崎由香子 ¹ 、巨瀬勝美 ¹ 、中西昭男 ³ 、岡田重益 ³ 、津崎 剛 ³	238
P 6 4	超極値 ¹²⁹ Xeガス発生と多孔質微粒子共存下での ¹²⁹ Xe-NMRスペクトル (工技院電総研 ¹ 、阪大医 ² 、工技院大工研 ³) ○服部峰之 ¹ 、木村敦臣 ² 、平賀隆 ³ 、藤原英明 ²	242
P 6 5	植物細胞における水の移動速度と温度の関係 (食総研 ¹ 、生物研 ²) ○小泉美香 ¹ 、石田信昭 ¹ 、狩野広美 ²	244
P 6 6	焼成パンのネットワークの造影とレンダリング (食総研 ¹ 、生物研 ² 、筑波大理工 ³) ○石田信昭 ¹ 、高野博幸 ¹ 、五十部誠一郎 ¹ 、植村邦彦 ¹ 、小泉美香 ¹ 、狩野広美 ² 、拝師智之 ³ 、巨瀬勝美 ³	248
P 6 7	MRI用ポリゴン表示Viewerの開発 (筑波大理工) ○佐々木英典、橋本誠太郎、拝師智之、巨瀬勝美	252
P 6 8	MRマイクロスコープ用勾配磁場プローブの開発 (筑波大理工) ○山崎由香子、拝師智之、松田善正、巨瀬勝美	254
P 6 9	産業用MRIの開発 (筑波大理工) ○秋田裕介、拝師智之、松田善正、巨瀬勝美	256
P 7 0	超並列型MRマイクロスコープの開発 (II) - 勾配コイルシステムの設計 - (筑波大理工) ○松田善正、拝師智之、巨瀬勝美	258
P 7 1	3Dポインタデバイスと専用グラフィックボードを用いたリアルタイムVolume Renderingシステムの開発 (筑波大理工) ○鈴木崇洋、橋本征太郎、拝師智之、植松孝明、松田善正、巨瀬勝美	262
P 7 2	Windows2000-PCを用いたRealtime3D-MRIの開発 (筑波大理工) ○植松孝明、拝師智之、宇津澤慎、巨瀬勝美	264
P 7 3	HMQC法によるアストログリア細胞の代謝物の観測 (鳥取大医 ¹ 、鳥取大遺伝子実験施設 ² 、鳥取大教育地域科学 ³) ○疋田純 ^{1,3} 、富永里香 ¹ 、井上仁 ¹ 、難波栄二 ² 、大塚譲 ³ 、飯塚舜介 ¹	266
P 7 4	脳内代謝物質の細胞内における動的ふるまい (日本女子大理 ¹ 、国立精神神経センター神経研 ²) ○高橋征三 ¹ 、荻野孝史 ²	268
P 7 5	NMRマイクロイメージング法による炊飯米内部に形成された空洞の解析 (農水省食総研 ¹ 、農水省畜試 ²) ○堀金明美 ¹ 、豊島英親 ¹ 、逸見光 ¹ 、永田忠博 ^{1,2} 、吉田充 ¹	272
	[固体測定法の開発]	
P 7 6	MAS条件下での同種核二量子双極子相互作用をリカップルするパルス列を用いた、高い効率の帯域選択的磁化移動 (横国大工 ¹ 、阪大蛋白研 ²) ○松木陽 ¹ 、藤原敏道 ¹ 、阿久津秀雄 ^{1,2}	274
P 7 7	Frequency Switched Lee-Goldburg 法を用いた固体高分解能プロトンスペクトルの測定とペプチドへの応用 (日本ブルカー ¹ 、東工大 ²) ○山内一夫 ¹ 、黒木重樹 ² 、安藤勲 ²	278

P 7 8	^{14}N overtone NMR間接測定法のペプチドへの応用 (京大院理) ○矢野友海、竹腰清乃理、寺尾武彦	28
P 7 9	^1H decoupling with third averaging in solid NMR (京大院理) 竹腰清乃里、○溝上潤、寺尾武彦	28
P 8 0	Magic Angle Spinningモジュールのタービン形状の最適設計 (理研) ○仲村高志	28
[固体物性、高分子、固体イメージング]		
P 8 1	高温in-situ T_1 -SPRITEイメージングによる石炭軟化溶融過程解析 (新日鐵先端研 ¹ 、日本電子基礎研究所 ²) ○齋藤公児 ¹ 、古牧育男 ¹ 、長谷川憲一 ²	28
P 8 2	Stray-Field-Imaging 法による高分子への溶媒浸透メカニズムの解析 (新日鐵先端研 ¹ 、University of Surrey ²) ○齋藤公児 ¹ 、J. Godward ² 、P. J. McDonald ²	29
P 8 3	固体高分解能 ^{13}C NMRによるバクテリオロドプシンの電荷依存構造変化の解析 (姫路工大 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 、Richard Needleman ² 、Janos K. Lanyi ³ 、内藤晶 ¹ 、斉藤肇 ¹	29
P 8 4	固体NMR法を用いたナイロン6/クレイの構造解析 (NIST) ○浅野敦志、D.L.VanderHart、J.W.Gilman	29
P 8 5	^{89}Y -固体NMRによる、Eu-Y ₂ O ₂ S中のEu拡散の焼成温度依存性 (シーエーシーズ横浜分析 ¹ 、U S R オプトニクス ² 、化成オプトニクス ³ 、東京水産大 ⁴) ○原園としえ ¹ 、安達隆二 ² 、下村康夫 ³ 、渡部徳子 ⁴	30
P 8 6	^{29}Si 、 ^{13}C NMR法による6員環および直鎖シランの構造とダイナミクス (京大化研) ○梶弘典、山田周作、堀井文敬	30
P 8 7	σ - π 共役系ポリマーの固体構造に関する ^{13}C 、 ^{29}Si NMR解析 (京大化研) ○山田周作、梶弘典、堀井文敬	30
P 8 8	固体2次元 ^1H - ^{13}C HETCOR法によるポリビニルアルコール(PVA)の水素結合に関する研究 (京大化研) ○増田憲二、梶弘典、堀井文敬	30
P 8 9	α 、 ω -アルカンジオールおよびn-アルカンチオールの各結晶相における構造とダイナミクス (京大化研 ¹ 、熊本大理 ²) ○桑原和弘 ¹ 、堀井文敬 ¹ 、小川芳弘 ²	31
P 9 0	^{13}C NMRによるサーモトロピック液晶の研究 (金沢大理 ¹ 、The University of Akron ²) ○松澤英和 ¹ 、平井篤樹 ¹ 、水野元博 ¹ 、遠藤一央 ¹ 、須原正彦 ¹ 、Chang Dae Han ²	31
P 9 1	単結晶 ^2H NMRによる[Mg(H ₂ O) ₆][SiF ₆]の構造相転移の研究 (金沢大理) ○飯島隆広、水野元博、須原正彦	31
P 9 2	ナイロン4 6 結晶化物の構造と分子運動性 (群馬大工) ○栗原良仁、上原宏樹、山延健、甲本忠史	32
P 9 3	アイソタクチックポリプロピレン重合パウダーの構造と分子運動 (群馬大工) ○植木克典、上原宏樹、山延健、甲本忠史	32
P 9 4	^{13}C および ^1H の T_1 および $T_{1\rho}$ からみた凍結乾燥製剤の分子運動性 (国立衛研) ○吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄	32
P 9 5	雲母及びオクトシリケート層間におけるドデシルトリメチルアンモニウムイオンの構造と運動 (筑波大化) ○篠原絵美、山内美穂、石丸臣一、池田龍一	32
P 9 6	エコーフリー変換を可能にした固体NMRイメージング (筑波大物工) ○齋藤誠治、松井茂	32
P 9 7	高気体透過性ポリマーPTMSPにおけるXenonのダイナミクスの研究 (帝人 ¹ 、阪大院理 ² 、東大原総セ ³) ○永阪文憲 ^{1,3} 、尾身洋典 ² 、江口太郎 ² 、中村亘男 ² 、伊藤泰男 ³	33
P 9 8	固体NMRにおけるバックグラウンド消去法の定量性について (東レリサーチセンター ¹ 、石炭利用総合センター ²) ○三輪優子 ¹ 、片桐元 ¹ 、原田道昭 ²	33

P 9 9	固体NMRによる絹繊維の不均一構造の解明 (東京農工大) ○亀田恒徳、山根努、Yao Juming、中澤靖元、朝倉哲郎	336
P 1 0 0	固体高分解能 ^{13}C -NMR法によるポリペプチドの高次構造の安定性 (東工大) ○村田勝義、中野治朗、黒木重樹、安藤勲	340
P 1 0 1	固体 ^{13}C CP/MAS NMRと量子化学計算を用いた全芳香族高分子のコンホメーション解析 (東工大院理工) ○相見敬太郎、安藤慎治	342
P 1 0 2	NMR緩和時間測定による高分子固体の局所磁場勾配と拡散 (東工大院生命理工) ○浅川直紀、梶川達朗、佐藤耕平、櫻井実、井上義夫	346
P 1 0 3	固体高分解能NMRによる膜蛋白質疎水領域の立体構造の解析 (姫路工大理 ¹ 、ウェイン州立大 ² 、カリフォルニア大 ³) ○辻暁 ¹ 、長谷川潤 ¹ 、河南るり子 ¹ 、Richard Needleman ² 、Janos K. Lanyi ³ 、内藤晶 ¹ 、齋藤肇 ¹	348
P 1 0 4	ヒトカルシトニンのアミロイド繊維：原子間距離測定に基づく高次構造と反応機構 (姫路工大理 ¹ 、新潟経営大 ²) ○上平美弥 ¹ 、土肥輝美 ¹ 、辻暁 ¹ 、野坂篤子 ² 、齋藤肇 ¹ 、内藤 晶 ¹	350
P 1 0 5	PFM-NMRによる柔粘性結晶の拡散係数測定 (分子研) ○大石修	352
P 1 0 6	固体重水素NMRによるコポリ (γ -アルキルグルタメート) 主鎖のダイナミクス研究 (北大院工) ○堤耀広、森越信之、平沖敏文	354
P 1 0 7	SPS-芳香族炭化水素系コンプレックスのゲスト分子の運動性評価 (名工大工) ○山本裕輔、吉水広明、辻田義治、木下隆利	356
P 1 0 8	固体高分解能 ^{13}C NMR及び ^{113}Cd NMR法によるCd塩エチレンアイオノマーのイオン会合体と分子運動性 (名工大工) ○杉浦寿史、吉水広明、辻田義治、木下隆利	358
P 1 0 9	高分子中に存在する ^{129}Xe 核のNMR化学シフト値 (名工大工) ○鈴木智幸、吉水広明、辻田義治、木下隆利	360
	[固体化学におけるNMR]	
P 1 1 0	固体 ^{23}Na -NMRによる層状ケイ酸塩化合物中の層間カチオンの状態解析 (CACs四日市 ¹ 、CACs横浜 ²) ○田畑祥生 ¹ 、坂田育幸 ² 、植垣隆浩 ²	362
P 1 1 1	分子認識系におけるゲスト-ホスト相互作用の研究 (京大院理) ○中村新治、今城文雄、竹腰清乃理、寺尾武彦	364
P 1 1 2	^{129}Xe 高圧NMRによる(±)-[Co(en) ₃]Cl ₃ 結晶のマイクロ細孔のキャラクタリゼーション (阪大院理) ○上田貴洋、江口太郎、中村亘男	366
P 1 1 3	各種MQMASパルスシーケンスを用いたAl含有化合物の解析 (新日鐵先端研 ¹ 、日本電子 ²) ○金橋康二 ¹ 、齋藤公児 ¹ 、杉沢寿志 ²	368
P 1 1 4	固体 ^{13}C -NMRにおけるスペクトル編集テクニック (Wuの方法) の実材料への応用 (日鐵テクノロジー ¹ 、新日鐵先端研 ² 、日本電子 ³ 、日本電子データム ⁴) ○畠山盛明 ¹ 、齋藤公児 ² 、杉沢寿志 ³ 、出口健三 ⁴	370
P 1 1 5	ZSM-5細孔内のニトロアニリンの挙動：Si/Al比・カチオンの影響 (物質研) ○小森佳彦、林繁信	372
P 1 1 6	高Si/Al比ZSM-5ゼオライト細孔内におけるp-ニトロアニリンの運動 (物質研) ○林繁信、小森佳彦	374
P 1 1 7	Modern Solid State NMR Methods in Catalysis Science (National Chemical Laboratory, India) ○Subramanian Ganapathy	376
	[ハードウェア]	
P 1 1 8	直流電場NMR装置の製作とリチウム二次電池材料測定への応用 (大工研 ¹ 、神戸大自然科学 ² 、日本電子 ³) ○片岡弘 ¹ 、齋藤唯理亜 ¹ 、境哲男 ¹ 、蔭山博之 ¹ 、出来成人 ² 、池田武義 ³	378

P 1 1 9	超臨界水用高温NMRプローブの開発 (日本電子 ¹ 、日本電子データム ²) ○池田武義 ¹ 、江口剛史 ¹ 、杉沢寿志 ¹ 、櫻井智司 ¹ 、藤戸輝明 ²	38
P 1 2 0	MASスピナーの改良 (日本電子) ○樋岡克哉	38
P 1 2 1	化合物半導体を用いた高感度前置増幅器の ¹³ C観測への応用 (日本電子) ○松倉順一、末松浩人	38
[その他]		
P 1 2 2	有機ゲルマニウム化合物の固体高分解能 ⁷³ Ge NMRスペクトルの観測 (神奈川大理工) ○西川実希、竹内敬人、田中克己、高山俊夫	38
P 1 2 3	in situ バラ水素信号増強NMR法を用いたRhCl(CO)(PPh ₃) ₂ の水素化反応の研究	38
P 1 2 4	琵琶湖湖底堆積物中の有機物質、鉍物、リン物質の固体NMR法を用いた成分解析 (神奈川大工 ¹ 、岡山大資生研 ²) ○高山俊夫 ¹ 、佐藤祐一 ¹ 、中島進 ²	39
P 1 2 5	構造解析におけるLC-MS/NMRの応用 (日本電子) ○藤本孝子、藤井直之、森田徹一郎、高橋豊、樋口哲夫	39
P 1 2 6	インターネット上のSDBS-NMRのアクセス状況 (その1) (工大院物質研 ¹ 、TAAC ²) 早水紀久子 ¹ 、○齋藤剛 ¹ 、矢部篤子 ¹ 、衣笠晋一 ¹ 、塚本啓一 ² 、小島 功 ²	39
P 1 2 7	CAST法による立体化学の規範的コード化とNMR化学シフト予測システムへの適用 (理研 ¹ 、科技団さがけ21 ² 、豊橋技科大 ³) ○越野広雪 ¹ 、佐藤寛子 ^{1,2} 、船津公人 ³ 、中田 忠 ¹ 、 鶴澤洵 ¹	40
P 1 2 8	2種類の配向試料に対する分子の配向テンソルの相対方向の決定法の開発 (都立大理) ○野村薫、甲斐荘正恒	40

第1日 (11月8日水曜日)

講演要旨

マイクロ秒領域での超高速パルスラベルによる蛋白質の非ヒエラルキー的構造形成過程の研究

(¹岐阜大学医学部, ²フォックス・チェイス癌センター, ³阪大蛋白研)

○桑田一夫¹, Ramachandra Shastry², Heinrich Roder², 後藤祐児³

Non-hierarchical folding process of protein uncovered by ultra-rapid pulse labeling on microsecond time scale.

Kazuo Kuwata¹, Ramachandra Shastry², Heinrich Roder², Yuji Goto³

¹Department of Physiology, School of Medicine, Gifu University, Gifu 500-8705, Japan; ²Institute for Cancer Research, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania 19111, USA; ³Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

We clarified the kinetic and structural characteristics on the non-native α -helical intermediate formation during refolding of bovine β -lactoglobulin. Continuous-flow method showed that the fluorescence increases after refolding with a time constant of several hundred μ s, suggesting the non-native α -helical intermediate formation. The kinetic analysis using the continuous- and the quenched-flow pulse labeling shows that the stable hydrogen bond formation occurred at the hydrophobic core sheets (β F, β G & β H) at a time constant of ~ 10 ms. While H-bonds at the N-terminal region (β A) formed quite slowly. The burst phase labeling experiment showed that the amide protons at β A were already protected by a factor of ~ 10 at ~ 2 ms after refolding, indicating the marginally stable conformation corresponding to the non-native α -helix. The folding of β -lactoglobulin contains both the non-hierarchical (β A) and the hierarchical (β F, β G & β H) aspects, showing the interplay between the local and non-local interactions during protein folding.

現在、世界的規模で、プロテオームの重要性が認識され、蛋白構造解析プロジェクトが進行しているが、蛋白質立体構造と蛋白質機能発現機構との関連は、必ずしも明白なわけではない。それには幾つかの理由が考えられる。ひとつには、蛋白質が溶液中で安定に存在するためには、限られたコンフォーメーションしか許されないということである。実際、アミロイドを形成するようでは、生体に不利に働く。立体構造としては、'沈殿やアミロイドを生じない'ということが重要であり、機能を考える以前にまず考察されなければならない事柄である。しかし、この拘束条件は未だ不明な点が多く、このことが、立体構造を解釈する上で、問題を一層複雑にしている。

ふたつには、その機能は、エネルギー散逸を伴う動的過程と常にカップルしており、ダイナミクスと切り離して論じることは出来ない、ということである。ではどのくらいのタイム・スケールの運動が、機能に直接関係しているのであろうか？多くの蛋白質では酵素反応等のタイム・スケールはミリ秒のオーダーである。実際、量子力学的な現象である電子伝達反応においても、各残基が特定の配置をとるための運動のモードは極めて遅い。このゆっくりした運動は、非常に低い確率の熱力学的揺らぎなのだろうか、あるいは、位相

量の変化を伴う‘本当に遅い’モードの運動なのだろうか？これは、単に運動の解釈上の問題ではなく、蛋白質ダイナミクスの本質に起因する問題である。

この遅いモードの運動を溶液中の NMR で観測するために、少なくとも二つの方法がある。1つは化学シフトの揺らぎを観測するオフ・レゾナンス照射法 (O-ROESY 法) であり、もうひとつは水素・重水素交換法である。前者に関しては、既に前回報告した。 β ラクトグロブリンでは、 β A の N 端側に、数百マイクロ秒のタイム・スケールの運動が、かなりのポピュレーションで存在することが分かった。

β ラクトグロブリンは、構造形成途中で、天然構造には存在しない α ヘリックスを形成することで知られている。連続フロー法 (蛍光検出) を用いることにより、この非天然ヘリックスが数百マイクロ秒で形成されることが分かった。その強度の TFE 依存性は、デッドタイムが数ミリ秒の CD ストップフローの解析結果と基本的に合致していた。その後、 β ラクトグロブリンは 800 ミリ秒で、 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移を行い、極めてゆっくりと (分のオーダーで) 天然の β パレル構造に到達した。

超高速パルスラベル法では、連続フロー型のセルを用い、240 μ 秒の時間分解能を得ることが出来た。パルス強度 ~ 50 での通常のパルスラベル法では、疎水性コア (β F, β G, β H) では ~ 10 ミリ秒の段階で、プロテクションが始まった。これに対し β A のプロテクションは有意に遅れた。従って、プロテクションファクターが 50 以上の安定な構造は、数ミリ秒のオーダーでは N 端では、未だ出来ていない、と考えられる。

然し、パルス強度を下げて、プロテクションファクターの低いアミドプロトンを検出することが出来るバーストフェイズラベル法を行ってみると、N 端の β A に相当するセグメントが、2 ミリ秒で 10 前後の protection factor を有することが明らかとなった。上のカイネティクスと合わせて考えると、 β A に相当する領域が、非天然 α ヘリックス形成の主たる場と考えられた。またこの非ヒエラルキー的なヘリックスは、辺縁的に安定な構造と考えられる。

β ラクトグロブリンの天然構造を見ると、疎水性コアシート部分 (β F, β G, β H) を C 端の主ヘリックスが覆っているのに対し、非コア部分 (β B, β C, β D) にはヘリックスがない。然し、上述のような構造形成過程も含めて考えると、N 端の非天然ヘリックスセグメントが、構造形成途中で一時的に、非コア部分を覆っていた可能性が考えられるのである。私は、これは水素結合ドナーやアクセプターが表面に露出するのを防ぎ、一時的にアミロイド形成から保護するためではないだろうか、と考えている。即ち、これらのヘリックスはアミロイド形成を防ぐために存在しており、本来、蛋白の機能とは直接関係がない可能性が高い、と考えられるのである。

Heteronuclear Off-resonance ROESY の結果では、 β A の前半部分はかなりミリ秒オーダーの運動のポピュレーションが高い。これは同部位が、溶液中で非常にゆっくりではあるが、 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移を行っているためではないだろうか？蛋白の機能に関しても、ダイナミクスの観点から、興味深い結果が得られている。天然状態におけるプロテクションファクターの分布は、N 端半分 (非コア部分) と C 端半分 (コア部分) で大きく異なる。プロテクションファクターは、蛋白質のミリ秒以上の遅い揺らぎを反映していると考えられる。その N 端半分と C 端半分の境界に位置するのが、E F ループである。この E F ループが、Tanford 転移と呼ばれる、機能的に重要な構造転移を起こすらしいことが最近明らかになった。何故、機能的に重要な部分がコアと非コアの境界に位置するのであろうか？

ここで最初に述べた問題に回帰する。遅い運動モードは、単なる稀な熱揺らぎなのか、それとも、ピコ秒からナノ秒の速い運動から、力学的に生成されたある種のオーダーを有する、位相量の変化を伴う、本当の‘遅い’運動として考えられるのであろうか？

少なくとも、 β ラクトグロブリンに関しては、私は後者の可能性があってもよいと考えている。何故なら、それはコアと非コアの境界に位置するからである。ホワイトなスペクトルを有する単なる確率的な稀な運動でなく、遅い運動モードを持つ少数のパラメーターが系を支配しているのではないだろうか？

タンパク質複合体の界面残基を同定するNMR測定法の開発

東京大学大学院薬学系研究科 嶋田 一夫

High resolution NMR has been used for the identification of the interfaces of larger protein-protein complexes in solution ($M_r > 50,000$) through chemical shift perturbation and/or hydrogen-deuterium exchange experiments for the main-chain amide groups of the complexes. The interface thus identified is not necessarily identical to that revealed by X-ray crystallography. In the present paper, in order to identify the contact residues in a large protein-protein complex more rigorously, we developed a novel NMR method that utilizes cross saturation phenomena in combination of TROSY detection using an optimally deuterium labeled system.

【はじめに】

ゲノムプロジェクトの加速度的進展により、数多くの遺伝子情報が明らかになりつつある。この成果を十分に活用するためには、遺伝子産物であるタンパク質が、水溶液中でいかにして他の生体高分子と相互作用し、そして機能発現しているかを原子レベルで解明することが重要である。従来、核磁気共鳴(NMR)法による、タンパク質-タンパク質およびタンパク質-核酸複合体の相互作用界面残基の特定には、複合体形成に伴う主鎖アミドプロトンの化学シフト変化や水素-重水素交換速度変化がしばしば用いられてきた。しかし、それら指標により同定された界面は X 線結晶構造解析により明らかとなったものと必ずしも一致することはなく、あいまいな点もあった。そこで本研究では、タンパク質複合体における相互作用界面をより厳密に同定する新規NMR測定法の開発を試みた。

【方法の原理】

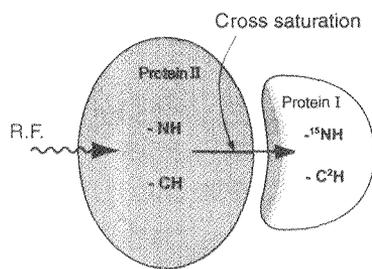


Fig. 1 Basic concept of Cross saturation method

高分子量タンパク質では、ラジオ波照射により引き起こされるシグナル飽和が、磁氣的相互作用により、近傍のプロトンに伝播する交差飽和とよばれる現象が強く起こる。たとえば Fig. 1 に示すようなタンパク質 I - II 複合体の系において、タンパク質 II のプロトンシグナルのみを選択的に飽和できるならば、飽和の影響は界面を通して、タンパク質 I に伝搬される。磁化の飽和は NMR シグナルの強度減少として観測されるため、シグナル強度が減少したタンパ

ク質 I の残基を、界面残基として同定できる。これを可能とするために、タンパク質 I の非交換性プロトン (C^2H) を 2H で、さらに、主鎖アミド基を ^{15}N で均一標識し、非標識タンパク質 II と複合体を形成させる。この複合体に非交換性プロトンの周波数を持つラジオ波で照射することにより、タンパク質 II のみを飽和することが可能となる。そして、複合体の 1H - ^{15}N HSQC のスペクトルを観測すると、タンパク質 II 由来のシグナルのみが観測されるので、シグナル強度が減少している残基を界面残基として同定できる。

NMR、高分子量タンパク質、重水素化、TROSY、交差緩和

しまだ いちお

【結果と考察】

以上の方法を実際にタンパク質複合体に適応するにあたり、免疫グロブリン結合タンパクであるプロテイン A の Bドメイン(FB)と免疫グロブリンの Fc フラグメントとの複合体(FB-Fc 複合体 MW~64K)をとりあげ、複合体中の FB 側の相互作用界面を同定することとした。FB-Fc 複合体は X 線結晶構造解析によりその構造が明らかになっており、また NMR 法では化学シフト変化や水素-重水素交換速度変化を指標に FB 側の相互作用界面の同定が行われている。

Fig. 2a と Fig. 2b は、 ^2H および ^{15}N で均一標識した FB と非標識の Fc フラグメントからなるの FB-Fc 複合体に対して測定した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルであり、それぞれ a が Fc を飽和させなかった場合のスペクトル、b が Fc を飽和させた場合のスペクトルである。

Fig. 2 で得られた Fc を飽和させた場合と飽和させなかった場合のアミドプロトンのシグナル強度比を、FB のアミノ酸残基番号に対してプロットしたグラフが Fig. 3 である。いくつかのアミドプロトンのシグナル強度は明らかにラジオ波照射により減少している。これは複合体中の Fc フラグメントの飽和が相互作用界面を通して Fc 結合状態の FB 分子に移動したことを示しているといえる。

以上の情報をもとに明らかにされた FB の Fc 結合部位を X 線結晶構造解析で明らかにされたものと、従来の NMR 法によるものとを比較するため、FB の構造モデル上に示す (Fig. 4)。Fc との結合に伴い化学シフト変化 (Fig. 4b) や水素-重水素交換速度変化 (Fig. 4c) を示した残基は、X 線結晶構造で複合体界面を形成する残基 (Fig. 4a) とその分布が完全には一致しないことがわかる。

一方、交差飽和実験 (Fig. 4d) において、シグナル強度変化が顕著に観測された残基の分布は X 線結晶構造により明らかとなった相互作用界面とほとんど一致している。つまり、交差飽和実験は相互作用界面を従来法よりも正確に同定できると結論した。

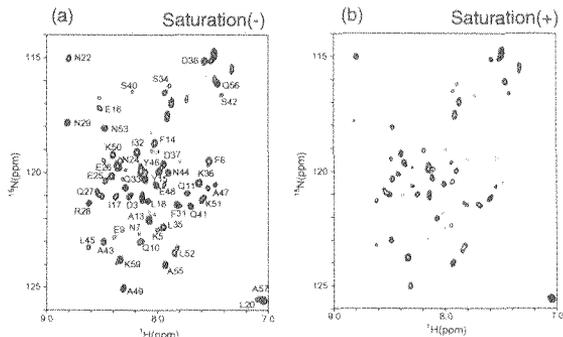


Fig. 2 ^1H - ^{15}N HSQC spectra

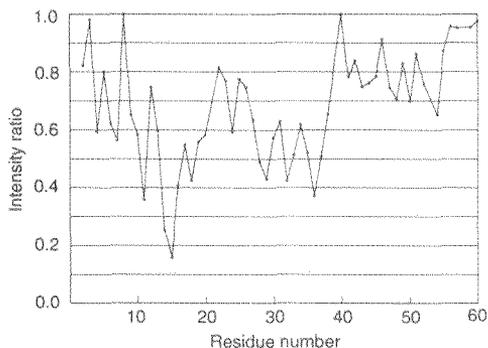


Fig. 3 Intensity ratio



Fig. 4a X-ray

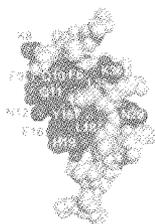


Fig. 4b Chemical shift perturbation



Fig. 4c H-D exchange experiment

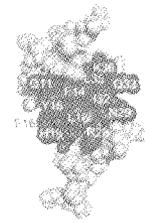


Fig. 4d Cross saturation method

Resolution of structural details of membrane-embedded proteins using solid state NMR methods

Anthony Watts, Biomembrane Structure Unit, Biochemistry Department,
Oxford University, Oxford, OX1 3QU, UK.

Using solid state NMR approaches, it is now possible to define the structure and dynamics of binding for a small, isotopically (^2H , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N) labelled ligand, prosthetic group, or solute in its binding site of a membrane bound protein at near physiological conditions in natural membrane fragments or in reconstituted complexes [1, 2]. Studies of oriented membranes permit the orientational bond vectors of labelled groups to be determined to good precision before the crystal structure of the receptor is resolved, and to similar resolution, as shown for retinal in bacteriorhodopsin [3, 4, 5] and bovine rhodopsin [6]. The potential for resolving similar details for ligands and drugs bound to their target receptors, is now being realised using the agonist, acetyl choline when intercalated into its binding site in the membrane bound, fully functional nicotinic acetyl choline receptor [7].

Novel magic angle spinning (MAS) NMR methods on membrane dispersions permit high resolution-like NMR spectra to be obtained for isotopically labelled ligands at their binding site in functional, fully hydrated membrane proteins [1, 2]. To yield structural information, dipolar couplings can be reintroduced into the spectrum of labelled ligands in their binding sites of membrane-bound proteins to give interatomic distances to high precision ($\pm 0.5 \text{ \AA}$). In addition, relaxation and cross-polarization data gives estimates for the kinetics for on-off rates for binding. These approaches have been used to identify sugars, and their structural requirements for binding, in transporters expressed to amplified levels in *E. coli* plasma membranes at high sensitivity (250nmoles of ligand binding sites are detected) [8, 9]. By exploiting triple resonance MAS NMR methods with uniformly ^{15}N -labelled protein in membranes, it is now possible to define the residues in the binding site within $\sim 7 \text{ \AA}$ of the ligands, to be resolved. As an example of drug binding, analogues (imidazole-pyridines) of the K^+ -competitive inhibitors of the gastric-ATPase, have been structurally defined to high resolution ($\pm 0.3 \text{ \AA}$) at their binding site in functional membrane bound protein [10, 11]. Such information confirms that the most potent inhibitors are the ones in which the ring moieties are constrained chemically, as revealed for bound but unrestrained analogue studied here. when bound. In addition, chemical shifts can be measured directly to help provide details of the chemical nature (electrostatic, hydrophobic or aromatic) binding environment for a bound ligand, as shown for drug analogues used in peptic ulcer treatment in the gastric ATPase, and for acetyl choline in the acetyl choline receptor [12].

Finally, since many membrane active peptides (toxins, ion channels) are potential drug targets, but as yet structurally unresolved, as a result of the difficulty of crystallisation and the incomplete nature of the information obtained from studies in organic solvent or micellar dispersions, we have developed a new method for direct resolution of peptides in membranes, using unlabelled peptides. High-resolution proton spectra, with dipolar couplings averaged through molecule rotation, give rise to correlation spectra from which structural data can be determined. This approach opens up a new method for membrane protein and peptide structure determinations, with protein size being no limitation to spectral resolution.

- [1]. Watts, A. (1999) Structural resolution of ligand-receptor interactions in functional, membrane-embedded receptors and proteins using novel, non-perturbing solid state NMR methods. *Pharmacy & Pharmacology Communications*, 5, 7-13.
- [2]. Watts, A. (1999) NMR of drugs and ligands bound to membrane receptors. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 48-53.
- [3]. Ulrich, A.S. and Watts, A. (1993) *Solid State NMR* 2, 21-36.
- [4]. Ulrich, A.S., Watts, A., Wallat, I. & Heyn, M.P. (1994) *Biochemistry*, 33, 5370-5375.
- [5]. Ulrich, A.S., Wallat, I., Heyn, M.P. & Watts, A. (1995) *Nature Structural Biology*, 2, 190-192.
- [6]. Gröbner, G., Burnett, I.J., Glaubitz, C., Choi, G., Mason, A.J. & Watts, A. (2000) *Nature*, 405, 810-813.
- [7]. Williamson, P.T.F., Gröbner, G., Spooner, P.J.R., Miller, K.W. & Watts, A. (1998) *Biophysics J.* 72, p144
- [8]. Spooner, P.J.R., Rutherford, N., Watts, A. and Henderson, P.J.F. (1994) *PNAS*. 91, 3877-3881.
- [9]. Spooner, P.J.R., O'Reilly, W.J., Homans, S.W., Rutherford, N.G., Henderson, P.J.F. & Watts, A. (2000) *Biophys. J.* (in press)
- [10]. Middleton, D.A., Robins, R., Feng, X., Levitt, M.H., Spiers, I.D., Schwalbe, C., Reid, D.G. & Watts, A. (1997) *FEBS Letts.* 410, 269-274..
- [11]. Middleton, D.A. *et al.*, *PNAS* (in press)
- [12]. Williamson, P.T.F., *et al.*, (1998) *Biochemistry*, 37, 10854-10859; Williamson *et al.*, *PNAS* (in press)/

See also (www.bioch.ox.ac.uk/~awatts/)

Structural Proteomics of an Archaeon

Cheryl H. Arrowsmith

Structural Genomics Project in Toronto Ontario Cancer Institute and Department of Medical Biophysics University of Toronto 610 University Avenue, Toronto Ontario, Canada M5G 2M9

The goal of structural proteomics is to generate 3D structures of proteins on a genome-wide scale. To explore the feasibility of a comprehensive structural proteomics project, 424 non-membrane proteins of unknown structure from *Methanobacterium thermoautotrophicum* were cloned, expressed in *E.coli* and purified for structural studies. About 20% of these were suitable for x-ray crystallography or NMR spectroscopy without further manipulation, providing an estimate of the number of readily accessible structural targets in a proteome. A retrospective analysis of the experimental behavior of these proteins suggested some simple relations between sequence and solubility, implying that a comprehensive database of protein properties will be useful in optimizing high-throughput strategies.

Ten three-dimensional structures were determined using NMR spectroscopy or X-ray crystallography, in several cases revealing biochemical functions that were not detectable from sequence analysis.

This study suggests that a large-scale structural proteomics effort is feasible, and identifies many of the experimental hurdles that need to be overcome in order to optimize such an effort.

BMRB: the Biomolecular Magnetic Resonance Data Bank

^aUlrich, E.L., ^aDoreleijers, J.F., ^aChae, S., ^aMading, S., ^aMuñoz, A., ^aSchnoes, A.M., ^bWenger, R.K., ^aZhao, Q., ^cIoannidis, Y.E., ^bLivny, M., and ^aMarkley, J.L.

^a *University of Wisconsin-Madison, Department of Biochemistry, 53706, Madison, WI, USA*

^b *University of Wisconsin-Madison, Department of Computer Sciences, 53706, Madison, WI, USA*

^c *University of Athens, Athens, Greece*

BioMagResBank (BMRB – URL: www.bmrwisc.edu) is a repository for information derived from biological macromolecules by NMR spectroscopy. BMRB is designed to provide access to quantitative NMR data in forms that are useful for computational and comparative studies of macromolecular structure-function relationships. The current archive has over 1600 entries representing a large collection of assigned ¹H, ¹³C, and ¹⁵N chemical shifts for proteins and several entries for DNA and RNA molecules. Also available are smaller, but growing, collections of other classes of data (coupling constants, relaxation parameters, and H-exchange rates). Newer features available from the BMRB web site will be discussed here: (1) A query grid system allows users to retrieve sets of BMRB entries for proteins, DNA, or RNA that have defined characteristics and content (chemical shifts, relaxation values, coupling constants, etc.). (2) A list has been developed of BMRB entries that match NMR entries in the PDB. Each BMRB and PDB entry in this list has been reviewed to confirm that the authors and/or the citation are consistent and that the biomolecular systems studied are equivalent, including the presence of ligands. Discrepancies between the BMRB and PDB entries are noted in a comment section. This list of matched entries will be extended continually as new BMRB and PDB entries are released. (3) The 97 PDB entries investigated previously (Doreleijers et al.) for the quality of coordinates and NOE distance constraints has been transformed into STAR files that follow for most data types the latest released version of the NMR-STAR dictionary (2.1). In collaboration with the PDB, the BMRB intends to provide NMR constraint and coordinate information in NMR-STAR file format for new structures. (4) A web-based data visualization system (DEVise) provides plots of various kinds of experimental data in BMRB entries. A development version of this software supports interactive displays of NMR experimental data from NMR-STAR files together with three-dimensional views of the molecule studied.

We are pleased to acknowledge productive collaborations with the Protein Data Bank and the European Bioinformatics Institute. BMRB is supported by NIH grant LM05799 from the National Library of Medicine.

Structural biological characterization using NMR relaxation approaches

David Cowburn, New York Structural Biology Center, c/o Box 163, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY, 10021-6399, USA

Measurements of nuclear magnetic relaxation can provide insights into motions on the pico-nano second time scale. These motions may be macromolecular (hydrodynamic) or atomic-scale. Longer time scales also contribute to transverse relaxation and can be detected by measurements at multiple fields. Improved precision and development of analytical methods now permit direct measurement in solution of ^{15}N chemical shift anisotropy (CSA) of individual amide nitrogens. The variability of observed CSA's makes for some complexity in analysing relaxation data.

These improved analyses will be presented in their applications to

- a) the hydrodynamic characterisation and structure determination of subdomains in multidomain systems
- b) the effects of circularization (i. e. head-to-tail cyclization) on protein stability and flexibility
- c) comparison to long time scale molecular dynamics simulations of proteins of significant flexibility.

スカラー結合を利用した水素結合の直接観察法と残余双極子相互作用を利用した新しい測定法

(奈良先端大・バイオ、理研・バイオデザイン/GSC*、日本ブルカー†) 三島正規、伊藤紀之、Jun-Goo Jee、池上貴久、畑中 稔*、横山茂之*、伊藤隆*、M. Wälchli†、○白川昌宏

Direct observation of hydrogen bonds in proteins and protein-ligand.

(Nara Inst. Sci. Tech, RIKEN*, Bruker Japan†) Masaki Mishima, Noriyuki Ito, Jung-Goo Jee, Takahisa Ikegami, Minoru Hatanaka*, Shigeyuki Yokoyama*, Yutaka Ito*, Markus Wälchli†, Masahiro Shirakawa

Hydrogen bonds (H-bonds) are of central importance for maintenance of three-dimensional conformations of proteins and often play essential roles in recognition of ligand molecules. Intermolecular H-bonds formed between the ligand phosphates and protein amide groups are often crucial for the interactions between proteins and phosphate-containing ligands. We report the detection of intermolecular three-bond ^{31}P - ^{15}N and two-bond ^{31}P - ^1H J couplings across $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}^--\text{P}$ H-bonds. We also designed a new pulse scheme, $^3\text{h}J_{\text{NP}}$ HNPO, to observe correlations between ^1H , ^{15}N and ^{31}P of the H-bond donor and acceptor groups. The resultant spectra clearly show the correlation across the H-bond.

水素結合は蛋白質、核酸などの生体高分子において、立体構造の保持、リガンドの認識と結合、触媒反応の制御などに中心的な役割を果たす。しかし、その重要性にかかわらず、従来は生体高分子の水素結合は、直接観測することは出来ず、X線やNMRで決定した立体構造や、化学シフトやH-D交換などのNMR実験から間接的に推定されてきた。

最近になって Grzesiek らは DNA、RNA などの核酸の塩基対に見られる $\text{N}-\text{H}\cdots\text{N}$ 型水素結合や蛋白質の主鎖間に見られる $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$ 型水素結合の供与基、受容基の原子間にスカラー結合が存在することを示した。これは生体高分子における初めての実用的な水素結合同定法といえる。

蛋白質の構造決定の初期過程での水素結合ネットワークの情報は、

水素結合、スカラー結合、蛋白質-リガンド相互作用、立体構造決定

みしままさき、いとうのりゆき、いけがみたかひさ、はなたなみのる、よこやましげゆき、いとうゆたか、しらかわまさひろ

構造決定の迅速化に大きく寄与すると期待される。このような効果は水素結合がポリペプチド鎖上の遠隔的な構造情報をより多くもつ β シートに富んだ蛋白質で顕著であろう。我々はスカラー結合を利用した水素結合直接観測法を、2つの β シートに富む蛋白質の構造解析に適用した。その構造解析の迅速化における有効性を議論する。またその過程で、いくつかの不規則的な水素結合パターンを見出した。これは NMR による構造決定での誤りを効果的に除くと考えられる。

蛋白質のリガンドには、ヌクレオチド、りん脂質、NAD、補酵素 A (CoA), DNA, RNA などリン酸基を持つものが多い。ほとんどの場合、こういったリガンドの認識にはリン酸基を受容基とする水素結合が決定的な役割を果たす。また水素結合はしばしば酵素触媒にも関与する。しかしリン酸基は水素原子を持たないため、溶液 NMR においては水素結合を同定するのは困難である。

我々は蛋白質とリン酸基の間に形成される分子間水素結合を検出する新しい手法を開発することを目的にして、 ^{31}P と水素結合供与基の ^{15}N 、 ^1H 間のスカラー結合($^3\text{h}J_{\text{NP}}$, $^2\text{h}J_{\text{HP}}$)を測定した。得られた $^3\text{h}J_{\text{NP}}$ は大きく、リン酸基とアミド基間に形成される水素結合の新しい検出法である、TROSY-HNPOの測定を可能にした。

【蛋白質主鎖間の水素結合の同定と構造決定の迅速化】

TROSY-HNCO 実験により蛋白質主鎖間に観測されるアミド基とカルボキシル基間の水素結合の同定を行った。対象は β 構造を持つキチナーゼ A1 の FnIII 様ドメイン、 α/β 構造を持つヌクレオチド加水分解酵素ヒト MTH1 (hMTH1) である。

158 残基からなる hMTH1 について多くの主鎖間の水素結合を同定することができた。これらの水素結合は β ストランド間のトポロジーを同定し、大まかなフォールディングに関する有用な情報を与えた。構造決定の初期過程における HNCO による水素結合の同定は β シートに富む蛋白質の構造決定に大変有効であることを示した。

【リン酸基を含む分子間水素結合の同定】

GTP 分解酵素ヒト H-Ras の変異体 Ras(Q61L)と GDP の複合体について、 $\{^{31}\text{P}\}$ spin-echo difference ^{15}N constant-time TROSY により、 $^3\text{h}J_{\text{NP}}$ を測定した。さらに quantitative J_{HP} [^{15}N , ^1H] HSQC により $^2\text{h}J_{\text{HP}}$ を測定した。その結果、Ras(Q61L)・GDP に存在する 5 つの N-H...O-P 水素結合のうち、Ala18- α リン酸基間のみ非常に大きな J 値を観測した。また新しいパルス系列 TROSY-HNPO を利用し、 $^3\text{h}J_{\text{NP}}$ を介した Ala18 主鎖アミド ^{15}N と GDP の $^{31}\text{P}\alpha$ の相関を得ることに成功した。

溶液マジック角試料回転を利用した溶液中蛋白質の
C S A ・ 残余双極子効果の定量的観測

(北陸先端大・新素材センター)

○楯 真一、栗田順一、天谷哲康、島原秀登

**Application of high-resolution MAS NMR to quantitatively elucidate
 ^{15}N chemical shift anisotropy and residual dipolar couplings in dilute bicelle media**

Shin-ichi Tate, Jun-ichi Kurita, Tetsuyasu Amaya and Hideto Shimahara

Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)

Center for New Materials

1-1 Asahidai, Tatsunokuchi, Ishikawa 923-1292

Japan

Abstract: The measurement of residual dipolar couplings in partially ordered solutions can provide valuable global structural restraints in determining biomolecular structure. In addition to the residual dipolar couplings, the residual CSAs are also treasure to get another set of global structural information. They can further provide profound means to assess the length of the hydrogen bond. Because of high sensitivity of chemical shifts to minute changes in sample temperature and co-existing solutes in a protein solution, the residual CSAs are hard to measure quantitatively. In this paper, we describe a novel approach to gain the accurate residual CSAs with the high-resolution magic angle spinning (MAS) NMR technique. The application of the MAS to a protein dissolved in dilute liquid crystalline medium can eliminate anisotropic spin interactions. Thus, we can measure the isotropic chemical shifts of a protein in ordered medium under the MAS without changing sample temperature and solutes. This prompts us to collect the residual CSAs quantitatively. In the presentation, we will show the details in measuring residual ^{15}N CSAs of ubiquitin and the possible applications of this parameter to protein structure analysis by NMR.

Introduction: Dilute liquid crystalline media have been widely used to measure anisotropic spin interactions, such as residual dipolar couplings and chemical shift anisotropies (CSA). Residual dipolar couplings provide unique restrains in protein structure determination ¹⁻³. The dipolar couplings can provide the direct information on the orientations of the corresponding bond vectors relative to the magnetic field. These restraints compensate for the strictly local NOE and J coupling restraints and improve the accuracy of NMR-derived structures ⁴. The change in chemical shift observed for a nucleus like ^{15}N when shifting from an isotropic medium to an oriented liquid crystalline phase results from its CSA. This contains analogous information with that of the residual dipolar coupling to show the orientation of its CSA tensor relative to the magnetic field ⁵⁻⁷. Careful analysis of changes to ^{15}N chemical shifts appearing in ordered state can give the magnitude of ^{15}N CSA, $\Delta\sigma$, and the orientation of the principle component of the ^{15}N CSA with respect to the NH bond vector, α . Because ^{15}N CSA values, $\Delta\sigma$ and α , are shown to sensitive to backbone conformation and hydrogen bond strength ⁸, the quantitative analysis of ^{15}N CSA values will give us invaluable structural information of a protein.

Keywords : chemical shift anisotropy, magic angle spinning, residual dipolar coupling, protein structure, NMR

たて しんいち、くりた じゅんいち、あまや てつやす、しまはら ひでと

As chemical shifts are extremely sensitive to sample conditions, such as temperature and co-existing solutes, the measurement of orientation-dependent changes to ^{15}N chemical shift or the residual CSA requires more careful experiment than that for the residual dipolar couplings. In recently published reports, those values were measured from the chemical shifts differences between those measured under isotropic and ordered states by changing sample temperature with subtracting the contributions from intrinsic temperature inducing chemical shift changes^{6,7}. Those observed results have shown good correlation between the observed values and the calculated residual CSAs from a high-resolution crystal structure, but they do not seem to be accurate enough to evaluate residue specific CSA. In the present study, we will show the useful application of the high-resolution magic angle (MAS) NMR techniques to quantitatively measure the residual ^{15}N CSAs. This method would open up the direct way to utilize the CSA values to elucidate the local backbone structure and hydrogen bond strength.

1. Effect of magic angle sample spinning to dilute liquid crystalline medium

The dynamics of the liquid crystal director during high-speed sample spinning have been extensively investigated⁹. When a liquid crystal is spun around the tilted axis against the magnetic field with high spin rate, the director does not have time to re-align itself to the magnetic field. Under this high-spinning condition around the tilted axis, the director reorients in such away that the time average of the potential energy is minimum. In general, for liquid crystals with negative diamagnetic anisotropy, $\Delta\chi < 0$, director is distributed in a plane perpendicular to the rotation axis when $0^\circ < \theta < 54.7^\circ$ where θ is the angle between the rotation axis and the magnetic field. Consequently the anisotropic interactions are scaled down by:

$$D_{\text{obs}} = (-1/4)D_s(3\cos^2\theta - 1) \quad (1)$$

where D_s represents the static anisotropic interaction. When $54.7^\circ < \theta < 90.0^\circ$, the directors tend to align along the rotating axis, and the anisotropic interactions are scaled down by :

$$D_{\text{obs}} = (-1/2)D_s(3\cos^2\theta - 1) \quad (2)$$

From above consideration, the MAS rotation of a dilute liquid crystalline medium can be expected to diminish anisotropic spin interaction in a protein caused by weak molecular ordering when spinning rate is larger than that of the liquid crystal director re-orientation.

In the present study, we used 7.5% (w/v) DMPC/DHPC/CTAB bicelle to achieve weak ordering of a protein. Figure 1 shows the solvent ^2H spectra measured under the MAS with 2.6kHz sample spinning (b) and in the static state (a) at 30°C . As clearly seen from those spectra, anisotropic interaction seen on the residual quadruple coupling of ^2H , the MAS with 2.6kHz can be effective to even this dilute liquid crystalline medium.

2. Application of the MAS to measure the residual dipolar couplings

In the present study, we used human ubiquitin as a target protein for devising this technique. Figure 2 shows the comparison of the IPAP spectra of ^{15}N ubiquitin in 7.5% bicelle medium to demonstrate the effect of the MAS to the observed $^1\text{J}_{\text{NH}}$ values. The observed $^1\text{J}_{\text{NH}}$ values of ubiquitin in 7.5% bicelle medium under 2.6kHz MAS were consistent with those collected for the protein in the solution without bicelle; the pair wise r.m.s.d. value was

0.59 Hz corresponding to the experimental reading error range. Thus the data show the MAS can surely decouple the residual dipolar interactions for the protein in bicelle medium.

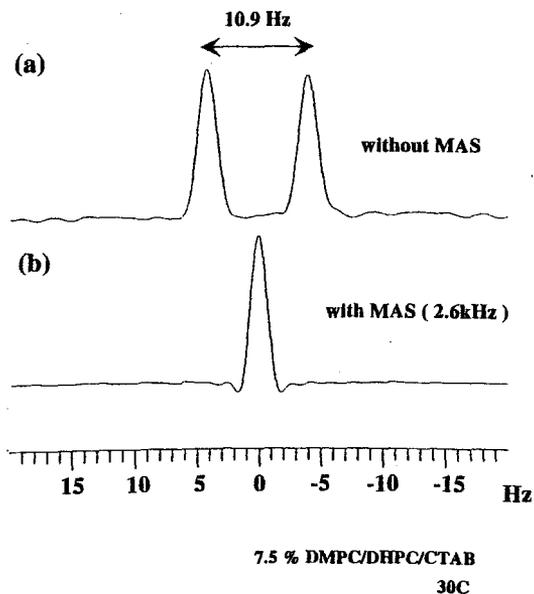
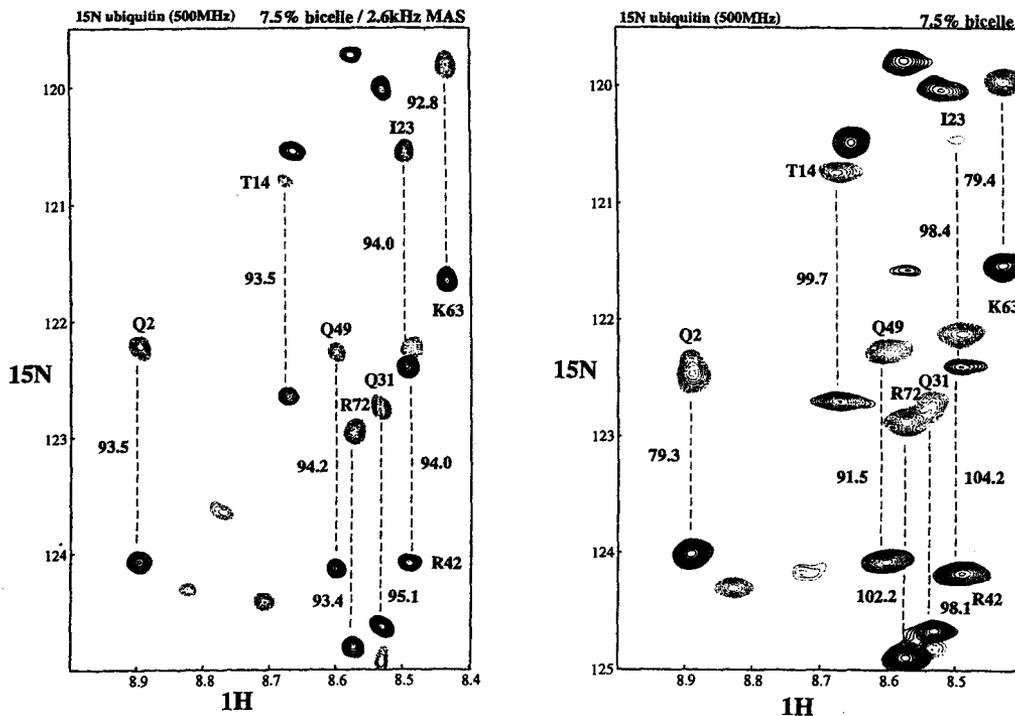


Figure 1. Influence of magic angle sample spinning on the solvent ^2H quadrupole splitting.

Figure 2. Comparison of the IPAP spectra of ^{15}N labeled ubiquitin measured in the static state and under the MAS condition.



3. Measuring the residual CSAs for ubiquitin

The above data clearly demonstrate that the MAS can diminish the anisotropic spin interaction caused by weak molecular assignment in dilute bicelle medium. Thus, the changes to ^{15}N chemical shifts of the weakly ordered protein caused by the MAS application directly correspond to the residual CSAs. Figure 3 shows the representative parts of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of the same ^{15}N ubiquitin sample dissolved in the 7.5% bicelle medium observed in static (a) and under MAS (b) conditions. After applying the MAS, we observed significant changes to ^{15}N chemical shifts from those in the static spectrum. As indicated with black triangles in Figure 3, L15 shows quite large ^{15}N chemical shift alteration under the MAS. It is noted here that in the present experiment all sample conditions are exactly the same in both spectra (a) and (b) except for the application of the MAS. Thus, we do not have to consider unexpected effects on the chemical shifts from the minute differences in the sample condition. Further analysis on the ^{15}N CSA values based on the present observation will be given in the presentation.

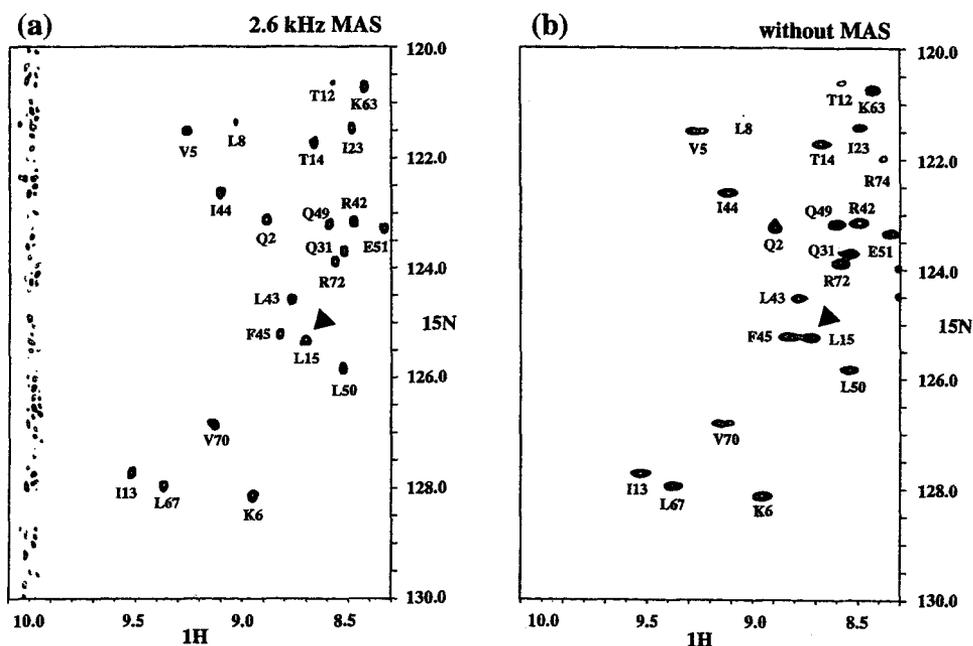


Figure 3. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N labeled ubiquitin measured in static state and under the MAS condition.

References

1. Tolman, J. R., Flanagan, J. M., Kennedy, M. A., and Prestegard, J. H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9279-9283.
2. Kung, H. C., Wang, K. Y., Goljer, I., and Bolton, P. H. (1995) *J. Magn Reson. B*, **109**, 323-325.
3. Tjandra, N. and Bax, A. (1997) *Science*, **278**, 1111-1114.
4. Clore, G. M. and Gronenborn, A. M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5891-5898.
5. Ottiger, M., Tjandra, N., and Bax, A. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 9825-9830.
6. Cornilescu, G., Marquardt, J., Ottiger, M., and Bax, A. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6836-6837.
7. Boyd, J. and Redfield, C. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7441-7442.
8. Sitkoff, D. and Case, D. A. (1998) *Prog. NMR spectrosc.* **32**, 165-190.
9. Courtieu, J., Alderman, D. W., Grant, D. M., and Bayles, J. P. (1982) *J. Chem. Phys.* **77**, 723-730.

Acknowledgements: This work is supported by the grant from the Sumitomo Foundation.

第2日 (11月9日木曜日)

講演要旨

二量子四極子分裂画像による 関節軟骨応力変形の解析

(京都府立医大・一生理¹・整形²、テルアビブ大・化学³)

○瀬尾芳輝¹, 生駒和也¹, 日下義章², H. Shinar³, G. Navon³

Deformation of Articular Cartilage Analyzed by ²H DQF Spectroscopic Imaging.

¹Department of Physiology, ²Department of Orthopaedic Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan,

³School of Chemistry, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Tel Aviv 69978, Israel.

Y. Seo¹, K. Ikoma¹, Y. Kusaka², H. Shinar³ and G. Navon³

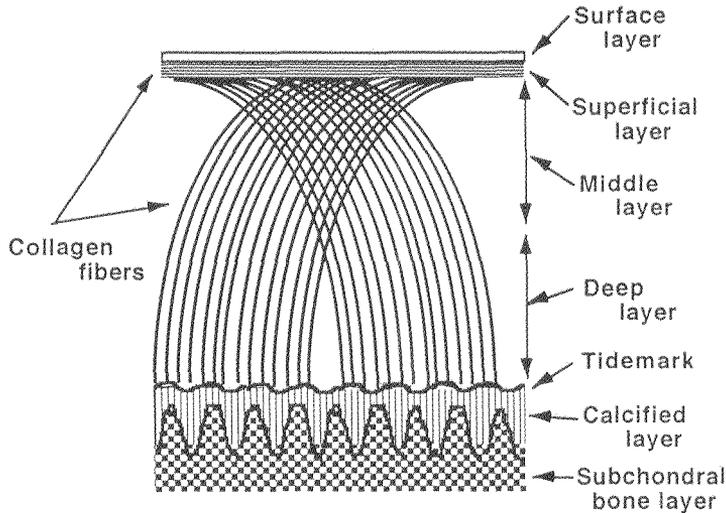
We have measured the order of the collagen fibers in articular cartilage by using ²H double-quantum-filtered (DQF) spectroscopic imaging that depicts exclusively water interacting with oriented structures. In the absence of load, a large splitting is observed in upper area of the calcified layer and a smaller splitting in the deep layer. The splitting disappears in the middle layer and reappears at the surface. When the cartilage was rotated and was set its surface parallel to the static field, the splitting of the calcified and deep layers is halved while the splitting of the surface layer is increased. This is an indication that the fibers align perpendicular to the bone at the deep layer and parallel at the surface. Under static loads, while the increase of the splitting at the surface and the thickening of this zone continues, the splitting at the deep layer completely collapses. The marked collapse of the splitting near the bone may be a result of the crimping of the collagen fibers in this layer.

【はじめに】 関節軟骨は、図1に示す様に数層の層構造を持っている。コラーゲン繊維は、石灰化層から垂直に立ち上がり、中間層で緩やかに曲がり、表層では、表面に平行に走っている。荷重負荷に最適化した構造を有していると考えられている。非荷重時の構造については電子顕微鏡などによって研究が進められてきたが、荷重下の関節軟骨については、極めて限られた知見しか得られていない。我々は、重水置換したアキレス腱組織について、重水素核NMRスペクトルの四極子分裂の大きさが、コラーゲン繊維の走行の方向や乱れに敏感であり、アキレス腱断裂後の変性・修復過程に著しく変化する事を示した。今回、二量子四極子分裂画像法を用いることにより、コラーゲン繊維に配向した重水素水分子の四極子分裂をマーカーとして、非荷重時・荷重時の関節軟骨のコラーゲン繊維の構造変化を可視化した。さらに、荷重強度を変化させたときに生じる連続的変化について新たな知見を得ることができた。

キーワード：水分子、二量子フィルター-NMR、四極子分裂画像、関節軟骨

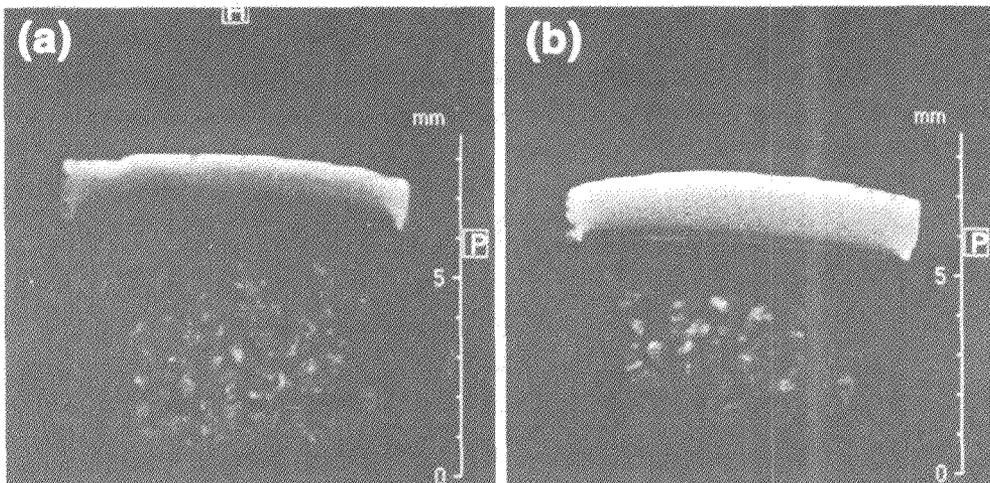
せおよして、いこまかずや、くさかよしあき、Shinar H.、Navon G.

Fig. 1. Structure of articular cartilage and orientation of collagen fibers.



【方法】 新鮮な食用成牛の大腿骨内頰の関節軟骨を実験材料とした。大腿骨内頰遠位部の荷重負荷部位および後方関節面の非荷重負荷部位から、軟骨・軟骨下骨および海綿骨を一塊として直径7 mmの円柱状に摘出し、重水素水生理食塩水中に1～数時間置き、測定試料とした。外形10 mmの耐圧NMR試料管 (Wilmad) 内に関節軟骨表面が静磁場方向に対して垂直になるように置き、ガラスフィルターとテフロンプラグを介し、非磁性バネにより、0.15～1.0 MPaの荷重を印可した (図4a)。NMR測定は、AMX-300wb NMR分光計 (7.05 T、Bruker) に、直径10 mm H-2 RF コイル、H-2 チルトコイルおよびH-1 RFコイル、Micro2.5マイクロイメージングプローブを用い、室温(24℃)で行った。

Fig. 2. T2*-weighted gradient-echo H-1 MRI of the weight-bearing part of cartilage (a) and non-weight-bearing part of cartilage (TR/TE = 300/4 ms, Flip angle = 45°, FOV = 12.8 mm², data matrix = 256², slice thickness = 1 mm).



【結果・考察】

1. H-1 T_2 緩和時間とH-1 MRI 荷重部と非荷重部の関節軟骨の T_2 強調gradient-echo画像（非荷重状態、TR/TE = 300/4 ms、Flip angle = 45°）を図2に示す。いずれも軟骨表層直下の信号強度が高く、深層に行くに従って低下しているが、信号強度の減少は、荷重部で顕著であった。Multi-spin-echo法により T_2 緩和時間を測定してみると、荷重部軟骨の T_2 緩和時間は、二峰性を示した。軟骨最表層で最長(40 ± 3 ms)中間層にかけて急激に短縮し中間部のやや骨よりの部位で最小値(8 ± 0.4 ms)をとり、深層で再び延長し最深部で39 ± 9 msをとった。非荷重部においては、二峰性は示すものの深部での T_2 緩和時間の延長は顕著ではなかった。また、 T_2 緩和時間は、静磁場と軟骨とのなす角度により変化し、深部の緩和時間の変化が大きい。よって、H-1 NMRにおいても、軟骨内の水分子の緩和時間が部位によって異なり、構造タンパク質であるコラーゲン繊維の走行構造を反映しているものと考えられてきた。

2. H-2 二量子四極子分裂画像 図3に二量子四極子分裂画像のパルス系列を示す。二量子フィルターにより、水分子の重水素酸素核間の四極子相互作用がゼロに平均化されない場合に生じる2nd rank SQ coherence ($T_{2,1}$)を選択的に測定した。軟骨の深さ方向の位相エンコード磁場勾配パルスを、二量子緩和時間内(t_{DQ})に与えた。スライス選択は、最初の90°パルスを周波数選択パルスとしスライス選択磁場勾配パルスとともに与えればよいが、今回は省いた。

図4に典型的な荷重部軟骨の二量子四極子分裂画像を示す。石灰化層から最深部にかけて、もっとも大きな四極子分裂（約1500 Hz）が測定され、深層から中間層にかけてより小さな四極子分裂（約500 Hz）が測定され、表層に向けて次第に分裂幅を小さくする。表層直下の部分で四極子分裂は無くなるが、最表層部では小さい分裂が認められた。静磁場内で軟骨を90度回転させると、中間層以下の四極子分裂は1/2に、最表層は、2倍弱に増大した。よって、コラーゲン繊維は、深部では骨に対して垂直方向に、最表層では骨に対して平行に、中間層では様々な方向に、走行しているものと考えられる（図1）。

Fig. 3. Pulse sequence and coherence-transfer pathway of double-quantum filtered 1D spectroscopic imaging.

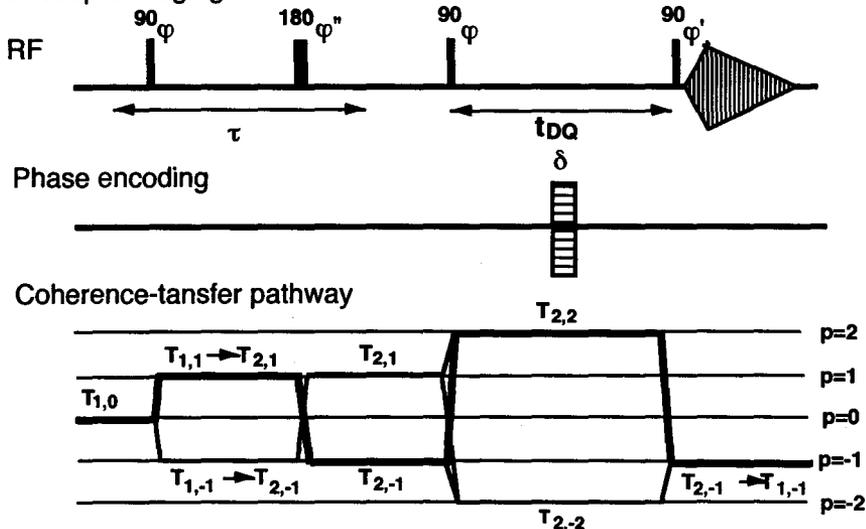
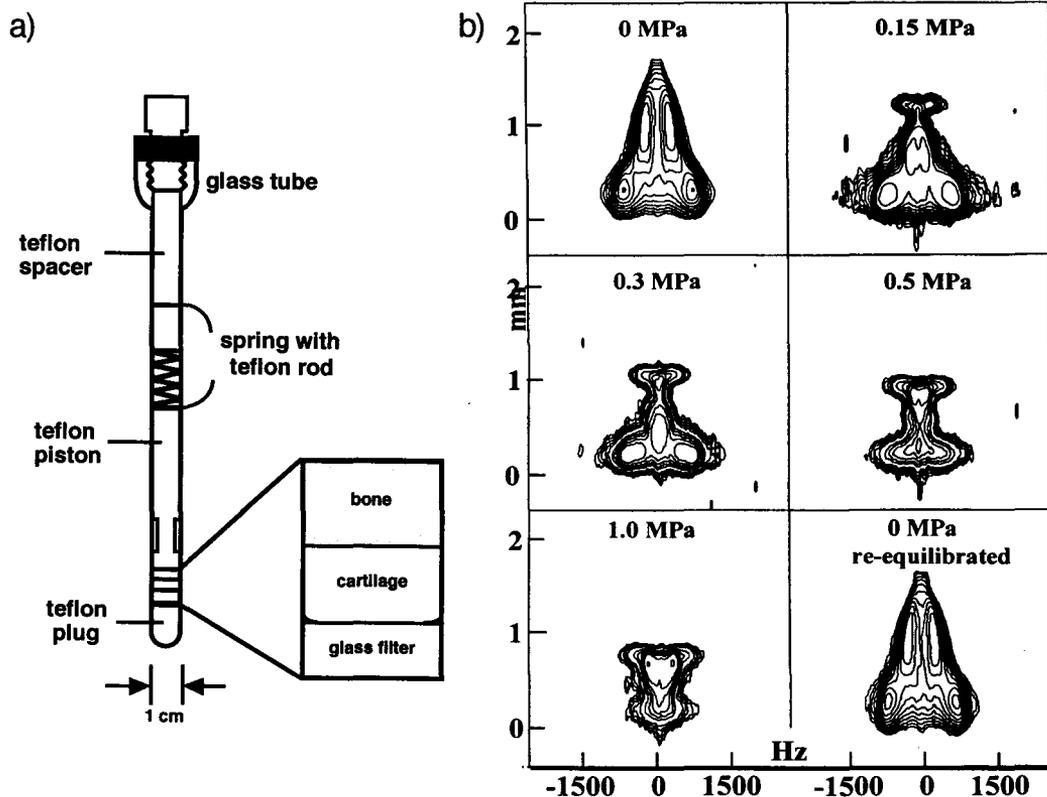


Fig. 4 a) Scheme of compression device of cartilag. b) H-2 DQF spectroscopic images of a bone-cartilage plug without load and with static loads (0.1 - 1.0 MPa). Scale indicates thickness of cartilage from subchondral bone. (TR/ τ = 1 sec/100 us, FOV = 12.8 mm x 20 kHz, data matrix = 64 x 2048)



3. 荷重による二量子四極子分裂画像の変化 図4に荷重負荷時の二量子四極子分裂画像の変化を示す。0.1~1.0 MPaの荷重を順次加えていくと、軟骨の厚みはだんだんと薄くなる。軽荷重(0.1~0.3 MPa)では、中間層から深部にかけての小さい四極子分裂が完全に無くなり、最表層部の分裂が大きくなった。高荷重(0.5~1.0 MPa)では、最表層部の分裂はさらに大きくなり、その領域の厚さも増していく。同時に最深部の大きな四極子分裂が消滅した。脱加重し、生理食塩水内にしばらくおくと、非荷重時とほとんど同一の二量子四極子分裂画像が得られた。以上の結果より、荷重負荷時には、まず、中間層のコラーゲン繊維が大きく変形し、荷重を受け止める。高荷重時には、深層部のコラーゲン繊維にまで、変形がおよぶ事が明らかとなった。

【まとめ】 二量子四極子分裂画像により、関節軟骨の荷重負荷によるコラーゲン繊維の変形を可視化する事が出来た。高荷重時の最表層部および中間層のコラーゲン繊維の再配向については、荷重を掛けつつ静磁場に対する角度を変化させた測定が必要である。現在、角度可変荷重プローブを製作中である。

実験動物における薬理学的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}

Pharmacological brain functional imaging method in experimental animals

(Natl.Inst.Enviroin.Studies¹, Tsukuba Univ²) F.Mitsumori¹, M.Kumagai^{1,2}

We studied a functional magnetic resonance imaging method for experimental animals to investigate the pharmacological activation or modulation of the brain function. The method was based on the T_1 shortening of water in the activated neurons by an intrusion of manganese ion through the calcium channel. Image subtraction between after and before the activation gave a reliable functional mapping of the brain with eliminating the signal change due to non-specific activation.

【はじめに】ヒトを対象とする NMR 脳機能マッピング法 (fMRI) が広汎に行われているが、薬物や毒物の脳機能に及ぼす影響を解明するためには、薬物投与が自在に行える動物における脳機能イメージング法の確立が望まれる。このためには、動物の麻酔下における機能発現を高感度でとらえられる方法が必要である。前回、このような要請のもとに我々はマンガンイオンをコントラスト試剤として用いる高感度脳機能イメージング法を報告した。今回、動物へのマンガン投与法を改善し、また、標的薬物投与の前後で連続的に測定を行い、投与前後の差分イメージを作製することにより、薬物投与による特異的な脳機能賦活を選択的に、再現性よく測定できる方法を検討した。

【方法】雄の Wistar ラットを halothane 麻酔下 (1%) で右総頸、内頸動脈間に外部循環回路を設定し、これより $MnCl_2$ 水溶液 (60mM)、D-mannitol (25%, 5-7.5ml/kg 体重)、脳賦活化のための化学物質等を投与した。 $MnCl_2$ 水溶液は、D-mannitol によって右側の血液脳関門 (BBB) を破壊後 1.4ml/h で 10 分間連続投与する方法と、予め 6 分間投与し、BBB 破壊後、再度 6 分間投与する 2 つの投与法を用いた。麻酔は脳賦活を行う約 40 分前に α -chloralose (30mg/kg) + urethane (300mg/kg) に切り替えた。測定は、Bruker Biospec24/30 分光計に、自作の内径 50mm の sine コイル検出器を用いて行った。 T_1 強調画像 (TR/TE=306/13ms) をスピンエコー法で測定した。位相エンコードを 64 段とし、積算 2 回で 1 画像を約 40 秒で取得した。これにより、化学物質 (主としてグルタミン酸) 投与の前後で連続して画像を測定し、投与前後の差分画像を作製した。

【結果と考察】神経細胞の賦活に伴うカルシウムチャンネルの活性化により、細胞外のマンガンイオンが細胞内に取り込まれ、これによる活動神経細胞内の水の縦緩和時間の短縮を T_1 強調画像において信号強度の増強として観測するのが本法の趣旨である。この方法は、血流動態の変化を観測する BOLD 法に比べ、より神経活動に直接的

NMR イメージング、脳機能、マンガン、 T_1 強調画像、神経伝達物質

みつもりふみゆき、くまがいめぐみ

で、信号の変化量も大きいという利点を有する。しかし、(1) 外来性のマンガン投与を必要とする、(2) 神経細胞へのマンガニオンの取り込みは、測定的时间スケールでは非可逆的で、信号の変化は積分的に観測される等の難点がある。(1)については、昨年マンガニオンの投与法の改善により、必要とされるマンガン量を 1/10 に軽減できることを報告した。(2)については、麻酔の軽減や、制御困難な動物脳の非特異的賦活化によっても信号増強が起こってしまうため、標的とする薬物による信号変化をこれと区別することが困難である。実際、実験を積み重ねるに従い、この非特異的な脳機能活性化が起こる例が散見され、賦活後の T_1 強調画像の測定のみでは不十分であることが明らかになった。今回提案する方法では、一回の測定を 40 秒に短縮し、標的薬物を投与する前後で測定を繰り返し、その差分画像をもって賦活化部位の判定を行うこととするものである。図 1 に右脳へのグルタミン酸の投与前後における T_1 強調画像、およびその差分画像を示す。差分画像において右脳皮質部位での賦活化が明瞭に観測できる。非特異的な信号変化がある場合もこの差分画像によりグルタミン酸の効果を判定できることを確認した。また、対照実験として、生理食塩水を投与した場合には、非特異的信号増強の有無にかかわらず、差分画像では信号増強は認められなかった。基本的に、D-mannitol 投与により血液脳関門を破壊した後ではすべての脳機能発現が信号増強に寄与するため、マンガン投与の中間で D-mannitol を投与し、血液脳関門破壊から測定までの時間を短縮する変法も試みたところ、再現性に若干の向上が見られた。以上の点から、差分画像法を用いることにより、また、マンガン投与法を改良することにより、興奮性の薬物による脳賦活の機能イメージング法の信頼性、再現性を改善することができた。

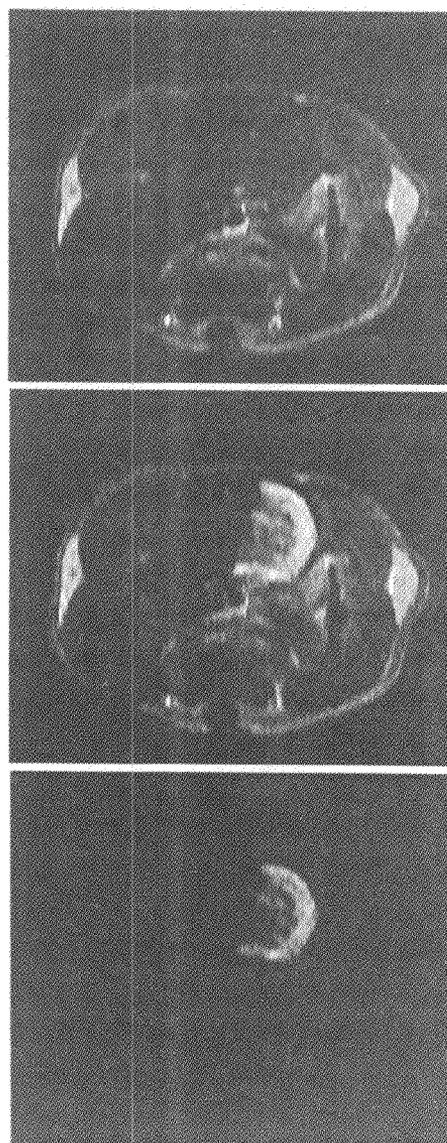


Fig. 1. T_1 -weighted images of a rat brain in the activation to the right hemisphere by $26 \mu\text{mole}$ of glutamic acid. top: before activation middle: after activation bottom: subtracted image

超偏極¹²⁹Xeガスを用いた器壁による緩和効果の研究

(阪大・医) ○藤原英明、木村敦臣、柳川康洋、(国立循環器病セ・放射線) 飯田秀博、(工技院・大阪工業技術研究所) 平賀 隆、(工技院・電子技術総合研究所) 服部峰之

Relaxation Behavior of Laser-Polarized ¹²⁹Xe Gas: Size Dependency and Wall Effect of the T₁ Relaxation Time in Glass and Gelatin Bulbs

Hideaki Fujiwara, Atsuomi Kimura, Yasuhiro Yanagawa, Hidehiro Iida,¹ Takashi Hiraga,² and Mineyuki Hattori³

School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University

¹ Dept. of Biomed. Radiology, National Cardiovascular Center Research Institute

² Dept. of Material Physics, Osaka National Research Institute

³ Supermolecular Science Division, Electrotechnical Laboratory

Size dependency of the relaxation time T₁ was measured for the laser-polarized ¹²⁹Xe gas encapsulated in different sizes of cavity made by glass bulbs or gelatin capsules. The dependency is analyzed on the basis of the kinetic theory of gases and a relationship is derived in which relaxation rate is connected with the square inverse of the diameter of cavity. Such analysis provides a novel parameter which denotes wall effect on the relaxation rate when gas molecule collides with the surface once in a second. Dependency of the relaxation time on the materials comprising glass bulbs or gelatin capsules is also discussed.

序. 超偏極希ガスNMRは物理から化学、医学まで応用可能な最新測定法として注目されるようになった。¹ 超偏極希ガスの製法は、半導体レーザー素子が開発され高出力で安定した波長のものが得られるようになり以前に比べ容易となった。またRbのようなアルカリ金属の使用にもかかわらず、ガラスの加工などによりかなり自由に生成装置を組み上げることが出来るようになった(生成装置については、本討論会の講演番号P64参照)。我々は、自作の超偏極希ガス生成装置を使って¹²⁹XeのNMR緩和時間(T₁)を測定し、この緩和時間における器壁の効果を調べたので以下に報告する。

実験.

- 1) レーザ偏極装置: 半導体レーザーとしてOpto Power社製OPC-A020-795-CSPSを用い、(1/4)入板を通して円偏光とした。この型は光出力がグラスファイバー接続ではないので円偏光を得るのは簡単である。磁石は縦型の分析用NMR装置の漏れ磁場を利用し

超偏極希ガスNMR, Xe-129, 緩和時間, サイズ依存性, 壁による緩和効果

ふじわら ひであき、きむら あつおみ、やながわ やすひろ、
いいだ ひでひろ、ひらが たかし、はっとり みねゆき

たので、垂直方向の12mT程度の磁場の位置に偏極セルを置いた。偏極セルは120℃の恒温槽内に置いた。セルはシリンダー状で外径6cm長さは10cmである(一部長さ20cmのセルも用いた)。装置全体の設計については本討論会の講演番号P64を参照された。Rbは約0.2gを高真空(10⁻⁶Torr)下で封入した。ガラスはパイレックスガラスを用いたが、今回は特に表面コーティングは考慮しなかった。

用いたXeガスは天然存在そのままの組成で高純度品を用いた。数気圧以上に加圧した方が偏極度は上がるはずであるが、ガラス装置の使用上の安全を優先して1気圧で実験を行った。

- 2) ガラス球とゼラチンカプセル: ガラス球はそれぞれの材質のガラス管を購入し自作した(一部石英ガラスなどは阪大ガラス工作センターに依頼)。実験に使用したガラス球の材質は以下のものである: 石英(東芝製)、パイレックス(IWAKI TE30)、硬質ガラス(赤川製)、並ガラス(日本電気製)、北海スーパー(日本電気製)。日本薬局方によるゼラチンカプセルは市販品をそのまま用いた。これはシリンダーの上下に半球のふたが付いた形である。球形ゼラチンカプセルは特注品として入手した。
- 3) 球の内径の測定: ガラス球やゼラチン球の内径は、中に水を注入しその重さから決定した。局方ゼラチンカプセルのサイズはカタログ上の値を引用した。
- 4) NMR測定: Xe-NMRの測定はVarian社製INOVA 400WB装置で行った。測定周波数は110MHz、温度は室温(25℃)である。ガラスやゼラチン球は10φ試料管に入れて測定した。これらの球は自作のものは細い枝管を付け、市販品などには針で孔を開け、真空ラインを利用して偏極ガスを導入し、粘着テープで密封した。

結果と考察.

1) 超偏極¹²⁹XeのT₁測定.

超偏極の磁化は熱平衡の磁化に戻るプロセスが(縦磁化について) T₁で決まることからT₁を求める式が知られている:

$$\ln(S_n) = \{\ln(\cos \alpha) - T_R/T_1\}(n-1) + \ln(S_1) \quad (1)$$

ここでは、α°パルスがT_Rの時間間隔で繰り返す(全部でn回)照射され信号強度Sが測定される。S₁とS_nは1番目とn番目の信号強度を表す。この式より、ln(S_n)をn-1に対してプロットすると、勾配がln(cos α) - T_R/T₁で切片がln(S₁)となることが分かる。

2) 90°パルスの測定法.

超偏極実験でパルス角を測定する場合、従来の試行錯誤的な方法は適用できない。測定対象の試料についてパルス角を正確に評価するため、本研究では以下の方法を採用した。式1に基づくT₁測定を、同じ試料について、パルス照射時間を2倍にして繰り返すとする。α°と2α°パルスに対する式1の差をとると:

$$\text{傾斜の差} = \text{slope}(2\alpha) - \text{slope}(\alpha) = \ln\{(2\cos^2\alpha - 1)/\cos\alpha\} \quad (2)$$

となり、これからcos αが求められ、αが決まる。ここでの実験ではαは16.5 μsecとなった。

3) 種々のガラス球についてのT₁値.

T₁の測定値を表1に掲げた(次ページ)。

Table 1. Relaxation Data of the Laser-Polarized ^{129}Xe Gas Encapsulated in Glass Bulbs and Gelatin Capsules *

Glass Bulb				Gelatin Capsule			
Iwaki TE30		Hokkai-Super		Pharmacy Grade		Gelatin Bulb	
d	T_1	d	T_1	d	T_1	d	T_1
7.8	94.1±9.8	8.1	27.6±2.8	8.8 (#00)	105.4±8.5	6.3	179.9±15.0
6.6	66.9±9.3	6.1	20.3±0.1	7.8 (#0)	84.1±4.7	5.7	150.0±20.8
5.8	25.3±4.5	5.5	17.1±0.7	6.8 (#1)	78.8±5.8	4.3	89.8±10.3
4.2	18.7±2.8	4.9	14.7±0.7	6.3 (#2)	59.2±3.7	4.1	79.9±9.4
4.0	13.9±3.4			5.8 (#3)	52.7±3.8		
				5.1 (#4)	45.5±4.0		

Glass Bulb							
Quartz		Iwaki TE30		Akagawa		Ordinary-Class	
d	T_1	d	T_1	d	T_1	d	T_1
6.4	172.8±16.1	6.6	65.0±5.1	6.8	126.8±15.3	6.4	97.2±13.4

*d is the inside diameter of the spherical volume in mm and T_1 is the longitudinal relaxation time in sec. Standard errors are estimated in the repeated measurements.

4) T_1 のサイズ依存性の解析.

簡単な気体分子運動論的な考察から、以下の式を導くことが出来た：

$$1/T_1 = (15D/t_{1,\text{wall}})(1/d^2) + 1/T_{1,\text{inf}} \quad (3)$$

ここで、Dは自己拡散係数、 $t_{1,\text{wall}}$ は1秒に1回の速度で器壁に衝突が起こる場合の1回当たりの緩和時間への寄与、dは空孔の直径、 $T_{1,\text{inf}}$ は無有限大サイズ中での緩和時間である。局方ゼラチンカプセルについては、この式は以下のようなになった（図1）：

$$1/T_1 = 0.504(\pm 0.049)(1/d^2) + 0.00321(\pm 0.00126), \quad r=0.981 \quad (4)$$

ここで、±の値は標準誤差、rは重相関係数を表す。自己拡散係数として、1気圧で室温のXeガスについての値、 $D=5.7\text{mm}^2/\text{sec}$ を利用すると、 $t_{1,\text{wall}}=170\pm 17$ が得られる（註：これは無次元量となる）。内径9.2 mmの場合に器壁への衝突回数が1回/秒となることから、このサイズで1気圧、室温のXeの T_1 に及ぼす器壁の緩和効果は170秒となる。あるいは緩和速度に1/170secの寄与があることとなる。

このように $t_{1,\text{wall}}$ は空孔サイズを標準化した上で器壁の緩和効果を表すパラメーターとして用いることが出来る。

上記カプセルは正確には球形でなく球形近似をしたわけであるが、球形のゼラチンカプセルについて同様の実験を行うと：

$$1/T_1 = 0.199(\pm 0.005)1/(d^2) + 0.00052(\pm 0.00023), \quad r=0.999. \quad (5)$$

が得られた。傾斜の若干の違いは、形の違いの他、ゼラチンの表面状態の違いを反映していると思われる（正確な比較は局方カプセルの形状効果をコンピューターシミュレーションすることにより得られるはずである）。

パイレックスガラスに対しては以下の式が得られた：

$$1/T_1 = 0.968(\pm 0.163)(1/d^2) + 0.00003(\pm 0.00847), \quad r=0.948 \quad (6)$$

この式から、 $t_{1,wall} = 88 \pm 15$ が得られる。即ち、パイレックスガラスはゼラチンカプセルより緩和効果大きい（5式と比べると5倍程度大きい）。

同じガラスでも北海スーパーでは：

$$1/T_1 = 1.218(\pm 0.045)(1/d^2) + 0.0174(\pm 0.0014), \quad r=0.999 \quad (7)$$

となった。パイレックスガラスより緩和効果は若干大きいが大差はない。

種々のガラスの種類と緩和効果の違いを簡単に比較した結果も表1に掲げてある。

やはり石英ガラスが一番良いデータを与える。

ガラスの器壁の緩和効果は微量に含まれる鉄分（パイレックスで0.3%の酸化第二鉄が含まれる）により大きく増強されるが、ガラス加工中のこのような金属成分の混入などにも影響される。ガラスの表面処理（シラン系化合物による化学処理）が緩和効果を抑えることが知られており、長い緩和時間の実現にはこのような処理が不可欠であろう。

上の4～6式で、切片の値から $T_{1,inf}$ を見積もると100～1000秒程度にかなりの幅が見られた。本来は無限大空孔中の緩和時間として10000秒程度の値が期待されるが、これより短いことは、Xeガスへの空気など不純物の混入によると考えられる。これは、超偏極セルからの発生（微量の水分はアルカリ金属と反応して水素ガスを発生する）、あるいは、偏極ガスを取り出してサンプルに充填中に空気が混入することによると思われる。 $T_{1,inf}$ の正確な評価には、今回より大きな容器を用い、真空ラインに直結したXeガス充填が必要であろう。

今回の結果は、Xeの緩和効果が表面の材質や状態を反映して大きく変化することを示している。XeのNMRが、生体を含めて、表面の物理化学的状態あるいは生体表面の病態解析に利用出来る可能性が示唆される。

- 藤原英明、「超偏極希ガスを用いた医用磁気共鳴技術の発展」、技術予測シリーズ：21世紀に期待される技術～その将来展望、日本ビジネスレポート社、p.69-75 (2000).

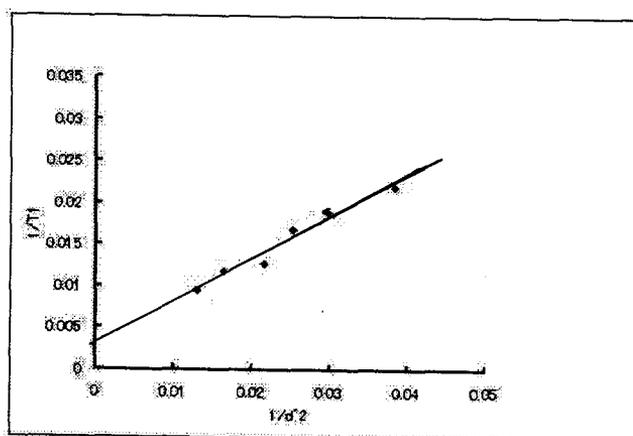


Fig.1 Plots of $1/T_1$ against $1/d^2$ for the gelatin capsules (eq. 4) .

超並列型 MR マイクロスコープの開発

—システムコンセプトとシステム設計—

(筑波大学物理工学系)○巨瀬勝美, 拝師智之, 松田善正

Development of a Super-Parallel MR Microscope: Concept and System Design

Katsumi Kose, Tomoyuki Haishi, Yoshimasa Matsuda

The super-parallel MR microscope, in which a large number of samples can be measured at the same time, has been proposed. The system has a specially designed gradient probe system composed of a large number of gradient probes, each of which is essentially the same independent gradient probe and cooperatively works. By operating the probe system in a homogeneous magnetic field at the same frequency, a number of MR microscope images can be obtained using a single transmitter and multiple receiver system.

1. はじめに

短期間に多量のサンプルの MRI/MRM(MR Microscopy)撮像を行う応用が, いくつか考えられている. また逆に, このような撮像が可能となれば, MRI/MRM の応用分野が飛躍的に広まるものと期待される.

上記の計測を可能とするために, 一つのアプローチとして, サンプルを撮像領域へ次々と自動的かつ高速に供給し, 高速, もしくは超高速イメージング法を用いて撮像する手法が考えられる. しかしながら, この方法では, 同時に1個のサンプルしか計測できないため, 処理速度に限界があり, 飛躍的に処理速度を高めるためには, 同時に複数のサンプルを撮像する手法, すなわち計測の「並列化」が必要である. 本研究では, MR マイクロスコープ計測を並列化するシステムを検討し, 設計したので, その結果を報告する(1).

2. 並列化 MRM における問題点と解決法—超並列型 MRM—

〈並列化 MRM に対する要求〉

最も簡単な並列化手法は, 多数のサンプルを一つの RF コイルの中に設置し, 同時に撮像する方法である. しかしながら, 画素あたりの十分な SNR を確保して信号加算を不要とし, さらに高速化を達成するためには, サンプルの大きさに適合した RF コイルを使用することが不可欠である. よって, 複数の RF コイルを, 互いに干渉しないように RF シールドボックス内に配置し, 各サンプルを各コイルで独立に励起し, 各コイルから独立した NMR 信号を受信する必要がある. また, 勾配磁場としては, 必要な強度とスイッチング速度を確保して, 各サンプルに同時, もしくは別々に印加するものが要求される.

MR マイクロスコープに必要な勾配磁場強度は, 実用的な空間分解能 (画素サイズ) の目安である $50\mu\text{m}$ を実現するために, プロトンを測定対象として, 約 $10\sim 20\text{G/cm}$ の強度を必要とする. そして, 高速撮像法を実施するためには, 最大勾配磁場まで 1ms 以下, さらに, EPI などの超高速撮像法を行うためには, 最大勾配磁場まで 0.1ms 以下というスイッチング速度が必要とされる.

MRI, MR マイクロスコープ, 勾配磁場プローブ, 超並列型 MRI

こせ かつみ, はいし ともゆき, まつだ よしまさ

＜並列化 MRM における勾配コイル＞

このような性能の勾配磁場をサンプルに印加する手法として、すべてのサンプルに対して「単一の大きな勾配コイルを用いる方法」と、「各サンプル毎に個別の勾配コイルを用いる方法」が考えられる。以下、これらの利害得失を議論する。

勾配磁場を短い時間で立ち上げる場合に、その技術的限界を決定するのは、立ち上げ時に供給する電力である。すなわち、勾配コイルのインダクタンスを L 、電流を I 、立ち上げ時間を Δt とすると、コイルに蓄えられる磁気エネルギーは $U=(LI^2)/2$ であるので、立ち上げ時に必要とされる電力 P は、 $P=U/(\Delta t)=(LI^2)/(2\Delta t)$ となる。現在のハイエンド人体用 MRI では、 $L\sim 1\text{mH}$ 、 $I\sim 300\text{A}$ 、 $\Delta t\sim 0.1\text{ms}$ であり、これらを用いて計算すると 450kW となる。

ところで、一定の勾配コイル形状で、そのサイズ（直径 a ）を変化させた場合、勾配磁場発生効率（単位電流あたりの勾配磁場） η は、 a^2 で変化し、インダクタンス L は a に比例して変化する。すなわち、勾配磁場強度を一定に保つためには、 a^2 に比例して電流 I を増加させる必要がある。よって、立ち上げ時間 Δt も一定とすれば、勾配磁場の立ち上げ時に必要な電力 P は、 a^5 で増加する。なお、直径 a の変化とともに、コイルの巻き数 n を変える可能性もあるが、 η は n に比例し、 L は n^2 に比例するため、 P は n には依存しない。

さて、勾配コイルの中に、均一な勾配磁場が発生する領域の体積は、 a^3 に比例して増加するため、その領域の中に配置できるサンプル数（RF シールドボックスの数） N は、 a^3 に比例して増加する。すなわち、サンプル数 N に対して、勾配磁場のスイッチングに必要な電力 P は $N^{5/3}$ で変化する。一方、各サンプル毎に個別の勾配コイルを用いる場合には、サンプル数 N を増やしても、電力は勾配コイルの数 N に比例して増えるだけである。もちろん、個別に勾配コイルを巻いた場合には、スペースの効率が悪く（約 $1/3$ 程度）なるが、 N が大きい場合には影響は少ない。このように、個別の勾配コイルを使用する場合は、広い均一な静磁場空間が利用できる限り、非常に多数のサンプルの同時計測が可能であり、いわば「超並列」ともいべきシステムの構築が可能である。実際、人体用 MRI で使用されている磁石の静磁場空間を活用する並列化 MRM は、超並列型システムでなければ構築不可能である。

以上のように、個別の勾配コイルを使用する方法が有利であるが、サンプル毎の勾配コイルは、どのように作成すればよいであろうか？一つのアプローチとして、アクティブシールドされた勾配コイルを近接して配置するという方法が考えられる。しかしながら構造が複雑となるため、大量に製作する場合には、簡単な構造を有する以下に述べるコイル配置が有用であると思われる。すなわち、独立した通常の勾配コイルを、コイル外の磁場も考慮して最適に配置するシステムである(2)。次節にその配置を述べる。

3. 超並列型 MRM 用勾配磁場プローブの構成

Fig.1 に勾配コイル配置の見取り図を示し、Fig.2 と Fig.3 に、コイルに流れる電流の向きを示す。このように、1 個の勾配コイルユニットは、 G_z コイルが Maxwell 型、 G_x と G_y コイルが Anderson 型であるような、単体として勾配磁場コイルとして使用できるものである。しかしながら、Fig.2 と Fig.3 に G_z コイルと G_x コイル (G_y も同様) の配置を示すように、隣接するコイルに流れる電流を同じ方向とすることにより、一つの勾配コイル

ユニットの発生する勾配磁場が、隣接するユニットの勾配磁場を増強するような配置となっている。なお、勾配コイルが固定されている箱は、RF シールドとなっており、中心部にはソレノイドコイルがあり、サンプルは上方より挿入する。

勾配コイルと RF コイルが 1 体となったユニットは、一次元的な方向ばかりでなく、二次元的、さらには三次元的に配置して、各ユニットの発生する磁場が、隣接するユニットのサンプル位置に、協調的な勾配磁場を発生するようにすることができる。Fig.4 に、このユニットと基本的に同一の設計手法で製作した勾配コイルユニットを示す。

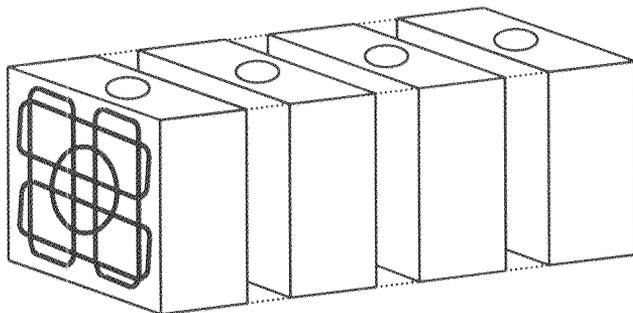


Fig.1 Overview of the gradient-probe system for the super-parallel MR microscope. The gradient probe units are placed along one direction. Two or three dimensional arrays can be used for the super-parallel MR microscope.

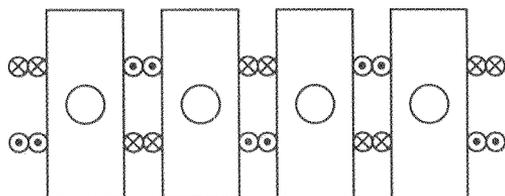


Fig.2 Current directions for Gz coils.

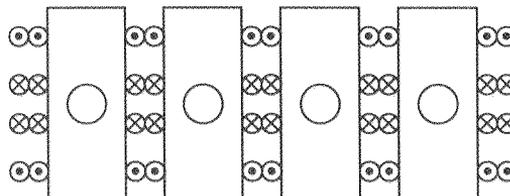


Fig.3 Current directions for Gx or Gy coils.

coils.

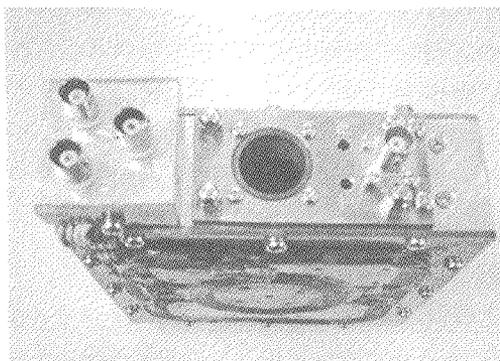


Fig.4 Gradient probe unit which uses thin gradient coils. The width of the probe is about 53 mm. The total thickness for one set of gradient coils (both sides) is about 6 mm.

4. システム構成

4個のプロープに対するシステム構成の例を Fig.5 に示す。

このように、送信高周波パルスは、同一のパルスプログラマ、RF 変調器を使用して生成し、送信機には、個別のものを使用している。また、図には示していないが、勾配コイル用電源は、共通のものを使用する。このように、同一の共鳴周波数、同一のパルスシーケンスを使用するので、送信系は、ほとんど共通化することができる。

一方、受信系は、独立した NMR 信号を受信する必要があるため、プリアンプ、検波器は、サンプルの個数だけ独立したものが必要である。しかしながら、

多チャンネルで高速の ADC を使用すれば、1 台の PC で NMR 信号を収集し、複数サンプルの NMR 信号から、それぞれ画像再構成することができるため、データ処理などの部分は共通化が可能である。

5. 考察

超並列化 MRM は万能ではなく、限られた条件の下で、非常に有用なシステムである。すなわち、信号積算が不要な程度に SNR が高く、超高速撮像法を適用すると画像コントラストの確保が困難な場合である。このため、低磁場 (1T 以下) でシステムを構築して $100\mu\text{m}$ 以下の空間分解能をめざしても、信号積算が必要なため、高磁場 (10T 以上) を使用した「直列型」MRM に対する優位性はない。また、緩和時間情報などの画像コントラストが不要であれば、直列型 MRM で、超高速撮像を使用した方が処理効率が高い。

よって、一つの典型的なシステムとしては、3~7T の磁場強度で口径 40~90cm の超伝導磁石を用いたシステム (サンプル数、数 10 個程度) であり、適した撮像対象としては、画像コントラストを優先して、 T_1 強調画像や T_2 強調画像などを取得するケースである。このような場合、どうしても位相エンコードのための繰り返し時間を確保する必要があるため、並列化による時間短縮の効果は極めて大きい。このような撮像例を、我々は計画中であるが、今後、他にも必要なケースが増えてくると予想される。 ■

References

- (1) 「NMR マイクロスコープ装置」, 特願 2000-266247.
- (2) 松田善正, 押師智之, 巨瀬勝美, 「超並列型 MR マイクロスコープの開発—勾配コイルシステム的设计—」, 第 38 回 NMR 討論会要旨集, 2000 年.

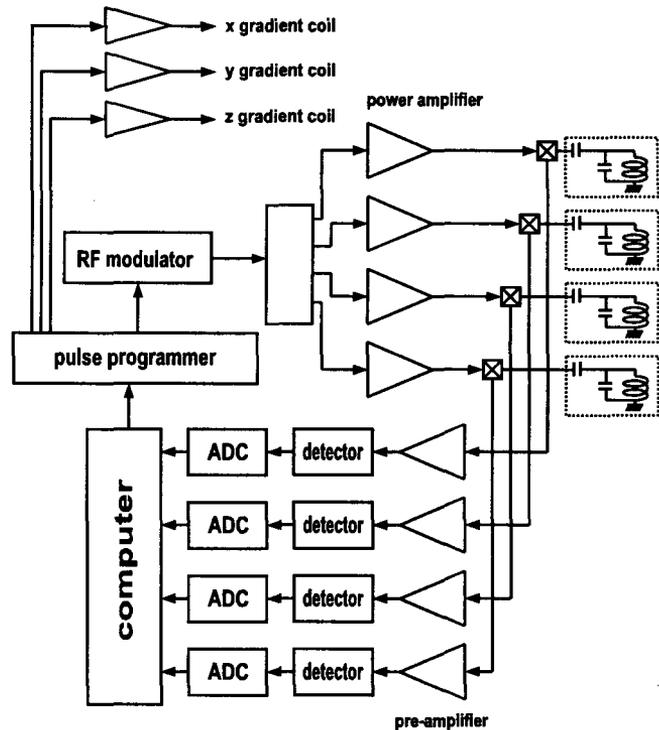


Fig.5 Block diagram of the super-parallel MRM.

NMR によるリボソーム再生因子の構造解析

(大阪大学¹、RRF 研究所²)

○吉田卓也¹、内山進²、中野博明¹、樫森啓真¹、木島広如¹、
大嶋民子¹、松原正¹、岡伸一郎¹、島原秀登¹、祭原ゆかり¹、
石野哲也²、吉田稔夫²、横瀬一輝²、大久保忠恭¹、小林祐次¹

Structural analysis of Ribosome recycling factor

Takuya Yoshida¹, Susumu Uchiyama², Hiroaki Nakano¹, Hiromasa Kashimori¹, Hiroyuki Kijima¹, Tamiko Ohsima¹, Tadashi Matsubara¹, Shinichiro Oka¹, Hideto Shimahara¹, Yukari Saihara¹, Tetsuya Ishino², Toshio Yoshida², Kazuteru Yokose², Tadayasu Ohkubo¹ and Yuji Kobayashi¹
¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ²RRF Research Inc.

The solution structure of ribosome recycling factor (RRF) from hyperthermophilic bacterium was determined by heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy. Fifteen structures were calculated using restraints of NOE-derived interproton distances, torsion angles and T₁/T₂ anisotropies. The resulting structure has an overall L-shaped conformation with two domains and is similar to that of tRNA molecule. Domain I is a rigid three α -helix bundle. Domain II is a three-layer $\alpha/\beta/\alpha$ sandwich. The backbone rmsd values of both domains were 0.7Å when calculated separately, which is smaller than that of the molecule as a whole (1.4 Å).

翻訳終結後合成したタンパク質を遊離したリボソームはリボソーム・mRNA・tRNA の複合体となる。この複合体を解体し再利用する過程は、効率のよいタンパク質生合成のために重要であると考えられる。リボソーム再生因子(RRF)は、原核生物においてこの複合体を解離させるために不可欠な分子量 22kDa のタンパク質因子である。RRF はその活性発現に EF-G および GTP を

多核多次元 NMR、立体構造、運動性、リボソーム再生因子

よしだたくや、うちやますすむ、なかのひろあき、かしもりひろまさ、きじまひろゆき、おおしまたみこ、まつばらただし、おかしんいちろう、しまはらひでと、さいはらゆかり、いしのでつや、よしだとしお、よこせかずてる、おおくぼただやす、こばやしゆうじ

必要とすることは知られているが、詳細な作用機構については限られた理解しか得られていない。我々は RRF のリボソーム再生機構について知見を得るため、さらに RRF をターゲットとした新規抗生物質の開発に寄与するため、NMR を用いた解析をおこなってきた。本研究では RRF の溶液中での立体構造および運動性を解析した結果を報告する。

大腸菌を用いた超好熱菌由来 RRF の大量発現系を構築し、重水素化を含む各種の安定同位体標識をした RRF を調製した。Varian INOVA500,600 を用いて各種の多核多次元 NMR スペクトルを測定し、ほぼ全ての ^1H , ^{13}C , ^{15}N 核の帰属を行った。また、NOE の収集および χ^1 角情報のための J 値の測定をおこなった。予備的な構造解析の結果 RRF は 2 ドメイン構造をとっており、特に一方のドメインは異方性の高いヘリックスバンドルを形成していることが明らかとなった。そこで、 ^{15}N 核の緩和時間測定を行ったところ、 T_1/T_2 はドメイン構造を反映した 2 峰性の分布を示した。 T_1/T_2 のヒストグラムから回転拡散テンソルを見積もり、H-N 核間ベクトルの配向に関する拘束条件を得た。立体構造計算には CNS を用いた。

得られた構造の RMSD は、主鎖について分子全体で 1.4 \AA と比較的大きな値を示したが、各ドメインでは 0.7 \AA であり良好な収束を示した。RRF 分子は特徴的な L 字型をしており、L の縦線に相当するドメイン I は 3 本の α ヘリックスからなる逆並行ヘリックスバンドル構造からなっていた。通常のコイルドコイル構造とは異なり、各ヘリックスは直線状でそのねじれは小さかった。また L の横線に相当するドメイン II は 1 本の α ヘリックス及びそれぞれ 2 および 4 ストランドからなる 2 つの逆並行 β シートによって形成されていた。分子全体の形・大きさは tRNA と非常によく似ており、これは RRF が tRNA と同様なかたちでリボソームと相互作用する可能性を示唆している。さらに分子表面に RNA 等の認識・結合に関与していることを示唆するいくつかの特徴的な領域が明らかとなった。ドメイン I とドメイン II とはほぼ直角に配向しており、 T_1/T_2 から得られた回転拡散テンソルの主軸の一つはほぼドメイン I のヘリックスバンドルの中心軸と並行であった。また得られた構造は、 T_1/T_2 の観測データをよく再現するものであった。ドメイン間のヒンジ部分は比較的小さな $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}$ NOE の値を示し、ヒンジ部分は 2 次構造領域に比べてフレキシブルであることが示唆された。現在構造の精密化とともに、ドメイン間の揺らぎについてさらに解析を進めている。

フィブロネクチンコラーゲン結合ドメイン⁶F1¹F2 モジュールペアのモジュール間相対配向の決定：¹⁵N 緩和時間、およびバイセル存在下での ¹H-¹⁵N 双極子カップリングの応用

(オックスフォード大 1、旭化成工業 2、生物分子工学研 3) ○橋本康博 1,2、S. Smith¹、A. Bocquier³、A. Pickford¹、I. Campbell¹、J. Werner¹

The ⁶F1¹F2 module pair forms part of the collagen binding region of fibronectin. The characterization of the spatial arrangement of the individual modules is essential for better understandings of the collagen-fibronectin interaction. However, a lack of sufficient inter-module NOEs led to an ill-defined module-module orientation in the structure calculation.

Here we present the application of long-range order restraints to the precise determination of the module-module orientation. These make use of rotational diffusion anisotropy in an isotropic solution and alignment of a molecule, e.g. in liquid crystalline media. ¹⁵N T_1/T_2 and ¹H-¹⁵N residual dipolar coupling restraints yielded significant improvements of the definition of the structure.

1. はじめに： ⁶F1¹F2 モジュールペア (*I*) はフィブロネクチンのコラーゲン結合ドメイン (⁶F1-¹F2-²F2-⁷F1-⁸F1-⁹F1) の一部である。両分子の結合メカニズムの解明には、個々のモジュール相対配向の情報が不可欠である。しかし ⁶F1¹F2 はモジュール間 NOE が少ないため、精度良い決定が困難である。

我々はモジュール間 NOE に加えて、¹⁵N T_1/T_2 およびバイセル存在下での ¹H-¹⁵N 双極子カップリング (RDC) を構造計算時の拘束条件として用いた。これらは NH ボンドベクトルのディフュージョンあるいはアライメントテンソルに関する角度依存性を示す(2, 3)。したがって分子中の各 NH ボンドベクトルの配向の決定が、空間的に離れた複数のドメインの相対配向性に関する知見を与える。

しかしこれらの拘束条件は、*z* 軸に関して対称的な角度情報であるため、各 NH ボンドの配向を精度良く決定することはできない。そこで我々はバイセルのチャージを変えて (CTAB 添加)、2 種類の RDC のデータセットを得た。そして、これら RDC および ¹⁵N T_1/T_2 を同時に構造計算に組み込んだ。

2. 実験： NOE、³J_{HαHN}、 T_1/T_2 、RDC-A (*bicelle A)、および RDC-B (*bicelle B) の拘束条件のさまざまな組み合わせで構造計算を行った (Table 1 参照)。計算には X-PLOR(4)を用いた。

[*bicelle A: DTDPC/DHOPC = 3/1, bicelle B: DTDPC/DHOPC = 3/1 + CTAB] (DTDPC: 1,2-O-ditridecanyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DHOPC: 1,2-O-dihexyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, CTAB: cetyltrimethylammonium bromide). $D_{||}/D_{\perp} = 0.85$, $D_a = 7.0$, $R = 0.5$ (RDC- A), 0.4 (RDC- B)。

3. 結果： Table 1 に結果を示した(5, 6)。 T_1/T_2 や RDC 拘束条件の追加により、NOE と ³J_{HαHN} のみで計算した構造よりもモジュール間配向性の構造精度が向上した (Table 1A-D)。さらに、これら

¹⁵N 緩和時間、バイセル、双極子相互作用、フィブロネクチン、コラーゲン

○はしもとやすひろ

の拘束条件を同時に組み込むことにより、飛躍的な精度の向上が得られた (Table 1E~H)。とくにすべての拘束条件を同時に用いた場合、3倍の精度が得られた (Table 1H)。Figure 1に(A)および(H)の構造を比較した。得られたディフュージョンテンソル、および2つのアライメントテンソルが示すように、それぞれのお互いに異なる配向がNHボンドの、さらにはモジュール間配向性決定の精度向上につながったと考えられる。なお、両テンソルの配向が一致しないこと、また高いロンビシティー (bicelle A: 0.5、bicelle B: 0.4) は、バイセルと ${}^6\text{F1}$ / ${}^1\text{F2}$ 分子との間の静電相互作用を示唆する。

Table 1. Quality of refined structures with or without T_1/T_2 and RDC restraints

	(A) NOE + ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ +	(B) NOE + ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ +	(C) NOE + ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ +	(D) NOE + ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ +
		T_1/T_2	RDC-A	RDC-B
(a)	8.4 ± 3.6	6.1 ± 2.5	5.8 ± 3.2	5.0 ± 3.5
(b)	7.3 ± 3.1	5.2 ± 2.0	4.5 ± 2.1	4.7 ± 3.1
(c)	$55.8 + 36.0$	$59.5 + 33.1$	$60.0 + 32.2$	$63.5 + 29.2$
	(E) NOE + ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ +	(F) NOE + ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ +	(G) NOE + ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ +	(H) NOE + ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ +
	RDC-A + T_1/T_2	RDC-B + T_1/T_2	RDC-A + RDC-B	RDC-A + RDC-B + T_1/T_2
(a)	4.9 ± 2.7	3.7 ± 2.3	3.3 ± 1.3	2.7 ± 1.1
(b)	3.8 ± 1.8	3.3 ± 2.1	3.2 ± 1.2	2.6 ± 0.9
(c)	$61.9 + 29.9$	$65.6 + 26.0$	$63.2 + 30.0$	$63.1 + 29.3$

Backbone RMSD (Å) of (a): the ${}^1\text{F2}$ module when overlaid with ${}^6\text{F1}$, (b): the ${}^6\text{F1}$ module when superimposed with ${}^1\text{F2}$. (c) Ramachandran core & allowed region (%).

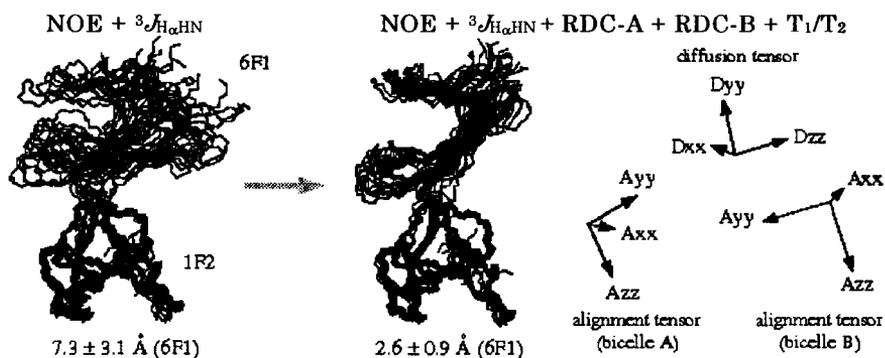


Figure 1. Impact of T_1/T_2 and RDC restraints in structure refinement. Families of 15 structures refined with (a): NOE and ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ restraints, (b): NOE, ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$, T_1/T_2 , RDC-A and RDC-B. Each family is overlaid on ${}^1\text{F2}$. Orientations of the diffusion and the alignment tensors are also shown.

文献： (1) Bocquier, A.A. et al. (1999) *Structure*, 7, 1451-1460. (2) Tjandra, N. et al. (1997) *Nat. Struct. Biol.*, 4, 443-449. (3) Tjandra, N. et al. (1997) *Science*, 278, 1111-1114. (4) Clore G.M. et al. (1998) *J. Magn. Reson.*, 131, 159-162. (5) Hashimoto, Y. et al. (2000) *J. Biomol. NMR*, 17, 203-214. (6) Hashimoto, Y. et al. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, submitted.

NMR 分光法を用いた SS 結合が欠損したリゾチーム変異体の構造変化の研究

関西学院大学・理学部、神戸大学・理学部²

○野田 康夫、横田 篤、富永 剛史、谷阪 喜昭、橘 秀樹²、
瀬川 新一

Structure analysis of lysozyme variants lacking a disulfide bridge by means of NMR spectroscopy.

School of Science, Kwansai Gakuin Univ. and Faculty of Science, Kobe Univ.².

○ Yasuo Noda, Atushi Yokota, Takeshi Tominaga, Yoshiaki Tanisaka, Hideki Tachibana², Shin-ichi Segawa.

Lysozyme has four intramolecular disulfide bridges. Protein folding proceeds via regenerating the native disulfide bridges. In order to investigate the detailed structure of lysozyme in an intermediate state of folding, we constructed three-disulfide variants of lysozyme by replacing two Cys with Ala. NOESY-HSQC spectra of these variants were measured with referring to intact four-disulfide lysozyme. Chemical shift values for NH and C α H protons of these variants were determined, and those for many side chain protons could be determined. They were similar to those for the reference four-disulfide lysozyme, except for the residues in the immediate vicinity of the disulfide bridge removed. For example, in C30A/C115A variant, the resonance frequencies of main chain protons shifted large, and many NOESY cross-peaks disappeared against the residues involved in the interface between B- and D-helices connected by C30-C115 disulfide bridge. Similarly, the residues involved in the β -domain of lysozyme lost many NOESY cross-peaks among specific pairs of protons in C64A/C80A. Furthermore, hydrogen exchange rates were measured for the amides of three-disulfide variants. These results clearly indicates that a part of molecule is disordered in the hydrogen bonded structure and the other part is tightly folded as well as in the intact.

【序論】 タンパク質の SS 結合再生中間体は折りたたみ過程の中間体をトラップしたものとしてこれまでよく研究されてきた。我々は部位特異的のアミノ酸置換によってニワトリ・リゾチームの 3 SS 中間体 4 種を作製し、その折りたたみ反応の速度論的研究を行ってきた(参考文献)。天然リゾチームには SS1(C6-C127)、SS2(C30-C115)、SS3(C64-C80)、SS4(C76-C94)という 4 本の SS 結合が存在する。リゾチーム分子が折りたたまれる律速段階が 3 SS 体形成過程の付近にあると思われる。この段階では、すでに立体構造はかなり天然構造に近いと考えられる実験データ(CD スペクトル、熱変性の DSC 測定など)が多数存在する。しかし、立体構造の詳細を知るためには NMR による構造情報が不可欠であった。2 SS 体になると立体構造はかなり天然構造とは異なってくる。2 SS 体から 3 SS 体への

リゾチーム、水素交換反応速度、構造のゆらぎ、SS 結合

のだ やすお、よこた あつし、とみなが たけし、たにさか よしあき、
たちばな ひでき、せがわ しんいち

変化の過程が折りたたみ過程の研究のかぎを握っていると考えられる。現在 2 SS 体の NMR による研究も行っているが、3 SS 体の研究結果を中心に報告する。

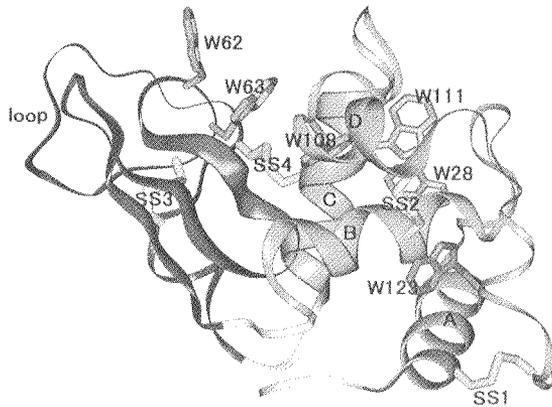


Fig. 1: Ribbon diagram of the native structure of hen lysozyme. Sticks represent the four disulfide bridges, SS1 to SS4. Four Trp residues (W28, W108, W111, W123) lies in the center of four α -helices in α -domain.

【方法】はじめに、天然 4 SS 体の metLYZ (N 末端に Met 残基が付加している) と 3 SS 変異体の C30A/C115A、C64A/C80A および C76A/C94A の ^{15}N 置換試料を作製した。蛋白質は約 1.0mM 程度の濃度まで溶解した。pH3.8、25°C で安定な立体構造を保持しているこの条件で NMR 測定が行われた(3 SS 変異体の中で一番不安定な C30A/C115A、C64A/C80A の転移温度は約 49°C)。Bruker 社製 Avance DRX600 NMR 分光器を用いて、TOCSY-HSQC、NOESY-HSQC スペクトルなどを測定した。また同様に 2 本の SS 結合を欠損したりゾチーム変異体、すなわち、 α ドメイン内に 2 本の SS 結合を有する 2 SS[6-127,30-115]と β ドメイン内に 2 本の SS 結合を有する 2 SS[64-80,76-94]についても実験を行っている。

【結果】 NOESY-HSQC スペクトルから主鎖のアミドプロトン 1 個あたり平均約 10 個の NOESY 交差ピークが観測できた。TOCSY-HSQC スペクトルを併用することによって主鎖の C_αH 、NH プロトンの d_{NN} 、 $d_{\alpha\text{N}}$ 相関を容易に同定することができ、metLYZ に対しては合計 702 個のプロトンの化学シフト値を決定した。3 SS 変異体に対しても同様に 700 近いピークの同定を行った。 d_{NN} 、 $d_{\alpha\text{N}}$ 相関をアミノ酸配列に沿ってプロットすると、2 次構造分布の概略を知ることが出来るが、3 SS 変異体の 2 次構造分布は metLYZ(4SS 体)のものと全く同一であった。これは 3 SS 変異体の立体構造が天然蛋白質と全体としてはほぼ同じであることを示唆する結果であった。

C30A/C115A 変異体、C64A/C80A 変異体と C76A/C94A 変異体に対して、 C_αH 、NH プロトンの化学シフト値を metLYZ の対応する値からの変化量としてプロットしたものが Fig. 2 である (2 SS[6-127,30-115]については図だけ著す)。C30A/C115A 変異体においては欠損した SS 2 結合 (C30-C115) の近傍で化学シフト値の変移量が大きく、何らかの構造変化がこの領域で起きていることを示し

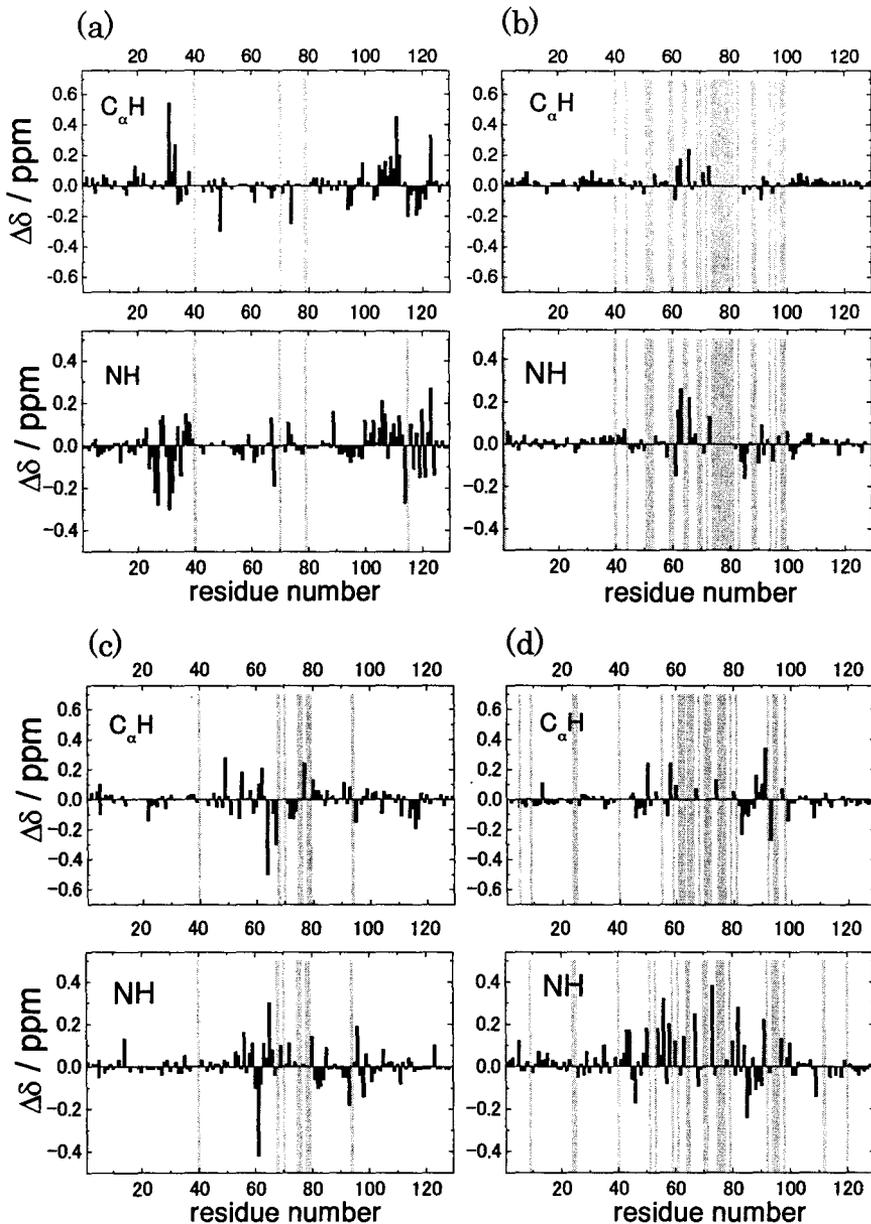


Fig. 2: Chemical shift differences along the amino acid sequence : $\delta_{3SS} \cdot \delta_{4SS}$. (a)C30A/C115A, (b)C64A/C80A, (c)C76A/C94A, (d)2SS[6-127,30-115]. Top panel: Chemical shift differences of backbone $C_{\alpha}H$ resonances. Bottom panel: Chemical shift differences of backbone NH resonances. The long bars indicate that the resonances of main chain protons could not be identified, that is, probably shifted large.

ている。特に、残基 30 の前後と D ヘリックス近傍は変化が顕著である。C64A/C80A 変異体においても SS3 結合の近傍である β シート領域から C-ヘリックスにかけて主鎖プロトンピークの位置が大きく変移しており、現時点でピーク位置を同定出来ていないものがいくつか存在している。また、C76A/C94A 変異

体でもループ領域(残基 62-80)と C ヘリックスの中央付近で化学シフト値の変化量が顕著に大きい事がわかった。 α ドメインには 4 個の Trp 残基が存在するため、どのような構造変化があったかをさらに詳しく知るために側鎖プロトン (C_{β} , C_{γ} , C_{δ} プロトン、インドール NH) 間の NOESY 交差ピークを探した。まず、C30A/C115A に関して出来る限り多数の NOESY 交差ピークの帰属を行った結果、1000 個を越す NOESY 交差ピークを同定することが出来た。3 SS 変異体においては、側鎖間(側鎖-主鎖間も含め)の NOESY 交差ピークはその強度が一般に弱く、いくつかの明瞭なピークが消失していた。C30A/C115A 変異体において典型的な消失ピークをリストアップすると、つぎの側鎖間プロトンの NOESY 交差ピークが消失ないしは極端に弱くなっていた。

W28C4, W28C5	-	L56 側鎖, A95C β , M105 側鎖, L17C δ ,
W108C5	-	M105 側鎖, A107C β , V99 側鎖, I98C γ , A95C β
W111Ne	-	N27C β , A30C β , V120C γ , A115C β , K116 側鎖,
W111C2	-	A31C α , C β , N27C α
W123Ne	-	A115C β , F34 側鎖, A30C β
I98C γ	-	A107NH, W108Ne, D101NH, N103NH
L17C δ	-	L25C δ , A95NH
K33C γ	-	F34 側鎖, F38 側鎖, W123C5, C6

M105 と K116 は全面的に交差ピークが消失。

すべての交差ピークに対して系統的に探し尽くしたわけではないが、上記のデータは 4 本のヘリックスに包まれる Trp 残基の集中したいわゆる疎水コア領域で残基の側鎖間のパッキングが顕著に緩んでいることを示唆している。どの程度までかは明瞭でないが、無定形状態に近いと想像される。

構造の柔らかさを知るために、水素交換反応速度を metLYZ と C30A/C115A 変異体に対して観測した。pH3.8、25°C で重水素交換反応速度を測定し、アミノ酸ごとに交換反応の時定数 τ を決定した。分子全体の立体構造の安定性が約 30°C も減少しているので、3SS 体においてはいわゆる Global Unfolding による交換反応が主となっている。しかし、比較的分子表面に近く、速く交換するアミドプロトンの部分は Local Unfolding が交換反応の律速過程であるためアミノ酸残基による違いが観測される。4SS 体と 3 SS 体での顕著な相違は D ヘリックスの領域に見られる。この領域は Local Unfolding で交換していると思われるが、3 SS 体の C30A/C115A では瞬時に重水素交換してピークは全く観測されない。また B ヘリックス領域の、N27、A30、A31、E35、N37 も D₂O 溶解直後から消失している。これらの結果は、D ヘリックスと B ヘリックスの領域の水素結合ネットワークの消失を強く示唆しており、前述のような疎水コア領域の無定形化を支持する結果と考えることが出来る。

【参考文献】: A. Yokota, K. Izutani, M. Takai, Y. Kubo, Y. Noda, Y. Koumoto, H. Tachibana & S. Segawa. *J. Mol. Biol.* (2000)295, 1275-1288.

NMR データと JAM モデルによる scTCR の溶液構造精密化

(¹京大院理、²ハーバード医)○北尾彰朗¹、Brian Hare²、Gerhard Wagner²

NMR structural refinement to study structure and dynamics of scTCR based on JAM model

¹Kyoto University¹, ²Harvard Medical School,
Akio Kitao¹, Brian Hare², Gerhard Wagner²

Structure and dynamics of single chain T cell receptor (scTCR) was determined by using the structure refinement method that we have developed recently. The method is capable of determining populations of conformational substates, and amplitudes and directions of internal protein motions. This is achieved by fitting static and dynamic nuclear magnetic resonance (NMR) data. The approach is based on the Jumping-Among-Minima (JAM) concept. We found that the free scTCR undergoes inter-domain motions in which opening and closing of the binding site to the MHC-peptide complex take place. These binding modes would be essential to the MHC-peptide complex binding.

【序】

NMR からは蛋白質の構造やダイナミクスに関する豊富な情報を得ることができる。しかし、これまでの溶液 NMR による蛋白質の構造決定は十分な精度でおこなうことができず、蛋白質がとりうる構造の複数の候補を求めることしかできなかった。ここで問題であったのは、(1) NMR の幾何的拘束条件 (NOE による距離情報や J coupling による二面角の情報) は、通常は「不等式」として与えるので蛋白質の存在する構造空間内での範囲を大まかに決めることしかできないこと、(2) それにも関わらず構造決定は静的な 1 つの構造を決めようとしてなされてきたことである。特に (2) は、溶液中でゆらいでいる蛋白質の状態を記述するには適当でないということが近年認識されつつあり、蛋白質の構造を多数の構造のアンサンブルとして、ゆらぎを取り入れた動的構造決定の方法が必要となってきた。

【方法】

これらを踏まえ、我々はこれまでに溶液 NMR データを用いた新しい構造精密化法の提案をおこなってきた。分子シミュレーションの解析から、蛋白質のダイナミクスは、JAM (Jumping-Among-Minima) モデルと呼ばれる方法で記述することで

構造精密化 ダイナミクス JAM モデル TCR CDR ループ

きたおあきお、Hare Brian、Wagner Gerhard

ることが明らかになってきた[1]。蛋白質は天然状態においても、エネルギー的には区別しづらいが構造的な違いからは区別できる多数の準安定な状態、いわゆる CS (Conformational Substates) をとることがわかっている。溶液中でのゆらぎは、CS 内での比較的速いゆらぎと CS 間のジャンプ (JAM) という2つの運動から構成されていると考えることができる。CS 内での比較的速いゆらぎは、振動的なゆらぎである蛋白質の大多数の自由度が関わっている。CS 間のジャンプは確率的な大きな振幅を持つゆらぎであり、ごく少数の自由度しか関わっていない。このモデルに基づいて考えると、それぞれの CS 内でのゆらぎは分子シミュレーションからもとめ、CS 間のジャンプを記述するパラメータすなわち各 CS の統計重率は実験データ (今回は NMR オーダーパラメータ) を再現するようにもとめるという考え方が可能となる。具体的には、(1) まず幾何的拘束条件を満たす立体構造を多数用意する。(2) それぞれの構造について短い分子シミュレーションをおこないゆらぎを決定する。(3) オーダーパラメータを再現するように各構造の統計重率を決定する。この段階でほとんど CS は重みは0となり、小数の CS の重みだけでオーダーパラメータが再現される。我々は既にこの方法を細胞接着をつかさどる蛋白質 CD2 の構造精密化に用い、その有用性を示した。[2]。

本研究はこの方法を更に細部で改良して、scTCR (the V module of the single chain AKR/J (H-2^d) mouse T cell clone D10.G4, 28 kDa) の構造精密化にもちいたものである。この蛋白質については既に通常の構造決定[3]・ARIAを用いた構造精密化[4]がおこなわれている。また、MHC-ペプチドとの結合構造もX線結晶解析によって解かれている[5]。本研究の目的は、scTCRの動的構造を精密化し、MHC-ペプチドとの特異的結合に関わるゆらぎを抽出することである。

【結果】

CD2の場合と同様に、scTCR の場合も十分な精度で動的構造の精密化をおこなうことができた。また、構造間の遷移も極少数の CS の間で起こっていることが明らかになった。特に大きなゆらぎはドメイン間のゆらぎによる MHC 結合部位の開閉モードである。これが複合体形成における重要な「結合モード」であると考えている。

【文献】

- [1] A. Kitao, S. Hayward, and N. Go. *Proteins* 33, 496(1998).
- [2] A. Kitao, and G. Wagner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2064(2000).
- [3] B.J. Hare, D.F. Wyss, M.S. Osburne, P.S. Kern, E.L. Reinherz, and G. Wagner. *Nat Struct Biol* 6, 574(1999).
- [4] B.J. Hare, and G. Wagner. *J Biomol NMR* 15, 103(1999).
- [5] E.L. Reinherz, K. Tan, L. Tang, P. Kern, J. Liu, Y. Xiong, R.E. Hussey, A. Smolyar, B. Hare, R. Zhang, A. Joachimiak, H.C. Chang, G. Wagner, and J. Wang. *Science* 286, 1913(1999).

グライム化合物 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_3$ ($n=2\sim 50$) およびリチウム塩
をドーブした電解液における溶媒、リチウムイオンとアニオンの自
己拡散係数

(物質研) ○早水紀久子、杉本恭子、齋藤 剛

(ユアサコーポレーション) 相原雄一、坂東寿則

**Self Diffusion Coefficients of the Ions and Solvents of Electrolytes composed
of Glyme Family of $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_3$ ($n=2\sim 50$) and $\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$**

K. Hayamizu, K. Sugimoto, T. Saito (National Institute of Materials and Chemical Research)

Y. Aihara, T. Bando (Yuasa Corporation)

The diffusion measurements for the ions and the solvents were made for the electrolytes doped by lithium salt. The solvents are the glyme family which are important because of the basic compounds for the polyethylene oxide (PEO). When the solvent molecules are small, the solvent diffuses the fastest and next the anion followed by the lithium. The solvent diffusion is the slowest and the lithium followed by the anion for the larger solvent. The interactions between the solvent and lithium are discussed.

はじめに： 現在リチウム電池の電解液は有機溶媒が使われ、電池を大型化して二次電池（バッテリー）を実用化するためには安全性の観点から高分子電解質、高分子ゲル電解質の開発が急務である。現段階ではポリエチレンオキシド（PEO）系高分子が有力視されているが、イオン伝導機構は十分に解明されていない。 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_3$ ($n=2,3,4,5$) および分子量 400,1000,2500 のポリエチレンオキシド（PEO）のメチル化物は、PEO 系の高分子電解質の重要な系列化合物である。本報告ではグライム化合物とメチル化 PEO にリチウム塩 ($\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ 、LiTFSI) をドーブして作成した電解液・電解質の溶媒 (^1H NMR)、リチウム塩 (^7Li NMR) とアニオン (^{19}F NMR) の自己拡散係数を測定した。これらのデータは PEO 系高分子電解質におけるイオン伝導の機構解明に重要である。

実験：サンプル： $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_3$ 系列のサンプルで $n=2$ (diglyme, DG), 3 (triglyme, TG), 4 (tetraglyme, TeG), 5 (pentaglyme, PG) は純物質である。メチル化 PEO は分子量分布がある。各々の溶媒にリチウム塩 ($\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ 、LiTFSI) を溶媒の O:Li の割合で 20:1、10:1 の異なった濃度でドーブして電解質を作成した。サンプル管はシゲミ製の外径 5mm の二重管を用い、DG, TG, TeG, PG 系ではサンプル高さ 3mm 以内とした。

NMR 測定：自己拡散係数と緩和時間の測定は JEOL-GX200 を Galaxy・MacNMR で置き換え、JEOL 製の拡散測定ユニットを付属した装置で行った。拡散係数の測定は Hahn-Echo のパルス系列に 2 つの磁場勾配パルスを挿入した最も簡単なものを用いた。本研究で用いた最大の磁場勾配強度は約 5 T/m である。

自己拡散係数、電解液、リチウムイオン、アニオン、溶媒和

はやみずきくこ、すぎもときょうこ、さいとうたけし、あいはらゆういち、ばんどうとしのり

結果と考察：

拡散定数を D とすると有名な Einstein-Stokes の式は次のとおりになる。

$$D = kT / c\pi\eta r_s$$

この式によれば拡散する粒子の拡散半径（ストークス半径 r_s ）が小さいと自己拡散係数は大きくなり、同時に媒体の粘性(η)が大きいと拡散は遅くなると関連付けられる。電解液のカチオン、アニオン、溶媒の拡散係数を考慮する時には、同一サンプルでは粘性は同じと仮定できる。粒子の大きさはリチウムイオン、カチオン、溶媒の順番で大きくなる。

分子量 400,1000,2500 の PEO をメチル化したサンプルのうち、分子量 1000,2500 は室温で液体でないので、温度を上げて自己拡散定数を測定した。溶媒間のデータの比較は 60°C で行った。図 1 に 60°C、濃度が O:Li=20:1 のサンプルの溶媒、アニオン、リチウムの自己拡散係数をグライム $\text{CH}_3\text{O} \cdot (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n \cdot \text{CH}_3$ の n でプロットした。メチル化 PEO では分子量の分布の中心分子量を $n=11,24,56$ とした。 n が小さい時には溶媒、アニオン、リチウムの順番に自己拡散係数が大きくなり、ストークス半径の順番とは一致しない。すでに我々が報告しているように^{1, 2}、この現象はリチウムイオンへの溶媒和でほぼ説明できる。即ち DG, TG, TeG, PG, メチル化 PEO(400) では 1ヶのリチウムに平均 1~2 個の溶媒分子が溶媒和した状態で拡散している。一方溶媒分子が大きくなるとリチウムは溶媒より大きい自己拡散係数を持つことがわかる。溶媒とリチウムイオンの拡散係数が同じになる付近では溶媒の $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 鎖とリチウムが 1:1 で相互作用していると考えられ、60°C で $n \sim 15$ である。

一方アニオンは常にリチウムよりも自己拡散係数は大きく、溶媒の拡散とは異なった挙動をしていることがわかる。特に溶媒分子が大きいた時にはアニオンの拡散が際立って大きくなる。モデル的に考えるとリチウムイオンは溶媒と密な相互作用をしているが、アニオンは独立して拡散していると考えられる。

イオン伝導度との関連から高分子電解質ではアニオンの拡散がイオン伝導を担っていることがわかっているので、溶媒の分子量とイオン伝導機構の相関についても検討している。

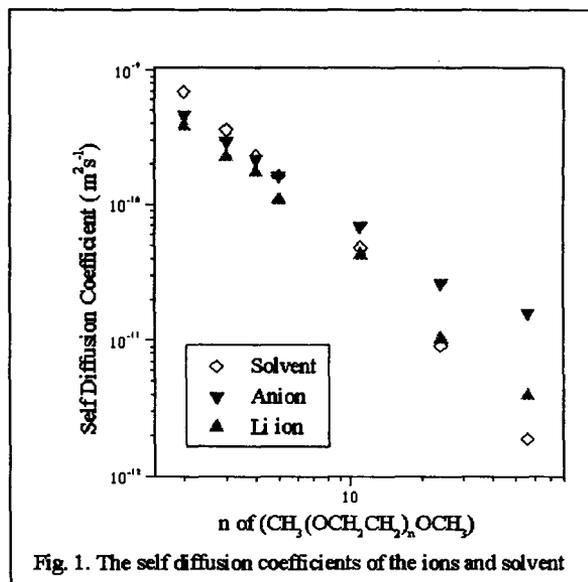


Fig. 1. The self diffusion coefficients of the ions and solvent

文献

1. K. Hayamizu et al, J. Phys. Chem. B 103, 519-524 (1999).
2. Y. Aihara et al, J. Chem. Phys., 113, 1981-1991 (2000).

NMR量子コンピュータによる蛋白質・核酸の高次構造予測序論
 (大工研¹ 阪大院理²) 福見 俊夫^{1, 2}

Prediction of secondary structure of RNA and related biopolymers by an NMR quantum computer: A preliminary report

Toshio FUKUMI

Osaka National Research Institute &

Graduate school of Science, Osaka University

Prediction of higher order structure of biopolymers is a typical NP-Complete problem which is intractable by conventional computers. Recently, it was recognized that quantum computers enables to solve certain NP-problem exponentially faster than conventional computers. In this report, I would like to present my preliminary algorithm to predict secondary structure of RNA employing an NMR quantum computer.

ヒトゲノムの解析が順調に推移し、ゲノム配列が全て解き明かされようとしている現在、ポスト・ゲノムプロジェクトとして蛋白質・核酸の構造・機能の解析は極めて重要な課題となった。蛋白質・核酸の構造決定の手法としてX線回折やNMRが有力であるが、一つの蛋白に数ヶ月を要することや、全ての蛋白がこれらの手法によることができるほど安定ではなくまた単離可能ではないこともあることを考慮すると、構造解析の新しい手法の抜本的ブレイクスルーが望まれる。

In Silico で高次構造を予測するコードとしては Vienna RNA (<http://www.tbi.univie.ac.at>)があまりにも有名である。このコードはC言語で書かれており多くの UNIX ツールも備えていて強力である。(ちなみに、ソースのリスティングをしたら、A4の2段組で30cmにもなった。)しかしながら、蛋白質・核酸の高次構造の予測はNP-完全問題であって計算量理論による限界があり、現在のノイマン型コンピュータで解くことはできない。ここにPは多項式を意味し、P-問題とは多項式時間でチューリングマシンがホルトし

NMR Quantum : Computer Secondary Structure : RNA : Algorithm

ふくみ としお

て解を出せるような問題である。これに対して、量子コンピュータはある種の NP-問題を従来型のコンピュータに比べて指数関数的に速く解くことができるとされている。ここに、NPとは非多項式を意味し、計算量理論では NP-問題は従来型のコンピュータでは解けないとされている。

このように、強力な量子コンピュータのリソースとしては

1. 波動関数の重ね合わせ
2. 波動関数の干渉
3. 波動関数のエンタングルメント
4. 量子テレポーテーション

がある。これらは、量子超並列演算を担うものである。ここで、誤解を恐れず何故量子計算が指数的に速いかを記しておく。従来型のコンピュータはトランジスタに量子力学を用いているものの演算自体は電圧のオン・オフによる古典力学に依っている。しかし量子力学ではオンとオフの状態を同時にとることが出来る。Nスピン系は古典的にはNビットであるが、量子力学では 2^N ビットになる。これをキュービット (Qubit) と言う。これらを有効に使うためには量子力学に基づくアルゴリズムが必要である。そのためには量子性を生かしたアルゴリズムの開発が不可欠である。現在までのところ、

1. 大きな整数の素因数分解 (ショア) ¹
2. データベースサーチ (グローバー) ²

が知られている。これらは必ずしも問題を指数関数的に速く解くものではないし上の4つのリソースを十分に駆使しているものでもないが、ショアは素因数分解のアルゴリズムを開発する過程において量子フーリエ変換という重要な発明をした。このショアのアルゴリズムが量子コンピュータの研究に火をつけた。特に、このアルゴリズムがRSAという暗号の解読を可能とする点で衝撃的であった。量子コンピュータは最近広く注目を集めていて若干の混乱が見られるようである。筆者の立場は、古典論よりも少ない手続きで問題を解くことができるものを量子コンピュータとする穏健派である。実際、筆者等はNMR量子コンピュータを用いてドイツの命題を解くことにより、量子並列演算が可能であることを実証している。

近年、量子コンピュータの研究は世界中で火事場の騒ぎのような活況を呈している。しかし残念ながら、量子アルゴリズムはショアのものやグローバーのもの2つしかなく、実際に役に立つアルゴリズムの開発は焦眉の急である。

特にポスト・ゲノムが指向される現状では有効なアルゴリズムの開発が強く求められている。既に、この方向を目指すものとしてホーレンベルグ³によるグローバルの方法を用いた蛋白質のアミノ酸配列を比較するアルゴリズムの提案がある。

そこで、本研究では、第3のアルゴリズムとして

3. 蛋白質・核酸の高次構造予測のアルゴリズム

を提案したい。このため、全てのコンフォーメーションの量子力学的重ねあわせを用いればよさそうに思えるが、これでは量子コンピュータの特性を生かしていない。何故ならこれではキュービット (Qubit) を有効に利用してはず、ビット数は指数関数的に大きくなるとはいえ現在のコンピュータと同じ困難に陥る。そのため、エネルギーミニマムを探す過程に量子性を用いることとしたい。結論から先に述べると、RNAの二次構造予測の問題はケーリーグラフ上のスペクトル解析に帰せられる。さらに、グラフの固有値問題はリーマン多様体上のラプラシアン固有値問題と等価である。そこで、エネルギーミニマムを探すために次の写像を導入する。

$$\text{Tensor} \begin{pmatrix} N \\ M \end{pmatrix} \rightarrow \text{Tensor} \begin{pmatrix} N-1 \\ M+1 \end{pmatrix}$$

この写像は多様体上の計量を定義し、多様体上の運動はこの計量に対して測度可遷性をもつ、つまりエルゴード的である。Pをあるベクトル場とすると、任意の点Aから任意の点BへPを動かすことができる。これは新しいベクトル場

$$P(A \rightarrow B) = \exp[\mu \nabla] P$$

を誘導する。この μ は距離である。この過程を繰り返すことによって全ての構造を調べあげることができる。重要なのは、これがユニタリー表現になっていることである。このため、上記の繰り返しはユークリッド空間におけるフーリエ変換に帰着できることである。このことによって、高次構造の予測に量子フーリエ変換が有効になる。従って、ここに述べた手法はショアの素因数分解のアルゴリズムに極めてよく似ているといえる。ショアは大きな整数の素因数分解をフーリエ変換に帰着させたのである。しかし、本研究ではリーマン幾何学という高等数学を使っている点で異なると言えば異なる。ここで、フーリエ変換とは何かを振り返って見たい (NMRはフーリエ変換抜きでは語れないが)。全ての (線形) 微分方程式の解はフーリエ級数に展開できる。問題は、この級

数が収束するか否かである。つまり、どう言う空間に入るかである。ユニタリー表現はフーリエ級数が収束することを保証する。リーマン多様体まで持ち出したのはこのためである。本アルゴリズムの要点は次のようにまとめられる

「膨大な数の水素結合の組み合わせから最適解を探す過程を量子フーリエ変換に帰着する」。

量子コンピュータのハードに関しては多くの提案があるが、この中でNMRが最も多くのビット数を実現している。しかし、NMR量子コンピュータについては色々の批判があることも事実である。典型的なものはスピン系は混合状態にあってNMR量子コンピュータでは擬純粋状態しか用いていると言うものである。これについては暫くおきたい。

量子力学の系はユニタリー作用素により時間発展するが、任意のユニタリー行列をNMRのパルス列に変換する方法は、坂口、小澤、福見⁴によって発見されているので量子アルゴリズムを高分解能NMRのRFパルス及びパルス磁場勾配にプログラムすることは可能であるので、これにより現在でも到達可能なNMR量子コンピュータでも多重共鳴を用いればかなり大きな分子量のRNAの二次構造予測が可能になると期待される。このためには量子計算に適したスピン系が必要である。このための要件は

1. スピン結合が大きい
2. 化学シフトによりスペクトルが十分に分離している
3. 化学シフトの異方性やスピン・回転相互作用による速い横緩和が無い

である。量子計算では $1/2 J$ で展開するという操作を繰り返すので J が大きいことが必須である。なお、直接スピン結合していることが望ましいが必須ではない。また、ホモとヘテロではパルスのかけ方もスペクトルも異なる。現状では以上の要件を満たす分子の探索が急務である。

1. P.Shor, Proc. 35th IEEE, p116 (1994).
- 2.L.K.Grover, Phys. Rev. Lett, 78, 325 (1997).
- 3.L.C.L.Hollenberg, anXiv:quant-ph/0002076.
- 4.U.Sakaguchi, H.Ozawa, and T.Fukumi, "NMR Quantum Computing" in "Large Scale Coherence and Statistics of Photons and Atoms", ed. J.Perina, J.Wily & Sons (in press).

光・マイクロ波誘導核偏極

(CREST[†]・京都大学大学院理学研究科[‡]) ○ 武田和行[†]、竹腰清乃理[‡]、寺尾武彦[‡]

Photo- and microwave-induced nuclear polarization

(CREST[†], Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University[‡])○K. Takeda[†], K. Takegoshi[‡], and T. Terao[‡]

Applications of dynamic nuclear polarization (DNP) which use huge electron spin polarization of photoexcited triplet states are presented. Firstly, it is shown that DNP by photoexcited triplet states is possible even in polycrystalline samples. An attempt is introduced to transfer nuclear polarization among crystals in a mixed powder sample. The effect of the scattering of the excitation laser in polycrystalline samples is also discussed. Secondly, an application to a dilute spin system is demonstrated. For a pair of hyperpolarized like spins, small tip angle of a resonant pulse causes spectral asymmetry in the dipolar splitting, from which the absolute sign of the dipolar interaction as well as the nuclear polarization can be obtained.

電子スピン偏極を核スピんに移動させる動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization: DNP) により NMR 信号を飛躍的に増大させることができる。DNP を行うには、試料中にフリーラジカルもしくは光励起により三重項状態に移行する分子をゲストとしてドーブする必要がある。後者の方が以下の点で有望である。(a) 光励起三重項状態の中にはフリーラジカルよりもはるかに大きい電子スピン偏極を持つものがある。(b) 三重項状態は光励起を止めれば基底状態に戻り消滅するために NMR 線形に影響を与えることはない。しかし、これまでに光励起三重項状態を用いた DNP は、単結晶を用いた ¹H の偏極増大というごく限られた系でしか行われていない。我々は化学的あるいは生物学的に興味ある系での光励起三重項状態を用いた DNP を可能にするためにその適用範囲を広げることを目指している。

[粉末試料での光励起三重項状態を用いた DNP]

従来、光励起三重項状態を用いた DNP は単結晶試料でしか行われていなかったが、我々はペンタセンをドーブしたナフタレンの粉末試料を用いて、ペンタセンの光励起三重項状態を用いた DNP を行うことに成功している [1]。その応用として、混合粉末における微結晶間のスピン拡散を利用した偏極移動の試みについて紹介する。また、粉末試料における励起レーザー光の試料中の透過についても議論する。

[希薄スピン系への適用]

Key words: 高偏極核スピン、光励起三重項状態、動的核偏極 (DNP)

たけだ かずゆき、たけごし きよのり、てらお たけひこ

^{13}C 等の存在比の低い希薄なスピン系でもDNPが可能であることを示すために、我々は98%重水素化したナフタレン単結晶にペンタセンをドーブした試料を用いて存在比2%の「希薄な」 ^1H スピン系のDNPを試みた。3187 G、150 KでDNPを行った結果、 ^1H スピン偏極 ~ 0.27 を得た (Fig. 1)。この偏極値は熱平衡時の値の $\sim 1.3 \times 10^5$ 倍に相当する。偏極した ^1H スペクトルを Fig.2 に示す。孤立した ^1H に相当するセンターピークの他に、 ^1H - ^1H 双極子相互作用により分裂したピークが現れている (Fig.2(a) ★印)。スピン偏極が大きいつき、同種核スピン対に対してティップ角の小さい励起パルスを用いると、分裂ピーク強度が非対称になる (Fig.2 (d))[2]。この強度比から双極子相互作用の符号およびスピン偏極が得られる。

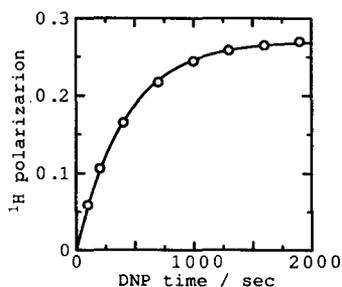


Fig.1 Buildup of ^1H polarization of a single crystal of 98%-deuterated naphthalene doped with pentacene at 150 K and in 3187 G.

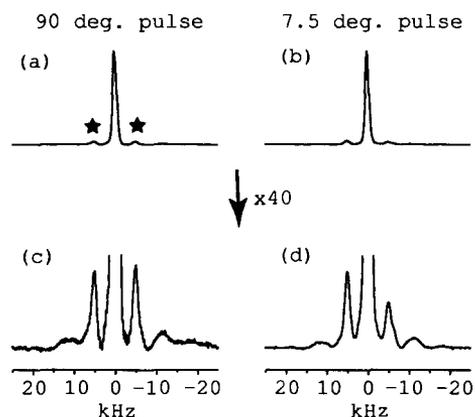


Fig.2 Enhanced ^1H spectra of a single crystal of 98%-deuterated naphthalene doped with pentacene (a) with a 90° pulse, and (b) with a 7.5° pulse. (c) and (d) are the magnifications of (a) and (b), respectively.

References

- [1] K. Takeda, K. Takegoshi and T. Terao, 第37回NMR討論会 P79 (1998).
- [2] J.S.Waugh, O.Gonen and P.Kuhns, *J. Chem. Phys.*, **86**, 3816 (1987).

天然存在比 ^{13}C -REDORによる複数原子間距離の同時測定(姫路工大理¹、北里大薬²、味の素中研³)西村勝之¹、海老澤計慶²、鈴木栄一郎³、斉藤 肇¹、○内藤 晶¹**Natural Abundance ^{13}C REDOR Coupled to a Singly ^{15}N -Labeled Nucleus: Simultaneous Determination of Interatomic Distances**Katsuyuki Nishimura¹, Kazuyoshi Ebisawa², Ei-ichiro Suzuki³, Hazime Saitô¹,
and Akira Naito¹¹Department of Life Science, Himeji Institute of Technology, ²Pharmaceutical Department, Kitasato University, ³Central Research Laboratory, Ajinomoto Co., Inc.

REDOR technique was applied to natural abundance ^{13}C -nuclei coupled to a singly labeled ^{15}N nucleus to determine the ^{13}C - ^{15}N interatomic distances simultaneously in crystalline ammonium [^{15}N] L-glutamate monohydrate(1). Consequently, the interatomic C-N distances between ^{15}N and $^{13}\text{C}=\text{O}$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^{13}\text{C}_\gamma$, and $^{13}\text{C}_\delta$ carbon nuclei for 1 were determined with precision of $\pm 0.15 \text{ \AA}$. ^{13}C -REDOR factors for three spin system, and the sum of two isolated 2-spin systems were further evaluated by the REDOR measurements on isotopically diluted 1 in a controlled manner. Subsequently, the intra- and intermolecular C-N distances were separated by searching the minima in the contour map of root mean square deviation (RMSD) between the theoretically and experimentally obtained ($\Delta S/S_0$) values against two interatomic distances, $r_{\text{C-N1}}$ and $r_{\text{C-N2}}$.

【序】 固体試料において、同種核および異種核の双極子相互作用をマジック角回転下で復活させて、原子間距離を精密に求める方法が数多く開発され、この原子間距離情報から分子の三次元構造を決定することが可能になってきた(1,2)。原子間距離を精密に測定するためには、孤立した原子間の距離を測定することが必要であるが、二重標識試料では多くの原子間距離を同時に測定することはできない。そこで全標識試料を用いる試みがなされているが、強いスピン相互作用のために、特定の原子間距離を精密に決定することは必ずしも容易ではない。異種核原子間距離の精密決定に有用な回転エコー二重共鳴法(REDOR)においても、多スピン系の場合は精密な距離情報を求めることが難しくなる。一方、分子内と分子間の双極子寄与を分離することができれば分子のパッキングに関する情報を得ることも可能である(3,4)。本研究では単原子を ^{15}N 核で同位体標識した試料を用いて天然存在比 ^{13}C -REDOR の観測を試みた。さらに、この試料を用いて全ての種類の天然存在比炭素核と単標識窒素核の原子間距離を同時に決定する方法を検討したので、この点について報告する。

【実験】 単原子を同位体標識した [^{15}N]L-グルタミン酸は ICON Services Inc. (USA)から購入した。L-グルタミン酸アンモニウム一水和物結晶は、飽和アンモニア水溶液から再結晶することで同位体標識率 100%(I)と 60%(II)の試料を調製した。

REDOR, 原子間距離, 双極子結合, RMSD, 同位体標識

にしむら かつゆき、えびさわ かずよし、すずき えいいちろう、さいとう はじめ、
ないとう あきら

天然存在比 ^{13}C -REDOR スペクトルは CMX-400 NMR 分光器を用いて測定した。 ^1H , ^{13}C , ^{15}N 共鳴周波数はそれぞれ 400.16, 100.64, および 40.55 MHz に設定し、 ^{13}C および ^{15}N 核の π パルス長はそれぞれ 10.8 および 11.8 μs に設定した。 ^{15}N 照射には xy-4 補償パルス系列を用いて off-set 効果を最小にした。ラジオ波の均一度を上げるため 20 mg の結晶試料をコイルの中央部に位置するように 5 mm ローターに詰めて REDOR 測定を行った。ローター周波数は $5000 \pm 2\text{Hz}$ に設定した。

【結果と考察】

天然存在比 ^{13}C -REDOR スペクトル

図 1 に試料(I)の $\text{NcTr}=8\text{ms}$ で測定した天然存在比 ^{13}C Full-echo および REDOR スペクトルを示す。ここで Nc はローターの回転数、 Tr はローター周期である。5本の信号は高磁場から C_β , C_γ , C_α , $\text{C}=\text{O}$, C_δ 炭素核に帰属することができた。これらの帰属は REDOR 効果の程度からも確認することができる。例えば、 $\text{C}=\text{O}$ と C_δ 炭素は互いに接近した位置に現れているが、高磁場の信号の REDOR 効果が格段に大きいことから、 ^{15}N との距離の近い $\text{C}=\text{O}$ 炭素が高磁場側の信号であると帰属できる。またアルキル炭素の信号も REDOR 効果の程度から、高磁場から順に C_β , C_γ , C_α 炭素の信号であると帰属できた。炭素核の照射周波数をカルボニル炭素に設定した場合とアルキル炭素に設定した場合は全く REDOR 効果に違いはなかった (図 1 矢印)。

図 2 に天然存在比 ^{13}C -REDOR 効果 $\Delta S/S_0 = (S_0 - S_f)/S_0$ の NcTr に対するプロットを示す。ここで S_f は REDOR 信号強度、 S_0 は Full-echo 信号強度を表す。それぞれの炭素に対する曲線は大きく異なっていることが分かる。実線は 2 スピン系として計算した REDOR 曲線であるが、実測値と大きなずれのあることが判明した。この大きなずれは分子間双極子相互作用の寄与によるものと考えられる。

分子内および分子間双極子相互作用の分離

天然存在比 ^{13}C -REDOR を観測したことで、同種核の双極子相互作用やスピンスピン相互作用の寄与は無視できるが、異種核分子間相互作用の寄与は除くことができていない。二重標識試料の場合は段階的希釈によって分子間双極子相互作用の寄与が除けることを示したが、一重標識試料では希釈によって分子間相互作用を容易に取り除くことができないことが分かった。即ち標識率が $f(0 < f < 1)$ の場合観測される REDOR 強度は

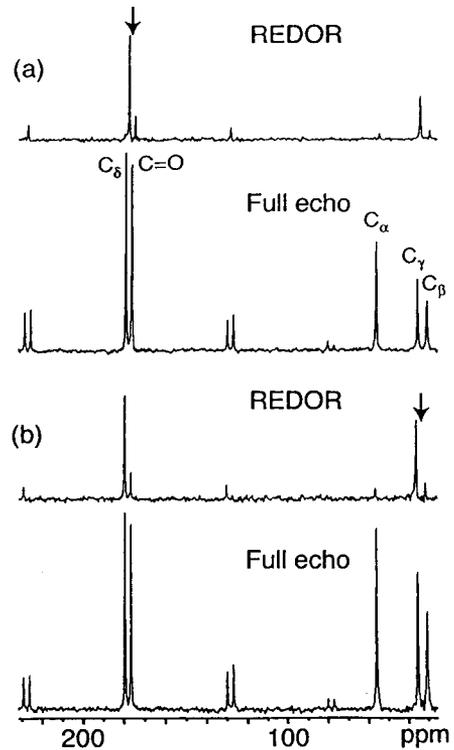


Figure 1. Natural abundance ^{13}C -REDOR and full echo spectra at $\text{NcTr}=8\text{ms}$ with two different carrier frequencies for crystalline ammonium [^{15}N] L-glutamate monohydrate

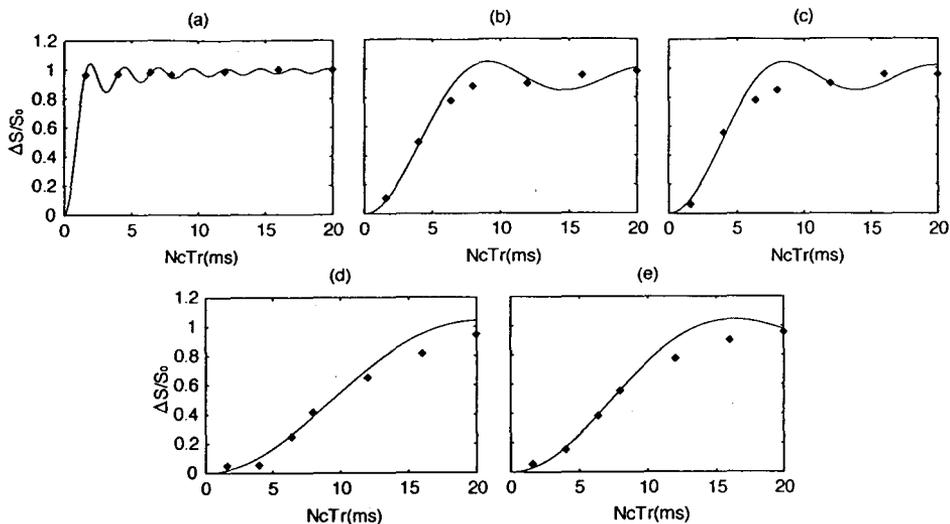


Figure 2. Plots of $(\Delta S/So)$ values against $NcTr$ values and the best fit theoretical curves using 2spin system for the C_{α} (a), $C=O$ (b), C_{β} (c), C_{γ} (d) and C_{δ} (e) resonances.

$$S_r = f^2 S_{CN_1CN_2} + f(1-f)S_{CN_1} + (1-f)fS_{CN_2} + (1-f)^2 S_o \quad [1]$$

と表せる。ここで $S_{CN_1CN_2}$ は N_1 および N_2 核と結合をもつ C 核の REDOR 強度であり、 S_{CN_1} および S_{CN_2} は N_1 核あるいは N_2 核とのみ結合をもつ C 核の REDOR 強度である。さらに S_o は N 核と結合をもたない C 核の REDOR 強度である。ここで $(\Delta S/So)_r = (S_r - So)/So$ と $f^2 + f(1-f) + (1-f)f + (1-f)^2 = 1$ の関係を [1] 式に適用すると

$$(\Delta S/So)_r = f^2 (\Delta S/So)_{f=1} = f(1-f)[(\Delta S/So)_{CN_1} + (\Delta S/So)_{CN_2}] \quad [2]$$

の関係が得られる。この式は $(\Delta S/So)_{CN_1}$ と $(\Delta S/So)_{CN_2}$ の和のみが実験で決定できることを意味している。従って、 $f=1$ と $f=0.6$ の試料で REDOR 測定を行い、 $(\Delta S/So)_{CN_1} + (\Delta S/So)_{CN_2}$ (REDOR 和) を求めた。実験で求めた REDOR 和に最もよくフィットする REDOR 和を求めるため、実測値と理論値の RMSD を r_{CN_1} と r_{CN_2} を変数として計算した結果を図 3 に示す。これから分子内距離 (r_{CN_1}) と分子間距離 (r_{CN_2}) を分離して求めることができた。これらの値を X 線回折から得られた結果と共に表 1 に示す。分子内距離が分子間距離よりも小さい場合には非常に正確な分子内距離が得られるが、分子内距離が分子間距離よりも長い場合には正確な分子内距離を求めることが困難であることが判明した。

【まとめ】 単原子の窒素を ^{15}N で同位体標識した試料における天然存在比 ^{13}C -REDOR を観測することによって、複数 C-N 原子間距離を同時に測定することが判明した。この場合、定

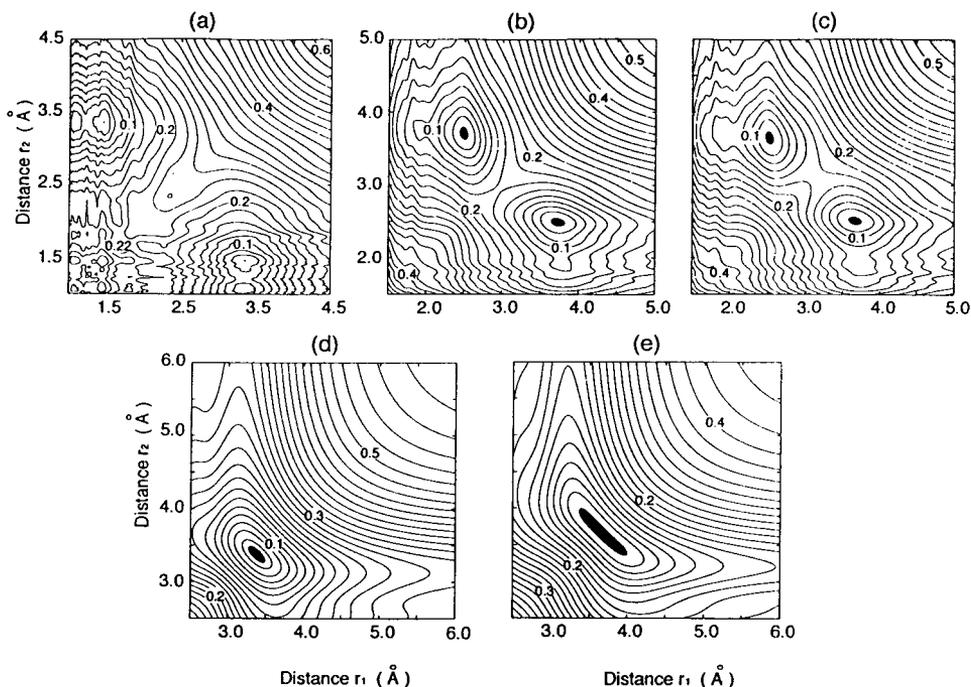


Figure 3. 2D-RMSD contour plots between the theoretically and experimentally obtained $(\Delta S/S_0)^*$ values against r_1 and r_2 interatomic distances for C_α (a), $C=O$ (b), C_β (c), C_γ (d) and C_δ (e) carbons.

量希釈試料を用いることにより、分子内と分子間の C-N 距離を分離できることが分かった。分子内原子間距離が分子間原子間距離より短い場合は精度の高い原子間距離が決定できるが、長い場合には原子間距離精度の減少が生じた。

Table 1. ^{13}C - ^{15}N interatomic distances (\AA) of ammonium [^{15}N]L-glutamate monohydrate crystals determined by REDOR and X-ray diffraction methods.

	REDOR		X-ray	
	r_{CN1}	r_{CN2}	intramolecular	intermolecular
C=O	2.545 ± 0.105	3.725 ± 0.085	2.492	3.687, 6.113
C_α	1.465 ± 0.010	3.360 ± 0.010	1.497	3.857, 4.722
C_β	2.510 ± 0.050	3.665 ± 0.085	2.448	3.700, 4.739
C_γ	3.525 ± 0.175	3.800 ± 0.180	3.835	4.017, 4.133
C_δ	3.340 ± 0.070	3.410 ± 0.070	4.977	3.432, 3.796

【文献】

- (1) A. Naito, K. Nishimura, S. Kimura, M. Aida, N. Yasuoka, S. Tuzi, and H. Saito, *J. Phys. Chem.*, 100, 14995 (1996).
- (2) K. Nishimura, A. Naito, M. Aida, S. Tuzi, and H. Saito, *J. Phys. Chem.*, B102 (1998).
- (3) A. Naito, K. Nishimura, S. Tuzi, and H. Saito, *Chem. Phys. Lett.*, 92, 506 (1994).
- (4) K. Nishimura, A. Naito, S. Tuzi, and H. Saito, *J. Phys. Chem.*, B103, 8398 (1999).

システインテトラペプチド-鉄錯体の溶液構造
 (山口大医療短大) ○右田たい子

“The solution structure of iron-cysteine tetrapeptide complexes”; Department of Biological Chemistry, Yamaguchi University; Catharina T. Migita

Cystine containing tetra-peptides of structures XCCX and XCXC were synthesized and their complex formation with iron(III) in D₂O solutions were evaluated through 400 MHz ¹H NMR spectroscopy. The values of chemical shift for α- and β-H of cysteine and for α-Hs of the C-terminal or N-terminal amino acids varied reflecting the fixed structure due to the coordination. Nitrocylation of these iron-peptide complexes showed characteristic EPR spectra and g-values of these paramagnetic complexes were correlated with the solution structure obtained from the ¹H NMR results.

酵素タンパクや生理活性ペプチド中のシステイン残基は金属イオンのターゲットとなり、生理作用発現に決定的な役割を担う場合が多い。特に XCCX 型の部分構造は、メタロチオネイン、DNA-binding Zinc finger peptide, vanadium peptide などに共通してみられる。また、非ヘム鉄-イオウタンパク質においても、ニトロシル化によっていわゆる g=2.03 signal を与えるものは、4システイン残基が配位した構造をとっていると考えられている。しかし EPR では XCCX-鉄錯体と XCXC-鉄錯体の判別は可能であるが、g 値が X 残基で異なるためタンパク質中の鉄イオンの結合部位や周辺の構造についての情報は得られない。本研究では、鉄(III)イオンがシステインのチオール基を配位することによって ferrous low-spin 状態となり ¹H NMR の観測が可能になることを期待し、数種類の XCCX, XCXC-peptide を合成 [ABI 432A peptide synthesizer] しこれらの鉄錯体の ¹H NMR [BRUKER AVANCE 400S] を測定した。

NMR 測定用試料は D₂O 溶液(acidic)で、DSS を内部標準として化学シフト値を求めた。

【結果と考察】

XCCX 型テトラペプチドは、非配位状態(Table I, fee)では多くの場合隣り合う Cysteine のα-H とβ-H はそれぞれ 4.6ppm, 3.0ppm 付近に multiplet signal を与え磁氣的に等価である事がわかる。しかしこれらの値は N-端, C-端残基によって明らかに異なり chemical shift 値から逆に Cys 結合残基を帰属できる可能性があることがわかる。また、予想されたように X のα-H (β-H も) は N-端, C-端で異なる shift 値を示す。得られた C-端のα-H の値は Wüthrich による deprotonated amino acid の値[†]よりすべて大きく、カルボキシル基はプロトン化した状態にあることがわかる。Free peptide 試料

システインテトラペプチド 鉄錯体 ¹H NMR 水溶液構造

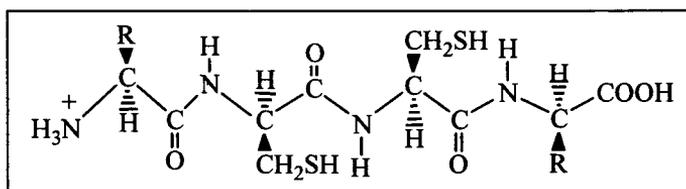
みぎた たいこ

溶液に Fe³⁺溶液を加えてゆくと、GCCG および SCCS では Cys β-H の信号強度が順次減少し 3.3, 3.0ppm 付近に新たな信号が現れる。これらの信号強度は peptide:Fe³⁺が等モルあたりまでは増加するが、それ以上ではジスルヒドとみられる白色沈殿が生成し、NMR 信号の広幅化・強度の減少が起こってしまう。Cys β-H の信号が二組に分離されることから、二組の Cys-SH~Cys-SH が Fe³⁺に配位し ferrous low-spin complex を生成したと考えられる。陽電荷をもつ Lys(K)が末端にくる場合は鉄錯体の形成がきわめて起こりにくく、また陰電荷をもつ Asp(D)が末端にくる場合は C-端のカルボキシル基と隣接する Cys-SH とで鉄イオンに配位するものと考えられる。

Table I ¹H Chemical shifts* (ppm vs DSS) of cysteine-containing peptides and iron-peptide complexes.

Peptide condition	Cys		X (G, S, K, D))				γ-, δ-, ε-H
	α-H(2H)	β-H(4H)	α-H (N)	α-H (C)	β-H (N)	β-H (C)	
GCCG							
Free	4.62m	2.96m	3.948	3.911	-	-	-
+Fe ³⁺	4.62m	2.96m	4.025	3.920	-	-	-
		3.28q (2H) 3.03q (2H)		3.911			
SCCS							
free	4.65m	2.97m	4.419q	4.224q	4.010q	3.91d, 3.885d	-
+Fe ³⁺	4.65m	2.97m	4.518q	4.224q	4.012t	3.975d 3.91d 3.66d	-
		3.29q 2.97q					
KCCK							
free	4.605q	2.99m	4.31q	4.08q	1.92q (N, C)	1.45q (γ) 1.69q (δ) 2.956q (ε, N) 2.939q (ε, C)	
+Fe ³⁺	4.606q	2.99m	4.38q	4.08q	1.93q (N, C)	1.46q(γ) 1.70q (δ) 2.95q (ε, N) 2.93q (ε, C)	
		3.4 3.25					
DCCD							
free	4.612	2.955 2.940	4.56q	4.40q	3.05d	3.00d	-
+Fe ³⁺	4.744 4.614	2.973 2.959	4.56q	4.40q	3.08d	3.046 3.027	-

*in D₂O solution.



†Kurt Wüthrich, "NMR in Biological Research: Peptides and Proteins", North-Holland/American Elsevier, 1976.

高圧 NMR が明らかにする葉酸結合型 Dihydrofolate Reductase の活性型構造
 (神戸大学・自然科学¹, 広島大学・理学²) ○北原 亮¹、Sareth Sina¹、山田博昭¹、
 大前英司²、月向邦彦²、赤坂一之¹

High Pressure NMR reveals Active-Site Hinge Motion of Folate-Bound *Escherichia coli*
 Dihydrofolate Reductase

Kitahara R.¹, Sareth S.¹, Yamada H.¹, Ohmae E.², Gekko K.², and Akasaka K.¹

Graduate School of Science and Technology, Kobe University¹, Department of Mathematical
 and Life Science, Graduate School of Science, Hiroshima University²

High pressure (~2000bar) ¹⁵N/¹H two-dimensional NMR study has been carried out on folate-bound DHFR from *E. coli*. Several cross peaks in the ¹⁵N/¹H HSQC spectrum are split into two with increasing pressure, showing the presence of a second native conformer with a smaller partial volume than the first one ($\Delta V = -25 \text{ ml/mol}$ at 15°C). The split signals arise from hinge regions of the M20 loop and the C- and F-helices crucial for the binding of the cofactor NADPH, showing that the two conformers differ in the orientation of the NADPH binding segments. The negative volume change and negative changes in enthalpy and entropy associated with the transition from the first to the second conformer suggest that the second conformer has an “open” structure in the NADPH binding site with a larger exposure of the polypeptide segments to water. At 1 bar, the free energy level of the open conformer is estimated to be 5.2 kJ/mol above the closed conformer, giving a population of the open conformer of about 10%. The open conformer is considered important for the binding of NADPH.

<序論>

蛋白質の機能と構造の揺らぎ。アミノ酸が連なっただけの高分子が機能するためには特定の立体構造を持つことが必須と考えられ、構造生物学においてX線回折やNMR法による構造決定(原子座標の決定)がその機能を理解する道と考えられてきた。しかし蛋白質がその固定された座標に止まっていたら機能することができず、蛋白質のもつ“構造の揺らぎ”がその機能発現に大切と考えられる。

キーワード：高圧 NMR、DHFR、活性構造

きたはら りょう、サレス シーナ、やまだ ひろあき、おおまえ えいじ、
 げっこう くにひこ、あかさか かずゆき

蛋白質の揺らぎを見る。蛋白質の揺らぎを観測する方法として、NMR ではスピン緩和によるピコ秒～ナノ秒の速い揺らぎの観測がある。しかしこの方法は蛋白質の天然構造周辺の揺らぎだけを見ているに過ぎない。忘れてはならないのはミリ秒～秒の遅い揺らぎである。溶液中では蛋白質は様々な構造間の平衡状態にあるため、いわゆる天然構造の他にも“稀な構造”が共存している。つまり NMR により決定された構造では、NMR の時間スケールよりも十分遅く交換している“稀な構造”は無視されている。我々は蛋白質の機能を理解するためには、その構造の全体像を理解し、“稀な構造”に目を向ける必要があると考えている。

体積軸から“稀な構造”を見る。溶液中での蛋白質は天然構造から完全変性構造までの様々な構造間の平衡状態にあり、その平衡を支配するギブスエネルギー差 (ΔG) は等温条件下では $\Delta G = \Delta G_0 + \Delta V(P - P_0)$ で近似される。つまり構造間の体積差が存在すれば加圧によりその存在割合が変化する。通常天然状態が最も部分モル体積が大きく、完全変性状態が最も小さい事から、圧力を変えることにより天然状態から完全変性状態の間に含まれる様々な状態を安定化させ、観測する事が可能になる[1]。

Dihydrofolate Reductase の機能と“稀な構造”。Dihydrofolate Reductase (DHFR)は補酵素 NADPH とともに基質 Dihydrofolate(DHF)を Tetrahydrofolate(THF)に還元する酵素であり、基質や補酵素との結合に伴い様々に構造を変化させる事が X線結晶構造解析から明らかにされている[2]。その構造のバラエティーは、基質・補酵素の結合を制御していると考えられるループ (M20 ループ) 部分に集中している。また溶液中でも、種や基質アナログの種類によっては2つの天然構造をもつことが NMR により明らかにされており、それらの構造のバラエティーも M20 ループを含む基質・補酵素結合部位に見られる[3,4]。ここで報告する大腸菌葉酸(基質アナログ)結合型 DHFR は単位格子内に M20 ループにより NADPH 結合部位が“開いた構造”と“閉じた構造”の2つの分子を持つ一方で[2]、溶液中では“閉じた構造”しか観測されていない[5]。我々は高圧 NMR 法により溶液条件下でも葉酸結合型 DHFR には2つの天然構造があることを発見した[6]。

<実験方法>

On-line 高圧セル法。高圧 NMR 測定は神戸大学で開発された高圧セル法により行った[7]。市販の分光器 (DMX-750)、プローブを用いるため、あらゆるパルステクニックが適応でき高分解能の測定が可能である。耐圧セルは石英性で圧力範囲は～4000bar である。

実験条件。圧力 30-2000bar、温度 15-35°Cの範囲で $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC を測定した。試料条件は *E.coli* DHFR:1.2mM、folate(substrate-analogue):4.5mM、Tris buffer :20mM、pH7.0 (at 25°C)、95% $\text{H}_2\text{O}/5\%^2\text{H}_2\text{O}$ 。

<結果と考察>

我々は高圧 NMR 法により溶液条件下で大腸菌葉酸結合型 DHFR には二つの天然構造があることを発見した。それは $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC スペクトルの特定残基(Arg12, Val13, Trp22, Gly51, Gly95) 由来のピークが高圧下で二つのピークへと分裂することに基づいている。この現象は対応する部分が、二つの異なる磁場環境中を NMR の時間スケールよりも十分遅く交換していることを意味する。これら二つに分裂したピークの ^{15}N 化学シフト差は ~ 1 ppm であること、またそれらは補酵素結合部位 M20 ループ、C,D ヘリックスの “hinge” 部分に集中していることから、それら hinge 部分で主鎖二面角(ϕ, ψ)が異なる二つのコンフォメーションが存在することが分かった。さらに各部位でみられたコンフォメーション平衡が圧力・温度により協同的に変化していることから、葉酸結合型 DHFR は二つの構造間の平衡であることが分かった (Fig.1)。見積もられた常圧下での二つの構造間の自由エネルギー差(ΔG_0)は 5.2 kJ/mol で、第二の構造は常圧下でさえ 10 %ほど存在していることを意味する。また第二の構造は第一の構造に比べ部分モル体積が 25 ml/mol 小さい。さらにこの二つの分子種間の平衡の温度依存性から、第二の構造は低温ほど安定に存在しエンタルピー、エントロピー的に第一の構造に比べ小さいことが分かった($\Delta H \sim -43$ kJ/mol, $\Delta S \sim -0.15$ kJ/mol at 1,000-2,000 bar)。一般的にエンタルピー、エントロピーの減少には疎水基の水和が大きな寄与をしていると考えられるため[8]、第二の構造の部分モル体積の減少はタンパク質内部の疎水性キャビティーの水和、特に補酵素結合サイトの水和が原因と判断できる。この第二の構造の特徴は、補酵素の結合サイトが水和したつまり揺らぎの大きな状態をとっている点で、補酵素との結合・解離により適した “開いた構造” と考えられる。この “開いた構造” は常圧下ではその分布量が少なく分光学的に観測されないもので、圧力はその平衡をシフトさせることにより観測可能とした。

$^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC スペクトルの特定残基由来の信号が二つに分裂する現象は DHFR-methotrexate 錯体でも観測され、その二つの構造間の平衡は圧力・温度によりシフトした。基質(アナログ)結合型 DHFR が二つの天然構造を持つことは種や基質アナログによらない一般的な性質であり、“開いた構造” が補酵素との結合に大切と考えられる。このような他の分子と結合可能な “Active form” と不可能な “Inactive form” の平衡は、DHFR に限らず酵素が基質や補酵素と結合する際に必要と考えられる。

<参考文献>

- (1) Inoue, K., Yamada, H., Akasaka, K., Herrmann, C., Kremer, W., Maurer, T., Doker, R., and Kalbitzer, H. R. (2000) *Nature Struct. Biol.* **7**, 547-550.
- (2) Sawaya, M. R. and Kraut, J. (1997) *Biochemistry* **36**, 586-603.
- (3) Li, L., Falzone, C. J., Wright, P. E. and Benkovic, S. J (1992) *Biochemistry* **31**, 7826-7833.
- (4) Falzone, C. J., Wright, P. E. and Benkovic, S. J. (1994) *Biochemistry* **33**, 439-442.
- (5) Epstein, D. M., Benkovic, S. J., and Wright, P. E. (1995) *Biochemistry* **34**, 11037-11048.
- (6) Kitahara, R., Sareth, S., Yamada, H., Ohmae, E., Gekko, K., and Akasaka, K. (2000) *Biochemistry*, in press.
- (7) Akasaka, K. et al. (1997) 第36回 NMR 討論会要旨集 1-4.
- (8) Makhatadze, G. I. and Privalov, P. L. (1994) *Biophys. Chem.* **51**, 291-309.

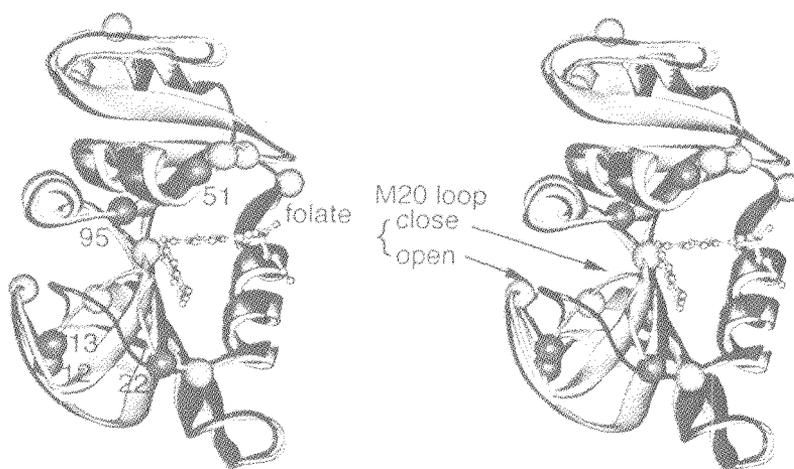


Fig.1 Two crystal structures of DHFR-folate binary complex, the close form (gray, PDB 1RX7) and the open form (black, PDB 1RD7).The five residues that show doublet splitting at 2,000 bar are marked by dark gray spheres. Residues whose cross peak intensities are decreased to less than 50% due to exchange-broadening between two conformers at 2,000 bar are marked by light gray spheres.

古細菌由来転写延長因子NusA蛋白質の二量体構造

○山崎和彦^{1, 2}、Mark D. Allen^{1, 2}、鈴木理^{1, 2}¹生命工研・構造生物、²科技団・戦略基礎

Solution structure of a transcriptional elongation factor NusA of archaeal origin in a dimeric form

Kazuhiko Yamasaki, Mark D. Allen, and Masashi Suzuki

AIST-NIBHT CREST Centre of Structural Biology

The NusA protein is a transcriptional elongation factor originally found in a bacterial system. NusA homologues are identified in all of the determined archaeal genome sequences, although the mechanism of the transcriptional elongation in archaea is essentially unknown. In the present study, the solution structure of a NusA homologue of the archaeon *Thermoplasma volcanium*, which exists in a dimeric form of 33 kDa, was determined. The structure is a tandem repeat of two similar structural domains consisting of three α -helices and three β -strands. A two-fold symmetric structure of the dimer is constituted by formation of an intermolecular antiparallel β -sheet of the C-terminal domains. Residues probably involved in DNA-binding were identified in the C-terminal domain by a chemical-shift perturbation experiment.

【はじめに】 NusA蛋白質は、 λ ファージN蛋白質による坑転写終結に必要な因子として真正細菌より発見された転写延長因子である。RNAポリメラーゼや転写終結因子Rhoと相互作用して、転写の延長や終結において重要な役割を果たす。真核生物、真正細菌について第3の生物群である古細菌の転写延長・終結機構はほとんど未解明であるが、近年多数決定された古細菌ゲノムDNA配列の全てよりNusAホモログが見いだされており、転写に関連する必須機能をもつことが考えられる。本研究では、好熱性古細菌*Thermoplasma volcanium*由来のNusAホモログ二量体（分子量33kDa）の立体構造をNMR分光法を用いて決定し、DNAとの結合部位の同定を行った。

【方法】 PCR法によりゲノムDNAからNusA遺伝子を単離し、大腸菌を用いて蛋白質を大量発現した。必要に応じて、¹³Cおよび¹⁵Nの安定同位体標識を行った。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。得られた距離情報および角度情報をもとに、

キーワード：転写延長因子、二量体、立体構造、DNA結合

やまさきかずひこ、マークアッレン、すずきまさし

Nilges (1993) の方法を用いて simulated annealing 計算を行い、対称な二量体の立体構造を決定した。DNA13mer (5'-GCTAGCCGCCAGC-3') および 18mer (5'-GCACGTGCTTTATATAGC-3') のそれぞれ一本鎖および二重鎖を用いて、Biacore X (ファルマシア) を用いた表面プラズモン共鳴法によって結合を解析し、そのうち13mer の一本鎖を NusA の溶液に添加して、化学シフトの変化を解析した。

【結果および考察】単量体の構造は、3本の α ヘリックスと1枚の3鎖 β シートからなる構造ドメインが、2つ繰り返して構成されており、N末端側ドメインの β シートとC末端側ドメインの α ヘリックス2本が疎水性相互作用によりパッキングしていた (図)。分子間接合面では、C末端側ドメインの3鎖 β シートどうしが逆平行に繋がって6鎖 β シートを形成することにより、回転対称な二量体となっていた。

一本鎖DNAとNusAの結合は速い交換の系であり、NusA主鎖アミド基の ^1H 、 ^{15}N 化学シフトのDNA結合に伴う変化を追うことが可能であった。大きく変化した残基 (図で黒く表示) のうち、4つ (二量体で8つ) がLys残基であり、いずれもC末端側ドメインの特定の領域に存在することから、それらの残基が直接DNA結合に関与すると考えられる。

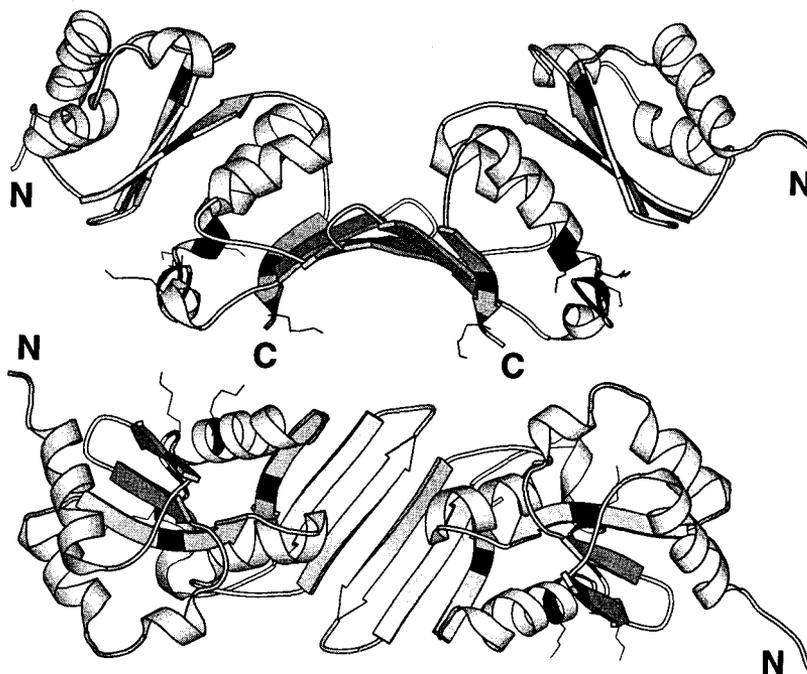


Figure: Solution structure of *T. volcanium* NusA dimer. Residues with large chemical shift change ($\sqrt{\Delta\delta_{\text{H}}^2 + \Delta\delta_{\text{N}}^2} > 50 \text{ Hz}$, $^1\text{H}=750 \text{ MHz}$) upon DNA binding are shown in black colour, among which Lys residues are highlighted by indication of their sidechains.

【文献】 Nilges (1993) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 17, 297–309.

第3日 (11月10日金曜日)

講演要旨

¹³C,¹⁵N 多次元固体 NMR による完全標識ペプチド・マストパラン X のシグナル帰属と構造解析

(横浜国大・工 1、三菱生命研 2、群大・工 3、阪大・蛋白研 4)

○藤原敏道¹、柳下元¹、福島径¹、俵山みどり¹、戸所泰人¹、
佐々健太郎¹、松木陽¹、河野俊之²、若松馨³、阿久津秀雄^{1,4}

Signal assignment and structural analysis of a uniformly isotope-labeled peptide, mastparan X by multidimensional ¹³C, ¹⁵N solid-state NMR

Department of Chemistry and Biotechnology, Yokohama National University¹; Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences²; Department of Biochemical Sciences, Gunma University³; Institute for Protein Research, Osaka University⁴

Toshimichi Fujiwara¹, Hajime Yanagishita¹, Kei Fukushima¹, Midori Tawarayama¹, Yasuto Todokoro¹, Kentaro Sasa¹, Yoh Matsuki¹, Toshiyuki Kohno², Kaori Wakamatsu³, and Hideo Akutsu^{1,4}

Carbon-13 and nitrogen-15 NMR signals of uniformly enriched mastparan X were assigned in the solid state. Intra-residue correlations of backbone and sidechain signals are acquired with 2- and 3-D NMR experiments that have dipolar mixing periods for directly bonded spins. Inter-residue correlations of C^α and C^β signals were obtained with a newly developed 2-D experiment that have a triple magnetization-transfer period. These experiments enabled the sequence specific assignments of the most signals. The chemical shifts of the assigned CO, C^α and C^β signals indicate that mastparan X forms an α-helix.

[はじめに] ¹³Cや¹⁵Nで完全標識したペプチド・タンパク質を対象として標識核スピンの固体NMR信号を多次元NMR法で分離して解析することにより、少数の実験で分子全体にわたる多くの構造情報を得ることができる。すでに、1次元固体高分解能NMRで信号が分離できるような同位体標識した小さな分子について固体NMRで帰属を行い距離測定や二面角測定を行えることが明らかになっている。この方法をより大きな分子に適用するために、まずこの方法の出発点である、シグナル帰属法について検討した。モデルとして対象にしたのは、15アミノ酸残基からなる完全標識したペプチド、マストパランXである。¹³Cと¹⁵Nの等方化学シフトによる展開期と双極子結合による混合期を持つ数種類の多次元固体NMR実験を行って効率的な信号帰属の方法を調べ、帰属を行ったので報告する。

[試料と実験] 用いたマストパランXは、C末端がアミド化されている本来のものではなく、グリシンが付加しているものを用いた。アミノ酸配列は Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-Gly である。マストパランXは、ユビキチンとの融合タンパク質として大腸菌で大量発現させて、酵素反応で切り取った[1]。培養は同位体標識したグルコースと塩化アンモニウムを含む最小培地を用いて行った。固体状態のマストパランX(7mg)はメタノール溶液から溶媒を気化させることによって調製した。NMR実験は Chemagnetics CMX Infinity 400 で行い、磁場強度は ¹³C 共鳴周波数で 100MHz であった。プローブは 4mm 径スピナー用の広帯域三重共鳴プローブと二重共鳴プローブを用いて行った。

多次元固体 NMR, 同位体標識, マストパランX, 信号帰属, マジック角試料回転

ふじわらとしみち、やなぎしたはじめ、ふくしまけい、たわらやまみどり、とどころやすと、ささけんたろう、まつきよう、こうのとしゆき、わかまつかおり、あくつひでお

[帰属法と結果] アミノ酸への帰属は、次のような方法で行った。カルボニル炭素と α 炭素、 β 炭素の炭素間双極子結合による相関スペクトルを作る2次元RFDR、二量子双極子結合により側鎖炭素間の相関を作る2次元SPC5[2]、窒素15と炭素13の相関スペクトルを作る2次元CPを用いた。これらの2次元測定を組み合わせ、 $\text{CO}-\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta$ の3次元相関法も高い分解能を持ち有効であった。この中で2次元RFDRスペクトルを図1に示す。特徴的な α 炭素化学シフトを持つグリシン、 β 炭素がメチル基であるアラニン、1分子中に3残基あり強い信号強度をもつリジンなどは容易に帰属することができる。

さらに、アミノ酸配列へ帰属を進めるためには、残基間のスピンの相関を調べる必要がある。図2に残基間炭素の相関を明らかにするための2次元パルス系列を示す。この方法では、 t_1 期に $i+1$ 番目残基の α と β 炭素が化学シフトで展開する。次の混合期でその磁化は共有結合に沿って $i+1$ 番目残基の窒素、 i 番目残基のカルボニル炭素、 i 番目の α 炭素へと移動する。この結果、検出期には i 番目残基のカルボニルと α 炭素の磁化として観測される。この一連の磁化移動のために3つの方法を連結して混合期を作った。またこの混合期では $i+1$ 番目の α 炭素から $i+2$ 番目の α 炭素への磁化移動は生じない。この方法によって初めて、アラニンなど分子中に複数ある残基についても化学シフトを配列特異的に求めることができた。

マストパンについてアミノ酸残基内と残基間の相関を組み合わせると、ほぼすべての信号を帰属することができた。得られた $\text{C}^\alpha\text{C}^\beta\text{Co}$ の信号の化学シフト値は α ヘリックス構造であることを示していた。この固体状態でマストパンXは、水溶液中で取るランダム構造でなく、リン脂質膜に結合した時に取る2次構造を取っているといえる。

[考察] この方法で、帰属できるタンパク質の大きさは、アミノ酸の種類や二次構造の多様性、線幅による。用いたマストパンXは8種類のアミノ酸残基からなる15残基のペプチドで α ヘリックスのシフト値に集中した共鳴周波数を持ち、必ずしも化学シフトによる分散が大きいものではない。この実験では線幅は約2 ppmであったが、固体状態の完全標識した球状タンパク質では試料調製法やさらに大きい静磁場やデカップリング磁場、試料回転数などを用いることにより0.5 ppm以下にできることが報告されている[3]。従って、分子量のさらに大きなタンパク質についても多次元等方化学シフト法を適用してシグナルを分解することができるだろう。

[文献] 1. T. Kohno et al, J. Biomol. NMR, 12, 109 (1998). 2. M. Hohmy et al, J. Chem. Phys., 110, 7983 (1999). 3. J. Pauli et al, J. Magn. Reson. 143, 411 (2000).

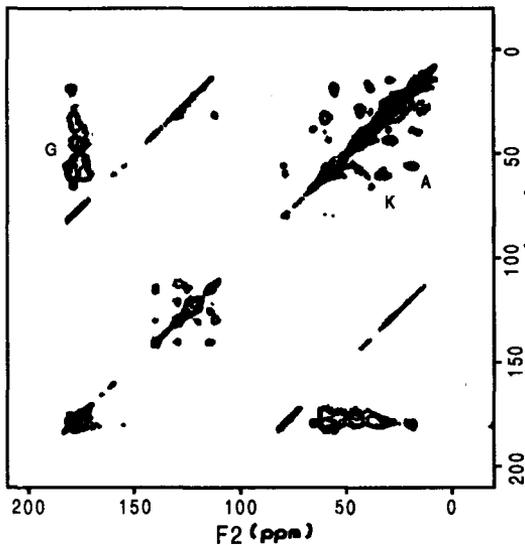


図1. ^{13}C 2D RFDR Spectrum of fully $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ labeled mastparan X

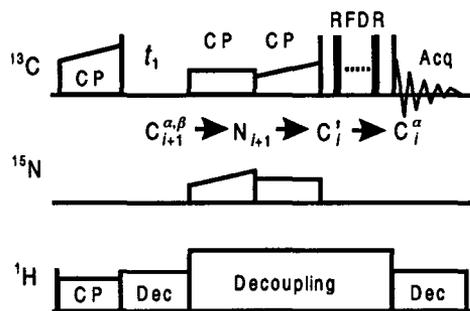


図2. 2D pulse sequence for obtaining inter-residue $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ correlation spectrum

固体NMRによる熱硬化性樹脂シリルカルボラン複合ジエチニルベンゼンシリレンポリマーの熱硬化メカニズムの解析[3]

○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 Structural Study of Silyl-Carborane Hybridized Diethynylbenzene-Silylene Polymers by Solid-State NMR Spectroscopy[3]

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 structure of silyl-carborane hybridized diethynylbenzene-silylene polymer has been studied utilizing high-resolution solid-state ¹H, ¹³C, and ²⁹Si NMR and two-dimensional ¹H-¹³C heteronuclear correlation NMR. The polymer which has C≡C bonds in the main chain and has -CH=CH₂ and -CB₁₀H₁₀C-Si(CH₃)(CH₃)-H bonds, and carborane in the bulky side chain shows a very high thermal stability by curing above 200 °C. As a result, it was found that 1) the naphthalene rings were formed due to the diene reaction between Ph-C≡C and C≡C and 2) a three-dimensional networking structure would be formed due to some addition reactions concerning the C≡C bonds, the -CH=CH₂ groups, and -CB₁₀H₁₀C-Si(CH₃)(CH₃)-H groups at 200–450 °C.

緒言

シリルカルボラン複合ジエチニルベンゼンシリレンポリマーは高耐熱性の高分子材料である(図1)。酸素指数は優に40を越え(空気中では不燃)、空気中での5%重量減少温度は780°Cという高い値を示す。しかし、実用的に応用するには強度に問題があり、分子レベルでの構造解析が必要である。このポリマーは、熱処理により不溶の非晶体となるので、その構造解析には固体NMRを用いるのが唯一の方法と言ってよい。

構造は図1に示すものを狙って作られてはいるものの、側鎖が(1)-CH=CH₂になっているもの、(2)-CH(CH₃)-と枝分かれたもの、(3)シリルカルボランが主鎖にリンクせず、ペンダント状になってしまったもの、などが含まれてかなり複雑である。NMRを測定するという視点からは、¹H, ¹¹B, ¹³C, ²⁹Siの4種の核が含まれており、CP-MASで十分なものから四極子核まで含まれており興味深い。本研究では、この複雑な構造をもつポリマーを4種の核全てで測定、解析を行い、その架橋構造及び酸化の過程を検討した。

キーワード: ケイ素, 固体NMR, 熱硬化性樹脂, 耐熱性ポリマー, 熱架橋構造
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

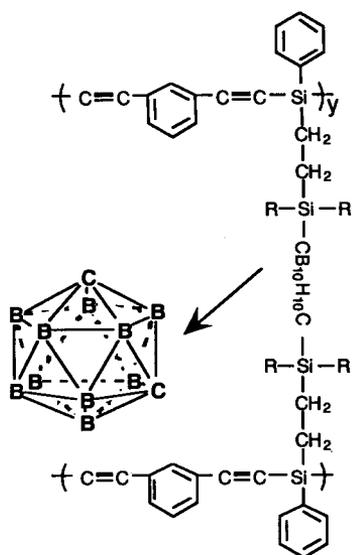


Fig. 1 Structure of Silyl-Carborane Hybridized Diethynylbenzene-Silylene Polymer Structure

実験 固体NMR測定はBruker DSX-300分光計を用いて、4 mm CP-MASプローブで行った。

^1H CRAMPS NMR測定 ^1H の共鳴周波数は、300 MHzで行った。 ^1H - ^1H 双極子相互作用をデカップルする多重パルスとしてBR-24を使用し、 $\pi/2$ パルス幅は1.8 μs 、 τ を3 μs とした。マジック角回転(MAS)の回転周波数は、1.8-2.0 kHzにコントロールした。スケーリング・ファクター 0.40で全てのスペクトルを補正し、それによる ^1H 化学シフトの誤差は0-10 ppmの範囲で ± 0.1 ppm以内である。シリコンゴム(0.12 ppm)を内部基準として使用した。繰り返し時間は10 sで、32回の積算を行ったので、1つのサンプル測定に要する時間は、5分程である。

^{13}C , ^{29}Si CP-MAS NMR測定 ^{13}C 及び ^{29}Si の共鳴周波数は、それぞれ75.6, 59.6 MHzであった。 ^1H の $\pi/2$ パルス幅は ^{13}C 、 ^{29}Si 共に2.8 μs であり、交差分極実験における接触時間は ^{13}C で4 ms、 ^{29}Si で8 msであった。マジック角回転(MAS)の回転周波数は、 ^{13}C で7.0 kHz、 ^{29}Si で5.0 kHzにコントロールし、全てのサンプルを測定した。遅延時間は6-8 sとし、800-16000回の積算を行ったので、1つのサンプル測定に要する時間は、2-26時間程であった。データポイントは1-2 kで、スペクトル幅は ^{13}C で30.1 kHz、 ^{29}Si で35.7 kHzとした。 ^1H のデカップリングはtppmで行い、 ϕ は 10° とした。 ^{13}C 化学シフトはアダマンタンの高磁場側の信号を29.5 ppm、 ^{29}Si 化学シフトはポリジメチルシランを-33.8 ppmとしてTMS基準に換算した。

2次元 ^1H - ^{13}C シフト相関 NMR NMR測定 ^1H - ^{13}C HETCOR測定は、Borumらによって提案された方法で行った(D. P. Burum and A. Bielecki, J. Magn. Reson. 94, 645, (1991))。パルス系列を図2に示した。 ^1H の $\pi/2$ パルス幅を2.8 μs とし、MASの回転周波数は、5.0 kHzにコントロールした。 ^1H 軸はスケーリング・ファクター 0.29で補正した。繰り返し時間は4 sで、352回の積算を行い、 ^1H 軸のポイント数を64としたので1つのサンプル測定に要する時間は、25時間程であった。

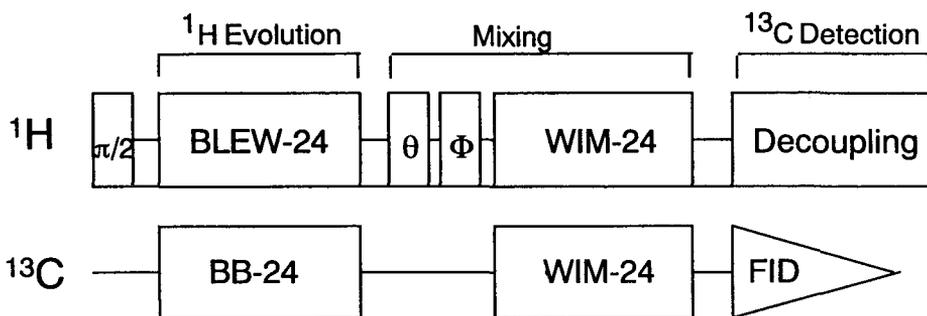


Fig. 2 Pulse diagram of 2D heteronuclear-correlation experiment.

考察 図3に(a)未処理及び熱処理温度を(b)200℃、(c)250℃、(d)300℃、(e)350℃、(f)450℃に変化させて調整したシリルカルボラン複合ジエチニルベンゼンシリレンポリマーの ^{13}C CP-MAS NMRスペクトルを示す。熱処理温度とともに $\text{C}=\text{C}$ に帰属されるピークは熱処理温度が上昇するに従って減少し、450℃では完全に消失している。このことから250℃以上の熱処理で $\text{C}=\text{C}$ 結合が架橋反応に関与していることは明らかである。



Fig.3 ^{13}C CP-MAS NMR spectra of silyl-carborane hybridized diethynylbenzene-silylene polymer cured at various temperatures: a) before curing; b) 200℃; c) 250℃; d) 300℃; e) 350℃; f) 450℃.

The peaks marked with an asterisk are due to spinning side bands of the phenyl carbons and the $\text{C}=\text{C}$ carbons.

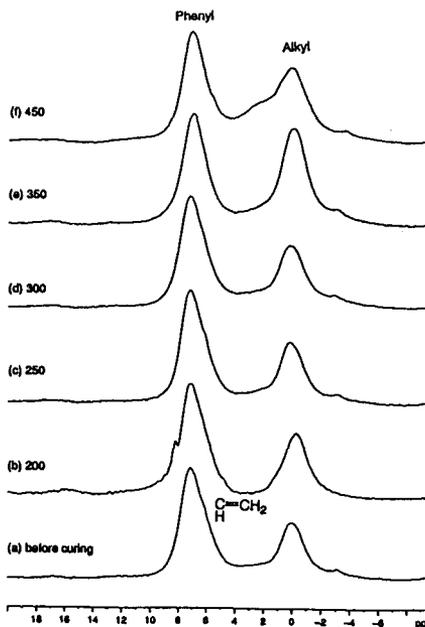


Fig.4 ^1H CRAMPS NMR spectra of silyl-carborane hybridized diethynylbenzene-silylene polymer cured at various temperatures: a) before curing; b) 200℃; c) 250℃; d) 300℃; e) 350℃; f) 450℃.

図4に同様の試料の ^1H CRAMPS NMRスペクトルを示す。ここで、ビニル基とフェニル基の ^1H シグナルが重なっているため、 ^1H - ^{13}C HETCOR 測定を行った(図5)。図5から ^{13}C の135.0 ppmのピークとクロスピークを持つ ^1H の6 ppm付近のピークがビニル基のプロトンの信号であるとわかる。図4での6 ppm付近のビニル基の信号による肩は熱処理温度とともに減少している。この結果から、250℃以上熱処理でビニル基が架橋反応に関与することが分かる。

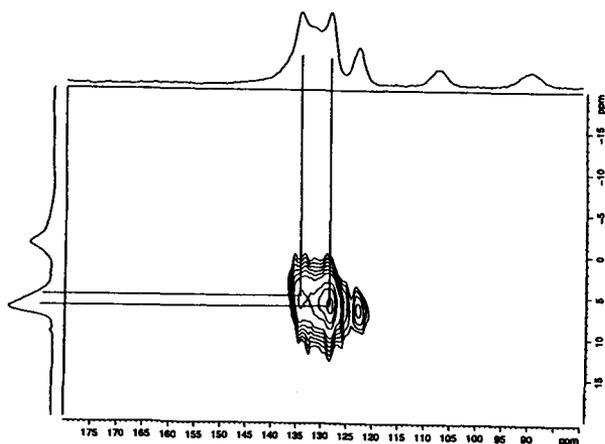


Fig.5 2D ^1H - ^{13}C heteronuclear-correlation spectrum of silyl-carborane hybridized diethynylbenzene-silylene polymer.

以上をあわせて考えると、側鎖のビニル基が主鎖の $\text{C}=\text{C}$ 結合に付加する架橋反応が存在し、3次元的なネットワークが形成されると考えられる(図6(b))。この付加反応には側鎖のビニル基だけではなく、ペンダント状になった側鎖も200℃の比較的低温から関与していることが、 ^{29}Si NMR スペクトルから明らかとなった。また、 ^{13}C CP/Dipolar Dephasing-MAS NMRスペクトルからナフタレンの生成も確認され、図6(a)に示すような架橋反応が存在することも分かった。

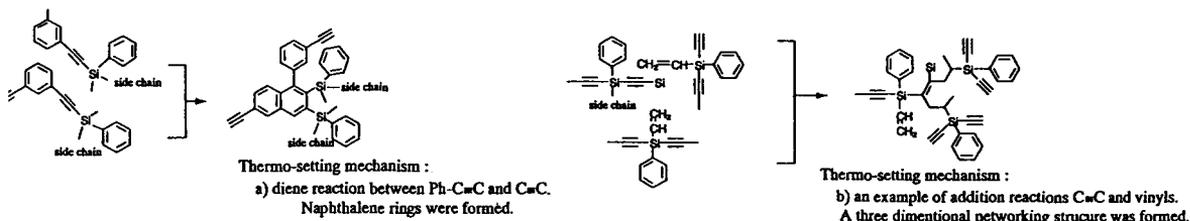


Fig.6

また当日は、軍事関係をはじめさまざまな分野で注目されているシリルカルボラン部分の ^{11}B MQ-MAS NMRによる酸化機構の解析も予定しており、よりホットなデータを提供する予定である。

固体 NMR による家蚕絹の繊維化前の構造と繊維化機構 の解明

東京農工大工¹、バリアンテクノロジーズジャパン²、生研機構³
○芦田淳^{1,2}・亀田恒徳^{1,3}・山根努^{1,3}・中澤靖元¹・大郷耕輔¹・朝倉哲郎¹

The Solid State NMR Study of the Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin before Spinning and the Mechanism of Spinning.

Jun Ashida^{1, 2}, Tsunenori Kameda^{1, 3}, Tsutomu Yamane^{1, 3}, Yasumoto Nakazawa¹, Kosuke Ohgo¹, and Tetsuo Asakura¹

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology; ²Varian Technologies Japan Ltd.; ³Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

The structure of *Bombyx mori* silk fibroin before spinning – known as silk I – is determined by two-dimensional spin-diffusion NMR and REDOR. Instead of *B. mori* silk fibroin, we used the stable isotope labeled sequential model peptides, (Ala-Gly)₁₅. The backbone torsional angles (ϕ and ϕ') of the Ala and Gly residues were determined by 2-D spin-diffusion NMR as (-60° , 130°) and (70° , 30°), respectively. The distance of the intra-molecular hydrogen bond along the chain was determined from REDOR as $4.0 \pm 0.1 \text{ \AA}$, which is in agreement with the predicted distance, $3.9 \pm 0.1 \text{ \AA}$ according to the structural model determined here. Also the mechanism of spinning of *B. mori* silk fibroin will be discussed by the structure change from silk I to silk II.

【緒言】

家蚕 (*Bombyx mori*) 絹フィブロインの繊維化前の構造は Silk I と呼ばれており、繊維化後の構造である Silk II と区別される。Silk I の構造を決定することは、繊維化後の構造である Silk II への転移機構、すなわち家蚕絹の繊維化過程を分子レベルで解明するために重要である。これまでに X 線結晶回折や電子線回折、CP/MAS NMR などによる構造解析が行われているが、配向させようとするとき Silk II 型に容易に変化してしまうため Silk I の解析が難しく、決定的な構造は明らかにされてこなかった。本研究では、2 次元スピン拡散 NMR 法[1-3]や REDOR 法などの配向しない系にも適用できる固体 NMR の手法を駆使して Silk I 型構造の解明を試みた。

絹フィブロイン、固体 2 次元スピン拡散 NMR、REDOR、繰り返し β ターン構造

あしだ じゅん、かめだ つねのり、やまね つとむ、なかざわ やすもと、
おおごう こうすけ、あさくら てつお

また、さらに、本研究で得られた分子構造モデルに基づいて、絹の逆平行 β シート構造(Silk II)への構造転移の機構、いわゆる繊維化機構について検討した。

【試料作成】

以下に、本研究での NMR 測定に供与した Ala, Gly のカルボニル炭素を二重ラベル、あるいはカルボニル炭素とアミド窒素を二重ラベルした(Ala-Gly)₁₅ 試料を示した。

- (1) (AG)₆A[1-¹³C]G₁₄[1-¹³C]A₁₅G (AG)₇
- (2) (AG)₇[1-¹³C]A₁₅[1-¹³C]G₁₆G(AG)₇
- (3) (AG)₆A[1-¹³C]G₁₄A[1-¹³C]G₁₆G(AG)₇
- (4) (AG)₆A[1-¹³C]G₁₄AG[¹⁵N]A₁₇G(AG)₆

これらの試料は、Pioneer Peptide Synthesis System (PE Biosystems 社製)を用いて Fmoc 固相合成法により合成した。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 3 日間透析を行い、NMR 測定に供与する試料を得た。得られた試料が Silk I 構造をとることは、IR および ¹³C CP/MAS NMR により確認した。

【NMR 測定】

固体 NMR は、Varian ^{Unity} INOVA400 および Chemagnetics Infinity400 を用いて測定した。

2次元スピン拡散 NMR では、試料回転速度は 6kHz、試料回転角度はマジック角 +7°、ミキシングタイムは 2 秒、あるいは 5 秒と設定した。ミキシングタイムは、分子内でのスピン拡散がおこるが、分子間でのスピン拡散がほとんど無視できる条件で最適化を行った。シミュレーションスペクトルは、SGI の OCTANE Workstation 上で自作の FORTRAN プログラム[1,2]を使用して求めた。REDOR NMR では、試料回転速度は 5kHz、REDOR パルス系列には XY-8 を用い、¹³C および ¹⁵N の 90 度パルスをそれぞれ 5 μ s、7 μ s と設定した。

【結果および考察】

①Ala 残基の内部回転角(ϕ 、 ψ)の決定

Fig.1(a)に、試料 1 のカルボニル炭素領域の固体 2次元スピン拡散 NMR スペクトルを示した。計算スペクトル(b)との比較に加え、絹フィブロイン中の Ala 残基の C _{α} 、C _{β} 化学シフト等高線マップの結果[4,5]を考慮して、Ala の内部回転角は(-60 \pm 5°、130 \pm 5°)と決定した。

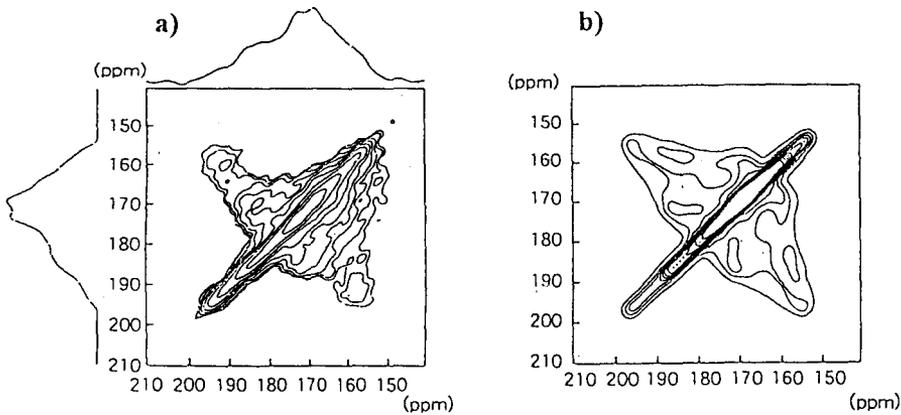


Fig. 1

- (a) Experimental 2D spin diffusion spectrum of $(AG)_6A[1^{13}C]G_{14}[1-^{13}C]A_{15}G(AG)_7$.
 (b) Calculated 2D spin diffusion spectrum of the Ala residue with torsional angle of $(-60 \pm 5^\circ, 130 \pm 5^\circ)$

② Gly 残基の内部回転角 (ϕ , ψ) の決定

①と同様に、試料 2 の固体 2 次元スピン拡散 NMR スペクトルを測定し、計算スペクトルとの比較を行った。この場合には、スペクトルが一致する (ϕ , ψ) の解は (ϕ , ψ) マップ上で 4 ケ所得られた。 (ϕ , ψ) の値を絞り込むために、試料 3 の固体 2 次元スピン拡散 NMR スペクトルを測定し、Ala の内部回転角を $(-60, 130)$ とした時の Gly の (ϕ , ψ) マップを検討した。さらに X 線結晶回折による C 軸長 (8.9 Å) の値も考慮して、Gly の内部回転角を $(70 \pm 5^\circ, 30 \pm 5^\circ)$ と決定した。

以上、①②の実験で決定された Ala, Gly 残基の内部回転角 (ϕ , ψ) に基づいて WAXS のシミュレーションパターンを計算したところ、Fig. 2 のように絹フィブロインモデル化合物の実測 WAXS パターン [6] と非常に一致を示した。

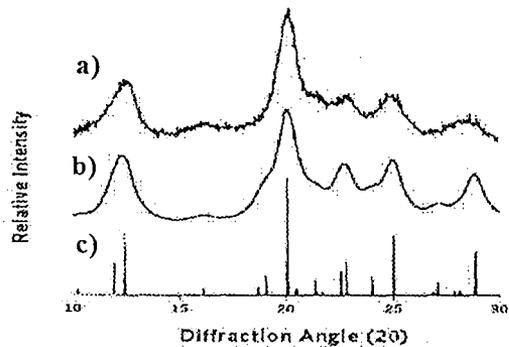


Fig. 2

WAXS pattern spectra of $(AGSGAG)_{168}$ (a), and calculated WAXS pattern with our silk I model (b,c)

③ 分子内水素結合間の距離決定

本研究で決定された Ala, Gly 残基の内部回転角 (ϕ , ψ) に基づく Silk I 構造を Fig. 3 に示した。これはこれまでに提唱された構造とは全く異なった新しい構造で、“繰り返し β ターン構造” と名づけた。この構造では、分子内・分子間水素結合が交互に形成され安定化している。例えば、 i 番目の Gly のカルボニル酸素と $i+3$ 番目の Ala のアミド水素の間に分子内水素結合が存在し、この時のカルボニル炭素とアミド窒素の核間距離は $3.9 \pm 0.1 \text{ \AA}$ となる。

この分子内水素結合の存在を確認するために、試料4のカルボニル炭素とアミド窒素の間の距離を REDOR 法により測定した。Fig.4 に試料4の REDOR 測定結果を示した。同位体ラベルしたカルボニル炭素とアミド窒素の核間距離は $4.0 \pm 0.1 \text{ \AA}$ と求められ、我々の提唱したモデルから予想された結果と一致した。

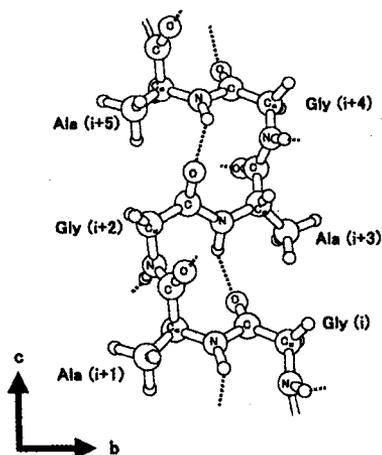


Fig.3 Repeated β -turn structure of silk fibroin

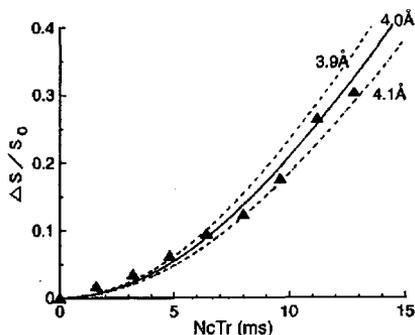


Fig.4 REDOR plot, $\Delta S/S_0$ vs $N_c T_r$, of $(AG)_6A[^{13}C]G_{14}AG[^{15}N]A_{17}G(AG)_6$ with silk I form. Experiments (\blacktriangle) and simulated lines by assuming the distance between ^{13}C and ^{15}N as 4.0 \AA (solid line), and 3.9 , and 4.1 \AA (dashed lines).

④絹の繊維化の機構

本研究で得られた Silk I 構造によって、繊維化の機構が以下のように説明できる。すなわち、紡糸の際にカイコの首振り運動によって、繊維軸方向への延伸がかかり、分子内水素結合が切れて分子間水素結合に移行することによって、全ての水素結合が分子間水素結合に変わる。この分子間水素結合の方向は、繊維軸に垂直であり、繊維軸に対する横方向からの力に抗する分子間水素結合のネットワークが瞬時に作成される。

なお、本研究は一部、生研機構基礎研究推進事業により行われた。

【参考文献】

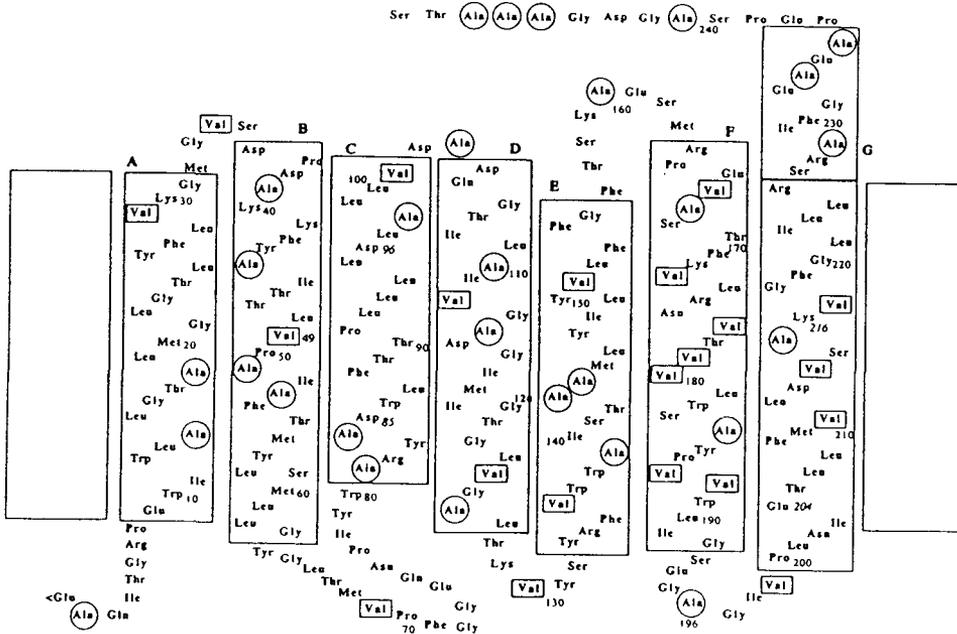
- 1) 芦田、桑原、植垣、寺尾 第 29 回 NMR 討論会講演予稿集 p245 (1989)
- 2) 芦田、桑原、今城、寺尾 第 30 回 NMR 討論会講演予稿集 p1 (1990)
- 3) J. D. van Beek, L. Beaulieu, H. Schaefer, M. Demura, T. Asakura, and B. H. Meier; *Nature* **405**, 1077-79 (2000)
- 4) T. Asakura, M. Iwadate, M. Demura, and M. P. Williamson; *Int. J. Biol. Macromol.*, **24**, 167-71 (1999)
- 5) M. Iwadate, T. Asakura, and M. P. Williamson; *J. Biomol. NMR*, **13**, 199-211 (1999)
- 6) J. A. Anderson; *Biopolymers*, **45**, 307-21 (1998)

膜タンパク質活性部位変化による広領域構造変化の ^{13}C NMRによる検出
 (姫路工大理) 河瀬靖治、谷生道一、吉良敦史、山口 悟、辻 暁、内藤 晶、
 ○斉藤 肇

Global Conformational Changes of Membrane Proteins of Site-directed Mutation at the Active Site as Detected by ^{13}C NMR, Department of Life Science, Himeji Institute of Technology, (Himeji Inst. of Technol.) Y. Kawase, M. Tanio, A. Kira, S. Yamaguchi, S. Tuzi, A. Naito and H. Saito

We have recorded ^{13}C NMR spectra of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ - and $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}$ -labeled D85N and D85N/D96N mutants of bacteriorhodopsin (bR), in order to examine how conformation and dynamics of the protein backbones are altered when the Schiff base is protonated (at pH 7) and deprotonated (at pH 10). Greater changes, including acquisition of motions of intermediate frequency ($\sim\text{ca. } 10^4$ to 10^5 Hz), were noted, which indicates conformational changes as well as large-amplitude motions of transmembrane helices upon deprotonation of Schiff base and the formation of the M-like state in the absence of photo-illumination.

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌の紫膜中において、レチナールの光吸収によるオールトランスから 1 3 cis 型への異性化による光駆動プロトンポンプとしての機能をもつ。bR がもつプロトタイプのプロトンポンプの活性を、タンパク骨格の構造とダイナミクスの視点からとらえる研究に加え、これを膜タンパク質の典型的な例としてとらえることも重要である。これは、バクテリア由来の膜タンパク質として、発現系が容易でありかつ多様な G タンパク質共役受容体 (G



固体高分解能NMR、バクテリオロドプシン、膜タンパク質、ダイナミクス、
 かわせ やすはる、たにお みちかず、きら あつし、やまぐち さとる、つじ あきら、
 ないとう あきら、さいとう はじめ

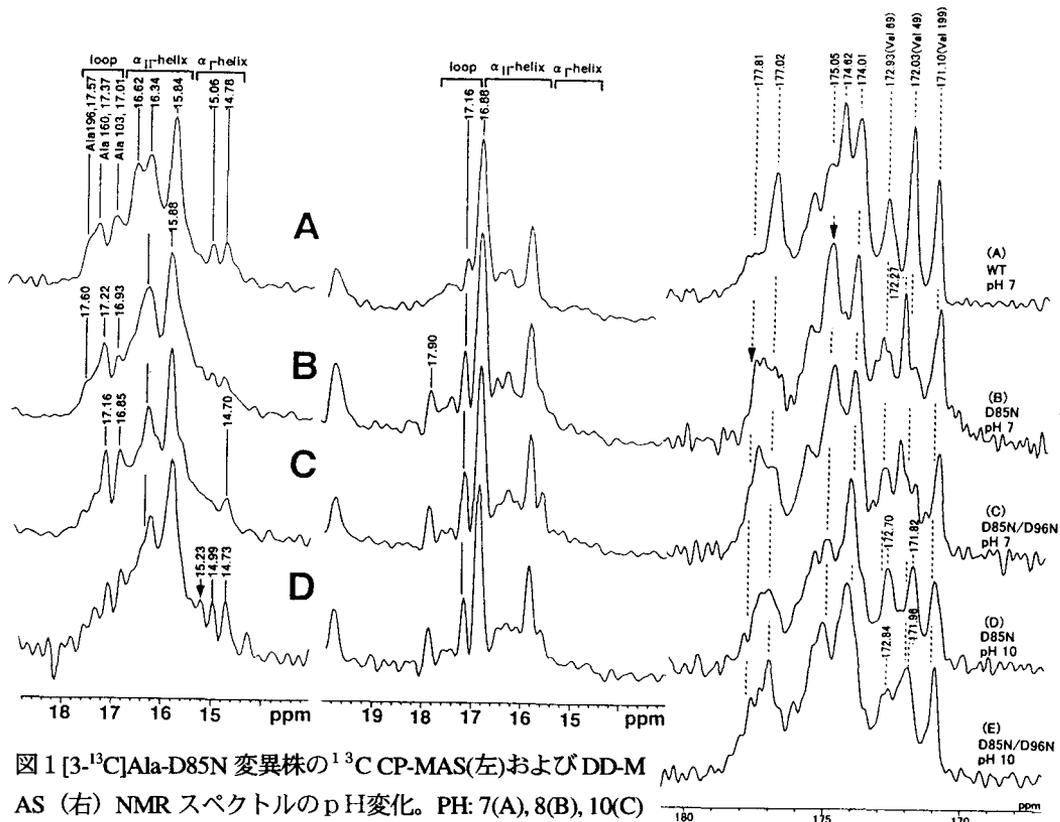


図1 [3-¹³C]Ala-D85N 変異株の¹³C CP-MAS(左)およびDD-MAS(右) NMR スペクトルのpH変化。PH: 7(A), 8(B), 10(C) 11(D)。図2 [1-¹³C]Val-bR, D85N および D85N/D96N 変異株の¹³C CCP-MAS NMR スペクトル。

PCR) 分子群に共通の7本の膜貫通αヘリックスからなる。これまでに調べられたbRの三次元構造は、膜貫通αヘリックス部位はいずれも類似しているが、膜表面にあるループまたは末端部分の構造は完全に欠落、ないしは著しく異なった結果が得られている。

固体高分解能NMRによるアプローチは、回折法からは測定が困難な揺らぎとそのダイナミクスに関する知見、および生理的条件下における実験データを与えるという利点がある。¹⁻³ 図1, 2はそれぞれ[3-¹³C]Ala-, [1-¹³C]Val-標識(標識位置は前ページ模式図参照) bR, D85N, またはD85N/D96N 変異株の¹³C NMRスペクトルを示す。これらは活性部位のシッフ塩基近傍残基の変異体で、光照射がなくてもpH 10付近でM様中間体構造に変換する。第一に、野生株にくらべて明らかに16.34-16.62ppm付近のD85N変異株の信号強度の減少は、M様中間体の生成によりB, Gヘリックスに位置するAla39, 51, 53, 215の揺らぎが起これ、その周波数がプロトンデカップリング周波数との干渉のためにスペクトルの先鋭化が成功せず、その結果信号が欠落している。図2においては、Val49(ヘリックスB)、69(B-Cループ)および矢印のピークの低磁場側シフトと、信号の欠落が生じる。これらの結果は、M様中間体生成にともない、10⁴-10⁵の揺らぎがヘリックス、ループに誘起され、それらが関与する部位は、B, GヘリックスとE-FまたはF-Gループであることがわかった。

¹ H. Saito and I. Ando, Annu. Rep. NMR Spectrosc., 21, 209-290 (1989). ² H. Saito, S. Tuzi and A. Naito, Annu. ibid., 36, 79-21 (1998), ³ H. Saito, et al., Biochim. Biophys. Acta, 44884, 39-47 (2000)

D85N

カルモジュリンのメチオニン側鎖のダイナミクスと水和

(北大院工, *Univ. of Calgary)

○村井亮平、平沖敏文、H. J. Vogel*、堤耀廣

Dynamics and Hydration of Methionine residues on Calmodulin

○R. Murai, T. Hiraoki, H. J. Vogel*, A. Tsutsumi

*Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Hokkaido University***Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, Canada*

The dynamics of the methionine side chains on Calmodulin and their hydration effect were investigated by a solid-state deuterium NMR. The methyl groups of the methionines show a Pake powder pattern, characterized by the fast three-fold jump at below 213K in both lyophilized and hydrated apo-CaM. With increasing a temperature, the line shape changes and the spectral intensity decreases. A singlet and a rectangular line shapes are observed at 296K in the hydrated and lyophilized, respectively, indicating the presence of the additional large-amplitude motions of the C₃ axis of the methyl. Motionally averaged rectangular line-shapes are observed for the both states of holo-CaM at 296K. The dynamics of the methionines deuterated in β and γ positions will be discussed.

【はじめに】

カルモジュリン (CaM) は細胞内情報伝達物質である Ca²⁺受容体であり、他のタンパク質に比べメチオニン残基の存在比が大きい。また、メチオニン残基は標的酵素との結合部位に多く存在し、メチオニン側鎖の柔軟性が分子認識に寄与していると考えられている。そこで本研究では、apo 状態と holo 状態の CaM において、メチオニン側鎖のダイナミクスとその水和量依存性を調べる為に、固体重水素 NMR 測定を行なった。

【実験】

固体重水素 NMR 測定は、共鳴周波数 46MHz で行った。試料はメチオニン側鎖末端のメチル基を重水素化したものと、 β , γ 位を重水素化した試料を用いた。水和量は凍結乾燥試料を相対湿度 95% 下に放置し調整した。分子表面積を考慮すると、この水和量ではタンパク質表面はほぼ完全に水分子に覆われている。

【結果・考察】

Fig.1 に apo-CaM のスペクトル温度依存性を示す。凍結乾燥試料、水和試料とも、-60°C 以下の低温域では四重極分裂幅が約 40kHz の Pake powder pattern の線形が得られた。これは、メ

Keyword: カルモジュリン、メチオニン側鎖、固体重水素 NMR、水和、ゆらぎ

むらいりょうへい、ひらおきとしふみ、H. J. Vogel、つつみあきひろ

チル基が速い C_3 回転運動をしている事を示している。温度上昇とともに線形が変化し、スペクトル強度も減衰した。室温の凍結乾燥試料では台形の線形が得られ、水和試料は鋭い1本のピークとなり、水和による影響がみられた。これらの結果は、 C_3 軸自身が kHz オーダーの大振幅な運動をしていることを示している。この運動モデルとして、kHz 程度の C_3 軸自体の大振幅な運動を考慮して線形シミュレーションを行い、実測スペクトルを再現できた。

スピン格子緩和時間 T_1 測定を行い (Fig.2)、メチル基の回転運動の速さを調べた。水和による T_1 の変化は観測できなかった。また、apo と holo の T_1 の値もほとんど同じであった。活性化エネルギーは 5.5 kJ/mol と求まり、モノマーでの値 8.8 kJ/mol よりかなり小さな値を示している。¹⁾

holo-CaM の凍結乾燥試料、水和試料ともに 0°C 以下の温度域では、apo 状態と同様のスペクトル温度依存性を示した。しかし、apo 状態の室温でみられた水和による線形の平均化は観測できなかった。 β, γ 位を重水素化した試料のスペクトルは rigid な線形ではなく、apo 状態、holo 状態ともに、室温で kHz 程度の大振幅な運動の存在を示すスペクトルが得られた。

以上の結果から、メチル基の C_3 回転に加え、 -20°C 付近から $C_\alpha-C_\beta-C_\gamma$ 部位の大振幅な運動が始まり、側鎖全体がゆらいでいると考えられる。室温付近では、apo-CaM のメチル基に水和による効果が現れ、側鎖の多重内部回転の自由度が holo-CaM より大きいことがわかった。

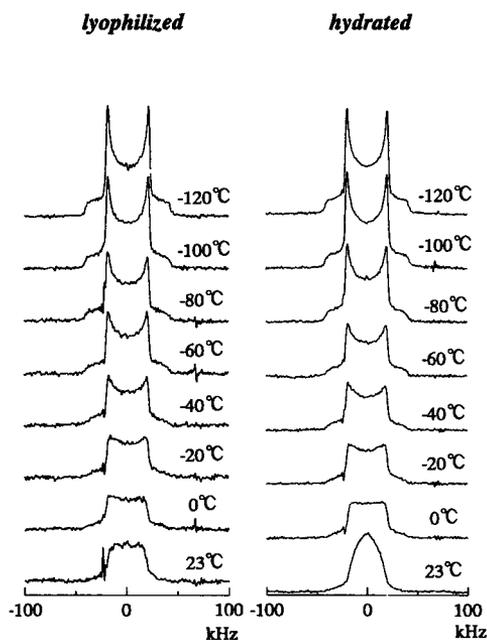


Fig.1 The temperature dependent spectra of lyophilized and hydrated apo-CaM

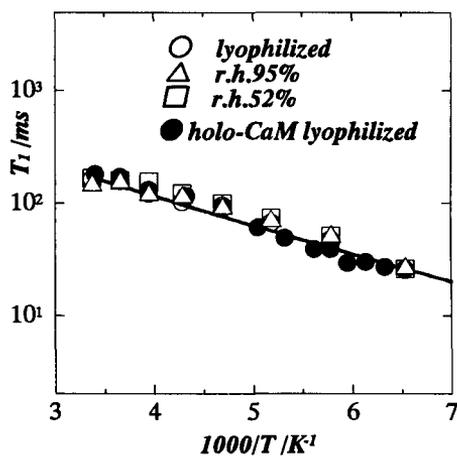


Fig.2 Temperature dependence of T_1

1) L. S. Batchelder, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105, 2228-2231.

核酸－金属イオン相互作用の多次元NMR分光法による解析
 (愛媛大・理学部¹、工技院・融合研²、筑波大・応生³)
 ○森田勇人¹、田中好幸²、田中俊之³、多比良和誠²、林秀則¹

Functional analysis of the metal-ion-binding motif in biologically active RNA molecules with multi-dimensional NMR spectroscopy

(Fac. Sci., Ehime Univ.¹, NAIR, AIST², Inst. Appl. Biochem., Univ. Tsukuba³)

○Eugene H. Morita¹, Yoshiyuki Tanaka², Toshiyuki Tanaka³, Kazunari Taira², Hidenori Hayashi¹

An important metal ion in reactions catalyzed by hammerhead ribozymes is called as P9 metal ion (the metal ion captured by the phosphorus atom of A9 and N7 of G10.1 [P9-G10.1 motif]). Hammerhead ribozymes have catalytically important tandem G-A pairs in the core region. The P9 metal ion is most probably a Mg²⁺ under physiological conditions. In this study, with heteronuclear multi-dimensional NMR spectroscopy, we have studied whether this motif by itself is sufficient to capture structurally and catalytically important metal ions in solution. We have found that the P9-G10.1 motif with several flanking base-pairs is sufficient to capture divalent metal-cations.

多くの機能性RNA分子は金属イオンを補因子として用いており、金属イオンとの相互作用様式を解析することは、RNAの機能発現のメカニズムを解明するために不可欠である。本研究ではハンマーヘッド型リボザイムの二価金属イオン結合モチーフを例として、多次元NMRスペクトルを測定することによるRNA分子と二価金属イオンの相互作用様式の解析を試みた。

これまでの核酸分子と金属イオンの相互作用の研究は、金属イオン添加に伴う¹H-NMRスペクトル、或いは³¹P-NMRスペクトルの変化から結合部位を推定することが行われてきた。また近年では、ヘキサアミンコバルトのアミノプロトンと核酸のプロトンの間のNOEから結合部位を推定する方法も試みられている。しかしながら前者の方法を用いた場合、プロトンとリンは核酸分子全体の構造変化にも敏感に反応するため、化学シフト値の変化が、金属イオンとの結合の影響を反映しているのか、金属イオンとの結合に伴う核酸分子全体の構造変化を反映しているのかが明確で無い。後者の方法を用いた方法の場合、ヘキサアミンコバルトは完全水和型の金属イオンのモデルであり、金属イオンが直接配位 (inner-sphere coordination) する可能性がある結合部位の同定には用いることができない。従って、汎用性のある金属結合部位同定法としては、金属イオンとの結合に伴う影響は結合部位付近に限局されているが、分子全体の構造変化に伴う場合はその化学シフト値が広範囲にわたり大きく変化する核種の化学シフト値を同時に観測することが必要になる。

研究対象のハンマーヘッド型リボザイムの二価金属イオン結合モチーフはG-A mismatchesと隣接するC-G塩基対からなる。結晶構造中では、G-A mismatchesは

キーワード：二価金属イオン、ハンマーヘッド型リボザイム、金属イオン結合モチーフ

sheared型のG-A塩基対を組んでおり、このアデニン残基のリン酸基とアデニン残基の3'側に存在するグアニン塩基の7位の窒素 (N7) を介して金属イオンと結合している。一方、ハンマーヘッド型リボザイムの金属結合モチーフと同様の配列を持つRNAオリゴマーのX線結晶構造解析の結果でも同様の様式で金属イオンが結合することが明らかになっており、この配列モチーフのみを取り出したモデルRNAにおいて、ハンマーヘッドリボザイムにおけるのと同様の金属結合様式が観測されると期待される。従ってこのモチーフを用いて核酸塩基の8位の窒素 (N8)、8位の炭素 (C8)、8位の水素 (H8)、リン (P) の化学シフト値を観測した場合、金属イオンに結合する残基のC8、H8、Pの化学シフトのみが変化すると考えられる。

本研究では、2D ^1H - ^{31}P HMQC-NOESY、 ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを測定し、各塩基のC8、H8、Pのシグナルの帰属を行うことで、金属イオンとの結合に伴い化学シフトの変化するC8、H8、Pの同定を試みた。2D ^1H - ^{31}P HMQC-NOESYスペクトルはリンとH8/H6プロトンの連鎖帰属が可能な点が特徴的である。

また、このモチーフがハンマーヘッド型リボザイムの他の保存配列無しに独立して金属結合能を有しているかが明らかになるという点で、生化学的な見地からも本研究は重要な意義を持つ。

まず、二価金属イオン結合モチーフを含むRNAオリゴマー、GA10: r(GGACGAG UCC) を化学合成した。また、GA10の2D ^1H - ^{31}P HMQC-NOESYを測定した結果、連鎖的にリンとH8/H6プロトンのシグナルの帰属が可能であり、二重らせん分子中のリンの帰属に有効であることがわかった。次に同様のスペクトルを種々の濃度の MgCl_2 存在下で測定したところ、金属イオンの結合部位であるA6残基のリン (P/A6) が他のシグナルよりも大きく高磁場シフトした。同時に各 MgCl_2 濃度で、 ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを測定したところ、金属イオン結合部位のG7のC8カーボン (C8/G7) およびH8プロトン (H8/G7) に有意な低磁場シフトが観測された。この時、金属イオン添加に伴うプロトンの化学シフト変化はほぼすべての残基にみられ、プロトンの化学シフト変化のみから核酸塩基内の結合部位を同定することは困難であったが、C8カーボンの化学シフト変化と組み合わせることにより、金属結合部位を同定することができた。また、これまでのDNAオリゴマーのNMRによる滴定実験の結果より、金属が核酸塩基に結合した場合、C8カーボンとH8プロトンが同時に大きく低磁場シフトすることが判っており、今回の結果は、そのデータと一致した。

以上の結果から、複数の核種のNMRシグナルを同時に観測することにより、金属イオンとの結合に伴う結合部位周辺の構造変化をより詳細に解析できることを明らかにした。また、ハンマーヘッド型リボザイムの金属イオン結合モチーフは他の保存配列無しに金属イオンと結合できる独立した機能モジュールであることを明らかにした。

「参考文献」

1. "Well-conserved tandem G-A pairs and the flanking C-G pair in hammerhead ribozymes are sufficient for capture of structurally and catalytically important metal ions."
Yoshiyuki Tanaka, Eugene H. Morita, Hidenori Hayashi, Yasuhiro Kasai¹, Toshiyuki Tanaka, and Kazunari Taira *J. Am. Chem. Soc.* in press.

HIV-Tat タンパク質に対する RNA アプタマーの分子認識における
水素結合と構造の役割

(横国大工¹、工技院生命研²、東大院工³) ○片平正人¹、松上明正¹、
大橋肅¹、小林伸一郎¹、上杉晴一¹、山本利香²、西川論²、多比良和誠³、
Penmetcha Kumar²

Molecular recognition of RNA aptamer for HIV-Tat protein -Hydrogen bond and structure-
(Fac. of Eng., Yokohama Natl. Univ.¹, Natl. Inst. of Bioscience and Human Tech., MITI² and Grad. Sch. of
Eng., Tokyo Univ.³) Masato Katahira¹, Akimasa Matsugami¹, Kiyosi Ohashi¹, Shin-ichiro Kobayashi¹,
Seiichi Uesugi¹, Rika Yamamoto², Satoshi Nishikawa², Kazunari Taira³ and Penmetcha Kumar²

The structure of the RNA aptamer for HIV-Tat protein complexed with two argininamide molecules has been determined. Upon complex formation, two U:A:U base triples are induced at the central portion of the aptamer, which causes widening up of an originally narrow major groove and makes the room to accommodate the argininamide molecules. Although the imino proton signal of Hoogsteen-paired U of the base triple is not observed, observation of the AN7-UN3 coupling through the Hoogsteen-type hydrogen bond by the use of the recently reported method, which utilizes AH8-AN7 coupling, directly confirmed the formation of the base triple. Each argininamide binds to G located both sides of the base triples. The stacking between Hoogsteen-paired U and argininamide further stabilizes this arrangement. Structural analysis of the aptamer-Tat peptide complex will also be presented.

(序) HIV-Tat タンパク質を結合する RNA アプタマーが、試験管内分子進化法により得られた。このアプタマーは、天然の TAR RNA に比べ、100 倍も強く Tat タンパク質を結合する(Kd \sim 10⁻¹⁰ M)。Tat タンパク質のモデル化合物として、アルギニンアミド分子(Kd \sim 10⁻⁴~10⁻⁵ M)及び Tat タンパク質の部分ペプチド(Kd \sim 10⁻⁹ M)を用いて、複合体の構造解析を行い、高い親和性がもたらされているメカニズムを解明する事を目指した。

(方法) T7 RNA ポリメラーゼの系を用いた試験管内転写反応により、¹³C, ¹⁵N 標識した RNA アプタマー (34 mer) を得、ゲル電気泳動によりこれを精製した。アルギニンアミド及び部分ペプチドは購入したものを用いた。NMR スペクトルは、Bruker DRX600 を用いて測定した。

(結果と考察)

① アルギニンアミドとの複合体の構造決定

アプタマーはアルギニンアミドを2分子結合する事が、滴定実験よりわかった。この複合体の構造を決定した(結合部位に関して r.m.s.d. \sim 0.8 Å)。アルギニンアミドの結合に伴い、アプタマーには大きな構造変化が生じる。特に中心部に2つの U:A:U のベーストリプルが形成される(Fig. 1)。ベーストリプル中、フーグスティン型の水素結合で結合している U(U7, U23)に関しては、そのイミノプロトンが水との交換の為観測されず、水素結合の形成を HNN-COSY 法で直接的に証明する事ができなかった。しかしこの様な場合でも、AH8-AN7 のカップリングを利用する事により、HNN-COSY 法で、水素結合を介した N-N のカップリングが観測できる事が報告された。そこで本系にもこの方法を適用してみたところ、AN7-UN3 のカップリングが A10-U7 と A26-U23 の間で観測され、2つのベーストリプルの形成を直接的に証明する事ができた(Fig. 1)。

連続した2つのベーストリプルの形成により、本来狭い RNA の主溝が、押し広げられる。こうして、アルギニンアミド分子が結合するスペースが作り出される。そして、各アルギニンアミド

RNA アプタマー、HIV-Tat タンパク質、タンパク質-RNA 相互作用、水素結合、立体構造
かたひらまさ、まつがみあきまさ、おおはしきよし、こばやししんいちろう、
うえずぎせいいち、やまもとりか、にしかわさとし、たいらかずなり、くまーる

分子は、ベーストリプルの両側に隣接して位置する G と各々水素結合により結合する。そしてフーグスティン型で結合した U とアルギニンアミド分子とのスタッキングにより、この配置はさらに安定化される(Fig. 2)。

② 部分ペプチドとの複合体の構造解析

アルギニンアミド分子の時とは異なり、アプタマーは、部分ペプチドを 1 分子だけ結合する事が、滴定実験よりわかった。しかし複合体形成に伴いアプタマーに誘起される構造変化は、アルギニンアミドが 2 分子結合した時と、基本的には同じである事が、HNN-COSY の実験等によって分かった。また同定された分子間 NOE からは、アプタマー上の 2 つの結合部位において、アルギニン残基が、先と同様な相互作用を行っている事が示された。以上の事は、部分ペプチド中の異なる 2 つのアルギニン残基が、アプタマー上の 2 つの結合部位において、各々相互作用している事を強く示唆する。これが高い親和性が生じる原因だと思われる。そしてこの際、2 個連続したベーストリプルの形成によって主溝を押し広げる事で、かさ高いペプチド鎖を受け入れるスペースが確保されているのだと考えられる。

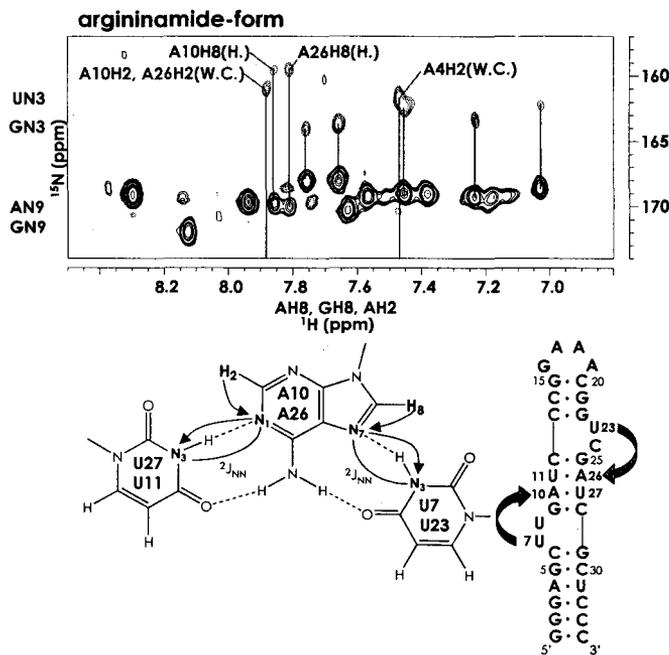


Figure 1 Aptamer sequence, U:A:U base triple, and HNN-COSY spectrum.



Figure 2 Structure of the aptamer complexed with two argininamide molecules (Top view).

^9Be NMRピーク分離法による環状イミド三リン酸イオンの微視的
錯平衡解析 ～ Be^{2+} イオンの窒素原子への直接的相互作用～

(神戸大学工学部、神戸大学大学院自然科学研究科*)

○牧 秀志、辻戸 正彦*、成相 裕之*

^9Be NMR Study on the Microscopic Complexation Behavior of *cyclo- μ -Imidotriphosphate Anions*

～Direct Coordination of Be^{2+} ion for Imino Nitrogen Atom～

^aHideshi Maki, ^bMasahiko Tsujito, and ^bHiroyuki Nariai

^aDepartment of Chemical Science and Engineering, Faculty of Engineering, Kobe University,
1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

^bDepartment of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe
University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

Microscopic complexation behavior of Be^{2+} ion with cyclic imidotriphosphate ligands, involving P-O-P and/or P-NH-P linkages has been investigated by a ^9Be NMR technique. These ligands form monodentate and bidentate complexes, where monodentate complexes consist of O-coordination and N-coordination complexes. For these complexation systems, the formation constants of monodentate and bidentate complexes, as well as those of O-coordination and N-coordination complexes have been determined by the peak area ratio calculation of the ^9Be NMR spectra. For the Be^{2+} - $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ system, the fact that N-coordination is much favored than O-coordination found in this study is unexpected because hard Be^{2+} ions usually favor harder oxygen atom than nitrogen atom to coordinate. The present result shows the crowded donor N atoms in $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ ligand form a specific binding site of a ring structure.

【緒言】本研究で用いた環状イミド三リン酸イオン、 $\text{cP}_3(\text{NH})_n^{3-}$ ($n=1\sim 3$) は3個のリン酸基が酸素原子またはイミノ基によって架橋された環状ポリリン酸である(Fig.1)。これらは分子内に2種類

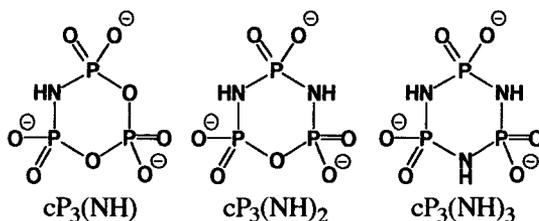


Fig.1 Structure of *cyclo- μ -imidotriphosphate anions*

の配位原子すなわち非架橋酸素原子と

架橋窒素原子を持つため多様な配位構造が期待される。単純なHSAB理論による予測では、ハードな Be^{2+} イオンは非架橋酸素原子のみに配位すると予想されるが、 $\text{cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ および $\text{cP}_3(\text{NH})_2^{3-}$ においては分子中央部に窒素原子が密集しているため、架橋窒素原子も配位に関与する可能性がある。特に、 $\text{cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ のAl錯体生成において単純なHSAB理論による予測に反してAl-N配位構造が存在し、さらに分子内多座配位錯体を形成し三座錯体では Al^{3+} イオンが3個の架橋窒素原子と結合してクラウン状錯体を形成していることが明らかとなっている。そこで今回は、荷電/半径の

MULTINUCLEAR NMR · COMPLEX · DECONVOLUTION · BERYLLIUM · PHOSPHATE

まき ひでし・つじと まさひこ・なりあい ひろゆき

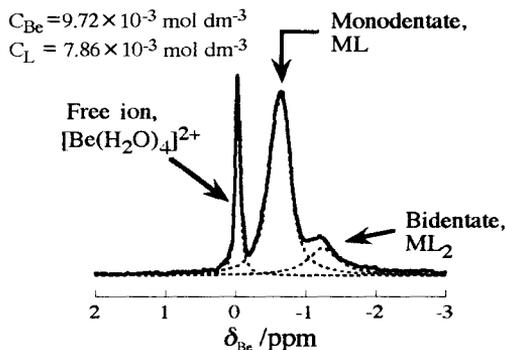


Fig. 2 ^9Be NMR spectrum of $\text{Be}^{2+}\text{-cP}_3(\text{NH})_3^-$ mixture solution (pH 2.5, $-2 \pm 1^\circ\text{C}$).

値が ~ 6.5 であり Al^{3+} イオンと近い値(~ 6.0)を持ち、かつ同じくハードな酸に分類される等、化学的類似性が期待される Be^{2+} イオンについて ^9Be NMR法による微視的錯平衡解析を行った。

このような「微視的な」溶液内平衡については A. E. Martell らによるアミノ酸の酸解離反応の研究例があるが、錯生成反応に関しては殆ど例がない。通常の熱力学的手法を持つパルスNMR法は微視的錯生成

反応の追跡に適している。本研究においては、 ^9Be NMRピーク分離法を用いて配位原子の違いを反映した微視的錯体安定度定数の決定を行い、錯体の配位構造の詳細を検討した。

【実験】 ^9Be NMRスペクトルは Bruker社製 DPX-250 NMR測定装置 (Ref. $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ BeCl}_2 + 10\% \text{ D}_2\text{O}$)を用い、配位子交換速度を遅くするために -2°C で測定を行った。試料溶液は $C_{\text{Be}^{2+}} = 0.005, 0.01 \text{ mol dm}^{-3}$ の各 BeCl_2 水溶液に $\text{cP}_3(\text{NH})_n^-$ ($n=1\sim 3$)各水溶液を添加することにより調整した。また Be^{2+} イオンの加水分解防止のため HCl または NaOHで pH 2.5に調製した。

【結果と考察】 **ピーク分離解析** 低温においては Be^{2+} イオンの配位子交換速度はNMRタイムスケールに対して充分小さいため、配位数の異なる錯体の各シグナルを観測可能である。一方、 ^9Be 核は四極子核であるためNMRシグナルの線幅は増大し、スペクトルは数本のシグナルの重なりとして現れる。そこで各々のシグナル強度を算出するためローレンツ型曲線を用いた非線形最小二乗法によるピーク分離解析を行った。

巨視的錯体安定度定数決定 分子中のイミノ基数が最も多く、 $\text{Be}^{2+}\text{-N}$ 原子間相互作用が最も期待される、 $\text{Be}^{2+}\text{-cP}_3(\text{NH})_3^-$ 錯生成系の代表的な ^9Be NMRスペクトルをFig.2に示す。化学シフトの配位数に対する加成則に基づき、低磁場側から遊離の Be^{2+} イオン、単座錯体、二座錯体のシグナルと同定した。それぞれのシグナル強度を S_0, S_1, S_2 とすると、分子間*i*座錯体の巨視的安定度定数

K_i はシグナル強度比を用いて以下のように表現できる。種々の要因により、シグナル強度と分子種の濃度間の直線性は一般的に誤差の大きいものとされている¹⁾が、本解析法では「強度比」を用いることで定量的精度が改善される。

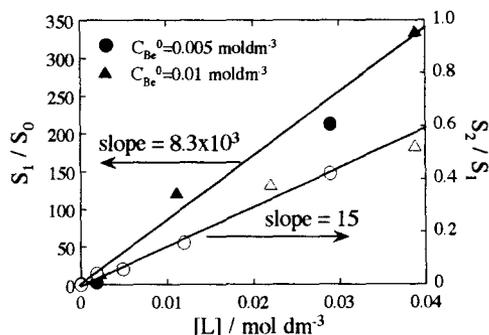
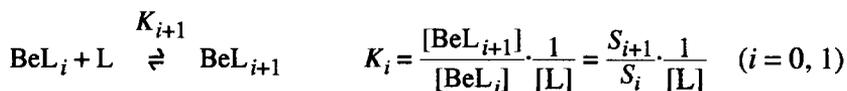


Fig. 3 Peak area ratios as a function of $[\text{L}]$ (close; S_1/S_0 , open; S_2/S_1)



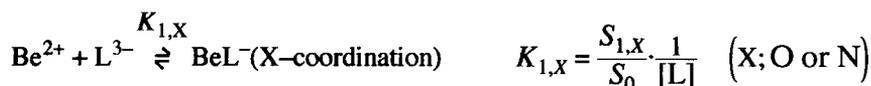
$$\text{但し、} [\text{L}] = C_L - [\text{BeL}] - 2[\text{BeL}_2] = C_L - \frac{S_1}{\sum S_i} C_L - \frac{2S_2}{\sum S_i} C_L$$

すなわち、 S_1/S_0 , S_2/S_1 を遊離の配位子濃度、 $[\text{L}]$ に対してプロットすると傾きがそれぞれ K_1 , K_2 である直線が得られる。実際に各プロットは概ね直線上に位置し(Fig.3)、その傾きから $\log K_1=3.9$ および $\log K_2=1.2$ が算出された。本錯生成系において分子間錯体(ML_2)の生成が明らかとなり、 Al^{3+} イオンよりも分子内錯体を形成しにくいことが明らかになった。荷電/半径の値が近い両方で異なる挙動を示したことにより、この系の多座配位錯生成挙動は主にイオン半径に支配される、すなわち金属イオン-配位子間の立体的適合性に大きく依存すると考えられる。また、 Be^{2+} - $\text{cP}_3(\text{NH})_n^{3-}$ ($n=1,2$)錯生成系においても同様の解析を行い、分子間二座錯体の生成を確認した(Table)。

微視的錯体安定度定数決定

上述の解析の結果、単座錯体のシグナルに関して、半値幅が全シグナル中最大であり、また化学シフト値が金属イオンおよび配位子濃度に依存する現象が見出された。これは、単座錯体のシグナルが複数の微視的錯体のシグナルからなる可能性を示唆している。慎重なピーク分離解析の結果、今回得られた単座錯体のシグナルは、2本の微細なシグナルの和として表現することが可能であった。各シグナルは化学シフトの配位数に対する加成則に基づき、 -0.65 ppm 付近のシグナルを単座O錯体と同定した。 -0.55 ppm 付近のシグナルは配位子分子中に配位原子として非架橋酸素原子以外には架橋窒素原子しか存在しないため、単座N錯体のシグナルである(Fig.4)。さらに二座錯体はO,O錯体であることが確認された。

O錯体およびN錯体のシグナル強度を $S_{1,O}$, $S_{1,N}$ とすると、各微視的錯体の安定度定数 $K_{1,O}$, $K_{1,N}$ はシグナル強度比を用いて以下のように表現できる。



$S_{1,O}/S_0$, $S_{1,N}/S_0$ を $[\text{L}]$ に対してプロットし、直線の傾きからO錯体およびN錯体の微視的安定度定数を決定した(Table)。さらにこれらの錯体安定度定数値と配位子中のイミノ基数の関係をFig.5に示す。イミノ基数の増加の影響をあまり受けていない K_2 および $K_{1,O}$ に対して K_1 および $K_{1,N}$ ではその影響は大きい。前者は架橋酸素原子の塩基性の増大のため錯生成定数は微増するにとどまっているが、後者では配位原子で

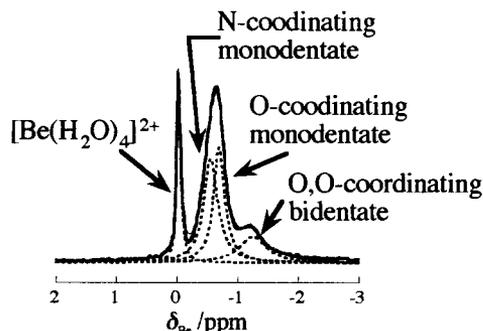


Fig. 4 ^9Be NMR spectrum of Be^{2+} - $\text{cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ mixture solution (pH 2.5, $-2\pm 1^\circ\text{C}$).

Table Logarithmic microscopic stability constants for the interaction of $cP_3(NH)_n$ ($n=1\sim 3$) anions with Be^{2+} ion.

Ligand	$\log K_1$	$\log K_2$	$\log K_{1,O}$	$\log K_{1,N}$
$cP_3(NH)$	2.8	—	2.7	2.0
$cP_3(NH)_2$	3.3	1.1	3.1	3.0
$cP_3(NH)_3$	3.9	1.2	3.1	3.9

あるイミノ窒素原子そのものが増加するために、錯生成定数が大きく増大すると考えられる。以上の結果から、本錯生成系におけるN錯体および分子間O,O錯体の存在を定量的にも明らかにすることができた。

【総括】本研究における $Be^{2+}-cP_3(NH)_n^{3-}$ ($n=1\sim 3$) 錯生成系において、化学的類似性が期待される Al^{3+} イオンと同様、HSAB理論による単純な予測に反し、Be-N配位構造が確認された。一方、多座錯生成挙動においては分子内錯体を形成しないなど相違点が多く、環状イミド三リン酸イオンの多座錯生成挙動は配位子-金属イオン間の立体的適合性が支配的である。すなわち分子中央部に架橋窒素原子が密集しているため、小さなイオン半径を持つ本質的にハードなカチオンのみ架橋窒素原子に配位し、逆に遷移金属イオン等のソフトなカチオンは非架橋酸素原子のみに配位すると考えられる。また、 Be^{2+} イオンは半径が小さいため、 $cP_3(NH)_3$ 分子中の3個の等価な非架橋窒素原子に同時に配位せず、 $Al^{3+}-cP_3(NH)_3^{3-}$ 錯生成系で見出されたクラウン状の分子内三座錯体は形成しないと考えられる

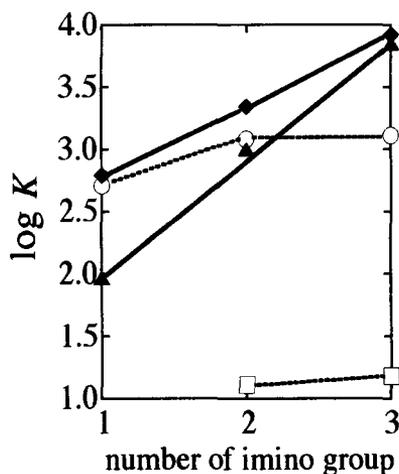


Fig. 5 Plots of $\log K$ vs. number of imino groups (○; $\log K_{1,O}$, ▲; $\log K_{1,N}$, ◆; $\log K_1$, □; $\log K_2$).

1) Andrew E. Derome, *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, 1st edn, Chap. 7.6, Pergamon Press Ltd., Oxford (1992).

Andrew E. Derome, 化学者のための最新NMR概説 第一版, 7.6章, 化学同人, 1991

NMR によるフェレドキシン溶液構造の決定と FNR 分子認識機構の解明

加藤悦子¹、手島圭三²、栗栖源嗣³、楠木正巳³、長谷俊治³、山崎俊正¹
(農水省・生物研¹, 広大², 阪大・蛋白研³)

Identification of the FNR Binding Surface of Ferredoxin by Heteronuclear NMR Spectroscopy

Etsuko Katoh¹, Keizo Teshima², Genji Kurisu³, Masami Kusunoki³,
Toshiharu Hase³ and Toshimasa Yamazaki¹

¹National institute of agrobiological Resources,

²Hiroshima University, ³Osaka University

Three-dimensional solution structure of ferredoxin (Fd) from maize leaf was determined by NMR spectroscopy. The structure consists of four-stranded mixed β -sheet, two-stranded antiparallel β -sheet and three α -helices. The structure retains a similar folding to other structurally characterized plant-type [2Fe-2S] ferredoxins. The interacting sites of Fd in solution were analyzed by NMR chemical shift perturbation upon complex formation with ferredoxin-NADPH⁺ reductase (FNR). Examination of chemical shift changes in the course of titration with FNR revealed that the stoichiometry of the Fd/FNR complex is 1:1. Large chemical shifts change occurred in the regions near Asp65 and the C-terminus when FNR was titrated into Fd. Our experimental results are indicated that both electrostatic and hydrophobic force are important for complex formation of Fd/FNR.

[緒言]

高等植物やらん藻の電子伝達タンパク質フェレドキシン(Fd)は、光合成電子伝達系の光化学系I複合体から電子を受け取り、フェレドキシンNADP⁺還元酵素(FNR)等の還元酵素に電子を受け渡す働きをしている¹。このような生体内電子伝達反応は高い反応効率と特異性を持つ。その要因として酸化還元中心の電位とともに、反応に関与する蛋白質間の相互作用が重要であると考えられる。タンパク質相互作用に関して多くの研究が行われているが、Fd/FNR複合体形成機構を直接的に観測するFd/FNR複合体の高次構造についての報告はない。本研究では、とうもろこしFd²の溶液構造を解明するとともに、NMR法を用いて、FdのFNRによる滴定実験を行い、FdのFNR認識部位の特定を行った。

キーワード：フェレドキシン、フェレドキシン NADP⁺還元酵素(FNR)、NMR、複合体

かとう えつこ、てしま けいぞう、くりす げんじ、くすのき まさみ、はせ としはる、
やまざき としまさ

[実験]

^{15}N 標識および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した Fd タンパク質および未標識 FNR タンパク質は大腸菌を用いた系により大量合成した。NMR 測定には 1.4mM の Fd タンパク質を水溶液に溶解し NaCl (0.1 M), NaH_2PO_4 (50 mM), NaN_3 (2mM) により pH 7.1 に調整したものをを用いた。NMR による滴定実験は、 ^{15}N -Fd 溶液に FNR を一定量ずつ加え ^{15}N -HSQC 測定により行った。すべての NMR 測定は、Bruker DMX750 を用い 20°C で行った。ディスタンスジオメトリー(DG)法と分子シュミレーション(SA)法を併用した構造計算は XPLOR3.1 を用いて行った。

[結果と考察]

Ser38-Ala48 および Thr76-Thr78 の領域は[2Fe-2S]クラスターに近接する部分であり、クラスターの Fe の常磁性の影響によりシグナルが広幅化し観測できなかった。この領域を除き、すべて (98 残基のうち 85%) のバックボーンの帰属を行うことができた。NMR 測定により得られた束縛条件から、DG/SA 法を用いた構造計算により Fd タンパク質の高次構造を解明した。Fd は 4 つの β -strand (β 1:3-9, β 2:12-18, β 3:48-51, β 7:85-88)から形成される平行/逆平行 β -sheet と短い 2 組の β -strand (β 4:56-57, β 6:80-81)そして β 3:48-51, β 5:73-75)から形成される逆平行 β -sheet そして 3 本の α -ヘリックス(α 1:24-34, α 2:66-70, α 3:92-96)から形成されていることが分かった (図 1)。この構造は、他の植物由来の Fd とほぼ同様のホールディングであった。次に、Fd の FNR との結合領域を明らかにするために NMR による滴定実験を行った。その結果、Fd と FNR の複合体形成比は 1:1 であることが明らかとなった。また、大きな化学シフトの変化は、Asp65 近辺および C 末端領域であった (図 1)。特に極性残基(Arg40, Asp60, Asp65, Asp66)が大きくシフトしていることから、静電的相互作用が Fd/FNR 複合体形成に重要であることが分かった。この結果は、これらの残基が FNR の極性残基(Glu306, Lys27, Lys82, Lys85)と空間的によく対応していることから示唆される。その他、疎水性の残基(Tyr37, Tyr63, Leu64, C-末残基)も大きくシフトしていることから、Fd/FNR 複合体形成には静電的相互作用と同時に疎水的相互作用が重要であることが明らかとなった。

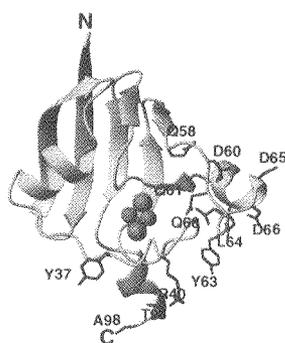


Figure1 NMR solution structure of Fd. Side chains of residues displaying large chemical shift changes ($\Delta\delta > 0.1\text{ppm}$) upon complex formation with FNR are shown in stick models.

References

- 1 Stults, C. L., Das, K. K., Kyle J. W., Chon, H. C., Schaeper, R. J., and Basu, S. (1987) *Methods Enzymol.* **138**, 575-607.
- 2 Kimata, Y. and Hase T. (1989) *Plant Physiol.* **89**, 1193-1197.

多次元NMR法による2量体型不凍タンパク質の機能解析

(北海道工業技術研究所、*富山医科薬科大学)

三浦和紀*、扇谷 悟、星野 保、三浦 愛、近藤英昌、○津田 栄

NMR Analysis of Antifreeze Protein Intramolecular Dimer: Structural Basis for the Improved Activity (Hokkaido National Industrial Research Institute, AIST, MITI) Kazunori Miura, Satoru Ohgiya, Tamotsu Hoshino, Ai Miura, Hidemasa Kondo, and ○Sakae Tsuda

The structure of a new antifreeze protein variant RD3 from antarctic eel pout (*Rhigophila dearborni*) with enhanced activity has been determined for the first time by nuclear magnetic resonance spectroscopy. RD3 comprises a unique translational topology of two homologous type III AFP globular domains, each containing one flat ice binding plane. The two ice-binding planes are located laterally with the N-domain plane located about 3.5 Å "behind" that of the C-domain, and with an angle of 32° +/- 12° between the planes. These results can be interpreted by a mechanism that the C-domain plane of RD3 binds first to the ice {10-10} prism plane in the <0001> direction, which induces successive ice binding of the N-domain in the <0101> direction. The cooperative ice binding of the two domains of RD3 is thought to be crucial for the significant enhancement of antifreeze activity.

[序] 不凍タンパク質による氷結晶成長阻害は、低温環境下に生息する動植物が凍結から身を守るために備えている極めて特異な生体防御機能である。近年、アミノ酸組成の異なる様々なタイプの不凍タンパク質が我々の身近にある魚類、越冬中の昆虫（幼虫）、冬野菜等の組織液から続々と発見されているが、その一方でそれら不凍タンパク質が有する氷結晶成長阻害機構の解明は進んでいない。その理由は、零度C以下で生成する氷の濃度や不凍タンパク質1分子当たりに結合する氷結晶濃度の定義が困難なこと、氷生成に関する結晶学的理解が不充分であることから、例えば不凍タンパク質がもたらす非直線的な水の凝固点降下を酵素反応速度論等により解釈できないためである。我々は、天然の不凍タンパク質の構造と機能の相関解明とその結果に基づく高機能型不凍バイオ物質の工業利用を目指して、これに必要なNMR・X線研究を展開しようとしている。本講演では、1995年に南極魚の体液から発見された2量体型タイプIII不凍タンパク質(RD3)[1]のNMR解析結果について報告する。

[実験] 遺伝子大量発現システムを構築してRD3の非ラベル体、¹⁵N-ラベル体、及び¹³C/¹⁵N-ラベル体を発現・精製した[2]。1)微量浸透圧計, 2)温度制御機能(低温域)付き偏光顕微鏡, 3)ペルチェ型凝固点観測モニターにより、精製RD3の不凍活性を測定した。

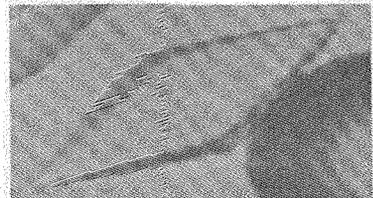


図1. Bipyramidal ice crystal with RD3

キーワード：多次元NMR、不凍タンパク質、3次元構造、同位体ラベル、遺伝子発現；研究者名：みうらかずのり（生研機構派遣研究員）、おおざやさとる、ほしのたもつ、みうらあい、こんどうひでまさ、つださかえ

NMR実験は4°Cで行い(一部常温)、測定装置にはバリアン社製UNITY-Inova500スペクトルメーター(4channel, x,y,z PFG ProbeHead)を用いた。主として異種核相関3次元NMRの実験手法(HNCACB、CBCACONNH、HC(CO)NH、HCCH-TOCSY、¹⁵N-edited TOCSY/NOESY、HNHA)によりRD3の全ての¹H,¹³C,¹⁵N-NMR信号の帰属を行った[2]。また主鎖HN結合ベクトルのNMR緩和時間(T₁, T₂, NOE)を測定した。これら取得データの解析はSGI O²ワークステーション上で行い、数値演算処理にはNMRPipe[3]およびin-houseプログラム群をNMR信号データベース作成には主としてPIPP[4]プログラム群を用いた。構造計算にはX-PLOR3.851とin-houseプログラム群を用い構造評価には主としてvadar[5]とProcheck[6]を用いた。1気圧下に生成する六方晶型氷結晶(I_h)は東京工業大学大学院特別研究員の伊藤英之助博士より頂いた単位格子座標を基に必要な大きさの結晶面の座標を作成した。分子の描画と氷結晶面-RD3間ice-matching解析はInsightI(Molecular Simulations Inc.)を用いて行った。

[結果] 図2に、RD3の不凍活性(凝固点降下度)をタイプIII不凍タンパク質の単量体(monomer)のものと比較した結果を示す。RD3はmonomerが連結部位を経て2個結合しただけの不凍タンパク質である。従ってその不凍活性はmonomerの2倍になると単純に予想された。しかしながら、特に低濃度域のタンパク質濃度(0~0.5mM)においてRD3の不凍活性はmonomerに比べて6倍にもなることが見出された。

RD3の不凍機能を詳細に調べるために、その氷温付近(4°C)でのNMR構造の決定を行った。RD3は二つの球状ドメイン(N末端側とC末端側)が9残基の短い連結部位により繋がった立体構造を

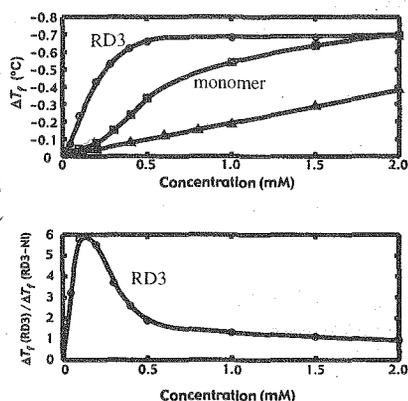


図2. Freezing point depression by type III AFP monomer and RD3. The linear profile is obtained for hen egg lysozyme.

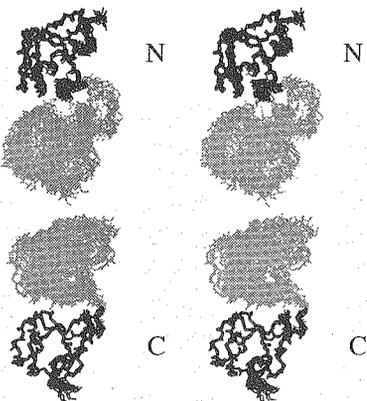


図3. Superpositions of 40 structures of RD3. When they are superposed for one domain, the counter domain are dispersed.

形成することが見出された(図3)。Nドメイン(res.1-64)とCドメイン(res.74-131)の各々の原子座標間RMSDは0.49と0.43でありPhi/Psi角度はRamachandran Plotの良好な範囲にあった。連結部位(res.65-73)のRMSDは0.66°であり特定の立体配置を有しこれが繋ぐ二つの球状ドメインの相対配置を特定の範囲内で変化させるよう働くことが示された。このような性質はカルモデュリン[7]等に見出されるものと似ていると考えられた。

図4にRD3の立体構造を示す。NドメインとCドメインは短い8本の β -sheet (β)と1本の α -helixを含む相同なドメイン構造を形成することが明らかになった。Nドメインの β 2- β 3、 β 6- β 7を含む領域とCドメインの β 10- β 11、 β 14- β 15を含む領域は分子内対称階層構造あるいは"pretzel fold"と呼ばれるタイプIII不凍タンパク質に典型的に見られる構造モチーフである。このモチーフの表面に配置されるアミノ酸残基の極性基が、氷結晶との水素結合に関与すると考えられた。

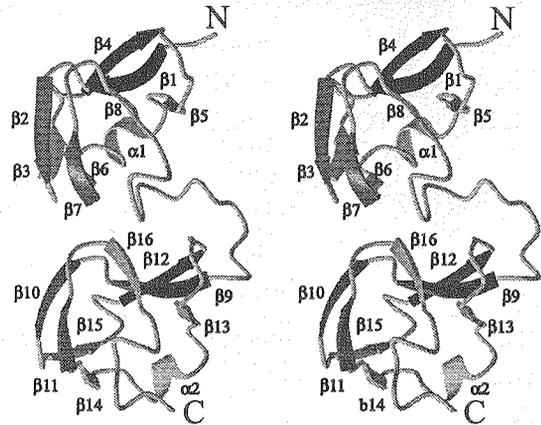


図4. The ribbon model of the average minimized structure of RD3.

上記の極性基のpretzel fold上での配置を示したのが図5である。図中の四角は、これら極性基を含む平面を表す。つまり、RD3は、分子表面上に極めて平らな面を形成する極性基を有すると言える。これら極性基の空間配置はちょうど6方晶型の氷結晶 (I_h : c-axis=7.361、a-axis=4.507) のプリズム面 (例: $\{10-10\}$ 面) 上の酸素原子の配置と一致するため、これら2つの面がRD3の氷結晶結合面であると結論付けられた。CドメインとNドメインに形成された2つの氷結晶結合面の相対配置を調べると前者は後者よりも約3.5前方に位置していることが分かった。このことは、前者が先に氷結晶面に結合し、これに続いて後者の面の氷結晶結合が起こることを示唆している。一方、40個のNMR構造について、2つの氷結晶結合面のなす角度を見積もると $32^\circ \pm 12^\circ$ であることが見出された。Cドメインの氷結晶結合面中に1列に並んでいるThr88、Ala86(CO)、Gln114の酸素原子が氷結晶 $\{10-10\}$ 面の $\langle 0001 \rangle$ 方向の酸素原子と水素結合するようなドッキングをコンピュータ上で行った場合、 32° の角度をなすNドメインは同じ氷結晶 $\{10-10\}$ 面の $\langle 0101 \rangle$ 方向の酸素原子とドッキングすることが見出された。即ち 32° の角度をなすCドメインの氷結晶結合はNドメインを氷結晶表面に近づけ結合を誘発する協同的效果をもたらすものと考えられた。

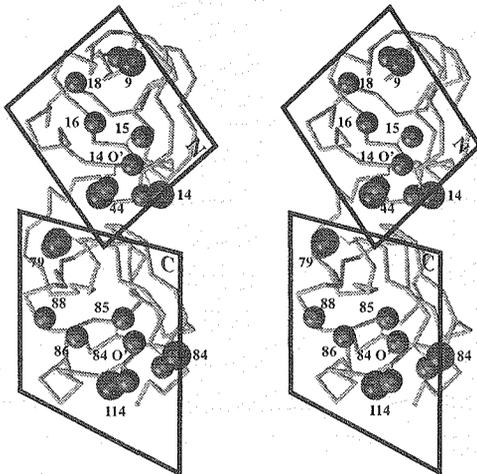


図5. Shown on the ice-binding planes are all polar atoms involved in ice-binding. The two planes located laterally.

RD3が氷結晶と結合する際に、NドメインとCドメインの氷結晶結合面が同一平面上に配置する性質を有するか否かを40個の算出構造の中の両ドメインの相対位置とNH結合ベクトルの¹⁵N-NMR緩和時間を調べることにより検討した。図6に示す通り、2つの氷結晶結合面が同一平面上に並ぶ構造が算出されていることが見出された。また、両ドメインはほぼ同一の order parameter (S^2 : 平均値は0.84 +/- 0.08 (N)と0.87 +/- 0.08 (C))を有し連結部位はこれよりも高い運動性を有する (S^2 : 平均値0.60 +/- 0.15)ことが示された。

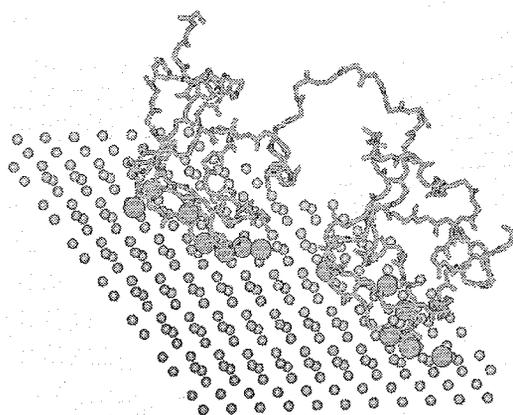


図7. The ice-docking model of RD3.

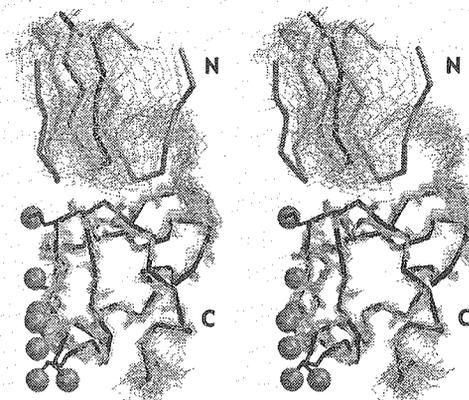


図6. Superpositions of the 40 structures of RD3 on the C-domain. Solid lines of the N-domain show allowed range of this domain's movement by flex. linker.

本研究は、不凍タンパク質RD3が極性残基を適正に配置した2枚の平面を有し、それらが一つの氷結晶プリズム面と特異的に結合する能力を有することを明らかにした。不凍タンパク質による水の凝固点降下は、氷結晶面に結合した不凍タンパク質間のすきまに湾曲氷結晶面が生成されることにより起こると考えられている(ケルビン効果[8])。RD3の2枚の氷結晶結合はこの湾曲氷結晶面の効率的な発生をもたらすものと我々は推察している[9]。

参考文献

1. Wang, X., DeVries, A. L., and Cheng, C. H. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1247, 163-172.
2. Miura, K., Ohgiya, S., Hoshino, T., Nemoto, N., Nitta, K., and Tsuda, S. (2000) *J. Biomol. NMR*, 16, 273-274.
3. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) *J. Biomol. NMR*, 6, 277-293.
4. Garrett, D.S., Powers, R., Gronenborn, A. M., and Clore, G. M. (1991) *J. Magn. Reson.*, 95, 214-210.
5. Wishart, D. S., Willard, L., Richards, F. M., and Sykes, B.D. VADAR v.1.2 (Univ. of Alberta, 1994)
6. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283-291.
7. Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C.B., and Bax, A. (1992) *Science*, 256, 632-638.
8. Wilson, P. W. (1994) *Cryobiology*, 31, 406-412.
9. Miura, K., Ohgiya, S., Hoshino, T., Nemoto, N., Suetake, T., Miura, A., Spyropoulos, L., Kondo, H., and Tsuda, S. (2000) *J. Biol. Chem.* on revision.

Grb2の構造と機能

(北大・薬¹, CREST², 都臨床研³) 1, 2○稲垣冬彦, 1小椋賢治,
2湯澤聡, 2西田元彦, 2川崎政人, 3畠中秀樹

Structure and function of Grb2 (Hokkaido University¹, CREST², TMIMS³)

1, 2○F. Inagaki, 1K. Ogura, 2S. Yuzawa, 2M. Nishida, 2M. Kawasaki
3H. Hatanaka

Grb2 is an adaptor protein consisting of a SH2 domain flanked by two SH3 domains, which mediates signal transduction from growth factor receptors to Ras. We determined the structures of individual domains complexed with the target peptides by NMR and elucidated the molecular mechanism for specific and general recognition of the target peptides. We also studied the solution structure of Grb2 by NMR and small angle X-ray scattering, which clearly shows that Grb2 in solution is flexible around a linker connecting SH2 and cSH3 domains. Using bivalent consolidated SH3 binding peptides, we showed that flexibility is important for exerting its biological functions. In addition, we determined the structure of Vav nSH3 and its complex with Grb2 cSH3 by NMR and X-ray crystallography, respectively. In the complex, proline rich region in Vav nSH3 is bound to its PRR binding region and is simultaneously recognized by Grb2 cSH3 in canonical manner.

はじめに

Grb2はSH3-SH2-SH3のドメイン構造を持つ。細胞質内でSosと結合することにより、細胞成長因子レセプターよりRasへのシグナルを仲介するアダプター蛋白質である。このシグナル伝達経路は細胞増殖の主要な経路として認められている。Sos以外にもGrb2は多くの標的蛋白質を持ち、多様なシグナル伝達を仲介する。例えば、Grb2は血球系の細胞に特異的に発現しているVavと結合する。この結合はGrb2のcSH3とVavのnSH3同士の結合という点でユニークである。Grb2はミクロドメインに存在するLATとSH2を介して結合することによりGrb2-Vav複合体をミクロドメインに局在化させる。ミクロドメインへの局在化は血球細胞の増殖や分化に必要なVavのチロシンリン酸化に必須な過程と考えられている。

Grb2 SH2によるチロシンリン酸化ペプチドの認識

Grb2のSH2とShc由来のリン酸化ペプチド(DDPSpYVNVQNLDK)の複合体の立体構造をNMRを用いて解析し、特異的認識機構について明らかにした。Grb2のSH2はリン酸化チロシンC末端側2番目の残基にAsnを要求する点でSrc等とは異なる認識が期待される。Grb2SH2は塩基性残基で裏打ちされた深いポケットを持ち、このポケットにリン酸基は結合している。この様なリン酸化チロシンの認識はSH2に共通している。一方、SrcやPLCγではリン酸化チロシンC末端側の配列は伸びきった構造を取ってSH2上に結合しているのに対し、Grb2SH2では、ShcペプチドはpYVNVのコア構造部分でターン構造を取っている。Grb2SH2のみに存在するTrp121とShcペプチドとの立体障害のため、ペプチドは伸びた構造をとって結合できずにターン構造を取る。このターン構造はペプチド2番目のAsn側鎖とGrb2SH2主鎖との間の水素結合形成によりさらに安定化される。

Grb2 SH3によるプロリンに富むペプチドの基質認識

Grb2のnSH3, cSH3を対象とし、SH3によるプロリンに富むペプチドの基質認識

を明らかにする事を目的とした。SosのC末端に含まれるプロリンに富んだ配列のうち、VPPペプチド (VPPPVP \overline{P} RRR) はnSH3に、またファージディスプレイより見いだされたRHYペプチド (RHYRPL \overline{P} PLP) はcSH3に強く結合する。そこで、nSH3とVPPペプチド、cSH3とRHYペプチドの複合体について、NMRを用いて立体構造を決定し、結合基質認識の機構について検討した。VPPおよびRHYペプチドはいずれも3回ラセン軸を持つ左巻きのポリプロリンヘリックス構造を取り、SH3上の保存された芳香族残基とループにより形成される浅い溝に結合し、非プロリン残基が特異的にSH3上の残基と相互作用していた。

以上、SH2、SH3いずれの例も、結合ペプチドは一般的な結合モチーフと結合の特異性を与える制御部位から構成されていることを示している。

Grb2の動的構造と機能

Grb2のnSH3とcSH3はそれぞれ比較的短いリンカーでSH2と結ばれている。X線結晶構造解析の結果によれば、二つのSH3は空間的に近接し、Grb2全体はコンパクトな構造を取っている。Grb2はSos以外にもダイナミン、N-WASP、シナプシン等多くの標的タンパク質と結合する。二つのSH3が標的タンパク質のプロリンに富む領域を如何に認識するか興味深い。我々はインタクトなGrb2を用い、動的挙動について検討した。全重水素化Grb2を調製し、三重共鳴三次元NMRの測定を行ない、リンカー部分も含め95%以上の残基について主鎖アミドグループ(1H, 15N)の帰属を確立した。この帰属に従い、15N核の緩和時間及びNOEの測定を行い、Grb2の運動性について調べた結果、SH2とcSH3の間のリンカーの運動性は高いことが明らかとなった。溶液中でGrb2のSH2とcSH3の間のリンカーは運動性に富み、Grb2分子内でnSH3とcSH3は種々の相対配置を取りうることを示している。実際、SosとRHYペプチドを1-9残基の長さのリンカーでつなげたペプチドはnMオーダーでGrb2に結合することを明らかにした。それぞれのペプチドは μ Mオーダーの結合を示すことより、二価でGrb2はペプチドに結合することは明らかである。さらにリンカーの長さの異なるペプチドでも二価で結合することが可能なことより、Grb2は二つのSH3の相対配置をかえてペプチドに結合することがわかる。

Vav nSH3の構造とGrb2 cSH3との結合

Vav nSH3は配列内にプロリンに富んだ配列 (PPPPG) を持つ。NMRにより溶液内の構造を検討した結果、PRR以外に存在するプロリンのシス、トランス異性に基づく構造多型を取ることを明らかにした。このProをGlyに置換した変異体を作製し、トランス型に固定したVavを調製した。変異体について構造を決定した結果、PRRはRTループに存在しVav nSH3自身にくわえ込まれていた。さらに、Grb2 cSH3との複合体について結晶構造解析をおこなった。PPPPGはポリプロリンヘリックス構造を取り、単体同様、ヘリックスの頂点をVavの疎水性ポケットに結合するとともに、底面をGrb2 cSH3に提示していた。Grb2 cSH3によるPRRの認識はSem5によるPRR認識と類似していた。Vav nSH3はGrb2 cSH3を結合するために特化したSH3と考えられる。

Grb2, Src homology, Vav, SAXS

いながきふゆひこ, おぐらけんじ, ゆざわさとる, にしだもとひこ, かわさきまさと, はたなかひでき

ポスター発表要旨

高圧NMR法による超臨界二酸化炭素中の溶質-溶媒相互作用
 (東北工研・CREST) ○金久保光央・相澤崇史・劉子敬・生島豊

Solute-Solvent Interactions in Supercritical Carbon Dioxide by High-Pressure NMR Spectroscopy
 (Tohoku National Industrial Research Institute and CREST)

○Mitsuhiro Kanakubo, Takafumi Aizawa, Chee C. Liew, and Yutaka Ikushima

We have recently developed a temperature-controllable high-pressure cell for the precise measurements of supercritical solutions. By using the high-pressure cell, ^1H and ^{19}F chemical shifts of some simple molecules were precisely determined in sub- and supercritical carbon dioxide at several temperatures up to 30 MPa. The chemical shifts at infinite dilution, where the bulk magnetic susceptibility contribution was subtracted, were shifted to higher frequency with increasing density of carbon dioxide.

【序】近年、水や二酸化炭素をはじめとした超臨界流体は環境調和型プロセスの媒体として注目を集めている。超臨界流体の特徴的な性質は、温度、圧力といったマクロ的な外部操作により、溶媒機能を制御できることである。しかし、超臨界流体のミクロ的な描像は未だ十分に明らかとなっていない。本研究では、超臨界二酸化炭素中に溶解した溶質分子の化学シフトの溶媒密度依存性を正確に測定し、溶質分子周りの溶媒和構造に関して検討を行った。

【実験】高圧NMR分光システムおよび流通式高圧セルの模式図を Fig. 1 および Fig. 2 にそれぞれ示す。試料溶液は、磁石外部の溶解セルで調製後、高圧セル内に流入させた。試料濃度は調製後、観測されたピーク面積から、あらかじめ作成しておいた検量線を用いて決定した。高圧セルはセラミクスチューブ(外径 10 mm ϕ , 内径 5 mm ϕ)を用い、スペーサーを挿入して試料溶液(約 0.3 cm³)を観測領域にのみ設置した。分光器(Varian Inova 500)既存のプロープ下部からの乾燥空気による温度制御に加え、高圧セル上部にヒーター線を非誘導的に巻き付け、セル内の温度を ± 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 以内で制御した。

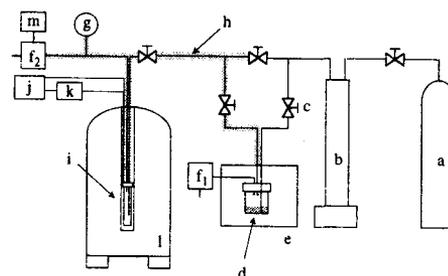


Figure 1. Schematic diagram of the high-pressure NMR system. (a) CO₂ cylinder, (b) syringe pump, (c) high-pressure valve, (d) mixing vessel for preparing the solutions, (e) oven, (f) back-pressure regulator, (g) pressure gauge, (h) insulation jacket, (i) high-pressure cell, (j) dc power supply, (k) indicator of thermocouple, (l) superconducting magnet, and (m) recorder.

キーワード：超臨界二酸化炭素・高圧NMR・溶質-溶媒相互作用

かなくほ みつひろ・あいざわ たかふみ・りゅう ちいちゃん・いくしま ゆたか

【結果と考察】典型的な例として、 H_2O と $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ の ^1H 化学シフト $\delta(^1\text{H})$ および CF_4 の ^{19}F 化学シフト $\delta(^{19}\text{F})$ の密度依存性を Fig. 3 に示す。溶質濃度は無限希釈値とみなせるので、溶液の密度は純粋な二酸化炭素密度とした。また、化学シフトは二酸化炭素のモル磁化率 ($20.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) を用いて磁化率の補正を行い、密度がゼロの外挿値を基準として表わした。

Fig. 3 から化学シフトは溶媒効果により密度増加にともない3次曲線的に高周波数側へと移行することが明らかとなった。 H_2O では、化学シフトが $\rho < 0.3 \text{ g cm}^{-3}$ で急激に増加し、臨界密度 (0.466 g cm^{-3}) 近傍の中間密度領域でなだらかとなり、再び、 $0.65 \text{ g cm}^{-3} < \rho$ で増加し始めることが確認された。一方、相互作用が比較的弱いと考えられる CF_4 では、 H_2O の場合ほど顕著な傾向は見られなかったが、 $0.80 \text{ g cm}^{-3} < \rho$ で立ち上がりが見測された。

高密度領域での動径分布関数が密度に依存しないと仮定して、化学シフトから溶質分子周りの溶媒の過剰局所密度 (ρ_l^{ex}) を算出した結果を Fig. 4 に示す。¹⁾ 約 0.3 g cm^{-3} を中心として、溶質分子周りに過剰の溶媒分子が集合していることが明らかとなった。

発表では、溶媒和構造の温度依存性ならびに異方性効果についても検討を行う。

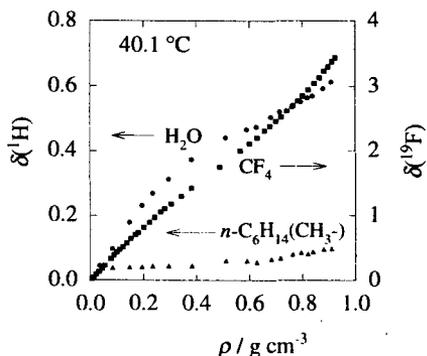


Figure 3. Density dependence of chemical shifts of H_2O , $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, and CF_4 in CO_2

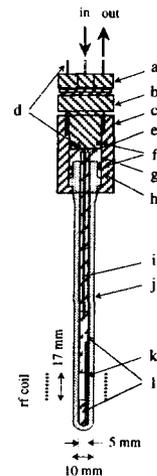


Figure 2. Side cut-away view of high-pressure on-line NMR cell. (a) 1/16 in. Swagelok fittings, (b) Ti-Al valve stem, (c) Ti-Al valve seat, (d) thermocouple, (e) 1/16 in. stainless steel outlet tube, (f) Hyker O-rings, (g) Teflon cushion, (h) Teflon ring, (i) 1/16 in. Ti inlet tube, (j) ceramic tube, (k) TMS-C6 D6 reference, and (l) Teflon spacers.

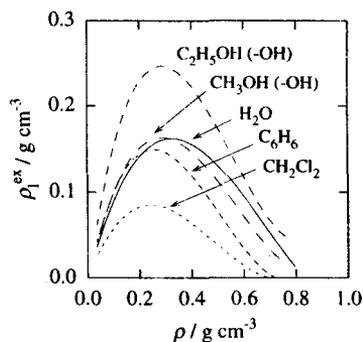


Figure 4. Density dependence of ρ_l^{ex} around various solute molecules in CO_2 at $40.1 \text{ }^\circ\text{C}$

1) M. Kanakubo, T. Aizawa, T. Kawakami, O. Sato, Y. Ikushima, K. Hatakeda, and N. Saito, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 2757 (2000).

T₂測定時における温度上昇

北大院工 °平沖敏文、堤 耀広

RF Heating in CPMG experiments

T. Hiraoki and A. Tsutsumi

Department of Applied Physics, Hokkaido University, Sapporo

We have investigated the relationship between the temperature change and the pulse power, π pulse interval, and the number of loop in CPMG method at a constant temperature. The sample temperature directly measured by a thermocouple was found to increase with the number of loop under the hard pulse, and the display temperature of the spectrometer also less increases. This results in deducing a incorrect T₂. Such heating effect could be minimized by the reduced pulse power and the accurate T₂ was obtained.

RFパルス照射による試料温度の上昇は、異種核デカップル、TOCSY/ROESY、交差分極等で観測され、これを低減するため多くの複合パルス系列が考案されている。溶液用プローブでは、表示温度は試料管の直下の熱電対により検出された試料管を流れる気体の温度であり、試料温度そのものではない。パルス強度が大きい場合 DANTE のような RF パルス照射下では、温度制御された気体を流しても、誘電加熱により試料温度は上がるであろう。CPMG法は T₂ 測定のため広く用いられており、 π パルス間隔 (PI * 2) は電力増幅器の duty-cycle 等を考慮して、PI を π パルスの 50 倍以上とるように奨められている。ハードパルス ($\pi/2 = \sim 20 \mu\text{s}$) を用いて PI を 10ms 以下にして、数百 ms 以下の T₂ を CPMG 法で測定する場合、 π パルスのループ数が増えると表示温度が上昇し、正確な T₂ を求めることが出来ないことが分かった。本研究では CPMG 法による試料自体の温度上昇量を測定し、これとパルス幅、 π パルス間隔、ループ数との関係を調べ、温度上昇を軽減する方法を検討した。

実験

測定は主に FX270 (41MHz) 10 ϕ 多核プローブ (コイル長 2.0cm) を用い ²H を観測した。プローブの空気流量は約 15 L / 分である。他に、DSX300 (46MHz)、5 ϕ 多核プローブも用いた。試料は 2% 重水素化ベンジルアルコールを用い、5 ϕ 管の試料高は 2.2cm である。²H スペクトルは singlet であり、測定はすべて on resonance で行った。試料温度は上記試料に直接熱電対 (T) をさし込み測定し、分光計の表示温度はそのまま読んだ。熱電対の位置は RF コイル中央に調整した。空気は温度安定化装置を通して安定化し、試料の温度変化量は RF パルス非照射時

キーワード； CPMG, T₂, RF 照射加熱、パルス強度

ひらおき としふみ、つつみ あきひろ

には0.1K以下である。

結果と考察

Fig.1にCPMG測定時における試料の温度変化量と表示温度をloop数に対して示す($\pi/2=18\mu\text{s}$ (160W), $PI=2\text{ms}$, loop数=2~300, 積算回数=16, $\text{dum}=-1$, $\text{acq.delay}=1.0\text{s}$, $T_1=0.12\text{s}$ at 21.4°C)。loop数=50から温度が上がり始め、loop数=300で約1K上昇した。さらに、loop数=300の測定時間内(45s)に蓄熱効果のため約0.2K上昇した。一方、表示温度の上昇は0.4Kであった。PIを10msに長くすると、試料温度上昇は0.5Kに減少した。パルス強度を下げ、 $\pi/2=84\mu\text{s}$ ($\gamma B_1/2\pi=3\text{kHz}$, 10W)の場合、他の測定条件は上と同じで、loop数=300で0.2K上昇し、表示温度は0.1K上がった。PI=10msでは温度上昇は観測されなかった。

CPMG法により求めた T_2 プロフィールを(a) $\pi/2=18\mu\text{s}$ と(b) $84\mu\text{s}$ 場合についてFig.2に示す。 $PI=2\text{ms}$, loop数=2~124である。最終loop時でそれぞれの温度上昇量は0.2Kと0Kである。loop数が多くなると、(a)の強度が(b)の場合よりも徐々に増える。これは試料温度が上がり T_2 が長くなり信号強度が増加するためである。この場合データ点は単一の緩和曲線で合わせる事が出来ず、二個の T_2 (664ms, 116ms)が必要である。一方(b)のパルス幅が長い場合、単一の T_2 (121ms)で表される。これはHahn-echo法で求めた値と一致する。Hahn-echo法では、パルスがハードパルスでも温度上昇は観測されなかった。

以上の結果は、比較的短い T_2 をCPMG法で測定する場合、パルス強度、PI、ループ数をうまく選択しなければ、測定中に試料温度が上がりスペクトル強度が変化するので、誤った T_2 が得られる可能性があることを示している。正確な T_2 を求めるにはパルスパワーを下げて測定するかHahn-echo法を用いるのが良い。発表時には、塩を含む水溶液系や他の核(^1H , ^{13}C)の結果も示す予定である。

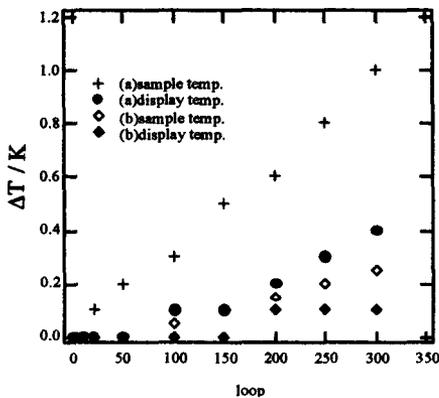


Fig.1 Temperature change against the number of loop in CPMG、(a) $\pi/2=18\mu\text{s}$, (b) $\pi/2=84\mu\text{s}$.

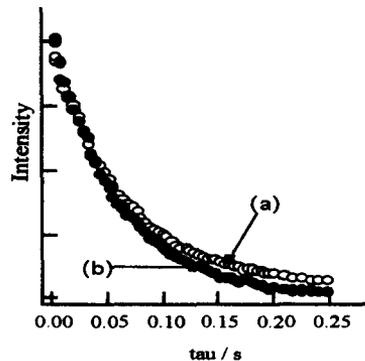


Fig. 2 Intensity profile in CPMG 21.4°C , $\text{tau}=PI \times \text{loop}$.

Drosophila Sex-lethal タンパク質の2タイプの RNA 認識

(東京大学大学院理学系研究科¹、千葉工業大学工学部²、神戸大学理学部³、生体分子工学研究所⁴)

○金仁実¹、武藤裕¹、伊藤拓宏¹、井上真¹、北村彩¹、Seung-Wook Chi¹、武田佳宏¹、河合剛太²、坂本博³、志村令朗⁴、横山茂之¹

TWO TYPES OF RNA RECOGNITION BY SXL RBD1-RBD2

(Dept. of Biophys. & Biochem., Univ. of Tokyo¹, Dept. of Ind. Chem., Chiba Inst. of Tech.², Dept. of Bio., Kobe Univ.³, Biomol. Eng. Res. Inst.⁴)

○KIM, I.¹, MUTO, Y.¹, ITO T.¹, INOUE, M.¹, KITAMURA, A.¹, CHI, S.-W.¹, TAKEDA, Y.¹, KAWAI, G.², SAKAMOTO, H.³, SHIMURA, Y.⁴ AND YOKOYAMA, S.¹

The *Drosophila* Sex-lethal (Sxl) protein plays key roles in the regulation of gene expression, such as the female-specific alternative splicing not only of the *transformer* (*tra*) pre-mRNA but also of its own pre-mRNA and the dosage compensation. The Sxl protein contains two RNA binding domains, RBD1-RBD2, which binds to the target RNAs for alternative splicing. Intriguingly, except for the Sxl binding site of *tra*, those of Sxl and *msl-2* contain an adenosine instead of a guanosine just prior to the polyuridine tract and we showed that the adenosine of the target RNA was specifically recognized by the Sxl RBD1-RBD2. Recently, we reported the crystal structure of Sxl RBD1-RBD2 complexed with *tra*-derived dodecamer (GU₂GUg). In the present study, we determined the NMR structure of the complex between the Sxl RBD1-RBD2 and the single-stranded RNA decamer, UAUg, derived from its own mRNA precursor. Compared with the crystal and the NMR structures, we showed that the Sxl RBD1-RBD2 used the different residues for the recognition of the adenosine and the guanosine, which were just prior to the polyuridine stretch in the target RNAs, GU₂GUg and UAUg, respectively. It is noteworthy that the Sxl RBD1-RBD2 recognize not the common sites of purine moiety but the specific sites, which are different between the adenosine and the guanosine moieties.

Drosophila melanogaster の Sex-lethal (Sxl) タンパク質は、*transformer* (*tra*) pre-mRNA の選択的スプライシング、自分自身の Sxl pre-mRNA の自己制御、dosage compensation などに重要な役割を担っている。Sxl タンパク質は、RNA 結合ドメイン(RNA binding domain; RBD)を2つもち、

キーワード：Sex-lethal. Polyuridine. Complex. Conformational change

著者ふりがな：きむいんしる。むとうゆたか。いとうたくひろ。いのうえまこと。きたむらあや。ちすんうく。ただだよしひろ。かわいごうた。さかもとひろし。しむらよしろう。よこやましげゆき。

特有の uridine-rich polypyrimidinetract (PPT) に直接結合することにより、遺伝子の発現を調整していることが知られている。Sxl タンパク質が結合する PPT 配列においては、PPT の 5'側の purine が結合の安定化に寄与している。tra の結合配列では guanosine が、tra 以外では adenosine が存在する。したがって、Sxl 蛋白質が、この 2 type の purine をどのような機構により pyrimidine と区別して認識しているかを調べることは大変興味深いことである。我々は、核磁気共鳴法 (NMR) を用いて、Sxl RBD1-RBD2 と その標的 RNA の一つの (UAU₈) との複合体の高次構造解析を行い、複合体の構造を決定した (Figure 1)。

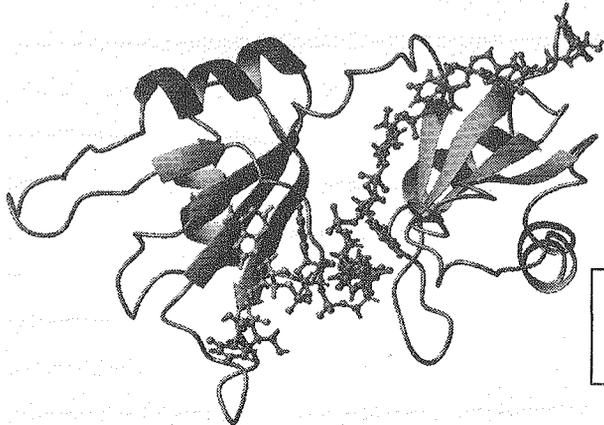


Figure 1

NMR structure of Sxl RBD1-RBD2•UAU₈

二つの RBD は一本鎖 RNA を挟むような形で認識し、RBD2 は 5'の UAU を、RBD1 は U2 から U8 までを主に認識し、また、U5 と U6 の認識には RBD1 と RBD2 がともに認識に関与していた。もっとも興味深いことは purine の認識である。Sxl タンパク質と tra 由来の RNA(GU₂GU₈) の結晶構造解析では、guanosine の 2-amino proton が Ala168 の主鎖の carbonyl group によって認識されていた (Figure 2)。しかし、今回得られた UAU₈ と Sxl タンパク質との複合体の NMR 構造では Ala168 はその向きを変え、Tyr93 の側鎖とともに methyl group による hydrophobic pocket を作り、adenosine の 2-proton を認識していることが示唆された。

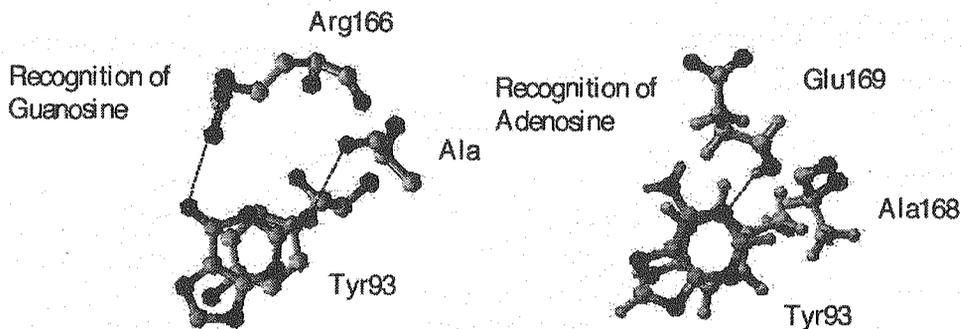


Figure 2 Two types of RNA recognition by Sxl RBD1-RBD2

Guanosine recognition in Sxl RBD1-RBD2•UGU₈ complex (left) and adenosine recognition in Sxl RBD1-RBD2•UAU₈ complex (right)

G 蛋白質共役型受容体(GPCR)と結合するペプチドリガンドの立体構造解析
 (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}、大瀧哲也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

Conformation of a peptide ligand bound to a G-protein coupled receptor

Hiroshi Inooka^{1,3}, Tetsuya Ohtaki², Osamu Kitahara², Takahisa Ikegami¹, Satoshi Endo¹,

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 I, Discovery Research Division² and Medicinal Chemistry Laboratories,

Pharmaceutical Research Division³, Takeda Chemical Industries Ltd.

Peptide hormones in the glucagon / secretin family elicit a wide array of physiological effects by binding to G-protein coupled receptors (GPCRs). Much work on the conformations of these peptide were directed towards studying the mechanism of their physiological effects and rational drug design by virtue of their specificity and high biopotency. Nevertheless, the active conformations of the peptides bound to the receptors have not been reported. We describe here the conformation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide PACAP(1-21)NH₂ bound to the PACAP receptor using the NMR method of transferred nuclear Overhauser effect (TRNOE) spectroscopy. Its N-terminal region (residues 3-7) forms a novel β coil structure, and create a cluster of hydrophobic residues that are essential for the receptor binding. In contrast, the C-terminal region (residues 8-21) adopts an α helix in resemblance to PACAP27 bound to the micelle.

GPCR のメンバーは数百種類以上を数え、それらはモノアミン類、グルタメート、プロスタグランジン、ペプチド、タンパク質のように多様なリガンドに対する受容体を含み、細胞内に種々の信号を伝達する。この中でグルカゴン・セクレチン受容体ファミリーに属するものは、PACAP、VIP、グルカゴン、セクレチンのようなペプチドホルモンに対して選択的な受容体である。これらのペプチドの立体構造は水溶液中ではみだれているが、疎水溶媒やミセル中で部分的に安定な立体構造を形成すると報告されている。この中で 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、副腎皮質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おこなう幅広い機能を有している。

我々は TRNOE 測定により C 末アミド化された 27 残基の天然のペプチドホルモン PACAP27 のかわりに C 末を切り縮めた PACAP(1-21)NH₂(PACAP21)の立体構造を PACAP 受容体に結合状態で決定した。TRNOE は巨大な

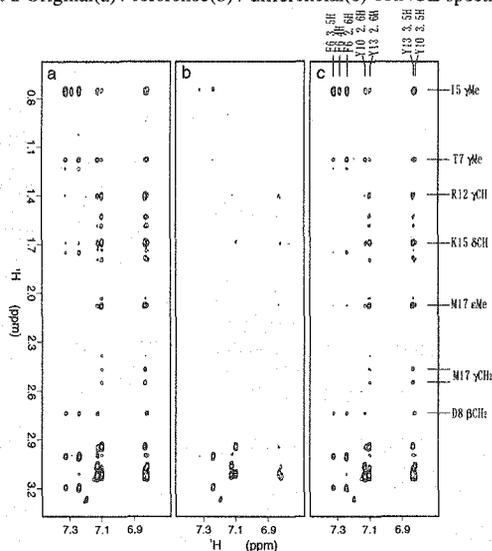
Key words : GPCR, PACAP, TRNOE, IRMA, β coil

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

タンパク質に結合した小さなリガンドの構造解析に広く用いられており、定量的な立体構造解析には速い乖離速度を必要とする。PACAP27 はあまりに小さい k_{off} (0.02 s⁻¹) と高親和性 ($K_d = 3.1$ nM at pH 6.3) を示すけれども、PACAP21 は TRNOE 実験に適する大きな K_{off} 値 (5,000 ± 1500 s⁻¹) と中庸の親和性 ($K_d = 18$ μM at pH 6.3) を有する。

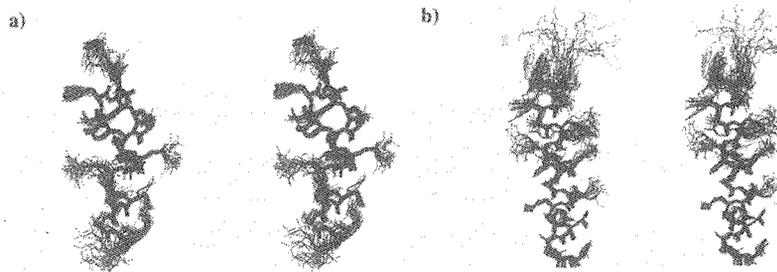
図 1 a は受容体と結合した PACAP21 において、近接した水素ペアに対して見いだされた TRNOE クロスピークを示している。親和性の強い PACAP27 を追加すると、これらのクロスピークは図 1 b に示すように受容体への競合的阻害により消失したが、これは TRNOE ピークが受容体に結合した PACAP21 の立体構造を反映していることを示している。他方でいくつかのクロスピークは PACAP27 の添加後も認められるが、それらは PACAP21 がフリーな状態で近接する水素ペアに生じる定常的 (steady-state) NOE である。したがって図 1 c に示す両者の差スペクトルが結合状態の立体構造を定量的に反映する真の TRNOE クロスピークを与えることになる。

Fig. 1 Original(a) / reference(b) / differential(c) TRNOE spectra



我々は TRNOE 実験から 387 個の距離制限を取り出し、受容体結合 PACAP21 の立体構造を X-PLOR の simulated annealing protocol を用いて IRMA 最適化を行い決定した。IRMA を用いるにあたり、受容体結合状態と非結合状態に相当する緩和行列の積に当たる項を補正項として追加した。実験から得た距離制限に対する計算構造の R 因子 (0.39) は立体構造決定の信頼性を示している。図 2 a に示すように受容体結合の PACAP21 の立体構造は N 末 C 末 1 残基ずつを除いて良く定まっている。PACAP21 の立体構造は N 端の extended 構造 (1-3 位)、type-II β ターン (3-6 位) と type-I β ターン (4-7 位) からなる N 末の β coil、及び C 末の α ヘリックス (8-21 位) という 3 つの 2 次構造から構成されている。構造比較のため DPC-micelle 結合の PACAP27 の立体構造も決定した (図 2 b)。

Fig. 2 The receptor-bound PACAP21(a) and the micelle-bound PACAP27(b)



今回初めて明らかになった PACAP の受容体結合構造では、ミセルや他の溶液系では flexible な N 末部位が特徴的な β coil を形成する点が興味深い。さらに、ペプチドリガンドが膜受容体への輸送される際、溶液-膜-受容体の 2step transition が提唱されているが、立体構造的にこの考えが妥当かどうか議論してみたい。

メチル化 DNA 特異的リプレッサー hMBD1 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、²熊本大・医) ○大木出¹、下竹敦哉¹、藤田直之²、
Jee Jun-Goo¹、池上貴久¹、中尾光善²、白川昌宏¹

**Structure of the methyl-CpG-binding domain of hMBD1 and its interaction
with methylated DNA**

○Izuru Ohki¹, Nobuya Shimotake¹, Naoyuki Fujita², Jee Jun-Goo¹, Takashi Ikegami¹,
Mitsuyoshi Nakao² and Masahiro Shirakawa¹

(¹Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology, ²School of Medicine, Kumamoto University.)

ABSTRACT

Human MBD1 is a methylation-dependent transcriptional repressor which correlates with alterations in chromatin structure and gene silencing and binds specifically to methylated DNA via a methyl-CpG-binding domain (MBD). We have determined the solution structure of the MBD of hMBD1 by multi-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. The ternary structure of the MBD of hMBD1 has a novel α/β sandwich structure. It consists of a four stranded anti parallel β -sheet and an α -helix packed approximately parallel to the β -sheet. Basic residues conserved in the MBD family are largely confined to one face of this fold and a flexible loop, which together form a large positively charged surface. DNA binding assay of the site-directed mutants and chemical shift changes that occur upon binding with a methylated DNA allowed us to identify this surface as the DNA interaction site.

多次元 NMR、構造解析、転写因子、メチル化 DNA、DNA 結合ドメイン、DNA 認識

おおきいずる、しもたけのぶや、ふじたなおゆき、ジージュンゲー、いけがみたかひさ、
なかおみつよし、しらかわまさひろ

脊椎動物の DNA には CpG 配列のシトシンの 5 位がメチル化修飾を受けた m⁵CpG 配列があり、その配列は近傍遺伝子の発現抑制、クロマチン構造の安定化や不活性化等、様々な働きに関与する。この m⁵CpG 配列は、約 70 アミノ酸残基から成る m⁵CpG 結合ドメイン(MBD)により特異的に認識される。現在までにこのドメインはMBDファミリーとして5種類のタンパク質 (MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2) 中に見つかっており、最近、MBD を持つリプレッサータンパク質 MeCP2 が進行性神経発達障害を主症状とする Rett 症候群の責任遺伝子産物であること、多くの変異がその MBD 部分にあることがわかり、DNA メチル化は臨床的な注目も集めている。

本研究で扱った human MBD1 は、体細胞中に広く存在する転写リプレッサータンパク質であり、N 末端側にある MBD を介し、*in vivo*, *in vitro* のどちらでもメチル化されたプロモーターに対し結合能を持ち、転写抑制を行う。我々は昨年度の NMR 討論会において、溶液 NMR の手法により MBD1 MBD の立体構造を決定したことを報告したが、今回は更に NMR を用いた DNA との複合体の解析と部位特異的変異体解析を行うことで、MBD とメチル化 DNA の結合様式に対する詳細なモデルを立てることができた。発表では、この MBD の DNA 認識機構について、更には MeCP2 の MBD の変異と Rett 症候群との関係について議論する予定である。

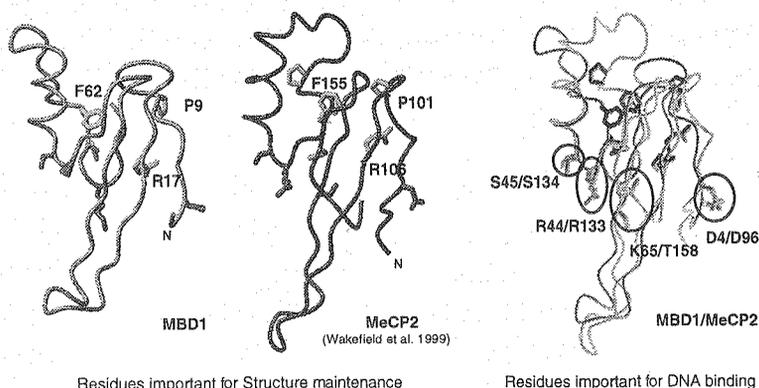


Figure1 Positions of Rett syndrome mutations.

Rett 症候群にみられる変異を構造上に示したもの。

Human Lysozymeの構造と運動に与える低温効果の解析

(北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻¹、富山医科薬科大学²、
千葉工業試験場³、北海道工業技術研究所⁴、バリアンジャパン⁵)

○久米田博之¹、三浦和紀²、小橋川敬博¹、岡 千寿³、
三浦 愛⁴、根本暢明⁵、新田勝利¹、津田 栄⁴

Low-temperature-induced effects in human lysozyme elucidated by three-dimensional NMR spectroscopy.

(Division of Biological sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University,
Faculty of Pharmaceutical Science, Toyama Medical and Pharmaceutical University,
Industrial Research Institute of Chiba Prefecture, Hokkaido National Industrial
Research Institute (HNIRI))

A variety of 2D and 3D-NMR experiments has been carried out to clarify the low-temperature effect on the structure and the dynamics of a human lysozyme, for which three-dimensional structure was determined by only X-ray crystallography. The full assignment of ¹H- and ¹⁵N-resonance of human lysozyme was completed at 4°C. It appeared that the α-proton chemical shifts of Asn66, Asn75, Leu85 are remarkably changed with decreasing temperature. The former two residues are located closer to the active site and Leu85 involved in the loop connecting the α-domain and β-domain. The data suggests that the lowering of the temperature specifically influence upon the structure of the deep cleft in the active site of the molecule.

【序】低温活性酵素は常温型酵素に比べて低温度域での比活性が高く活性化エネルギーが低いといった特徴を有している。このことは、低温活性酵素が常温型酵素よりも柔軟な構造を有することに起因すると考えられている。しかしながら、この仮定を証明し高機能型低温活性酵素を人工デザインするためのタンパク質高次構造解析に基づく研究は充分に行われていない。本研究では、ヒトリゾチームをモデルタンパク質として、その高次構造と運動が温度低下に伴いどのように変化するのかを多次元NMR法を用いて解析した。

【実験】ヒトリゾチームはメタノール酵母を用いた発現系を用いた[Oka C. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. (1999) Nov;63(11):1977-83]。¹⁵Nラベル体と¹³C/¹⁵Nダブルラベル体は、¹⁵Nラベル(NH₃)₂SO₄、¹³CラベルCH₃OHを用いて得た。各種NMR測定は試料 2 mM、pH3.6、35°Cまたは 4°C、10%重水中にて、VarianUnityInova500を用いて行った。多次元NMR信号処理はNMRPipeにより行い、シグナルの帰属はPIPPソフト群により行った。

キーワード：多次元NMR、ヒトリゾチーム、低温効果；研究者名：くめたひろゆき、みうらかずのり、こばしがわとしひろ、おかちとし、みうらあい、ねもとのぶあき、つつかつとし、つださかえ

【結果と考察】三次元NMRの手法であるCBCACONNH、HNCA CB、 ^{15}N -edited TOCSY/NOESYを用いて、4℃について130残基すべての、35℃について105残基の ^1H -、 ^{15}N -、 ^{13}C -NMRスペクトルの帰属に成功した。これらの結果を用いて温度の低下に伴う化学シフトの変化を解析した。図1に4℃と35℃の $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ HSQCを比較する。ほぼすべてのピークは低磁場側にシフトしている。これは温度低下に伴い、注目しているNH基の水素結合が影響を受けるためである。各ピークの移動度の違いは、各々のアミノ酸残基が受ける温度の影響が異なることを示唆している。図2は各残基の α プロトンのケミカルシフトの

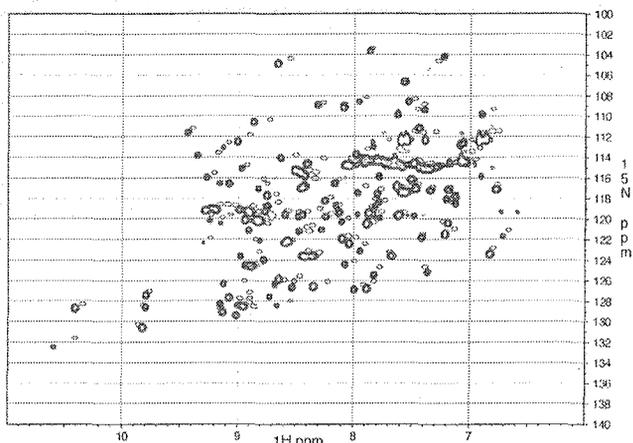


Fig.1 Overview of $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ HSQC at 4°C and 35°C
bold line:4°C, thin line:35°C

35℃と4℃の差をプロットしたものである。この図から、35℃から4℃への温度低下に伴い、Leu85、Asn66、Asn75の α プロトンのケミカルシフトが大きく変化したことが示される。これらの残基は、いずれも β ドメインのループ領域に存在する残基であり、Asn66とAsn75は活性部位近傍のループ領域に、Leu85は α ドメインと β ドメインを結ぶループ領域に存在する(図3)。従って、温度降下に伴う構造変化は活性に直接的に大きな影響を与えると考えられる部位に局在すると考えられる。現在、より詳細な構造変化を調べるため4℃および35℃での立体構造の解析を行っている。

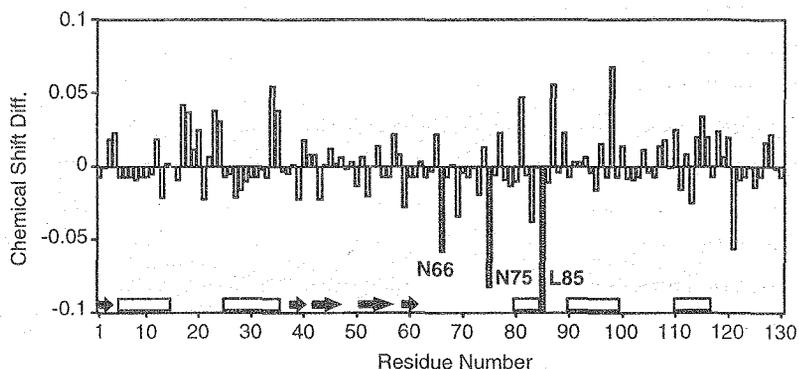


Fig.2 ^1H NMR chemical shift difference of the α -proton resonances between 35°C and 4°C.

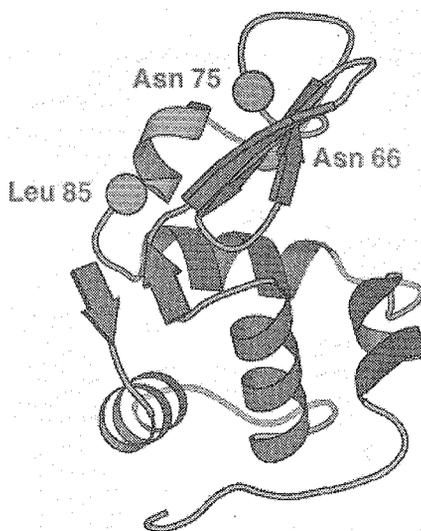


Fig.3 X-ray structure of Human lysozyme

遠位相互作用を利用したAbp1/DNA複合体の立体構造解析

○菊地淳¹, 岩原淳二², 木川隆則^{1,2}, 村上洋太³, 岡崎恒子⁴, 横山茂之^{1,2,5}
¹ 理研GSC, ² 理研細胞情報伝達, ³ 京大ウイルス研, ⁴ 藤田保衛大, ⁵ 東大院理

Use of long-range structure information in the structure analysis of Abp1/DNA complex

○Jun Kikuchi¹, Junji Iwahara², Takanori Kigawa^{1,2}, Yota Murakami³, Tsuneko Okazaki⁴, Shigeyuki Yokoyama^{1,2,5}
¹Genomic Sciences Center,RIKEN, ²Cellular Signaling Laboratory, RIKEN, ³Institute of Virus Research, Kyoto University, ⁴Institute of Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, ⁵Graduate School of Science, The University of Tokyo

Three-dimensional structure analysis of macromolecular complex beyond 20kDa is still risky work in the NMR studies. Since current solution NMR methodology strongly relies on interproton distance restraints, the most rigorous problem to tackle large molecular complex is low proton density due to its deuterium labeling. We show how the long-range structure information is effectively worked for 30kDa Abp1/DNA complex. Abp1 was found in the centromere region in the fission yeast *S. pombe*, and its N-terminal region comprised two DNA-binding domains consisted helix-turn-helix motif. Significant improvement defining interdomain orientation was accomplished by a combination of residual dipolar couplings and rotational diffusion anisotropy restraints (T_1/T_2) in its structure calculations. In addition to this, we observed paramagnetic effect from Co^{2+} /Chromomycin A3 complex of which specifically interact GC minor groove of B-DNA structure. These effects were used as intermolecular restraints between Abp1 and DNA supplemented for small number of intermolecular NOEs.

<緒言> 分子量の低いタンパク質のNMR構造解析については方法論が整備されてきたものの、20kDaを越える対象については未だに多くの難問を抱えている。その大きな問題は重水素化に伴うNOE観測の難しさであり、水素間距離情報に大きく依存した溶液NMR法にとって、分子量の上限を大きくするためには他の構造情報を積極的に活用する試みが望まれる。我々は染色体セントロメア領域に存在するAbp1とその認識DNA複合体(30kDa)の立体構造解析に挑戦し、Abp1の連鎖帰属と各ドメインの立体構造計算、DNAのシグナル帰属に関しては定法を用いて成し遂げることができた。しかしAbp1部位は立体構造的に独立な2つのhelix-turn-helixモチーフと呼ばれるDNA結合ドメインで構成されており、ドメイン間の相対配置を決定するためには遠位相互作用を立体構造計算に組み込む必要があった。さらにAbp1/DNA間の相互作用についても、DNAに特異的に相互作用する Co^{2+} /Chromomycin A3(ChrA)複合体を用いて分子間に及ぼす常磁性効果を抽出することができたので、これらの成果について報告する。

<立体構造計算> Abp1/DNA複合体についてはその分子量によるシグナルの広幅化のため、50%の重水素化を施した。Abp1部位について、1650の距離情報、244の¹³C二次シフト情報、104の二面角情報、 T_1/T_2 に基づく71の緩和異方性情報、 $^1J_{\text{NH}}$ に基づく64の残余双極子カップリング情報を用いてプログラムCNSによる二面角系における分子動力学計算を行った。なお、各配向係数はパウダーパターン分布より初期設定を行った。20000Kでの高温MD計算から徐冷し、配向情報に対する重みを徐々に大きくすることによって得られた再安定エネルギー構造について、拡散テンソルの計算をプログラムTENSORで、(Pf1 phage液晶中の)配向テンソルの計算をプログラムSSIAを用いて行った。これらの操作により配向係数を最適化した後得られた8個の収束構造により、Abp1部位のドメイン配向を決定した。つづいて、GC配列の副溝にのみ特異的相互作用を及ぼすChrAを Co^{2+} , Mg^{2+} それぞれを用いて結合させ、各金属体における¹H化学シフト変化、強度変化を観測することによりAbp1/DNA間に及ぼす分子間相互作用を抽出した。

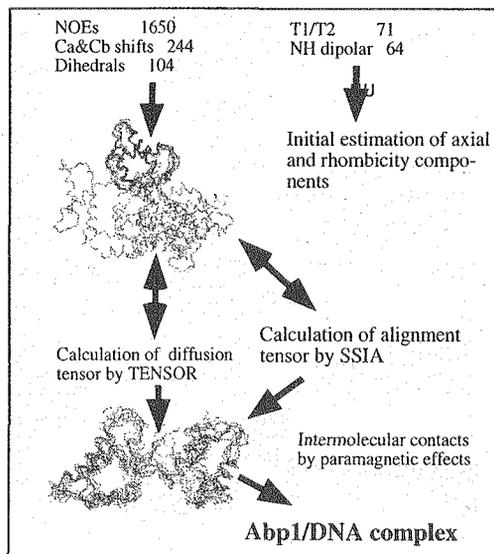


Fig.1 Scheme of structure analysis of Abp1/DNA complex using long-range order NMR restraints

Key words: タンパク質・DNA相互作用, 緩和解析, 残余双極子カップリング, 常磁性効果, 異方性
 きくちじゅん, いわはらじゅんじ, きがわたかのり, むらかみようた, おかざきつねこ, よこやましげゆき

< T_1/T_2 データの有用性 > 主鎖 ^{15}N 核緩和時間比 T_1/T_2 は溶液中におけるタンパク質分子の拡散運動に関する情報を有しており、軸対称モデル、または非対称モデルによる緩和解析により、NMR法の苦手とする、分子形状に関する情報を与える。Fig. 2はPDB中に登録されている10個のタンパク質について、軸対称モデルを仮定した場合の拡散テンソルの長軸/短軸比、 D_{\parallel}/D_{\perp} の実測値と計算値を比較した結果である。これらの相関は T_1/T_2 がN-H結合ベクトルとタンパク質分子の拡散運動の方向との間に遠位の構造情報を有していることに起因している。短距離情報の蓄積により得られるNMR構造では高分解能のX線結晶構造と比較して球状に近くなる問題が以前から指摘されていたが、 T_1/T_2 のような遠位相互作用の導入により、異方的な分子形状が再現できると期待できる。

< ドメイン配向の決定 > まず、遠位相互作用を導入せずに距離情報、 ^{13}C 二次シフト情報、二面角情報の短距離情報のみを用いてAbp1部位の立体構造計算を行った。各DNA結合ドメインについて良く収束した構造が得られるものの、ドメイン間にはNOEが観測されないため配向を定めることができない。しかし、水溶液中における緩和異方性情報 T_1/T_2 と、Pf1 phage液晶中で観測したNH残余双極子カップリング情報を相補的に用いることにより、各ドメインの配向を定めることができた(Fig. 1下)。この再安定構造について非対称モデルによる緩和解析を行うと、拡散運動の長軸はAbp1自身の長軸と大きく離れた方向にあることがわかった(Fig. 3a)さらにDNAの認識helixである各ドメインの第3 helixの相対配置を調べてみると、第3 helixの外側にDNAの主溝が結合し得る広い空間が開いていることがわかった。

< Abp1/DNA複合体モデル > 次に、Abp1/DNA分子間の相互作用を観測する試みを行った。まず、同位体フィルター法による分子間NOEの観測を試みたものの、重水素化に伴う水素密度の減少が災いし、その解析は非常に困難であった。本研究で用いた21塩基対のDNA鎖はGC配列が両端にしか存在しないことを利用して、これらの配列に特異的に相互作用するChrAを用いた。反磁性体として Mg^{2+} 、常磁性体として Co^{2+} を各々相互作用させ、 ^{15}N ラベルAbp1/DNAの $[\text{1H}-^{15}\text{N}]$ HSQCスペクトルの比較から常磁性効果を抽出した。両者間での化学シフト変化は ^1H で著しく ^{15}N では殆ど観測されず、常磁性シフトが抽出できていることがわかる。同様に常磁性緩和によりブロードアウトしているシグナルも同定できた。これら常磁性効果による遠位相互作用に加えて、塩基置換を施したDNA鎖との結合実験から得られた化学シフト変化の情報を基にしたAbp1/DNA複合体モデルをFig. 3(b)に示す。このAbp1/DNAの座標から5Åのビーズモデルを仮定し、流体力学計算プログラムSOLPROを用いて拡散テンソルの計算を行うと、実測値と類似の傾向になった。

これら遠位相互作用の導入は、主鎖シグナルの帰属が終了した段階で効果的に利用することができる。従って小タンパク質のglobal foldの高速決定や、重水素化に伴いNOEの抽出が困難な、高分子量タンパク質や膜タンパク質にNMR法の適用範囲を広げることができると期待できる。

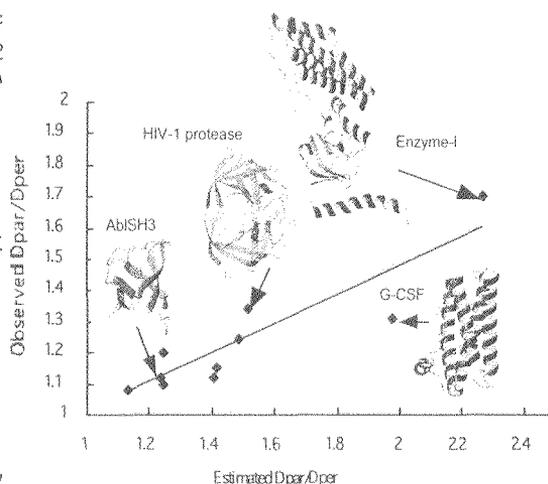


Fig.2 Comparison of experimental and calculated diffusion tensor ratio, D_{\parallel}/D_{\perp} in axially symmetric model derived from 10 PDB structures. Higher D_{\parallel}/D_{\perp} value indicates anisotropic molecular shape.

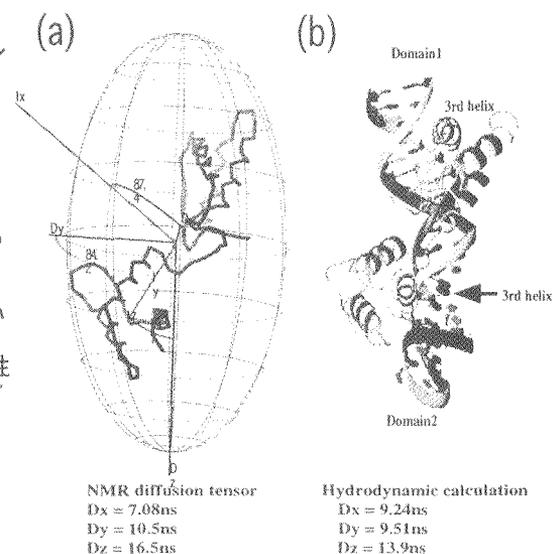


Fig.3 (a)Schematic representation of diffusion tensor of Abp1/DNA obtained by fully asymmetric model. (b)Model of Abp1/DNA complex based on diffusion tensor, chemical shift changes and paramagnetic effects.

タンパク質基本構造の解明研究

(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, 元田容子¹, 松田夏子¹, 沈新春¹, 横山茂之^{1,2,3}

Structure determination of protein folds

Takanori Kigawa^{1,2}, Takashi Yabuki¹, Emi Yamaguchi¹, Eiko Seki¹, Takayoshi Matsuda¹, Yoko Motoda¹, Natsuko Matsuda¹, Xinchun Shen¹, and Shigeyuki Yokoyama^{1,2,3}

¹Genomic Sciences Center (GSC), RIKEN, Kanagawa, ²Cellular Signaling Laboratory, RIKEN, Hyogo, 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 much more suitable than the conventional *in vivo* expression system. First, we developed the high-throughput system to produce a large number of proteins and protein domains at the same time. By using this system, proteins suitable for the structure determination could be screened from hundreds of cDNA clones within a day. Second, the system have been improved to produce milligram quantities of proteins by optimization and adopting the new "dialysis method".

1. 序

我々は、タンパク質の基本構造と分子機能の関係を網羅した「百科事典」の作成により、タンパク質の高次構造と機能の関係を明らかにすることを目指している。この目的のためには、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。そのため、我々は無細胞タンパク質合成系を主たるタンパク質発見方法として利用することとして、構造解析用試料の調製に用いるための、改良・開発をおこなった。

キーワード：安定同位体標識，多次元NMR，無細胞タンパク質合成系，構造ゲノム科学

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，ちんしんしゅん，よこやましげゆき

II. 無細胞タンパク質合成系による多品種同時発現

系の流れとしては、各々のcDNA断片に固有のプライマーセットを用いた1段階目のPCR反応と、発現調節配列（プロモーター、ターミネーター、SD配列など）やTag配列（His-tagやGST-tagなど）を持つ共通プライマーセットによる2段階目のPCR反応を、引き続きおこない、発現用の鋳型DNA断片を作成する。次に、この鋳型を用いた無細胞タンパク質合成により、DNA断片にコードされたタンパク質を発現して解析する。すべての反応は、96穴マイクロプレート上で行い、多数試料の同時処理を可能とする。

実際に、無作為に選んだマウスのcDNA 87クローンを、His-tag fusionの形で発現した際の合成量を図に示す。0.1mg/ml以上の比較的高い合成量が、24クローンについて得られ、また、クローン中で最も大きな分子量214kDaのタンパク質の合成も確認できた。さらに、発現量や可溶性の解析までに必要な時間は約12時間と、極めて短時間であった。この結果から、ゲノムにコードされた多数のタンパク質を、同時並行的に、迅速に発現調製する系を確立できたと考えられる。

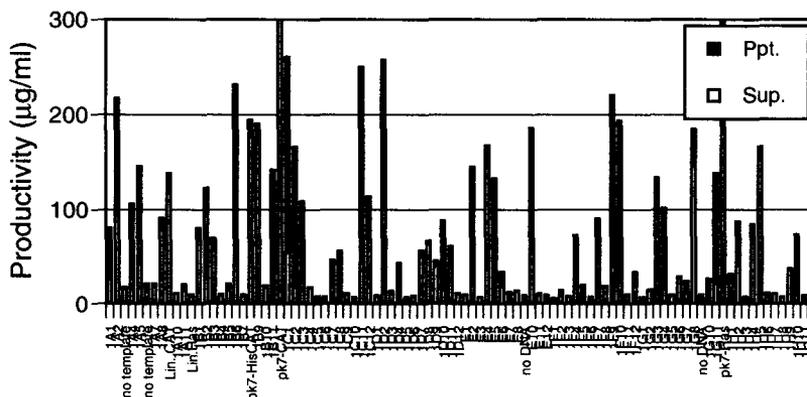


Figure Cell-free protein synthesis from PCR-derived template DNAs on a 96-well plate. His-tagged mouse cDNA clones and controls. Soluble fraction (open) and precipitated fraction (filled).

III. 無細胞系を利用したタンパク質の安定同位体標識

我々の研究成果により、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（透析法）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る。20種類の均一 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識アミノ酸、ないしは、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 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と、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識Cys、および $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識Trpを用いることにより、無細胞透析法を用いて、容易に均一 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識タンパク質の調製が可能となった。

Interaction of Yeast Ubiquitin Hydrolase with Ubiquitin: An NMR Study of the 35 kDa Covalent Complex

(理研遺伝生化学¹, 三菱化学生命研², 北里大理³)

○Sundaresan Rajesh¹, 坂本泰一², 田中剛史², 須貝真理子², 小寺義男^{2,3},
柴田武彦¹, 河野俊之², 伊藤 隆¹

Interaction of Yeast Ubiquitin Hydrolase with Ubiquitin: An NMR Study of the 35 kDa Covalent Complex

○Sundaresan Rajesh,¹ Taiichi Sakamoto,² Takeshi Tanaka,² Mariko Sugai,² Yoshio Kodera,^{2,3}
Takehiko Shibata,¹ and Toshiyuki Kohno,² Yutaka Ito¹

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

²Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, ³Department of Physics, Kitasato University

ABSTRACT

YUH1 (26kDa) is involved in maintaining the monomeric Ub pool in cells. We recently reported the assignment of backbone chemical shifts for free YUH1 and in the 35kDa complex with Ub. As the next step, we report the full backbone and side-chain ¹³C resonance assignment of Ub in the YUH1-Ub covalent complex.

INTRODUCTION

Yeast Ubiquitin Hydrolase (YUH1, 236 residues), is a member of the Ubiquitin C-terminal Hydrolase family of deubiquitinating enzymes. We have been investigating the structural basis behind the high specificity of YUH1 for Ub-fusion proteins, using multidimensional NMR. We recently reported the NMR assignment of backbone chemical shifts for (1) YUH1 on its own, (2) yeast Ub on its own, (3) YUH1 in the presence of Ub, (4) Ub in the presence of YUH1, (5) YUH1 in the covalent complex with Ub, which was prepared by reducing the YUH1-Ub thiol-ester intermediate. Chemical shift perturbation analysis indicated the importance of hydrophobic stacking forces in Ub binding by YUH1, for the first time. As the next step, we initiated NMR studies from the Ub side of the covalent complex with YUH1.

EXPERIMENTAL METHODS

The backbone ¹H_N, ¹³C_α, ¹³C', ¹⁵N and side-chain ¹³C_β resonance assignments of Ub in the 80%-²H/¹³C/¹⁵N-Ub and unlabelled-YUH1 covalent complex were achieved by analysing the 3D HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, HN(CA)CB, HN(COCA)CB spectra with deuterium decoupling. The side chain ¹³C resonance assignments for Ub in the 35 kDa complex was achieved using 3D CC(CO)NNH and CCNNH experiments with magnetization originating from side-chain ¹³C nuclei.

YUH1, Side-chain resonances, Multidimensional NMR, Chemical Shift Perturbation

Rajesh S., さかもとたいいち, たなかたけし, すがいまりこ, こでらよしお, しばたけひこ, こうのとしゆき, いたうゆたか

RESULTS AND DISCUSSION

Complete backbone resonance assignment for Ub in the 35 kDa Ub-YUH1 complex was obtained, including those residues that were exchange broadened from our earlier studies on the Ub-YUH1 mixture. In addition complete side-chain ^{13}C resonance assignment for Ub in the covalent complex was achieved using the 3D CC(CO)NNH and CCNNH experiments. Chemical shift perturbation analysis enabled the clear mapping of YUH1-binding regions on Ub. Recently the crystal structure of YUH1-Ub aldehyde was reported. Mapping the NMR chemical shift perturbation data onto the crystal structure suggested that YUH1 recognizes a region around T7-L8 as well as the C-terminal cleavage site (L73-G75), which were within 2 Å from hydrophobic stretches on YUH1. Thus the X-ray structure and the NMR chemical shift perturbation data collectively corroborate our hypothesis that hydrophobic interactions form the major driving force behind the tight recognition of Ub by YUH1, a step necessary for the subsequent hydrolysis of Ub C-terminal fusions.

REFERENCES

1. Rajesh S, Sakamoto T, Iwamoto-Sugai M, Shibata T, Kohno T, Ito Y., *Biochemistry*, **38** (29), 9242-53 (1999).
2. Sakamoto T, Tanaka T, Ito Y, Rajesh S, Iwamoto-Sugai M, Kodera Y, Tsuchida N, Shibata T and Kohno T., *Biochemistry*, **38** (36), 11634-11642 (1999).
3. Johnston SC, Riddle SM, Cohen RE, Hill CP., *EMBO J.*, **18** (14), 3877-3887 (1999).

残余双極子結合の測定によるgalectin-3の構造とリガンド結合
 (国際基督教大¹, Lund University, Sweden², University of Georgia, USA³)
 ○梅本公子¹, Leffler, H.², Prestegard, J.H.³

Residual dipolar coupling analysis of the structure and ligand binding of galectin-3
 K. Umemoto¹, Leffler, H.² and J.H. Prestegard³
 (International Christian University¹, Lund University², University of Georgia³)

Residual dipolar coupling (RDC) analysis was applied in a structural and ligand binding investigation of human galectin-3, a lectin which has a selective affinity for certain β -galactose-containing oligosaccharides. Uniformly ¹⁵N-labeled intact galectin-3 and its C-terminal carbohydrate recognition domain (CRD), galectin-3C, were prepared and used in this experiment. N-acetylglucosamine (LacNAc), double labeled at selective sites, was used as the ligand. RDC was measured for ¹D_{NH} of the protein, as well as ¹D_{NH} and ¹D_{CH} of the disaccharide. The results are used to discuss structural variations of the protein upon ligand-binding and allowed ligand binding geometries.

Introduction

Dipolar couplings D between nuclear spins are usually averaged to zero in solutions due to the isotropic tumbling of molecules. If the molecular tumbling is anisotropic such as in partially aligned bicelles, the dipolar interaction remains to be observed. Residual dipolar couplings have the same dimension as scalar coupling, J, and can be measured as the sum of scalar and dipolar couplings, J+D Hz. Since the dipolar coupling depends on the average of the angular term $(3\cos^2\theta-1)/2$, where θ is the angle between the bond and the magnetic field, it offers information on relative bond orientations.

The study of biomolecular structures in solution by NMR has traditionally been based on distance constraints obtained from NOEs. The same approach to the study of protein-ligand interactions, however, often fails due to insufficient number of NOEs available between protein-ligand interfaces. Similarly, the structures of the amino-acid residues that are key to the binding are often poorly defined, because of the flexibility of the binding site, especially when the binding is weak. Residual dipolar couplings, on the other hand, provide information on the relative orientation of individual bonds, the information that can be used as constraints in combination with the NOE data.

In the present study, residual dipolar coupling analysis was applied to study the structure and ligand binding of galectin-3, a human carbohydrate binding lectin. While galectin-3 is widely distributed in many tissues, high expression is seen in macrophages and epithelial cells, especially under inflammatory conditions and in cancer cells. Its biological function, however, is still largely unknown. Galectin-3, 250 aa, selectively binds with β -galactoside-containing oligosaccharides at its C-terminus, 143 aa, the carbohydrate recognition domain.

Materials and Methods

Uniformly ¹⁵N-labeled C-terminus of galectin-3 (galectin-3C), and LacNAc, double

キーワード：残余双極子結合, ガレクチン, ラクトース

○うめもときみこ, H. レフラー, J. H. プレステガード

labeled at selective sites, were dissolved in a bicelle medium. To prepare the medium, DMPC and DHPC were mixed in a molar ratio 2.8:1 at concentration in total lipid weight of 5 % in 20 mM phosphate buffer, pH6.5.

Amide one-bond coupling data $^1D_{NH}$ of galectin-3C were collected in two types of experiments, J-HSQC, an intensity-based experiment [1], and SCE-HSQC, where the scalar couplings are enhanced by two-fold [2]. It was important to run both experiments for each sample under the same conditions, especially for aligned protein samples, to obtain the unambiguous $^1D_{NH}$ couplings. Three sets of J-HSQC data were collected for each galectin-3C sample using different constant time delays for more accuracy. The coupling data for the ^{15}N - 1H bond of the labeled LacNAc were obtained similarly by SCE-HSQC experiments. The $^1D_{CH}$ couplings of the labeled LacNAc were also measured using a modified SCE-HSQC experiment. The measurements were done both at 25 °C and 38 °C on a Varian INOVA 600.

Residual dipolar couplings were calculated as the difference between the couplings measured in the aligned state (J+D) and those measured in the isotropic state (J). For the dipolar couplings of LacNAc bound to galectin-3C were scaled to take into account the unbound LacNAc.

Using the experimental residual dipolar couplings of galectin-3C, the order matrix was determined by a singular value decomposition approach [3], and structural variations on galectin-3C upon binding was investigated by simulated annealing using CNS protocol[4]. The X-ray crystallographic data of the human galectin-3C complexed with LacNAc[5] were used as the initial coordinates.

Results and Discussion

Measured amide NH residual dipolar couplings, $^1D_{NH}$, of galectin-3C ranged from -30Hz to +17Hz and were consistent with the secondary structure of the molecule, with large negative $^1D_{NH}$ appearing for the residues in the β -sheets. Some discrepancies were noticed at one β -strand consisting the binding site and another one of its neighbors. In the magnetic field, galectin-3C is oriented with its long axis parallel to the magnetic field, and the N-H bonds in the β -sheets perpendicular to the field. The orientation of bound LacNAc could not be defined independently because of the degeneracy between two of the bond vectors for which D was measured, but found to be consistent with the orientation suggested by X-ray analysis[5].

Structures of both complexed and free galectin-3C were refined by simulated annealing (CNS) using NOE and residual dipolar couplings as constraint. Preliminary results indicated subtle structural variations of galectin-3 around the binding site upon binding. Further refinement is in progress.

References

1. Tolman, J.R. and J.H. Prestegard, *J Magn Reson B*, 1996. **112**:245-52.
2. Tolman, J.R. and J.H. Prestegard, *J Magn Reson B*, 1996. **112**:269-74.
3. Losonczi, J.A., *et al.*, *J Magn Reson*, 1999. **138**: 334-42.
4. Brunger, A.T. *et al.*, *Crystallography and NMR simulations*, version 1.0, 2000
5. Seetharaman, J. *et al.*, *J Biol Chem*, 1998. **273**:13047-52.

ラン藻 *Anabaena variabilis* M3 の RNA 結合タンパク質 RbpA1
の溶液構造解析

(愛媛大・理学部¹、阪大・蛋白研²、埼玉大・理学部³、
福井工業大・工学部⁴)

○村上 智英¹、森田 勇人¹、山崎 俊夫²、佐藤 直樹³、
京極 好正^{2, 4}、林 秀則¹

Solution structure of RNA-binding protein, RbpA1, in cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3

(Faculty of Science, Ehime University¹, Protein Research Institute, Osaka University²,
Faculty of Science, Saitama University³, Fukui Institute of Technology⁴)

○Toshide Murakami¹, Eugene Hayato Morita¹, Toshio Yamazaki², Naoki Sato³,
Yoshimasa Kyogoku^{2, 4}, Hidenori Hayashi¹

RbpA1 is a low-temperature induced protein in cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3. RbpA1 recognizes the locally double-stranded RNA, and unfolds the locally double-stranded region, which inhibits the translation of genetic information to protein, to single-stranded RNA. RbpA1 is thought to be an evolutionary fundamental RNA-binding protein because of containing two functional domains, an RNA-recognition motif (RRM) and a glycine-rich domain, found in eukaryotes. To understand the structure-function relationships, we have analyzed the solution structure of each domain in RbpA1 with the heteronuclear multi-dimensional NMR spectroscopy.

生物は環境の変化に伴い、細胞内でその影響を打ち消す物質の発現を誘導することで新たな環境に適応する。温度は重要な環境因子の1つであり、高温環境下、低温環境下においてそれぞれ幾つかの遺伝子発現が誘導される。しかし、低温環境下では高温環境下と異なり、mRNA上に部分的に存在する相補的領域が二本鎖が生じることにより、遺伝情報の翻訳効率の低下が生じる。これは原核、真核生物共通の問題である。ラン藻 *Anabaena variabilis* M3のRbpA1は、低温環境下で発現が誘導され、mRNA上に生じた二本鎖を解きほぐし、一本鎖のランダムコイル状に戻すことで、mRNAの翻訳を促進するRNA結合蛋白質である。RbpA1は、真核生物に多く見られるRNA recognition motif (RRM) 1つとグリシンリッチドメイン1つとから構成される。他のラン藻などの原核生物や数種の高等植物で見ついているグリシンリッチ蛋白質などのRNA結合蛋白質もRbpA1と同様の一次構造上の特徴を持つことから、これらのRNA結合タンパク質の一般的特徴を備えた、進化的に最も基本的なタンパク質であると考えられる。従って、RbpA1によるmRNAの構造転移誘導の分子機構を解明することで、原核生物であるラン藻から真核生物である高等植物まで普遍的に存在する低温環境適応機構を解明できると期待される。本研究では、RbpA1を構成する2つの機能単位RRMとグリシンリッチドメインが二本鎖を形成したRNAの認識やそのときほぐしの過程において果たす役割を解明するために、安定

キーワード：低温耐性、RNA-recognition motif、グリシンリッチドメイン

同位体標識法を併用した多次元NMR分光法により、RbpA1の溶液構造を決定することを目的とした。

^{15}N のみ、あるいは ^{15}N および ^{13}C で安定同位体標識したRbpA1を大腸菌による大量発現系を用いて作製し、 ^1H - ^{15}N HSQC、CBCA(CO)NH、HNCACB、 ^1H - ^{15}N および ^1H - ^{13}C HSQC-NOESY, ならびにHCCH-TOCSYスペクトルを測定した。得られたスペクトルをもとに、主鎖、側鎖の ^1H 、 ^{15}N 、 ^{13}C の化学シフト値を決定し、主鎖、側鎖まわりのNOEシグナルの帰属を行った。これらの情報をもとに、RbpA1の溶液構造計算をX-PLORにより行った。その結果、RRMは二本の α ヘリックスと1枚の β シートから構成されるが、グリシンリッチドメインは、RbpA1が溶液中で単独で存在する条件下では明確な構造をとらないことを明らかにした。

近年、グリシンリッチドメインを持たないRNA結合蛋白質も同定されてきていることから、グリシンリッチドメインが二本鎖を形成したRNAとの結合に中心的役割を果たしているのではなく、RRMによる二本鎖を形成したRNAの認識の効率を上昇させたり、ときほぐしの過程を効率的に進行させる機能を持つ可能性が高い。

現在、RbpA1ならびにグリシンリッチドメインを取り除いたRbpA1の二本鎖を形成したモデルRNAに対する反応性を比較することで、グリシンリッチドメインの構造のフレキシビリティが二本鎖を形成したRNAの認識やそのときほぐしの過程で果たす役割の解明を試みている。

「参考文献」

- [1] " NMR backbone assignments of the cold-regulated RNA-binding protein, RbpA1, in the cyanobacterium, *Anabaena variabilis* M3."
Eugene Hayato Morita, Toshihide Murakami, Koichi Uegaki, Toshio Yamazaki, Naoki Sato, Yoshimasa Kyogoku, and Hidenori Hayashi.
J. Biomol. NMR in press.
- [2] " Solution structure of cold-regulated RNA-binding protein, RbpA1, in cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3."
Eugene H. Morita, Toshihide Murakami, Koichi Uegaki, Toshio Yamazaki, Naoki Sato, Yoshimasa Kyogoku, and Hidenori Hayashi.
Protein Sci. Submitted

硫酸還元菌チトクロム c_3 の酸化型および

還元型における ^{15}N 緩和解析

(横浜国大・工¹、阪大・蛋白研²) ○福岡由記¹、原田英里砂¹、藤原敏道¹、阿久津秀雄¹²

Analysis of Backbone Dynamics in Oxidized and Reduced Cytochrome c_3 Using ^{15}N -NMR Relaxation Measurements

○¹Y. Fukuoka, ¹E. Harada, ¹T. Fujiwara and ¹²H. Akutsu

(¹Dept. Chem. Biotech. Yokohama Natl. Univ. ²Institute of Protein Research Osaka Univ.)

Cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. is an electron carrier protein, contains four c-type heme groups per molecule and a molecular weight of 14000. To examine the relationship between dynamic properties and redox potentials, heteronuclear $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -NMR NOE and ^{15}N NMR of oxidized and reduced forms were measured. Model-free analysis reveals that there is little correlation with secondary structure in oxidized form, although the mobility changed around each heme. By comparing the order parameter S^2 of two forms, we examined change of mobility in two forms. Furthermore, the relationship between structure and reduction kinetics was examined.

チトクロム c_3 は 1 分子中に 4 つヘムを持ち、分子量は約 14000 の電子伝達タンパク質である。本研究では NMR を用いて緩和時間、NOE を測定し、NMR シグナルを解析し、酸化型および還元型の動的構造を明らかにすることを目指した。model free analysis に基づく解析の結果、酸化型の運動性は 2 次構造との強い相関は見られなかったが、各ヘム間で揺らぎの大きい部分と小さい部分があることがわかった。これは電子移動速度に影響を与えている可能性があると考えられ、構造と電子移動速度について検討を行った。また、揺らぎのパラメータである S^2 を比較することにより両状態のタンパク質の運動性の変化を検討した。

【緒言】

絶対嫌気性菌である硫酸還元菌は硫酸塩を最終電子受容体として乳酸などを酸化することによりエネルギーを得ている。チトクロム c_3 はこの過程において電子伝達体として機能しており、1 分子中に 4 つヘムを持ち、分子量は約 14000 である。細胞内においてはペリプラズムあるいは細胞膜に付着した形で存在している電子伝達タンパク質です。

[Key words] チトクロム c_3 , 酸化還元, ^{15}N 緩和解析, model-free 解析, 電子移動速度

ふくおかゆき、はらだえりさ、ふじわらとしみち、あくつひでお

チトクロム c_3 は他の c 型チトクロムに比べて標準酸化還元電位が低い性質や電子伝達経路を明らかにするためには、その機能や特性を構造と関連づけて議論することが重要となります。本研究ではチトクロム c_3 が水溶液中で分子のどの部分がどのくらいの速さで運動しているかといった動的構造に注目した。そこで、分子の動的構造解析に有用であり、また温度、pH、塩濃度などの測定条件を広範囲にわたり選ぶことが可能である NMR を用いて緩和時間、NOE を測定し、それを解析することにより動的構造を明らかにすることを目指し実験をした。

【実験】

^{15}N でフルラベルしたチトクロム c_3 は $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ のみを N 源とした培地で培養した硫酸還元菌宮崎 F 株の菌体から精製した。精製した $[U-^{15}\text{N}]$ チトクロム c_3 を脱塩し軽水溶液サンプル (30mM リン酸緩衝溶液、pH7.0, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%\text{D}_2\text{O}$) とした。 $[U-^{15}\text{N}]$ チトクロム c_3 の濃度は 1-2mM である。酸化状態のサンプルはこのようにして得られたが、還元状態のサンプルは痕跡量のヒドロゲナーゼ (40-60 μl) を共存させ、NMR サンプル管内を H_2 ガスで置換することによって還元させて得た。以上のようにして得られた酸化状態、還元状態のサンプルについて NMR スペクトルを測定した。測定は 303K で行い、用いた装置は Bruker DRX600 である。 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 異種核 2 次元 NMR により分離観測された ^{15}N シグナルについて緩和時間である T_1 , T_2 と ^1H との間で生じる NOE を測定し、モデルフリー解析に基づく解析を行った。

【結果と考察】

酸化型、還元型サンプルそれぞれについて NMR スペクトル測定で得られた NMR シグナルを用いて緩和時間である T_1 , T_2 と ^1H と ^{15}N の間で生じる NOE をモデルフリー解析に基づく解析を行った結果、これまでのところ酸化型についてはヘム 1 と 2 の間及び、ヘム 3 と 4 の間には比較的硬い構造の部分があり、ヘム 1 と 3 の間及びヘム 2 と 4 の間には揺らぎの大きい部分があることがわかった。運動性の 2 次構造との強い相関は見られなかった。これはヘム 4 における電子移動速度に影響を与えている可能性があると考えられる。また、揺らぎのパラメータである S^2 を酸化型と還元型とを比較すると、全体の S^2 は還元型のほうが酸化型よりもそろっていて酸化型では揺らぎの変化が見られた。これらを X 線結晶構造上で見てみると、酸化型においてヘム 4 の上下が揺らいでいてそれを結ぶループが rigid であると考えられ、還元型においてはヘム 3 まわりの揺らぎが小さいと考えられます。これらのことから構造と酸化還元電位について検討を行った。

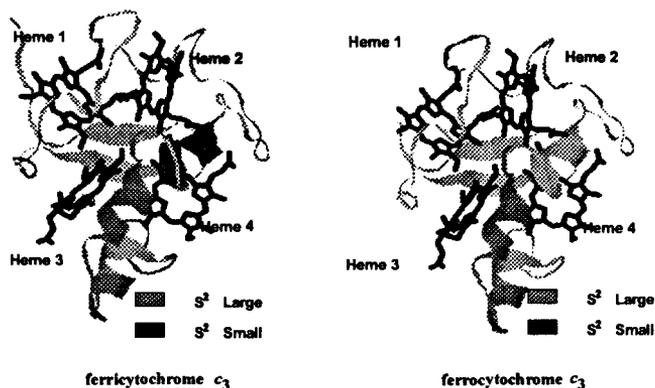


Fig1 S^2 mapping to crystal structure

テロメア蛋白質 hRap1 の Myb 様ドメインの構造解析

(横浜市大・院総合理 1, 大阪大・蛋白研 2)

○花岡慎悟¹, 長土居有隆¹, 相本三郎², 西村善文¹

Solution structure of Myb-like domain of human telomeric protein, Rap1
(1Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, 2Protein
Research Institute, Osaka University)

○Hanaoka S¹, Nagadoi A¹, Aimoto S², Nishimura Y¹

Telomeric protein are essential for the protection and maintenance of chromosome ends. Although several telomeric proteins, including TRF1, TRF2 and TIN2 are known in mammals, it has been puzzling that none have orthologs in budding yeast. But It is reported a newly identified human protein, hRap1 that is the ortholog of the budding yeast telomeric DNA binding protein scRap1p. hRap1 has an N-terminal BRCT domain, central Myb domain, and a C-terminal protein interaction domain in common with scRap1p and affects telomere length. However scRap1 binds telomeric DNA directly, hRap1 can not bind telomere DNA. hRap1 is located at telomeres through interaction with the telomeric binding protein, TRF2. scRap1p has two Myb domains and binds to telomeres through a direct interaction with the telomeric DNA, while hRap1 has a single Myb domain and does not appear to have duplex telomeric DNA binding activity. Here we report that the solution structure of Myb-like domain of hRap1 has been determined by NMR.

【序論】

哺乳類では、テロメア結合因子として TRF1、TRF2 が見つかっている[1]。TRF2 のテロメア DNA への阻害は染色体末端の保護機能の急激な低下を引き起こす[2]。最近ヒトで、この TRF2 へ結合し、テロメアに存在するタンパク質が見つかった[3]。このタンパク質は出芽酵母のテロメア結合タンパク質 scRap1p[4]とホモロジーが高いことから hRap1 (human Rap1) とされた。hRap1 は 399 アミノ酸残基をもち、その 1 次配列から scRap1p 同様に中央部位に Myb ドメインをもっていることが推定された。しかし、scRap1p は 2 つの Myb 様ドメインをもち DNA に結合するが hRap1 は 1 つしか Myb 様ドメインをもっておらず、また、テロメア DNA への結合活性がないことが報告された[3]。hRap は C 末が hTRF2 と相互作用し、テロメアに存在する。しかし Myb ドメインの機能はわかっていない。そこで、Myb 様ドメインの溶液中での構造を NMR を用いて決定した。

Key words : テロメア、Myb 様ドメイン、NMR

はなおか しんご、 ながどい ありたか、 あいもと さぶろう、 にしむら よしふみ

【実験】

hRap1 の Myb 様ドメイン 59 残基は合成ペプチドを使用した。2D NOESY, TOCSY, DQF-COSY を測定し、解析した。構造計算は X-PLOR ver. 3.851 で行った。

【結果・考察】

hRap1 の構造は scRap1p のドメイン 1 との 1 次配列的の相同性から予想されたように 3 本のヘリックスからなる Myb 様ドメインであり、1 番目のヘリックスと 2 番目のヘリックスの間のループがヒトのほうが長い以外はそれほど違いはなかった。また、ドメイン同士での静電分布の違いも見受けられなかった。しかし、scRap1p の DNA 結合ドメインは 2 つの Myb 様ドメインをもち、2 つの Myb 様ドメインとその間のループ全体でみると DNA を認識する側が明らかに正の静電ポテンシャルをもち、DNA に結合することがわかる。しかし、hRap1 の Myb 様ドメインは単独にしかなく、その前後の配列から正に荷電する領域も見受けられないことから DNA に単独では結合できないと思われる。

また、scRap1p が DNA の塩基を特異的に認識するアミノ酸は hRap1 においてもその性質はほとんど保存されているが、ヒトのテロメア DNA に結合するタンパク質、TRF1、TRF2 と比べた場合、DNA を特異的に認識するであろうと予想されるアミノ酸とは 181Lys、182Asp を除けば明らかに性質が異なることからヒトのテロメア DNA を特異的に認識することはできないと思われる。

Myb 様ドメインは DNA を認識するモチーフとして考えるのが一般的であり、scRap1p とのその相同性から hRap1 の Myb 様ドメインは DNA に結合すると考えられた。しかし、hRap1 は DNA にはそれ単独では結合できないこと[3]から、hRap1 の Myb 様ドメインの役割はおそらく scRap1p のとは違うことが予想される。

【Reference】

- [1] Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument - Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T. (1995) *Science* 270, 1663-1667
- [2] van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998) *Cell* 92, 401-413
- [3] Bibo Li, Stephanie Oestreich, and de Lange, T (2000) *Cell* 101, 471-483
- [4] Shore, D., and Nasmyth, K. (1987) *Cell* 51, 721-732

ナトリウムチャンネルの III-IV linker 領域中における IFM motif の構造解析
 (京大院薬 1、京都工芸繊維 2) ○宮本和英 1、金折賢二 2、中川照眞 1、黒田義弘 1

Structural Study of the Fragment Peptides Corresponding to the III-IV linker Including the Isoleucine-Phenylalanine-Methionine (IFM) Motif in Sodium Channels.

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

²Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology

○Kazuhide Miyamoto¹, Kenji Kanaori², Terumichi Nakagawa¹, and Yoshihiro Kuroda¹

The IFM (Ile-Phe-Met) motif in the III-IV linker, which tethers between domains III and IV of the sodium channel α -subunit, is known to interact with its receptor consisting of domain III S4-S5 loop and domain IV S4-S5 loop, and occludes the inner mouth of the sodium channel. This is called a fast inactivation process. The previous electrophysiological experiments revealed that the Ile→Gln mutation at position 1488 (I1488Q) in the IFM motif slightly degraded the inactivation, while Thr1491Met mutation (T1491M) largely. Presently, in order to investigate the gating mechanisms of the sodium channel fast inactivation, we studied the structures of the sodium channel inactivation gate related peptides (17 residues) that includes the IFM (Ile-Phe-Met) motif in the rat brain type-IIA and human heart sodium channels by circular dichroism (CD) and NMR spectroscopies. It was concluded that the hydrogen bonding was formed between the hydroxyl oxygen of Thr1491 and the backbone amide proton at position 1488. This hydrogen bonding was considered to play an important role in controlling the inactivation mechanisms in sodium channels.

Na⁺チャンネルの III-IV リンカー領域中にある疎水性アミノ酸 Ile-Phe-Met (IFM motif) は、疎水性相互作用により Na⁺チャンネルのイオン透過孔を細胞質側から塞ぐと考えられている (不活性化)。最近、我々は rat brain type-IIA Na⁺チャンネルの IFM motif を含む 17 残基から成るペプチド MP-3A (Fig. 1) において、Ile1488 の主鎖 NH と Thr1491 の側鎖 OH が水素結合し得る距離にあることを見出した[1]。IFM motif の Ile から Gln への置換 (Ile/Gln) は不活性化に殆ど影響を与えないが、Thr1491 から Met への置換 (Thr/Met) は不活性化に対して大きく影響を与えることが電気生理学的実験により知られている。我々は、この電気生理学的実験で得られた結果が Ile と Thr 間の水素結合と関係があるのではないかと考えた。そこで、MP-3A を Ile/Gln 置換した MP(rb)-3QFMT および Thr/Met 置換した MP(rb)-3IFMM

NMR、CD スペクトル、ナトリウムチャンネル、不活性化ゲート

みやもとかずひで、かなおりけんじ、なかがわてるみち、くろだよしひろ

さらに、human heart Na⁺チャンネルの IFM motif を含むペプチド MP(hh)-3A および Thr/Met 置換した MP(hh)-3IFMM を合成した (Fig. 1)。不活性化は IFM motif とそのレセプター (ドメイン III および IV の S4-S5 ループ) との疎水性相互作用により生ずることから、疎水性環境を模倣した SDS ミセル溶液に各ペプチドを溶かしてペプチドの立体構造を CD スペクトルおよび NMR を用いて研究した。

各ペプチドの NOESY および DQF-COSY スペクトルから、距離と二面角(ϕ)の拘束ファイルを作成した。このファイルに基づく分子動力学計算 (simulated annealing) を InsightII/Discover で行うことにより各ペプチドの立体構造を決定した。MP(rb)-3QFMT における IFM motif の構造は MP(hh)-3A のそれと似ていた。これは Ile/Gln が IFM motif の構造に影響を与えないことを示すものである。IFM motif の構造は、その隣接残基 Thr の側鎖 OH と Ile(Gln)の主鎖の NH との

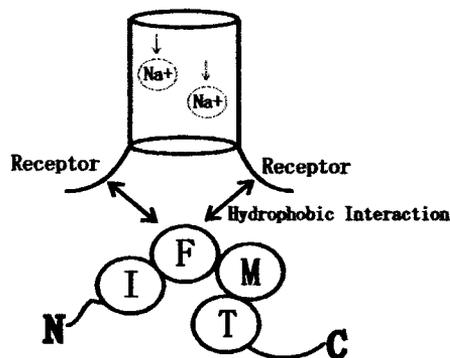


Fig. 2 Schematic Representation for the inactivation of the Sodium Channel

水素結合により形成されていることが分かった (Fig. 2)。また、MP(rb)-3IFMM の構造は MP(hh)-3IFMM のそれと良く似ていたが、この 2 種のペプチドの構造は MP(rb)-3QFMT や MP(hh)-3A とは異なっていた。これは MP(rb)-3IFMM および MP(hh)-3IFMM における Thr が Met に置換されているために、上で述べた水素結合が形成されないことに起因すると考えられる。Rat brain type IIA および human heart Na⁺チャンネルにおける IFM motif の Thr が、不活性化機構に重要な役割を担っていると思われる。疎水性相互作用によるペプチドの安定性を示すギブズ自由エネルギー(ΔG)を IFM motif の表面積から単位面積あたり $20 \text{ cal}/\text{\AA}^2$ として算出した。その値 (-3.9 kcal/mol) は電気生理学的実験による開状態と不活性化状態との間の平衡定数から算出された値 (-4.1 kcal/mol) と良く一致した。IFM motif の表面積と、Na⁺イオンの不活性化ゲートからの遺漏率とに相関関係があることを見出した。

[rat brain type-IIA]

MP-3A (Ac-KKKFGGQDIFMTEEQKK-NH₂)

MP(rb)-3QFMT (Ac-KKKFGGQDQFMTEEQKK-NH₂)

MP(rb)-3IFMM (Ac-KKKFGGQDIFMMEEQKK-NH₂)

[human heart]

MP(hh)-3A (Ac-KKKLGGQDIFMTEEQKK-NH₂)

MP(hh)-IFMM (Ac-KKKLGGQDIFMMEEQKK-NH₂)

Fig. 1 Peptide Sequences

[参考文献]

(1) Y. Kuroda, K. Miyamoto, et al., J Peptide Res (in press).

ペプチド-ペプチド相互作用による二次構造変化に関する研究
 (京大院薬) 黒田義弘、○前田能崇、中川照眞

Helix-Stabilizing Effects of an Oligopeptide on Another Peptide Containing Similar
 Amino Acid Sequences with Each Other

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
 Yoshihiro Kuroda, ○Yoshitaka Maeda, and Terumichi Nakagawa

We have previously shown by NMR and CD spectroscopies that the helical content of the sodium channel inactivation gate related peptide (Ac-GGQDIFMTEEK-NH₂;MP-1A) solutions was increased by adding the pentapeptide KIFMK. The pentapeptide consists of the IFM motif which is included in MP-1A and the basic amino acids at its N- and C-termini which may be interacting with the acidic amino acids residing on both sides of the IFM motif in MP-1A. In order to study more thoroughly whether or not the presence of the IFM motif and the two lysine residues are prerequisites for stabilizing a helical conformation of MP-1A, we have studied interactions between some other oligopeptides and MP-1A or MP-1A analogues by NMR and CD spectroscopies. It was concluded that the exact IFM sequence and the presence of the two Lys residues exert most effectively the helix-stabilizing effects on the secondary structure of MP-1A. An idea emerged from these results has been applied to a fragment peptide of the Syrian hamster prion protein (SHaPrP) to study whether or not an oligopeptide which includes the same amino acid sequence of the SHaPrP can stabilize the helical conformation of the fragment peptide which locates at the first putative helical region in SHaPrP.

【緒言】

第 38 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-GGQDIFMTEEK-NH₂)とペントペプチド KIFMK との相互作用の配列特異性に関して検討した[1]。その結果、KIFMKによるMP-1Aの α ヘリックス構造の安定化には、オリゴペプチド両端の正電荷およびIFM motifが重要な役割を果たしていることが確認できた[2]。本研究では、MP-1AとKIFMKとの相互作用における更なる詳細な配列特異性を検討するために、不活性化ゲートペプチド MP-1MMA (T1491M)、MP-1TA (T1491 deletion)、MP-1A' (F1489F (D 体))とオリゴペプチド KIFMK 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。この結果をふまえて、次にプリオンタンパク中のアミノ酸配列を持つモデルペプチドへの応用を試みた。モデルペプチドとして PrP(129-154)を用い、その部位の一部のアミノ酸配列を含み、両端に酸性もしくは塩基性アミノ酸を有するオリゴペプチドを作用させることによる PrP(129-154)の二次構造変化の検討を行った。

chelix、オリゴペプチド、NMR

くろだよしひろ、まえだよしたか、なかがわてるみち

【実験】

① TFE(CF₃CD₂OH)と水との混合溶媒に、モデルペプチド(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、モデルペプチド(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-1MMA の形成する αヘリックス構造が不安定化される方向性の化学シフト変化が確認された。また、MP-1TA および MP-1A' の場合においても同様に KIFMKにより αヘリックス構造が不安定化されるという結果が得られた。CD スペクトルからもこれらの二次構造変化を支持する結果が得られた(Fig.1, Fig.2)。KIFMK が MP-1A の形成する αヘリックス構造を最も効果的に安定化したことより、モデルペプチドおよびオリゴペプチドがともに同配

列の IFM motif を有していることが αヘリックス構造の安定化には不可欠であると結論できる。ここで、IFM motif はモデルペプチドとオリゴペプチド間の疎水性相互作用を引き起こすことにより両者の接近を促し、塩基性アミノ酸と酸性アミノ酸との静電相互作用によりモデルペプチドの形成する αヘリックス構造を安定化していると考えられる。

次に、PrP(129-154)の形成する αヘリックス構造を安定化すると考えられるオリゴペプチドを選択し(Fig.3)、それらの相互作用を検討した結果、PrP(129-154)の αヘリックス構造を安定化するのに有効なオリゴペプチドは EFGNK と EYYEK であった。これらのオリゴペプチドはモデルペプチド PrP(129-154)との疎水性相互作用により接近し、静電相互作用による分子間の Salt Bridgeを形成するとともに、側鎖の電荷と PrP(129-154)の Helix Dipole との相互作用により、PrP(129-154)の形成する αヘリックス構造を安定化しているものと考えられる。

【参考文献】

[1] 黒田義弘、前田能崇、宮本和英、等 第 38 回 NMR 討論会要旨集 p.118-119 (1999)
 [2] Y.Kuroda, Y.Maeda, K.Miyamoto, *et al.*, *Biophys. J.*, 77(3), 1363-1373 (1999)

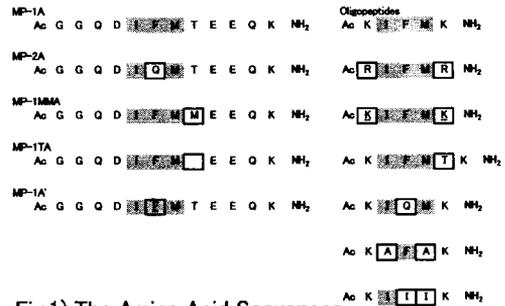


Fig.1 The Amino Acid Sequences

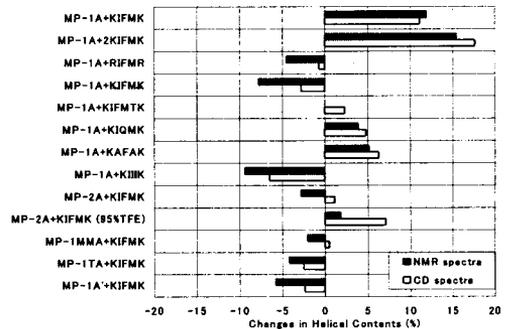


Fig.2 Changes in Helical Contents obtained from NMR and CD Spectra

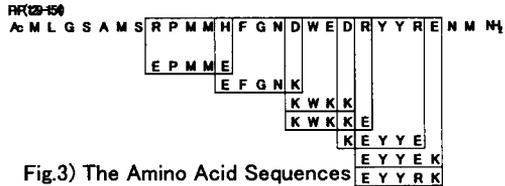


Fig.3 The Amino Acid Sequences

ブロメラインインヒビターの pH 滴定曲線の 構造的解析と静電物性相関

群大・工¹、東薬大・生命科学²、東大・農³

○秦野 賢一¹、小島 正樹²、田之倉 優³、高橋 健治²

pH Titration Studies of Bromelain Inhibitor VI

Department of Biological Sciences, Gunma University¹

School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science²

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo³

Ken-ichi Hatano¹, Masaki Kojima², Masaru Tanokura³, and Kenji Takahashi²

The pH titration experiments were performed by ¹H NMR for bromelain inhibitor VI (BI-VI), cysteine-proteinase inhibitor from pineapple stem¹, in the pH-range 1.5-9.9. The results showed that above pH 4 the resonances of amide protons of Ser4^{light chain (L)} and Lys19^{heavy chain (H)} were greatly downfield-shifted from their normal values exposed to solvent, which indicated that these residues might form hydrogen bonds with the side chains of Asp9^H and Asp32^H, respectively at that pH. The pK_a values of backbone amino and carboxyl groups for terminal residues, and side-chain carboxyl ones were calculated from the titration curves. In addition, based on the Tanford-Kirkwood theory, theoretical pK_a values for these ionizable groups were calculated from the three-dimensional structures previously determined by NMR². Experimental pK_a values of Glu1^H, Glu2^H and Asp38^H were especially different from the calculated ones. From the analyses for NMR conformation ensemble, the carboxyl groups of Glu1^H and Glu2^H should have coulombic interaction with its amino-end group and the guanidium group of Arg11^L, respectively in real aqueous environment.

【はじめに】

蛋白質分子の機能や物性は、その静電的性質つまり外界のpHに大きく依存している。そういった意味でpH滴定実験は重要で、種々の測定手段により昔から行われてきた。近年では、多次元NMRを用いた滴定や分子の立体構造を基に静電場の方程式を解くことにより各解離基のpK_aを理論的に計算することが可能となってきた。本研究ではバイナッブル地下茎由来ブロメラインインヒビター6 (BI-VI) を用いて二次元¹H NMRにより主に酸性解離基のpH滴定実験を行い、その詳細な静電物性相関を明らかにすることを目的とする。BI-VIは軽鎖11残基、重鎖41残基の二本鎖から成り、両鎖はS-S結合により一体化している¹。本阻害剤の立体構造は、pH 3.9において既に決定されている²。至適pHは酸性側に偏っているがpH 1.7-10.7ではCDスペクトル上で特に大きな構造変化はなく、従って静電環境の影響のみを純粹に解析するには適した分子であると考えられる。

【実験】

NMR測定はBruker AM400分光計を用いて、40 °Cで行った。pH 1.5-9.9間の計17点でTOCSYスペクトルを測定し、既に行われている帰属¹に従って各プロトンの滴定曲線を作成した。解離基のpK_aは、当該解離基に最も近い原子の滴定曲線からプログラムPKA-I³により決定した。

立体構造に基づく各解離基のpK_aは、プログラムMEAD⁴を用いて行った。既にNMRにより決定された18個の構造(PDBファイル2BI6)を鋳型として、さらに化学シフト情報も組み入れてAMBERのSANDERモジュールを用いて再計算を行った。そして得られた各構造(3BI6)に対応するpK_aの平均値を求めた。計算法の骨子は、各原子の電荷を解離により変化する通常のformal chargeと原子間の分極に基づくpartial chargeとに分け、各解離基のpK_aに影響を及ぼす因子として ΔpK_{Born} 、 $\Delta pK_{\text{background}}$ 、 $\Delta pK_{\text{interact}}$ の3種を、Poisson-Boltzmann方程式により見積もることである。 ΔpK_{Born} は解離

キーワード：解離定数、構造、静電物性、pK_aの理論計算、pH滴定

はたの けんいち、こじま まさき、たのくら まさる、たかはし けんじ

基の電荷が周囲に誘起した分極とその電荷自身との相互作用による項、 $\Delta pK_{\text{background}}$ は解離基の電荷と解離基以外のpartial chargeとの相互作用による項、 $\Delta pK_{\text{interact}}$ は解離基の電荷と当該解離基以外のformal chargeとの相互作用による項である。これら3因子の総和を、アミノ酸モデル化合物（またはランダムコイル状態）の pK_a 値³からのずれとして評価した。

【結果と考察】

pH滴定実験により明らかになったBI-VIの各解離基の pK_a を右表に示す。各モデルペプチドの pK_a 値と比べると、そのほとんどが同じであった。しかしGlu1^HとGlu2^HならびにAsp9^HそしてAsp32^Hの側鎖カルボニル基の実測 pK_a (pK_{exp})は、約1 unit以上もモデルペプチドのそれらより小さい値をとっていた。またSer4^HとLys19^Hのアミドプロトン(NH)の化学シフトがpH 4以上で急激に低磁場にシフトしており、水素結合に関与していることが示唆された。3BI6の構造から考察すると、Asp9^Hの側鎖カルボキシル基は、Ser4^HのNHと水素結合している可能性が示唆された(18構造中13個で距離

Table. Ionization Constants of the Ionizable Groups in BI-VI at 40 °C in H₂O

Residue (Group)	ΔpK_{Born}	ΔpK_{back}	$pK_{\text{intrinsic}}$	pK_{calc}	pK_{exp}
<i>Light chain</i>					
Thr1 ($\alpha\text{-NH}_2$)	-0.9	-1.0	5.6	7.5 ± 1.0	7.5 ± 0.1
Glu5 ($\gamma\text{-COOH}$)	0.8	-1.0	4.2	5.4 ± 1.3	4.0 ± 0.1
Arg11 ($\alpha\text{-COOH}$)	0.8	-0.9	3.9	4.0 ± 0.9	3.2 ± 0.1
<i>Heavy chain</i>					
Glu1 ($\alpha\text{-NH}_2$)	-2.3	-0.6	4.6	11.1 ± 1.8	7.7 ± 0.1
Glu1 ($\gamma\text{-COOH}$)	0.7	0.0	5.1	3.4 ± 1.8	3.3 ± 0.1
Glu2 ($\gamma\text{-COOH}$)	0.9	-1.0	4.3	4.8 ± 1.4	3.3 ± 0.1
Asp9 ($\beta\text{-COOH}$)	0.9	-2.2	2.8	2.9 ± 0.6	3.0 ± 0.2
Asp13 ($\beta\text{-COOH}$)	0.9	-1.5	3.5	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.1
Glu24 ($\gamma\text{-COOH}$)	0.9	-0.3	5.1	5.3 ± 1.3	4.2 ± 0.1
Asp32 ($\beta\text{-COOH}$)	2.4	-2.9	3.5	2.6 ± 2.6	3.1 ± 0.2
Asp38 ($\beta\text{-COOH}$)	1.7	-0.8	4.9	2.1 ± 1.9	3.6 ± 0.2
Lys41 ($\alpha\text{-COOH}$)	0.4	-0.6	3.8	3.7 ± 1.0	3.5 ± 0.2

$pK_{\text{intrinsic}}$ is defined as the pK_a of the site when all other ionizable sites in the protein are neutralized.

2.2 ± 0.2 Å, 二面角16 ± 7°)。一方、Asp32^HのそれはLys19^HのNHと水素結合している可能性が示唆された(18構造中7個で距離2.4 ± 0.2 Å, 二面角26 ± 5°)。

一方、BI-VIの立体構造に基づき計算した pK_a (pK_{calc}) 及びその内訳を右表に示した。実測値と計算値との比較により、1)Glu1^H主鎖アミノ基の計算値が実測値と比較して極めて高い、2)Glu2^H, Asp38^Hの側鎖 pK_a の計算値が実測値よりも高い、ことがわかった。この原因を、NMRコンフォメーションアンサンブルの多形性に基づいて以下のように解析した。

pK_a の計算に鑄型として用いた18個の構造はGlu1^HとAsp38^Hの位置関係により、2群 即ち、A)Glu1^Hアミノ基とAsp38^Hカルボキシル基が近距離にあり直接クーロン相互作用できうる構造、B)上記官能基が直接相互作用できない構造、に分類できる。A群には11個の構造が該当し、B群には7個が該当する。各グループ内の pK_a の平均値は、Glu1^Hアミノ基に関してA群11.85、B群9.84、Asp38^Hカルボキシル基に関しては各々0.63、3.62となり、B群の方が実測値によく対応していることがわかった。このことはNMRの距離情報から得られた各構造の中で、実際にはGlu1^Hアミノ基とAsp38^Hカルボキシル基とが直接相互作用していないものが、溶液中における真の構造であることを示唆している。同様なアンサンブルの解析によりGlu1^Hの側鎖カルボキシル基が自身の主鎖アミノ基と、Glu2^Hの側鎖がArg11^Hの側鎖と直接クーロン相互作用していることが示唆された。

以上のように多次元NMRを用いたpH滴定実験と立体構造に基づく pK_a の理論計算を組み合わせると、蛋白質分子の静電的性質を網羅的に解析することができる。発表では、上記以外の解析や本研究により明らかになったBI-VI分子全体の静電相互作用ネットワークそしてその阻害活性との相関についても提示する。

1. Hatano, K. et al. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **232**, 335-343.
2. Hatano, K. et al. (1996) *Biochemistry*, **72**, 104-107.
3. Tanokura, M. et al. (1976) *Biopolymers*, **15**, 393-401.
4. Bashford, D. and Gerwert, K. (1992) *J. Mol. Biol.*, **224**, 473-486.
5. Nozaki, Y., and Tanford, C. (1967) *Methods Enzymol.*, **11**, 715-734.

ペプチド・蛋白質のbicelleへの組み込みとNMR測定

○落合研次1、森川友仁1、野口真路1、林 和彦1、楠 英樹1、窪田健二1、
須貝真理子2、河野俊之2、若松 馨1
(群大工1、三菱化学学生命研2)

Reconstitution of peptides and proteins into bicelle and NMR measurement

K. Ochiai, T. Morikawa, S. Noguchi, K. Hayashi, H. Kusunoki, K. Kubota, M. Sugai*, T. Kohno*, K. Wakamatsu
Gunma University, *Mitsubishi kasei Institute of Life Sciences

As a basis to employ isotropic bicelles as membrane-mimic, we first analyzed dependences of mean hydrodynamic radius of DMPC/CHAPSO bicelles on DMPC/CHAPSO ratio (q), total lipid concentration, and temperature. Temperature- and q value-dependences of spectrum were also analyzed of a uniformly ^{15}N -labeled short peptide reconstituted in DMPC/CHAPSO bicelles.

[序論]

bicelleはリン脂質とdetergentの混合物が形成するdisk状の会合体で、中央部分は脂質二重膜、縁の部分はミセル状の構造をとる。近年、溶液中の蛋白質を配向させるために頻用されている。

膜と相互作用するペプチド・タンパク質に関する従来のNMR研究は、主にガラス板に積層した二重膜・リボソーム・ミセルを用いて解析されてきた。ここで、用いる脂質の形態によって測定法や得られる情報の種類が異なる。bicelleは二重膜構造の部分の有していること・会合体が小さいことから、これにペプチドや蛋白質を組み込めればより生理的な環境に近い有用な情報が得られると期待される。本研究では光散乱法を用いたbicelleのcharacterization及び、ペプチドを組み込んだサンプルのNMR測定を行った。

[実験]

bicelleを形成するためにリン脂質としてDMPCを、detergentとしてCHAPSOを用いた。bicelleの平均流体力学半径の組成比($q = [\text{phospholipid}] / [\text{detergent}]$)・濃度・温度依存性を調べるために、水溶液の動的光散乱測定を行った。試料はポアサイズ0.2 μm のナイロンフィルターを通すことにより光学的に精製した。相関計はALV-5000/E(ALV社)を用い、波長488.0 nmのArイオンレーザーを光源とした自作の光散乱装置を使用した。散乱角 $30^\circ, 45^\circ$ で測定した散乱光強度の自己相関関数からStokes-Einsteinの関係式を用いて平均流体力学半径を算出した。

^{15}N で一様にラベルした15残基のペプチド、[^{15}N]mastoparan-X-Gly ([^{15}N] MPX-G)はubiquitin fusionとして大腸菌で発現し、切断・精製した。bicelle ($q = 0.5$ or 1.0)に組み込んだ[^{15}N] MPX-GのHSQCスペクトルはBruker ARX-400で測定した。bicelleのシグナルは磁場勾配によるcoherence selectionで消去した。なお、今回の測定条件下では、bicelleは磁場中で配向していないisotropicな状態である。

[結果・考察]

Fig. 1に光散乱の測定結果を示す。bicelleの平均流体力学半径は組成比に大きく依存していることが分かった (Fig. 1A)。特に $q = 1.0$ を越える組成で顕著に大きくなることが分かった。また、濃度

キーワード: bicelle、ペプチド、蛋白質、安定同位体ラベル

おちあい けんじ、もりかわ ともひと、のぐち しんじ、はやし かずひこ、くすのき ひでき、くばた けんじ、すがい まりこ、こうの としゆき、わかまつ かおり

(Fig. 1B) および温度 (Fig. 1C) を変えても、測定を行った範囲内で半径はほぼ変わらないことが分かった。しかし、低濃度では温度を高くすると水溶液の白濁が見られた。これらのことから、NMR測定に用いるときは $q = 0.5 \sim 1.0$ の組成で高濃度のものが適していると考えられる。

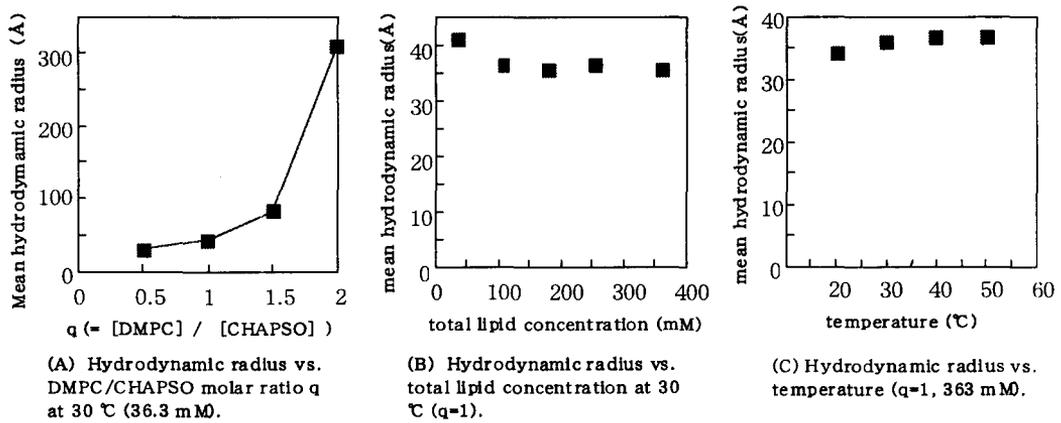


Fig.1 Light scattering of bicelle

Fig. 2にDMPC/CHAPSO ($q = 0.5$) のbicelleに組み込んだ $[^{15}\text{N}]$ MPX-GのHSQCスペクトルを示す。bicelleの大きさは温度によってあまり変化しないにもかかわらず、シグナルの線幅は大きな温度依存性を示した (Fig. 2A)。また、線幅は q 値にも大きく依存した (Fig. 2B)。Fig 2Cに $q = 0.5$, 40 °Cでの2次元HSQCスペクトルを示す。

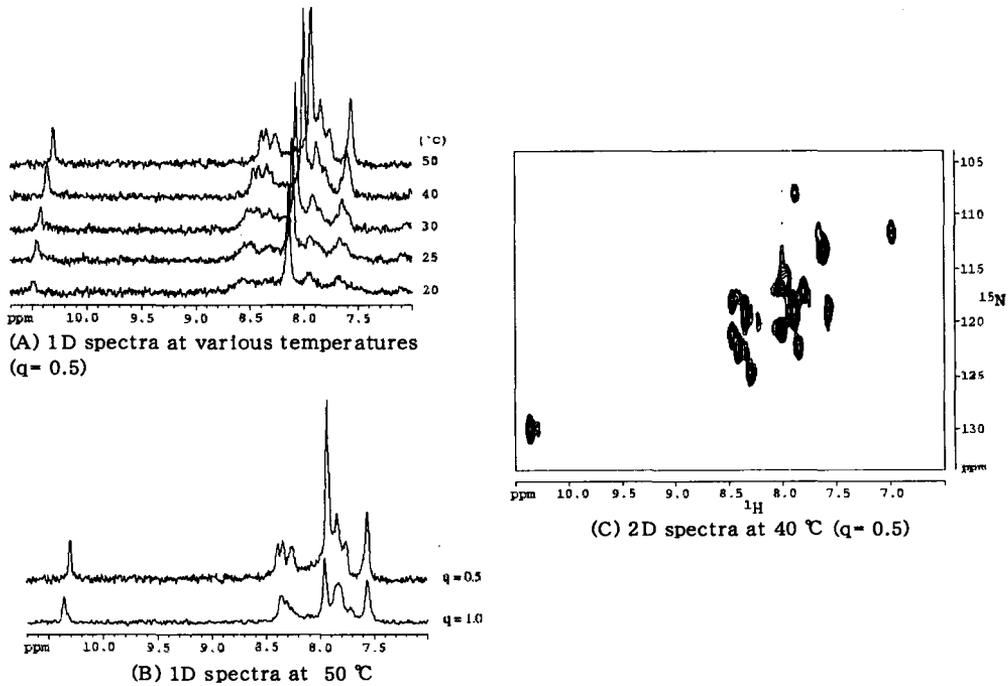


Fig.2 HSQC spectra of $[^{15}\text{N}]$ MPX-G in DMPC/CHAPSO bicelle

今後、 ^{13}C と ^{15}N でラベルしたサンプルについてbicelle中の構造を解析する予定である。また、蛋白質を温和な条件でbicelleに組み込む条件も検討中である。

NMR 法による SDS ミセルとインフルエンザヘマ
 グルチニン由来の膜融合ペプチドの相互作用解析
 工業技術院 生命工学工業技術研究所

○千葉かおり 1、根本暢明 2、中西洋志 1

1 工技院 生命研、2 バリアンテクノロジーズジャパン (株)

Interaction Analysis between SDS Micelle and Fusion Peptide from Influenza Hemagglutinin by NMR

Kaori Chiba-Kamoshida¹, 2Nobuaki Nemoto², Hiroshi Nakanishi¹

Influenza Hemagglutinin exists on the surface of influenza virus particles. It is one of the most well-examined molecule playing important roles in virus-infection process. Following the binding between receptor saccharides on a target cell membrane and the pocket-like structure of hemagglutinin, N-terminal of one subunit of hemagglutinin is inserted into the target membrane as the first step of membrane fusion process. We observed the membrane-bound structure of the fusion peptide using wild-type 20mer peptide without any modification on the peptide sequence. The NMR result showed that the peptide binds the SDS micelles keeping its N-terminal 14 amino acids inside the SDS micelle.

インフルエンザウイルスを構成するタンパク質のアミノ酸は突然変異をおこしやすい易いという特徴を持っているため、毎年膨大な数の新種のインフルエンザウイルスが出現し、流行をくり返している。しかし、抗原性の変化を伴う多くの変異体が存在する主要表面タンパク質ヘマグルチニンでも、膜融合ペプチド部分のアミノ酸配列は多くの型のウイルスで非常によく保存されている。我々はインフルエンザウイルスの感染過程を解明する上で重要な膜融合過程を分子論的に明らかにすることを目的として、このように高度に保存されたアミノ酸配列を持つ膜融合

キーワード SDS インフルエンザ ヘマグルチニンウイルス 膜融合

ちばかおり ねもとのぶあき ちばかおり

ペプチドが膜とどのように相互作用しているかを調べた。実験には、Aichi/68 型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(H3 型)由来の膜融合ペプチドである H2 サブユニットの N 末端の 20 アミノ酸を使用した。これを 300 mM のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)と混合してペプチド-SDS ミセル複合体を作り、膜融合が起こるといわれている pH5 で、膜融合ペプチドが SDS とどのように相互作用しているのかを NMR 法で調べた。NMR では、まず DQF-COSY、TOCSY、NOESY の二次元スペクトルを用いてペプチドのプロトンのピークのアサイメントを行った。その後、ペプチドが SDS ミセルに対してどのように突き刺さっているかを調べるために、5-ドキシルステアリン酸または 12-ドキシルステアリン酸を加えてスペクトルの変化を観測した。5-ドキシルステアリン酸を加えた実験からは、20 残基の膜融合ペプチドのうち、C 末端の 6 アミノ酸以外のアミノ酸からのプロトンのシグナルが消失したことから、N 末端側の 14 アミノ酸残基は SDS ミセルの中に埋め込まれており、C 末端側の 6 残基は膜の外に突き出しているという結果を得た。また、12-ドキシルステアリン酸を加えた実験では、N 末端側から 2 番目と 3 番目付近のアミノ酸残基からのシグナルの強度が弱くなっている事から、12-ドキシルステアリン酸のドデシル基が存在する SDS ミセルの中心付近にこれらのアミノ酸残基が存在する事が示唆された。

Vesl/Homerタンパク質、Vesl-1Sの 溶液構造解析

(¹三菱化学生命研、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

Solution Structural Analysis of Vesl/Homer Family Protein, 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 residues, 21 kDa), whose expression is upregulated during long term potentiation in the hippocampus neurons, is thought to participate in the formation of synaptic plasticity by negatively regulating the clustering and the assembling of group I metabotropic glutamate receptors and inositol triphosphate receptors. The N-terminal 110 residues of Vesl-1S contains EVH1 domain which binds to proline rich motif, PPXXF, found in the receptors.

Here we report the nearly complete ¹³Cα, ¹Hα, ¹³Cβ, ¹Hβ and ¹³CO NMR assignments of Vesl-1S using triple resonance 3D NMR spectroscopy on uniformly ¹⁵N/¹³C labeled Vesl-1S. Furthermore, we investigated the chemical shift perturbation of uniformly ¹⁵N labeled Vesl-1S upon binding to the peptides derived from the receptors. We also investigated the interaction of C-terminal region with N-terminal region using the C-terminal 61 residues deleted Vesl-1S.

Vesl/Homerファミリータンパク質（～394残基）はシナプス後肥厚においてタンパク質-タンパク質間相互作用のアダプタータンパク質として機能し、I型代謝型グルタミン酸レセプター（mGluR1/5）・IP3レセプター（IP3R）・リアノジンレセプター（RyR）のクラスタリング・アセンブリ・トラフィックを制御している。Vesl/Homerタンパク質はN末端110残基にEVH1ドメインを持ちレセプター細胞内領域のPPXXF配列と選択的に結合する。また、C末端領域にはロイシンジッパーモチーフ配列を持ちcoiled-coil相互作用によって2量体を形成する。

Vesl-1S/Homer 1a (186残基、21 kDa) はロイシンジッパーモチーフ配列を持たないためdominant-negativeとして機能し、恒常的に発現する他のVesl/Homerタンパク質とは異なりシナプスの長期増強に伴い海馬ニューロンにおいて発現誘導されることからシナプス可塑性の形成に関与し、記憶・学習の分子機構に関与していると考えられている。我々はNMRを用いVesl-1Sの溶液構造を明らかにし、選択的リガンド認識機構およびVesl-1Sに特徴的なC末端領域の機能を解明することを目指している。

キーワード：Vesl/Homer、Vesl-1S、多次元NMR、立体構造解析

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

<実験>

^{15}N ユニフォームラベルおよび $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 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% H_2O - 10% D_2O 100 mMリン酸バッファー (pH 6.5) を用い30°Cで行った。また、PPXXF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 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ユニフォームラベルしたVesl-1Sを用いHNCA、HN(CO)CA、HNCACB、CBCA(CO)NNH、HNCO、HN(CA)COを測定し、側鎖シグナルの帰属のためにHBHA(CBCACO)NNH、HCA(CO)NNH、HCCH-TOCSY、CC(CO)NNH、H(CCCO)NNHを測定した。また、 ^{15}N ユニフォームラベルしたVesl-1Sを用い ^1H - ^{15}N 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。さらに、Vesl-1Sに特徴的なC末端領域とEVH1ドメインとの相互作用を末端領域欠損ミュータントを用い検討した。

<結果および考察>

現在までに $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベルしたVesl-1Sの90%の $^1\text{H}\alpha$ 、97%の $^{13}\text{C}\alpha$ 、76%の $^1\text{H}\beta$ 、96%の $^{13}\text{C}\beta$ および93%の ^{13}CO シグナルを帰属した。また、 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上でPro残基を除く176残基中165残基を帰属した (94%)。帰属された $^1\text{H}\alpha$ 、 $^{13}\text{C}\alpha$ 、 $^{13}\text{C}\beta$ 、 ^{13}CO シグナルのchemical shift indexからVesl-1SのN末端領域は水溶液中で2個の α ヘリックスと8個の β ストランドからなるEVH1ドメインを形成していることが示唆された。一方、C末端領域は典型的な2次構造を持っていなかった。

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からArg10-Asp17、Thr20-Thr27、Val32-Val34、Thr68-Gln76およびGly87-Ser97の各領域がVesl-1Sとレセプターとの結合に関与していることが示唆された。また、Vesl-1Sに特徴的なC末端領域を欠損したミュータントとワイルドタイプの ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを比較したところ、レセプター結合領域の一部とC末端領域との間に相互作用があることが示唆された。このことはVesl-1SのC末端領域がレセプターとの選択的な結合に関与している可能性を示している。

SSI の低温変性状態に対する圧力効果

Pressure effects on the cold denatured state of SSI.

○笹川拓明¹、田村厚夫¹、神村耕二¹、山田博明²、赤坂一之¹○Hiroaki Sasakawa¹, Atsuo Tamura¹, Koji Kamimura¹, Hiroaki Yamada², Kazuyuki Akasaka¹

1 神戸大・自然科学、2 神戸大・理

1Graduate School of Science and Technology, Kobe University, 2Department of Science, Kobe University

Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI) is a dimeric 23kDa serine protease inhibitor isolated from *Streptomyces albogriseolus*. SSI gives rise to the heat denaturation at high temperature and the cold denaturation at lower pH and around freezing temperature. The tertiary structure of the cold denatured SSI is partially structured and differs completely from the tertiary structure in the native state. NMR measurements were performed at various pressures and temperatures on a Bruker DMX-750 spectrometer operating at proton frequency of 750.13MHz to investigate volumetric characterizations of the denatured state. Volumetric parameters ($\Delta\beta$, ΔV_D) were obtained from the experimental data. The phase diagram of the cold denatured SSI on temperature and pressure was drawn from the estimated volumetric parameters. The compressibility change $\Delta\beta$ for the cold denatured(D') to the more highly denatured(D) state turned out to be very large(0.11 ml/mol bar), which suggests the D state has a structure with ample volume fluctuation.

圧力をパラメータとする研究は蛋白質の構造転移に伴う体積及び圧縮率の変化といった新しい情報をもたらす。しかしこれまで蛋白質の変性構造に対する圧力効果の研究は、ほとんど報告例がない。放線菌 *Streptomyces albogriseolus* s-3253 の生産する二量体タンパク質 *Streptomyces subtilisin inhibitor*(SSI)(文献 1) の低温変性状態 (D' 状態) は単量体で且つ特異な三次構造をもつことがこれまでの研究により明らかにされ

キーワード: 高圧NMR、圧力変性、圧縮率、変性状態構造

著者ふりがな: ささかわ ひろあき、たむら あつお、かみむら こうじ、やまだ ひろあき、あかさか かずゆき

ている（文献2、3、4）。このSSIのD'状態に対して30barから2000barの範囲を、神戸大学において開発されたオンラインセル高圧NMR法（¹H共鳴周波数750MHz）により¹H-NMRスペクトルの変化を測定した。

加圧によりD'構造は極めて容易により高度の変性構造(D)に転移した(Fig.1)。Hisの環プロトン及び低磁場シフトしたαプロトン信号の積分強度から得られた転移中点の圧力は、6°Cで524bar、4°Cで644bar、2°Cで688barと、天然構造の蛋白質の場合（多くは数千bar）と比べてはるかに低い。また10°C以下におけるD'構造の存在比は、30barから加圧とともに増加し、一旦200barから300barの間で最大となり、さらに加圧すると減少する(Fig.2)。そこで温度、圧力の関数としてタンパク質の安定性を記述する式(1)に対して最小二乗法の計算を行うことにより、種々の熱力学的パラメーターの導出を試み、相図を作製した(Fig.3)。それによると体積変化量であるΔV₀は-10.44mol/molと比較的小さいが圧縮率変化Δβの値が0.11ml/mol barと他の天然状態のタンパク質（約0.02ml/mol bar）に比べて非常に大きな値を持つことが分かった。つまりこれはD'構造よりD構造の方が非常に圧縮されやすい状態であり、D状態が非常に体積ゆらぎの大きい構造を持つことを示唆している。

さらにSSIの構造転移に伴う圧縮率変化の大きい原因を明らかにするために、15N同位体標識資料を大腸菌より作製し、様々な温度、圧力で1H-15N HSQCの測定を行い、この結果を併せて報告する予定である。

$$\Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \Delta C_p \left[T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] + \Delta V_0(p - p_0) + \frac{\Delta \beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta \alpha(p - p_0)(T - T_0) \quad (1)$$

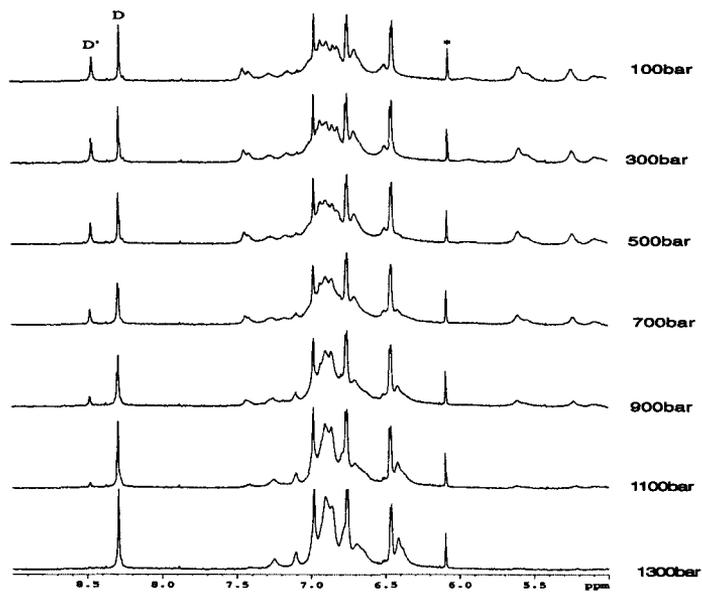
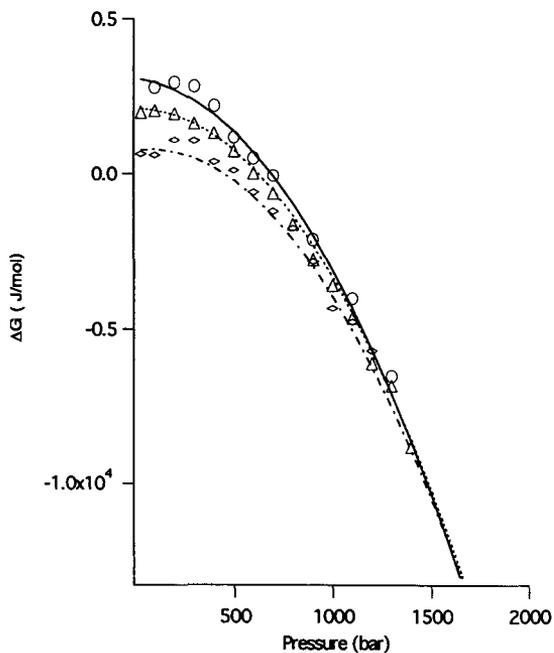


Fig.1-a Pressure dependence of the aromatic region for the ^1H NMR spectra at $\text{pH}^* 1.6$ and



The transition curves of the cold denatured for SSI at various temperature on P- ΔG plane. Open circle: 2°C ; open triangles: 6°C ; open squares: 10°C .

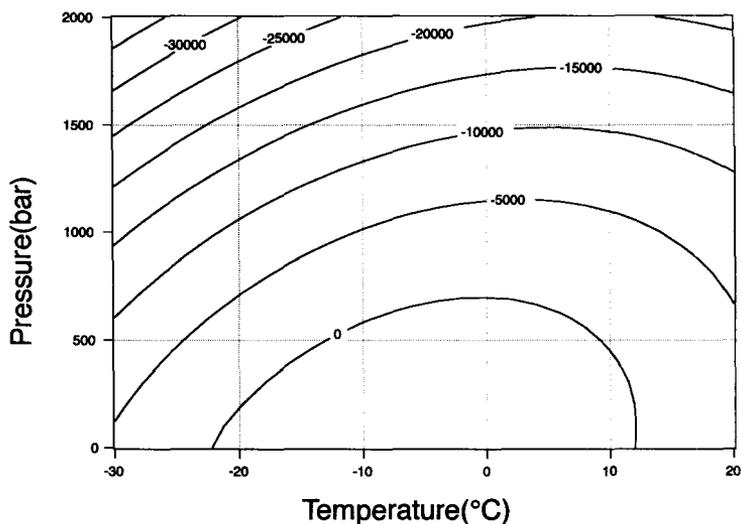


Fig.3 The phase diagram of the D' state SSI on temperature and pressure. Values shows Gibbs free energy (J/mol).

文献

1. Hiromi, K., Akasaka, K., Mitsui, Y., Tonomura, B. i., and Murao, S. (1985) Protein Protease Inhibitor - The Case of Streptomyces Subtilisin Inhibitor, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
2. Tamura, A., Kimura, K., Takahara, H., and Akasaka, K. (1991) *Biochemistry* **30**, 11307-11313.
3. Tamura, A., Kimura, K., and Akasaka, K. (1991) *Biochemistry* **30**, 11313-11320.
4. Konno, T., Kataoika, M. Kamatari, Y., Kanaori, K., Nosaka, A. & Akasaka, K. (1995) *J. Mol. Biol.* **251**, 95-103.

残基間 $^3J_{\text{NC}}$ スカラカップリング観測によるプロテイン G
水素結合への圧力効果

(¹神戸大院・自然、²神戸大・理、³NIH)

○李 華¹、山田博昭²、赤坂一之^{1,2}、Angela M. Gronenborn³

Pressure Effect on Hydrogen Bonds in Protein G Studied through Interresidue
 $^3J_{\text{NC}}$ Scalar Couplings

(¹Graduate School of Science and technology and ²Faculty of Science, Kobe University;

³National Institute of Health, USA)

○ Hua Li¹, Hiroaki Yamada², Kazuyuki Akasaka^{1,2}, and Angela M. Gronenborn³

Pressure-induced changes in $^3J_{\text{NC}}$ scalar couplings through hydrogen bonds were investigated in the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G. ¹H, ¹⁵N and ¹³C triple-resonance NMR spectroscopy coupled with the on-line high pressure cell technique was used to monitor eleven $^3J_{\text{NC}}$ scalar couplings at 30 and 2000 bar in uniformly labeled ¹⁵N and ¹³C protein isotopes. Both increased and decreased $^3J_{\text{NC}}$ scalar couplings were observed at high pressure. No correlation with secondary structure was apparent. The difference in coupling constants as well as pressure-induced chemical shift data suggests a compaction of the helix ends and an increase of the helix pitch at its center in response to pressure. Our data provides the first direct evidence that the electronic orbital overlap in protein backbone hydrogen bonds is altered by pressure.

【序論】 水素結合は蛋白質や核酸の構造安定化に寄与し、酵素反応の調節、水との相互作用などの生命活動に欠かせない働きをする。水素結合の存在は、普通、蛋白質や核酸の立体構造が x 線や NMR で決定された後、原子間距離から間接的に推定される。近年、水素結合を介したスカラカップリングの存在が、核酸と蛋白質を対象とする研究から次々と検出され、水素結合ペアの同定や核酸と蛋白質の構造決定の有力の手段となった。また、水素結合を介したスカラカップリングの存在は、水素結合ドナーとアクセプター原子の間に電子雲が重なり、水素結合が共有結合の性質を持つ直接的な証拠である。そこで、我々は常圧と加圧下で、蛋白質の水素結合を介したスカラカップリング定数を測定し、水素結合への圧力効果を調べた。

Keywords: high pressure, hydrogen bond, $^3J_{\text{NC}}$ scalar coupling, protein G

り か、やまだ ひろあき、あかさか かずゆき、Angela M. Gronenborn

【実験】 ^{13}C 、 ^{15}N 均一標識した Immunoglobulin 結合ドメインのプロテイン G を 100 mM MES バッファー(90% H_2O /10% D_2O)に溶かし、10 mM 蛋白質試料溶液を得られ、pH5.6 に調節した。神戸大で開発したオンライン高圧 NMR 装置を用い、遅延時間 2T をそれぞれ $1/(2^1J_{\text{NC}})$ 、 $3/(2^1J_{\text{NC}})$ 、 $4/(2^1J_{\text{NC}})$ に合わせた HNCQ 測定を、 25°C 、30 bar と 2 kbar でそれぞれ行い、水素結合を介したスカラカップリング定数($^3hJ_{\text{NC}}$)を求めた。

【結果と考察】 遅延時間 2T をそれぞれ $1/(2^1J_{\text{NC}})$ 、 $3/(2^1J_{\text{NC}})$ 、 $4/(2^1J_{\text{NC}})$ に合わせた HNCQ スペクトルから、文献の計算方法に従い、30 bar と 2 kbar とでプロテイン G の水素結合を介したスカラカップリング定数($^3hJ_{\text{NC}}$)を求めた⁽¹⁾。図 1 には、30 bar と 2 kbar での参考 HNCQ スペクトル [2T = $3/(2^1J_{\text{NC}})$] と長距離 HNCQ スペクトル [2T = $4/(2^1J_{\text{NC}})$] の代表的領域を示す。プロテイン G は 2 kbar で変性しないことがわかる。

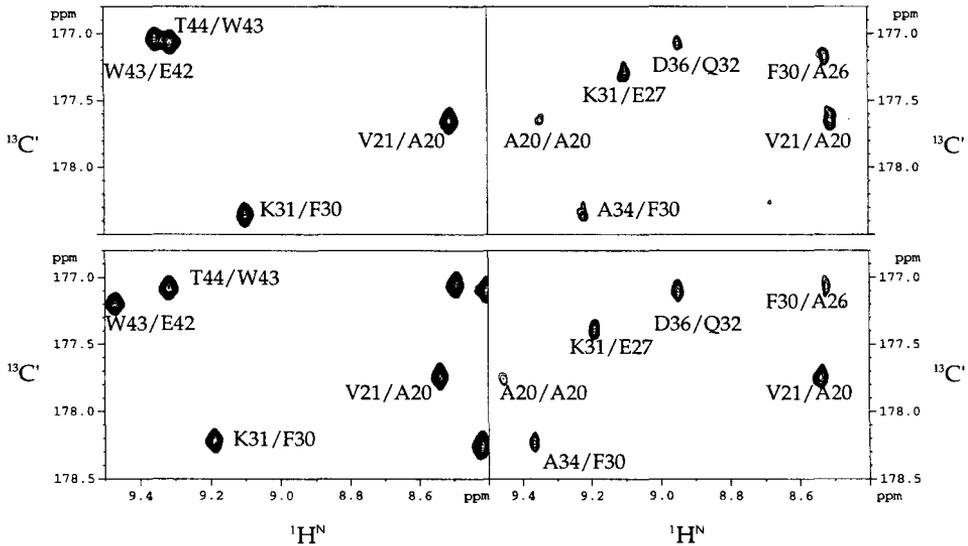


Fig.1 Representative regions of 2D CT-HNCQ spectra obtained with different dephasing time. 100 ms (left) and 132 ms (right), at 30 bar (upper panel) and 2000 bar (lower panel). Each cross peak is labeled by the residue number of the amide proton and the carbonyl carbon involving the H-bond.

高圧セルの小さい試料容積(~20 μl)のため、今回プロテイン G の水素結合対のうち、0.5 Hz より大きい 11 個 $^3hJ_{\text{NC}}$ についてのみ測定可能であった。この 11 個の $^3hJ_{\text{NC}}$ は蛋白質の二次構造とループ領域に遍在し、加圧下で $^3hJ_{\text{NC}}$ の絶対値は増加する(水素結合が強くなる)のもあれば、減少する(水素結合が弱くなる)のもある。圧力による $^3hJ_{\text{NC}}$ 絶対値の変化を、プロテイン G のトポロジー上にマッピングしたのは図 2 で

ある。図 2 で示すように、水素結合の圧力応答は非均一であり、ループ領域の水素結合の強まり、二次構造、特にヘリックス真ん中あたりの水素結合の弱まりが起こる。圧力による ${}^3J_{NC}$ の変化は +0.08 Hz ~ -0.12 Hz の範囲に収まり、これは見かけ上の水素結合距離 N...O の変化 +0.045 Å ~ -0.037 Å に相当する。

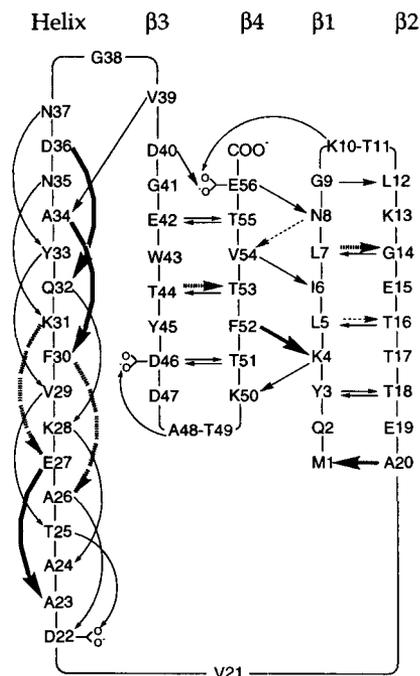


Fig. 2 Schematic drawing of the secondary structure of protein G with hydrogen bond networks marked by arrows. Increased ${}^3J_{NC}$ couplings induced by pressure are indicated by thick solid arrows, decreased ${}^3J_{NC}$ couplings are indicated by thick dashed arrows, and ${}^3J_{NC}$ with no change are indicated by thin dotted arrows.

${}^3J_{NC}$ から得られた結果は、圧力によるアミドプロトンの化学シフト変化の結果と一致している^(2,3)。図 3 では、アミドプロトンの圧力シフトのヒストグラムを示した。図 3 でわかるように、ほとんどのアミドプロトンが圧力による低磁場シフト傾向を示すが、ヘリックス真ん中あたりの Val29、Gln32、Asn35 のアミドプロトンが高磁場シフトしている、つまり、 ${}^3J_{NC}$ からの結果と同じく、ヘリックス真ん中あたりの分子内水素結合が弱まることを意味する。さらに、図 4 では、圧力による ${}^3J_{NC}$ の変化(図 4A)と、それらとアミドプロトンの化学シフト変化との相関(図 4B)を示した。

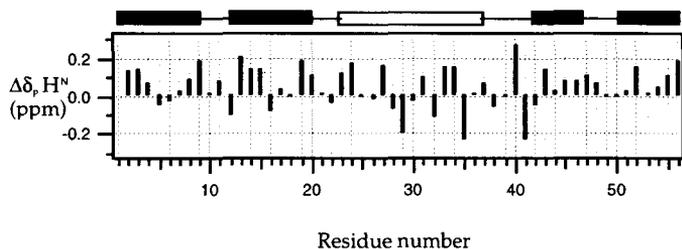


Fig. 3 Pressure-induced chemical shift changes for individual amide protons. The positions of the β -sheets and the helix of protein G are indicated by solid and open rectangulars, respectively.

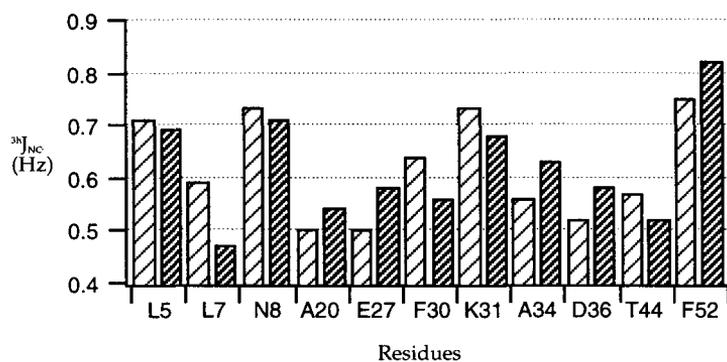


Fig. 4A ${}^3J_{NC}$ for 11 H-bond pairs measured at 30 bar (light dashed columns) and 2 kbar (dark dashed columns), respectively.

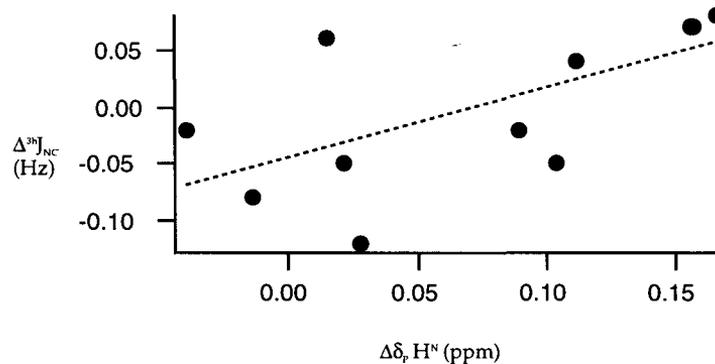


Fig. 4B Correlation plot between the pressure-induced changes of ${}^3J_{NC}$ and those of chemical shifts of amide protons. The correlation coefficient between them is 0.64.

本実験は、加圧により水素結合のドナー及びアクセプター原子の間で、電子雲の重なりが変化することを、はじめて実験的に証明したもので、今後加圧下での電子伝達反応などの経路及びその予測に役立つと期待される。

【参考文献】

1. Cornilescu, G., Ramirez, B. E., Frank, M. K., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., and Bax, A. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6275-6279.
2. Li, H., Yamada, H., and Akasaka, K. (1998) *Biochemistry* **37**, 1167-1173.
3. Akasaka, K., Li, H., Yamada, H., Li, R., Thoresen, T., and Woodward, C. K. (1999) *Protein Sci.* **8**, 1946-1953.

【謝辞】本実験にご協力いただいた日本ブルカー社 Dr. Markus Wealchli に厚くお礼申し上げます。

溶解度の限られている蛋白質の主鎖シグナルの効率的帰属

(生物分子工学研¹、CREST 堀田プロジェクト²) ○廣明秀一¹、
清水真人²、武藤隆則¹、森川耿右¹、堀田凱樹²、神田大輔¹

An Efficient Assignment Strategy of Backbone Signals of Protein of Limited Solubility

(Biomolecular Engineering Research Institute¹, CREST²) ○Hidekazu Hiroaki¹, Masato Shimizu², Takanori Muto¹, Kousuke Morikawa¹, Shigeki Hotta² & Daisuke Kohda¹

Abstract In a protein solution of high concentration such as a NMR sample, apparent molecular weight of the sample increases because of self-association in a non-specific manner. It causes severe loss of signal-to-noise ratio in some 3D triple resonance experiments, so that assignment of the backbone signals becomes difficult. We found that a systematic use of inverse ¹⁴N labeling of the protein may overcome this shortage of the NMR information necessary for the assignment. In the inverse labeling protocol, ¹⁴N amino acids are supplemented to minimal media of ¹⁵N background, and the NH signals of the corresponding amino acids are vanished from the ¹⁵N/¹H-HSQC spectra. A combination of the inverse ¹⁴N labeling and our in-house assignment program facilitates the assignment of the backbone signals from 3D-NMR data sets of limited signal-to-noise ratio.

【序】 蛋白質の主鎖の信号の帰属は、NMRによる蛋白質解析の重要なステップの一つである。分子量 15kD 程度までの「性質のよい」蛋白質試料は、¹³C/¹⁵N の安定同位体標識を導入することで、最少では CBCA(CO)NH と HNCACB の 2 セットの 3D-NMR の解析により、主鎖の連鎖帰属が得られる。しかし実際には、試料となる蛋白質の溶解度が限られているため、良好なスペクトルが得られないことが多い。特に CBCA(CO)NH と HNCACB の測定法は、試料の非特異的的自己会合（アグリゲーション）による感度低下が著しい。この場合、残基内／残基間の ¹³Cβ 相関の一方または両方が得られないため、アミノ酸タイプの情報が得られず連鎖帰属に困難をきたす。

そこでわれわれはアミノ酸選択的逆ラベル法を多用することで、¹³Cβ によって得られる帰属に必要な情報の一部を補完することを試みた。この方法は、¹⁵N 標識の最小培地中に、¹⁴N アミノ酸を添加することにより当該するアミノ酸のシグナルを ¹H/¹⁵N-HSQC 上で消去することで、アミノ酸タイプの情報を得るものである。この方法を開発中の帰属支援プログラム ASAP と併用することで、限られた S/N の 3次元スペクトルからでも、主鎖シグナルの帰属が可能になった。

【実験】 われわれは、すでに得られている p47-SH3C(66aa)および p47-PX(130aa)

安定同位体標識、逆ラベル、蛋白質、多次元 NMR、自動帰属

ひろあきひでかず、しみずまさと、むとうたかのり、もりかわこうすけ、
ほったよしき、こうだだいすけ

の NMR データと帰属結果をモデルとして用いて、ASAP の開発を行った。帰属の対象となる蛋白質試料 (*E. coli* Vsr (Vsr Δ 20,20-155, 137aa), *Drosophila* gcm DNA binding domain (159aa)) は、大腸菌の発現系を用いて、 ^{15}N 標識、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識およびいくつかのアミノ酸選択的逆ラベルの試料を調製し、2D/3D-NMR の測定を行った。これらの試料はいずれも溶解度に限りがあり、試料濃度は p47-PX と Vsr Δ 20 で 0.6mM、gcm-DBD で 0.5mM であった。

アミノ酸選択的逆ラベルは、 ^{15}N 標識 M9 培地に、蛋白質発現誘導の 30 分~1 時間前に非標識(^{14}N)アミノ酸 100mg/l を添加することにより行った。大腸菌宿主は BL21 または BL21(DE3)を使用し、特別なアミノ酸要求株は用いなかった。

コンピュータプログラムは SGI Octane (IRIX 6.3)上で C 言語を用いて開発した。

【結果と考察】

1. アミノ酸選択的逆ラベル法 本法には、(1)特殊な宿主大腸菌を用いなくとも逆ラベルが可能であること、(2)感度のよい $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC を測定できる十分量 (~0.1mM) の試料しか必要としないこと、(3)培地が安価なこと、といった利点がある。ただし欠点として、(4)複数の組み合わせで逆ラベルを行わなければいけないアミノ酸があり (例えば F/Y、I/V/L など)、得られた情報を直感的に帰属に活用しにくいこと、が挙げられる。この組み合わせ逆ラベルによるアミノ酸タイプの情報を容易に扱えるようにすることが、帰属支援プログラムの開発目的の一つであった。

2. 帰属支援プログラム ASAP ("Assignment Strategy for Aggregation-prone Proteins") 3D-NMR の情報を利用した蛋白質のシグナルの帰属は、 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトル上の NH 相関ピークを一つ一つの都市に見たてた場合に、組み合わせ最適化問題の一つである「巡回セールスマン問題」の特殊な例として考えることができる。ASAP はこの「巡回セールスマン問題」の最適解を検索するプログラムである。入力には、帰属する蛋白質の配列、3D-NMR (HNCA, HN(CO)CA, HNC(O)CA, HN(CA)CO, CBCA(CO)NH, HNCACB) の相関ピークと、逆ラベルによるアミノ酸タイプの情報を用いる。特に、一部のデータ (例えば C β の情報の過半数) が欠損していても、得られている情報だけで帰属最適解の検索を行えるようにアルゴリズムを工夫してある。小さな蛋白質の場合にはすべての残基を考慮して最適解を複数出力する。帰属すべき残基数が多い場合は、20 残基程度のセグメントに分割して、部分最適解を複数出力する。出力は 3D-NMR 解析ソフトウェアのストリップ列として視覚化される。解析者は、画面に表示される ^{15}N -edited NOESY のストリップ列を見て、帰属の妥当なものだけを確定し、帰属されていない残基を再度 ASAP で検索する。このサイクルを数回くりかえすことで、最終的に主鎖の帰属が完成する。

3. 帰属の実際 われわれは Arg 選択的逆ラベル、Lys 選択的逆ラベルと ASAP を併用して、gcm-DBD の帰属を行い、Phe/Tyr 選択的逆ラベルの結果を利用して帰属を検証した。gcm-DBD はとりわけ CBCA(CO)NH / HNCACB の感度が低く、観測された C β の相関ピークは残基間で全体の 5 割程度、残基内は 1 割以下であったが、95%以上の残基を矛盾なく帰属できた。また Vsr Δ 20 の帰属も現在進行中である。アミノ酸選択的逆ラベル法と帰属支援プログラムの組み合わせは、限られた溶解度や自己会合により 3D-NMR の感度の悪い蛋白質を、 ^2H 標識を行わずに帰属するときに適用可能な方法であることがわかった。

抗腫瘍性抗生物質C-1027 の三次元構造

(筑波大・応生/TARAセ¹、東北大・院理²、大鵬薬品³)○田中俊之¹、石塚みどり¹、福田純子²、平間正博²、大谷敏夫³**Three-Dimensional Structure of C-1027, A Chromoprotein Antitumor Antibiotic**

Institute of Applied Biochemistry and Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba¹, Graduate School of Science, Tohoku University², Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.³

Toshiyuki Tanaka¹, Midori O. Ishitsuka¹, Sumiko Fukuda², Masahiro Hiram², Toshio Otani³

The three-dimensional structures of C-1027 apoprotein and its complex with the aromatized chromophore have been determined by homonuclear two-dimensional NMR spectroscopy. The apoprotein is mainly composed of three antiparallel β -sheets. A hydrophobic pocket is formed by the four-stranded β -sheet and two loops. The aromatized chromophore is bound to the hydrophobic pocket with its core benzodihydropentalene moiety centered in the pocket and other substituents arranged around the core. The hydrophobic interactions between the core of the chromophore and the pocket is most likely the main interactions between the apoprotein and its chromophore.

C-1027 is a potent antitumor antibiotic, in which a nonprotein chromophore (**1** in Fig. 1) is tightly and specifically bound to an apoprotein (110 residues). The chromophore, which has an endiyne structure and is responsible for DNA cleavage, is very labile when isolated, but greatly stabilized through binding to the apoprotein. Their binding structure and stabilizing interactions are very interesting problems in terms of molecular recognition and protein transport. Here, we present the three-dimensional structures of C-1027 apoprotein and its complex with the aromatized chromophore determined by homonuclear two-dimensional NMR spectroscopy.

Lyophilized C-1027 apoprotein was dissolved at a concentration of 6.6 to 7.6 mM in either 99.996% D₂O or 90% H₂O/10% D₂O. For the complex form (holoprotein), both lyophilized protein and aromatized chromophore (**2** in Fig. 1) were dissolved in the same solution, and the final concentration of the holoprotein were between 8.3 to 8.6 mM. The pH of the NMR samples was adjusted to 5.0 by addition of microliter amounts of 0.1 M NaOD. Two-dimensional COSY, HOHAHA, and NOESY spectra were recorded at 30 °C on a Bruker AM600 spectrometer. Structure calculations were performed using X-PLOR.

The three-dimensional structure of C-1027 apoprotein was determined on the basis of 1533 experimental restraints derived from NMR spectroscopy. The apoprotein is mainly composed of three antiparallel β -sheets: four-stranded β -sheet (43-45, 52-54; 30-38; 92-94; 104-106), three-stranded β -sheet (residues 4-6; 17-22; 61-66), and two-stranded β -sheet (70-72, 83-85) (Fig. 2). These secondary structure regions are well defined with the atomic r.m.s. deviation

C-1027、クロモプロテイン、溶液構造、芳香環化クロモフォア

たなか としゆき、いしつか みどり、ふくだ すみこ、ひらま まさひろ、おおたに としお

of $0.57(\pm 0.12)$ Å for backbone heavy atoms and $0.98(\pm 0.10)$ Å for all heavy atoms about the averaged minimized coordinate positions. A hydrophobic pocket is formed by the four-stranded β -sheet and two loops (residues 75-79; 97-100). The overall shape of the apoprotein is very similar with those of other chromoprotein apoproteins, such as neocarzinostatin, auromomycin, and actinoxanthin.

The binding structure of C-1027 complex was calculated based on 1533 NMR-derived constraints which include 38 intermolecular restraints between the aromatized chromophore and the apoprotein. The aromatized chromophore is bound to the hydrophobic pocket of the apoprotein (Fig. 3). The benzodihydropentalene core locates in the center of the pocket with its molecular plane almost perpendicular to the bottom of the pocket. The β -tyrosine unit locates on the left side of the core, and both benzoxazine and aminosugar moieties on the right side. The hydrophobic interaction is most likely the major binding interaction between the apoprotein and the aromatized chromophore. Moreover, the 18-amino group of the chromophore locates in the proximity of either the carboxylate of Asp101 or the imidazole ring of His104, which indicates there could be a salt-bridge or a hydrogen bond type interaction between the aromatized chromophore and these side chains.

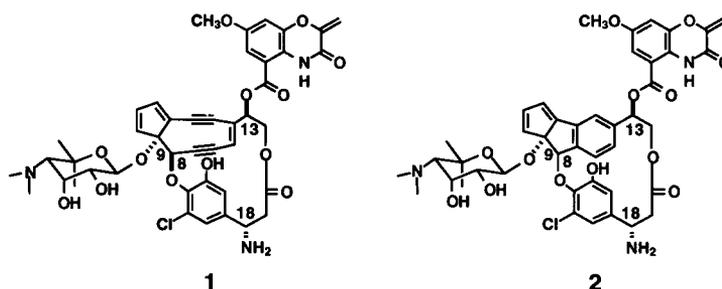


Fig. 1 Chemical structures of C-1027 chromophore (1) and its aromatized product (2).

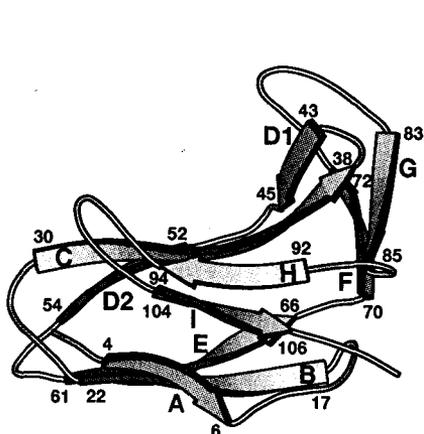


Fig. 2 Ribbon diagram of C-1027 apoprotein.

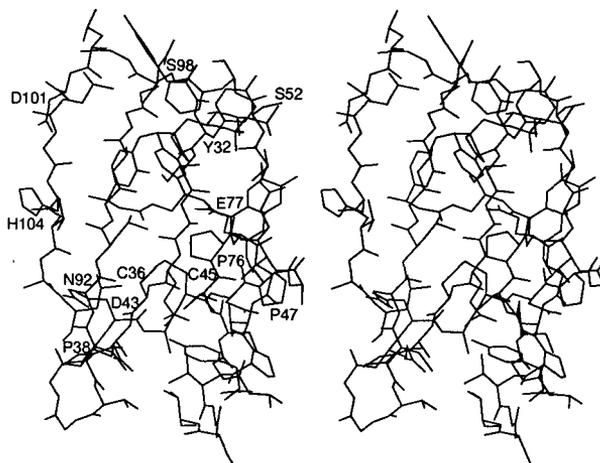


Fig. 3 The binding-site structure of chromophore-apoprotein complex.

E11残基の置換がウシミオグロビンの活性部位構造に及ぼす影響の解析

(筑波大化¹、慶應大医²) ○桑原愛¹、山本泰彦¹、島田秀夫²、石村巽²

Function-Structure Relationship in V68A and V68L Mutants of Bovine Myoglobin

A. Kuwahara¹, Y. Yamamoto¹, H. Shimada², and Y. Ishimura²

¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

²Dept. of Biochem., School of Med., Keio Univ.

Valine E11 in bovine myoglobin has been replaced by alanine or leucine using a site-directed mutagenesis technique and the effects of these amino acid replacements on the active site structure of the protein have been investigated by paramagnetic NMR. The orientation of Fe-bound ligand with respect to the heme has shown to be influenced by the replacement at the E11 position, suggesting that the contact among the E11 residue, the bound-ligand, and/or histidine E7 side chain modulates functional properties of the protein.

【序論】酸素貯蔵ヘムタンパク質であるミオグロビン(Mb)では、酸素などの外部配位子が結合するヘムはEヘリックスとFヘリックスから作られた疎水的空間に挿入されている。本研究では、Mbの外部配位子結合部位近傍に存在し、配位子親和性の調節に重要であると考えられるVal E11を、タンパク質工学的手法によりAla、Leuに置換したウシMbの部位特異的変異体(V68A、V68L)を調製し、アミノ酸置換が活性部位の立体構造に及ぼす影響をNMRにより解析することにより、Mbの機能調節における疎水的なE11残基の役割を明らかにする。MbのX線結晶構造では、E11側鎖はヘム鉄に結合した外部配位子及びHis E7側鎖とコンタクトすることが示されている(Fig.1)。したがって、E11残基の置換は直接的あるいはHis E7とのコンタクトを介して、外部配位子のヘム鉄への結合に影響を及ぼす、すなわち、Mbの機能が影響を受ける、と考えられる。そこで、E11残基と外部配位子との相互作用について詳細な構造化学的情報を得るため、O₂のモデルとなる二原子分子CO、CN⁻、直線三原子分子N₃⁻、そしてかさ高く近傍のアミノ酸側鎖との立体反発が予想されるImidazoleを用いて解析を行った。Mbの外部配位子を系統的に変えてNMR測定を行い、それぞれの配位状態でのヘムの電子構造と活性部位の立体構造の解析を通して、E11残基が外部配位子とヘム鉄との結合に与える影響を明らかにした。

【実験】Mb変異体は、組換え遺伝子を含むプラスミドを導入した大腸菌を培養、抽出、分離、精製して得た。CN⁻体、N₃⁻体、Imidazole(Im)体は、溶媒をリン酸 bufferに置換したmetMb(H₂O)にそれぞれKCN、NaN₃、Imidazoleを加えることにより調製した。CO体は、metMb(H₂O)に脱酸素及びCO吹き込み処理後、Na₂S₂O₄によるヘム鉄の還元により調製した。それぞれのMb水溶液は限外濾過によって約1.5mMに濃縮し、磁場ロック用に10% D₂Oを添加、または溶媒をD₂Oに置換し、NMR測定用試料とした。

ミオグロビン、部位特異的変異体、ヘムの電子構造、NMR、常磁性シフト

くわはらあい、やまもとやすひこ、しまだひでお、いしむらゆずる

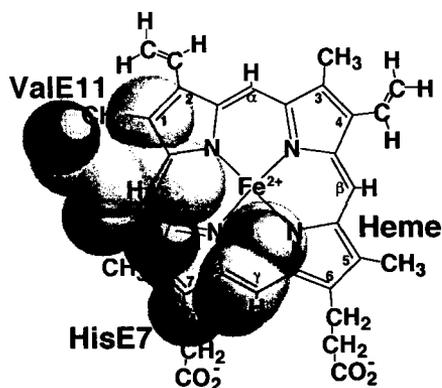


Fig. 1 Structure of Heme, HisE7 and ValE11 in the active site of Mb.

Table 1 Chemical shifts of E11 of bovine Mb(CO) in D₂O, at 25°C. δ_{calc} : Calculated shift. δ_{obs} : Observed shift.

	δ_{calc} (ppm)	δ_{obs} (ppm)
Val E11 C _{α} H	4.27	3.24
C _{β} H	1.37	0.74
C _{γ} H ₃	0.81 (0.78)	-0.66
C _{γ} H ₃ '	-2.90(-2.94)	-2.29
Leu E11 C _{α} H	4.09	3.22
C _{β} H	0.68	0.85(?)
C _{β} H'	-0.68	-0.61
C _{γ} H (A)	1.16	
C _{γ} H (B)	1.05	0.44
C _{δ} H ₃ (A)	0.00(-0.04)	
C _{δ} H ₃ (B)	0.68 (0.64)	-0.21
C _{δ} H ₃ (A)	-2.13(-2.17)	-1.18
C _{δ} H ₃ (B)	-1.31(-1.35)	
Ala E11 C _{α} H		3.95
C _{β} H ₃	-0.48	-0.88

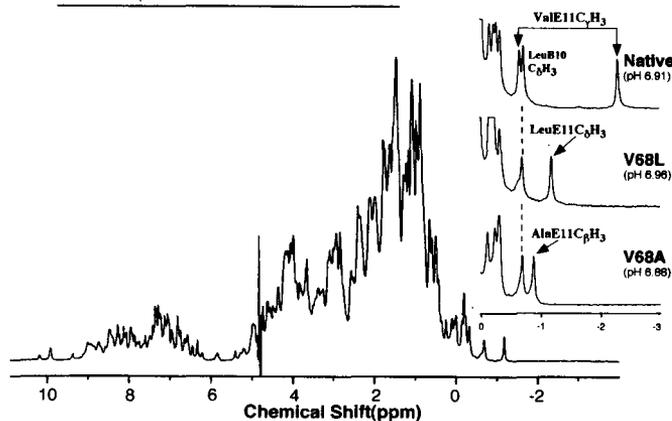


Fig. 2 400MHz ¹H NMR spectrum of V68L Mb(CO) and the upfield portions of 400MHz ¹H NMR spectra of bovine Mb(CO) in D₂O, at 25°C. Upper trace(native, pH6.91), middle trace(V68L, pH6.96) and lower trace(V68A, pH6.88).

【結果と考察】 Mb(CO) : native MbのCO体の¹H NMRスペクトルでは、ValE11 C _{γ} H₃, C _{γ} H₃' シグナルがポルフィリン環の環電流効果によりそれぞれ -2.29、-0.66ppm(298K, pH6.91)に分離して観測される(Fig. 2)。変異体ではValE11シグナルは観測されず、V68LではLeu E11 C _{δ} H₃' シグナルが -1.18ppm(298K, pH6.96 (Fig. 3))に、V68A ではAla E11 C _{β} H₃ シグナルが -0.88ppm(298K, pH6.88)に観測された。これらの結果より、アミノ酸置換が確認される。また、シグナルのシフト値を、ポルフィリン環の環電流効果¹⁾をもとに解析した結果、native、V68A、V68LMbのE11側鎖のコンフォメーションが、クジラMb X線結晶構造解析の結果と矛盾しないことが示された(Table 1)。CO体のスペクトルの比較では、E11 残基に由来するシグナル以外にシフト値が大きく変化するシグナルは検出されず、アミノ酸置換がMbの立体構造に及ぼす影響は置換部位近傍に限定されることを示唆している。したがって、E11 残基の置換が外部配位子とヘム鉄との配位結合に及ぼす影響についての知見は、常磁性MbのNMRスペクトルの解析より得た。

metMb(CN⁻) : CN⁻体の¹H NMRスペクトルでは、常磁性シフトして観測されるシグナルの解析を基に、アミノ酸置換が活性部位の構造に与える影響を調べた。まず、それらのシグナルの常磁性緩和時間の解析から、アミノ酸置換が活性部位の立体構造に与える影響は、Fig. 4に示すように変異部位近傍に限定されていることが示され

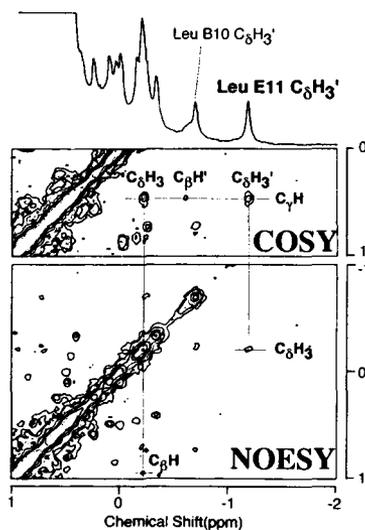


Fig. 3 The upfield portions of the COSY and NOESY spectra of V68L Mb(CO) in D₂O, at pH6.96, 25°C.

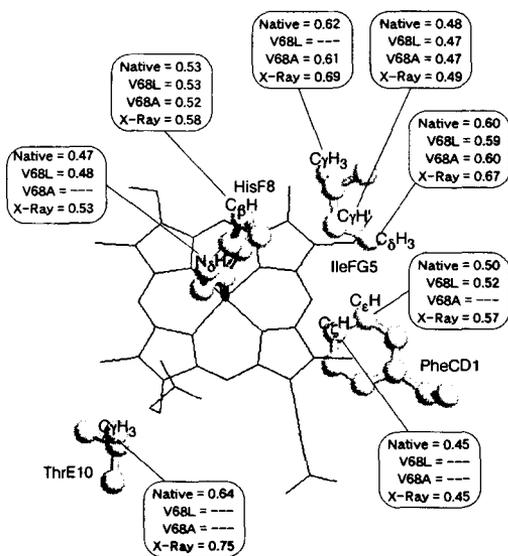


Fig. 4 Distances of amino acids in the vicinity of heme from heme iron. (Pdb file: 1MBO)

化に伴って δ_{pc} は変わる。CN 体での磁化率テンソルの z 軸は CN の配位する方向と一致すると考えられており²⁾、Fig. 5 のスペクトルでの対応するシフト変化は、E11 残基の置換により外部配位子のヘムに対する配向が変化することに起因すると考えることができる。また、飽和移動法を利用した His F8 N₃H、His E7 N₂H の水素交換反応速度の解析では、proximal 側の His F8 にはアミノ酸置換の影響は見られなかったが、His E7 N₂H はアミノ酸置換により約 3 倍に増大することが示された。この結果は、distal 側に存在する E11 残基の置換は proximal 側の構造には影響を及ぼさないという他の変異体の研究で得られている結果³⁾と一致している。

metMb(N₃) : Mb の N₃ 体、Im 体、OH 体の系は、low spin (S=1/2) と high spin (S=5/2) のスピン平衡の状態として存在する。また、N₃ 体では、CN 体の場合とは異なり、磁氣的異方性は小さいため、

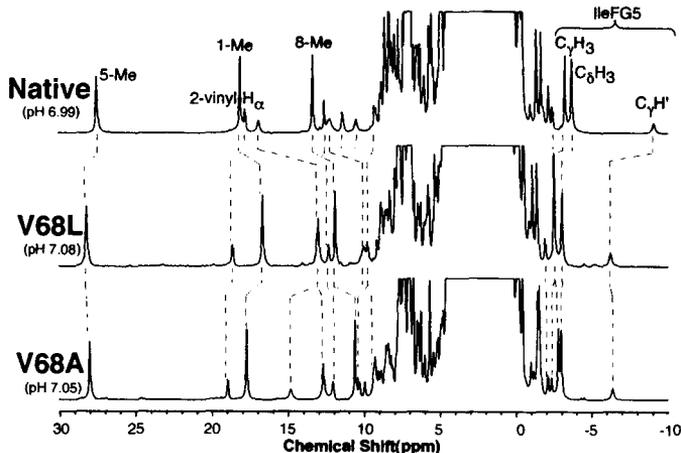


Fig. 5 400MHz ¹H NMR spectra of bovine Mb(CN⁻) in D₂O, at 25°C. Upper trace (native, pH 6.99, middle trace (V68L, pH 7.08) and lower trace (V68A, pH 7.05). The corresponding signals are connected by broken lines.

た。しかしながら、Fig. 5 にあるように、常磁性シフトして観測されるシグナルのシフト値 (δ_{obs}) は E11 残基の置換の影響を受けて変化している。一般に、 δ_{obs} は次のように表される。

$$\delta_{obs} = \delta_{dia} + \delta_{para}$$

$$\delta_{para} = \delta_c + \delta_{pc}$$

ここで δ_{dia} は反磁性シフトであり、不對電子が存在しない場合のシフト値を示す。また常磁性シフト (δ_{para}) は鉄からの化学結合を介した不對電子の非局在化によるコンタクトシフト (δ_c) 及び不對電子スピンと核スピンの双極子-双極子相互作用による擬コンタクトシフト (δ_{pc}) の和で表される。

Fig. 5 にあるように、E11 から遠く、ヘム鉄に配位していない Ile FG5 に由来するシグナルが、E11 残基の置換の影響を受けてシフトするのは、 δ_{pc} の変化に起因すると考えられる。 δ_{pc} はヘム鉄を原点とするある座標系 (不對電子による磁化率テンソルの主軸) に関して定式化されるが、分子の座標系に対する磁化率テンソルの主軸の配向の変

化に伴って δ_{pc} は変わる。タンパク質由来のシグナルにはアミノ酸置換の影響が反映されていない。しかしながら、ヘム側鎖プロトンシグナルのシフト変化から、ヘムの電子構造、N₃ の配位構造が E11 残基の置換により変化したことがわかる。V68L のスペクトルでは、native Mb と比較して、5-Me、2H_α、6H_α シグナルが約 4 ppm、His F8 N₃H シグナルが約 2.5 ppm 低磁場シフトする。このシフト変化は、 π 及び σ 結合を介した Fe からの不對電子の非局在化の変化に起因するコンタクトシフト変化によると考えられる。一方 V68A のスペクトルでは、native Mb と比較して、V68L ほどの低磁場シフトは観測さ

れなかった。4つのヘムメチルプロトンシグナルのシフト値の平均値を基にスピン平衡を解析した結果、High spin成分はV68L>V68A>native Mbであることが明らかとなり、クジラMbにおける機能の結果⁴⁾を参考にする、外部配位子とヘム鉄との配位結合が弱くHigh spin成分がより多いMbで、N₃⁻の解離反応速度がより大きくなるという、錯体化学的観点からも当然の結論が導きだされた。この結果から、E11残基の置換がN₃⁻の配位結合強度及びHis E7との水素結合強度に影響を及ぼすことが示唆された。

metMb(Im) : 変異体のIm体の¹H NMRスペクトルでは、His F8 N_δH と推測される化学交換性プロトンと8-Meシグナルが native Mbより約 3ppm高磁場シフトが観測された。これはコンタクトシフト変化によるものであり、外部配位子の Imまたは His F8 のイミダゾール環のヘムに対する配向が変化したことに起因すると推測される。ヘム鉄に配位するイミダゾール環Nのp_z軌道とFeのd軌道との反発により不対電子の非局在化の様式が変化し、ヘム側鎖のコンタクトシフトに影響が及ぶと考えられる。外部配位子 Imの配向が変化したとすると、E11残基の置換による立体反発とHis E7を介した水素結合様式の変化が原因として考えられる。native MbのIm親和性は変異体より低いことを考慮すると、E11残基の置換により、E11側鎖と外部配位子 Imの立体反発が小さくなり、ImはE7側鎖と、より安定な水素結合形成を可能にする配向をとると考えられる。

metMb(H₂O, OH) : native metMb(H₂O)の¹H NMRスペクトルではVal E11 C_γH₃シグナルが観測されるが、変異体では見られなかった。ヘム側鎖プロトンシグナルの化学シフトの変化は主に外部配位子H₂OとE7側鎖との水素結合様式の変化の影響によると考えられる。また、pK_a値決定の結果、native Mbでは8.6、V68A、V68Lでは8.8であった(Figs. 6 & 7)。V68AのOH体のスペクトルでは、nativeと比較してヘム側鎖シグナルが約2ppm低磁場シフトしていることから、OHの配位結合がやや不安定化していると考えられる。

【結論】 E11残基におけるValからAla、Leuへの置換は、配位子結合部位での疎水性側鎖のわずかな体積の違いによる立体障害の変化を引き起こすだけでなく、ヘム鉄に結合した外部配位子との直接的コンタクトや、外部配位子の配位状態の安定化に寄与する水素結合に関与するHis E7とのコンタクトの変化を通して間接的に外部配位子の配位構造に影響を及ぼすことが明らかとなった。したがって、E11残基の置換がMbの機能に及ぼす影響を解釈する際には、これらの構造化学的要因を考慮する必要がある。

【参考文献】 1) Chachaty, C. *et al.* (1984) *Org. Magn. Reson.* 22, 39-46. 2) Emerson, S. D. & La Mar, G. N. (1990) *Biochemistry* 29, 1556-1566. 3) Yamamoto, Y., Kurihara, N. *et al.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1433, 27-44. 4) Brancaccio, A. *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13843-13853.

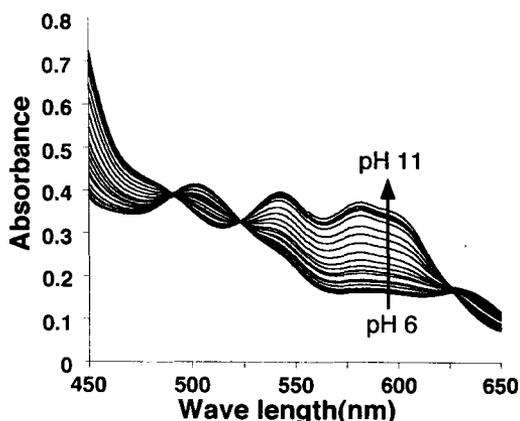


Fig. 6 pH dependence of UV-visible absorption spectra of V68L aquo-metMb.

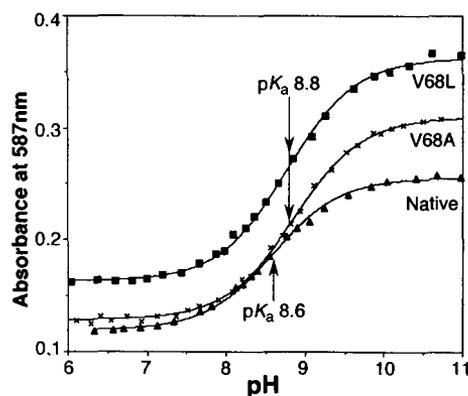


Fig. 7 pH dependence of visible absorbance at 587nm of bovine aquo-metMbs.

位置特異的¹³C 標識グルコースを用いた NMR スペクトル解析法
(都立大・理) ○江奈 武一郎、甲斐荘 正恒

New applications of site-specific ¹³C-labeled glucoses for protein NMR analyses

Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

Buichiro Ena and Masatsune Kainosho

Uniformly ¹³C/¹⁵N-double or ¹³C/¹⁵N/²H-triple labeled proteins, for different types of multi-dimensional NMR experiments, are usually prepared by *in vivo* expression systems with various *E. coli* strains, which can produce labeled proteins in M9 medium supplemented with [ul-¹³C]-glucose, ¹⁵N-ammonium salt, and H₂O or ²H₂O. Therefore, it would be possible to make good use of the site- and stereo-selective isotopic distributions by using culture media consisting of site-selectively ¹³C-labeled glucoses in ²H₂O, to provide supplemental information for NMR spectral analyses. This possibility has been extensively studied for the *E. coli* expression system producing cystatin A.

【序論】

NMR構造解析に用いる蛋白質試料は、通常、大腸菌を用いた高発現系により生産される。これまでに行われた代謝系の研究より、最小培地中の炭素源として位置特異的に¹³C 標識したグルコース類を用いれば、グルコースからアミノ酸への代謝経路を基に、各アミノ酸残基が位置特異的に¹³C 標識されることが期待される。更に、同経路からメチレンプロトンの一方がグルコース由来で他方が溶媒由来である部位が予想されたため、この¹³C 標識法と重水素標識法を組み合わせることにより、蛋白質のNMR解析に有用な位置・立体選択的標識体を簡便に調製することができると考えられる。そこで本研究では、大腸菌より得られた蛋白質からアミノ酸各部位における¹³C 標識率の偏りを明らかにするとともに、メチレンプロトンの重水素導入率の差を用いた立体選択的プロトン帰属について検討した。

【実験】

システインプロテアーゼインヒビター Cystatin A (98 残基) を試料とし、Bruker DRX-600 により測定を行った。グルコースは解糖系内で C¹ と C⁶、C² と C⁵、C³ と C⁴ がそれぞれ等価となるため(Fig.1)、試料調製は C¹ から C³ が各々¹³C 標識されたグルコースを炭素源とした3試料において行った。C(CO)NH 等の測定によりほぼすべての¹H、¹³C の帰属を行い、同条件において測定した¹H-¹³C HSQC 並びに HNCQ スペクトル上で対応付けた。この2種類の2-D スペクトル上で各アミノ酸ごとに分離の良いピークを複数抽出し、酢酸のメチル基を内部標準とした相対強度より標識率を決定した。また、立体選択的プロトン帰

位置特異的¹³C 標識グルコース、アミノ酸残基代謝標識、位置・立体選択的同位体標識、
蛋白質 NMR シグナルの帰属

○えな おいちろう、かいのしょう まさつね

属のために 50%重水中で培養した試料を調製し、 ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルでメチレンのシグナル強度を比較した。

【結果・考察】

最終的に 17 種類のアミノ酸について ^{13}C 標識率を求め、いずれのアミノ酸からも特徴的な ^{13}C 標識の偏りが認められた。解糖系中間体に由来するセリン属(Ser, Gly)、芳香属(Phe, Tyr, His)、ピルビン酸属(Ala, Val, Leu)アミノ酸では、標識グルコース依存的に特定の炭素が 80~90%と高度に ^{13}C 標識されたが(table.1)、TCA 回路中間体に由来するグルタミン酸属(Glu, Gln, Pro, Arg)、アスパラギン酸属(Asp, Asn, Thr, Ile, Lys)アミノ酸では 50~60%程度であった。また、グルコースの $^{13}\text{C}^1$ は Acetyl-CoA を経由して多くのメチル基に導入され、 $^{13}\text{C}^3$ は C' を強く標識することがわかった。

立体選択的プロトン帰属においては、数種の残基においてその可能性が示されている。特に、Ser の β 位と Gly の α 位のメチレンで pro-S/R シグナル強度間に差が見られたが、pro-S を重水素化したグリシンを取り込ませた実験より、両残基とも pro-R プロトンシグナルが相対的に強くなっていた。これにより、HSQC スペクトル上のシグナル強度比較から立体選択的帰属が可能である事を明らかにした。

これらの特徴を単独ないしは組み合わせることで、NMR 解析において極めて有用な試料を簡便に調製できることが示された。

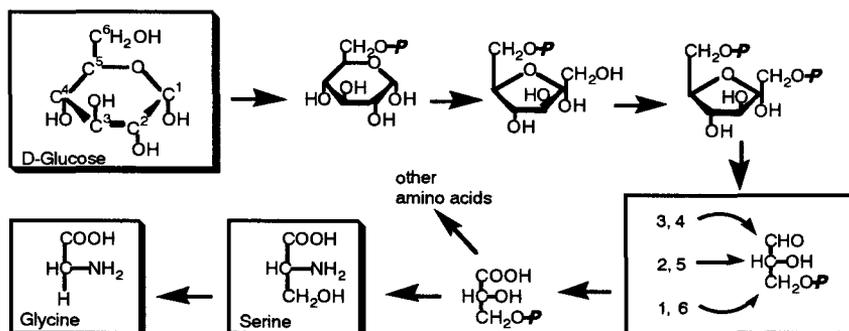


Fig.1 Metabolic map of glycolysis system and production of serine and glycine

Ser		Labeling Ratio of Amino Acid (mean \pm SD) %		
		$^{13}\text{C}'$	$^{13}\text{C}_\alpha$	$^{13}\text{C}_\beta$
Labeled Site of Glucose	1- ^{13}C	2.3 \pm 1.0	7.5 \pm 6.7	83.8 \pm 1.4
	2- ^{13}C	9.4 \pm 0.1	82.4 \pm 7.1	12.3 \pm 1.6
	3- ^{13}C	88.3 \pm 1.0	10.2 \pm 0.4	4.0 \pm 0.3

Gly		Labeling Ratio of Amino Acid (mean \pm SD) %		
		$^{13}\text{C}'$	$^{13}\text{C}_\alpha$	
Labeled Site of Glucose	1- ^{13}C	2.8 \pm 0.6	8.9 \pm 2.3	
	2- ^{13}C	6.8 \pm 0.9	80.5 \pm 2.6	
	3- ^{13}C	90.4 \pm 1.1	10.5 \pm 0.6	

Table.1 The ^{13}C -labeling ratio at each carbon position of serine and glycine

Streptomyces metalloproteinase inhibitor (SMPI) の活性ループ部位ペプチドの阻害活性と立体構造

(Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University¹, CREST², Protein Research Institute, Osaka University³, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology⁴)

Tashiro, M.¹, Feliciano, M.¹, Ohki, S.², Gonzales, N.¹, Tate, S.¹, Tamura, K.³, Aimoto, S.³, Hiraga, K.⁴, Oda, K.⁴ and Kainosho, M.^{1,2}

Inhibitory Activities and Structural Characterization of Peptides Mimicking the Active Site Loop of *Streptomyces* Metalloproteinase Inhibitor, SMPI

SMPI, isolated from *Streptomyces nigrescens* TK-23, is a single domain crystallin superfamily protein composed of 102 amino acid residues. The solution structure of SMPI indicates that the active site exists on a peculiarly exposed loop. As this peptide loop seems to maintain its active conformation toward cognate metalloproteinases, synthetic peptides mimicking the amino acid sequence of the active site of SMPI may retain the inhibitory activities. We have found that some synthetic peptides inhibit the enzymes rather strongly and that the conformations of the peptides can qualitatively explain their inhibitory activities. This information will be useful for designing inhibitors of clinically important enzymes, such as MMPs.

INTRODUCTION

Streptomyces metalloproteinase inhibitor, SMPI, isolated from *Streptomyces nigrescens* TK-23, is a globular protein consisting of 102 amino acid residues. SMPI belongs to the single-domain $\beta\gamma$ -crystallin superfamily, with a peculiar peptide loop containing the reactive site, Cys64-Val65, which is thought to bind to the active sites of cognate metalloproteinases and thus inhibit their activities (1, 2). Although the active site peptide moiety of SMPI exists as a protruding loop, which is isolated from the core part of the protein, the relaxation data analysis indicated that the loop was as rigid as the core region. Therefore, this active peptide loop may retain its active conformation by itself. This hypothesis has led us to examine the inhibitory activities and conformations of various synthetic peptides (details of the synthesis will be described elsewhere) that mimic the amino acid sequence of the active loop of SMPI.

MATERIALS AND METHODS

Inhibitory Activity Assays. The inhibitory activities of the peptides listed in Figure 1 were measured at 25 °C against the four metalloproteinases listed below, with the fluorogenic substrate, MOCAc-Pro-Leu-Gly-Leu-A₂pr(Dnp)-Ala-Arg-NH₂, at the final concentration of 8 μ M in 50 mM PIPES buffer (pH 7.0), containing 10 mM CaCl₂, 0.005% Triton X-100, thermolysin (final conc., 2.0 nM), SGMP II (20 pM), *Pseudomonas* elastase (74 pM), and vimelysin (2.0 nM).

NMR Experiments. The peptides were dissolved in either 250 μ l of 90% H₂O / 10% ²H₂O or 99.9% ²H₂O, at pH 3.5, at concentrations ranging from 1.5-3.0 mM depending on the peptide, and were transferred into Shigemi micro tubes (Shigemi Co. Ltd. Tokyo). NMR experiments were performed at 10 °C on a Bruker DRX800 or DRX600 spectrometer. Sequence-specific assignments of the proton (¹H) resonances were achieved using the standard method through the combined analyses of the DQF-COSY, TOCSY, and NOESY spectra. The structures were determined by the standard protocols in the program X-PLOR 3.8.

SMPI、NMR 構造解析、活性部位ペプチド、構造活性相関

たしろみつる、Feliciano, M.、おおきしんや、Gonzales, 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

RESULTS AND DISCUSSION

Inhibitory Activities of the Synthetic Peptides. Although intact SMPI shows the strongest inhibitory activities towards all of the metalloproteinases tested thus far, the other synthetic peptides, SP-1 and SP-4, still exhibit the strong inhibition with K_i values in the nM- μ M range. The inhibition spectra of these peptides are quite similar to that of SMPI. This result indicates that the isolated portion of the reactive site loop itself can be utilized as a potential inhibitor of metalloproteinases.

Description of the Structures. The conformations of the dipeptide units corresponding to Phe67-Pro68 in SMPI are significantly different between the intact SMPI and the peptides, SP-1, SP-2, and SP-3, which mimic the amino acid sequence of the active site peptide loop of the intact SMPI. The conformations of the proline peptide (X-Pro) bonds in these peptides and SMPI were characterized as *cis* and *trans*, respectively, as identified by the expected sequential NOEs and/or the expected $^{13}\text{C}^\beta$ and $^{13}\text{C}^\gamma$ chemical shifts. Despite this structural difference, the conformations of the polypeptide segment (Cys64-Arg66), which is primarily involved in the interface with thermolysin, are quite similar in the peptide fragments and SMPI as shown in Figure 2. This could be the reason why the active site loop peptides, composed of 14 amino acids (SP-1 and SP-4), possess comparable inhibitory activities against metalloproteinases. The present results provide the basic idea for the rational design of inhibitors against a specific family of metalloproteinases.

REFERENCES

- (1) Ohno *et al.*, *J. Mol. Biol.* (1998) **282**, 421-433.
- (2) Tate *et al.*, *J. Mol. Biol.* (1998) **282**, 435-446.

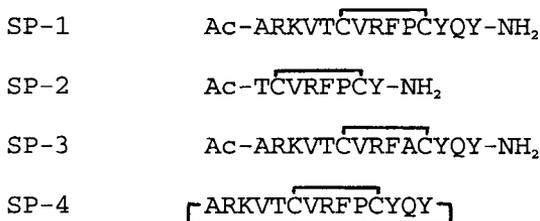


Figure 1. Primary structures of the synthesized peptides that mimic the amino acid sequence of the active site loop in SMPI.

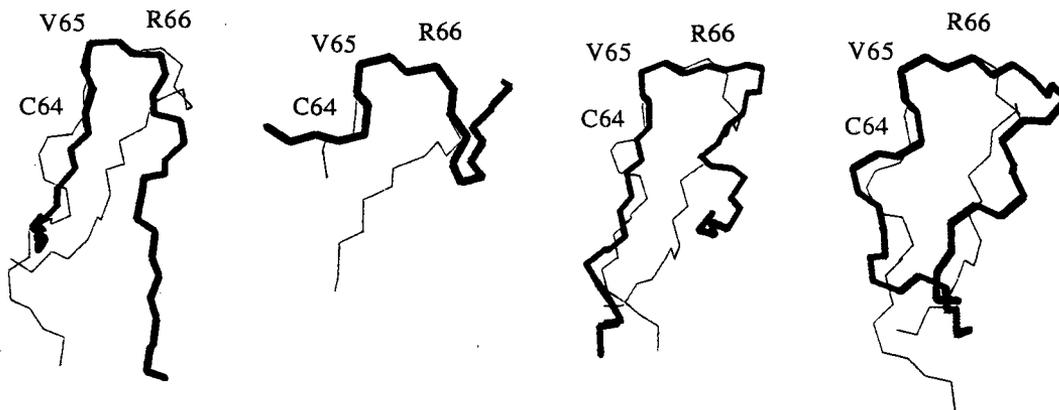


Figure 2. The energy-minimized average structures of the synthesized peptides (thick) and their corresponding regions of SMPI (thin) superposed on the polypeptide segment Cys64-Arg66, which is primarily involved in the interface with thermolysin (from left to right: SP-1, SP-2, SP-3, and SP-4).

hU2AF⁶⁵のRNA結合ドメインと標的RNAの相互作用

(¹東大・院理・生化, ²HHMI, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical Center)

○¹伊藤拓宏, ¹武藤裕, ¹金仁実, ²Michael R. Green, ¹横山茂之

NMR study of the interaction between the RBD1-RBD2 fragment of hU2AF⁶⁵ and the target RNA

¹Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo. ²Howard Hughes Medical Institute, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical Center, USA.

¹Takuhiro Ito, ¹Yutaka Muto, ¹Insil Kim, ²Michael R. Green, ¹Shigeyuki Yokoyama

The large subunit of the human U2 small nuclear ribonucleoprotein particle auxiliary factor (hU2AF⁶⁵) is an essential splicing factor required for the recognition of the polypyrimidine tract upstream of the 3' splice site. We determined the solution structures of the two hU2AF⁶⁵ fragments, corresponding to the first and second RNA-binding domains (RBD1 and RBD2, respectively). Now, we constructed the polypeptide containing two RBDs (RBD1 and RBD2) and the long interdomain region, and have assigned almost all of the resonances. Then, we performed the chemical shift perturbation experiment, and this indicates that RBDs interact with the target RNA in the β -strands, which seems to agree with the experiment about the single domain, RBD1 or RBD2. Furthermore, the resonances in the N-terminal interdomain region between RBD1 and RBD2 are also largely perturbed by the addition of the target RNA. However, the signals of the central part of the interdomain region are not largely perturbed. This indicates that the tertiary structure of the interdomain region is not changed, which is different from the cases of the Sxl protein and the ploy-A binding protein.

【序論】

スプライシング反応に必須のタンパク質である hU2AF⁶⁵は、反応の初期にpre-mRNAのイントロン部分の3'スプライス部位近傍に存在する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つ連続して持ち、これらが協調して標的一本鎖RNAを認識していると考えられている。前年度の本討論会において、1番目と2番目のRBD (RBD1, RBD2) の立体構造と、hU2AF⁶⁵の標的RNAとの相互作用の解析について報告した。今回、我々はRBD1とRBD2がタンデムにつながったタンパク質について、標的RNAとの相互作用についてNMR法により解析を行ったので報告する。

【方法】

大腸菌による大量発現系を用いて、²H (60%), ¹³C, および¹⁵Nにより安定同位体標識されたhU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2 (195 a.a.)を調製した。測定条件は20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 中で、温度は303Kであり、装置はBruker社のDRX600及びDMX500を用いた。各種3次元NMRスペクトルを測定し、タンパク質単体での主鎖および側鎖の化学シフトの帰属を行った。標的RNAの配列にはU4C2U4Gを用い、RNAを過剰に加えた条件で、結合状態のhU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2のスペクトルの測定および化学シフトの帰属を単体の場合と同様に

スプライシング、タンパク質-RNA相互作用、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, きむ いんしる, Michael R. Green, よこやま しげゆき

行った。また、chemical shift perturbationの実験は、0.3 mMのRBD1-RBD2に対して、モル比1:0から1:10までRNAを加え、各段階で2D ^1H - ^{15}N HSQCを測定した。

【結果と考察】

hU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2にU4C2U4Gを混合した際に、RBD1-RBD2の化学シフトはFigureのように変化した。RBD1とRBD2のドメイン部分に関しては、RBD1およびRBD2のドメイン単独に標的RNAを混合した際の変化と、ほぼ同様であった。このことは、ドメイン部分に関しては、つながった状態でもドメイン単独の場合と同様のRNAの認識をしていることを示唆している。

ドメイン間のリンカー領域に関しては、RBD1に近いN末端領域は大きな変化を示したが、中央の領域はほとんど変化しなかった。このことはリンカー領域の中でもN末端側は認識に関与しているが、中央の領域は認識には関与せず、立体構造も変化しないことを示唆している。RNAとの複合体の立体構造が明らかになっているSxlやpolyA-binding proteinの場合は、タンパク質が標的RNAを認識する際にリンカー領域がヘリックス構造をとる。ケミカルシフトパータベーション、アミドプロトンのNOEパターン、およびCSIデータとを考えあわせると、hU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2のリンカー部分は、標的RNAを認識するに際して、ヘリックス構造はとらないと考えられる。よって、hU2AF⁶⁵ RBD1-RBD2の標的RNAの認識機構は現在までに明らかになっているRBD-RNA複合体の場合とは異なっていることが予想される。

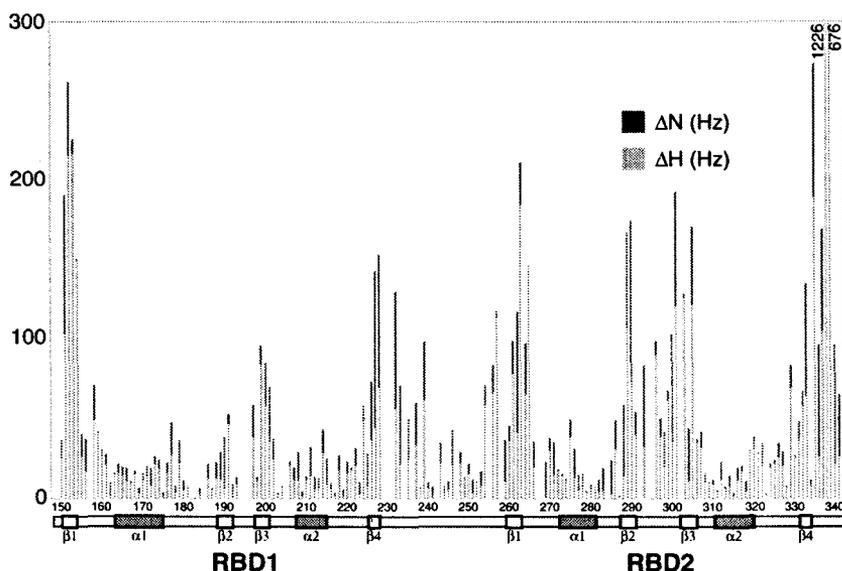


Figure. Chemical shift perturbation of RBD1-RBD2. The absolute value of the differences in the chemical shifts of the ^1H (light gray) and ^{15}N (dark gray) resonances (in Hz at a ^1H frequency of 600.13 MHz) between 1:0 and 1:10 molar ratios of RBD1-RBD2 and RNA are plotted versus the amino acid sequence.

立体選択的 $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ -二重標識芳香族アミノ酸の蛋白質 NMR への応用

CREST¹ ; 東京都立大学² ; 理研 GSC³

○大木進野¹, 寺内勉^{1, 2}, 土屋征司², 早野俊哉^{1, 3}, 甲斐荘正恒^{1, 2}

Application of stereospecifically deuterated aromatic amino acids to protein NMR

Shin-ya Ohki¹, Tsutomu Terauchi^{1,2}, Seiji Tsuchiya², Toshiya Hayano^{1,3},

and Mmasatsune Kainosho^{1,2}

CREST¹, Tokyo Metropolitan University², and RIKEN GSC³

Chemically synthesized (2S,3R)- and (2S,3S)-[1,3- $^{13}\text{C}_2$, 2- ^{15}N , 3- ^2H]-aromatic amino acids, i.e. Phe, Tyr, Trp, and His, were efficiently incorporated into the 18.2 kDa *E. coli* protein, peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase b, EPPIb, by *in vitro* protein synthesis using a cell-free extract prepared from *E. coli* A19. Well-resolved $\text{C}_\beta\text{-H}_\beta$ cross peaks were observed in the ^1H - ^{13}C HSQC spectra of the labeled proteins. Our discussion will be focused on the advantages of this labeling method over conventional strategies, such as uniform ^{15}N , ^{13}C -doubly labeling.

[序] 蛋白質の分子量増加に伴う NMR 信号の重なりや緩和時間の減少は、実際の測定と解析において大きな問題となる。この困難を克服するための方法として、前者に対してはアミノ酸選択的標識技術、後者に対してはランダム重水素化や選択的プロトン化が知られている。しかしながら、アミノ酸選択的標識のためには蛋白質合成時に各アミノ酸の代謝拡散を制御する必要があり、他方の重水素化試料は、側鎖の帰属や構造情報の減少という点で問題を抱えている。今回、我々はこれらの手法の優れた面を組み合わせた安定同位体標識技術を報告する。

立体選択的重水素化，無細胞蛋白質合成系，スペクトル単純化，感度向上

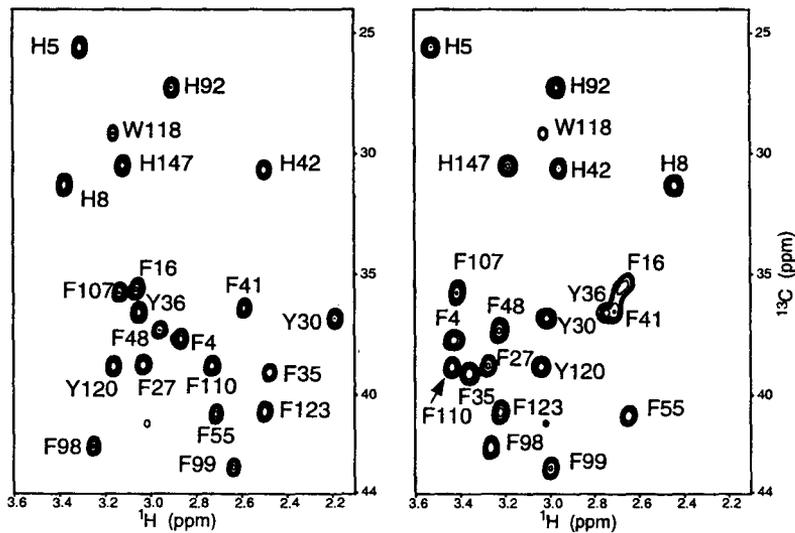
おおきしんや，てらうちつとむ，つちやせいじ，はやのとしや，
かいのしょうまさつね

[実験] H β 位置に立体選択的重水素化 (proR のみ, 若しくは proS のみを重水素化したもの) を施した芳香族アミノ酸 (His, Phe, Trp, および Tyr) を化学的な手法で合成した. 化学合成したこれらのアミノ酸を取り込ませた大腸菌由来のペプチジル-プロリル・シス-トランス・イソメラーゼ b (EPPib; 18.2kDa) を無細胞蛋白質合成系で発現し, カラム操作を含む通常の生化学的手法で精製した. 精製した試料の NMR スペクトルを測定した.

[結果] 無細胞蛋白質合成系は, 代謝拡散なしにアミノ酸を目的蛋白質に取り込ませるといった利点のみならず, 蛋白合成に必要なアミノ酸混合物の量が極端に少量ですむという特徴を持つ. 今回の実験では各アミノ酸 1mM を含む反応溶液 8ml から 20mg 前後の目的蛋白質を得ることが出来た.

EPPib は NMR 試料としては比較的大きな蛋白質 (18.2kDa) であるが, よく分離した高感度の信号を与えた. 2種類の NMR スペクトルを以下に示す. 発表では, 従来法である均一二重標識ならびにアミノ酸選択的標識試料のスペクトルとの比較をもとに, この手法の有用性を議論する.

図 1. 立体選択的 $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ -二重標識芳香族アミノ酸を取り込ませた EPPib の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルの $^1\text{H}\beta$ - $^{13}\text{C}\beta$ 領域の拡大図 (右; proR のみ. 左; proS のみ.)



新規タンパク質 SKLP の立体構造決定

(¹東京都立大学・理 ²CREST ³京都工芸繊維大学)○狩谷英里¹ 大木進野² 磯辺俊明¹ 平賀和三³ 小田耕平³甲斐荘正恒^{1, 2}**Structural determination of a novel yeast-killer toxin-like protein, SKLP**Eri Kariya¹, Shin-ya Ohki², Toshiaki Isobe¹, Kazumi Hiraga³, Kohei Oda³,and Masatsune Kainosho^{1,2}¹Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University; ²CREST;³Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology

A novel yeast-killer toxin-like protein, SKLP, isolated from the culture broth of *Streptomyces* sp. F-287, shows cytotoxic effects on both budding and fission yeasts, and also causes morphological changes on some yeasts and filamentous fungi. As the amino acid sequence of this 9.6 kDa protein has little similarity with other yeast killer toxins or proteins in general, we were interested in solving the structure of SKLP by NMR. The structure was determined by the standard heteronuclear multidimensional NMR method and was based on a total of 1,189 NMR-derived restraints. The SKLP structure comprises two Greek key motifs with a short extra β -strand at the N-terminus. Unexpectedly, the overall structure of SKLP was found to be similar to that of the toxin isolated from the killer yeast *Williopsis mrakii*, although these toxic proteins share only 13% amino acid homology.

[序論]

SKLP(*Streptomyces* killer toxin-like protein) は、放線菌培養液中から新規に見いだされた酵母阻害性物質 (killer toxin) である。本物質は分子量約 9,600 の蛋白質であり、いくつかの酵母に対して形態変化を誘起し殺菌的作用を示す。しかしながら、SKLP は他の killer toxin、さらには既知の蛋白質とのアミノ酸配列相同性が無く、その阻害対象となる酵素については全く不明である。本研究では、SKLP の立体構造を多核種多次元 NMR 法を用いて決定し、標的酵素の手掛かりを探る。

SKLP、killer toxin、crystallin superfamily、多核種多次元 NMR、立体構造決定

かりやえり、おおきしんや、いそべとしあき、ひらがかずみ、おだこうへい、
かいのしょうまさつね

[実験]

^{15}N -標識、 ^{15}N , ^{13}C -標識した SKLP は、それぞれ ^{15}N -標識、 ^{15}N , ^{13}C -標識アミノ酸混合物を用い、*Streptomyces sp. F-287* 株を培養し、その培養液から精製した。これらの均一同位体標識試料、及び非標識試料を用いて、通常の多次元 NMR 法により立体構造決定を行った。

[結果・考察]

1,189 個の構造情報より得られた SKLP の溶液中の立体構造を Fig.1 に示す。SKLP は既知の蛋白質と、アミノ酸配列上の相同性が全く見られなかったため、新規の構造を持つものと期待されたが、その構造は 2 つの向かい合った 4 重の逆平行 β -鎖からなるいわゆる Greek key モチーフ、と N 末端の 1 本の短い β -鎖からなっており、SKLP は $\gamma\beta$ -crystallin superfamily の一員であることが判明した。また、過去に報告されている yeast killer toxin の 1 つが、アミノ酸配列は異なっているものの、同じ superfamily に属している。発表では SKLP の立体構造を基に推定される、標的酵素の構造上の特性等に関して議論する。

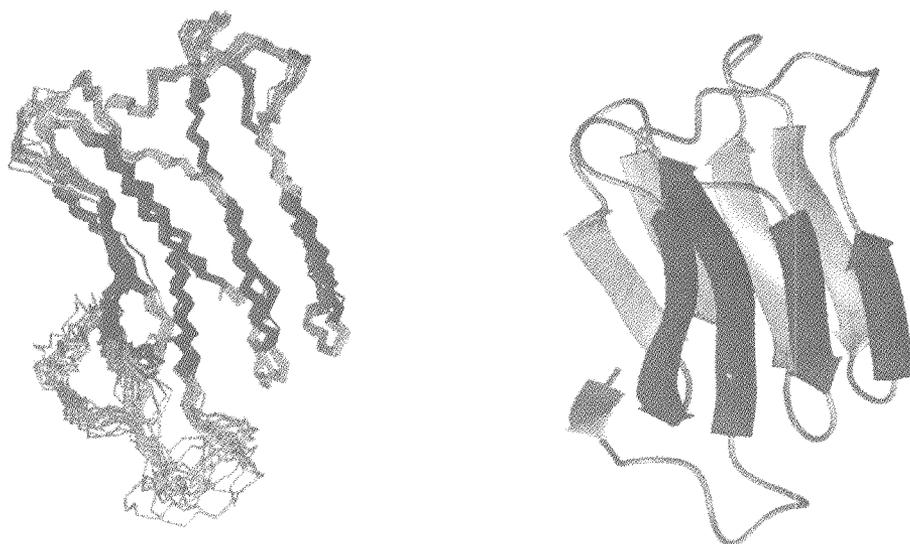


Fig.1. Superposition of the 20 calculated structures and ribbon diagram of SKLP

ヒトシスタチン A 二量体の立体構造解析

(¹東京都立大学院大学理学研究科・²CREST)

○大野綾子¹、田代充¹、児嶋長次郎²、楯真一¹、須田真輔¹、
梶裕之¹、甲斐荘正恒^{1,2}

Solution structure of the human cystatin A dimer

(¹Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University,

²CREST, Japan Science and Technology Corporation (JST))

Ayako Ohno¹, Mitsuru Tashiro¹, Chojiro Kojima², Shinsuke Suda¹,

Shin-ichi Tate¹, Hiroyuki Kaji¹, and Masatsune Kainosho^{1,2}

The protein cysteine proteinase inhibitor, cystatin A, forms an inactive dimer *via* thermal or acid denatured states. The dimer is thermodynamically very stable, and the dissociation to monomers occurs only by denaturation. It is well known that other cystatins, belonging to families 1 and 2, commonly form dimers under various conditions. Much attention has been directed to this phenomenon, since the thermally unstable L68Q mutant of cystatin C, which is thought to be responsible for the familial HCCAA syndrome, forms a dimer even under physiological conditions. This dimer formation has been assumed to be the initial step toward subsequent amyloid fibril formation. The NMR characteristics of the cystatin A dimer, which has not yet been proven to form such amyloid fibrils, are very similar to those reported for the dimer of L68Q cystatin C and also to those of the other cystatins. Therefore, the structural determination of the cystatin A dimer has become a crucial issue. We now report the NMR structure of the cystatin A dimer, which represents the first cystatin dimer structure ever determined.

はじめに

シスタチンは、100~120 残基からなるシステインプロテアーゼインヒビターで、植物から動物に至るまで広く存在している。また、シスタチンはアミノ酸配列の相

シスタチン A 二量体、立体構造、アミロイド繊維体

おおのあやこ たしろみつる こじまちょうじろう たてしんいち すだしんすけ
かじひろゆき かいのしょうまさつね

同性からシスタチンスーパーファミリーという一群の類縁蛋白質を構成している。このスーパーファミリーは、分子量及びジスルフィド結合の有無等により、三種類のファミリーに分類される。ここで対象としているシスタチン A (11kDa) は、タイプ1に属しており、83.3°Cと高い熱変性温度を持つ安定なインヒビターである。本研究室では、これまでにシスタチン A の阻害活性機構を解明するために、NMR 法を用いて野生体及び変異体の立体構造解析を行ってきた。これらの一連の研究において、熱、酸などの変性状態から refold させる過程で、不活性型シスタチン A が多量に生成されることを見いだした。この不活性型シスタチン A は、SDS-PAGE、質量スペクトル、ゲル濾過クロマトグラフィー等の結果より、極めて安定なダイマーであることがわかった。また、最近の研究より、シスタチン A に見られるようなダイマー形成が他のシスタチン類においても見られる共通の性質であることが明らかになってきた。中でも特に、タイプ2に属するシスタチン C に関しては、L68Q variant がシスタチン C アミロイド脈管障害 (HCCAA) を引き起こす脳内出血の原因となっているアミロイドファイバー形成に関与していることが知られており、さらに、ファイバー形成の初期過程でダイマー生成が関与している可能性が考えられている。このシスタチン類の重要なダイマーについて調べるために、NMR による構造解析が試みられた。野生体シスタチン C ダイマーに関しては、主鎖のシグナル帰属まで完了しており、化学シフト変化より、プロテアーゼとの相互作用に関与している二つの活性ループがダイマー形成に関与していることが明かとなった。しかし、これ以上の詳細な解析はなされておらず、他のシスタチン類のダイマーに関しても構造に関する知見は全く得られていない。本研究ではシスタチン類におけるアミロイドファイバー形成過程の知見を求めるために、多次元 NMR を用いてシスタチン A ダイマーの立体構造解析を行った。

結果

^1H - ^{15}N HSQC スペクトルではシグナルは一組しか観測されなかったため、このダイマーは二回対称軸をもつことがわかった。また、主鎖の ^1H 、 ^{15}N の化学シフト変化は、シスタチン C ダイマーと同様に、活性に関与している二つのループ領域に局在しており、特に第一活性ループにおいて顕著な違いが見られた。次に、ダイマーの interface を決定するために、 ^{15}N -及び ^{13}C -ラベルした試料から isotopically hetero dimer を作成し、ダイマーの interface に関与しているアミドプロトン残基の同定を行った。その結果、ダイマーの interface は、 β -strand 2 ($\beta 2$) と β -strand 3 ($\beta 3$) の間及び α ヘリックスと β シートの間であることが分かった。(Fig. 1) さらに、TROSY-HNCO スペクトルより、分子間の水素結合の直接観測を行った。その結果、 $\beta 2$ と $\beta 3$ の間

で、分子間水素結合の形成を確認した。これより、シスタチン A ダイマーは、Fig. 1 に示すように、残基番号 1~47 のユニットと残基番号 51~98 のユニットがちようど入れ替わり、 $\beta 2$ と $\beta 3$ の間で分子間水素結合の形成している”ドメインスワップ”型ダイマーであることがわかった。

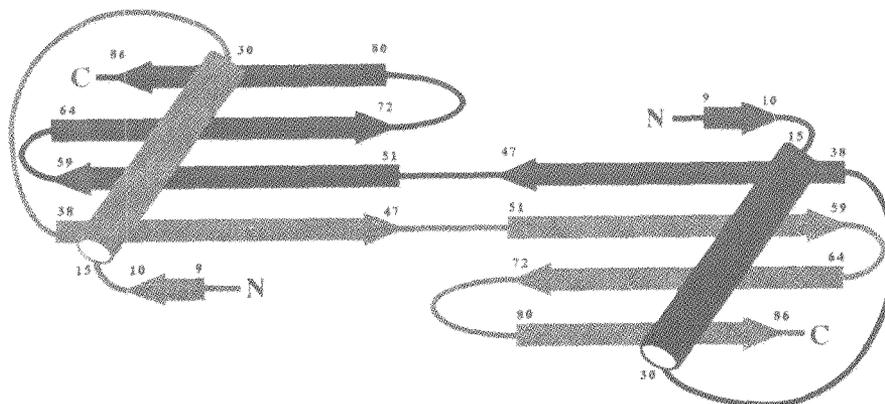


Fig. 1 Secondary structure elements of cystatin A dimer

以上の結果に基づいて、分子内及び分子間距離情報を集積し、2,656 個の距離情報及び 40 個の二面角情報を入力し、X-PLOR による構造計算を行い、Fig. 2 に示す構造を得た。各々のモノマー様のユニットの相対配置は、対応する NOE が観測されなかったためになかった。得られた 30 構造のモノマー様のユニットの backbone RMSD は、0.72 Åであった。

考察

シスタチン A ダイマー中のモノマー様ユニットは、シスタチン A モノマーの構造と非常によく似ていることがわかった。また、モノマーにおいて第一活性ループ (47-51) に相当する領域は、ダイマーでは二つのモノマー様ユニットをつなぐヒンジ領域になっており、さらに、第二活性ループ (72-80) に相当する領域も他方のモノマー様ユニットによって覆われていることがわかった。このことが、シスタチン A がダイマー形成により活性を失う原因と考えられる。また、cystatin A ダイマーのモノマー様ユニットは、偶然にも二本鎖からなっている甘味蛋白質モネリンとドメイン構成上類似していることがわかった。興味あることに、最近の研究よりモネリンは熱変性させることによって、アミロイドファイバーのような会合体を形成することが報告されている。このように、シスタチン類、或いはシスタチンと類似した

立体構造を持つ蛋白質に共通した性質としてダイマー形成がみられ、それらがアミロイドファイバー形成と深く関与していることが示唆される。

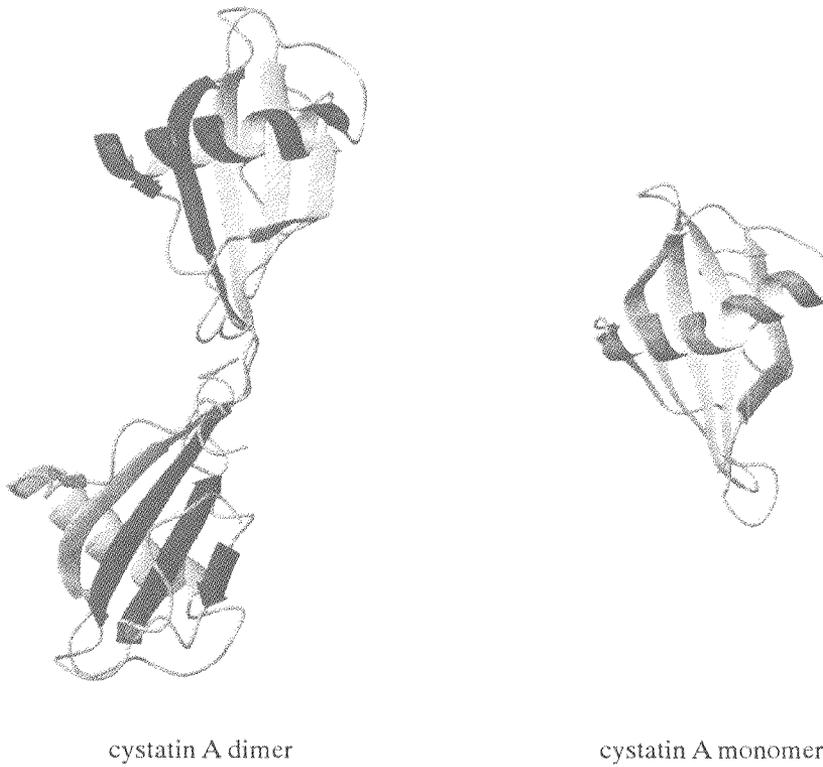


Fig. 2 Structural comparison between cystatin A dimer and monomer

細胞分裂に関与する YhhP 蛋白質の構造と性質：CPXP モチーフにおける点変異の効果について

(東京薬科大学¹, 名古屋大学農学部², 農水省生物資源研³) ○泊輝久¹,
神藤平三郎¹, 田代桜子¹, 水野猛², 加藤悦子³, 山崎俊正³

Structural and functional studies of a *Escherichia coli* protein YhhP implicated in a cell division; the effect of point mutations on CPXP motif

(School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science¹, Laboratory of Molecular Microbiology, School of Agriculture, Nagoya University², Structural Biology Unit, National Institute of Agrobiological Resources³) Teruhisa Tomari¹, Heisaburo Shindo¹, Sakurako Tashiro¹, Takeshi Mizuno², Etsuko Katou³, Toshimasa Yamazaki³

YhhP is a small *E. coli* protein consisting of 81 amino acids. Although the precise biological function of this protein is not well understood, genetic studies have implicated that this protein plays an important role in a cell division. In addition, the three-dimensional solution structure of native YhhP was previously determined by NMR spectroscopy. It folds into a two-layered α/β -sandwich structure with $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$ fold. The $\beta 1$ strand and $\alpha 1$ helix in the N-terminal region are connected by a sequence motif CPXP. Bacterial gene database analysis revealed this sequence motif CPXP to be highly conserved among proteins, which have high sequence homology to YhhP. In this study, we have created several point mutants in CPXP motif to examine the role of this motif in terms of structural stabilization using CD and NMR spectroscopy.

Yhhp 蛋白質は大腸菌の細胞分裂に関与する 81aa からなる小蛋白質である。その欠失変異体株は栄養豊富な培地中での成長曲線の log phase において異常な繊維状の細胞を形成するが、定常状態では正常な細胞に戻る。ゲノムデータベースを検索したところ、YhhP と相同性の高い小蛋白質が多く、多くのバクテリアにおいて共通に存在し、それらのいずれも共通配列モチーフ CPXP を持つことが示された。点変異の実験からこのモチーフは機能的にも重要であることが示唆された。一方 NMR により決定した YhhP の立体構造の考察から、このモチーフは構造安定化にも寄与していることが示唆された。このことを明らかにする為に、今回、共通配列モチーフである CPXP のアミノ酸置換を行い、YhhP の構造安定化におけるこのモチーフの役割について CD と NMR を用いて検討した。

Figure 1 に NMR による YhhP の溶液構造を示す。この構造は、 $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$ の配列をもち、混合 β -sheet の 4 本鎖と 2 本の α 鎖からなる 2 層の α/β サンドイッチ構造である。CPXP モチーフは最初の $\beta 1$ 鎖と $\alpha 1$ -helix との間のターン領域に位置し、 $\alpha 1$ -helix の安定化に寄与していることが示唆された。 $\beta 3$ 鎖は Val64-Ala65 において β -bulge 構造をもつ。また、 $\alpha 2$ -helix は Pro53 の存在により少し曲がっている。

キーワード： NMR, CD, point mutation, CPXP motif, cell division, protein stabilization

著者ふりがな：とまり てるひさ、しんどう へいさぶろう、たしろ さくらこ、みずの たけし、かとう えつこ、やまざき としまさ

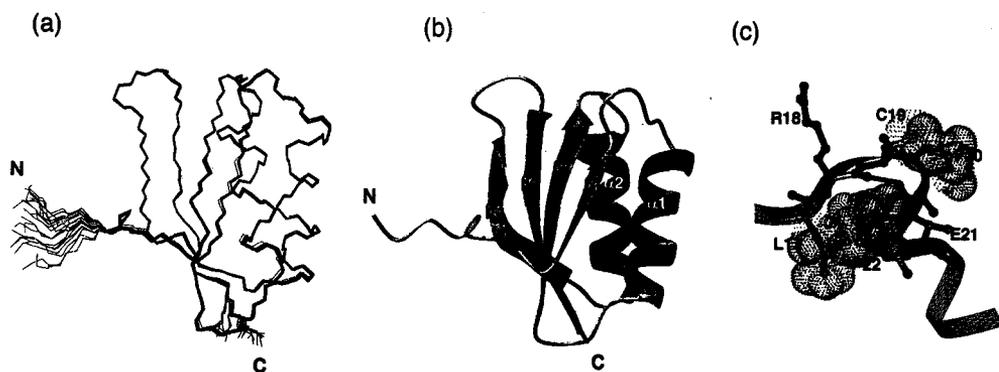


Figure 1. Three-dimensional structure of YhhP

a) The best-fit superposition of 20 energy-minimized backbone structures. b) Ribbon diagram of the energy-minimized average structure of YhhP. c) Close-up view of the CPXP motif.

これまで構造決定された蛋白質の中で α/β サンドイッチ構造は PDB データベースに多数見出されているが、YhhP と同じ $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$ のトポロジーをもつものはほとんどなく、唯一、転写開始因子の C 末端ドメイン (IF3C) のみが報告されている。これらの間ではアミノ酸配列の相同性はほとんど認められないにも関わらず、三次構造の類似性が認められた。(4本の β 鎖と2本の α 鎖に対する骨格原子の r.m.s.d は 1.8Åであった。) さらに、YhhP と IF3C の $\alpha 1$ 上の電荷分布に相同性が認められることから、YhhP が RNA 結合蛋白質である可能性を示唆され、現在その可能性を調べている。

先に、共通配列モチーフ CPXP が安定な α/β サンドイッチ構造の保持にも重要なことを述べた。このことを明らかにする為に CPXP モチーフの Pro20, Glu21, Pro22 を Ala もしくは Lys に置換した変異体(P20A, P22A), P20A, E21K, E21A を作成し YhhP の構造の安定性に及ぼすこれらの点変異の効果について検討を行う為に、変性過程を CD と NMR により解析した。その結果 wild-type に比べ、変異体 (P20A, P22A) は安定であり、P20A は不安定、E21K は常温では部分的に unfold していた。変異体(P20A, P22A)の安定性は $^{13}\text{C}\alpha$ の化学シフト差から明かのように (Figure2) $\alpha 1$ -helix が N 端列 3 残基ほど伸びたことによるものと推察される。

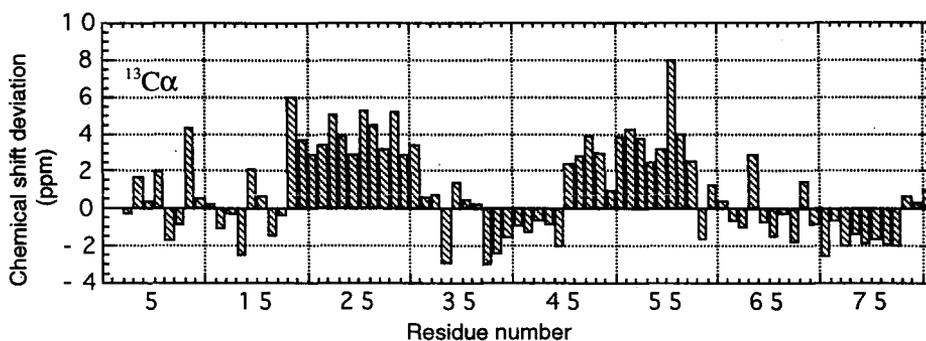


Figure 2. Chemical shift deviations of each residue in double mutant, (P20A, P22A)

二次元NMR 法によるリボヌクレアーゼ T₁ の熱変性過程の解析
 (東京薬大・生命科学¹, 中央分析センター²)

○松浦久恵¹, 佐久間千勢子², 前田正洋¹, 小島正樹¹, 高橋健治¹

Thermal Unfolding of Ribonuclease T₁ Studied by Two-Dimensional NMR Spectroscopy

¹School of Life Science and ²Central Analytical Laboratory, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Hisae Matsuura¹, Chiseko Sakuma², Masahiro Maeda¹, Masaki Kojima¹, and Kenji Takahashi¹

RNase T₁, a guanyloribonuclease secreted by *Aspergillus oryzae*, is a single-chain globular protein consisting of 104 residues. Various studies on unfolding/refolding of this protein have been performed. It was reported that the unfolding of RNase T₁ was a reversible, two-state transition and that the refolding process was rate-limited by proline-peptide isomerization. In the present study we performed thermal unfolding experiments using 2D NMR. The results showed that the molecule was unfolded with the concomitant and extensive distortion of the secondary structures whereas the proline-peptide bonds involving Pro39 and Pro55 remained in *cis*-form.

[序] リボヌクレアーゼ T₁ (RNase T₁) は、コウジカビ *Aspergillus oryzae* が生産する、104 アミノ酸残基から成る 1 本鎖球状蛋白質で、RNA 中のグアノシン-3'-リン酸部分を特異的に切断する。本酵素の構造、機能に関しては、これまで多くの研究がなされており、立体構造は、X 線結晶解析、NMR により決定されている^{1,2}。一方、リボヌクレアーゼ類の変性・再生実験も、古くから行われており、本酵素に関しては、以下のことがわかっている。

1) 変性は可逆で、二状態転移でよく近似できる、2) 分子中に 2 本存在する S-S 結合を切断、カルボキシメチル化しても、安定性は減少するが、正しく巻き戻る、3) 巻き戻り過程の速度論的解析から、数ミリ秒以内に大部分の二次構造が形成し、その後分から時間のオーダーで、2 段階のプロリンペプチド結合のシストランスの異性化 (Ser44-Pro55 の異性化→Tyr38-Pro39 の異性化) により正しい構造が形成される。一方、変性過程に関しては、二状態転移から予想される単純な指数関数型減衰を示す以上のことは知られていない。上記実験の多くは、CD、蛍光、DSC 等分子の global な指標に基づいている。これに対し、NMR は、帰属したシグナルをプローブとすることにより、local な観点から解析することができる。我々は以前、一次元 NMR によ

リボヌクレアーゼ T₁, 熱変性, 二次元 NMR

まつうらひさえ, さくまちせこ, まえだまさひろ, こじままさき, たかはしけんじ

る熱変性過程の追跡から、分子構造中離れた部位に存在する Asn81 主鎖と Ile90 側鎖が同じ挙動を示すことを明らかにした³。本研究では、二次元 NMR を用いてさらに詳細に解析し、変性に伴う分子内変化の様子を立体構造中でマッピングした。

[方法] 二次元 NOESY 測定は、蛋白濃度 1mM, pH5.6, 混合時間 150ms で Bruker DRX-500 で、40℃~56℃の各温度で測定した。常温、同一条件で既に行った帰属⁴に基づき、各温度におけるシグナルの移動、強度変化を解析した。

[結果と考察] 40℃~52℃の間は、スペクトルに大きな変化はなかった。54℃で一部のシグナルに変化が見られ、56℃ではランダムコイルと同様のスペクトルになった。従って 40℃~52℃, 52~54℃の各過程で、消失した NOE ピーク、強度が減少した NOE ピークを帰属した。帰属の結果から、以下のことがわかった。

40~52℃: 1)分子中の α ヘリックスのピッチ間の距離が増大し、ヘリックスがらせん軸方向に構造変化を起こした。2)幾つかのループ部分の角度が大きくなり、ループの頂点を中心としてペプチド鎖が幾分開いた構造をとるようになった。

52~54℃: 1) $d_{\alpha N}(i, i+3)$ 等ヘリックスに特徴的な NOE が消失し、ヘリックスが崩壊した。2) β シートを構成するストランド間およびストランド内の NOE が消失し、 β 構造が崩壊した。3)ヘリックスの崩壊に伴い、ヘリックスと側鎖同士で相互作用している領域 (Trp59~Ala75) 内の NOE が消失した。

以上のことから、40~52℃で若干その兆しが見られるものの、ヘリックス、 β シートとも大規模な崩壊が 52~54℃で起こったことがわかった。これら二次構造セグメント間で壊れやすい領域、壊れにくい領域は特に確認されなかった。また、主鎖、側鎖ともに変化していることから、二次構造、三次構造レベルでの変化の違いは見られず、分子全体が一様に構造変化したと考えられる。上記意味で、変性の協同性は極めて高い。

また、54℃でスペクトル測定後に一部会合が観察されたが、この会合は二次構造の崩壊と対応している。

一方、54℃においても、Ser44-Pro55, Tyr38-Pro39 の両プロリンペプチド結合はシス型のままであった。このことは、巻き戻り過程の律速段階であるプロリンペプチド結合の異性化は、変性過程では律速段階になっていない、即ち、巻き戻り過程と変性過程はマイクロのレベルでは異なった経路をとることを示している。

[文献]

1. Heinemann and Saenger (1982) *Nature* **299**, 27-31.
2. Pfeiffer et al. (1997) *J. Mol. Biol.* **266**, 400-423.
3. Kojima et al. (1994) *FEBS Lett.* **351**, 389-392.
4. Kojima et al. (1995) *J. Biochem.* **118**, 710-716.

ダニアレルゲン Der f 2 の立体構造と抗体認識

(日本女子大理¹、都臨床研²、アサヒビール食薬研³、北大院薬⁴)
 ○市川さおり^{1,2}、畠中秀樹²、高井敏朗³、西山千春³、結城敏文³、
 小椋賢治⁴、奥村 康³、稲垣冬彦⁴

Tertiary Structure of Mite Allergen Der f 2 and Recognition by Antibodies

Saori Ichikawa^{1,2}, Hideki Hatanaka², Toshiro Takai³, Chiharu Nishiyama³, Toshifumi Yuuki³,
 Kenji Ogura⁴, Yasushi Okumura³, and Fuyuhiko Inagaki⁴

¹Japan Women's University, ²Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, ³Asahi Breweries Ltd.,
⁴Hokkaido University

House dust mites cause heavy atopic diseases such as asthma and dermatitis. Among allergens from *Dermatophagoides farinae*, Der f 2 shows the highest positive rate for atopic patients. We have determined and refined the tertiary structure of Der f 2 by NMR. To identify the IgE epitope region of Der f 2, binding experiments were carried out between antigen and two monoclonal antibodies, both of which inhibit binding of human IgE antibody. The monoclonal antibodies we used were intact IgGs (150kDa). We found that addition of detergent weakened the binding between antigen and antibodies, and facilitated observation of the peaks related to binding region of antigen.

【序】 コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* やヤケヒョウヒダニ *D. pteronyssinus* といったハウスダスト中のダニは、アトピー性皮膚炎や気管支喘息などの症状を引き起こす最も重要なアレルゲンの発生源である。そして Der f 2 および Der p 2 と命名された 2 型アレルゲン蛋白質は、大部分のダニアレルギー患者が陽性を示すいわゆるメジャーアレルゲンであり、医学的に重要な分子である。我々は Der f 2 (129 残基) の立体構造を NMR を用いて決定したが(1)、今回さらに構造の精密化を行った。また Der f 2 のモノクローナル抗体 2 種についてそれぞれ Der f 2 との結合実験を試み、その結果、抗体との結合に関与する Der f 2 側の残基について情報が得られたので報告する。

【方法】 精密化: Der f 2 は 140mM N-octyl-β-D-glucoside の存在下、90%H₂O/10%D₂O 溶媒に溶解し、pH5.6 の NMR 試料とした。前回の試料濃度は 1.5mM であったが、精密化には 2.7mM の試料を作製し用いた。3 次元 ¹⁵N-edited NOESY, ¹³C-edited NOESY を 55°C で測定し、構造計算は X-PLOR v3.1 を用いて simulated annealing 法で行なった。

結合実験: モノクローナル抗体はインタクト IgG (分子量 150kDa) の形で用いた。複合体が高分子量になりシグナルの直接観測に困難が予想されたため、界面活性剤存在下で実験を行なった。これにより抗原抗体の結合を適度に弱めて速い交換を実現し、抗体添加によるピークのプロードニングを観測することを狙った。実験では 2 種類のモノクローナル抗体 15E11, 13A4 をそれぞれ 60mM N-octyl-β-D-glucoside を含む 300μM ¹⁵N-Der f 2 に添加していき、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した。

キーワード：立体構造 抗体認識 アレルゲン

いちかわさおり、はたなかひでき、たかいとしろう、にしやまちはる、ゆうきとしふみ、おぐらけんじ、おくむらやすし、いながきふゆひこ

【結果と考察】精密化: 前回の平均座標に対する Rmsd は $0.90 \pm 0.15 \text{ \AA}$ 、距離制限の数は 1086 個であったが、今回の精密化により得られた構造は Rmsd が $0.61 \pm 0.12 \text{ \AA}$ 、距離制限の数は 1777 個であった。精密化の過程で、6 個ある Pro の内 P79 のみがシスプロリンであること、また 7 個ある Thr の内、T47 の側鎖だけが分子の内側を向きその OH プロトンが強い NOE ピークとして観測されることがわかった。更に構造上疎水性残基の多く存在する大きなくぼみがあり、これは前回の構造からも見い出されていた塩基性残基のクラスターに隣接している。これらの部位はダニにとっての何らかの機能を有することが考えられる。

結合実験: 結合関与残基のピークは、抗体添加によりブロードニングを起こすと考えられる。滴定はモル比で Der f 2 : 15E11 = 1 : 0.375、Der f 2 : 13A4 = 1 : 0.5 まで各々 Der f 2 に添加した時点で、ピークのブロードニングによると考えられるピークの高さの減少が観測された。15E11 と 13A4 で得られたスペクトルのピークの高さを比較し、有意に減少した残基を精密化した立体構造上に色分けしてマッピングした (図)。二つの抗体のエピトープ領域はそれぞれタンパク質表面の異なる範囲にまともっており、重なりがないことがわかった。このことは、15E11 と 13A4 でサンドイッチ ELISA の実験が行えるという結果と矛盾しない(2)。また二つの抗体に対する Der f 2 変異体 43 種の反応性のデータより、15E11 では Der f 2 の D69, N71, H74 を、また 13A4 では R128, D129 を Ala に変えると結合能が弱められるということがわかっていて(3)。今回の NMR で示された二つのエピトープ領域は、それぞれこれらの置換残基を含んでいる。実際に抗体との結合で影響を受けることと、側鎖が結合に寄与することは別なので、両者で完全に一致する必要はないと考える。15E11 と 13A4 はともに Der f 2 とヒト IgE 抗体との結合を阻害することから、本実験で得られた結合領域は Der f 2 の IgE 結合部位と重なることが示唆される。

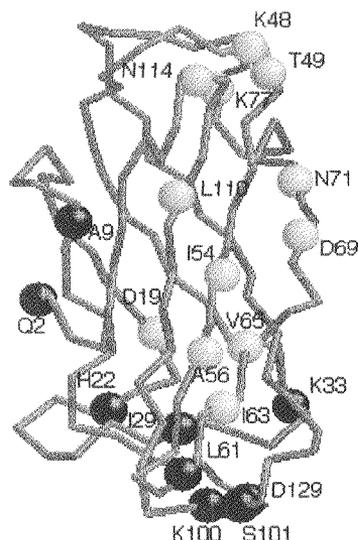


Figure. C α trace of the refined mean structure of Der f 2. Residues whose peak intensities were decreased by binding 15E11 (○) and 13A4 (●).

【文献】

- (1) S. Ichikawa et al., *J. Biol. Chem.* 273, 356-360 (1998)
- (2) M. Akagawa et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1725-1727 (1992)
- (3) C. Nishiyama et al., *Mol. Immunol.* 36, 53-60 (1999)

高等植物の His-Asp リン酸転移情報伝達系 B 型レスポンス
レギュレータ DNA 結合ドメインの立体構造

○細田和男*、八田知久*、加藤悦子*、水野 猛†、山崎俊正*
(*農水省農業生物資源研究所、†名古屋大学農学部)

NMR Solution Structure of B-Motif, a DNA-Binding Domain of Type-B Response Regulator for His-Asp Phosphorelay Signal-Transduction System in Higher Plant

Kazuo Hosoda*, Tomohisa Hatta*, Etsuko Kato*, Takeshi Mizuno†, Toshimasa Yamazaki*

* National Institute of Agrobiological Resources (NIAR),

†School of Agricultural sciences, Nagoya University

His-Asp phosphorelays, made up of “sensor”, “response regulators” and “phosphotransmitters”, are evolutionary-conserved powerful biological tactics for intracellular signal transduction. The higher plant, *Arabidopsis thaliana*, has more than 10 members of the regulator family that can be classified into two distinct subtypes, type-A and type-B. The latter regulators are clearly distinguished from the former by the existence of a common motif (B-motif) consisting of ca. 60 amino acids at their C-termini, although the precise function of this motif is unknown. In this study, we have determined solution structure of B-motif by NMR spectroscopy. It consists of three helices containing a helix-turn-helix motif. In addition, surface charge distribution of B-motif shows significant similarity to those of DNA-binding homeodomains. A structure-based hypothesis, derived from these results, that B-motif serves as a DNA-binding domain has been experimentally confirmed.

[緒言]

His-Asp リン酸転移シグナル伝達は、原核生物にもっとも普遍的に見られる細胞内情報伝達機構である。一般に、このシグナル伝達機構は、His-キナーゼセンサー、レスポンスレギュレータ、及び、両者の間でリン酸化を仲介する HPT ドメインの 3 種のシグナル伝達因子で構成される。近年、高等植物においてもこのバクテリア型 His-Asp リン酸転移シグナル伝達機構が多様な環境シグナル応答に利用されている事が明らかにされ、シグナル伝達因子が特定されつつある。シロイヌナズナにおいては、すでに 10 種類以上のレギュレータが同定されており、これらは A 型と B 型に大別される。B 型レギュレータはレシーバドメインの下流に 60 残基程度の共通のモチーフ (B モチーフ) を有する点で、A 型レギュレータと明確に区別される。さらに、両者はその発現様式や生化学物性においても明確な相違を示すことも明らかにされている。したがって、両者は高等植物の His-Asp リン酸転移シグナル伝達系において各々固有の役割を担っていること、さらには、その相違は B モチーフの機能に起因するものと推測される。しかし、残念なことに、B モチーフの機能は不明である。本研究は B モチーフの高次構造を NMR 法により解析し、その結果を基に B モチーフの機能を解明する糸口を見いだそうとするものである。

His-Asp リン酸転移情報伝達、DNA 結合蛋白質、レギュレータ、多次元 NMR、溶液構造

○ほそだかずお、はったともひさ、かとうえつこ、みずのたけし、やまざきとしまさ

[サンプル、測定]

15N 標識及び 13C/15N 標識した B モチーフ (64 残基) は、大腸菌を用いた系により、大量合成した。NMR サンプルは、10mM リン酸緩衝液 (pH6.9)、500mM NaCl にて調製した。NMR 測定は、Bruker 社 DMX750 を用い 15°C で行い、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。計算構造は、XPLORv3.1 にて、ディスタンスジオメトリー (DG) 法とシュミレッドアニーリング (SA) 法を併用した。

[結果と考察]

NMR スペクトルの解析から得られた 887 の拘束条件を用いて B モチーフの高次構造を決定した (Fig 1)。B モチーフは 3 本の α -ヘリックス ($\alpha 1$ 、His21-Leu25; $\alpha 2$ 、Pro32-Met39; $\alpha 3$ 、Arg41-Lys61) からなるヘリックスバンドル構造をしており、3 本のヘリックスの中心部に疎水的なアミノ酸側鎖を集めて立体構造を安定化している。B モチーフの 3 本のヘリックスバンドル構造は、ヘリックス・ターン・ヘリックス型 DNA 結合蛋白質、特に、蛋白質単体で DNA に結合するホメオドメインの構造に類似している。両者の一次構造上の相同性は 15% 程度であるが、ホメオドメインの DNA 認識に関与する $\alpha 3$ と N 末端のフレキシブルアーム領域に顕著な類似性が認められる。これらの事を考慮して、我々は、B モチーフがホメオドメインと類似した様式で、単体として DNA に結合すると推定した。この仮説をもとに、DNA 合実験を行い、B モチーフが DNA 結合能を有することを確認した。

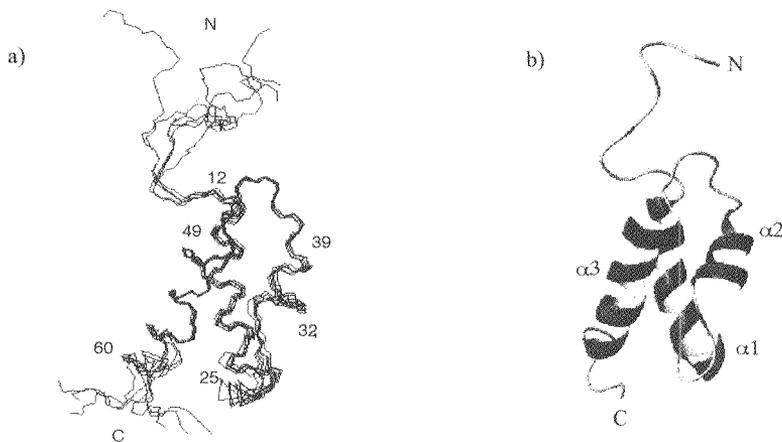


Figure 1 a) Superposition of the backbone atoms (N,Ca,C') of 6 NMR structures.
b) A ribbon diagram of the lowest-energy structure.

GABA_A 受容体相関タンパク質 – GABARAP – の立体構造解析(富山医薬大薬¹、北大院理²、九大院歯³)○ 河野隆英¹、三浦和紀¹、藤谷直樹^{1,2}、兼松 隆³、平田雅人³、新田勝利²、河野敬一¹Structural analysis of the γ -aminobutyric acid type A receptor associated protein, GABARAP¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930 - 0194, Japan² Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo 060 - 0810, Japan³ Cellular and Molecular Biochemistry, Graduate School of Dental Sciences and Kyushu University Station for Collaborative Research, Kyushu University, Fukuoka 812 - 8582, Japan
Takahide Kouno¹, Kazunori Miura¹, Naoki Fujitani^{1,2}, Takashi Kanematsu³, Masato Hirata³, Nitta Katsutoshi², and Keiichi Kawano¹

γ -Aminobutyric acid type A receptor (GABA_AR) associated protein, GABARAP was identified as a protein interacting with the GABA_ARs subunit γ 2L. GABARAP is found in postsynaptic membrane of inhibitory nerve terminals. GABARAP is believed to play a mediatory role of the interaction between GABA_ARs and a scaffold protein, gephyrin. Moreover, recent study indicates that GABARAP is also highly concentrated in intracellular compartments, implicates GABARAP is involved in targeting to plasma membrane and sorting of GABA_ARs.

In the present study, we have started the Structural analysis of GABARAP in order to clarify its mediatory mechanism. We prepared ¹⁵N- labeled and ¹³C/¹⁵N- labeled proteins and measured the double- and triple- resonance NMR spectra. The assignments and structural calculation are in progress.

【はじめに】

GABA_A 受容体は抑制性神経終末に存在する五量体タンパク質である。これまでの研究により GABA_A 受容体が細胞膜に発現されるためには、細胞膜下で受容体の足場となるタンパク質、gephyrin が不可欠であることが示されているが、生化学的に両者が相互作用するという結果は得られていない (1)。これらの事実から両者の相互作用を媒介する因子の存在が示唆されており、 γ -aminobutyric acid receptor associated protein (GABARAP) もその1つである。GABARAP は GABA_A 受容体の γ 2L サブユニットと相互作用し、また tubulin と結合することが分かっている。最近になって細胞質でも発現しており (2)、GABA_A 受容体の細胞膜へのソーティングやターゲティングに関わっているものとされている。今回GABARAP の構造を解明することにより、これらの機能との構造

GABARAP、GABA_A 受容体、tubulin、立体構造解析

こうのたかひで、みうらかずのり、ふじたになおき、かねまつたかし、ひらたまさと、
にったかつとし、かわのけいいち

活性相関を考察する。

また、GABARAP と 57 % のアミノ酸配列の相同性を示す、Goldi - associated ATPase enhancer、GATE-16 の構造が最近になって解明され (3)、これによると GATE-16 は ubiquitin フォールドの N 末端に2つの helix が付加した構造を持つ。GATE-16 はゴルジ体で物質輸送に関わっており GABARAP と比較することによって、両者の構造の類似点や相違点が機能にどう関わっているのかについても考察したい。

【実験】

大腸菌を用いて GABARAP を GST 融合タンパク質として発現し、可溶性画分を回収してトロンピン処理を行った後、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行った。最小培地を用いて、¹⁵N-ラベル体、¹³C/¹⁵N-ダブルラベル体を作成した。NMR スペクトルの測定には Bruker DMX-500 を使い、TOCSY-HSQC、¹⁵N-edited NOESY、HNCA 等により帰属を行った。

【結果と考察】

作製した試料を用いて、GABA_A 受容体 γ 2L サブユニットとの結合実験を行ったところ、in vitro で結合活性を有し、精製条件等に問題がないことを確認した。

NMR 測定に関しては、良好な¹H-¹⁵N HSQC スペクトルが得られたものの、TOCSY スペクトルに関しては側鎖プロトン由来のピークがほとんど得られず、帰属は困難であった。しかし、¹⁵N-edited NOESY スペクトルを参考にして帰属作業を進め、現在までに主鎖のシグナル帰属はほぼ終え、側鎖プロトンの帰属を進行中である。

【参考文献】

- 1) H. Betz, *Nature Neurosci.*, 1, 541-543 (1998).
- 2) M. Kneussel, S. Haverkamp, J. C. Fuhrmann, H. Wang, H. Wässle, R. W. Olsen, and H. Betz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8594-8599 (2000).
- 3) Y. Paz, Z. Elazar, and D. Fass, *J. Biol. Chem.*, 275, 25445-50 (2000).

イヌミルクリゾチームの折り畳み中間体の重水素交換反応による
解析

(北大院・理¹、北工研²、バリアンジャパン³)

○小橋川 敬博^{1,2}, 水口 峰之¹, 出村 誠¹, 小柴 琢己¹,
久米田 博之^{1,2}, 根元 暢明³, 津田 栄², 新田 勝利¹

**Hydrogen Exchange Study of the Folding Intermediate State of Canine Milk
Lysozyme**

Yoshihiro Kobashigawa^{1,2}, Mineyuki Mizuguchi¹, Makoto Demura¹, Takumi Koshiba¹,
Hiroyuki Kumeta^{1,2}, Nobuaki Nemoto³, Sakae Tsuda², Katsutoshi Nitta¹

¹Division of Biological sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University,

³Hokkaido National Industrial Research Institute.

³ Varian Technologies Japan Ltd.

Information about the folding intermediate (FI) state is indispensable to elucidate protein folding mechanism. In general, the intermediate species are accumulated transiently, whose life time is too short to be studied. It has been known that some proteins takes on the partially unfolded intermediate state (i.e., molten globule state: MG). In the present study, we examine the relationship between FI and MG states for canine milk lysozyme (CML) by hydrogen exchange methods by using NMR spectroscopy.

Numbers of amide protons appeared to have slow H-D exchange rates in both FI and MG states of CML. These amides participate in the secondary structure elements, which are constructed in the native state. The pattern of protection from hydrogen exchange is similar between these species. Hence, FI and MG states are thought construct almost the same structure. Moreover, in both species, amides with most resistant to hydrogen exchange are mainly located in the interface region of α -helices. This data indicates that the topology of α -helices in both states are the same as that of the native state. These data imply that each FI and MG species of CML contains cooperative interactions between the secondary structural motifs, which may be formed in the early stage of the protein folding process.

Key Words: molten globule, lysozyme, folding, hydrogen exchange, CSI

こばしがわ よしひろ、みずぐち みねゆき、でむら まこと、こしば たくみ、
くめた ひろゆき、ねもと のぶあき、つだ さかえ、にった かつとし

【緒言】

蛋白質の折り畳み機構を解明することは生命現象を理解するうえで重要であり、そのためには蛋白質の折り畳み過程において蓄積する中間体に関する知見が必要になる。リゾチームは安定な蛋白質であり、熱、pH、変性剤など様々な条件の変性に対して高い可逆性を示し、かつ変性過程が天然状態と Unfolded 状態の間の単純な 2 状態間の平衡反応として表されるために、蛋白質の Folding を研究する上で格好のモデルとして研究されてきた。近年、我々はリゾチーム群の中で例外的にイヌミルクリゾチーム(Canine Milk Lysozyme: CML)の変性過程について、1) 単純な 2 状態間の平衡反応ではなく 3 状態間の平衡反応として表されること、2) 部分的に変成した中間体である Molten Globule 状態(MG)が蓄積すること、3) 高い割合の 2 次構造および 3 次構造を有していること、4) これまで報告のあるリゾチーム - α - ラクトアルブミン ファミリーの MG 状態の中でも最も安定であることを報告した⁽¹⁾⁻⁽³⁾。本研究では、CML の MG 状態と折り畳み中間体の構造的な相違について重水素交換反応を NMR を用いて観測する手法により検討した。

【実験】

CML は大腸菌体内に不溶性顆粒として発現させた後 thioredoxin を用いて refolding した⁽⁴⁾。NMR スペクトルの測定には Varian Unity-Inova 500 を用いた。天然状態の帰属は pH 4.5, 30°C, 10%重水中において測定した一連の 2 重共鳴および 3 重共鳴多次元 NMR スペクトル群を用いて行った。MG 状態の帰属は pH 2.0, 30°C, 10% 重水中において同様に行った。カルボニル炭素の化学シフトはランダムコイル状態においても化学シフトの分散が広いことが知られている⁽⁵⁾。そこで、MG 状態の帰属に関しては(HCA)CO(CA)NH および HNCO を測定し、カルボニル炭素の化学シフトを用いた連鎖帰属法も利用した。重水素交換反応実験では、目的とする分子種が観測される条件下において一定時間反応させた後に pH 4.5 にし、すべての分子種を天然状態にして反応を停止し $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ HSQC を測定した。NMR データの処理には NMRpipe を用い、スペクトルの帰属とピーク体積、強度の算出に XEASY, PIPP, STARP, CAPP のプログラム群を用いた。

【結果と考察】

① 重水素交換反応

Fig. 1 は MG 状態および FI 状態の各残基の重水素交換反応への耐性の度合いを示したものである。バーが高いほど耐性が高いことを示している。CML の MG 状態における重水素交換反応に対する耐性のパターンを折り畳み中間体のものと比

較した。アミノ酸残基ごとに見ていくと、MG 状態では保護されているものの折り畳み中間体では保護されていない残基や、逆に折り畳み中間体では保護されているが MG 状態では保護されていない残基もいくつか見出されたが、大きな違いは見られずほとんど同じであった。また、ヘリックス単位で見た溶媒露出性のパターンも両者でほとんど同じであった。CML は天然状態において 4 本の α -ヘリックスを有しているが、A, B-ヘリックスが最も重水素交換反応への耐性が高く、これらに続いて D, C-ヘリックスの耐性が高かった。また、ヘリックスの界面領域は重水素交換反応に対して強い耐性を示していた。このことは、これら 2 つの分子種の α -ヘリックスのトポロジーが天然状態のものと類似していることを示している。これらの結果は 2 つの中間体が協同的な相互作用により形成されていること、これらの相互作用が折り畳みの初期の段階にすでに形成されていること、折り畳み中間体と MG 状態が構造的に類似したものであることを示唆している。

② Chemical Shift Index

Fig. 2 は Chemical Shift Index 法により予測された 2 次構造要素をプロットしたものである。天然状態では CML には 4 本の α -ヘリックスが存在するが、そのうちの A, B, D-ヘリックス領域はヘリックス性を示しており、C-ヘリックスについては C 末端側の半分だけがヘリックス性を示していた。また、これらの領域には α -ヘリックス特有の NOE パターンも一部観測されており、これらの領域に α -ヘリックスが形成されていることを示唆していた。現在、long-range NOE の解析を行っている最中である。発表ではその結果についても報告する予定である。

References

1. Kikuchi M, Kawano K, Nitta K. Calcium-binding and structural stability of echidna and canine milk lysozymes. *Protein Sci* 1998;7:2150-2155.
2. Koshihara T, Yao M, Kobashigawa Y, Nakagawa N, Isao T, Kuwajima K, Nitta K. Structure and thermodynamics of the extraordinary stable molten globule state of canine milk lysozyme. *Biochemistry* 2000; 39:3248-3257.
3. Kobashigawa Y, Demura M, Koshihara T, Kumaki Y, Kuwajima K, Nitta K. Hydrogen Exchange Study of Canine Milk Lysozyme: Stabilization Mechanism of the Molten Globule. *Proteins Struct Funct Genet* 2000;40, 579-589.
4. Koshihara T, Hayashi T, Ishido M, Kumagai I, Ikura T, Kawano K, Nitta K, and Kuwajima K. Expression of a Synthetic Gene Encoding Canine Milk Lysozyme in *Escherichia coli* and Characterization of the Expressed Protein. *Protein Eng* 1999a;12, 429-435.
5. Yao J, Dyson HJ, Wright PE. Chemical shift dispersion and secondary structure prediction in unfolded and partly folded proteins. *FEBS Lett* 1997;419, 285-289.

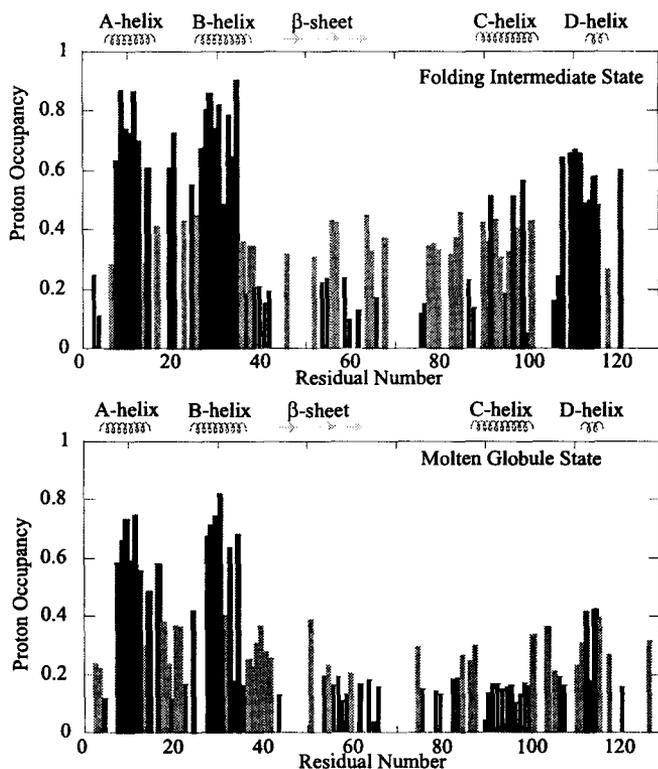


Fig. 1. Proton occupancy versus amino acid residue number of the FI state and the MG state of CML. Shown secondary structure elements are those of native CML.

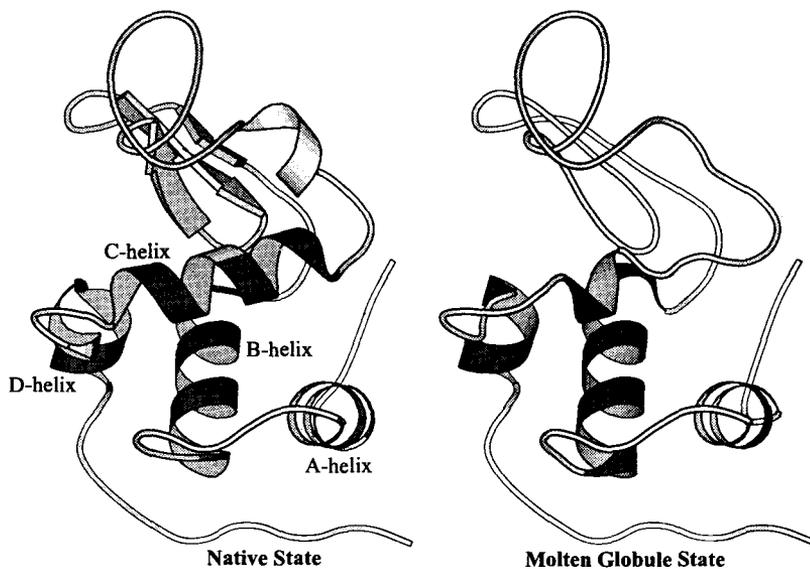


Fig. 2. Secondary structure predicted from CSI plotted on the x-ray structure of CML for the native and the molten globule state.

RecA の DNA 結合部位の解析

(¹理研・遺伝生化学, ²科技団・CREST)

○美川 務^{1,2}, 伊藤 隆^{1,2}, 八森由貴子¹, 齋藤雅子¹, 柴田武彦^{1,2}

Analysis of DNA binding site of RecA protein

(¹Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN; ²CREST, JST)

○Tsutomu Mikawa^{1,2}, Yutaka Ito^{1,2}, Yukiko Hachimori¹, Masako Saito¹ and Takehiko Shibata^{1,2}

RecA protein is essential for homologous genetic recombination and promotes strand exchange between two DNAs. We prepared N-terminal domain of RecA and analyze its DNA binding ability, using heteronuclear NMR spectroscopy.

The 2D ¹H-¹H NOESY spectrum of a synthetic peptide corresponding to the N-terminal domain of RecA did not show any feature characteristic of an ordered structure. However, upon the addition of 12mer(dC) to the N-terminal domain, inter- and intra- molecular NOEs were observed. As the next step, we prepared ¹⁵N labeled N-terminal domain of RecA. Complete backbone resonance assignment of N-terminal domain, both in the absence and presence of ssDNA was obtained. These results suggested that the N-terminal peptide folded into a compact domain upon ssDNA binding. Further structural analysis of the N-terminal domain bound to DNA is in progress.

[序]

RecA は DNA 相同組換え反応において中心的な役割を果たす蛋白質であり, DNA 組換え修復や, DNA 傷害に対する SOS 応答の誘導に必須である。RecA は多数の分子で DNA 上にフィラメント構造を形成し, その構造を介して DNA 組換え反応を行う。そのフィラメント形成部位のひとつである N 末端ドメインは, 自身の立体構造の維持に, 隣り合う RecA 分子との蛋白質・蛋白質間相互作用を必要とする。そして, この性質が RecA のフィラメント形成機構に重要である可能性が考えられる。そこで本研究では, N 末端ドメインの機能とその構造との関係を更に詳細に調べるために, 主に NMR 分光法を用いて, その機能解析を行うことにした。

RecA, recombination, DNA binding

みかわ つとむ, いたう ゆたか, はちもり ゆきこ, さいとう まさこ,
しばた たけひこ

[結果と考察]

N末端ドメインの2D ^1H - ^1H NOESY スペクトルを測定したところ、N末端ドメインは特定の構造を形成していないことが示唆された。しかしながら、そこにDNAを加えたところ、新しい分子間NOEと分子内NOEがそれぞれ観察された。この結果はN末端ドメインが蛋白質・蛋白質間相互作用だけではなく、蛋白質・DNA間相互作用によっても一定の立体構造を形成することを示唆している。そこで、 ^{15}N で標識されたN末端ドメインを調製し、さらに詳細にこの相互作用を解析することにした。DNA存在下、非存在下でそれぞれ主鎖の帰属を行い、DNA結合に関与するアミノ酸残基を決定した。現在、DNA結合状態のN末端ドメインの構造解析を進行中である。RecAのN末端ドメインの蛋白質・蛋白質間相互作用、蛋白質・DNA間相互作用、これら異なる二種類の相互作用がどのようにRecAのフィラメント形成機構に寄与しているのかを考察する。

¹⁵N 緩和測定による GTP 結合型 Ras の動的構造の解析(¹理研・ゲノム科学総合研究センター, ²理研・遺伝生化学,³理研・細胞情報伝達, ⁴東大院理・生化)○畑中 稔¹, 伊藤 隆^{1,2}, 高杉 憲司², 横山 茂之^{1,3,4}**Backbone resonance assignment and ¹⁵N relaxation analysis of Ras-GTP**○Minoru Hatanaka¹, Yutaka Ito^{1,2}, Kenji Takasugi² and Shigeyuki Yokoyama^{1,3,4}(¹Protein Research Group, Genomic Sciences Center, RIKEN; ²Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN; ³Cellular Signaling Laboratory, RIKEN; ⁴Department of Biophysics and Biochemistry, School of Science, University of Tokyo)

Abstract: Ras-GTP interacts various target proteins using a shared interaction surface localized around the phosphate-binding and the effector regions. We have recently elucidated from NMR experiments that the structure of the regions has conformational multiplicity, termed a "regional polysterism", in the GTP-bound state and proposed that it might play an important role for the multi-functionality of Ras in the signal transduction pathway.

In this study, we prepared Ras(Q61L), a mutant protein with drastically reduced intrinsic GTPase activity, bound to its proper ligand, GTP. With this sample, we for the first time achieved the backbone resonance assignments for overall length of the protein in the GTP-bound state including the phosphate-binding and the effector regions. Based on the assignments, we are attempting to analyze the relaxation parameters of the backbone ¹⁵N nuclei and will discuss the conformational multiplicity of Ras-GTP.

【序】GTP 結合タンパク質の一種である Ras は細胞内で起こる一連の情報伝達過程でスイッチ機能を果たしている。スイッチオン (活性) 状態に相当する GTP 結合型 Ras (Ras-GTP) は、お互いにアミノ酸配列の相同性が低い Raf1, PI3-kinase, Ral-GEFs, GAPs 等と相互作用する。これらの相互作用にあたっては、Ras のなかの「エフェクター領域」と「リン酸基結合領域」を共通のインターフェイスとしていることが知られている[Fig.1].

Ras は内在性の GTPase 活性を持っているため、Ras に結合した GTP は 298K でおよそ 3 時間で半数が GDP に加水分解される。したがって、Ras-GTP を用いて主鎖シグナルの帰属や緩和解析のための長時間の NMR 測定をおこなうことは不可能であり、GTPγS や GMPPNP 等の GTP アナログを用いて構造生物学的解析が行われてきた。私たちのこれまでの NMR 解析の結果から、Ras-GMPPNP や Ras-GTPγS は「エフェクター領域」と「リン酸基結合領域」に動的な多形性を持つことが示唆されており[1, 2], この動的多形性が、複数の異なるタンパク質と同一の領域で相互作用するために重要なのではないかと考えられている。しかし、Ras-GMPPNP や Ras-GTPγS では、「エフェクター領域」と「リン酸基結合領域」由来の ¹H-¹⁵N 相関ピークが、化学交換によるピークの著しいブロードニングのために観測することができないため、当該領域について緩和解析等の詳細な解析は不可能であった。また、Ras-GMPPNP や Ras-GTPγS では極端にブロードニングしていた ¹H-¹⁵N 相関ピークが、Ras-GTP ではある程度の強度で観測できるようになる場合が見られたため、本来の基質である GTP を結合した Ras-GTP を用いて解析を行うことが希求されていた。

本研究では、内在性 GTPase 活性を失った Ras(Q61L)変異体を用い、長時間の NMR 測定に耐える GTP 結合型試料の調製を行った。そして Ras(Q61L)-GTP の主鎖 ¹H/¹³C/¹⁵N シグナルの帰属を行った。さらに ¹⁵N 緩和測定を行い、動的解析を試みた。

キーワード : Ras, GTP 結合タンパク質, ¹⁵N-relaxation dynamics

○はたなか みのる, いう ゆたか, たかすぎ けんじ, よこやま しげゆき

【実験】本研究では、Ras(Q61L)変異体タンパク質として、C末端18残基を切除した171残基のタンパク質を用いた。

Ras(Q61L)-GTPの主鎖 $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ シグナル帰属のために、ユニフォーム $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識Ras(Q61L)-GTPと、ユニフォーム ^{15}N 標識Ras(Q61L)-GTPを調製した。これらのタンパク質をリン酸緩衝液[20mM Na-phosphate (pH6.5), 40mM NaCl, 0.5mM DTT in 90% $^1\text{H}_2\text{O}/10\%$ $^2\text{H}_2\text{O}$]を用いて調製しNMR測定試料とした。主鎖シグナルの帰属のために、2D ^1H - ^{15}N HSQC, CBCA(CO)NNH, CBCANNH, HNC(O), HN(CA)COと3D ^{15}N -separated NOESY-HSQCを測定した。測定はすべて293Kで行った。

また、主鎖のダイナミクスを調べるため、前述のユニフォーム ^{15}N 標識Ras(Q61L)-GTP試料を用い、 ^{15}N の T_1 , T_2 緩和時間測定、そしてsteady state $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE測定を行った。

測定はBruker社DRX600を用いて行い、データ処理及び解析はそれぞれAzara v2.0 (W. Boucher, unpublished), Ansig v3.3 (P. J. Kraulis, ref.: *Biochemistry* 33, 3515-3531, 1994)を用いて行った。

【結果・考察】Ras(Q61L)の性質から予想されたように、293KでRas(Q61L)-GTPにおけるGTPの加水分解速度は著しく遅くなり、3日間経過したのちでも半数以上のGTP型が存在することが ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルから確認された。このことから、測定時間が1~2日程度の3次元NMRを組み合わせることで、Ras(Q61L)-GTPにおけるシグナルの帰属が可能であることが確認された。また、Ras(Q61L)-GMPPNPとRas(Q61L)-GTPの ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを比較した結果、Ras(Q61L)-GTPのスペクトルにはRas(Q61L)-GMPPNPでは見当たらない20個程度の ^1H - ^{15}N 相関ピークが観測された。この「新しい」相関ピークは、Ras(Q61L)-GMPPNPで帰属不能な「エフェクター領域」と「リン酸基結合領域」由来のピークと考えられたため、Ras(Q61L)-GTPにおいては主鎖アミド基由来の ^1H - ^{15}N 相関ピークはほとんどすべて観測されており、それらの新しいピークも帰属可能であると予想された。

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識Ras(Q61L)-GTPを用い、4種類の3次元triple-resonance NMR測定を行なうことで80%以上の残基について主鎖 $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ シグナルを帰属することができた。残る20%弱の残基については ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上で比較的にブロードなピークを与えており、それ以上の完全な帰属を行うことは困難であった。そこで、帰属の不完全さと不確実さを取り除くために、3D ^{15}N -separated NOESY-HSQCの測定を行い、sequential NOEの解析を行った。その結果、N末端のMet残基と4個のPro残基を除く166個の全ての主鎖アミド基について $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ シグナルの帰属を行うことができた。

この帰属をRas(Q61L)-GDPの帰属と比較してみたところ「エフェクター領域」と「リン酸基結合領域」に属する残基において、化学シフトが大きく異なっていたため、これらの領域にGDP型からGTP型への転換によって構造変化が起きていることが改めて確認された。

これらの帰属に基づき、現在 ^{15}N 核の緩和測定を行い、動的構造の解析を試みている。Ras(Q61L)-GTPについて、緩和速度(T_1 , T_2)やNOEを測定することで、多形性を持つと考えられている領域の詳細な動的構造について議論できると予想される。前述の主鎖シグナルの帰属結果とあわせて報告する。

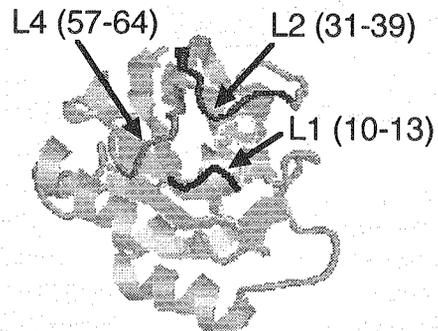


Fig. 1. NMR structure of Ras(1-171)GDP [ref. 1]

【参考文献】

1. Ito, Y. et al., *Biochemistry* 36, 9109-9119 (1997).
2. Geyer, M. et al., *Biochemistry* 35, 10308-10320 (1996).
3. Pai, E. F. et al., *EMBO J.* 9, 2351-2359 (1990).

大腸菌 DinI の高次構造と RecA との相互作用

(¹理研・遺伝生化学, ²CREST/JST, ³東大・院理・生化,

⁴理研・細胞情報伝達, ⁵理研 GSC)

相原秀樹^{1,2,3}, ○伊藤 隆^{1,2}, 美川 務^{1,2}, 横山茂之^{3,4,5}, 柴田武彦^{1,2}

Solution structure of *E. coli* DinI protein and its interaction with RecA

Hideki Aihara^{1,2,3}, ○Yutaka Ito^{1,2}, Tsutomu Mikawa^{1,2}, Shigeyuki Yokoyama^{3,4,5} and
Takehiko Shibata^{1,2}

¹Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN; ²CREST, JST (Japan Science and Technology);

³Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo;

⁴Cellular Signalling Laboratory, RIKEN; ⁵Protein Research Group, Genomic Sciences Center, RIKEN

The solution structure of DinI, a protein which negatively regulates the SOS response in *Escherichia coli* by inhibiting the activity of RecA, was determined using NMR spectroscopy. DinI consists of two α -helices and a three-stranded β -sheet, with a bipolar characteristic in the electrostatic potential at the protein surface. The NMR titration experiment suggested that DinI tightly binds to RecA. The TRNOE experiments monitoring the interaction of RecA with ssDNA showed that pre-incubation of RecA with DinI causes no inhibition effect on the ssDNA-binding activity of RecA. We therefore propose that DinI is preventing LexA from interacting with RecA-ssDNA complex, rather than promoting the dissociation of ssDNA from the complex.

【序】

DinI(アミノ酸 81 残基)は、大腸菌における SOS 誘導蛋白質の一つであり、DNA の損傷への応答として発現が誘導される。SOS 応答は ssDNA に結合した RecA が LexA レPRESSOR の自己消化を促進することによって誘起される。これまでの研究によって、DinI は RecA の LexA 自己消化促進活性を抑えることによって、SOS 応答を抑制的に制御していることが判明している。

本研究では、DinI の高次構造を NMR を用いて決定するとともに、DinI と RecA の相互作用のメカニズムの解明を試みた。

【結果および考察】

ユニフォーム ¹³C/¹⁵N 標識 DinI 試料を調製し、主鎖および側鎖シグナルの帰属を行った。ついで NOE 由来の距離情報と二面角の情報を解析し、高次構造決定を行った。DinI の高次構造は、既知の蛋白質フォールドのいずれとも明らかな高次構造上のホモロジーを示さなかった。DinI に対する RecA のタイトレーション実験を行った結果、DinI は RecA とおよそ 1:1 で強く結合することが明らかになった。

Keywords: DinI, RecA, ssDNA, 高次構造, 相互作用

あいはら ひでき, いたう ゆたか, みかわ つとむ, よこやま しげゆき, しばた たけひこ

つづいて、①d(TACG)+RecA, ②d(TACG)+RecA+DinI, ③d(TACG)+DinI の3種の試料についてTRNOESYを測定した(図参照). その結果, DinIはRecAのd(TACG)との結合を全く阻害しないことが判明した. したがって, DinIはRecAとssDNAの相互作用を阻害することによって間接的にLexAの自己切断を抑制するのではなく, ssDNAに結合したRecAに結合しLexAのRecAに対する接近を直接的に阻害していると考えられる.

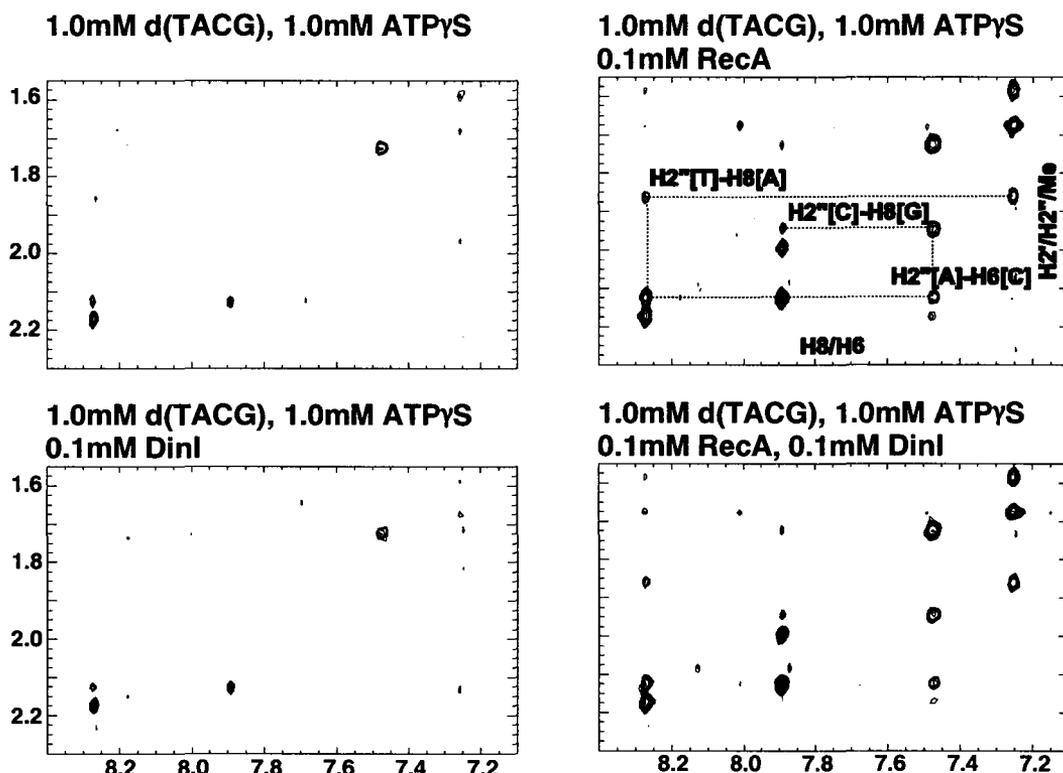


Figure:

2D ^1H - ^1H TRNOESY spectra ($T_m=180\text{ms}$) of d(TACG) + ATP γ S (upper left), d(TACG) + ATP γ S + RecA (upper right), d(TACG) + ATP γ S + DinI (lower left), and d(TACG) + ATP γ S + RecA + DinI (lower right). For each spectra, a region corresponding to H8/H6 (F2) and 2'/2''/Me (F1) is shown. Samples were dissolved in a 100% $^2\text{H}_2\text{O}$ buffer containing 20mM ^2H -Tris-HCl (pH 7.1), 6.7mM MgCl_2 and 150mM NaCl. All of these spectra were acquired at 298K on a Bruker DRX600 spectrometer.

epsin の ENTH ドメインの NMR による構造解析

(¹理研 ゲノムセンター, ²広島大 医, ³東大 理)

○小柴生造¹, 木川隆則¹, 菊池章², 横山茂之^{1,3}

Solution Structure of the Epsin N-terminal homology (ENTH) domain of human Epsin

Seizo Koshiba¹, Takanori Kigawa¹, Akira Kikuchi², and Shigeyuki Yokoyama^{1,3}

¹Genomic Sciences Center (GSC), RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research);

²Department of Biochemistry, Hiroshima University School of Medicine; ³Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo

Epsin has been identified as a binding protein of the Eps15 homology (EH) domains, and is involved in clathrin-mediated endocytosis. The N-terminal region of Epsin (residues 1 to 144) is highly conserved phylogenetically, and was named Epsin N-terminal homology (ENTH) domain. Although the precise role of the ENTH domain of Epsin is not well known, this domain has been reported to be required for endocytosis and actin cytoskeleton organization. In this study, we have determined the solution structure of the ENTH domain of a human Epsin by multidimensional NMR spectroscopy. The Epsin ENTH domain consists of seven α -helices which form two antiparallel hairpins and one three-helix hairpin. The tandem stacking of these hairpins constitutes a hydrophobic core in the ENTH domain. This topology is very similar to that of the VHS domain, which is thought to be involved in endocytosis, vesicular transport, and signal transduction. These results indicate that the ENTH and VHS domains constitute a common family involved in endocytosis.

<序論>

Epsin は, Eps15 や POB1 等のタンパク質に存在する Eps15 homology (EH)ドメインに結合するタンパク質として同定され, これまでにクラスリン依存性のエンドサイトーシスに関与することが明らかになっている。このタンパク質の C 末端領域は EH ドメインと相互作用し, 中央領域は AP2 と相互作用することが報告されている。このタンパク質の N 末端には, 生物種の間で配列上の保存性が高い約 140 残基からなる領域が存在し, Epsin N-terminal homology (ENTH)ドメインと命名された。このドメインはエンドサイトーシスにおいて重要な役割を果たしていることがこれまでに明らかになっているが, その正確な役割は現在明らかになっていない。本研究では, この epsin の ENTH ドメインの立体構造を多次元 NMR 法を用いて決定した。

多次元 NMR, 構造解析, タンパク質, エンドサイトーシス

こしばせいぞう, きがわたかのり, きくちあきら, よこやましげゆき

<方法>

human Epsin の ENTH ドメイン(1-144 残基)を, GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させ, 精製する系を確立した. 次に, 安定同位体標識した試料を用いて, 各種多次元 NMR スペクトルを測定した. 測定試料は, 約 1 mM の Epsin ENTH を使用し, バッファーは 20 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.5), 400 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.01 % アジ化ナトリウムを用いた. 測定は Bruker 社の DRX500 を用いて, 30°C で行った. データの処理は NMRPipe を用い, 解析は NMRView を用いた. 主鎖の帰属は, 3D HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HCACO, CBCANH, CBCA(CO)NH, ¹⁵N-edited NOESY 及び ¹⁵N-edited TOCSY スペクトルを用いて行い, 側鎖の帰属は主に 3D H(CCO)NH, C(CO)NH, HCCH-TOCSY, HCCH-COSY 及び ¹⁵N-edited TOCSY スペクトルを用いた. 距離情報は, 3D ¹⁵N-edited, ¹³C-edited, 及び 4D ¹³C/¹³C-edited NOESY スペクトルから得た. 構造計算は X-PLOR Ver. 3.1 を用い, simulated annealing 法で計算した.

<結果及び考察>

Epsin の ENTH ドメインの立体構造は 7 つの α ヘリックスから構成され, それらが 3 組のリピート構造を形成している. N 末端側の 2 組のリピート構造 (ヘリックス 1 と 2, 及び 3 と 4) はそれぞれ逆平行のヘアピン構造を形成し, 3 番目のリピート構造 (ヘリックス 5 から 7) は 3 本のヘリックスからなるヘアピン構造を形成している. ENTH ドメインの構造は, これら 3 組のヘアピン構造が積み重なったような構造からなり, 中心部に疎水性のコアを形成している. このフォールドでは, リピート構造をつなぐ 2 つの短いループ (α 2-3, 及び α 4-5) が構造の一方の面に向き, 各リピート内のヘリックス間をつなぐ 3 つのループ (α 1-2, α 3-4, 及び α 6-7) が反対側の面に向いている. これら 2 つの面には, ENTH ドメイン間で保存性の高い残基の中で, 疎水性のコアの形成に関与していないものの多くが存在し, これらの面がその機能に重要な役割を果たしていることを示唆している. ENTH ドメインの立体構造を, 報告されている他の構造と比較すると, ENTH ドメインに存在する 2 及び 3 本のヘリックスからなる 2 種類のリピート構造は, それぞれ HEAT リピートや ARM リピートと呼ばれる構造に類似している. これらの構造はそれぞれタンパク質内で繰り返して存在し, 細胞内で分子間相互作用に関与していることが報告されている. また ENTH ドメイン全体の構造は, 最近報告された VHS ドメインの立体構造と, 一次配列の相同性がほとんどないにも関わらず, 非常によく似ていることが明らかになった. この VHS ドメインは, エンドサイトーシスや膜輸送などに関与することが報告されており, ENTH ドメインと VHS ドメインが, エンドサイトーシスの領域において, 1 つの共通したファミリーを形成していることを示唆している.

緩和時間測定による Yeast Ubiquitin Hydrolase(YUH1)の
動的構造解析

(¹ 理研遺伝生化学,² 三菱化学生命研)

○高杉憲司¹, Sundaresan Rajesh¹, 須貝真理子², 河野俊之²,
柴田武彦¹, 伊藤隆¹

Backbone Dynamics Study of Yeast Ubiquitin Hydrolase(YUH1)

○Kenji Takasugi¹, Sundaresan Rajesh¹, Mariko Sugai², Toshiyuki Kohno², Takehiko
Shibata¹, Yutaka Ito¹

¹Laboratory of Cellular and Molecular Biology, RIKEN,

²Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences

The structure of YUH1 or YUH1-ubiquitin covalent complex was investigated by means of multi-dimensional NMR measurement using a 50%-deuterated/¹³C/¹⁵N-labelled YUH1. Complete backbone and side chain resonance assignments were obtained for free YUH1. The active binding site of YUH1 for ubiquitin was decided by the ¹⁵N, ¹H chemical shift perturbation analysis in combination with the structure modeling from the crystal coordinates of its human homologue UCH-L3^{1,2}.

In this study, the T_1 , T_2 of ¹⁵N and {¹H}-¹⁵N steady state NOE were measured for free YUH1. In order to estimate the flexibility of YUH1 backbone residues, the rotational correlation times and the order parameters were calculated from the relaxation data with model free approach. Based on the analysis of dynamic properties, the reaction mechanism of ubiquitin C-terminal hydrolysis and the importance of the flexible loops in YUH1 will be clearly understood.

Yeast Ubiquitin Hydrolase(YUH1, アミノ酸 236 残基)は polyubiquitin として発現される ubiquitin 前駆体などを認識し、ubiquitin ドメイン C 末端の Gly 残基の後ろでペプチド結合を切断する機能を持つ。YUH1 は酵母において同様の機能を有する UBP ファミリーを含め、既知の protease と一次構造上の相同性が低いことから、ペプチド鎖切断のメカニズムは不明であった。われわれは、YUH1 の ubiquitin ドメインとの相互作用のメカニズムを解明するために多次元 NMR 法により研究を行ってきた。一昨年度の NMR 討論会では、共有結合による YUH1 と ubiquitin との複合体について chemical shift perturbation を行い、インターフェイスについての考

Keywords: YUH1, 緩和時間, 動的構造

たかすぎ けんじ, Sundaresan Rajesh, すがい まりこ, こうの としゆき, しばた たけひこ,
いとう ゆたか

察を行った。われわれはこれらの結果を、YUH1 のヒト・ホモログである UCH-L3 の結晶構造¹⁾にマッピングすることにより、ubiquitin とのインターフェイスを明らかにした²⁾。しかしながら、一部のループ部分の残基については、共有結合複合体形成にもなって、おそらく化学交換によるピークのブロードニングをおこしている可能性があり、さらに詳細な研究が必要である。

そこで、ubiquitin に対する結合サイトが YUH1 単体において、ループ部分がどのような状態にあり、複合体形成の際にどのように構造が変化するかを明らかにするために、緩和時間測定による動的構造解析を行った。試料として 50%-²H/uniform-¹⁵N で標識された YUH1 を用い、¹⁵N 核の T_1 , T_2 および {¹H}-¹⁵N NOE の測定を行った。今回の発表では、これらの結果を Lipari らのモデルフリー理論^{3,4)}により評価を行い、YUH1 の溶液中でのバックボーンの運動性について考察を行う。さらに ubiquitin とのインターフェイスの動的構造から ubiquitin との複合体形成のメカニズムについての議論を行う。

References:

1. Steven C. Johnston, Steven M. Riddle, Robert E. Cohen, Christopher P. Hill, *EMBO J.* 18, 3877-3887(1999).
2. Rajesh S, Sakamoto T, Iwamoto-Sugai M, Shibata T, Kohno T, Ito Y. , *Biochemistry.* 38(29),9242-53(1999).
3. Lipari G., Szabo A., *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4546-4559(1982).
4. Lipari G., Szabo A., *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4559-4570(1982).

大腸菌 tmRNA における *trans*-translation に必須な シュードノットの立体構造

(千葉工業大学工学部¹, 弘前大学農学生命科学部²)

○行木信一¹, 白倉裕美¹, 藤井倫子¹, 姫野俵太², 武藤あきら²,
河合剛太¹

Structure of an RNA pseudoknot of *E. coli* tmRNA involved in *trans*-translation (Chiba Institute of Technology¹, Hirosaki University²)

Nobukazu Nameki¹, Hiromi Shirakura¹, Michiko Fujii¹, Hyouta Himeno², Akira Muto²,
Gota Kawai¹

Transfer-messenger RNA (tmRNA) is a unique molecule in combining both tRNA and mRNA properties, which facilitates a new translation reaction termed *trans*-translation. Its secondary structure of the 350-400 nts RNA is commonly characterized by a tRNA-like structure, coding region and four pseudoknots with different sizes. Among the four, we found that only PK1 is functional in *trans*-translation. In this study, we analyzed the structure of PK1 using NMR methods. Results have provided evidence that the two stems stacked to each other as often seen in pseudoknot structures, in spite of the existence of loop 3 between the stems. Furthermore, a sharp turn structure was found in PK1 structure, which share similar conformation with the U-turn structure in the anticodon loop of tRNAs. Relations between this similarity and the ribosome binding of tmRNA will be discussed.

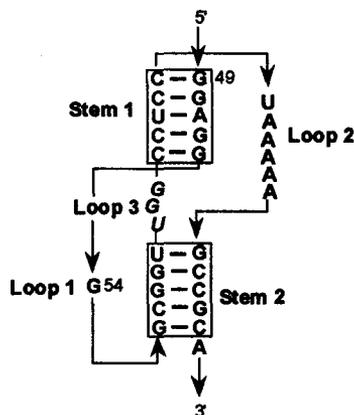


Fig. 1 Secondary structure of PK1 used in this study

[序] Transfer messenger RNA (tmRNA) は真性細菌に普遍的に存在し約 400 残基からなる安定な低分子 RNA で、tRNA として働く部位と mRNA として働く部位を一分子内に同時に持つ点で非常に特徴的な RNA である。多くの真性細菌間の配列比較および大腸菌 tmRNA における生化学的 probing 解析により、その二次構造は tRNA 様の構造を持つ部分、4 つのシュードノット構造 (PK 構造) およびタグペプチドをコードする領域からなっていることが示された¹。我々は、その 4 つシュードノットの中で mRNA 部位の上流に位置する 30 残基からなる PK 構造 (PK1) のみが、*trans*-translation に関与していることを示した^{2,3}。本研究では、PK1 における構造と機能の関係を明らかにするために、PK1 に相当する 31 残基の RNA およびその変異体について、NMR による解析を行った。さらに、安定同位体標識した PK1 RNA 試料を用いて、立体構造を決定することを試みた。

[方法] Fig. 1 に示す PK1 RNA を自動合成機によって調製した。また、¹³C/¹⁵N 標識 NTP (日本酸素) を用い、T7 RNA ポリメラーゼによって標識試料の調製を行った。さらに、T4 RNA リガーゼを用いた連結反応により、残基特異的な標識も行った。NMR スペクトルの測定は、DRX-600 分光計 (Bruker 社) を用いて 288 K および 298 K において行った。

Keywords: tmRNA, pseudoknot, *trans*-translation

なめき のぶかず, しらくら ひろみ, ふじい みちこ, ひめの ひょうた,
むとう あきら, かわい ごうた

軽水中において NOESY および ^{15}N - ^1H HMQC スペクトルの測定を行った。さらに、重水中において NOESY, HOHAHA, ^{13}C - ^1H HSQC, HCCH-TOCSY, HCCH-COSY および 3D-NOESY-HSQC スペクトルの測定を行った。loop 2 の連続するアデノシン残基を帰属するため、これらの残基を選択的に標識した試料についても測定を行った。構造計算は、X-PLOR を用い simulated annealing 法によって行った。

[結果及び考察] Fig. 2 に、PK1 の NMR スペクトルを示した。PK1 は、 Mg^{2+} 非存在下ではシャープなシグナルを与えないが、等モルの Mg^{2+} を加えることにより、スペクトルは大きく変化し、シャープなシグナルが得られた。このことから、PK1 は、 Mg^{2+} 存在下で初めて安定な PK 構造をとることが示された。等モル以上の Mg^{2+} を加えても、大きなスペクトル変化は観察されなかった。PK1 の特徴のひとつは、2つのステムが3塩基からなる loop 3 によって連結されていることである。イミノプロトンシグナルを解析した結果、loop 3 の前後に位置する G53 と G74 の間に NOE が観測され (Fig. 3) , このことから、loop 3 が存在するにもかかわらず、2つのステムがスタックしていることが示された⁴。

さらに、標識 RNA を用いて非交換性プロトンの帰属を行った。Fig. 4 に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ PK1 の ^{13}C - ^1H HSQC スペクトルを示した。得られた距離情報等を用いて X-PLOR による立体構造計算を行った結果、PK1 は、loop 1 すなわち G54 において、鋭い turn 構造 (G-turn) を形成していることがわかった。この G-turn 構造は、tRNA のアンチコドンループが普遍的にもつ U-turn 構造と類似しており、このことから、PK1 はコドン・アンチコドン複合体の構造を模倣している可能性が示された。すなわち、tmRNA が mRNA がない A-site に入る際、この PK1 が tRNA-mRNA 複合体を模倣する「PK1 擬態」モデルが考えられる。現在、PK1 の立体構造の精密化を進めている。

1. Felden, B. *et al.* (1997) *RNA*, 3, 89-103.
2. Nameki, N. *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.*, 286, 733-744
3. Nameki, N. *et al.* (2000) *FEBS Lett.*, 470, 345-349
4. Nameki, N *et al.* (1999) *Nucleic Acids Res.* 27, 1-9

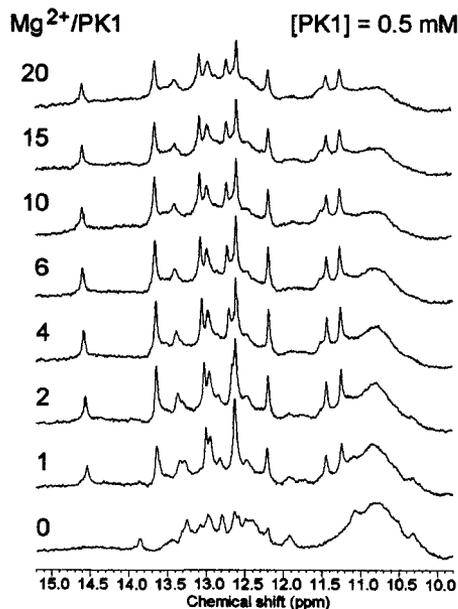


Fig. 2. Mg^{2+} dependence of PK1

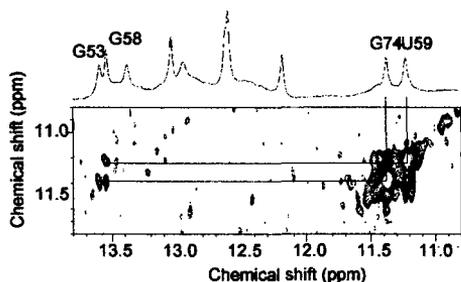


Fig. 3. NOESY spectrum of PK1

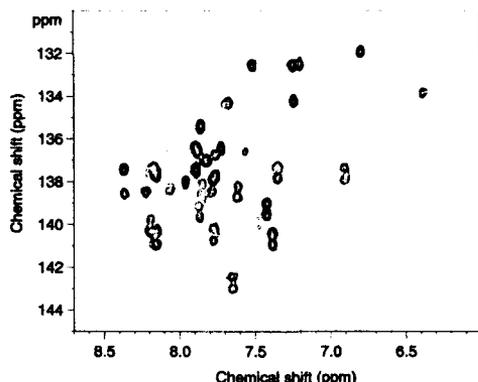


Fig. 4. ^{13}C - ^1H HSQC spectrum of PK1

バルジアウト残基を含む RNA の residual dipolar coupling を利用した構造解析

(千葉工大・工¹,

Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado²)

○ 染谷 龍彦¹, 坂本 泰一¹, 森村 香織¹, 富士原 和也¹,

Paul Hanson², Arthur Pardi², 河合 剛太¹

Application of residual dipolar coupling to the structural calculation of RNA containing bulge-out residues.

(Department of Industrial Chemistry, Chiba Institute of Technology¹,

Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado²)

○ Tatsuhiko Someya¹, Taiichi Sakamoto¹, Kaori Morimura¹, Kazuya Fujiwara¹,

Paul Hanson², Arthur Pardi², Gota Kawai¹

NMR solution structures of bio-macromolecules can be determined with distance constraints from NOEs and torsion constraints from scalar coupling constants. Recently, new constraints, residual dipolar couplings, have been introduced to the structure determination by NMR. In the presence of bicelles or Pfl phage, biomolecules are aligned to the magnetic field and, therefore, the residual dipolar coupling can be obtained. In the present study, the Pfl phage system was applied to a short RNA containing four bulge-out residues in its stem, which corresponds to the influenza virus NS1 protein binding region of the U6 snRNA. NMR spectra of the model RNA were measured and most of signals were assigned. Structural calculations were performed with the results that structures converged well except for the bulge-out region and that the global structure was not determined. Next, the residual dipolar couplings were fit to each of the calculated structures. These results are consistent with an angle of ~120 degrees between the two stems.

=序論=

従来の立体構造解析では、NOE を解析することにより得られるプロトン間の距離情報(<5 Å)と、scalar coupling から得られるねじれ角の情報を用いて構造解析を行っていた。しかし、RNA の場合には、バルジアウトやインターナルループなどがあり、それらの部位の情報を得ることが困難であるために、立体構造を決めるのは容易ではなかった。溶液における NMR スペクトルの測定の場合、分子は磁場に対していろいろな方向を向くため、dipolar coupling は平均されてしまい観測することはできない。しかし、脂質二重膜や pfl phage などのような磁場に対して配向する性質を持つ分子を測定試料と共存させることで、測定分子をも磁場に対して配向させることができ、residual dipolar coupling を観測することができるようになる¹⁾。Residual dipolar coupling を解析することにより、dipolar coupling 相互作用が観測された原子同士を結ぶベクトルと磁場との傾きがわかり、離れた部分どうしを関係付ける構造情報として用いることが出来るため、生体高分子の全体構造を決定する上で有利になる。そこで、バルジアウト残基を含むモデル RNA を用いて、ステム間の相対角度について検討を行った。今回用いたモデル RNA は、U6 snRNA のインフルエンザウイルス NS1 タンパク質結合部位

キーワード: 核酸の構造, residual dipolar coupling, インフルエンザ

そめや たつひこ, さかもと たいいち, もりむら かおり, ふじわら かずや, ぼーる はんそん, あーさー ぱーでい, かわい ごうた

である。NS1 タンパク質とは、ウイルスの翻訳調節に関与した複数の機能を持つ RNA 結合タンパク質であり、それぞれの機能に対応して異なった target RNA と同じ領域で結合するが²⁾、どのように認識しているかはわかっていない。本研究では、NS1 タンパク質による異なった target RNA への結合メカニズムを解明することをめざしている。

=方法=

バルジアウト領域を含む 34 残基のモデル RNA (Fig.1)を構築した。そのモデル RNA について、NMR 測定を行い、スペクトル解析および構造計算を行った。また、residual dipolar coupling の測定は、磁場に対して配向する pfl phage を NMR 測定試料と共存させて行った。測定に用いた溶媒は、30 mM Sodium phosphate, 50 mM NaCl, pH 6.9 であった。pfl phage を濃度が 10 mg/ml になるように加え、residual ¹H-¹³C dipolar coupling を測定した。

=結果および考察=

NMR スペクトルから得られた拘束条件(NOE と二面角)を用いて、立体構造計算を 100 回行った。その結果、約 8 割の構造では、ステム部分が収束したが、バルジアウト領域については収束していなかった(Fig.2)。これは、バルジアウト領域についての NOE の情報が少なかったためと考えられる。

そこで、計算によって得られた構造について residual ¹H-¹³C dipolar coupling の値を計算し、それと実測値との fitting を行った。このとき、order parameter がステム領域とバルジ領域で異なる可能性があるため、ステム部分だけの dipolar coupling の値のみを用いて行った。dipolar coupling に関する RMSD の値がもっとも低かった構造を Fig.3 に示した。このことにより、モデル RNA の構造はのようにバルジアウト領域を挟んで 2 つのステムが約 120 °で折れている構造であることが示唆された。

=まとめ=

今回用いたモデル RNA のステム間の相対角度は、約 120 °であることがわかった。今後はさらに、バルジアウト領域を含め、residual dipolar coupling の情報を加えて refinement を行い、立体構造を決定する。

=参考文献=

- 1) M. R. Hansen, et al., *Nature Struct. Biol.* **5**, 1065-1074 (1998).
- 2) Y. Qiu, et al., *RNA*. **1**, 304-316 (1995).

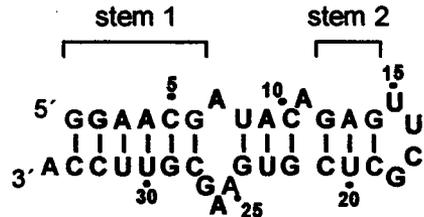


Fig.1 Secondary structure of the model RNA.

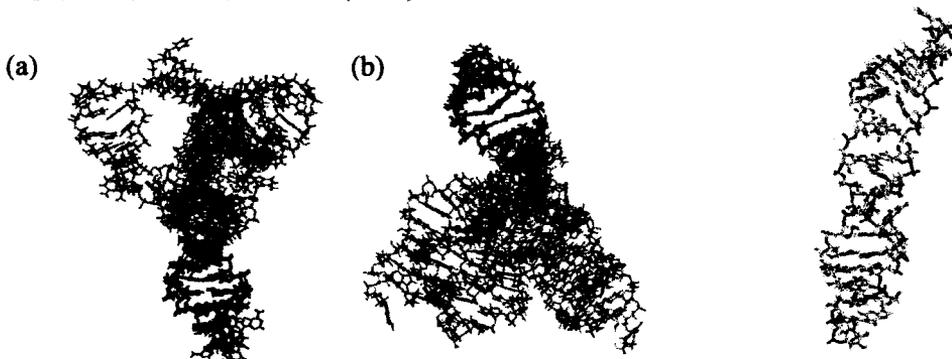


Fig.2 Calculated structures without residual dipolar coupling restraints. Superimpose of 5 structures in stem1 (a) and stem2 (b).

Fig.3 The structure gave the best fit.

PGSE-NMR を用いたイオン性液体の拡散挙動解析
 (横浜国立大学¹、物質研²) ○野田明宏¹、早水紀久子²、渡邊正義¹

The Analysis of Ionic Diffusion Mechanism for Ionic Liquids
 by Using PGSE-NMR Method

Yokohama National University¹, National Institute of Material and Chemical Research²

Akihiro Noda¹, Kikuko Hayamizu², Masayoshi Watanabe¹

The fundamental understanding of ionic liquid is not sufficient, for example, the ion transport mechanism, the degree of ion association, activity, and the interaction between the ions have not been evidently revealed. Because the ionic liquids are formed by only ionic species, so these liquids are highly concentrated electrolyte solutions. The interpretations of their physicochemical properties are very complicated. Thus we measured the self-diffusion coefficients of ions in ionic liquids by using PGSE-NMR method, together with ionic conductivity and viscosity, for 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (EMIBF₄) and bis(trifluoromethanesulfonyl)imide (EMITFSI), and 1-butylpyridinium tetrafluoroborate (BPBF₄) and bis(trifluoromethanesulfonyl)imide (BPTFSI). The relationships between the results of these measurements are discussed by using some basic equations.

〔緒言〕室温で液体であるイオン性液体、あるいは常温熔融塩と呼ばれる本研究で用いている物質はイオンのみで構成される液体で、構成成分がイオンのみであるがための様々な興味深い性質を示し、主な特徴としては高イオン導電率、広い電位窓、不揮発性や不燃性などの熱安定性、さらには酸や塩基に対する耐性などの化学安定性を有するものである。よって電池やキャパシタなどの電気化学デバイス用の電解質、あるいはそれらの溶媒として、または化学合成における溶媒や触媒としても注目され、現在世界中で研究が加速度的に行われている。これらイオン性液体の研究が進むにつれて性質は徐々に明らかにされつつあるが、その物理化学的解釈は非常に難解である。と言うのもイオン性液体がイオンのみで構成される電解質濃厚溶液であること、さらには当然ながらイオンが正と負の電荷を有するため、つまりカチオンとアニオンが存在するためにある一つのイオン性液体は本質的に二成分からなるなどの理由により、イオン性液体中のイオン-イオン相互作用や個々のイオン挙動は未だほとんど理解されていないという現状にあるが大変興味深いところである。そこで本研究においては図1に示すような4種類の

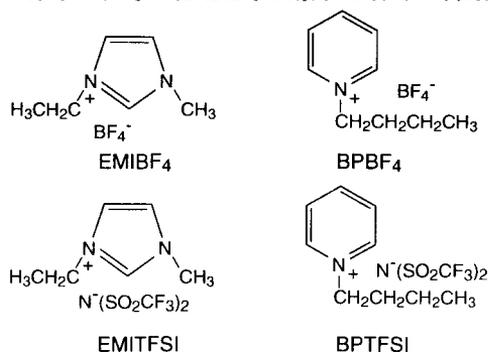


Fig. 1 Structure of EMIBF₄, BPBF₄, EMITFSI and BPTFSI.

(キーワード) PGSE-NMR イオン性液体 自己拡散係数 イオン導電率 粘性率

(著者ふりがな) のだあきひろ¹、はやみずきくこ²、わたなべまさよし¹

イオン性液体を合成し導電率や粘性率の測定に加え、イオン拡散を直接観測することのできるパルス磁場勾配スピネコー-NMR (PGSE-NMR) 法を用いて、系のカチオンとアニオンの自己拡散係数を個別に測定し、これらの測定結果を Nernst-Einstein 式などに導入することによって、イオン性液体中でのイオン挙動を明らかにすることを目的としている。

〔実験〕イオン導電率はステンレス電極を用いた複素インピーダンス法から、粘性率はコーンロータ式の粘度計を用いて、自己拡散係数は専用の拡散プローブと高出力アンプを付属して 4.7T の磁場で ^1H 、 ^{19}F -NMR を測定した。

〔結果と考察〕図 2 に 1-エチル-3-メチルイミダゾリウムテトラフルオロボレート (EMIBF₄) およびアニオン構造が異なる 1-エチル-3-メチルイミダゾリウムビス(トリフルオロメタン)スルホニルイミド (EMITFSI) の拡散係数温度依存性をカチオン (EMI⁺) とアニオン (BF₄⁻あるいは TFSI⁻) について別々に Arrhenius プロットで示す。この測定は 100℃から -10℃まで温度を降温させながら測定を行った。この温度範囲において本図から解るように、同じカチオン構造でも対アニオン構造が異なることによってカチオンの自己拡散係数が異なること、カチオンがアニオンよりも早く拡散していること、アニオンに

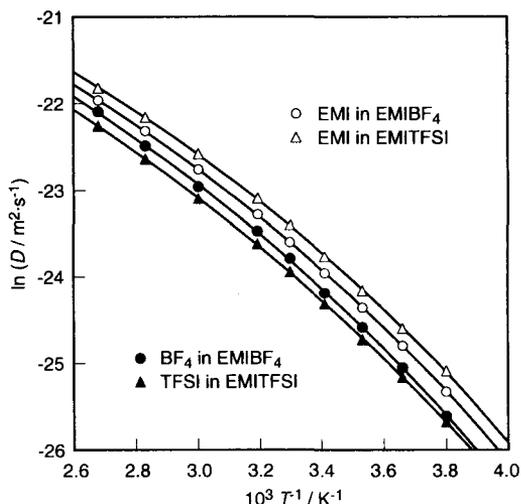


Fig. 2 Arrhenius plots of the self-diffusion coefficient of the anion and the cation for EMIBF₄ and EMITFSI.

については BF₄⁻が TFSI⁻よりも早く拡散していることがわかる。このように PGSE-NMR 法は見たいイオン種の拡散挙動を直接追うことが可能なことから、本研究で用いているイオン性液体のみならず、他のイオンが関与する物質やアプリケーションにおいてもその挙動を追跡するのに非常に有用な方法である。しかしながら問題としてイオンを扱う場合はそのイオンが解離しているのか、あるいは会合しているのかを考慮に入れる必要があり、このようなイオン性液体においてもすべてのイオンが解離してイオンとして存在しているかどうかは明らかになっておらず、会合体も存在する場合はイオンと会合体双方の平均として拡散係数が求められることである。本測定の結果によると、EMITFSI がより EMIBF₄ に比べカチオンとアニオンの拡散係数に差が見られ、またカチオンの拡散を比べてみると EMITFSI 中の EMI カチオンがより大きな拡散係数を示していることから、EMITFSI 中のイオン種はより解離したイオンとして存在していることが伺える。これら PGSE-NMR 法を用いた拡散係数の測定結果とイオン導電率の関係は Nernst-Einstein 式により、拡散係数と粘性率の関係は Stokes-Einstein 式によって考察したところ、必ずしも解離したイオン全てがイオン伝導に寄与していない、あるいはイオン伝導には会合して電荷を持たない成分の存在が有利に働くこと、粘性と拡散は非常に良く相関していることが明らかとなった。さらに拡散成分が単一ではなく、時間依存性を伺わせる測定結果も得られているので、イオンの解離や会合、あるいは活量という観点からこれらを議論する予定である。

j-hmbc 法によるフロリジン包接体における
O-グリコシル結合の解析

(工技院・生命研¹ 日本電子²) ○石塚靖子¹、根本 直¹、
金澤健治¹、中西洋志¹、内海博明²、鴨 修²

O-Glycosyl bond in florizin in inclusion complex analyzed with j-hmbc method
(AIST.NIBH¹, JEOL²) Yasuko ISHIZUKA¹, Tadashi NEMOTO¹, Kenji KANAZAWA¹,
Hiroshi NAKANISHI¹, Hiroaki UTSUMI², Osamu KAMO²

Abstract: Florizin is a glycoside composed two phenols combined with propanone. Phenol residue of florizin is included in a hydrophobic space of β -CD, causes the chemical shift changes in both florizin and β -CD and also induced circular dichroism spectra. In the case of floretin; non-glycoside, phenol residue does not enter into the inner space of β -CD. Glucose residue has been considered to bear an important roll to make a complex of phenol residue with β -CD. In this report, hetero-nuclear long range coupling constant about O-glycosyl bond in florizin was analyzed in both case free-florizin and included florizin. Large change in the 3D structure of florizin was suggested from coupling constants and NOEs.

[序] フロリジンは β -CD と混合すると β -CD に容易に包接され、フロリジン、 β -CD 共に、¹H, ¹³C シグナルの化学シフトに変化が現われ¹⁾、誘起円偏光二色性スペクトルからフロリジンの配向についての推定が行われている²⁾。フロレチンは β -CD に包接されず、フロリジンの包接には糖（グルコース）の存在が必要である。糖（グルコース）がどのように介在して包接が起るかは興味があるところである。今回、NOE と j_hmbc 法による異種核ロングレンジ結合定数を求めたことによって、free-フロリジンと包接されたフロリジンで分子の立体構造が大きく異なっていることがわかったので報告する。

[実験] フロリジン及び β -CD は市販品を精製せずにそのまま用いた。NMR スペクトルは日本電子製の ECP800(¹H 核で 800.08MHz, ¹³C 核で 201.20MHz)を用いて 25° C で観測した。

キーワード：j_hmbc 法、異種核 long range coupling、フロリジン、包接

いしづかやすこ、ねもとただし、かなざわけんじ、なかにしひろし、うつみひろあき、かもおさむ

[結果] 図1のようにフロリジンの水素を定義する。フロリジンのシグナルの帰属は定法によって行った。フリーのフロリジンの場合、NOEとして、3a,3b-2^{'''},6^{'''}、2a,2b-2^{'''},6^{'''} 及び1[']-3[']が観測された。β-CDに包接したフロリジンのNOEとして3a,3b-2^{'''},6^{'''}は観測されたが、2a,2b-2^{'''},6^{'''}が観測されず、あらたに3[']-3[']が加わった。β-CDとフロリジンの間には強いNOEがβ-CDの3位及び5位の水素とフェノール環(B)の水素との間に見られた。表1にみるように包接体とフリーのフロリジンではグルコースの水素核の結合定数はわずかに異なり、ピラノース環骨格に変化が生じていることが示唆された。フロログルシン環(A)とグルコースの結合に関して求めた異種核ロングレンジ結合定数は表2に結果を示した。フリーのフロリジンと包接されたフロリジンでは明らかに異なった結合定数が得られ、グルコースの配置がフリーと包接体では異なることがわかった。今後、観測されたNOEおよび異種核結合定数を用いたフロリジンの立体構造のシミュレーションを行う。

Table 1. ³J in glucose (Hz)

	florizin	florizin+β-CD(1:2)
J _{1[']2[']}	7.8	7.9
J _{2[']3[']}	9.3	9.3
J _{3[']4[']}	9.5	9.1
J _{4[']5[']}	9.5	8.8
J _{5[']6a[']}	6.0	4.5
J _{5[']6b[']}	2.2	1.8
J _{6a[']6b[']}	12.5	12.4

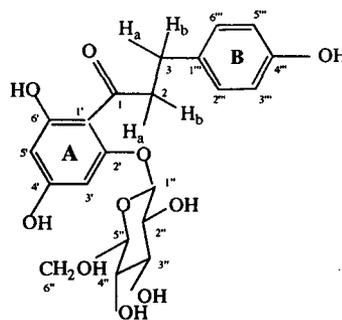


Fig. 1. Florizin

Table 2. Coupling constant from j-hmbc (Hz)

	florizin	florizin+β-CD(1:2)
³ J _{C2H1[']}	5.5	1.5
R2*	0.975	0.925

* 説明分散。

1) Y. Ishizuka, Y. Nagawa and H. Nakanishi, *J. Inclusion Phenomena*, 2,781-789 (1984).

2) Y. Ishizuka, Y. Nagawa, H. Nakanishi and A. Kuboyama, *J. Inclusion Phenomena & Mol. Recognition Chem.*, 9, 219-225, (1990)

^{15}N NMR法による環状イミドリン酸イオンの分子内水素結合挙動研究
(神戸大学工学部、神戸大学大学院自然科学研究科*)

○牧 秀志、植田 佳樹*、成相 裕之*

A ^{15}N NMR Study on the Intramolecular Hydrogen Bond Formation of *cyclo-μ*-
Imidopolyphosphate Anions

^aHideshi Maki, ^bYoshiki Ueda, and ^bHiroyuki Nariai

^aDepartment of Chemical Science and Engineering, Faculty of Engineering, Kobe University,
1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

^bDepartment of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe
University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

Cyclic imidopolyphosphate anions, involving P-NH-P linkages, i.e., *cyclo-μ*-triimidotriphosphate, $\text{cP}_3(\text{NH})_3$, and *cyclo-μ*-tetraimidotetraphosphate, $\text{cP}_4(\text{NH})_4$, contain non-bridging oxygen atoms as well as bridging nitrogen atoms as donor atoms for metal complexation. In addition to this interesting feature as ligand molecules, they have tautomerism equilibria. However, quite little has been known on intermolecular hydrogen bond formation in these ligands. A ^{15}N NMR technique is expected to provide deep insights into the microscopic hydrogen bond formation. ^{15}N enriched samples of these anions have been prepared and the hydrogen bond formation in the cyclic anions have been investigated precisely. The pH profile of the ^1H coupled ^{15}N NMR spectra of both anions gives most straight forward evidence for the intramolecular hydrogen bonding in these cyclic anions.

【緒言】シクロトリイミド三リン酸イオン ($\text{cP}_3(\text{NH})_3$)、シクロトリイミド四リン酸イオン ($\text{cP}_4(\text{NH})_4$) はリン原子がイミノ基で架橋した構造を持つ。これらの配位子においてはイミノプロトンが分子内を移動することによって互変異性が起こり、配位子の複雑な錯生成挙動の一因となっている。このような系での酸解離挙動の研究は多座配位錯体の配位挙動推定などに有用であるが、通常の熱力学的測定法では詳細な情報を得られない。またリン原子は分子内水素結合に関与しないため ^{31}P NMR法で直接的な情報を得ることは困難である。そこで本研究においては、 ^{15}N NMR分光法を用いて環状イミドリン酸イオンの互変異性ならびに分子内水素結合状態に関する研究を行った。 ^{15}N NMR分光法は高い周波数分解能を持ち、分子内水素結合に関する情報が期待できる。

NITROGEN · IMINO GROUP · TAUTOMERISM · HYDROGEN BOND · PHOSPHATE

まき ひでし・うえだ よしき・なりあい ひろゆき

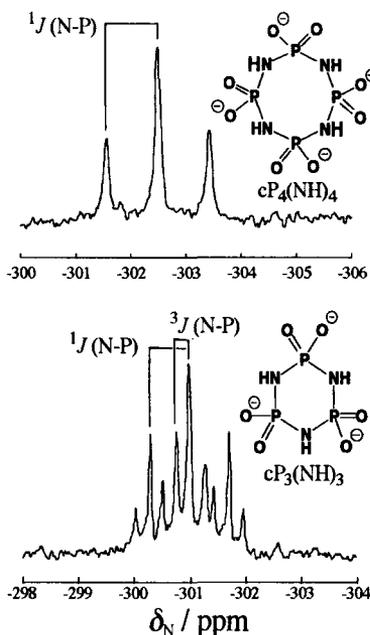


Fig.1 ^1H -decoupled ^{15}N NMR spectra of $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ anion ($C_L=0.10 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 6.82) and $\text{cP}_4(\text{NH})_4$ anion ($C_L=0.05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7.37).

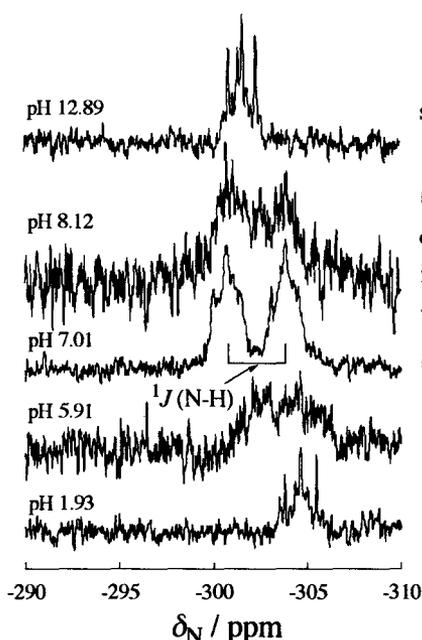


Fig.2 Representative ^1H -coupled ^{15}N NMR spectra of $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ anion (non-decoupled).

遠方のリン原子からの影響を受けていると思われる。ところが $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ では遠方のリン原子は1個しかなく、また全ての窒素原子は磁氣的に等価であるため、観測結果を解釈するには別のスピン-スピン結合経路を考慮に入れる必要があり、分子内水素結合の可能性が示唆された。

^1H coupling条件下で得られた $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ のスペクトルをFig.2に示す。pH 7付近において、隣接するプロトンの影響によりシグナルが2本に分裂し、 $^1J(\text{N-H})$ が最大となった。すなわち、高pH領域から中性領域になるにつれて分子内水素結合が安定であるが、pH 7付近では分子内水素結合が消滅し、プロトンは窒素原子のみに配位する。さらに低pH領域になると酸素原子にもプロトンが配位し、同時に互変異性が現れると考えられる。また、同様の結果が $\text{cP}_4(\text{NH})_4$ においても確認された。

$^1J(\text{N-H})$ のpH依存性をFig.3に示す。 $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ では $^1J(\text{N-H})$ がpH 6.5~7.5で最大であり、この時プロトンが窒素原子に配位した安定構造となると考えられる。さらに $\text{cP}_4(\text{NH})_4$ ではこの安定構造がpH 6.0~9.0と、高いpH領域におよぶ。 $\text{cP}_4(\text{NH})_4$ は空間的に歪んだ構造を持つため、 $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ に比べ分子内水素結合が不安定であると考えられる。このような詳細かつ新しい酸解離挙動の研究は今後金属カチオンなどとの錯生成挙動を研究する上でも大いに有用である。

【実験】 Bruker 社製 DPX-250 NMR測定装置 (Reference; 90% Formamide + 10%Dimethyl sulfoxide- d_6) を用い、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ にて ^1H decoupling および coupling 条件下で測定した。また試料溶液は、 0.10mol dm^{-3} $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ および 0.05mol dm^{-3} $\text{cP}_4(\text{NH})_4$ 水溶液に HClO_4 又は $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ を順次添加し、pH 0~12で測定を行った。 $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ および $\text{cP}_4(\text{NH})_4$ 分子内の窒素原子のうち、10%が ^{15}N に濃縮されている。

【結果および考察】 ^1H decoupling条件下で得られた代表的なスペクトルをFig.1に示す。 $\text{cP}_4(\text{NH})_4$ では1組の三重線が得られた。これは、 $\text{cP}_4(\text{NH})_4$ が比較的歪んだ構造を持つため、隣接する2個のリン原子のみからスピン-スピン結合の影響を受けるためである。これに対し、 $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ では三重線の三重線が得られた。 $\text{cP}_3(\text{NH})_3$ は平面構造に近いいためスピン-スピン結合が伝達しやすく、

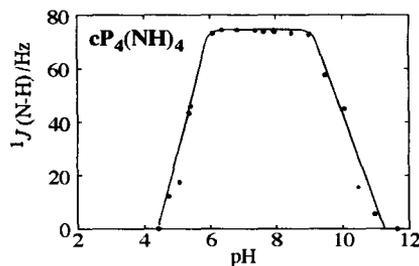
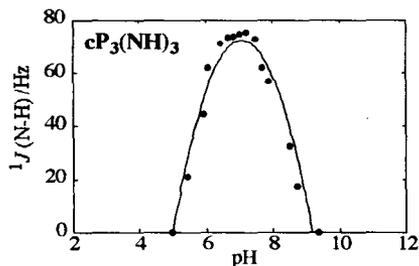


Fig.3 Plots of $^1J(\text{N-H})$ vs pH

1,3,5-Tri-alkyl-置換ベンゼンの立体障害
 ・溶媒シフトと緩和時間による検討
 (電気通信大学) ○前田真悟、丸森俊男、丸山勝也、仁木國雄、鈴木 冲

A study of steric hindrance of 1,3,5-trialkylbenzenes on the basis of
 solvent shifts and T₁ measurements

(University of Electro-Communications)

○ Shingo Maeda, Toshio Marumori, Katsuya Maruyama,
 Kunio Nikki and Noboru Suzuki

The steric hindrance of the ring hydrogen atoms on benzene derivatives(CH₃, C₂H₅, i-C₃H₇, t-C₄H₉, and neo-C₅H₁₁) is successfully estimated by means of the proton NMR solvent shifts. The steric hindrance of ring protons on 1,3,5-trineopentylbenzene varies significantly with the solvents used. This result reveals that the conformation of neo-C₅H₁₁ groups is easily changed by the dispersion force of the solvents. The conformations of alkyl substituents are also discussed based on the T₁ values of each carbon atom on 1,3,5-trialkylbenzenes in C₆F₁₄, CCl₄, and CH₂I₂.

1. 序論

Carter らによると、1,3,5-trineopentylbenzene の3つの置換基がベンゼン環の面に対して同じ側に集まったものが優位配座であると報告されている。¹⁾これは3つの置換基間に引力相互作用が働くことで説明されている。つまり、分子の立体配座は置換基の立体障害すなわち反発力だけでなく、置換基間の引力的相互作用にも支配されているということを示した最初の研究である。

我々はこのようなアルキル基間の分子内相互作用、または溶媒分子との分子間相互作用について、その大きさや特徴を明らかにしようとしてきた。今回、1,3,5-トリアルキル置換ベンゼンの置換基の大きさを変えて環プロトンの溶媒シフトを測定したところ、置換基が大きいほど溶媒シフトが小さくなることがわかったが、これは環プロトンへの溶媒分子の近づきやすさが置換基の大きさと関連することを示していると考えられる。しかし、溶媒によっては溶媒シフトの大きさの順番が変化する置換基があることを見出した。この結果は、置換基の大きさが溶媒により変化することを意味している。この現象に置換基の回転運動が関連していると考え、緩和時間の測定も試みた。

キーワード：立体障害、1,3,5-Tri-alkyl-置換ベンゼン、溶媒シフト、緩和時間

まえだしんご、まるもりとしお、まるやまかつや、につきくにお、すずきのぼる

2. 結果と討論

2.1 溶媒シフト

NMR の溶媒シフトを利用してアルキル置換ベンゼン誘導体の置換基を変えた時の環プロトンへの溶媒の接近のしやすさを見積もった。その結果、屈折率の特に大きな CH_2I_2 中では、置換基の数が増加する (1,4-置換体から 1,3,5-置換体へ) に従い溶媒シフト ($\Delta\delta$) は見かけ上高磁場シフトを示した。置換基を変えた場合の溶媒シフト (高磁場シフト) は見かけ上 $t\text{-C}_4\text{H}_9$ 、 $i\text{-C}_3\text{H}_7$ 、 $\text{neo-C}_5\text{H}_{11}$ 、 C_2H_5 、 CH_3 の順に増大した。また、屈折率の特に小さな C_6F_{14} 中では見かけ上の溶媒シフト (低磁場シフト) は $\text{neo-C}_5\text{H}_{11}$ 、 $t\text{-C}_4\text{H}_9$ 、 $i\text{-C}_3\text{H}_7$ 、 C_2H_5 、 CH_3 の順に増大した。このように、環プロトンの溶媒シフトの大きさが $\text{neo-C}_5\text{H}_{11}$ だけ溶媒によって異なるという結果が得られた。

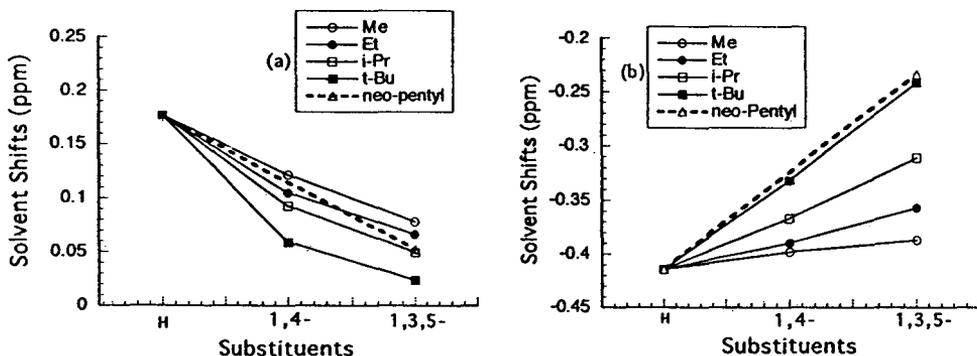


Fig.1 Ring proton solvent shifts of substituted benzenes, (a) $\Delta\delta$ (CH_2I_2) = δ CH_2I_2 - δ CDCl_3 and (b) $\Delta\delta$ (C_6F_{14}) = δ C_6F_{14} - δ CDCl_3

CH_2I_2 中では環プロトンのシグナルは CDCl_3 中よりも低磁場シフトを示すが、置換基が付くことで溶媒分子が環プロトンに接近しにくくなり、低磁場シフトの大きさは減少し高磁場シフトを示す。これは置換基の数や大きさが増すと、より溶媒の接近を妨げると考えると理解できる。一方、 C_6F_{14} 中では CDCl_3 中より高磁場シフトを示すが、置換基の数や大きさが増すことで溶媒の接近は妨げられ、高磁場シフトが減少し見かけ上低磁場シフトすると解釈した。

2.2 溶媒シフトと置換基定数

溶媒の近づきやすさの目安と考えられる溶媒シフトを、有機化学でよく使われる立体障害を表すパラメータと比較した。パラメータとして、立体置換基定数 E_s ²⁾ と A 値³⁾ を用いた。 E_s は RCOOC_2H_5 の加水分解の反応速度から求めたもので、 CH_3 基のときを 0 とし、これより高くなるほど負で大きな値を示す。A 値はシクロヘキサンに置換基を付けたときのアキシアルとエクアトリアル配座の間の自由エネルギー差から求めたものであり、値が大きいほど高くなることになる。これらのパラメータの各置換基に対する値は以下である。

Table.1 The common substituent constants.

substituent	CH ₃	C ₂ H ₅	i-C ₃ H ₇	t-C ₄ H ₉	neo-C ₅ H ₁₁
E _s	0.00	-0.07	-0.47	-1.54	-1.74
A value	1.7	1.8	2.1	5.6	2.0

E_s 値は C₆F₁₄ 中での溶媒シフトの大きさの順序と一致しており、A 値は CH₂I₂ 中での溶媒シフトの順序と一致しているという興味深い結果となった。

この結果、CH₃、C₂H₅、i-C₃H₇、t-C₄H₉ は高高さの順番が全て同じであるのに対し、neo-C₅H₁₁ に関しては、見積もる方法、あるいは溶媒の性質によって高高さが変わるとも言える。我々は neo-C₅H₁₁ の立体構造が溶媒によって変化していると考え、これらの系について緩和時間を測定した。

2.3 緩和時間

CH₃、C₂H₅、i-C₃H₇、t-C₄H₉、neo-C₅H₁₁ を置換基とした 1,3,5-トリアルキル置換ベンゼンをサンプルとした。溶媒は相互作用の大きさの違うと思われる CDCl₃、CCl₄、C₆F₁₄、CH₂I₂ の 4 種を用いた。1,3,5-トリネオペンチルベンゼンのみ当研究室で合成したものを用い、それ以外の溶質・溶媒は全て市販の物を使用した。試料は freeze-pump-thaw サイクルを数回行い脱気した。

緩和時間 T₁ は 180° - τ - 90° パルス法 (反転回復法) により測定した。

測定には Varian Unity plus 500MHz を使用した。

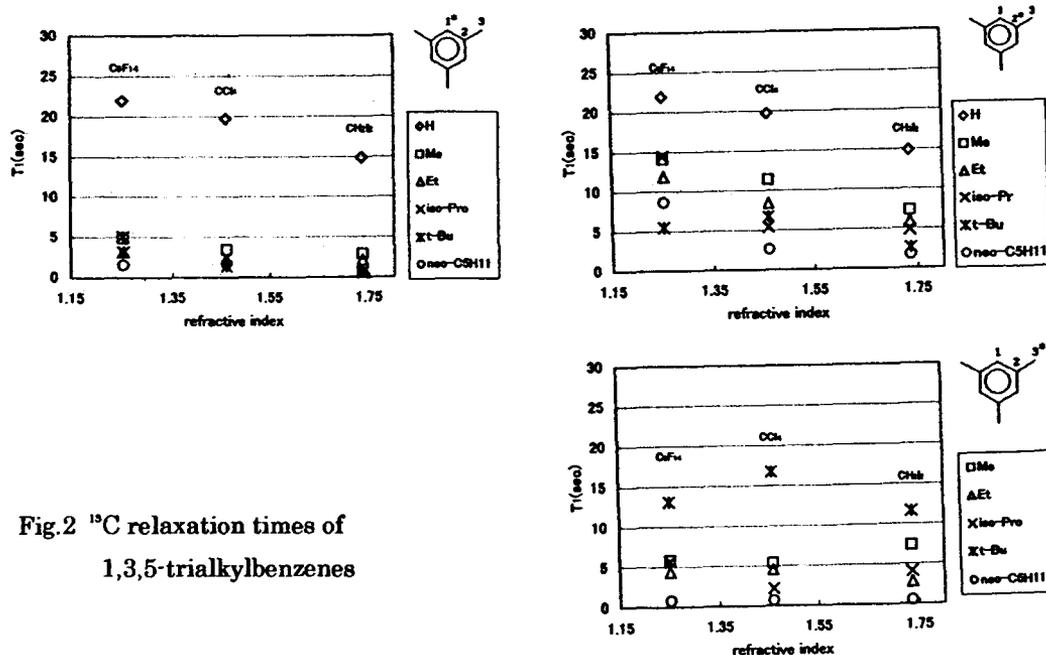


Fig.2 ¹³C relaxation times of 1,3,5-trialkylbenzenes

置換基の無い時、つまり溶質がベンゼンである時のプロットから、 T_1 は溶媒の屈折率が大きくなるにしたがって短くなっている。

C_1 については置換基が付くと、置換基が無い時に比べ T_1 はかなり短くなっている。また、置換基が大きいほど T_1 が短いという傾向も見られる。 C_2 でも同様に、置換基が付くことで T_1 は短くなるが、 C_1 と比較すると全体的に長い。また溶媒の屈折率が大きくなると T_1 は短くなっている。 C_3 では、他の ^{13}C 核より溶媒による変化が少ないということが言える。

3. まとめ

今回、1,3,5-trialkylbenzene の立体障害が環プロトンの溶媒シフトの測定により見積もることができることがわかった。また、置換基が neo- C_5H_{11} の場合は立体障害の大きさが、測定方法や溶媒により異なることが明らかとなった。さらに、立体障害の大きさと T_1 値の間にも関連がありそうな結果が得られた。

参考文献

1. R. E. Carter and P. Stilbs, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7515(1976)
2. R. W. Taft, Jr, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3120(1952)
3. E. L. Eliel, N. L. Allinger, S. J. Angyal, and G. A. Morrison "Conformational Analysis" Chapt. 2, John Wiley & Sons Inc.(1965)

LC-NMR-DOSY の応用

(東レリサーチセンター) ○川口 謙、木村一雄

Application of LC-NMR-DOSY

Toray Research Center, Inc., Ken Kawaguchi and Kazuo Kimura

An LC-NMR is the useful tool for analyzing mixture samples. A DOSY, Diffusion Ordered Spectroscopy, is also useful for the same purpose because mixture samples can be separated by the diffusion constants. When there are two or more components in a peak of HPLC, the combined method of a stop-flow LC-NMR and a DOSY is expected to be very useful under this circumstance. We call it "LC-NMR-DOSY". To try the "LC-NMR-DOSY", we have made a pulse sequence containing wet solvent suppression sequence and the results are well.

LC-NMR は、その名の通り、HPLC と NMR を直結した装置で、混合物の NMR 分析に威力を発揮する。一方、DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) は、分子の自己拡散係数の違いによって混合物の NMR シグナルを分離する方法である。LC-NMR が HPLC の保持時間で分離するのに対して、DOSY は拡散係数の差でシグナルを分離するものである。LC-NMR は分離能力、感度ともに優れているが、1 本の HPLC ピーク内に複数の成分が含まれる場合、DOSY を併用すれば HPLC の条件を変えることなく、それらも分離することが可能ではないかと考えた。そして、この測定法を「LC-NMR-DOSY」と呼ぶことにした。LC-NMR-DOSY は、UV 吸収を持たない成分 (多糖など) が混在する場合にも有用である。

装置は LC-NMR を含めて、Varian UNITY INOVA600 を用いた。試料はトルエンと N,N-ジエチル- α -トルアミドの混合物を用い、HPLC ピークが重なるように移動相のアセトニトリル/重水の比率を調整した。そして、トルエンは 240 μ g、トルアミドは 36 μ g に相当する量の試料を HPLC へ注入し、LC-NMR-DOSY 法を試みた。DOSY 法は、BPPLIED 法をベースにして、これに溶媒除去を行なうために WET を組み込んだパルスシーケンスを作成し用いた。

Fig.1 に stop-flow LC-NMR スペクトルを示す。この HPLC ピークにおける ^1H NMR スペクトルには、トルエン、トルアミドが共に観測され、このピーク内に 2 種類の成分が混在していることがわかる。この状態で LC-NMR-DOSY 法を試みた。DOSY 法は、Fig. 2 に示す様に、PFG 強度を変えた測定を行い、シグナル強度の減衰の速さから拡散定数を求める測定法である。LC-NMR-DOSY スペクトルを Fig.3 に示す。DOSY スペクトル (Fig.3) では、トルエンとトルアミドのシグナルが良く分離していることがわかる (拡散係数の小さい方がトルアミド)。ただし、芳香環領域のシグナルは、2 成分のシグナルが重なっており、シグナル強度値を成分毎に得ることができない為、分離できない。しかしこれに関しては今後のソフトウェアの進歩と共に解決できると考えられる。

LC-NMR、DOSY、自己拡散、混合物分析

かわぐち けん、きむら かずお

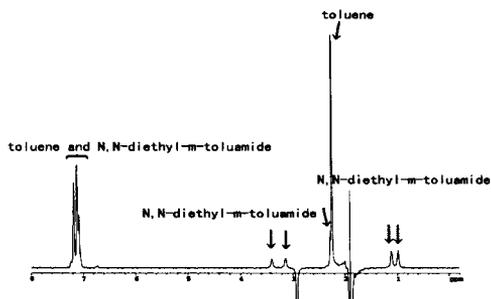


Fig. 1
The stop-flow LC-NMR spectrum of the mixture (toluene and N,N-diethyl-m-toluamide). Both components were observed at this condition.

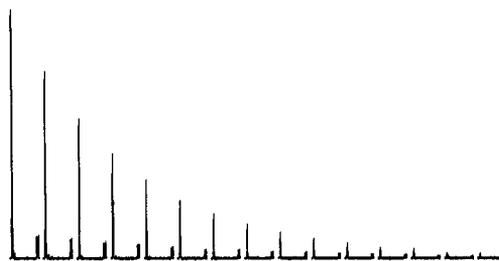


Fig. 2
The spectra of LC-DOSY. The signal intensities were decayed according to the PFG strength.

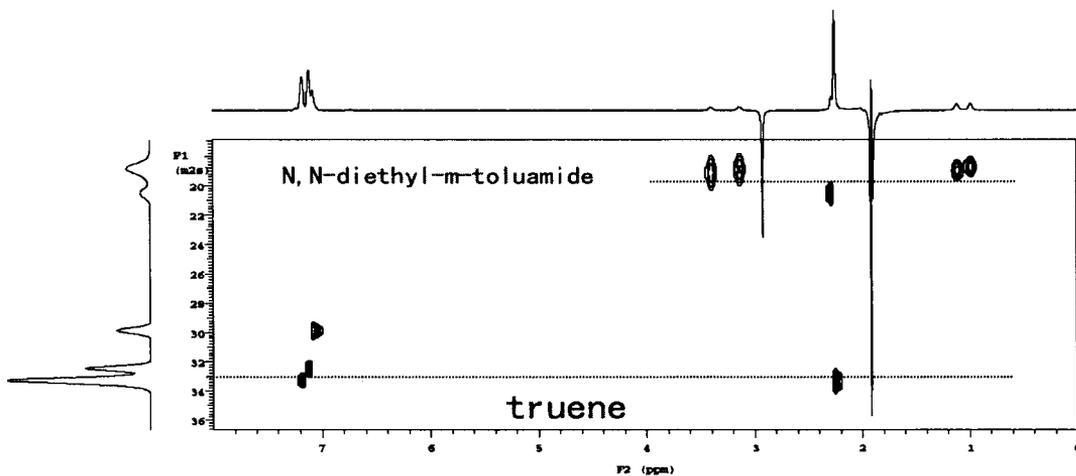


Fig. 3.
The LC-NMR-DOSY spectrum of the mixture (toluene and N,N-diethyl-m-toluamide). The diffusion constant of the toluamide is small (upper signals).

生体高分子水溶液の緩和時間測定における化学交換の影響

(東水大) ○松川真吾、渡部徳子

Effect of Chemical Exchange on NMR Relaxation Times for Biopolymer Solutions

Shingo Matsukawa and Tokuko Watanabe

Department of Food Sciences and Technology, Tokyo University of Fisheries

The temperature dependence of ¹H NMR relaxation times for biopolymer systems with chemical exchange were calculated and compared with experimental results of ¹H NMR relaxation times and circular dichroism for water in gelatin solutions in order to elucidate the hydrogen bonding behavior and structural change of gelatin molecules in aqueous solutions. From the results of the temperature dependence, it was found that ¹H T₂ of water in gelatin solution significantly changes with the conformational change of gelatin, such as random coil-triple helix transition, and the formation of gel, which alters the proton exchange rate between water molecule and hydroxyl groups of gelatin. The experimental results of the temperature dependence of ¹H T₂ were explained by the results of the calculation for two-site exchange model.

1. 緒言

水溶液中の生体高分子は温度や塩濃度が変わると高次構造形成が変化する。このような構造の変化に伴い、高分子鎖の運動性は変化し、また、水分子と高分子鎖の水酸基やアミノ基との間での化学交換速度を変える。この時、観測される水分子の ¹HT₂ は大きく変化する。本研究では、このような化学交換のある生体高分子水溶液において、Carr-Purcell-Maiboom-Gill (CPMG) 法によって観測される水分子の ¹HT₂ を計算し、これまでに知られている近似式の結果と比較する。また、ゼラチン水溶液の高次構造変化に伴う水の ¹HT₂ を測定し、計算結果と比較して3重螺旋形成とゲル化機構を検討する。

2. 実験

試料調製ゼラチンは室温で30分間80°Cで15分間加熱溶解して、1から12(w/w)%の溶液を調製した。

測定方法 NMR 緩和時間、CD 及び粘弾性の温度依存性は80°C~0°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。¹HT₂ NMRの測定はBruker社製のminispec PC-120を用いて、共鳴周波数は20MHz、2τ=0.2~1msでCPMG法で行った。

3. 結果と考察

化学交換の緩和時間への影響 化学交換がある場合のそれぞれの磁化ベクトル(M_A, M_B)の時間変化は共鳴周波数(ω_A, ω_B)、緩和時間(T_{2A}, T_{2B})、交換速度(1/τ_A, 1/τ_B)を用いて(1)式のように表わされる。CPMG法における180°xパルスによる位相の反転を考慮すると4nτにおける(M_A, M_B)は(2)式となる。

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} M_A \\ M_B \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\frac{1}{T_{2A}} + i\omega_A - \frac{1}{\tau_A} & \frac{1}{\tau_B} \\ \frac{1}{\tau_A} & -\frac{1}{T_{2B}} + i\omega_B - \frac{1}{\tau_B} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} M_A \\ M_B \end{bmatrix} \dots(1)$$

$$\begin{aligned} (E^2)^n \begin{bmatrix} M_{A,0} \\ M_{B,0} \end{bmatrix} & \dots\dots\dots(2) \\ E^2 &= (U e^{-\Delta t} U^{-1})(U e^{-2\Delta t} U^{-1})^n (U e^{-\Delta t} U^{-1}) \\ e^{-\Delta t} &= \begin{bmatrix} \exp(-\frac{1}{2}(1/T_{2A} + 1/T_{2B} + 1/\tau_A + 1/\tau_B) - \frac{1}{2}q) & 0 \\ 0 & \exp(-\frac{1}{2}(1/T_{2A} + 1/T_{2B} + 1/\tau_A + 1/\tau_B) + \frac{1}{2}q) \end{bmatrix} \end{aligned}$$

ここで E² = $\begin{bmatrix} a & b \\ c & d \end{bmatrix}$ とすると、これを対角化する行列Vと対角化行列Γは次式となる。

$$U = U^{-1} = \left\{ (q + \Delta)^2 + \frac{4}{\tau_A \cdot \tau_B} \right\}^{-\frac{1}{2}} \begin{bmatrix} -(q + \Delta) & 2/\tau_A \\ 2/\tau_A & (q + \Delta) \end{bmatrix}$$

$$q = \left\{ \Delta^2 + \frac{4}{\tau_A \cdot \tau_B} \right\}^{\frac{1}{2}}, \quad \Delta = 1/T_{2A} - 1/T_{2B} - i(\omega_A - \omega_B) + 1/\tau_A - 1/\tau_B$$

$$V = \begin{bmatrix} -2b & -2b \\ a - d - \sqrt{(a-d)^2 + 4bc} & a - d + \sqrt{(a-d)^2 + 4bc} \end{bmatrix}, \quad \Gamma = \begin{bmatrix} \frac{1}{2}(a + d + \sqrt{(a-d)^2 + 4bc}) & 0 \\ 0 & \frac{1}{2}(a + d - \sqrt{(a-d)^2 + 4bc}) \end{bmatrix}$$

化学交換 緩和時間 拡散係数 生体高分子 多糖

まつかわしんご、わたなべとくこ

$t=4n\tau$ におけるエコー信号強度は次式となる。

$$\begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} \begin{bmatrix} M_{A,t} \\ M_{B,t} \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} V \Gamma^n V^{-1} \begin{bmatrix} M_{A,0} \\ M_{B,0} \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} V \exp\left(-\frac{t}{4\tau} \ln \Gamma\right) V^{-1} \begin{bmatrix} M_{A,0} \\ M_{B,0} \end{bmatrix} \dots\dots\dots (3)$$

Fig1 に A と B の運動の活性化エネルギーと化学交換の活性化エネルギーを仮定した場合の計算結果を示した。運動の違い B 成分のプロトン比率は 0.1 とした。交換が無い場合の T_2 とそれらの平均を実線で示した。交換が早い場合の近似式 $1/T_{2obs} = f_a/T_{2A} + f_b/T_B + f_a f_b (\omega_A - \omega_B)^2 / (1/\tau_A + 1/\tau_B)$ と交換が遅い場合の近似式 $1/T_{2obsA} = 1/T_{2A,B} + 1/\tau_{A,B}$ での計算結果をそれぞれ破線と点線で示した。交換速度と緩和速度が等しくなる温度付近で、遅い成分 B が現われ、この時 T_{2obsA} は大きくなる。交換の活性化エネルギーと B 成分の運動の活性化エネルギーを変化させた場合の温度依存性を Fig2 と Fig3 に示した。

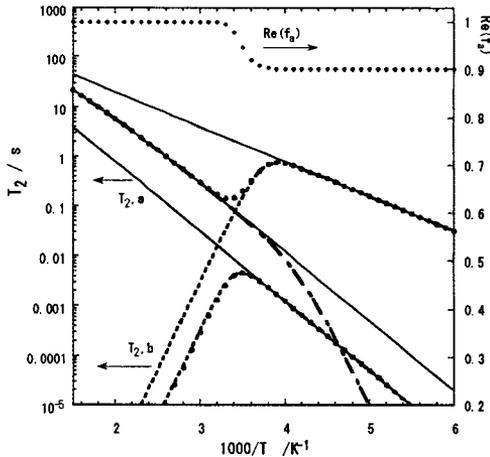


Fig. 1 Theoretical results of temperature dependence of apparent T_2

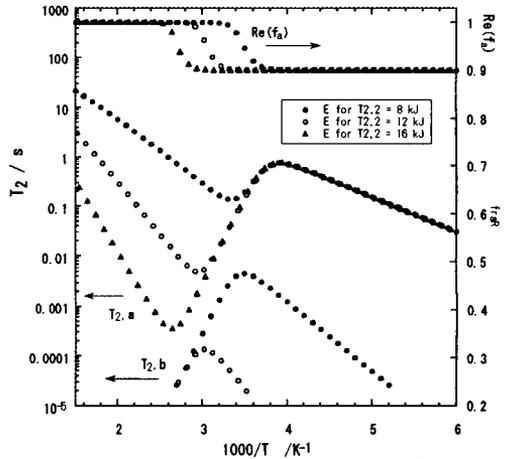


Fig. 2 Theoretical results of temperature dependence of apparent T_2 . Motional activation energy for $T_{2,2}$ is varied.

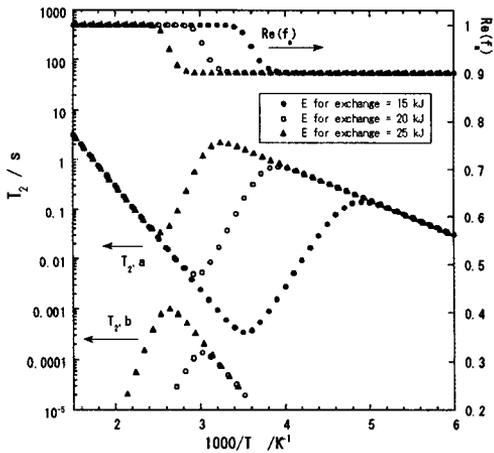


Fig. 3 Theoretical results of temperature dependence of apparent T_2 . Activation energy for exchange is varied.

ゼラチン溶液の温度依存性 Fig4 に 8%ゼラチン溶液の粘弾性、モル楕円率 $[\theta]$ 及び $^1\text{H}T_2$ の温度依存性を示した。降温過程の 30°C 付近において弾性率及び $[\theta]$ の急激な変化が見られ、ヘリクスとゲル構造の生成を示している。この時 T_2 も急激な低下を示しており構造変化を反映している。

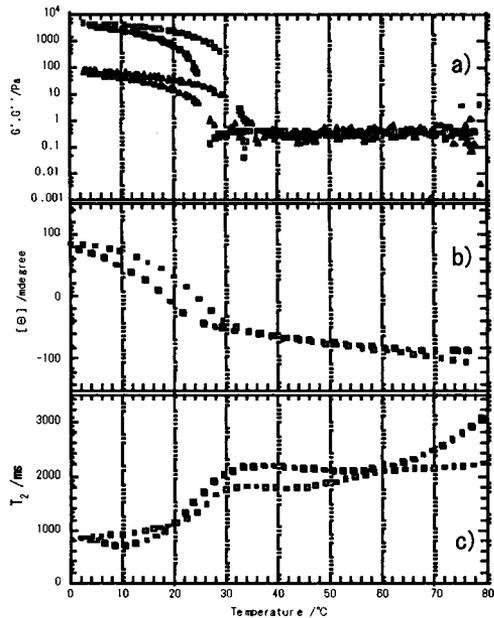


Fig. 4 Temperature dependence of (a) G' (■, □) and G'' (▲, △), (b) $[\theta]$ (■, □) and (c) $^1\text{H}T_2$ (■, □) for 8% gelation solution on cooling (●, ▲) and heating (○, △).

種々の非対称スルフィリミンの不斉 S 原子に隣接するメチレンプロトンの NMR 的非等価性に関する検討

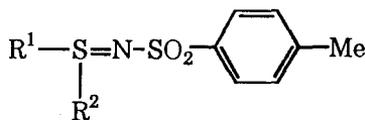
(東工大資源研¹, 関東学院大工²) 中村義之¹, 〇卯辰直也², 池田勝也², 岡村敦史², 尾辻 雅², 山本 保²

Studies on NMR nonequivalence of the methylene protons neighboring on asymmetric S atoms in sulfilimines

(Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology) Yoshiyuki Nakamura (Industrial Chemistry, Kanto Gakuin University) Naoya Utatsu, Katsuya Ikeda, Atsushi Okamura, Miya Otsuji, and Tamotsu Yamamoto

The methylene protons (MH_α) adjoined asymmetric center atoms are essentially nonequivalent in NMR chemical shift. However, chemical shift nonequivalence of MH_α in asymmetric sulfilimines has not yet been verified. The authors have measured the 1H NMR spectra of several sulfilimines having MH_α , MH_β and protons (MH_γ) on carbon atoms distant from asymmetric center, and proved that the protons are nonequivalent.

1. 非対称中心原子に隣接するメチレンプロトン (MH_α) は、本質的に NMR 化学シフト的に非等価である。しかしながら、スルフィリミン(1)の MH_α が非等価である例は知られていない。筆者らは、 MH_α 及び MH_β さらに 3,4 原子隔たった炭素上にプロトン (MH_γ) を有する数種のスルフィリミンの 1H NMR スペクトルを測定し、それらのプロトンがいずれも NMR において化学シフト的に非等価性であるかどうかを検討した。これらを合わせて報告する。



- 1a: $R^1=Et, R^2=Et$
 1b: $R^1=p\text{-MeC}_6\text{H}_4, R^2=Et$
 1c: $R^1=CH_2Ph, R^2=CH_2Ph$
 1d: $R^1=p\text{-MeC}_6\text{H}_4, R^2=CH_2Ph$
 1e: $R^1=p\text{-MeC}_6\text{H}_4, R^2=CH_2CH_2Cl$
 1f: $R^1=R^2=CH_2CH_2OCH_2Ph$
 1g: $R^1=p\text{-MeC}_6\text{H}_4, R^2=CH_2CH_2OCH_2Ph$

2. スルフィリミン (1) の合成: 1 は、既報のスルフィドとクロラミン T との反応¹⁾, またはエテニルスルフィリミンの Michael 付加²⁾により合成した。用いたスルフィドは、対称なものは市販品を、非対称なものは、4-トルエンチオールを出発原料とし、それぞれに相当するハロゲン化アルキルを反応させて合成した。測定: それらの試料の $^1H, ^{13}C$ NMR スペクトルは日本電子製 JNM-La-500, JNM-GSX-270 を用いて測定した。

3. 非対称スルフィリミンの S 原子に隣接する α 炭素上のプロトン MH_α の NMR 挙動: Et 基をもつ 1a, 1b の $CDCl_3$ 中室温での 1H NMR スペクトル中、前者の Et 基のプロトンは、一般的な A_3X_2 型の結合パターンを示したのに対し、後者のものは、 ABX_3 型結合パターンを示し、不斉中心の影響を示唆した。PhCH₂ 基を持つ 1c, 1d の $CDCl_3$ 中室温での MH_β の NMR スペクトルは、いずれも dd-結合パターンを示すが、Fig. 1 に示すよ

キーワード: 非等価性, 不斉中心, ABX_3 型, 溶媒効果, 非対称スルフィリミ

なかむら よしゆき, 〇うたつ なおや, いけだ かつや, おかむら あつし, おつじ みや, やまもと たもつ

うに温度を下げることで、前者は一重線になるが、一方後者では、dd結合パターンのままであった。このことから、不斉中心隣接メチレンプロトンの非等価性を確認した³⁾。

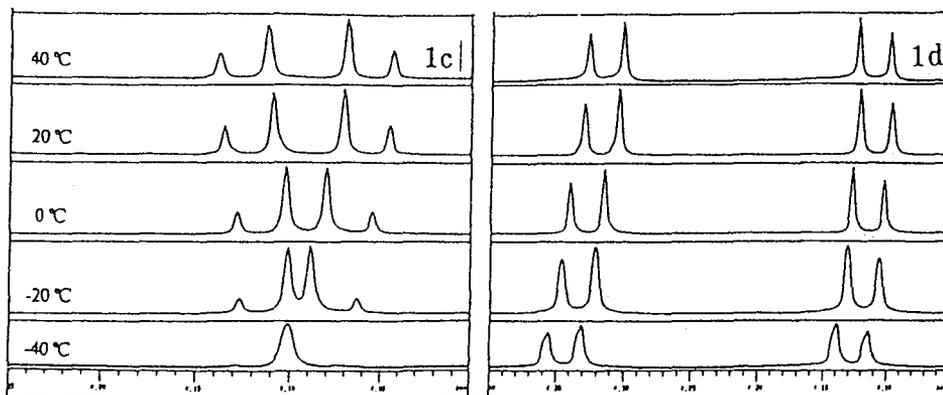


Fig. 1. ^1H NMR Spectra of methylene protons of 1c and 1d at various temperatures in CDCl_3 .

非対称スルフィリミンのS原子に隣接する β 炭素上プロトン MH_β のNMR挙動:

2-Chloroethyl基を持つ1eの CDCl_3 中室温の ^1H NMRスペクトル(エチルプロトン部分)は、Fig. 2のように、4組の複雑な結合パターンを示した。このパターンを ^1H - ^1H 、 ^1H - ^{13}C COSY、DEPTによって追究した結果、4組の8重線であることが判った⁴⁾。このように MH_β は化学シフト的に非等価であるが、溶媒や測定温度によりスピン結合パターンに変化が見られ、1eの溶液構造の変化がこれらに大きく寄与するようである。

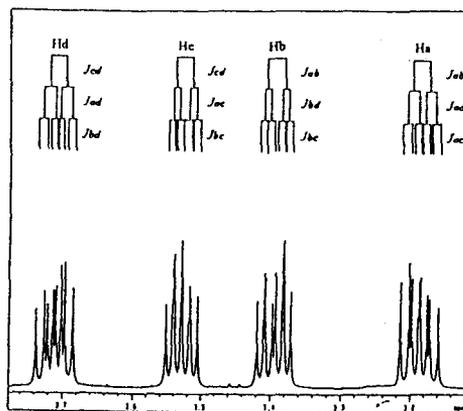


Fig. 2. Spin-Spin Coupling of Two Methylene Protons in Sulfilimine 1e at 24 °C in CDCl_3 .

非対称スルフィリミンの遠隔炭素上のプロトン MH_γ のNMR挙動: Benzyloxyethyl基を持つ1f、1gの CDCl_3 中、室温のスペクトル中 PhCH_2 のプロトン(MH_γ)のNMRスペクトルは、それぞれdd結合パターンを示した。この両者も上記と同様に温度の影響を調べた結果、1gのものも、低温においてdd結合パターンのままで、 MH_γ は化学シフト的に非等価であることを示唆した。一方、2-Phenylethoxyethyl基を有するスルフィリミンの MH_δ 、 MH_ϵ は、それぞれ3重線を示した。また、2-Phenylethylthioethyl基を有するスルフィリミンの MH_δ 、 MH_ϵ も同様で、これらは化学シフト的に非等価性を示さなかった。

以上、不斉中心隣接MHが化学シフト的に非等価性を示す例を挙げたが、これらが不斉中心原子に関わるものか、Geminal H自身の磁気異方性によるものか不明確である。

参考文献 1) 続実験化学講座, 5, 1197pp. 2) T. Yamamoto and M. Okawara, *Chemistry Lett.*, 1975, 581. 3) 中村・卯辰・尾辻・山本, 日本化学会第78秋季年会(00)(千葉). 4) 中村・池田・岡村・卯辰・山本, 日本化学会第77秋季年会(99)(札幌).

TRNOE 法によるムスカリン性アセチルコリン受容体に結合したメタコリンの構造解析研究

(理研 GSC¹, 科技団 CREST², 東大院医³, 東大院理⁴)

○濱田季之¹, 廣田 洋^{1,2}, 古川浩康³, 芳賀達也^{2,3}, 武藤 裕⁴, 横山茂之^{1,4}

Conformational analysis of methacholine bound to the muscarinic acetylcholine receptor by transferred NOE experiments

(GSC, RIKEN¹; CREST, JST²; Neurobiochemistry, Univ. of Tokyo³; Biophysics and Biochemistry, Univ. of Tokyo⁴)

○ Toshiyuki Hamada¹, Hiroshi Hirota^{1,2}, Hiroyasu Furukawa³, Tatsuya Haga^{2,3}, Yutaka Muto⁴, and Shigeyuki Yokoyama^{1,4}

In order to determine the conformation of (s)-methacholine (MeCho) bound to the M2 muscarinic receptor, we have used the transferred nuclear Overhauser effect (TRNOE) analysis.

Measurements of NOESY spectra for MeCho bound to the receptor were made both in the presence and the absence of an antagonist, atropine, and the spectra obtained in the presence of atropine were subtracted from those obtained without atropine for removal of non-specific signals. These data suggest that the C α -C β bond is in the *gauche* conformation (the torsion angle O-C β -C α -N is 60°) when (s)-methacholine is bound to the M2 receptor. These results are different from reported results using rigid acetylcholine analogues, which predict a *trans* conformation for acetylcholine bound to the muscarinic receptors.

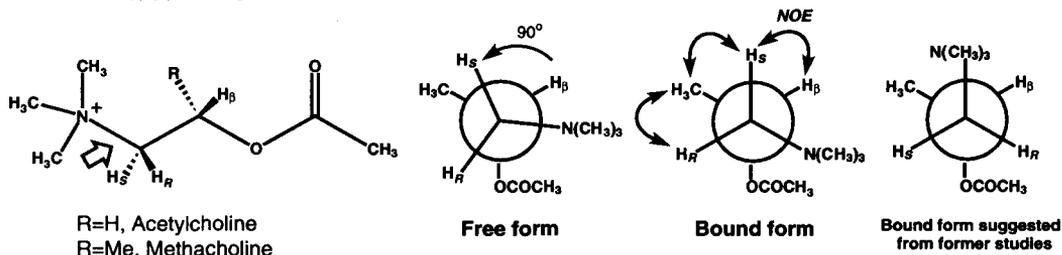
アセチルコリンは神経伝達物質として同定された最初の物質であり、中枢神経、および末梢神経で二種類のアセチルコリン受容体（ニコチン性とムスカリン性）に作用し、生理活性を引き起こす。

受容体に結合していないアセチルコリンの構造はX線結晶構造解析により 1966年に Pauling らにより解明された。その構造は O-C β -C α -N の二面角が約 60° をとる *gauche* 型であった。また、ニコチン性アセチルコリン受容体に結合したアセチルコリンは *trans* 型の立体配座をとっていることが、transferred NOE (TRNOE) 測定とエネルギー計算から予測された。ところが、ムスカリン受容体に結合したアセチルコリンの構造はアナログ化合物の結合実験などから *trans* と予測されてはいるものの、その構造が証明された例はない。

TRNOE, ムスカリン性アセチルコリン受容体, メタコリン, 立体配座, spin diffusion

はまだ としゆき, ひろた ひろし, ふるかわ ひろやす, はが たつや, むとう ゆたか, よこやま しげゆき

アセチルコリンのメチル化体である (s)-methacholine (MeCho) は、ムスカリン受容体に対する親和性がアセチルコリンと同様であり、また、それぞれのプロトンが独立した NMR シグナルを与えるため、NMR を用いた立体配座解析に適している。そこで、我々は、受容体と結合した MeCho の立体構造、特に C α -C β 間の内部回転角を TRNOE を用いて解析した。



NMR 測定には、50 μ M の M2 sub-type ムスカリン受容体 (N 末端の糖鎖付加部位の除去、第 3 細胞内ループ中央部の除去、そして、C 末端への His-tag の付加)、および、1.5 mM (受容体の 30 倍の濃度) の MeCho を含んだ試料溶液を調製した。

最初に、mixing time 150 m 秒で二種類の NOESY スペクトル (測定温度 23°C) を測定した。まず、上記で調製した試料溶液で測定し、次に、同じ試料溶液に antagonist である atropine を加え、受容体のリガンド結合部位を atropine でブロックした状態で NOESY スペクトルを測定した。これら二つのスペクトルの差をとることにより受容体に特異的に結合した MeCho の NOE シグナルを抽出し、それらの NOE 強度の比較を行った。その結果、spin diffusion 由来と思われるいくつかの NOE があることが推察された。そこで、spin diffusion 由来の間接的 NOE の除去 (短い mixing time での NOESY 測定) および、間接的 NOE の検出 (ROESY 測定) を行った。

Mixing time を 150m 秒で測定した時、H β / HR 間の NOE 強度は、H β / Hs 間の NOE 強度とほぼ同等であったが、mixing time を短くすることで、H β / HR 間の NOE 強度は、他より大きく減少した。また、ROESY スペクトルを測定すると、H β / HR 間の ROE は対角ピークと同じ方向に出ることから、この NOE (ROE) は spin diffusion 由来の間接的 NOE (ROE) であることがわかった。更に、NOESY スペクトル (mixing time = 30 ms) を測定し、H β / HR 間の NOE 強度が H β / Hs 間の NOE 強度に比べ弱いこと、 β Me / HR 間の NOE 強度と β Me / Hs 間の NOE 強度がほぼ同等であることから、二面角 O-C β -C α -N が 60° の *gauche* 型であると決定した。

以上の結果より、ムスカリン受容体結合時のメタコリンの立体配座は *gauche* 型であることが分かった。この立体配座は、溶液中の MeCho の立体配座 (二面角 O-C β -C α -N が 90°) が約 30° 回転したもので、アナログ化合物の結合実験などから予想されていた *trans* 型とは大きく異なっていた。今回の結果は、アセチルコリンの β 位に methyl 基が付いたことにより、その立体障害が立体配座に影響を与えている可能性もあるので、現在、メチレンプロトンが選択的に重水素化されたアセチルコリンの合成を行っており、今後その TRNOE の検討を行う予定である。

塩化マグネシウムおよび塩化カルシウム水溶液中における
水分子の回転運動におよぼす圧力効果
(立命館大理工)○文野浩一・谷口吉弘

Pressure Effects on the Rotational Motion of D₂O Molecule
in MgCl₂ and CaCl₂ Aqueous Solutions

Koichi, FUMINO; Yoshihiro, TANIGUCHI

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

The spin-lattice relaxation rates (R_1) of D and ¹⁷O nuclei of heavy water (D₂O) molecule in MgCl₂ and CaCl₂ aqueous solutions were measured in the range of 0.1-300 MPa and 0-1.0 molkg⁻¹ at 10 and 25°C. R_1 values increase with concentration quadratically in 0.1-200 MPa and linearly at 250 and 300 MPa. The rotational correlation times (τ) coordinated to Mg²⁺ and Ca²⁺, which is estimated by R_1 , increases with increasing pressure and is in this order: Mg²⁺ > Ca²⁺ > pure D₂O. This implies that the coordinated D₂O molecules rotate more slowly with increasing pressure.

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¹⁷O核のスピン-格子緩和速度(R_1)を10-50°C、0-1.0 molkg⁻¹、0.1-300 MPaにおいて測定した。 R_1 の値は各温度において圧力の増加とともに減少し、各圧力において溶液濃度と直線関係にあった。また、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¹⁷O核の回転相関時間(τ)の値は各圧力において、Li⁺ > Na⁺ > pure D₂O > K⁺ > 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、塩化マグネシウムおよび塩化カルシウム水溶液中における水分子のD核および¹⁷O核の R_1 を10、25°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, 25±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 R_1^0 を純水における測定核の R_1 とすると、上記水溶液中における水分子のD核のスピン-格子緩和速度比(R_1/R_1^0)と溶液濃度 m との関係は Fig. 1 に示されるように、0.1-200 MPaにおいて m と2次式の関係に、250-300 MPaにおいて直線関係にあることが認められ、(1)式および(2)式が成立するものと思われる。(この傾向は¹⁷O核についても同様であった。)

$$R_1/R_1^0 = 1 + B \cdot m + A \cdot m^2 \quad (0.1-200 \text{ MPa}) \quad (1)$$

$$R_1/R_1^0 = 1 + B \cdot m \quad (250-300 \text{ MPa}) \quad (2)$$

塩化マグネシウム、塩化カルシウム、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

ここで、Aはイオン-イオン間相互作用に関するパラメーター、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)式および(2)式のBはイオン分割により、(3)式が成立する。

$$B = B^+ + B^- \quad (3)$$

よって、二状態モデル²⁾を用い、 $B^+(K^+) = B^-(Cl^-)$ を仮定すると(4)式が得られる。

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

ここで、 R_1^+ はカチオンに配位する水分子の R_1 、 n^+ はイオンの配位数である。さらに極度尖鋭化条件下では(5)式が成立する³⁾。

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

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。(4)式および(5)式より Mg^{2+} および Ca^{2+} に配位する水分子の測定核の τ が得られ、25°CにおけるD核についてFig. 2に示す。 τ の値は、圧力の増加とともに増加しており、水分子の回転運動は加圧とともに遅くなるものと思われる。(この傾向は ^{17}O 核についても同様であった。)さらに、 τ の値は $Mg^{2+} > Ca^{2+} > \text{pure } D_2O >$ の順になることが認められた。

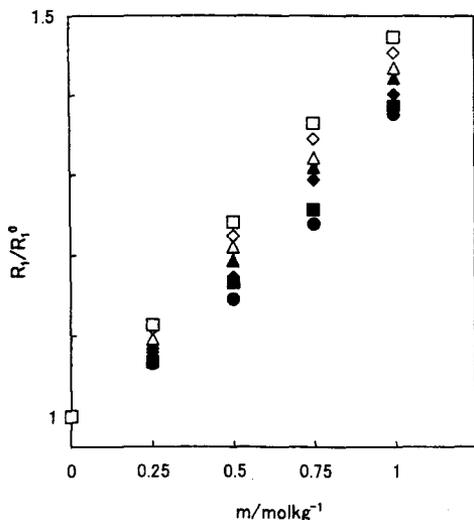


Fig. 1 Concentration dependences of R_1/R_1^0 values of D nucleus in $MgCl_2$ aqueous solutions at 25°C.

●: 0.1MPa, ■: 50MPa, ◆: 100MPa, ▲: 150MPa, △: 200MPa, ◇: 250MPa, □: 300MPa

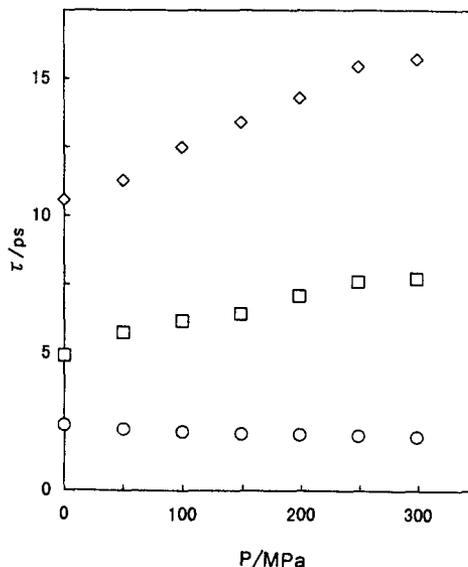


Fig. 2 Pressure dependences of rotational correlation times (τ) of D nucleus in D_2O molecules coordinated to Mg^{2+} and Ca^{2+} ions and pure D_2O molecule at 25°C.

◇: Mg^{2+} , □: Ca^{2+} , ○: pure D_2O

4. 参考文献

- 1) 文野浩一・清水昭夫・谷口吉弘, 第38回NMR討論会要旨集, p.33 (1999).
- 2) H. G. Hertz, "Water, A Comprehensive Treatise" Plenum Press, vol. 3, Chap. 7, p.301 (1973).
- 3) A. Abraham, "The Principles of Nuclear Magnetism," Oxford University Press, p.313 (1961).

NMR 緩和時間測定によるハイドロゲル網目サイズの予測
 (国立医薬品食品衛生研究所) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄

Estimation of hydrogel mesh size from ^1H spin-spin relaxation measurement
 of hydrogel polymer

(National Institute of Health Sciences)

Yukio Aso, Sumie Yoshioka and Shigeo Kojima

Release rate of drugs with large molecular size such as proteins is considered to be affected by hydrogel mesh size. In this study, we propose a method to estimate hydrogel mesh size from ^1H spin-spin relaxation data of hydrogel polymer protons. Relaxation process of hydrogel polymer protons could be described by a sum of two exponential equations. Proportion of rapidly relaxing protons was estimated from free induction decay of hydrogel polymer protons. Linear correlation was observed between the reciprocal of the proportion of rapidly relaxing protons and mesh size determined from dynamic light scattering measurement. Release rate of some model proteins from hydrogels could be estimated from gel mesh size determined from ^1H spin-spin relaxation measurement. These results indicate the usefulness of the proportion of rapidly relaxing protons as a measure of hydrogel mesh size.

はじめに

デキストランやゼラチンを架橋することによって得られる生分解性ハイドロゲルはタンパク質や核酸医薬品の放出制御剤の基剤として注目されている。その薬物放出特性の評価法開発を目的として、薬物放出特性を支配すると考えられるゲルの網目サイズをゲル高分子プロトンのスピン-スピン緩和過程を解析することによって予測することを試みた。また、得られた網目サイズがモデルタンパク質の放出速度と関連することを明らかにした。

実験

1) メタクリル酸グリシジル修飾高分子の調製

20gのデキストラン、ゼラチンまたはポリヒドロキシエチルアスパルタミド(PHEA)と4gのジメチルアミノピリジン(DMAP)を200 mlジメチルスルホキシド(DMSO)に溶かし、メタクリル酸グリシジル(GMA)を添加し25°Cで20時間穏やかに攪拌した。反応液は透析後、凍結乾燥した。 ^1H -NMRによってGMA由来のシグナル強度からGMAの修飾率を算出した。

2) ハイドロゲルの調製

メタクリル酸グリシジルの修飾率を変えたゼラチン、デキストランあるいはポリヒドロキシエチルアスパラギンの水溶液(高分子濃度20%)に、 β -ガラクトシダーゼ(GA)、牛血清アルブミン(BSA)、あ

キーワード：運動性、ハイドロゲル、タンパク質、放出速度、緩和時間

あそゆきお、よしおかすみえ、こじましげお

るいはリゾチーム(Lyz)をそれぞれ0.1、1、1%の濃度で溶解し、1 kGyの γ 線を照射することによりゲルを調製した。ゲルを直径6mm厚さ2mmの円板に切り取り、薬物放出実験に用いた。ゲルから37°CのpH7.4リン酸緩衝液に放出された薬物量を経時的に測定し、薬物放出速度を算出した。GAの定量は酵素活性を測定することにより行った。LyzとBSAの放出量は高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

3) ゲル網目サイズおよび $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間の測定

直径7mmの円柱状のゲルについてDLS-7000型動的光散乱光度計(大塚電子)を用い、動的光散乱の2次の相関関数 $G^2(\tau)$ を測定し、 $G^2(\tau)$ と相関時間 τ の関係から1式に従い、ゲル網目の拡散係数 D_m を算出した。

$$G^2(\tau)-1=\alpha\{\exp(-D_m q^2 \tau)\}^2 \quad (1)$$

α は試料の弾性率に逆比例する定数、 q^2 は測定系の定数である。ゲルの網目の間隔(ξ)は D_m の値からEinstein-Stokes式((2)式)を用いて算出した。

$$\xi = \kappa T / 6 \pi \eta D_m \quad (2)$$

ここで κ はボルツマン定数、 η は溶媒(水)の粘度である。

$^1\text{H-NMR}$ スピン-スピン緩和時間(T_2)の測定に用いたゲルは重水を用いて調製した。測定は共鳴周波数が25MHzのJNM-25MU型スペクトロメーター(日本電子)を用い、90°パルス照射後の自由誘導減衰を測定し、自由誘導減衰を3式に従いカーブフィッティングすることにより、 T_2 の小さい緩和過程を示すプロトンの比率 P_c を算出した。

$$I(t)/I_0 = P_c \exp(-t/T_2^c) + (1-P_c) \exp(-t/T_2^{nc}) \quad (3)$$

結果および考察

Fig. 1に動的光散乱測定法によって観測されるデキストランゲルの2次の相関関数 $G^2(\tau)$ の実測例を示す。架橋剤として用いたGMAの修飾率の上昇に伴い $G^2(\tau)$ の減衰速度は大きくなった。GMA修飾率が7%より大きいゲルでは α が小さくなるため、 $G^2(\tau)$ の減衰の観測が困難になった。 $G^2(\tau)$ と相関時間 τ の関係から算出したゲル網目の拡散係数 D_m および D_m を用いて算出したゲルの網目の間隔(ξ)をTable1に示す。GMA修飾率が大きいゲルほど網目間隔が小さくなる傾向が見られた。

$^1\text{H-NMR}$ において観測されるデキストランゲル高分子プロトンの自由誘導減衰信号をFig. 2に示す。いずれの高分子ゲルにおいても、Fig. 2に示すように2相性の減衰を示し、FIDシグナルは2つのexponential関数の和(3式)で表すことができた。これはゲル高分子プロトンに運動性の異なるプロトンが少なくとも2種類存在することを示唆する。架橋剤として用いたGMAの修飾率の大きなゲルほど緩和時間の短いプロトンの比率 P_c が大きかったことから、 T_2 の小さい緩和過程を示すプロトンは架橋の近傍にあり、運動の束縛されたプロトンであると考えられる。ゲルネットワークの単位長さあたりに存在する架橋の数を N とすれば、網目の間隔(ξ)は近似的に $1/N$ に比例する。 P_c はGMA修飾率があまり大きくなければ、ゲルネットワークの単位長さあたりに存在する架橋の数 N に近似的に比例すると考えられる。したがって、網目の間隔は P_c に逆比例すると考えられる。

$$\xi \propto 1/N \propto 1/P_c \quad (4)$$

dynamic light scatteringの測定によって見積もられたゲルの網目間隔 ξ と $^1\text{H-NMR}$ のFIDか

から見積もられた $1/P_0$ の関係は Fig. 3 に示すようにほぼ比例関係がみられた。2 次の相関関数の減衰が観測できないため、dynamic light scattering の測定によって ξ を見積もることが困難な GMA 修飾率の大きなゲルについても、 P_0 を算出できるので ξ の指標として有用であると考えられる。

$^1\text{H-NMR}$ 測定によって得られる $1/P_0$ の値がゲルの網目間隔として妥当であることを確かめるため、 $1/P_0$ とハイドロゲルからのモデル薬物の放出速度との関係を検討した。Ogston によるとゲル中の溶出分子の拡散係数 D_g は 5 式に基づいて算出できる。

$$\frac{D_g}{D_0} = \exp\left\{-\pi \frac{(r_s + r_f)}{(r + r_f)}\right\} \quad (5)$$

ここで r_s は溶質分子の流体力学半径、 r_f はゲル高分子ファイバーの半径を表す。 \bar{r} はゲル高分子間の平均の opening を表し、網目間隔 ξ に比例するので r の代わりに c_1/P_0 (c_1 は比例係数) を用いることができる。溶質分子の水溶液における拡散係数 D_0 は 6 式で表され、厚さ l の円板状のゲルからの薬物放出定数 k は 7 式で表される。7 式に 5 および 6 式を代入することにより k と P_0 の関係を表す 8 式が得られる。

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta r_s} \quad (6)$$

$$k = 4 \sqrt{\frac{1}{\pi l^2}} \sqrt{D_g} \quad (7)$$

$$k = 4 \sqrt{\frac{1}{\pi l^2}} \sqrt{\frac{kT}{6\pi\eta r_s} \exp\left\{-\pi \frac{(r_s + r_f)^2}{(c_1/P_0 + r_f)^2}\right\}} \quad (8)$$

Fig. 4 に β -ガラクトシダーゼの放出速度とゲルの網目サイズの指標である $1/P_0$ との関係を示す。Fig. 5 に Lyz、BSA の放出速度と $1/P_0$ との関係を示す。いずれの薬物の場合も、 $1/P_0$ が大きく、ゲルの網目が大きいほど薬物放出速度は大きかった。Fig. 4 に示すように β -ガラクトシダーゼの放出速度はゲル高分子の種類によらずひとつの曲線上にデータが集まった。これは、薬物放出速度が $1/P_0$ 、ゲルの網目サイズに支配されていることを示す。Fig. 4 に示す β -ガラクトシダーゼの放出速度定数のデータからフィッティングによって、 c_1 、 r_f の値を算出し、それらの値を用いて Lyz、BSA の放出速度定数を算出し、Fig. 5 に破線および点線で示す。放出速度の計算値は実測の放出速度と良く一致しており、ゲルの網目間隔の指標として $1/P_0$ が有用であることが示された。

引用文献

- B. Amsden, *Macromolecules*, 31, 8382 (1998).
A. G. Ogston, *Trans. Faraday Soc.* 54, 1754 (1958).

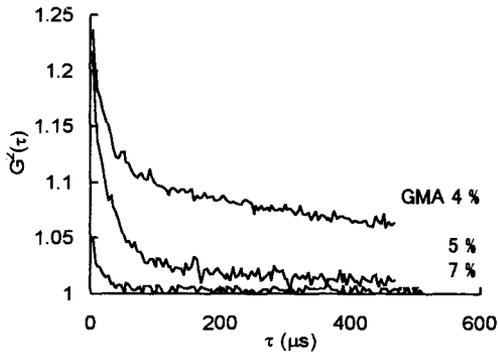


Fig. 1 Typical correlation function of crosslinked dextran hydrogels

Table I Diffusion coefficient (D_m) and mesh size (ξ) of dextran, PHEA and gelatin hydrogels determined by dynamic light scattering measurement

Gel	Degree of GMA	D_m substitution (%) (cm^2/s)	ξ (nm)
Dextran	4	2.6×10^{-7}	12
	5	4.4×10^{-7}	7
	7	7.9×10^{-7}	4
PHEA	11	n.d.	n.d.
	4	4.4×10^{-7}	7
	14	n.d.	n.d.
Gelatin	1.4	4.1×10^{-7}	8
	1.9	n.d.	n.d.
	2.7	n.d.	n.d.

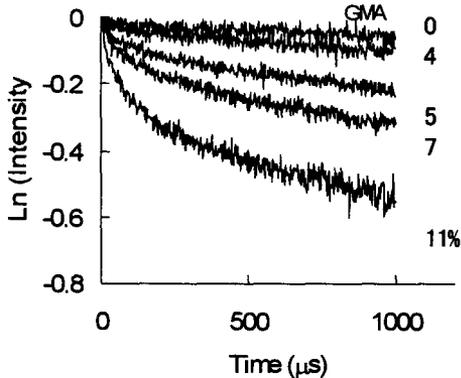


Fig.2 Free induction decay of cross-linked dextran hydrogel protons as a function of degree of GMA substitution

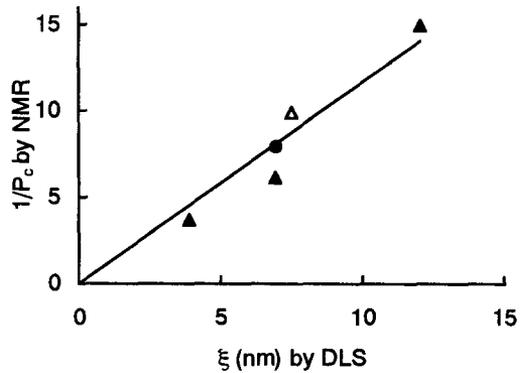


Fig. 3 Relationship between $1/P_c$ and gel mesh size

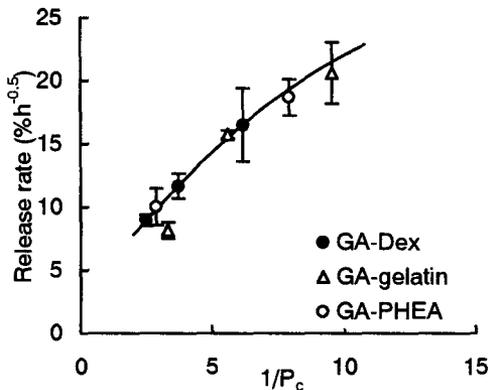


Fig. 4 Release rate of β -galactosidase from crosslinked dextran, gelatin and PHEA hydrogels

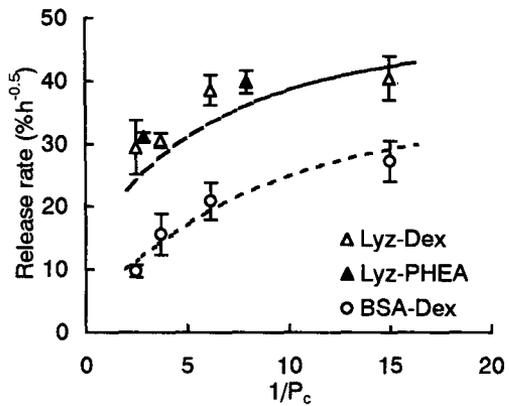


Fig. 5 Release rate of lysozyme and BSA from crosslinked dextran and PHEA hydrogels

スピネコーおよび π パルス列を用いた

^{13}C OMAS NMR によるコレステリック液晶の異方的

分子拡散係数の測定

(1.分子科学研究所 2.京大院理) ○西山 裕介(1) 久保 厚(1) 寺尾 武彦(2)

Determination of anisotropic molecular diffusion coefficients of cholesteric liquid crystals by combining a spin echo and a π pulse train with ^{13}C OMAS NMR

Yusuke Nishiyama¹, Atsushi Kubo¹, Takehiko Terao²

¹Institute for molecular science, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Japan

²Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

Abstract

A new method to measure molecular diffusion coefficients of cholesteric liquid crystals is proposed and studied both theoretically and experimentally. We spun cholesteric liquid crystals with positive magnetic susceptibility anisotropies around the axis inclined from the magnetic field by an angle larger than the magic angle, and apply a π pulse train to recover the position dependence of the ^{13}C NMR resonance frequency along the spinning axis, which is averaged by sample spinning. The spin echo attenuation with a π pulse train was recorded and analyzed.

1.序

液体中での分子拡散を測定する有力な手法として Pulsed Field Gradient (PFG) 法が確立されている。拡散が遅くまた双極子相互作用が完全には平均化されず残る液晶中においても強い磁場勾配や双極子デカップルなどの手法により異方的な拡散係数が求められている。異なるアプローチとしてコレステリック液晶においては、スペクトルの線形解析により異方的な拡散係数が得られている。

ここでは、コレステリック液晶の異方的拡散係数を精密に測定するための新しい手法を発表する。コレステリック液晶においては、ピッチ軸方向にらせんを描きながらディレクターが並ぶためディレクターの角度を通じて分子の位置と共鳴周波数に相関がある。そのため静止試料の NMR スペクトルは円柱パウダーパターンを示す。磁化率の異方性が正(負)のコレステリック液晶を磁場に対する試料回転軸の角度をマジックアングルより大きい(小

キーワード: OMAS 液晶 拡散 化学シフト異方性 スピネコー

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

さい)角度で試料回転する事によりピッチ軸を試料回転軸に一致させる事ができる。このとき、分子の位置と共鳴周波数の相関は試料回転により平均化されてしまう。ここに π パルス列を適切に照射する事により円柱パウダーパターンを復活させると分子の位置と共鳴周波数の相関が復活する。この状況は PFG を照射している間だけ分子の位置と共鳴周波数の相関が発生する PFG 法とよく似ている。 π パルス系列を PFG の代わりに照射し、エコーをとる事により拡散係数を測定した。

2.理論

半ローター周期の間に 2 回の π パルスを照射することにより円柱パウダーパターンを復活させる[1]。このとき磁化の発展は、OMAS のもとでの磁化の発展と π パルスによる効果を考えればよい事になる。OMAS のもとでの NMR の共鳴周波数は次のようにあらわされる。

$$\omega(\phi, t) = \bar{\omega} + C_2 \cos 2(\omega_r t + \phi) \quad (1)$$

ここで定数 $\bar{\omega}$ および C_2 は静磁場と試料回転軸のなす角 ϵ と化学シフトテンソルの主値に依存し文献[1]に与えられている。また、 $\omega_r / 2\pi (= 1/\tau_r)$ は試料回転周波数、 ϕ は試料管に固定された座標系におけるディレクターの分布をあらわす角度であり関係は figure 1 に示した。

Bloch 方程式に拡散項を加えると次のようにあらわすことができる。

$$\frac{\partial}{\partial t} M_+^{\text{time}}(\phi, t) = [i\omega(\phi, t) - 1/T_2] M_+^{\text{time}}(\phi, t) + D_R \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} M_+^{\text{time}}(\phi, t) \quad (2)$$

$M_+^{\text{time}}(\phi, t)$ を ϕ について Fourier 展開して次のようにあらわす。

$$M_+^{\text{time}}(\phi, t) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} a_{2k}(t) \exp(2ik\phi) \quad (3)$$

上の式では偶数次数の係数しか現れない。これは化学シフト相互作用が $\omega(\phi, t) = \omega(\phi + \pi, t)$ を満たすことおよび平衡状態の磁化が ϕ に依存しない事に由来している。次式のベクトル $\mathbf{a}(t)$ の時間発展を計算すれば OMAS のもとでの磁化の時間発展が与えられる。

$$\mathbf{a}(t) = \begin{pmatrix} \vdots \\ a_{-4}(t) \\ a_{-2}(t) \\ a_0(t) \\ a_2(t) \\ a_4(t) \\ \vdots \end{pmatrix} \quad (4)$$

$\mathbf{a}(t)$ を計算するためまず(2)式を $\mathbf{a}(t)$ で書き直し、さらに両辺を t に関してラプラス変換した。得られた方程式をラプラス係数について解いた後、逆ラプラス変換により $\mathbf{a}(t)$ とその

$$a_j^{new} = \exp(-ij\omega_r t) a_j^{old} \quad (10)$$

以上より、時間発展、座標変換、 π パルスを適切に繰り返す事によって π パルス列のもとでの磁化の時間発展が求まり、エコーの強度が計算できる。

3. 実験および結果

p-methoxybenzylidene-*p*-*n*-butylaniline(MBBA)に 5.3 wt% Cholesteryl Chloride(CC)を混合したコレステリック液晶 CC/MBBA を用いた。Figure 2 に示したパルスシーケンスを用いた。二つの異なる m に対して実験を行った。実験およびシミュレーションの結果を Figure3 に示した。

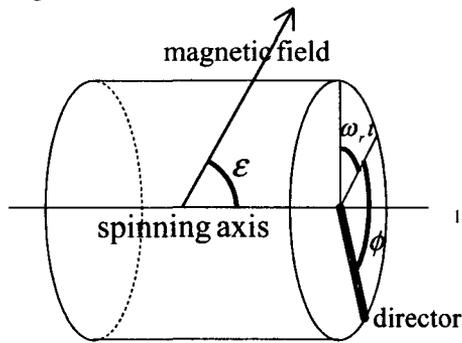


Figure 1. Relationship between the director and the magnetic field

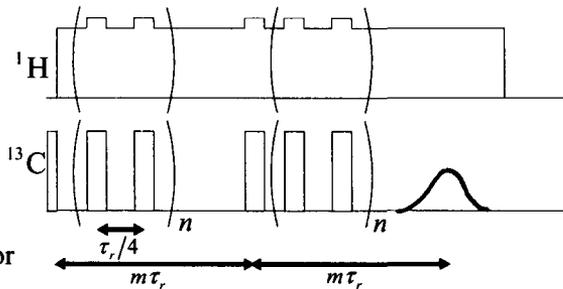


Figure 2. Pulse sequence used for observing spin echo attenuations.

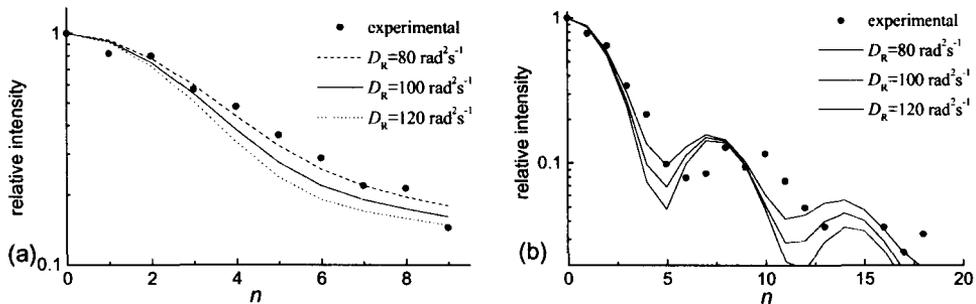


Figure 3. ^{13}C spin echo attenuation for the peak at 120 ppm of the cholesteric liquid crystal CC/MBBA. The spectra were observed at two different conditions (a) $m = 5$ and (b) $m = 15$. Experimental results are shown by dots and simulated result are shown by lines. The spectra were observed at 303 K and $\varepsilon = 90$ degree. The sample was spun with 2750 Hz.

[1] Y. Nishiyama, A. Kubo, and T. Terao, *Mol. Phys.* **96**, 1569 (1999).

液晶NMR自動解析法における遺伝アルゴリズムとスペクトルの積分変換の利用

(北大院・理) ○竹内浩, 井上香織, 安藤夕太, 小中重弘

Automatic analysis of NMR spectra of molecules dissolved in liquid crystals.
The use of genetic algorithm and integral transformation.

Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University
Hiroshi Takeuchi, Kaori Inoue, Yuta Ando and Shigehiro Konaka

Recently we have proposed a new method for automatic analysis of NMR spectra of molecules dissolved in liquid crystals. In the present study, the method has been applied to the analysis of ^1H -NMR spectra of ethanol, tolan and *trans*-azobenzene in ZLI 1132. The analysis searches a true solution for ethanol and approximate solutions for tolan and *trans*-azobenzene. This indicates that the automatic analysis by using genetic algorithm and integral curves is efficient. We have also discussed a procedure to obtain true solutions from approximate solutions.

【序】液晶を溶媒とするNMR (液晶NMR) では, 吸収線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, スピン数が増えると吸収線の数が増えるため, この方法による解析は困難になる。そのため, 吸収線の周波数と共に強度を用いる自動解析法が報告されている。この自動解析では, 化学シフトと直接結合定数を最小自乗法で決定する。しかし, 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。

我々は, 昨年の本討論会 [1] において, この点を克服する新しい自動解析法について報告した。今回は, この方法をエタノール・トラン ($\text{Ph}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{Ph}$) ・トランスアゾベンゼン ($\text{Ph}-\text{N}=\text{N}-\text{Ph}$) の実測スペクトルに応用した。それにより, 我々の開発した自動解析法について検討を行なった。

【実験】ネマチック液晶ZLI 1132中にエタノール (濃度4 wt%) ・トラン (10 wt%) ・トランスアゾベンゼン (10 wt%) をそれぞれ溶かし, JNM EX-400により ^1H -NMRスペクトルを測定した。スペクトルに対して液晶溶媒による吸収を補正し, 補正後のスペクトルを解析に用いた。エタノールとトランのスペクトルを図1と2に示す。

【解析】本自動解析法では, スペクトルを積分曲線に変換する。スペクトルを用いた解析では, 実測スペクトルと計算スペクトルのピークが一致するたびに, 局所解が生じる。しかし, 積分曲線にはピークが存在しないため, 局所解の数を減らすことができる。

この積分曲線に対する解析を行っても, 本研究で測定したスペクトルのように吸収線が多くなれば, なお様々な局所解が存在する。この局所解に陥らずに最適値を求めるために, 遺伝アルゴリズム (GA) [2] によるスペクトル・パラメーターの最適値検索を行った。

GAのパラメーターについては, 交叉確率と突然変異確率を0.8と0.3に設定した。選択にはトーナメント方式を用いた。

【結果】エタノール 1世代の個体数は40, 世代数は200とした。解析の第一段階では, トランス配座のみが存在するとして, その分子構造が気相のものと同じと仮定した。そして, 積分曲線に対するGAにより, 化学シフトと配向パラメーターを求めた。さらに, 直接結合定数と化学シフトをGAにより最適化した。これにより, 計算スペクトルは実測スペクトルを再現した。その時に得られた計算スペクトルを図1に示す。

トラン 1世代の個体数は10, 世代数は100とした。解析の結果, 実測スペクトルに対する液晶溶媒の吸収の補正が不十分であるために, 積分曲線から近似解しか得ることができなかった。

液晶NMR, 直接結合定数, 自動解析, 遺伝アルゴリズム, 積分変換

たけうち ひろし, いのうえ かおり, あんどう ゆうた, こなか しげひろ

そのため、積分曲線から徐々にスペクトル解析へ移行させる方法を、以下のような重み関数を導入したスペクトル変換を用いて検討した。

$$f_i = \sum_{j=1}^i w_{ij} I_j \quad (i=1,2,\dots,n)$$

I_j は、データ・ポイント j におけるスペクトル強度である。重み関数 w_{ij} が常に 1 の時には、 $f_i = \sum_{j=1}^i I_j$ 、つまり積分強度になる。しかし、 $j=i$ の時に $w_{ij}=1$ であり、 $j \neq i$ の時に $w_{ij}=0$ であれば、 $f_i = I_i$ になり、 $0 < w_{ij} < 1$ であれば、 $I_i < f_i = \sum_{j=1}^i w_{ij} I_j < \sum_{j=1}^i I_j$ となる。後者の場合、 f_i ($i=1,2,\dots,n$) は積分曲線とスペクトルの中間となる。本研究では、重み関数として $\exp[-\{(\nu_j - \nu_i)/\alpha\}^2]$ のガウス関数 (ν_j は j における周波数、 $\alpha > 0$) を用いた。この場合には、 α の値が大きいくほど、 f_i は積分強度に近くなる。

実際の解析では、積分曲線に対する GA により求めた近似解を化学シフトと直接結合定数の初期値にした。そして、 α の値を 1000, 100, 10 Hz の順に変化させながら、スペクトル・パラメーターを最小自乗法で決定した。その結果、実測スペクトルを再現することができた (図 2)。

トランス-アゾベンゼンについても、同様にしてスペクトル解析をすることができた。
【結論】 GA と積分曲線を用いた自動解析により、エタノールについてスペクトル・パラメーターを決定できた。トランとトランス-アゾベンゼンについては、近似解を求めることができた。このことから、この自動解析法が有効であることがわかった。また、近似解から真の解を得る方法についても検討した。

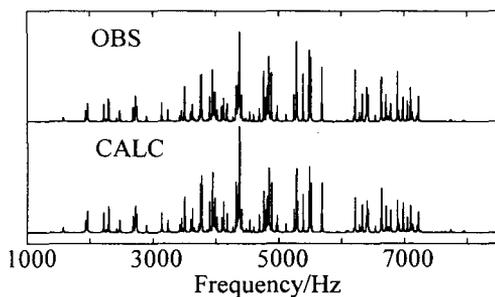


Figure 1. Observed and calculated $^1\text{H-NMR}$ spectra of ethanol dissolved in ZLI 1132. The observed spectrum has been corrected for the background due to ZLI 1132.

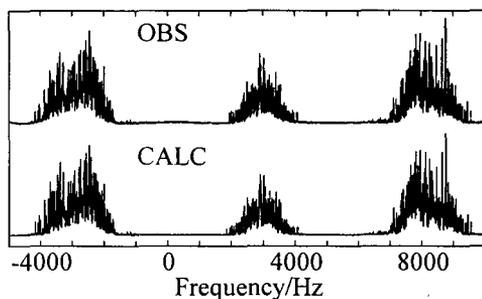


Figure 2. Observed and calculated $^1\text{H-NMR}$ spectra of tolan dissolved in ZLI 1132. The observed spectrum has been corrected for the background due to ZLI 1132.

【参考文献】

- [1] 竹内, 小中 第38回NMR討論会, P 43 (1999) 札幌。
- [2] A. H. Wright, in "Foundations of Genetic Algorithms," ed by J. E. Rawlins, Morgan Kaufmann, San Mateo (1991), p. 205.

時間依存型非断熱遷移理論による $I_N S$ スピン系の分極移動制御

(分子研) ○三嶋謙二、中村宏樹

【序】分極移動(cross-polarization)は、NMR において、スピン結合している感度のよい核(I)から感度の良くない核(S)へ分極を移動し、S 核の感度の良いスペクトルを得るためにしばしば用いられる手法である。最近、各々の核種に照射するラジオ波の振幅の一方を断熱的に一回掃引することの有用性が理論的に示された[1]。しかし、断熱掃引に共通した欠点として、パルス照射時間が長く、スピナー格子、スピン-スピン緩和などの影響が無視できなくなる可能性がある。本研究では、異核同核結合したスピン系 $I_N S$ における分極移動を一般的な非断熱遷移理論を用いて多ラジオ波を周期的に掃引して、短時間で低ラジオ波振幅で完全分極移動を達成することを目標とする。

【計算方法】スピン系 $I_2 S$ におけるハミルトニアンは右のように与えられる。ここで、 d_1 と D はそれぞれ、異核、同核双極子結合を表す。 $\Delta(t)$ は一方のラジオ波の offset を表し、時間に依存する断熱パラメータである。ハミルトニアンの特格項が時間依存しており、

$$\begin{pmatrix} -D/4 \mp \Delta(t)/2 & d_+ / 2 & \pm d_- / 2 \\ d_+ / 2 & D/2 \pm \Delta(t)/2 & 0 \\ \pm d_- / 2 & 0 & \pm \Delta(t)/2 \end{pmatrix}$$

Landau-Zener 型遷移問題である。数値計算は、近年当研究室で開発された時間依存型非断熱遷移理論[2,3]を用い、

$$d_{\pm} = (d_1 \pm d_2) / \sqrt{2}$$

半古典的に行った。最適化は、2 状態問題($d_1 = d_2$)に対して Newton-Raphson 法を、3 状態問題($d_1 \neq d_2, D \neq 0$)に対しては Powell 法を用いた。

【結果と考察】2 状態問題と 3 状態問題で関与する断熱状態の $\Delta(t)$ 依存性をそれぞれ図 1、2 に示す。スピン系は低温を仮定し、断熱状態(a)から(b)(2 状態問題)、および、断熱状態(a)から(c)(3 状態問題)に 100%遷移させることが目的である。典型的なパルス波と population の時間変化の様子を図 3 に示す。各々の場合で、断熱高速掃引に比べ、10 倍速く完全分極移動を引き起こすことができることがわかった。このことは、疑似交差を一回通過する時の非断熱確率 p で説明することができる。掃引する回数の影響、較正のエラーに対する安定性などを含めた詳細は当日報告する予定である。

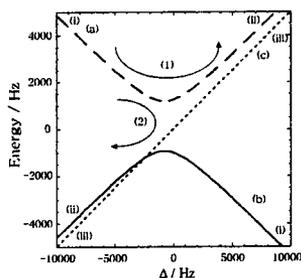


図 1

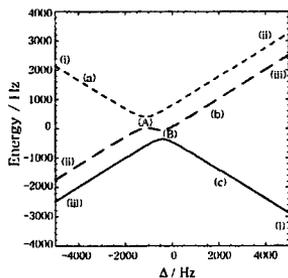


図 2

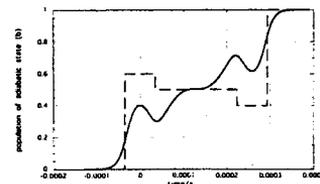
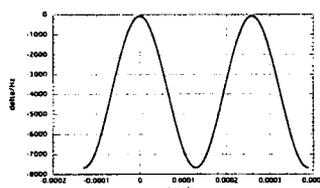


図 3

- [1] P. Hodgkinson and A. Pines, J. Chem. Phys. **107**, 8742 (1997).
 [2] Y. Teranishi and H. Nakamura, Phys. Rev. Lett. **81**, 2032 (1998).
 [3] Y. Teranishi and H. Nakamura, J. Chem. Phys. **111**, 1415 (1999).

試料二重回転下での REDOR

(分子研) 桑原 大介

The application of double-rotation NMR method to a CH_x ($x \geq 2$) spin system
(Institute for Molecular Science) Daisuke Kuwahara

Double-rotation NMR method was developed originally to remove second-order line broadenings for solid-state quadrupolar nuclei having half-integer spins. We applied the method to rare ^{13}C 's surrounded by abundant protons. It averaged out the homonuclear dipolar interactions, so that a CH_x ($x \geq 2$) system could be taken as an ensemble of independent CH systems. We could, therefore, detect heteronuclear dipolar interactions for CH_x spin systems without homonuclear decoupling techniques.

<目的>

試料二重回転 (DOR) は 元々 半整数スピンをもち四極子核の高分解能 NMR スペクトルを測定するために開発された手法である。二重回転の名が示すとおり それは回転軸の異なる2つの回転からなる。しかしよく眺めてみると一方の回転はマジック角試料回転 (MAS) である。それゆえに MAS の下で失われた情報を再び手に入れるべく開発された様々な手法が DOR にも適用できるのではないかと考えられる。異種核間双極子相互作用を測定するために幅広く利用されている Rotational-Echo Double Resonance NMR (REDOR) も、原理的には DOR 下で行うことができるであろう。しかし DOR は MAS でありながら MAS よりも複雑な回転であるため、そのような実験や理論的解析はまだ発表されていない。我々は、DOR のもとで REDOR を行って興味深い結果が得られるいくつかの実験を考案した。一つは CH_x ($x \geq 2$) スピン系に対する実験で もう一つは ^{13}C — ^{14}N スピン系に対する実験である。この研究のなかでは実験と理論計算の両面からそれらの実験の興味深い点を紹介する。

<実験 1 > CH_x ($x \geq 2$) スピン系に対して

DOR の働きは半整数スピンをもち四極子核の2次の線幅の広がりを取り除くことだけではない。ほかにも 同種核の双極子相互作用をかなり大きく減少させること

key words: 試料二重回転

くわはらだいすけ

が知られている。特に内部ロータの回転周波数が同種核の双極子相互作用よりも大きい場合には homonuclear なスピン系を heteronuclear な系とみなすことができる。

一般の $\text{CH}_x (x \geq 2)$ スピン系では ^1H - ^1H 双極子相互作用は 15kHz 程度となり、上記の条件は満たされない (内部ロータのスピードは 5kHz 程度)。しかし分子運動などにより ^1H - ^1H 双極子相互作用が 5kHz を下回る場合には DOR は十分にその威力を発揮する。すなわち $\text{CH}_x (x \geq 2)$ スピン系を独立した CH 系の集まりとみなすことができるのである。したがって REDOR 現象を容易に観測することができる上に、その解析もはるかに簡単となる。

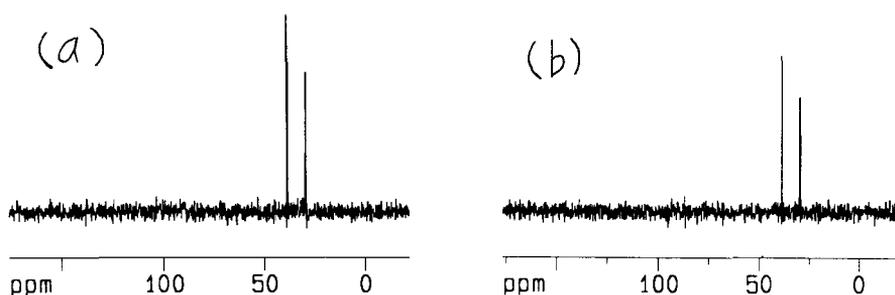


Figure 1. ^{13}C NMR spectra for adamantane undergoing DOR. Figure 1(a) was measured without ^1H π pulse. Figure 1(b) was measured with ^1H π pulse.

<実験2> ^{13}C - ^{14}N スピン系に対して

DORのもとで REDOR を行うためには ^{14}N スピンの磁化を 180 度倒さなくてはならない。その目的に対してまず思い浮かぶのは ^{14}N スピンに overtone pulse を照射することによりそれができないかということである。ところが固体粉末中の ^{14}N スピンは大抵 1MHz を超える核四極子相互作用を持つので、overtone nutation 周波数は静磁場中における相互作用テンソルの配向により異なり、各 ^{14}N スピンに付随する overtone polarization をすべて 180 度だけ倒すことはできない。それでも DOR の平均化作用は MAS より強力なため、より多くの配向に対する overtone polarizations を 180 度近く反転させることが可能であると考えられる。会場においては、DOR 条件下で ^{14}N の overtone polarizations が overtone pulse により反転していく様子を密度演算子から精確に計算した結果と、遷移モーメントから計算した平均 nutation 周波数を発表する。そして DOR の下で ^{14}N overtone pulse を使用して REDOR の実験を行うのに必要な三重共鳴 DOR NMR probe の製作について発表する。

化学シフトに対する相対性効果
(北見工大) ○馬場雄久、福井洋之

Relativistic effects on the nuclear magnetic
shieldings of hydrogen halides

(Kitami Institute of Technology) T. Baba and H. Fukui

A two-component relativistic SCF theory, based on the Douglas-Kroll transformation, is presented and applied to the calculation of nuclear magnetic shielding tensors of hydrogen halides HX (X=F, Cl, Br, I). Both the spin independent scalar relativistic (SR) and spin-orbit (SO) interactions are included in the zeroth-order Hamiltonian. The calculation is performed with the unrestricted coupled Hartree-Fock (CHF) scheme using gauge including atomic orbitals (GIAOs). The results show that the interplay between the SR and SO interactions has considerable effects on the iodine shielding in HI. It is found that the inclusion of the SR and SO interactions is insufficient to explain the total relativistic effect which is estimated from the four-component relativistic random phase approximation (RPA) calculation reported by Visscher *et al.*[1] In order to reproduce the total relativistic effect the relativistic spin Zeeman (RSZ) term is defined and added. The RSZ term shows a very large effect on the halogen atom shieldings and overestimates the total relativistic effects on the magnetic shieldings, especially the iodine shielding in HI. The results are shown in Tables I-III.

TABLE I. Relativistic and nonrelativistic nuclear magnetic shielding constants (in ppm) in hydrogen halides.

Molecule	Basis set ^a	Nucleus	NR ^b	SR ^c	SO ^d	SR+SO ^e	4-comp. ^f
HF	(13s8p3d/7s2p)	F	413.5	414.3	414.1	414.9	423.3
		H	28.63	28.65	28.82	28.84	27.87
HCl	(15s12p6d/7s2p)	Cl	950.1	955.7	953.6	960.4	1020.1
		H	30.72	30.73	31.78	31.82	31.00
HBr	(17s13p8s4f/7s2p)	Br	2643.2	2693.6	2677.0	2765.7	3224.6
		H	31.03	31.02	36.09	36.65	36.08
HI	(19s15p12d8f/7s2p)	I	4538.2	4653.4	4662.5	5162.0	6768.4
		H	31.25	31.13	45.12	48.44	47.98

^a Reference [2]. ^b Nonrelativistic calculations.

^c Only spin independent scalar relativistic effect was included.

^d Only spin-orbit effect was included.

^e Both scalar relativistic and spin-orbit effects were included.

^f Four-component relativistic RPA calculations in Ref. [1].

Relativistic effect · Nuclear Magnetic Shielding · Scalar Relativistic · Spin Orbit

ばばたけひさ、ふくいひろゆき

TABLE II. Relativistic spin Zeeman effect on the nuclear magnetic shielding constants (in ppm) in hydrogen halides.

Molecule	Basis set ^a	Nucleus	NR ^b	SR+SO ^c	SR+SO+RSZ ^d	4-comp. ^e
HF	(13s8p3d/7s2p)	F	413.5	414.9	424.5	423.3
		H	28.63	28.84	28.82	27.87
HCl	(15s12p6d/7s2p)	Cl	950.1	960.4	1037.5	1020.1
		H	30.72	31.82	31.81	31.00
HBr	(17s13p8s4f/7s2p)	Br	2643.2	2765.7	3657.2	3224.6
		H	31.03	36.65	36.63	36.08
HI	(19s15p12d8f/7s2p)	I	4538.2	5162.0	9727.9	6768.4
		H	31.25	48.44	48.42	47.98

^a Reference [2]. ^b Nonrelativistic calculations.

^c Both scalar relativistic and spin-orbit effects were included.

^d Scalar relativistic, spin-orbit, and relativistic spin Zeeman effects were included.

^e Four-component relativistic RPA calculations in Ref. [1].

TABLE III. The proton chemical shifts (in ppm) of hydrogen halides relative to the HF proton. The positive sign of the chemical shifts indicates a low-field shift.

	HCl	HBr	HI
NR ^a	-2.08	-2.39	-2.62
SR ^b	-2.08	-2.37	-2.48
SO ^c	-2.95	-7.27	-16.30
SR+SO ^d	-2.98	-7.81	-19.60
SR+SO+RSZ ^e	-2.98	-7.81	-19.60
4-comp. ^f	-3.13	-8.21	-20.11
Observed ^g	-2.95	-6.85	-15.75

^a Nonrelativistic calculations.

^b Only spin independent scalar relativistic effect was included.

^c Only spin-orbit effect was included.

^d Both scalar relativistic and spin-orbit effects were included.

^e Scalar relativistic, spin-orbit, and relativistic spin Zeeman effects were included.

^f Four-component relativistic RPA calculations in Ref. [1].

^g Reference [3].

References

- [1] L. Visscher, T. Enevoldsen, T. Saue, H. J. Aa. Jensen, and J. Oddershede, *J. Comput. Chem.* **20**, 1262 (1999).
- [2] H. Fukui and T. Baba, *J. Chem. Phys.* **108**, 3854 (1998).
- [3] W. G. Schneider, H. J. Bernstein, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **28**, 601 (1958).

核双極子線幅シミュレーターの試作

理研

金材技研, CREST-JST

○端 健二郎

清水 禎

後藤 敦

北澤 英明

Simulator for the calculation of the line width due to the nuclear dipole field

RIKEN

○K.Hashi

NRIM, CREST-JST

T.Shimizu, A.Goto, H.Kitazawa

Abstract:

We have made a simulation program to calculate the NMR line width due to the nuclear dipole field by the 2nd moment method. The contribution of the each nuclear spin is summed up in the range of $10 \times 10 \times 10$ unit lattices. This program utilizes the lattice information prepared by a commercial software to draw a crystal structure. Because of this feature, this program can be applied easily to the calculation of the line width for the crystal which has a complex structure.

プログラムの仕様および特徴

- (i) 結晶構造に関するデータは市販されている結晶構造描画ソフトによって入力済みのデータを利用する。このことにより複雑な結晶構造を持つ試料についても容易に対応できる。現在、最大8つの異なるサイトを持つ結晶構造に対応している。2次モーメントは $10 \times 10 \times 10$ の結晶格子について和を取ることで計算している。
- (ii) 核種に関するデータ(核スピン、核磁気回転比、存在率)は、このプログラムが持つデータベースから自動的に読み込む。核種に関するデータはプログラム上で任意に編集することができ、エンリッチした試料にも容易に対応できる。
- (iii) 試料は粉末結晶、単結晶の両方に対応しており、単結晶に対しては、外部磁場は任意の方向を選ぶことができる。また、角度依存性も自動で計算できるようになっている。

キーワード：核双極子線幅 シミュレーター

○はし けんじろう、しみず ただし、ごとう あつし、
きたざわ ひであき

デジタルシグナルプロセッサを用いた MRI 信号発生器の開発
 ○宇津澤慎*, 拝師智之, 巨瀬勝美
 (株)エム・アール・テクノロジー*, 筑波大学物理工学系

MRI Signal Generator using Digital Signal Processor
 Shin UTSUZAWA*, Tomoyuki HAISHI, Katsumi KOSE
 MR Technology Inc. *, Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

The MRI signal generator, which virtually generates MRI signal in the laboratory frame, has been developed using a DSP board and an I/Q modulator. The MRI signal data in the rotating frame were obtained using 2D complex FFT of a 2D MRI image acquired beforehand. The signal data were converted to two-channel analog voltages at a constant time interval using DA converters on the DSP board. The rotating frame signal was converted to the laboratory frame MRI signal using an I/Q modulator. The virtual MRI signal was supplied using a small coil to the RF coil of the MRI system through an inductive coupling. MRI images were obtained as if imaging objects had been in the RF coil. It is thus concluded that the proposed system is a useful tool to check the receiver and acquisition systems of MRI.

<はじめに>

MRI コンソールを構成する各ユニットに関してはそれぞれに評価試験が行われる一方で、静磁場発生用磁気回路が専用の設備で組み立てられるため、実際に MRI 信号を取得するのは開発の最終段階となることが多い。このため、開発過程にある MRI システムの評価において、被写体からの MRI 信号を擬似的に再現および入力して、受信系全体のシステム応答を測定することが望まれていた。本研究では以上の状況を踏まえ、デジタルシグナルプロセッサ(DSP)を搭載する PC 用拡張ボードを用いて「MRI 信号発生器」の製作を行った。

<システムの構成>

Fig.1 に開発した MRI 信号発生器(a)と信号の流れ(b)を示す。システムは、ノート PC、バスブリッジ(インターフェイス社製,UPC1471Wc)とこれに接続された DSP ボード(mtt 社製,DSP6031), DDS ボード(DS Technology 社製,FSW01, 10~200MHz), I/Q 変調器ならびに送信コイルから成る。DSP ボードは 4 チャンネルの 12bit DA 変換器を搭載し、内部タイマの割り込みにより正確なタイミングでデジタルデータをアナログ信号に変換する。また、DDS ボードの発振周波数(設定精度: ~0.1Hz)は PC のプログラム上からリアルタイムに変更可能である。I/Q 変調器は、互いに位相が 90° 異なる搬送波で 2 つの入力信号を変調し、これを高周波信号として出力する。

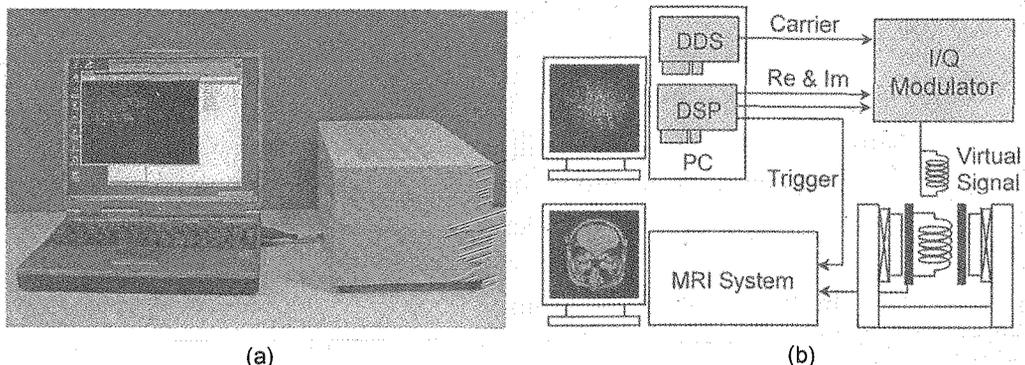


Fig.1 (a) Overview of the MRI signal generator (b) Block diagram of the MRI signal generator

キーワード: DSP, 拡張ボード, 機器評価, MRI 信号発生器, 任意波形発生器
 うつざわしん, はいしともゆき, こせかつみ

<MRI 信号の発生原理>

まず、PC 上で動作するプログラムが既得の画像をフーリエ変換し、実部と虚部の空間周波数データを作成する。こうして得られたデータを DSP ボードに転送し、各種パラメタの設定後に信号ならびにトリガの出力を開始させる。

DSP 側プログラムは、内部タイマにより定められたタイミングで DA 変換器から信号データを出力する。アナログ波形となった実部と虚部の信号は、DDS ボードで発生される搬送波により I/Q 変調された後に送信コイルに供給される。この波形は試料より発せられる MRI 信号と等価であり、通常の撮像時と同様に受信コイルで検出してサンプリングすることで再構成画像を得られる。

<実験>

実験に用いた信号データは、画素値 16bit の頭部およびオクラの MRI 断層像を 2 次元フーリエ変換して作成した。保存の際には、DSP ボードに搭載された DA 変換器のビット分解能が 12bit であることを考慮して圧縮を行った。MRI 装置および MRI 信号発生器において TR=100ms とし、0.3T の磁石を用いたシステムを模擬するために搬送波ならびに参照波の周波数を 12.97MHz に設定して実験を行った。

<結果>

DSP ボードより出力された信号波形を Fig.2 に、得られた再構成画像を Fig.3, Fig.4 に示す。頭部とオクラの断層像を比較すると、元画像に微細構造が増えるに伴い再構成画像に低周波歪みが現れた。これは、微細構造を有する画像では高周波成分が大きな値を持つため、信号データ作成時の画素値圧縮においてダイナミックレンジが不足したことに起因する。

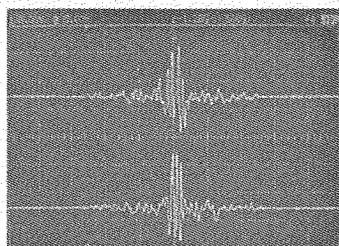


Fig.2. 2 channel MRI signal generated by DA converters on the DSP board

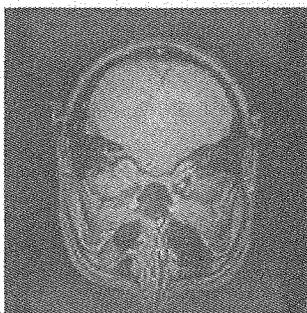


Fig.3 Reconstructed image of human brain (matrix size: 128²)

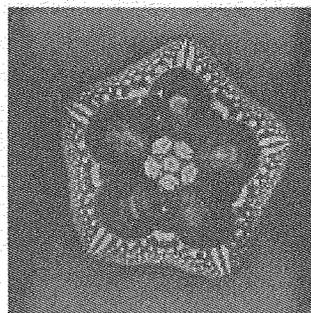


Fig.4 Reconstructed image of okra (matrix size: 128²)

<むすび>

ノート PC に接続された DSP ボードから同期用トリガ信号と共に 2 次元空間周波数データを出し、MRI 装置を用いて検波・画像再構成したところ、MR 画像が再現されることを確認した。信号処理プロセッサに DSP を用いることで出力のタイミングが厳密に設定され、ISA バスに接続される拡張ボードの採用によりデータや出力特性の変更を PC 上から容易に行うことができた。アナログ素子を用いて同等の機能を実現する場合と比較して、コストと開発時間の両面で非常に効率の良い MRI 信号発生器であることを確認した。今後はこのような MRI 信号発生器により受信系全体の機器評価が円滑に行えるものと思われる。さらに、PC 上で作成した任意波形の発生が可能となったことで、選択励起パルスの出力など様々な用途への応用が期待される。

<参考文献>

- 1) K.Kose and T.Haishi, "Development of a Flexible Pulse Programmer for MRI Using a Commercial Digital Signal Processor" in "Spatially Resolved Magnetic Resonance" (P.Bluemler, N.Bluemich, R.Botto, E.Fukushima Eds.), p.703, WILEY-VCH, 1998

***in vivo* ¹³C-MRS による脳内代謝の定量化に関する基礎的検討(1)**(株)東芝 医用機器・システム開発センター¹、国立精神・神経センター武蔵病院²、創価大学生命科学研究所³○岡本和也¹、渡邊英宏¹、梅田匡朗¹、大槻泰介²、小田正記³、金松知幸³、塚田裕三³**Fundamental evaluation for quantification of brain metabolism using *in vivo* ¹³C-MRS (1)**¹Medical Systems R&D Center, TOSHIBA, ²National Center of Neurology and Psychiatry,³Institute of Life Science, Soka Univ.K. Okamoto,¹ H. Watanabe¹ and M. Umeda¹, T. Otsuki,² M. Oda,³ T. Kanamatsu,³ Y. Tsukada³

Ten volunteers were selected and the written consent was obtained after being informed about the procedure and the potential risks of the study. A newly developed ¹³C-MRS system is based on a 2T TOSHIBA ¹³C-MRS research system, which has the features of a high SNR, a good separation of ¹³C chemical compounds and a good localization. ¹³C spectra were simultaneously obtained from two voxels (48 ml or 64 ml) on bilateral occipital lobes of volunteers after oral administration of 99% enriched [1-¹³C] glucose (Glc-1; 0.75g per 1kg body weight) in a 30% weight /volume water solution. An acquisition time is 5 min.. ¹³C spectra were acquired for 2-3.5 hours to obtain time courses for ¹³C-labeled compounds (glutamate and glutamine). Blood samples were taken from the antecubital vein before the administration and at predetermined intervals after the administration, and analyzed to measure the blood sugar level, the insulin level, and the fractional enrichment (F.E.) of Glc-1. TCA cycle rate of each individual was computed based on the previously proposed mathematical model using the time series data of ¹³C-labeled compounds. ¹³C-MRS by oral administration will extend the usefulness of ¹³C-MRS not only to human brain metabolism research but also to clinical applications.

【はじめに】

我々は高感度な *in vivo* ¹³C-MRS を目指し、マルチスライス HSQC パルスシーケンスや新規高周波コイル系等の開発を行い、ヒト脳内同時複数ボクセルから[1-¹³C]グルコース(Glc-1)代謝物の信号を高感度に観測できることを示してきた¹⁾。今回、この装置を使って人ボランティア頭部より得られたスペクトルデータから、TCA 回路速度(Vtca)等の算出を試みた。

【方法】

本試験については、国立精神・神経センター武蔵病院倫理委員会の承認を得て実施した。

<人ボランティア>

正常ボランティア(20代)で耐糖異常症などの合併症を有さない者を対象とした。試験前日までに、問診/一般血液生化学検査/尿糖/空腹時血糖値/耐糖能検査(GTT)/血圧測定/心電図、高次脳機能検査等を実施し最終的に10例を選定した。

<システム>

ヒト用 ¹³C-MRS 装置は、東芝製 2T ¹³C スペクトロスコーピー研究用装置をベースとし、パルスシーケンスとしてマルチスライス HSQC 法²⁾、高周波コイルとしては複数の表面コイルを関心領域周辺に配置するマルチ表面コイル、傾斜磁場強度 3G/cm の傾斜磁場コイル系を組み込んだものを用いた。関心領域を後頭部としたため、マルチスライス HSQC 法で左右の後頭部 2 箇所(64ml or

¹³C、人ボランティア、経口投与、TCA 回路速度、2T 人体用 MR システム

おかもとかずや、わたなべひでひろ、うめだまさあき、おおつきたいすけ、おだまさのり、かなまつともゆき、つかだやすぞう

48ml)を計測領域として設定し、左右一組の¹³Cスペクトルデータを5分で収集できるように調整した。またマルチ表面コイルとして、後頭部に矩形表面コイル(110mm*130mm)を3個配置した。

<試験手順>

被験者には、右上手腕静脈に採血ラインを確保し、1位標識¹³Cグルコース(Glc-1)を体重1kgあたり0.75g(水および炭酸水にて30%溶液に調整)を服用後、仰臥姿勢で装置に入ってもらった。その後、安静閉眼状態で2-3時間にわたり¹³Cスペクトルデータ収集を行った。採血は、服用後30分までは5分おき、30-60分の間は15分おき、さらに60-180分の間は30分おきで行い、グルコース濃度、¹³Cグルコース-全グルコース比(¹³C-Glc F.E.)、インシュリン値等を計測した。

<データ処理>

まず、後頭部2箇所から得られたスペクトルそれぞれについて、グルタミン酸の4位(Glu-4)と3位(Glu-3)、グルタミン4位(Gln-4)の¹³Cの信号値をデータ処理(カーブフィッティング)により算出し、最終的に各化合物のF.E.の時系列データを得た。次に、上記時系列データと血中グルコース量および血中¹³C-Glc F.E.のデータを用いて、Glc-1の代謝モデルからTCA回路代謝速度(Vtca)、グルタミン合成速度(Vgln)を算出した。Glc-1の代謝モデルでは、生体内で濃度の低い中間代謝物を無視してGlc-1からのGlu-4、-3やGln-4の各コンパートメントへの¹³Cの流れを単純化した。各コンパートメント毎に微分方程式をたて、血中グルコース量やグルコースのF.E.を入力として上記微分方程式をときながら、最小自乗法によりVtca、Vglnを決定した。図1に、血中Glc-1 F.E.やGlu-4 F.E.の計測値と最終的にfittingされたGlu-4 F.E.の時間変化を示す。

【結果および考察】

算出されたボランティアのVtcaは平均0.33(SD:0.15)(右平均:0.33、左平均:0.32)μmol/g/min.、Vglnは平均0.025(SD:0.016)(右平均:0.024、左平均:0.026)μmol/g/min.で、これから推定されるグルコース代謝率は0.20(SD:0.083)(右平均:0.20、左平均:0.20)μmol/g/min.であり、PETによる計測値と比べほぼ妥当な代謝速度といえる。

【結論】

¹³C-MRS装置を用いることにより、1位標識¹³Cグルコースを経口投与してTCA回路の代謝速度などの脳代謝に関する重要な知見を得られることを確認できた。

【参考文献】

- 1) Okamoto K, et al., in "Proc., ISMRM, 8th Meeting, 2000", p.1850
- 2) Watanabe H, et al., Magn. Reson. Med., 43:525-533, 2000
- 3) Mason GF, et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 15:12-25, 1995

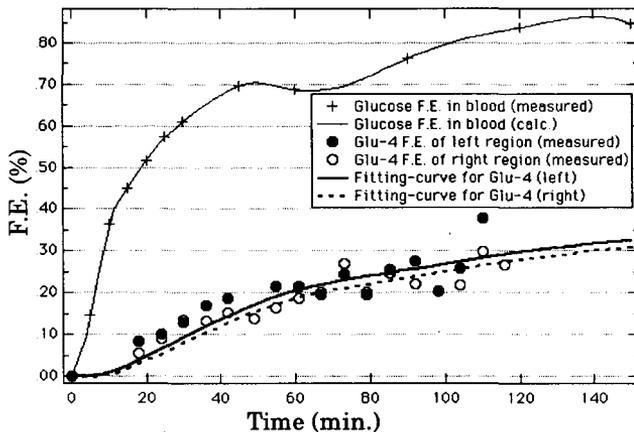


Figure 1
Measured Glc-1 F.E. in blood (+) and Glu-4 F.E. for left (●) and right (○) occipital regions, and fitting curves for Glu-4 F.E. data calculated using a set of differential equations based on a glucose-glutamate metabolic model. The Glc-1 F.E. data are interpolated using a spline function and used for an input of the differential equation set.

¹H DQF-NMR 法を用いたコラーゲン線維配向の定量化と
動的粘弾性の関係：家兎 stress-shielding モデルを用いて
京都府立医科大学第1生理¹・整形外科²

○生駒和也^{1,2}、瀬尾義輝¹、日下義章²、山崎隆仁²、高宮尚武²、平澤泰介²、
丸中良典¹

Correlation between the viscoelasticity and the quantitative analysis of the order of collagen
fibers by using ¹H DQF-NMR method

Departments of Physiology¹ and Orthopaedic Surgery²,

Kyoto Prefectural University of Medicine

○K. Ikoma^{1,2}, Y. Seo¹, Y. Kusaka², T. Yamasaki², H. Takamiya², Y. Hirasawa²,
Y. Marunaka¹

The effects of stress-shielding on the viscoelastic properties and micro-structure of collagen fibers in the Achilles tendon were investigated. Dynamic viscoelasticity of the Achilles tendons of stress-shielding legs and control legs was measured to determine dynamic storage modulus (E') and dynamic loss modulus (E''). ¹H-DQF NMR signals were analyzed to determine the residual dipolar coupling of bound water molecules in the Achilles tendons. Both E' and E'' decreased significantly in the Achilles tendons of the stress-shielding group (SS group). We assume that the decreases may be attributable to the disordered structure of the longitudinally aligned collagen fibers in the Achilles tendons of the SS group. The results of the ¹H-DQF NMR examination demonstrated significantly reduced residual dipolar coupling in the Achilles tendons of the SS group. These findings support the hypothesis that stress-shielding may result in disordering of the collagen fibers, which may in turn account for the changes in viscoelastic properties.

キーワード：アキレス腱、コラーゲン線維、stress-shielding、¹H DQF NMR 法、動的粘弾性

いこまかずや、せおよしてる、くさかよしあき、やまさきたかひと、たかみやひさたけ、ひらさわやすすけ、まるなかよしのり

【目的】

腱組織におけるコラーゲン線維の配向性は腱組織の力学特性に非常に重要である。ギプス固定や神経麻痺などの原因により正常な外力や運動が長期間負荷されない (stress-shielding) と、コラーゲン線維の配向が乱れ cross-link が増加することが報告されている。このような stress-shielding にともなうコラーゲン線維の変化は関節の拘縮に関与し、リハビリテーションの障害因子になることは周知のことである。本研究では、stress-shielding にともなうアキレス腱の動的粘弾性および DQF NMR 信号の変化を測定し、stress-shielding がアキレス腱のコラーゲン線維構造と力学的特性に与える影響の解析を試みた。

【方法および対象】

実験材料として雄性日本白色家兎(平均 2.5kg) 20 羽を使用した。静脈麻酔下に家兎右後肢の足関節を最大底屈位、膝関節を 90 度屈曲位に固定し、プラスチックギプスを足尖から大腿部まで巻き固定した。これを stress-shielding モデルとして、4 週後に固定群 (右足、n=20) と対照群 (左足、n=20) のアキレス腱を試料とした。粘弾性測定には 11 羽を使用した。粘弾性スペクトロメーター VES-F-III (岩本製作所、京都) を用いて、繰り返し引っぱり負荷による動的粘弾性試験を行った。初期張力を 100g として一定の張力を加えつつ、動的な負荷を 20g に設定した。0.1、0.2、0.4、0.8、1、2、4、8、10、20、40、80Hz の周波数で、測定開始後 0 分、15 分、30 分、60 分において経時的に弾性的要素を示す貯蔵弾性率 (以下 E')、粘性的要素を示す損失弾性率 (以下 E'') を求めた。DQF NMR 信号測定には 9 羽を使用した。DQF NMR 試料は全ての実験で静磁場に対してアキレス腱長軸が平行になるように装置内に設置した。測定には AMX-300 型超伝導核磁気共鳴装置(7.05 Tesla, Bruker 社製)を使用した。DQF NMR 信号の測定には以下に示すパルス系列を使用し、展開時間(τ)を種々に設定し、DQF NMR 信号が最大になる展開時間(τ_{\max})とその DQF NMR 信号強度を測定した。展開時間依存性曲線を Uji らの理論式で curve fitting を行い、residual dipolar coupling の値を求めた。

$90^\circ - \tau/2 - 180^\circ - \tau/2 - 90^\circ - t - 90^\circ - (\text{acq.})$

測定温度は 25 °C とした。DQF NMR 信号を測定した後、120°C、48 時間、加熱乾燥し水分含有率を測定した。

【結果】

4 週間ギプス固定後の足関節は尖足位拘縮を認め、アキレス腱の踵骨と筋腱移行部間の距離には外見上明らかな短縮を認めた。肉眼的にアキレス腱周囲の腱傍組織を完全に剥離した。アキレス腱の断面積は固定側で増加する傾向にあったが、有意差は認めなかった。E'、E''とも時間経過とともに増加する傾向を認めた。E'、E''はいずれ

も対照群に比して固定群が低値を示す傾向を認め、両群間全てで有意差を認めた (Fig. 1, 2)。E'、E''いずれも測定周波数が高くなるほど増加する傾向を認め、固定群と対照群は同様の傾向を認めた(Fig. 3, 4)。水分含有率は固定群が $61.8 \pm 1.2 \%$ (mean \pm SEM) に対して、対照群は $67.1 \pm 2.0 \%$ であり、統計学的に有意差を認めた。 τ_{max} は固定群、対照群ともに統計学的に有意な差はなかった。信号強度は、固定群で対照群より有意に低かった(Fig. 5)。Residual dipolar coupling は固定群で対照群より有意に低かった(Fig. 6)。

【考察】

今回の研究結果では、ギプス固定により stress-shielding を受けたアキレス腱は E'、E'' ともに非固定側に比して低値を示した。この結果は粘性、弾性要素がともに stress-shielding により低下することを意味する。文献的には、stress-shielding を受けた腱組織ではコラーゲン線維の密度が低下し、配向に乱れが生じ、cross-link が増加することが知られている。これら腱組織の組成と構造上の変化が粘弾性特性に変化をもたらしたと考えることができる。腱組織の短縮のみならず、粘性と弾性の低下が関節拘縮に大きく関与していることが明らかになった。DQF NMR 信号の測定の結果、stress-shielding を受けた腱組織で信号強度が減少したこと、水分含有率が増加していること、residual dipolar coupling が減少したことから、stress-shielding を受けた腱組織内では自由水が増加し、コラーゲン線維は長軸方向への配向度が減少したと理解できる。以上より stress-shielding によるコラーゲン線維の配向の低下により、張力を伝達するために重要な長軸方向へ向かう正常なコラーゲン線維の割合が減少して貯蔵弾性率と損失弾性率が低下したと考えることができる。

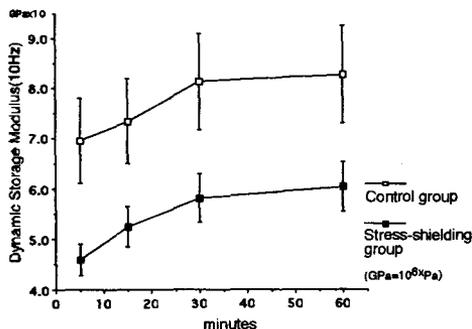


Figure 1

Dynamic storage modulus (10Hz)

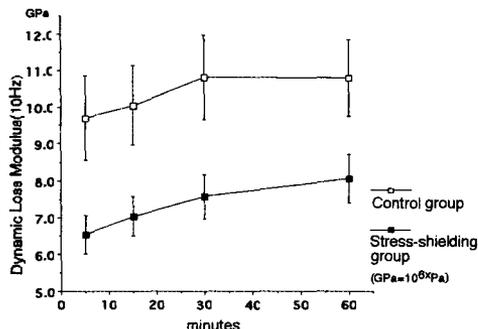


Figure 2

Dynamic loss modulus (10Hz)

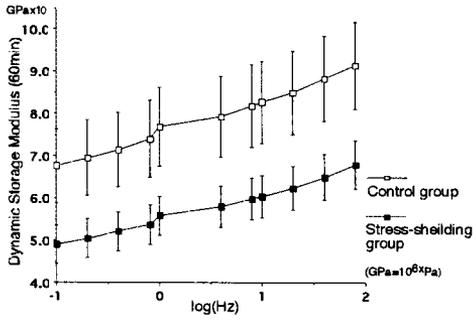


Figure 3

Dynamic storage modulus (60min)

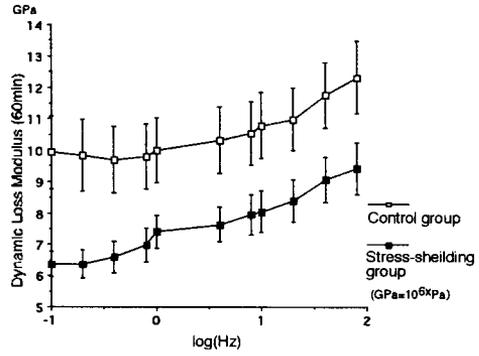


Figure 4

Dynamic loss modulus (60min)

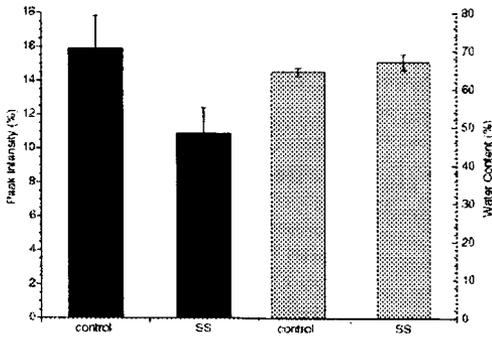


Figure 5

Peak intensity and Water content

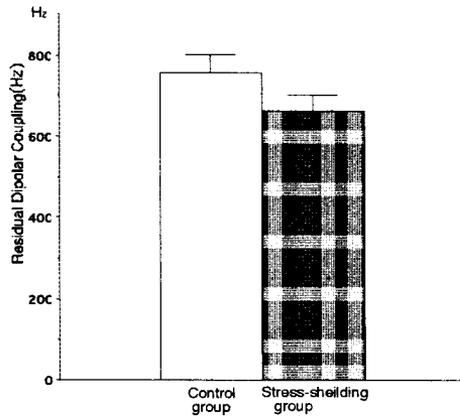


Figure 6

Residual dipolar coupling

ハルバッハ型永久磁石を用いたコンパクトMRマイクロ스코ープの開発

○拝師智之¹, 松田善正¹, 宇津沢慎², 山崎由香子¹, 巨瀬勝美¹,
中西昭男³, 岡田重益³, 津崎 剛³

筑波大学物理工学系¹, (株)エム・アール・テクノロジー², 住友特殊金属(株)³

Development of a compact MR microscope using a small permanent magnet

Tomoyuki HAISHI¹, Yoshimasa MATSUDA¹, Shin UTSUZAWA², Katsumi KOSE¹

Akio NAKANISHI³, Shigemasu OKADA³, Tsuyoshi TSUZAKI³

¹Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba-shi 305-8573

²MR Technology, 169-1 Kouya, Tsukuba-shi 300-2642

³Sumitomo Special Metal Co., LTD, Osaka

Recent developments of electronic devices and systems have enabled us to make compact MRI consoles (1). Thus if a small magnet for MR microscopy could be developed, a compact or desktop MR microscope can be constructed. For such a compact magnet, permanent magnets are the first choice because they require no cryostat and their stray fields are usually much smaller than those of superconducting magnets. Yokeless permanent magnets composed of segmented high-energy product magnetic materials (e.g. NdFeB magnets (2)) have been expected to present drastically compact magnets (4-5). In the present study, 1.0 T compact yokeless permanent magnets (30 cm cube or 20 cm cube) were developed and used for MR microscopes using a portable MRI console.

1. はじめに

数 mm³~数 cm³程度の小さな試料を撮像するためのコンパクトな MR マイクロスコープは、核磁気共鳴映像法が提案された 1970 年代初頭以来、その登場が渴望されていた。エレクトロニクスの進歩により磁石から独立した可搬型 MRI コンソール(80 kg)の開発が可能となり、1.5 T 臨床用 MRI の静磁場空間を利用して面内で(50 μ m)²の空間分解能を達成し⁽¹⁾, 低磁場 MR マイクロスコープの実用性を提示した。以降、システム全体の小型化を考える場合、1.0 T 程度の静磁場を発生するコンパクトな磁石の開発は急務であったが、Fe-Nd-B 系⁽²⁾の永久磁石材料を用いた磁気回路の出現により、設置面積が 1m²以下の MR マイクロスコープ(1.0 T, 1400 kg)が誕生した⁽³⁾。磁性材料の温度係数が比較的大きく(-1000 ppm/deg), 共鳴周波数が温度ドリフトする問題を有していたが、ナビゲータ・エコー法により解消した。

さらに、最近、ハルバッハ型と呼ばれるヨークレスな永久磁石磁気回路^(4,5)により、総重量を飛躍的に小型軽量化(1.0 T, ギャップ 60 mm で 210 kg, 従来比約 1/7)する方法が提案された。この磁気回路はスケラブル (任意のサイズで製作しても同一の静磁場を発生) であるため、さらに小さなサイズの磁石(1.0 T, ギャップ 40 mm, 85 kg)を製作することにより、デスクトップで使用できるような超小型で軽量の磁気回路の実現も可能である。そこで、本研究では、ギャップが 60 mm および 40 mm の 1.0 T ハルバッハ型永久磁石磁気回路を用いて、非常にコンパクトな MR マイクロスコープを開発した。また、撮像実験により性能評価を行ったので、その結果を報告する。

はいしともゆき, まつだよしまさ, うつざわしん, やまざきゆかこ, こせかつみ,
なかにしあきお, おかだしげます, つざきつよし
ハルバッハ, コンパクト, マイクロスコープ, 永久磁石, NMR ロック

2. MR マイクロスコープ

Fig.1に、開発したコンパクトMRマイクロスコープの全体像を示す。Fig.1(右側)は、ハルバッハ型のヨークレス永久磁石磁気回路(サイズ:36 cm×28 cm×32 cm, 総重量:210 kg, 共鳴周波数:約44 MHz, ポールピース直径およびギャップ:140/60 mm, 20 ppm over 20 mm dsv)である。磁場強度の温度係数が約0.1%/°Cであるため、木製台に磁石を設置してポリスチレン板(40 mm厚)で全体の断熱を行った。Fig.2に、開発したデスクトップMRマイクロスコープの全体像を示す。Fig.2(左側)は、ハルバッハ型のヨークレス永久磁石磁気回路(サイズ:27 cm×24 cm×18 cm, 総重量:85 kg, 共鳴周波数:約42 MHz, ポールピース直径およびギャップ:80/40 mm, 30 ppm over 12.8 mm dsv)である。

Fig.1(左側)およびFig.2(右側)は、両方のシステムに共通のMRIユニットである。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プログラムを制御するWindows-PC、(2)高周波変調・検波ユニット(周波数帯域35~65 MHz)であり、(3)3軸勾配磁場電源(±15 V, ±15 A)、そして(4)RFパワーアンプ(50W)である。このMRIユニットの高周波シンセサイザーには、共鳴周波数を補正する内部NMRロックをおこなうために、PCのISAバスに装着するDDSボード(FSW01, 10~200 MHz, 1 Hz精度, DST社製)を使用した。

Fig.3は、ギャップ60 mm用の平板型3軸勾配磁場コイルとソレノイド型RFコイルが一体となったプローブヘッドであり、z軸方向の最大幅は53 mmである。3軸勾配磁場コイルは、xおよびy軸に関しては並行4線コイル(20巻)、z軸に関してはMaxwellペアコイル(20巻)であり、ガラスFRP(2 mm厚)の上にx軸、y軸そしてz軸の順にエポキシ系接着剤で固定されている。x軸、y軸およびz軸の抵抗値R、インダクタンスLおよび効率 η は、それぞれ、(1.9 Ω , 1.9 Ω , 0.7 Ω), (214 μH , 212 μH , 66 μH), (3.1 G/cm/A, 3.0 G/cm/A, 2.6 G/cm/A)であった。また、RFプローブ部分(ソレノイド型、直径2 mmポリエチレン被覆銅線)はサンプル用試験管の外径に合わせて、内径が10, 12, または20 mmのものが選択できる。コイルには、2個の非磁性トリマキャパシタ(5-40pf)が接続されてタンクサーキットを構成しており、静磁場強度1 Tでのプロトン共鳴周波数(~42.58MHz)において、インピーダンスマッチング(50 Ω)を最適にすることができる。Fig.4は、同様に作成されたギャップ40 mm用の平板型3軸勾配磁場プローブヘッドであり、勾配コイルの効率は、x軸:3.1 G/cm/A, y軸:3.0 G/cm/A, z軸:2.6 G/cm/Aであった。Fig.5は、Fig.4の勾配磁場プローブの内部である。



Fig.1: The compact MR microscope (weight: 295 kg) using a 1.0 T Halbach magnet (size: 30 cm cube, weight: 210 kg, gap: 60 mm).

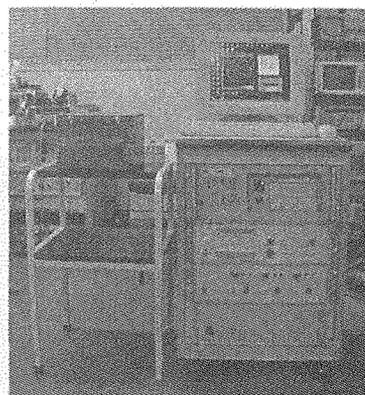


Fig.2: The desktop MR microscope (weight: 170 kg) using a 1.0 T Halbach magnet (size: 20 cm cube, weight: 85 kg, gap: 40 mm).

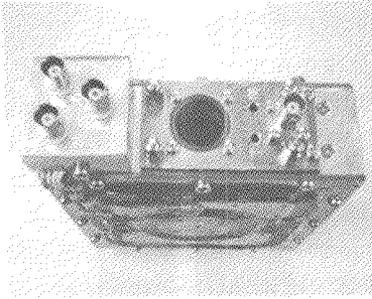


Fig.3: 3 axis gradient probe for 60 mm gap. Anderson type coils are used for x and y, Maxwell pair coils were used for z axis.

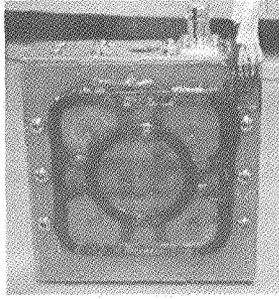


Fig.4: 3 axis gradient probe for 40 mm gap. Anderson type coils are used for x and y, Maxwell pair coils were used for z axis.

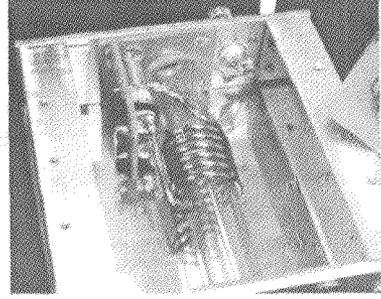


Fig.5: Inside of gradient probe. Solenoid coil (7 turns, 18 mm) was used for RF transmission / detection.

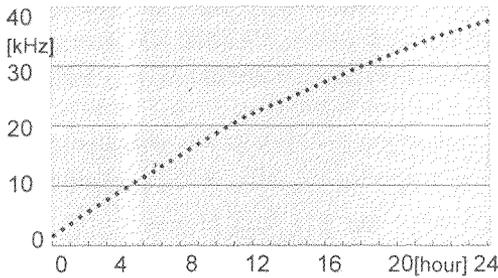


Fig.6: NMR frequency drift of 60 mm gap Halbach magnet with a heat insulation by foam slabs.

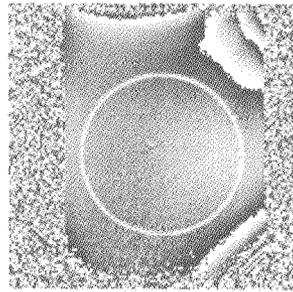


Fig.7: Phase map of a 2D cross section of a water phantom (18mm diameter cylindrical water). FOV: 25.6 mm x 25.6 mm.

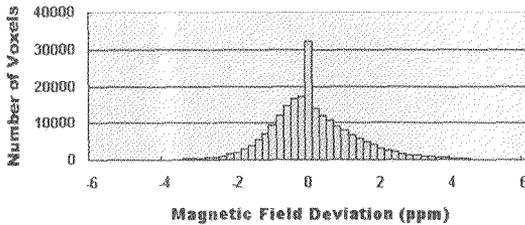


Fig.8: Magnetic field distribution in the central 15 mm dsv calculated using the 3D phase map.

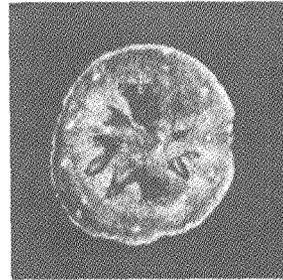


Fig.9: Cross sectional image of a berry acquired with 3D-SE: TR/TE = 100 / 8 ms, FOV = (15.36 mm)³, voxel size = (120 μm)³, NEX= 16.

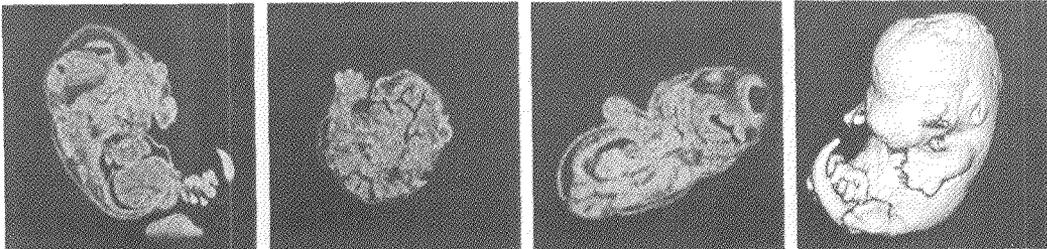


Fig.10: Cross sectional images and a surface rendered volume image of a mouse embryo fixed with preservation liquid. Imaging sequence: 3D-SE, TR/TE = 100 / 8 ms, FOV = (89.6 mm)³, voxel size = (70 μm)³, NEX = 24, Tacq = 12 hour.

3. 温度安定性

Fig.6 に、水ファントムの NMR 信号を内部ロックにより計測された、ハルバッハ型永久磁石磁気回路(ギャップ 60 mm)の共鳴周波数のドリフトを示す。このグラフより、1 時間の共鳴周波数ドリフトは最大約 1.5 kHz であることがわかり、約 30 分以内の撮像であれば中心周波数を補正しなくとも十分な周波数安定性であることがいえる。また、長時間の撮像実験では、ナビゲータ・エコー法による NMR ロックにより、撮像試料のスピンエコー信号から NMR 共鳴周波数および RF ユニットの周波数誤差を計測および補正して、周波数シフトを 20 Hz 以下に保つことが可能であった。

4. 均一領域

内径 18 mm の試験管底部に硫酸銅水溶液を充填した水ファントムの撮像実験により、ハルバッハ型永久磁石磁気回路(ギャップ 60 mm)の静磁場の均一性を測定する実験を行った。位相画像の計測のためにスピンエコー中心が 2 ms 異なる 2 種類の撮像パルスシーケンスを使用した。Fig.7 は、水ファントムの 3 次元位相画像の中心縦断層である。これは、 k -space におけるスピンエコーの中心が 2 ms (500 Hz) 異なる画像間の位相差を示した画像であり、位相差が $-180^\circ \sim +180^\circ$ の範囲をグレースケールで表示している。Fig.8 のヒストグラムは、Fig.7 の黄線で示される直系 15 mm 球内の 3 次元位相画像の voxel 強度分布を示したものであり、静磁場強度の均一度が 7 ppm 以下であることがわかる。この均一性は、1 画素あたりの空間周波数が約 200 Hz の 1 T の MR マイクロスコープとしては充分である。

5. 撮像実験

装置評価のために撮像実験をおこなった。40 mm ギャップ用サンプルは、直径約 11 mm のブルーベリーであり、パルスシーケンスは 3D-SE 法を用いた。撮像パラメータは、TR / TE = 100 / 12 ms, FOV=(15.36 mm)³, 画素サイズ=(120 μ m)³, 画素数は 128³, 信号加算回数 12 回であった。60 mm ギャップ用試料は、試験管の底部にホルマリン固定されたマウス胎児であり、パルスシーケンスは 3D-SE 法を用いた。撮像パラメータは、TR / TE = 100 / 12 ms, FOV=(89.6 mm)³, 画素サイズ=(70 μ m)³, 画素数は 128³, 信号加算回数 24 回であった。静磁場の温度ドリフトによる共鳴周波数の変動に対して、Navigator Echo 法は問題無く機能した。Fig.9-10 に、撮像実験結果を示す。このように、実用的な時間内で、(70 μ m)³ ~ (120 μ m)³ の画素サイズの画像を取得することが出来た。

6. 結語

1.0 T ハルバッハ型永久磁石を用いたコンパクトな MR マイクロスコープの開発をおこなった。断熱および NMR ロックを用いて静磁場強度の温度ドリフトを克服した。装置の評価のために撮像実験をおこなったところ、(70 μ m)³ ~ (120 μ m)³ の画素サイズの画像を実用的な時間内で取得した。以上より、開発した装置が大変有望であることを結論した。

<REFERENCES>

1. K. Kose, et al, 6th ISMRM proceedings, p.1924, 1998.
2. M. Sagawa, et al., J. Appl. Phys. 55, p.2083, 1984.
3. T. Haishi, et al, 7th ISMRM abstract book p.2035, 1999.
4. K. Halbach, the 8th International Workshop on Rare Earth Cobalt Permanent Magnets proceedings, p.123, 1985.
5. F. E. Bertora and M. G. Abele, Magnetic Resonance Imaging, vol. 10, pp. 809-813, 1992.

超偏極 ^{129}Xe ガス発生と多孔質微粒子共存下での ^{129}Xe -NMR スペクトル

(電子技術総合研究所) ○服部峰之、(阪大・医) 木村教臣
(大阪工業技術研究所) 平賀 隆、(阪大・医) 藤原英明

^{129}Xe -NMR Spectra of Hyperpolarized ^{129}Xe Gases in Porous Powders
Mineyuki Hattori¹, Atsuomi Kimura², Takashi Hiraga³ and Hideaki Fujiwara²
¹Supermolecular Science Division, Electrotechnical Laboratory
²School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University
³Department of Material Physics, Osaka National Research Institute

^{129}Xe -NMR spectra and spin-lattice relaxation times, T_1 , of hyperpolarized ^{129}Xe gas in porous powders were measured. The T_1 s of ^{129}Xe in porous powder suspension in H_2O and D_2O were 13.2sec and 59.4sec, respectively. This result suggests that relaxation of ^{129}Xe is dominated by dipolar-dipolar interaction between ^1H and ^{129}Xe . Hyperpolarization is maintained much longer by using deuterated solvents.

【序論】 ^3He , ^{129}Xe の核スピンの 1/2 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]。この超偏極ガスを用いた、ガス相のイメージングは、気体での ^3He , ^{129}Xe 緩和時間が長いため有望である[2]。しかし、これらのガス分子が他の物質と接触すると、その緩和確率は、急激に高まり偏極は消滅する[3]。本研究では、スペクトル、緩和時間の NMR 基礎データを収集し、凝集相における超偏極希ガスの利用技術確立の基礎とすることを目的とする。

【偏極装置】 Fig.1 に構成図を示す。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 200 μm ×1 μm)を $\lambda/4$ 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(1 μm)だけ拡大し入射した。磁場は縦型の分析用 NMR 装置の漏れ磁場を利用したので、垂直方向の 12mT 程度の磁場の位置に偏極セルを置いた。偏極セルは 120 $^\circ\text{C}$ の恒温槽内に置いた。セルはシリンダー状で外径 6cm 長さは 20cm である。Rb は約 0.2g を高真空 (10 $^{-6}$ Torr) 下で封入した。ガラスはパイレックスガラスを用いたが、今回は特に表面コーティングは行わなかった。Xe ガスは天然存在比そのままの組成で高純度品を用いた。He バッファガスを追加して数気圧以上に加圧し、偏極後に液体窒素トラップで偏極 Xe 氷を蓄積する方が、偏極度は向上する[4]。ここでは、ガラス装置の使用上の安全と操作の簡便性を優先してセル内が常時 1 気圧にできるようにした。シリンジ(S)が圧力バッファである、サンプル管(N)を一度真空引きし、セルから偏極 Xe を移した後、内部が減圧になった分がポンペから連続的に供給される仕組みである。1 バッチに、数十 cc の偏極 Xe を得ることができる。この装置で得られた、標準的な偏極率は、0.5~1%であった。

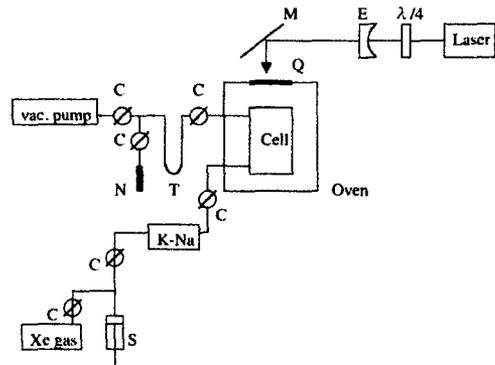


Fig.1 Schematic view of the apparatus for supplying polarized Xe gas.

E: expander of the laser beam (concave lens), M: reflecting mirror, Q: quartz window of the oven, C: stopcock, T: trap cooled by ice, N: NMR tube (10mm ϕ), S: plastic syringe (50ml).

キーワード: ^{129}Xe 、超偏極、光ポンピング、多孔質微粒子

はっとりみねゆき、きむらあつおみ、ひらがたかし、ふじわらひであき

【¹²⁹Xe-NMR】

試料調整：ガラクトース微粒子(Powder)または、PFOB を試料管にいれ、偏極ガス発生装置のマニホールドに接続し空気をポンプで除いた後、超偏極 Xe ガスを導入した。これをおぼして蓋をして NMR 測定を行った。さらに、H₂O および、D₂O を加えた後、分散させたものについても、スペクトル取得、緩和時間測定を行った。Powder 分散の濃度は、1g/mlになるようにした。

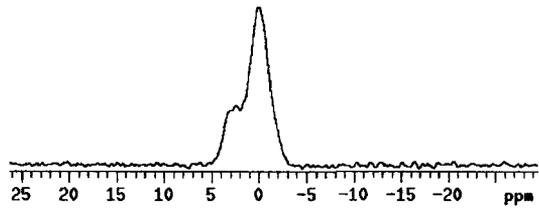


Fig. 2 Spectrum of powder with hyperpolarized Xe.

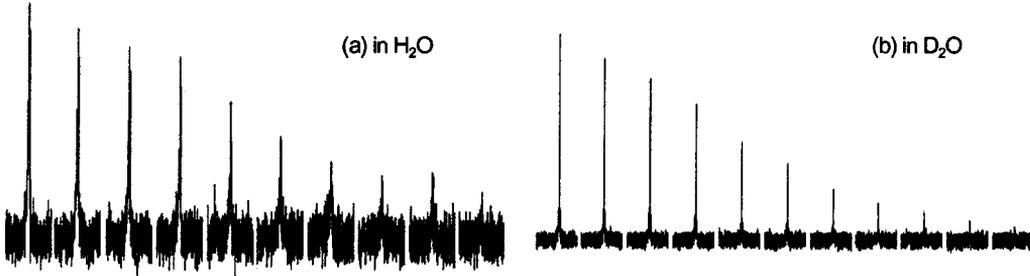


Fig. 3 NMR signal relaxation of hyperpolarized Xe in suspension of porous powder.

NMR 測定：¹²⁹Xe-NMR の測定は、Varian 社製 INOVA400WB 装置で行った。プローブは、10mm 管用広帯域測定周波数は 110MHz、温度は室温 (25°C) である。Fig.2 に微粒子、Xe ガスの共存化でのスペクトルを示す。ガス相からの強いピークの高周波数側に多孔質中に侵入したガスからのものと考えられる肩を観測した。また、Fig.3(a)に H₂O、(b)に D₂O へ分散した多孔質微粒子での ¹²⁹Xe の信号強度の時間変化を示す。信号強度は、明らかに D₂O 分散中の方が強い。Fig.3 (a),(b)の測定条件は、フリップ角 $\alpha=15^\circ$, $TR=30$ 秒である。ここで、 α は予稿集 2L3 の方法で決定した。また、縦緩和時間は、

$$T_1 = TR / [\ln(\cos\alpha) - \Delta \times TR]$$

の式から計算した。ここで、 Δ は、 $\ln(\text{intensity})$ を $(n-1)TR$ に対してプロットした傾きである。Table 1 に緩和時間測定値を示す。

Table 1 : T_1 of hyperpolarized ¹²⁹Xe in suspension

Suspension	T_1 (sec)	Suspension	T_1 (sec)
Powder (in H ₂ O)	13.2	Powder (in D ₂ O)	59.4
PFOB (in H ₂ O)	17.4		

【まとめ】超偏極 ¹²⁹Xe を偏極装置から多孔質微粒子をいれた試料管に移し、共存下での、また、これに軽水、重水の媒質を加えた微粒子分散系についての NMR スペクトルの取得と緩和時間測定を行った。多孔質微粒子中に侵入した Xe ガスの核磁気緩和時間は、分散媒が重水の方が軽水の場合より 4 倍程度長く、¹²⁹Xe の緩和が ¹H との双極子-双極子緩和機構によっていることを示唆する[5]。分散媒に重水を利用することで、多孔質微粒子中に封じ込められた、¹²⁹Xe の超偏極状態の持続時間を延長できることがわかった。

【参考文献】

- [1] T. G. Walker and W. Happer, Rev. Mod. Phys. 69, 629-642 (1997).
- [2] 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).
- [3] K. Sakai, A. M. Bilek, E. Oteiza, R. L. Walsworth, D. Balamore, F. A. Jolesz, and M. S. Albert, J. Magn. Reson., B111, 300-304 (1996).
- [4] B. Driehuys, G. D. Cates, E. Miron, K. Sauer, and W. Happer, Appl. Phys. Lett. 69, 1668 (1996).
- [5] I. E. Dimitrov, R. Reddy, and J. S. Leigh, J. Magn. Reson., 145, 302 (2000).

植物細胞における水の移動速度と温度の関係

(食総研¹、生物研²)○小泉美香¹、石田信昭¹、狩野広美²Effect of temperature on the transport rate of cell-associated water
measured by MRI⁽¹National Food Research Institute and ²National Institute of Agrobiological Resources)M. Koizumi¹, N. Ishida¹ and H. Kano²

Since transport of cell-associated water is a biological process mediated by water channel, measurement of the transport rate of cell-associated water provides useful information for insight the physiological function of plant tissues. The transport rate of water in bulbs of a geophytes was measured as self diffusion coefficient by pulsed gradient spin-echo method at various temperatures. Diffusion coefficient of pure water increased linearly between 5 °C and 55 °C. The diffusion coefficients in bulbs were low compared with pure water. The diffusion coefficient of outer scaly leaves increased linearly up to 45 °C followed by a slight decrease at 55 °C, while that in inner scaly leaves rapidly increased between 5 °C and 15 °C, and maintained afterwards in the bulb just before shooting. The effect of temperature on the transport rate of cell-associated water in the bulbs at different stages of growth will be reported.

これまで植物における水の移動は、単純な水ポテンシャルの差によって起こると考えられていたが、最近の分子生物学の進展により、動物細胞の場合と同様に、植物細胞の水は **water channel** を通して移動し、その移動は生体エネルギーを利用した生物学的過程によって制御されていると考えられるようになった。また、細胞の水は代謝のマトリックスであり、細胞の機能は水の移動によって強く制御される面を持っている。そのため、細胞の水の移動速度の計測は、異なる遺伝的形質を持つ組織、もしくは、新たに形質を導入された組織の機能を検討する上で、きわめて重要な意味を持つようになった。そこで、本発表では **geophytes** である鱗茎植物を用い、組織の生理的状態が変化して水の移動性が異なると考えられる生育ステージを選び、物理的ファクターとして温度をコントロールしながら、細胞の水の見かけの拡散係数（細胞においては生理作用に伴う水の移動であると考えられる）の変化を計測した。組織の生理状態の解析のために、マイクロコンピュータの Excel と NIH Image の機能を利用して、複数の拡散係数イメージ間の演算、および表示を行った。

キーワード：細胞の水、拡散計測、イメージング、温度変化

こいずみみか、いしだのぶあき、かのひろみ

<材料と方法>

植物： Geophytes であるツルボ(*Scilla scilloides*)は、つくば市農林研究団地内の構内において採取し、測定に用いた。ツルボは4月初旬に出芽して6月下旬までに葉を展開し、7月になると夏季休眠に入る。そして、8月下旬に再び出芽して花をつけ葉を展開し、12月初旬に冬季休眠に入るという生活環を繰り返す。

イメージの計測とイメージ間演算処理： ミクロNMRイメージング装置により、プローブ温度を5~55℃の間で変化させてパルス磁場勾配スピンエコー法で拡散強調イメージを測定した。3次元イメージは、スピンエコー法およびグラディエントエコー法によって測定した。

イメージデータをマイクロコンピュータに転送した後、visual BASIC で書いたプログラムによって単整数型データに変換し、Excel に読み込み可能なファイルを作ったあとでNIH Image で表示した。イメージ間データ演算は、Excel によって行い、その結果も NIH Image で表示した。

<結果および考察>

水のファントムでは、5℃から55℃において拡散係数は直線的な変化を示した(Fig. 2d, e; 1)。また、二重管中に入れた水では、ガラス管壁の影響が強く現れた。

一方、geophytes の鱗葉の水の移動速度は水に比べて低く、水のファントムとは異なる変化を示した(Fig. 2d, e; 2 and 3)。また、試料を採取する時期においてそれぞれ異なる挙動を示した。

Fig.1 はツルボの鱗茎の形態を示すイメージである。試料を8月15日に採取して測定したもので、夏季休眠より覚めて花芽が形成され、出芽直前の状態である。

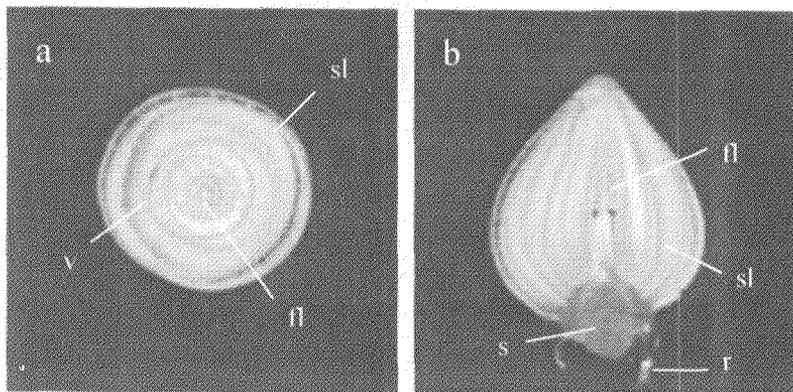


Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ images of the bulb of a *S. scilloides* indicating morphology. Images were measured by the spin-echo 2D-FT method with T_R , 300 ms and T_E , 10 ms. a; transverse section and b; longitudinal section. sl; scaly leaf, fl; flower bud, v; vascular bundle, r; root, s; scutellum.

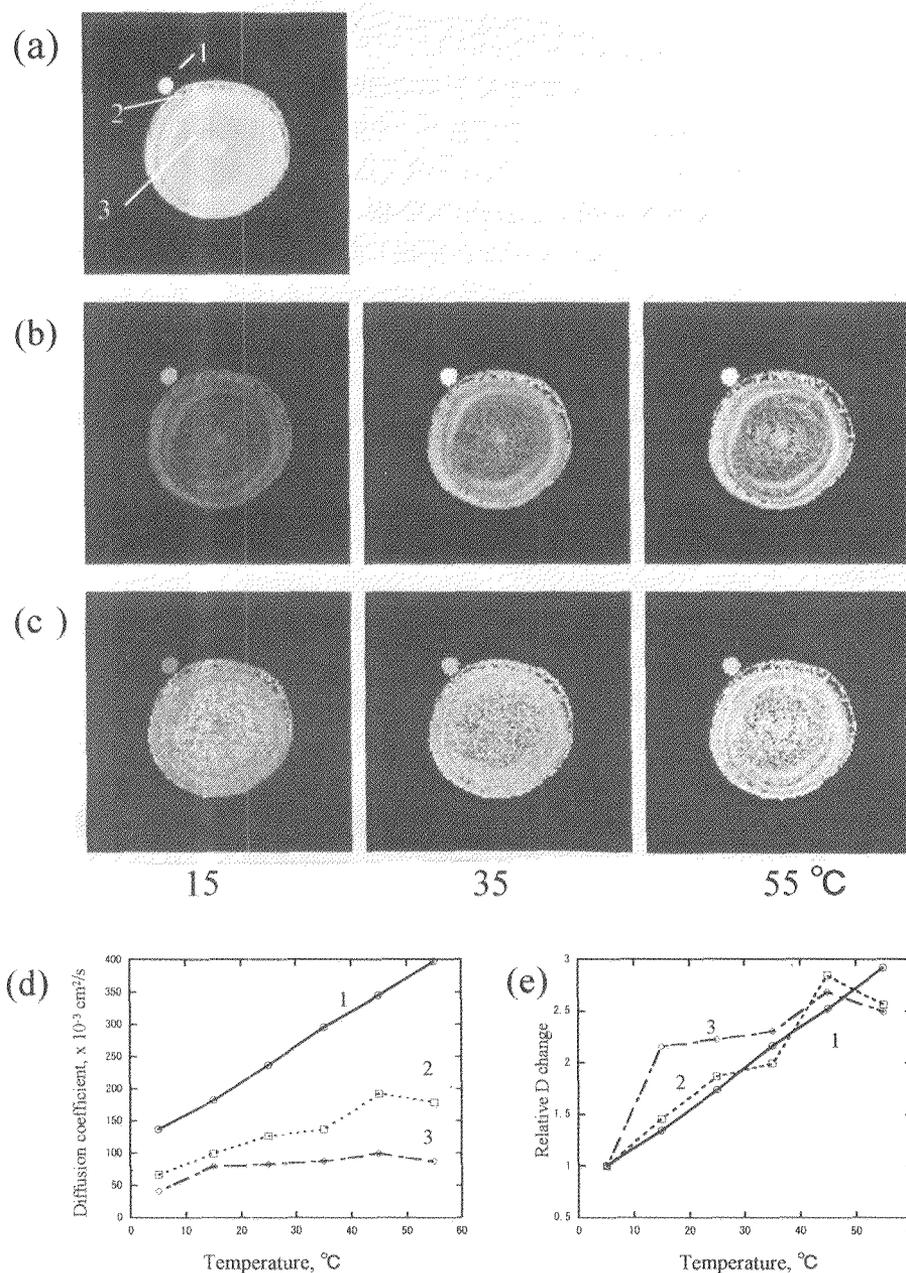


Fig. 2 An $^1\text{H-NMR}$ image (a), and diffusion coefficient images (b) and calculated increase rates of the diffusion coefficient (c) at various temperatures. The changes of diffusion coefficient (d) and the increase rate of the diffusion coefficient (e) are plotted for the positions indicated by arrows (1; H_2O , 2; an outer scaly leaf and 3; an inner scaly leaf). The diffusion coefficient image at 5°C is used as a reference.

Fig.2 は Fig. 1 と同じ時期のツルボ鱗茎の横断面のイメージ(a)と、15, 35, 55 °Cの拡散係数イメージ(b)、および、各拡散係数イメージを 5°Cの拡散係数イメージで割ったイメージ(c)である。¹H-NMR イメージ(Fig. 2a)はほぼ自由水量の分布を表し、この時期の鱗茎では外側の鱗葉に自由水が多く、維管束を確認することができた。拡散係数イメージ(Fig. 2b)は、自由水の多い外から3枚目までの鱗葉と芽の組織でイメージ強度が高く、内側の鱗葉の拡散係数は低かった。拡散係数の増加割合(Fig. 2c, e)は、自由水の多い鱗葉(Fig. 2a, 矢印2)では水のファントムと同様な増加を45 °Cまで保ったが、55 °Cにおいては増加割合の低下を示した。一方、内側の鱗葉(Fig. 2a, 矢印3)は、5 °Cから15 °Cの間で増加割合が高く、その後、著しい増加は示さなかった(Fig. 2c, e)。

植物細胞の生理活性の指標である呼吸速度の温度変化と比較検討した結果、外側の鱗葉の水の拡散係数は呼吸活性と強い相関を持つものと考えられる。

拡散速度の温度変化を拡散率に対するシグナルのヒストグラムで検討すると、休眠直前の鱗茎では、ほとんどの水が内側の鱗葉と同様な性質を持っているであろうと推定される。

文献：

Hills, B. (1998) *MRI and food processing*. pp.76-101. John Wiley & Sons, Inc. NewYork.

Stejskal, E.P. & Tanner, J.E. (1965) *J. Chem. Phys.* **42**: 288-292.

小島清嗣、岡本洋一編(1997)まるごと実践!画像解析テキスト NIHImage 新講座. 羊土社

焼成パンのネットワークの造影とレンダリング

(¹食総研、¹生物研、¹筑波大物工) ○石田信昭¹、高野博幸¹、五十部誠一郎¹、植村邦彦¹、小泉美香¹、狩野広美¹、拝師智之¹、巨瀬勝美¹

Visualization of gluten network of bread

Nobuaki Ishida¹, Hiroyuki Takano¹, Seitiro Isobe¹, Kunihiro Uemura¹,
Hiromi Kano², Tomoyuki Haishi³ and Katsumi Kose³

¹National Food Research Institute, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8642, Japan

²National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8602, Japan.

³Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8573, Japan

The architecture of the networks of baked breads composed of gluten fibers which runs through in complex manner in a space, is one of the major elements to determine the quality of the bread. In the current study, a simple method was devised to study the 3D structure of the breads using MRM (Magnetic Resonance Microscopy). Since the water content was too low to obtain a clear contrast of the bread structure, a piece of the bread was soaked in acetone containing a heavy metal ion. The heavy metals had the effects shortening the relaxation time of the solvent and staining the networks of the bread. The characteristics of the baked breads using a frozen dough were compared with those using a dough made by the ordinary processing method.

パンの網目構造はパンの品質にとって重要な要素である。これまで網目構造の評価は切断面の光学的観察により行われてきた。さらに、ネットワークの3次元立体構造を構築するためには、染色して包埋した試料から多数の切片を作り撮影した画像をコンピュータ上で再構築する必要がある。MRM(Magnetic Resonance Microscope)は非破壊で対象の3次元構造を測定することができ、パンの網目を3次元的な構造として評価できる新しい手法を与えると期待される。しかし、焼成後のパンは水分が少ないため、そのままではきれいなネットワーク構造のイメージを得ることは難しい。そこで、パンを構造を保ったままプロ

キーワード：MRM、パン、volume rendering、MIP、造影剤、

著者：いしだのぶあき、たかのひろゆき、いそべせいしろう、うえむらくにひこ、
こいずみみか、かのひろみ、はいしともゆき、こせかつみ

トンの豊富な溶媒に浸漬し、溶液のイメージを取ることで、パンの立体的な構造を影として測定する手法の開発を行った。

【材料及び方法】

パン：焼成したパンを約16mmの立方体に切り出して試料とした。

測定試料の調製：径24mmの試験管を用い、常磁性の重金属塩を含む溶媒(アセトン)にパンを浸漬して脱気後、試料とした。

MRMイメージの測定：300MHz高分解能NMRに装着したイメージング装置で径25mmのイメージングプローブを用いて、spin-echo法により測定した。測定は256 x 256 x 256のマトリックスで行った。イメージの平面分解能は0.1mmである。

3次元データはマイクロコンピュータに転送し、自作のVisual Basic上のソフトにより再配列した後、FTを用いたファイルサイズ変換ソフト、及びsurface renderingとmaximum intensity projection(MIP)ソフト((株)エム・アール・テクノロジー)によりイメージを作成した。

【結果及び考察】

パンの浸漬のために検討した溶媒の性質を表1に示す。メタノール、エタノールは複数のシグナルがあるためイメージにケミカルシフト効果出てシャープなイメージが得られない恐れがあった。また、エーテル、クロロホルムは重金属塩の溶解性に問題があった。この点で、アセトンはもっとも効果的な溶媒であったが、縦緩和時間(T_1)が5sと長いので3D測定のためにはきわめて長い時間が必要であることが問題となった。そこで測定時間を実用的範囲に収めるとともに、パンのネットワークを染色しイメージを明瞭にするために、重金属塩の利用を検討した。 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Gd^{3+} 、 Dy^{3+} の塩化物はアセトンにほとんど溶解しなかった。アセトンに溶解性を示した Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} の中で、アセトンの T_1 短縮とパンの造影効果に Fe^{2+} がもっとも適していた。

図1に8mMの Fe^{2+} を溶解したアセトンに浸漬したパンの2Dイメージを示す。通常の製法で2回発酵を行った生地によるパン(左)はグルテンの細かいネットワークが発達し、小さな気泡がたくさんできている様子がイメージ化されていた。パン表面の皮は薄く、皮下に細かい気泡が詰まった構造をしている。常時焼きたてパンを供給するために開発された凍結生地を使い傷害(なし肌)を生じたパン(右)では、気泡が大きくグルテンネットワークも厚いことがわかる。また、パン表面の皮は厚く、皮の所々に比較的大きな気泡による盛り上がりがありこれがなし肌と呼ばれる斑点となっていると考えられた。

3Dデータからパンの一部を薄く切り出し、surface renderingしたのが図2である。通常のパン(左)では細かく発達したネットワークに囲まれた気泡構造を持つが、なし肌パン(右)では厚いネットワーク中に気泡が点在する構造となっている。そして、通常のパンはスムーズな表面構造を持つのに対し、なし肌パンの表面はでこぼこであるのがよく捉えられた。さらに、MIPによるネットワーク構造の効果的な可視化について検討する。

【文献】柴田村治：錯体化学入門、共立出版、1970

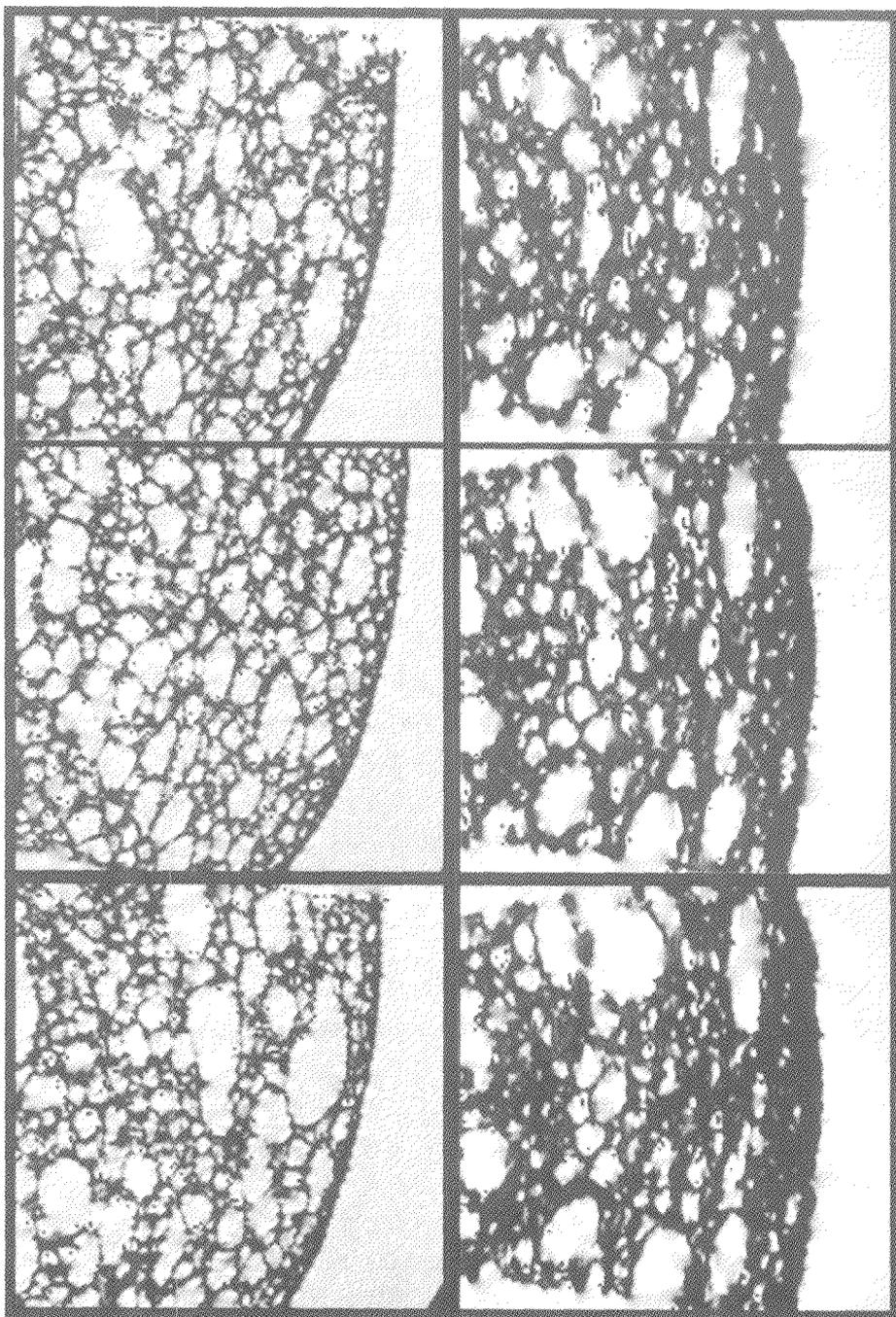


Fig. 1 2D images of baked breads soaked in acetone containing Fe^{3+} ion.
left: the bread made by ordinary processing method (normal bread)
right: the bread using frozen dough

Table 1 Properties of solvents

	Penetration	Number of peaks	solubility of metals
Acetone	good	1	○
Methanol	good	2	○
Ethanol	good	3 *	○
Ether	good	1	×
Chloroform	good	1	×
Water	solubilized	1	◎

*with coupling

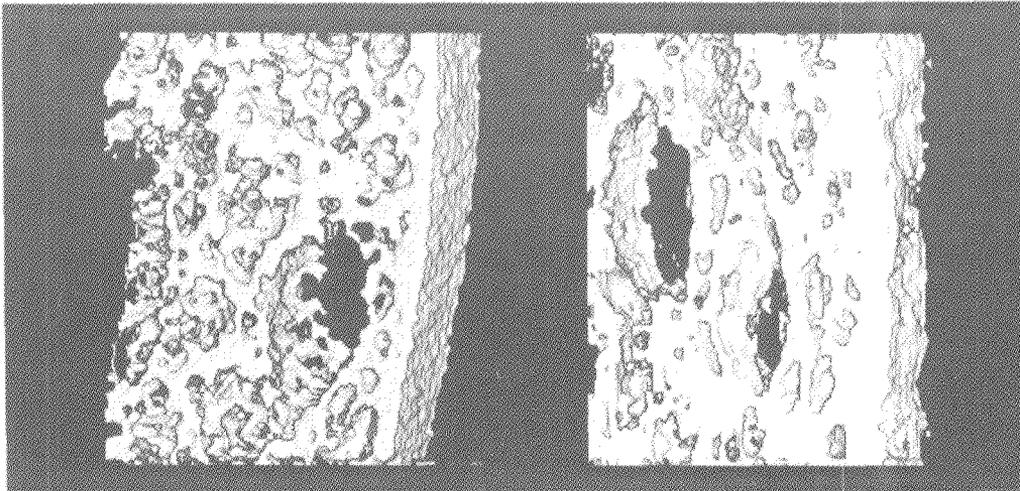


Fig. 2 3D Surface rendering images of normal bread (left) and the bread made by frozen dough (right)

MRI 用ポリゴン表示 Viewer の開発

○佐々木英典、橋本誠太郎、拝師智之、巨瀬勝美（筑波大学物理工学系）

Development of a fast 3D MR image viewer**by definition of the surface area as a set of polygons**○SASAKI Hidenori, HASHIMOTO Seitaro, HAISHI Tomoyuki, KOSE Katsumi
(Institute of Applied Physics, University of Tsukuba)

A fast 3D MR image viewer, in which surface area is defined as a set of polygons, has been developed. At first, the location of the surface was extracted from a set of volume data through a threshold operation. The polygons which constitute the surface were generated using the "marching-cube" algorithm. The coordinate data of the polygons were transferred through Direct3D functions to the graphic card of the PC. For a typical 3D volume data with 128^3 voxels, it took about 12 sec to generate the polygon data set and the image refresh-rate on the display was 8.3 fps. It was concluded that the developed 3D MR image viewer is a useful tool to understand the 3D structure of volume data.

【序論】

近年の MRI 撮像の高速化に伴い、汎用性の高い 3 次元データの表示、解析手法の開発が望まれている。従来、3 次元撮像されたボリュームデータの表示は、ボクセルデータの各点からのスクリーン上の点への寄与を合計することにより得られていた。この方法は、視点の位置を変更したときに、ボクセルデータから再計算する必要があった。本研究では、ボリュームデータの等値面をポリゴンにして、それを表示することにより、視点の位置を変えたときの再計算を高速にし、リアルタイムにあらゆる角度から等値面を見ることができる PC 用 Viewer の開発を行った。

【装置】

プログラムの開発を行った PC のハードウェア仕様を以下に示す。CPU は PentiumIII /600MHz、メモリは PC133 仕様 SDRAM128Mbytes、ビデオチップは GeForce256、ビデオメモリは 32Mbytes であった。OS には MicrosoftWindows2000 を搭載し、C コンパイラには MicrosoftVisualC/C++6.0 を使用した。グラフィックライブラリおよび入力デバイスのインターフェースライブラリとして、MicrosoftDirectX7.0a SDK を使用した。

【方法】

キーワード マーチングキューブ法 サーフェスレンダリング法

ささき ひでのり、はしもと せいたろう、はいし ともゆき、こせ かつみ

ボリュームデータをポリゴン化するために、四面体分割によるマーチングキューブ法を用いた。ポリゴン化された3次元データは、Direct3D 関数によって Geforce256 のジオメトリパイプラインに渡され、高速に座標変換および照明され表示される。また、この Viewer では、ユーザーインターフェースのひとつとして、従来の回転軸つきマウスに加え、ジョイスティックも利用できるようにした。これにより、三軸の回転および距離の変更が簡単にできるようになった。

【四面体分割のマーチング・キューブ法】

ボクセルデータのある点を格子点とした立方体を、頂点が立方体の頂点を含む5つの四面体に分割し、4つの頂点の内の閾値より上の点の数により、四面体を5つに場合分けしておおの場合について内部のポリゴンを作成する手順を規定する。それぞれの四面体の内部にポリゴンを作成することにより等値面全体をポリゴン化する。

【試料】

開発をしたポリゴン Viewer の評価を行うために、マウス胎児の3次元データを使用した。撮像シーケンスは、3D-SE であり、TR/TE=100/8ms、FOV は(8.96mm)³、画像サイズは(70 μ m)³、画素数は128³、信号積算回数は24回であった。

【結果】

レンダリング画像を Fig.1 に示す。ポリゴンの作成時間は11.9sec であり、レンダリング画像をリアルタイムに回転・表示することが可能である。表示時間は8.3frame/sec、ポリゴンの描画速度は261万 tri/sec であった。以上の結果から、マーチング・キューブ法によるポリゴン表示法が、サーフェスをあらゆる角度から解析する目的に、非常に効果的であることを結論した。

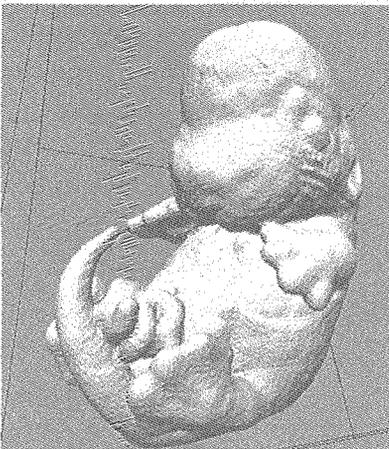


Fig.1

参考文献

三次元 CG の基礎と応用 千葉則茂 土井章男 共著 サイエンス社
DirectX7 実践プログラミング 工学社

MR マイクロスコープ用勾配磁場プローブの開発

○山崎由香子, 拝師智之, 松田善正, 巨瀬勝美(筑波大学物理工学系)



Development of a gradient probe for MR Microscope using a 1.0 T Permanent Magnet

Yukako Yamazaki, Tomoyuki Haishi, Yoshimasa Matsuda, Katsumi Kose

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8573, JAPAN

The technique to make thin gradient coil sets for a desktop MR microscope has been developed. By using this technique, a three-axis gradient probe was constructed for a 1.0 T Halbach-type yokeless permanent magnet with the 40 mm gap (85 kg). Imaging experiments demonstrated that samples with about 12 mm diameter could be imaged at around 100 microns cube voxel volume less than 2 hours.

1. はじめに

もし小さなサンプル (1cm^3) のための小さな磁石が開発されたら, 机上で手軽に使ったり, 持ち運んで使用できる夢の MR マイクロスコープが実現する. このような磁石としては, 永久磁石以外の選択はありえない. ところが, 従来型の磁気回路方式では, 1T で 60mm のギャップを有する磁石は, Fe-Nd-B 系の永久磁石材料を用いても, 1 トン以上の重量を有し, 上記のような小型軽量磁石の実現は不可能であった(1).

ところが, ハルバッハ型と呼ばれるヨークを有しない永久磁石回路(2)を, Fe-Nd-B 系の永久磁石材料を用いて構築することにより, 飛躍的に小型軽量化 (1.0T, ギャップ 60mm で 210kg, 従来比約 1/7) することが可能である(3). また, この磁気回路は, スケーラブル (任意のサイズで製作しても同一の静磁場を発生) であるため, さらに小さなサイズの磁石を製作することにより, 卓上で使用できるような, 小型軽量磁石が実現可能である.

このような小型の磁石に対しては, 静磁場空間が非常に狭くなるため, 非常に限られた厚みで 3 軸の勾配コイルを製作する必要がある. そこで, 本研究では, 薄型勾配コイルを製作する手法を開発し, 40mm のギャップに挿入可能な勾配磁場プローブを製作し, 性能評価を行ったので, その結果を報告する.

2. 薄型勾配磁場コイルプローブの製作

Fig.1 に本研究で開発した, RF コイルと勾配磁場コイルが一体となった勾配磁場プローブを示す. サイズは, 98mm(W)×100mm(H)×38mm(D)である. 勾配磁場コイルは, x および y に関しては, Anderson 型 (平行 4 線型), z 軸に関しては, Maxwell ペアである.

これらのコイルは, 厚さ 0.5mm の FRP 板をコイルの芯とし, これを厚さ 6mm のテフロン板で挟んでビスで固定して銅線のガイドとし, 直径 0.5mm のポリエチレン被覆銅線を 1 層巻きして製作した. コイルは巻き枠に巻いた状態で瞬間接着剤で固定し, テフロン板のガイドをはずすことにより, 厚さ 0.5mm の薄型平面コイルを得た. Gx と Gy コイルは, それぞれ 4 枚の矩形のコイルを貼り合わせて製作し, Gz には 2 枚の円形のコイルを使用した.

このプローブでは, 幅 30mm のアルミチャンネルをフレームとし, 厚さ 0.2mm の銅板を側板として RF シールドボックスを形成し, 側板の上に厚さ 1mm の FRP をビスで固定し,

キーワード MRI, MR マイクロスコープ, 永久磁石回路, 勾配コイル, 勾配磁場プローブ
やまざきゆかこ, はいしともゆき, まつだよしまさ, こせかつみ

その FRP 板の上に, 上記の勾配コイルを接着して固定した. そして, シールドボックスの中央に, 内径 12.5mm, 外径 16mm のアクリルパイプを固定し, そのパイプの上に, ソレノイドコイル (直径 18mm, 7 ターン) を巻いた. このコイルと 2 個の非磁性トリマコンデンサ (Voltronics 製) を用いて, 並列共振回路によるマッチング回路を生成し, 共鳴周波数 (約 42MHz) において 50Ω にマッチングをとった.

3. 撮像実験による評価

上記の勾配磁場プローブの評価のための実験を行った. Fig.2 に, 実験に用いたデスクトップ型 MR マイクロスコープの全体像を示す. Fig.2 の右側に示すのは, ポータブル型の MRI コンソール (重量約 80kg) であり, 左側に示すのが, ハルバッハ型の永久磁石磁気回路 (1.0T, 住友特殊金属製, サイズ: 27cm(W)×18cm(H)×24cm(D), 重量 85kg) である. この磁石のギャップは 40mm であるため, 上記の勾配コイルプローブは, この空隙に問題なく挿入できた.

球状の水ファントムの撮像により, 勾配磁場発生効率を, $G_x: 3.1\text{G/cm/A}$, $G_y: 3.0\text{G/cm/A}$, $G_z: 2.6\text{G/cm/A}$ と評価した. Fig.3 に, 本勾配磁場プローブで撮像した blue berry の画像を示す. このように, 直径 1cm 程度のサンプルの撮像が可能である.

4. むすび

薄型の勾配コイルを製作する手法を開発し, 片側で厚さ 3mm 以下, 両側で厚さ 5mm 以下の 3 軸勾配コイルを製作した. そして, 40mm の磁石空隙に挿入できる勾配磁場プローブを製作し, 撮像実験により, 直径 12mm 程度のサンプルの撮像が可能であることを示した.

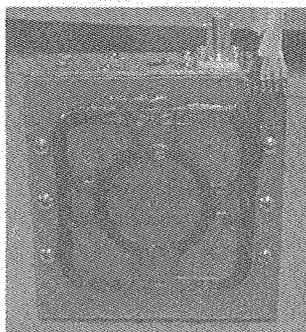


Fig.1: Gradient probe for the desktop MR microscope. The size is 98 mm x 100 mm x 38 mm. Anderson type coils are used for x and y axis, Maxwell pair coils are used for z axis.



Fig.2: Desktop MR microscope using a 1.0 T Halbach permanent magnet (size: 27 cm x 24 cm x 18 cm, weight: 85 kg, gap: 40 mm). The total weight is about 170 kg.

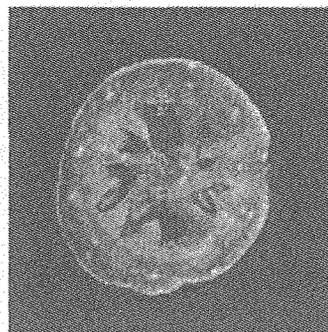


Fig.3: Cross sectional image of the blue berry, acquired with a 3D-SE (TR/TE = 100/12). FOV: $(15.36\text{ mm})^3$, Image matrix: 128^3 , matrix size: $(120\text{ }\mu\text{m})^3$, NEX: 16.

<参考文献>

- 1) T. Haishi, et al, 7th ISMRM proceedings, pp. 2035, 1999.
- 2). K. Halbach, Proceedings of the 8th International Workshop on Rare Earth Cobalt Permanent Magnets, p.123, 1985.
- 3) 拝師智之・他, 第 4 回 NMR マイクロイメージング研究会講演要旨集, 2000.

産業用MRIの開発

(筑波大学物理工学系) ○秋田裕介, 拝師智之, 松田善正, 巨瀬勝美
Development of the MRI system for on-line selection of female salmon

Yusuke Akita, Tomoyuki Haishi, Yoshimasa Matsuda, and Katsumi Kose

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

The MRI system for on-line selection of female salmon has been designed. The system uses a 0.2 T C-shape permanent magnet and flat RF coil to continuously and rapidly feed salmon to the measurement area. Preliminary experiments were performed to measure the SNR of salmon tissue at 0.3 T. As a result, it is concluded that the SNR of salmon at 0.2 T will be enough for selection of female salmon even at the speed of one per second.

1. はじめに

広く普及している臨床用MRI(国内約4,000台)に対して、「産業用MRI」という言葉がしばしば使われる。ところが、この言葉の定義は曖昧で、実験室で試験用サンプルの評価に使われるものから、実際に工場などでオンラインで使用されるものまで広く含んでいる。

さて、オンラインMRI(OMRI)が成功するためには、①MRIで検査が可能か、②検査用MRIが技術的に構築可能か、③検査コストが回収できるか、という三つの条件をクリアする必要がある。これらの条件は、必ずしも独立したものでなく、また、技術の進歩とともに、適否の状況も変化していくものである。

我々は、コンパクトでポータブルなMRIコンソールと、永久磁石磁気回路を組み合わせることにより、さまざまなタイプのMRIを構築できることを示してきた(1)が、このアプローチにより、OMRIに対しても、新たな展開が見出せるものと考えている。本研究では、(財)いわて産業振興センターより依頼のあった「鮭の雌雄判別用MRI」に関して、システム設計を行い、実験を進めているので、その結果を報告する。

2. システム設計

<システムに対する要求>

鮭雌雄判別用MRIの仕様として、「毎秒1匹以上」の検査速度が要求されている。これは、水揚げされた直後の1,000匹程度の鮭を、雌雄、重量、大きさなどで迅速に分別して冷蔵する必要があるためである。このため、撮像に(超)高速撮像法を用いる必要があるばかりでなく、静磁場中で核磁化が生成するまでの時間(T_1 が1秒程度であるため1秒は必要)を確保しなければならない。また、鮭を撮像領域に連続的に供給するための搬送ラインの速度を、合理的な範囲に抑える必要がある。検出感を確保する必要があるのは当然であるが、検査コストを抑えるため、出来る限り低コストのシステムを構築することも必要である。

MRI, 産業用MRI, 永久磁石磁気回路, オンラインMRI

あきた ゆうすけ, はいし ともゆき, まつだ よしまさ, こせ かつみ

<システム仕様>

Fig.1 にシステムの概念図を示す。このように、鮭の搬送スピードと磁石のコストを抑えるために、鮭の頭尾と垂直な方向に鮭を搬送し、さらに鮭の腹部の一部のみを観測するために、静磁場強度 0.2T の C 型の永久磁石回路を用いた。これにより、鮭の置かれた間隔を 20cm とすると、鮭の搬送速度は (平均) 20cm/s 程度であり、磁石のポールピースの直径が約 50cm であるため、鮭が磁石中央の撮像部位に到達するまでに、1 秒以上の核磁化生成時間を確保することができる。なお、永久磁石回路の仕様は、ギャップ 250mm, 50ppm 均一領域 150mm 球, 静磁場強度 0.2T, 重量 1,250kg である。

撮像には、繰り返し時間 25ms, エコー時間 10ms の勾配エコー法を用い、 32×64 画素の画像を、1 秒毎にリアルタイムに撮像・画像表示する (2)。このための勾配磁場強度としては、0.5G/cm が必要であり、立ち上げ時間は 1ms 程度が必要である。

RF コイルは、上下に分割したフラットコイルを使用しており、鮭の搬送の障害にならないような設計となっている。

また、撮像に使用する MRI 撮像システムは、当研究室で開発したコンパクト・ポータブル型の MRI コンソールと同等のものであるが、勾配磁場電源と高周波送信機を強化している。

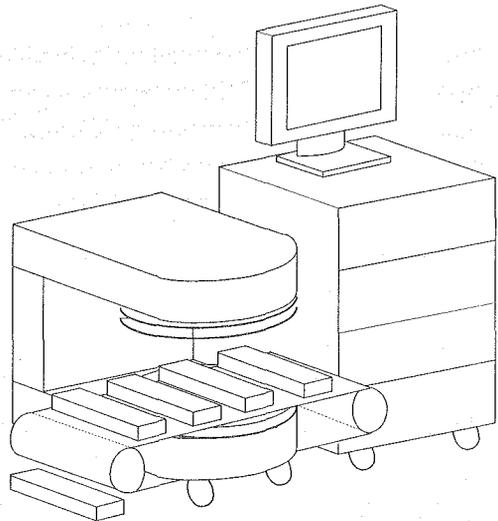


Fig.1 Overview of the MRI system for on-line selection of female salmon.

3. 予備実験

上記のシステムを設計するために予備実験を行ったシステムを Fig.2 に示す。このシステムには、ギャップ 80mm, 均一領域 30mm 球 (50ppm), 静磁場強度 0.3T の永久磁石回路 (約 50kg) を使用している。このシステムを用いて、鮭の切り身の高速撮像 (64×64 画素, 毎秒 1 枚) を行い、画素あたりの SNR の評価を行って、上記のシステムの妥当性を評価した。また、フラット型コイルを作成し、SNR の評価を行った。



Fig.2 Portable MRI system using a 0.3 T permanent magnet.

4. むすび

現時点で、システムは構築中であるが、討論会では撮像結果を報告する予定である。

参考文献

1. 巨瀬勝美, 拝師智之, 安立直剛, 固体物理, 34 巻 3 号, 208-212, 1999 年.
2. Tomoyuki Haishi and Katsumi Kose: J. Magn. Reson. 134, 138-141 (1998).

超並列型MRマイクロ스코プの開発 (II)

—勾配コイルシステムの設計—

(筑波大学理工工学系) ○松田善正、拝師智之、巨瀬勝美

Development of a Super-Parallel MR Microscope : Design of Gradient Coil Systems

Yoshimasa Matsuda, Tomoyuki Haishi, Katsumi Kose

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

The magnetic-field gradient coil systems for the super-parallel MR microscope have been designed. The gradient systems are 1D or 2D arrays of gradient probe units, each of which can be used for an MR microscope. Electric current directions are designed in order that each gradient coil unit should enhance the gradient field for the sample next to it. The magnetic field distributions for the gradient systems were calculated and regions for the homogeneous gradient fields were visualized. As a result, it is demonstrated that the proposed gradient coil systems give homogeneous gradient fields for super-parallel image acquisitions.

1. はじめに

同時に多数のサンプルのMRマイクロSCOPE撮像を行う「超並列型MRマイクロSCOPE」は、均一な静磁場中において、各サンプルに対する勾配磁場プローブを、同時かつ協調的に動作させることを基本的なアイデアとしている(1,2)。本研究では、本来単独で使用されるMRマイクロSCOPE用勾配磁場プローブを「基本ユニット」とし、そのユニットを、一次元もしくは二次元のアレイ状に配置することにより、上記の勾配磁場プローブシステムを構築する手法を検討したので、その結果を報告する。

2. 超並列型MRマイクロSCOPE用勾配磁場プローブの構成

<勾配磁場プローブ基本ユニット>

Fig.1(a)に、超並列型MRマイクロSCOPE用勾配磁場プローブの基本ユニットとなる、勾配磁場プローブの概観図を示す。このプローブは、本来単独で使用されるものであり、RFシールドボックス(130 mm(W)×130 mm(H)×40 mm(D))の両側面に、Maxwell型勾配コイル(G_zコイル)と、Anderson型(平行4線型)勾配コイル(G_xおよびG_yコイル)を装着したものである。これらのコイルの形状は、計算機を用いた磁場計算により最適化している。なお、各コイルの厚さは、約0.5 mmで、プローブ全体の厚さは52 mmとなっている。また、シールドボックスの中央部には、交換可能なRFコイルユニットが設置されている。

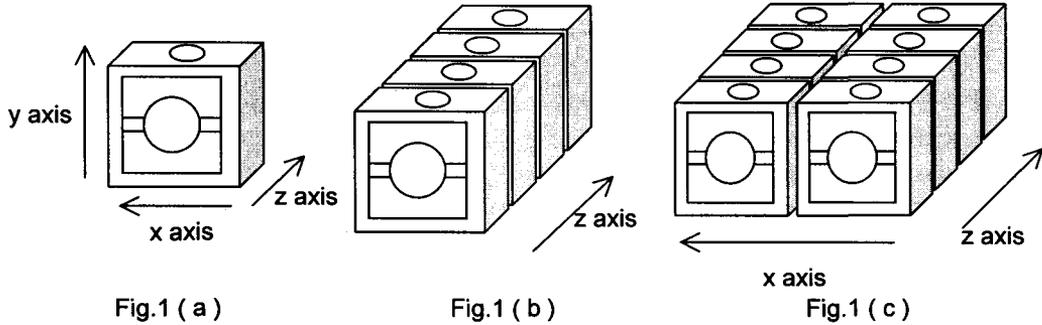
<一次元アレイと二次元アレイによる勾配磁場プローブシステムの構成>

Fig.1(b)とFig.1(c)に、上記の基本ユニットを、一次元および二次元のアレイ状に配置したシステムの概観図を示す。それぞれ、z方向にはプローブの中心間の距離を55 mm、二次元アレイでは、x方向のプローブ中心間の距離を140 mm(ギャップ10 mm)とした。

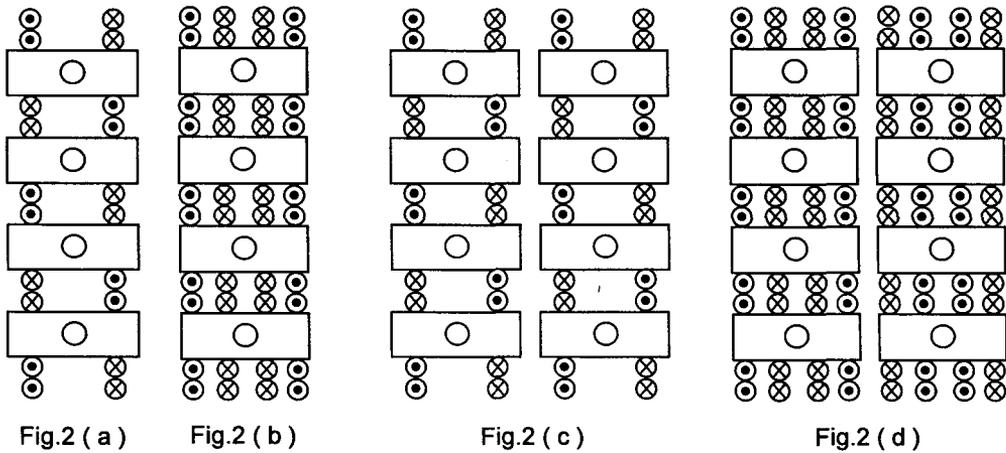
Fig.2(a)とFig.2(b)に、それぞれ、一次元アレイと二次元アレイにおける電流の方向を

MRI, 超並列型MRマイクロSCOPE, 勾配磁場プローブ, アレイ型勾配コイル
まつだ よしまさ, はいし ともゆき, こせ かつみ

示す。この電流の方向は、隣接するサンプルの位置に発生する勾配磁場が、増大するように決められている。すなわち、従来、単独の勾配コイルでは、コイルの片方（内側）の磁場しか利用していなかったが、このアレイ型勾配コイルでは、コイルの両側の磁場を有効に利用している。なお、アレイの両端には、隣接する勾配コイルが存在しないため、2個の勾配コイルを使用している。



Overview of the gradient systems. Single gradient coil unit (Fig.1 (a)), one dimensional array (Fig.1 (b)), and two dimensional array (Fig.1 (c)).



Current directions for 1D array: G_z coil (Fig.2 (a)) and G_x coil (Fig.2 (b)). Current directions for 2D array: G_z coil (Fig.2 (c)) and G_x coil (Fig.2 (d)).

3. 超並列型 MR マイクロスコープ用勾配磁場プローブの磁場分布

前節に述べた、基本ユニット、一次元アレイ、二次元アレイのそれぞれに関して、各コイルが発生する静磁場分布を、ビオ・サバルの公式を積分することにより計算した。さらに、その静磁場分布を、各サンプルの中心付近に原点をもつ一定の傾きをもつ磁場分布（理想的勾配磁場）に、最小自乗近似を用いてフィットし、その理想的勾配磁場からの強度のずれが5%の領域（「5%領域」と呼ぶ）をそれぞれ求めた。

Fig.3 (a)と Fig.3 (b)は、それぞれ基本ユニットにおける G_x および G_y コイル、そして G_z コイルの5%領域を示す。このように、5%領域は、サンプルの中心付近にほぼ集中しているが、特定の方向にも伸びている。しかしながら、実際に使用する領域は、サンプルを収容する球状の領域であるため、「5%領域に内接する円の直径」で、勾配磁場が均一な領

域の大きさを評価した。これは、 G_x と G_y については18.4 mm、 G_z については29.0 mmであった。

Fig.4 (a)とFig.4 (b)は、それぞれ一次元アレイにおける G_x および G_y コイル、そして G_z コイルの5%領域を示す。このように、5%領域は、各サンプルの中心付近に集中した領域と、特定の方向に伸びた部分とからなる。同様に、内接円の直径を求めると、両端のプロープにおいて、 G_x 、 G_y については、それぞれ18.4 mm、 G_z については21.0 mm、内側のプロープにおいて、 G_x と G_y については20.2 mm、 G_z については23.0 mm、であった。

Fig.5 (a)、Fig.5 (b)、Fig.5 (c)は、それぞれ二次元アレイにおける G_x 、 G_y 、 G_z コイルの5%領域を示す。このように、5%領域は、1次元アレイと同様に各サンプルの中心付近に集中した領域と、特定の方向に伸びた部分とからなる。同様に、内接円の直径を求めると、両端のプロープにおいて、 G_x 、 G_y 、 G_z について、それぞれ20.8 mm、20.8 mm、23.0 mm、内側のプロープにおいて、 G_x 、 G_y 、 G_z について、それぞれ20.2 mm、20.4 mm、23.0 mmであった。

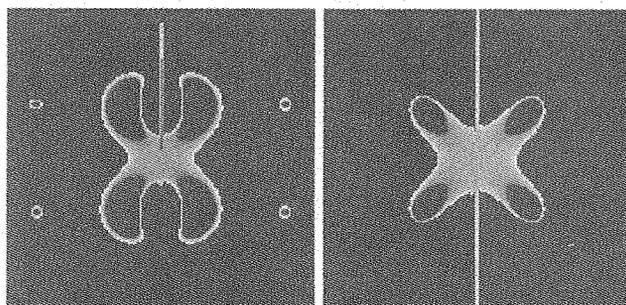


Fig.3 (a)

Fig.3 (b)

Regions of linear magnetic field-gradient for the single gradient unit: G_x (a) and G_z (b). In the bright area, the gradient-field deviation from that of the ideal field is less than 5% .

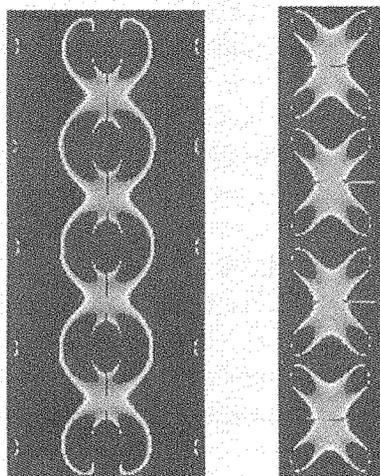


Fig.4 (a)

Fig.4 (b)

Regions of linear magnetic field-gradient for 1D array: G_x (a) and G_z (b). In the bright area, the gradient-field deviation from that of the ideal field is less than 5% .

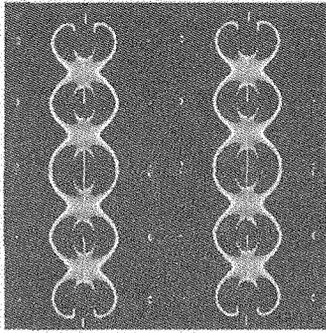


Fig.5 (a)

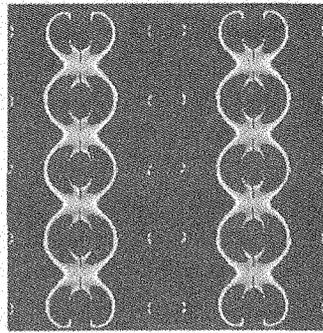


Fig.5 (b)

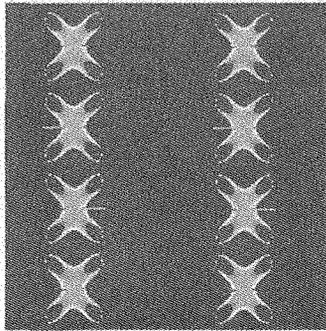


Fig.5 (c)

Regions of linear magnetic field-gradient for 2D array: G_x (a), G_y (b), and G_z (c). In the bright area, the gradient-field deviation from that of the ideal field is less than 5%.

4. 考察

勾配磁場プローブの基本ユニットを、隣接するサンプルの位置に発生する勾配磁場が増強されるように、電流の方向に留意してアレイ状に配置することにより、各サンプルの位置に、均一な勾配磁場領域が発生することを、磁場計算により示した。勾配磁場の均一な領域は、本来、三次元的な領域で評価しなければならないが、 x , y , z の二次元面で評価する限りでは、直径 20mm 程度のサンプルの撮像が可能な程度の勾配磁場が発生できることが明らかとなった。均一領域の大きさは、両端のプローブと、内側のプローブでやや異なり、また、勾配磁場の中心は、サンプルの中心よりややずれるが、撮像にはほとんど問題にはならないことが判明した。本研究では、最大 8 個までの二次元アレイで計算を行ったが、プローブの数が増えても、また、三次元のアレイにおいても撮像の上では問題はないと思われる。

5. むすび

今後、実際に超並列型勾配磁場プローブを開発し、性能評価と撮像実験を行いその結果を報告する予定である。

参考文献

- (1) 「NMR マイクロスコープ装置」, 特願 2000-266247.
- (2) 巨瀬勝美, 拝師智之, 松田善正, 「超並列型 MR マイクロスコープの開発—システムコンセプトとシステム設計—」, 第 38 回 NMR 討論会要旨集, 2000 年.

3Dポインタデバイスと専用グラフィックボードを用いた リアルタイム Volume Rendering システムの開発

○鈴木崇洋、橋本征太郎、拝師智之、植松孝明、松田善正、巨瀬勝美
(筑波大学物理工学系)

Development of a real-time volume rendering system using a 3D pointing device and dedicated image processing board.

○Takahiro Suzuki, Seitaro Hashimoto, Tomoyuki Haishi, Takaaki Uematsu, Yoshimasa Matsuda, Katsumi Kose (Institute of Applied Physics, University of Tsukuba)

The real-time volume rendering system has been developed on a WindowsNT system using a dedicated image processing board (VolumePro500) and a 3D trackball. The image processing board was used to drastically reduce the computation time required for 3D image-data interpolation and so on. The trackball was used for a 3D pointing device which interactively and intuitively determine the 3D view direction. Windows-events generated by the rotation of the trackball were coded to operations which rotate the 3D object to be displayed as volume rendered images. The system performance was tested using 128^3 and 256^3 voxel MRI data. The display frame rates were 16.7 and 11.1 fps for 128^3 and 256^3 data. It was concluded that the proposed system is very useful to understand 3D structures of volume data.

はじめに

近年、コンピューター技術の発展とともに、高速な3次元画像データの取得が容易となりつつあり、3次元のMRIデータを有効に、また効率よく表示、解析する手法に大きな関心もたれている。3次元画像データの表示手法のひとつであるVolume Renderingは、構造把握には適しているが、多量の演算による処理時間の長さが問題となっていた。また、3次元の視線方向の指定が必ずしも容易ではなかった。そこで本研究では、Mitsubishi Electric Information Technology Center America, Inc.で開発された、Volume Rendering専用ボード (VolumePro 500) と、大型のトラックボールを用いることにより、トラックボールの回転と被写体の回転が直接対応するようなリアルタイムVolume Renderingシステムを開発した。

装置と方法

開発・実行には、VolumePro 500とグラフィックカード (Canopus SPECTRA5400 R2) を接続したPC (Pentium II / 300 MHz, 256 Mbyte) と、トラックボールマウス (Logitech

MRI、3次元画像、Volume Rendering、リアルタイム処理

○すずきたかひろ、はしもとせいたろう、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

TrackMan MarbleFX)を用いた。また、OSにはWindowsNT 4.0 SP6、CコンパイラにVisual C++ 6.0を使用した。開発したシステムは、最大 256^3 までのボクセルデータを、VolumePro 500のオンボードメモリーに読み込み、トラックボールの回転で指定された3次元の視線方向からのVolume Rendering画像を、グラフィックカードに順次転送する。転送された画像は、2次元のテクスチャーとしてリアルタイムにモニター出力される。トラックボールの回転によって直感的に指定される任意の視線方向からの3D表示を実現するため、マウスイベントの処理に特別な工夫を加えた。

実行結果

開発を行ったシステムの評価には、当研究室のMR microscopeによって取得したマウス胎児の3次元データを使用した。撮像シーケンスは、3D-SEであり、TR/TE=100/8 ms、FOVは $(8.96 \text{ mm})^3$ 、画素サイズは $(70 \text{ } \mu\text{m})^3$ 、画素数は 128^3 、信号積算回数は24回であった。また、このデータを、フーリエ補間で 256^3 ボクセルまで拡大したものも使用した。

実行画面をFig. 2に示す。Rendering表示速度は、 128^3 ボクセルデータでは、16.7 frame/sec、 256^3 ボクセルデータでは、11.1 frame/secとなり、トラックボールの回転操作とMRIデータの回転・Volume Rendering処理時間は、ほぼ一致することとなった。また、不透明度、閾値などの各パラメータの変更もリアルタイムに処理が可能のため、Volume Rendering特有のパラメータ操作の煩わしさを、特別意識する必要はなかった。

まとめ

VolumePro 500を用いることによって、 256^3 ボクセルデータを10 frame/sec以上レンダリングすることができ、リアルタイム回転表示が可能となった。また、トラックボールによる操作性は、被写体の回転とボールの回転が一致するため、3次元構造を直感的に把握できた。以上より、本システムによるVolumePro 500及びトラックボールを用いたVolume Renderingの回転・表示は、被写体の構造把握には非常に効果があると結論した。

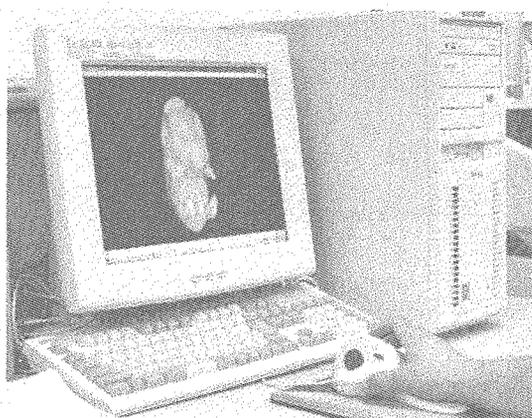


Fig.1 : Real-time volume rendering system using a dedicated image processing board and 3D pointing device .

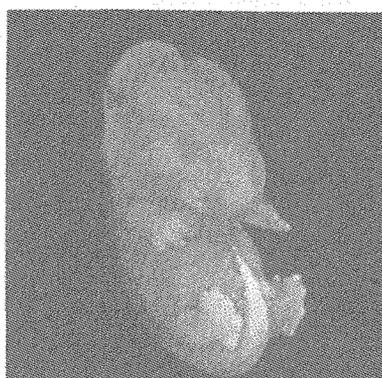


Fig.2 : Volume rendering image of a mouse embryo acquired with a 3D-SE (TR / TE = 100 / 8) . FOV : $(8.96 \text{ mm})^3$, Image matrix : 128^3 , matrix size : $(70 \text{ } \mu\text{m})^3$, NEX : 24

Windows2000-PCを用いた Realtime3D-MRI の開発
 (筑波大学理工学系) ○植松孝明, 拝師智之, 宇津澤 慎, 巨瀬勝美

Development of the Realtime 3D NMR Imaging System with Windows2000-PC
 (Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8573 Japan)
 ○Takaaki Uematsu, Tomoyuki Haishi, Shin Utsuzawa, Katsumi Kose

The real-time 3D MRI system, in which volume-rendered images are displayed successively in short-time intervals (< 3 seconds) just after the image acquisitions, has been developed. The system was constructed on a PC running under Windows2000 operating system. Imaging experiments were performed using an MRI system with a 4.7 T superconducting magnet and actively shielded gradient coil. The imaging sequence was a 3D gradient echo sequence, in which parameters were TR/TE=1.4/0.8 ms, Matrix=64x64x64, FOV=32.0 mm cube, and NAQ=1. In order to shorten the data acquisition time, the half-Fourier acquisition was used. As a result, the image refresh-rate of 2.79 seconds was achieved.

1. はじめに

被写体の 3次元撮像と同時に画像を表示するリアルタイム 3D-MRI は、近年の高速撮像法とハードウェアの高速化に伴い、実現が可能となってきた。さらに、Volume Rendering 法による三次元可視化法と組み合わせた技術は、臨床の現場においても、Interventional MRI として、その有用性が期待されている。本研究では、これまで 12 台の PC を用いて構築されていた、3次元撮像とほぼ同時に Volume Rendering 画像を表示するリアルタイム・3D-MRI 画像再構成・表示システムを、OS に Windows2000 を導入した 1 台の PC を用いて構築した。さらに、撮像時間の短縮を図るため、Half Fourier 法を使用し撮像を行い、その有用性を確認した。

2. 装置構成

本研究で開発した Windows2000 が導入された PC には、データ取得のための A/D 変換ボード (DATEL 社製)、撮像パルス・シーケンス制御のための DSP ボード (mtt 社製)、高周波発生のための Direct Digital Synthesizer ボード (DS Technology 社製) の 3 種類のボードが ISA バスに、画面表示のためのビデオカードが AGP バス上に挿されている。

Windows2000 によるシステムの構築のために、A/D 変換ボードと DDS ボードについて、データのやり取りを行うための WindowsNT/2000 用デバイスドライバを作成し、使用した。また、これまで Windows95 で使用していたプログラムを Windows2000 上で用いることができるように、データ収集、画像再構成プログラムや DSP ボードにパルスや勾配コイルについての情報を送るプログラムを移植し、使用した。

開発したプログラムは、A/D 変換ボードによって取得されたデータを、ボード上のメモリから PC のメインメモリに読み出し、三次元 FFT 処理後、Volume Rendering 処理を行い、その結果を 1 画素あたり 1 Byte の 64x64 画素のデータとして画面に表示・保存するまでの一連の動作を一度に行う。

3. 実験

実験には静磁場強度 4.74 T (水素原子の歳差運動周波数: 202 MHz) の超伝導磁石を用いた。撮像には、外径 27 mm の試験管に挿入された、直径 22 mm、高さ 38 mm の水ファントムを用いた。パルス・プログラムには DSP ボードを用い、100 nsec の時間精度でパルス・シーケンスを構築できる。撮像シーケンスは TR/TE = 1.4/0.8 msec の 3D gradient echo 法を用い、撮像視野 (32.0 mm)³、画素数 64³、信号積算 1 回とした。信号のサンプリングレートは 10 μsec とした。

また、リアルタイム 3D-MRI における最大の問題は、撮像に非常に時間を要する点である。こ

Keywords : Realtime-3D MRI, Windows, Volume Rendering, Half Fourier

うえまつ たかあき

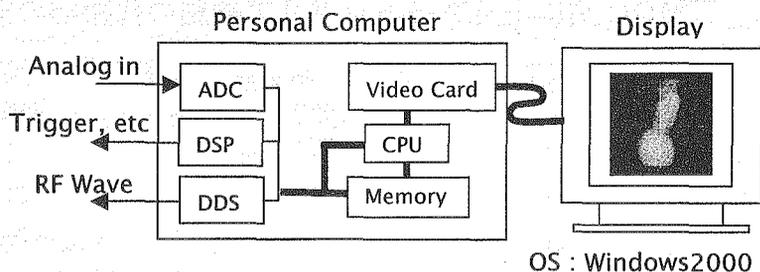


Fig. 1 Realtime 3D MR Imaging System with Windows2000

の問題を解決する方法として今回は Half Fourier 法を用いた。この方法は、一方向の位相エンコードの回数を半分に減らし、取得しない k 空間のデータにはすべてゼロを代入する点である。取得されるデータ量が半分になるため、結果として、撮像時間は半分に短縮される。また、データ量が少なくとも、Volume Rendering 法は信号雑音に強い画像処理法であることから、レンダリング後の画像における物体の認識には問題ない。

4. 実験結果と考察

実験結果を以下に示す。TR=1.4 msec として Half Fourier 法による信号取得を行った場合、信号取得に 2.79 sec, 画像再構成とレンダリング処理に 1.27 sec, 計 4.06 sec で一度の処理を終え、画像を表示することができた。また、信号の取得が完了する毎に、新しい画像を表示できるようになることから、画像更新時間は 2.79 sec であった。画像再構成における処理のうち、FFT 処理に約 900 msec, レンダリング処理に約 200 msec 程度の処理時間を要した。撮像実験の結果得られた画像を Fig. 2 に示す。今後は、Realtime-3D MRI の特徴を生かした三次元的物理現象の観測への応用を予定している。また、FISP 等のパルス・シーケンスの導入による S/N 向上も効果的であると考えられる。それらの、より複雑な高速撮像法の実現のため、パルスプログラムである DSP ボードのプログラム開発を今後予定している。

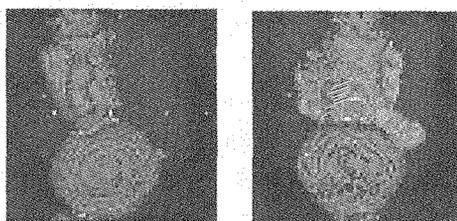


Fig. 2 Volume Rendered Images with the Realtime-3D Imaging System

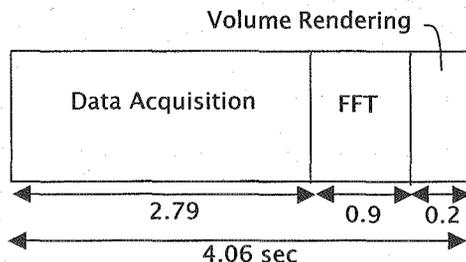


Fig. 3 Image Processing Time

参考文献

- 1) T. Haishi, K. Kose, Proc. ISMRM, 2175, (1999)

HMQC 法によるアストログリア細胞の代謝物の観測

(鳥取大学医学部¹, 同遺伝子実験施設², 同教育地域科学部³)

○ 疋田 純^{1,3}, 富永里香¹, 井上 仁¹, 難波栄二², 大塚 譲³,
飯塚舜介¹

Observation of Metabolites of Astroglial Cells from Mouse by HMQC Method

Faculty of Medicine¹, Gene Research Center², Faculty of Education and Regional Sciences³ Tottori University

J.Hikita^{1,3}, R.Tominaga¹, M.Inoue¹, E.Namba² Y.Otsuka³, S.Meshitsuka¹

Primary cultures of astrocytes were prepared from 2- to 4-day-old newborn mouse brains. Astrocytes were incubated with ¹³C-labeled glucose and the release of ¹³C-enriched metabolites into cultured media was studied by ¹H{¹³C}NMR spectroscopy. In addition to major signals of lactate, alanine, glutamine and acetate, minor signals of citrate, glycine and serine were observed in the culture of 15 to 30 days. In the medium of longer culture than 60 days these metabolites were not exported into the medium. The astrocytes that were stored at -80 °C were incubated in the same condition as having similar growth did not release these metabolites. Effects of the additives in the culture medium were also discussed.

はじめに

脳内には神経細胞の他に、グリア系細胞が大量に存在する。従来、グリア系細胞の脳における役割は、神経細胞間の物質移動、脳血管関門の形成、神経伝達物質の取り込み、死細胞の貪食、ミエリン形成などであると考えられてきた。これらに加えて、最近、脳代謝においてアストロサイトを中心としたグリア系細胞が重要な役割をしていることが明らかにされてきた。神経細胞はアストロサイトからの栄養物質の供給を受けて、生存に必要な物質とエネルギーを生成し、また、神経細胞特有の神経伝達物質の合成においても前駆体となる物質の供給を受けていることが明らかにされてき

キーワード： アストロサイト, 初代培養細胞, 代謝物, ¹H{¹³C}NMR

ひきたじゅん, とみながりか, いのうえまさし, なんばえいじ, おおつかゆずる,
めしつかしゅんすけ

た。ピルビン酸カルボキシラーゼ及びグルタミン合成酵素は神経細胞には存在せず、アストロサイトにのみ存在することが知られている。ピルビン酸カルボキシラーゼはピルビン酸からオキサロ酢酸を合成し、解糖系からクエン酸回路への経路で重要な働きをする。グルタミン合成酵素はグルタミン酸からグルタミンを生成する。このように特異な機能をもつアストロサイトはこれらの代謝物を細胞外に分泌し、それらの代謝物によって中枢神経系が維持されていると理解される。アストロサイトの代謝物のNMRによる解析は、主として1次元の測定で行われてきた。そのため、いくつかの重要な代謝物が見落とされてきた。そこで、 ^{13}C ラベルしたグルコースを用いて2次元NMRで代謝物を観測することにした。

実験方法

生後2, 4日のマウスの大脳から組織を採取し、物理的攪拌により細胞を分離した。DMEM培養液にF12培養液を加えた(1:1)培養液に10%仔牛胎児血清を添加した条件で培養した。週2回培養液を交換し、増殖の状態を見て植え継ぎを行いアストロサイトの単一カルチャーを得た。代謝物の観測は、グルコースを含まないDMEMに ^{13}C ラベルしたグルコースを添加し、10%仔牛胎児血清を添加した条件で培養した。NMR測定試料は培養時間12から48時間の培養上清である。 $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ NMRの測定はVarian Unity-500で行った。

結果

培養30日以内のアストロサイトは培養液中に乳酸、アラニン、グルタミンを多量に放出している。これに加えて、クエン酸、グリシン、セリンなどが観測された。培養60日以降の場合には、これらの代謝物は乳酸を除いて観測されなかった。また、 -80°C で凍結保存した細胞についても、解凍して凍結前と同程度の増殖が見られたが、培養液には上記の代謝物を観測することは出来なかった。このように、初代培養アストロサイトの細胞機能は培養日数の経過によって大きく変化することが分かった。形態的には変化は見られないが、それに先がけて酵素系の発現が変化を受けていくものと考えられる。さらに、培養液中の添加物の影響についても議論する。

脳内代謝物質の細胞内における動的ふるまい

(日本女子大学理学部¹、国立精神神経センター神経研究所²)

○高橋征三¹、 荻野孝史²

Dynamic Behaviors of Metabolites in Brain Cells

Seizo Takahashi¹ and Takashi Ogino²

(Dept. Chem. & Biol. Sci., Japan Women's Univ.¹ & Inst. Neurosciences, NCNP²)

The present work uncovered the presence of cross-relaxation between metabolite signals and cell constituents of high molecular weight. The cross-relaxation rates were different among metabolite signals. A simple two-state model failed to account for the apparent T_2/T_1 ratios. Chasing an uptake of D_2O into the brain tissue, it was found that the exchange rates observed by 2H and 1H were different at least by a factor of 50. It suggests that the water molecules take not only the free and bound states in the cells, but also the state with moderately restricted molecular motion. This state is considered to occupy a small part in brain cells, and has escaped from the observation by 1H spectra. The results lead us to propose a model in which some of the metabolites are restricted in motion within the cells, and the motion effects on the spin relaxation with no appreciable cross-relaxation.

【はじめに】

MRS や CSI で観測される信号は、細胞内において自由に運動している低分子の代謝物質であり、その信号強度は細胞内の代謝物質の濃度に比例すると考えられている。しかしこれは代謝物質が、酵素と結合した状態とのあいだに動的平衡があるときや、細胞内マトリックスに閉じ込められて制限拡散を受けているときには必ずしも成り立たない可能性がある。したがって交差緩和の研究はスペクトル解釈をきわめて重要な意味をもつといえる。

1次元 NMR の測定法を使う従来の MRS では、水や高分子物質のピークが重なっていて、交差緩和の測定はきわめて困難であった。我々は脳組織に高速 2次元 NMR 測定法を適用することでこの問題を解決した。そして 1H -NMR において、ほとんどすべての代謝物質について交差緩和が見られることを発見した。細胞内代謝物質の動的ふるまいはきわめて複雑で、単純なモデルで交差緩和機構を矛盾なく説明することは難しいが、脳組織における重水の交換反応の研究から一定の洞察を得ることができた。

キーワード NMR, 交差緩和、代謝物質、細胞、in vivo

たかはし せいぞう、おぎの たかし

[実験]

試料は 8 週令の Wistar ラットの脳組織を摘出し、細片にして約 120mg を 5 mm NMR 試料管に詰めた。装置は Bruker の AMX-400 を使い、測定温度は 298K である。飽和移動と緩和時間の測定は高速 2 次元 super-COSY を使った。脳組織の重水交換速度の測定は、Dy-DTPA の重水溶液を組織外液に加え spin-echo を測定しシャープな成分のみを捉え定量した。スペクトルの解析は MATLAB による自作のプログラムで行った。

[結果]

- (1) 水から 60ppm 低磁場側を 5 秒間照射した後に、待ち時間を変えて交差磁化移動による信号強度の回復を測定した。その結果、N-アセチルアスパラギン酸(NAA)の信号を除いて、すべてのピークに信号の回復が見られた。そして値は代謝物によって異なった。代表的な値を表 1 に示す。
- (2) 交差磁化移動による信号強度の変化は、照射位置によって有意の変化を示さなかった。これは水の場合と大きく異なる。この結果は、代謝物質の交差緩和は直接に細胞内の高分子との間でおこり、水分子を通して間接的に緩和する機構による寄与はほとんど無視できることを示唆する。
- (3) 一定以上の照射パワーを与えると信号強度は変化したが、その挙動は代謝物質によって少しずつ違うように思われる。このことは(1)の結果と矛盾しない。

T_1 の測定は COSY 測定の前に 180 度パルス挿入して行った。COSY スペクトルの解析は絶対値表示で行ったので、信号強度の挙動を見ながらスペクトルの符号を適宜反転して、強度の回復が連続的につながるようにした。回復の挙動はすべて単一の指数曲線に従い、緩和時間はおよそ 1 秒から 2 秒の間であった (表 1)。

Metabolites	Magnetic transfer (s)	T_1 (s)	T_2 (ms)	$T_2/T_1(10^{-1})$
N-Acetyl Aspartate	—	1.12 ± 0.11	162 ± 39	1.45 ± 0.34
Glutamate	0.50 ± 0.09	1.06 ± 0.07	140 ± 23	1.32 ± 0.23
Aspartate	1.32 ± 0.37	1.01 ± 0.05	110 ± 22	1.09 ± 0.25
Lactate	0.56 ± 0.10	1.98 ± 0.16	18 ± 6 212 ± 260	0.09 ± 0.41 1.07 ± 1.31
GABA	0.87 ± 0.13	1.48 ± 0.06	107 ± 21	0.72 ± 0.24
Myo-Inositol	0.66 ± 0.11	0.99 ± 0.06	133 ± 23	1.34 ± 0.23

Table 1. Half times of magnetic transfer of metabolite protons due to the cross-relaxation to those of high molecular weight cell constituents in the brain tissues, as well as the T_1 and T_2 relaxation times together with their ratios. N-acetyl aspartate does not show an apparent magnetic transfer due to cross-relaxation which shows as '—' in the table. The result shows that there is no apparent correlation between magnetic transfer and relaxation rates.

- (4) T_2 の測定は CPMG パルスのあとにスピンを z 軸に戻す 90 度パルスを挿入し、短時間待ち時間を入れた後で COSY を測定した。したがって得られた T_2 緩和時間の解釈には一定の留保が必要である。データの質は T_1 緩和時間の測定に比べて劣るが、データのバラつきの範囲内でほとんどのピークが単一の指数曲線で説明できた。明らかな例外は乳酸のメチル基とメチン基の交差ピークで、この場合には 18ms という非常に速い緩和成分の寄与が無視できなかった。ほとんどのピークについて緩和時間はおよそ 0.1 秒から 0.2 秒程度であった (表 1)。
- (5) 脳組織の遅い成分の重水交換速度を測定したところ、 ^2H で測定すると約 2 時間で半分交換するという結果になったが、 ^1H で測定すると約 150 時間という結果になった。 ^2H の信号強度は一定値になったあとは 24 時間ごとに組織外液を交換しても 2 週間にわたって有意の変化を示さなかった。また ^1H については、12 時間ごとに組織外液を交換しても、見かけの交換速度に影響はなかった。
- (6) 結合水の様子を見るために、飽和移動による水の action スペクトルを測定した結果、 ^1H の場合は自由水に比べて約 20 倍の線幅の広がりが見られたが、 ^2H では 5 倍程度しか差が見られなかった。

[考察]

交差緩和による磁化移動の結果から、明らかに細胞内における代謝物質の NMR スペクトルが細胞内の高分子成分と交差緩和していることは否定できない。交差磁化回復の実験は、交差緩和がピークによって異なることを明らかにした。しかし現時点では、交差緩和速度を直接に求めることができないので、 T_1 と T_2 の比を測定することを考えた。つまり低分子の代謝物質が、細胞内の溶液中に溶けていて自由に分子運動できる状態(F 状態)と、高分子または細胞内組織の近傍にあって運動が著しく制限されている状態(R 状態)との間に速い平衡が成り立ち、R 状態

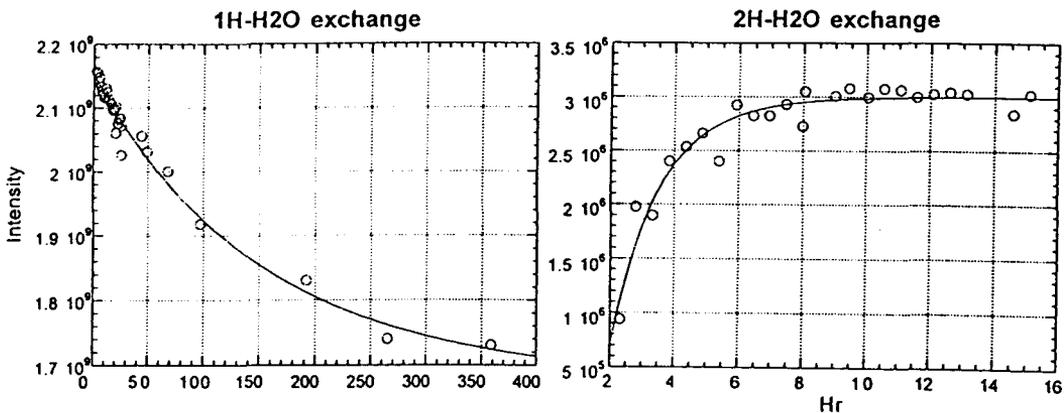


Fig. 1. ^1H - ^2H Exchange of Rat Brain Tissue observed by ^1H - and ^2H -NMR Spectra.

The tissue was immersed in $^2\text{H}_2\text{O}$ doped with Dy-DTPA, and CPMG pulse sequence was used. The spectral intensity was taken integrating over the resonance. Note the difference in the time-scale in hours between two plots. The result shows the apparent exchange rate is ca. 50 times slower in ^1H comparing to ^2H .

における交差緩和速度が F 状態の緩和速度に比べて十分に速いならば、 T_1 と T_2 の比は R または F 状態での存在時間に関係する量を反映するであろう。もしすべての代謝物質がほとんど F 状態にあるならば、どのピークも交差緩和の存在に関係なく T_1 と T_2 の比は一定値を示すと期待される。

結果は表 1 に示すように、 T_1 と T_2 の比は代謝物質によって値が異なるようである。しかも交差磁化の移動時間と縦または横緩和時間とのあいだに簡単な相関は見出せなかった。たとえば NAA の場合、明らかに磁化移動と緩和時間との関係は矛盾する。NAA に有意の交差緩和は見られないにもかかわらず、 T_1 と T_2 の比は R 状態が他の物質と同程度に存在することを示唆するからである。上で仮定した単純な 2 状態モデルが成り立たないことは明らかである。

水の飽和移動の効率は照射のオフセット位置によって大きく変化するのにたいして、代謝物質については高分子成分からの磁化移動のオフセット効果が見られないことから、水分子が間に介在して交差緩和する機構の寄与は小さいと推測される。したがって代謝物質は細胞内で 2 つ以上の状態で存在し、それらが速い動的平衡をなしていると考えられる。

細胞内の水分子の存在状態については昔から多くの研究があるが、細胞内外の水の交換速度は、3 状態の平衡で解析されてきた。我々は脳組織のゆっくりとした重水の交換速度を測る目的で、時間分割による ^2H と ^1H の同時測定を試みた。しかし ^2H の見かけの交換速度に比べて ^1H の交換速度が 50 倍程度も遅いので、結果的に同時測定の意味がなかった。この見かけの交換速度の違いは双極子緩和と四重極緩和の違いにその原因が帰せられよう。つまり細胞内における水の結合状態に少なくとも 2 種類あり、 ^2H では自由水と比較的ゆるく分子運動が制限された状態とのあいだの平衡を観測していて、 ^1H の場合は硬く水素結合した状態とのあいだの平衡も同時に観測できるとすれば、両者のあいだに見かけの交換速度の違いがあっても矛盾がない。

飽和移動による水の action スペクトルはこの解釈を支持する。つまり結合状態の水の線幅は ^2H のほうが ^1H より明らかに狭い。したがってこの解釈が正しいとすれば、 ^2H で見られた交換が ^1H で見られないことから、細胞内において水は大部分が自由水か水素結合のネットワークを作った状態にあるが、 ^1H の測定では直接に観測にひっかからない、比較的ゆっくりと運動している状態の水があるようである。

細胞内における水の状態の類推から、細胞内の代謝物質は、交差緩和には直接に寄与しないがスピン緩和には寄与するような、分子運動がある程度制限された状態が存在することを示唆する。この状態の実体を明らかにすることが今後の課題であろう。

NMR マイクロイメージング法による 炊飯米内部に形成された空洞の解析

(農水省・食総研¹, 農水省・畜試²)

○堀金明美¹, 豊島英親¹, 逸見 光¹, 永田忠博^{1,2}, 吉田 充¹

A study of internal hollows in cooked rice grains observed by NMR microimaging

Akemi K. Horigane¹, Hidechika Toyoshima¹, Hikaru Hemmi¹,

Tadahiro Nagata^{1,2}, and Mitsuru Yoshida¹

¹:National Food Research Institute, ²:National Institute of Animal Industry

Nondestructive analysis of water distribution and morphological structure change in rice grains, five Japonica type rice cultivars with different amylose contents, during cooking was performed with NMR microimaging. Using a specially designed holder, high quality images of cooked rice grains were obtained, even when 8 to 10 grains were measured simultaneously. Internal hollows were detected in all examined cooked rice grains of five cultivars, and process of their formation was precisely observed. The origin of these hollows seemed to be cracks or fissures. Sealing of such lacerations by gelatinized starch in the peripheral layer, followed by expansion of the grain, during cooking left hollows inside of the grains. The volumes of internal hollows were calculated using the volume rendering from the three dimensional image data sets. The size, shape and total volume of hollows in a grain differed between cultivars.

【はじめに】 食生活の多様化や高級化傾向により、味が良く様々な調理法に適した米の新品種が作出され、その品種特性や加工適性を評価するための新しい分析法が求められている。炊飯米の食味には、米の主成分である澱粉の糊化特性や、炊飯米の物性などが影響する。澱粉の糊化特性は一般に精米粉を用いて測定、評価されるが、米は粒の集団として食されることから、その糊化特性は米粒の組織構造を破壊した「粉」ではなく、「粒」の状態の評価されるべきであろう。米粒の糊化特性を解明するためには、米粒内部への水の浸透や分布を明らかにする必要がある。そこで、NMR マイクロイメージング法により飯粒内の水の分布を調べた。その中で、澱粉の糊化、膨潤による飯粒の形態変化により、飯粒内部に空洞が形成されることが明らかになり、この品種間差異についても検討した。

キーワード：NMR マイクロイメージング、炊飯米、水分分布、デンプンの糊化、空洞

ほりがねあけみ, とよしまひでちか, へんみひかる, ながただひろ, よしだみつる

【材料および方法】(1) 炊飯米：アミロース含量の異なる5品種（モチミノリ，ミルキークイーン，コシヒカリ，関東181号，ホシユタカ）の精白米10gを洗米せずに，米重量の1.5倍に相当する脱イオン水を加え，1時間浸漬した後，炊飯して調製した。

(2) NMR マイクロイメージング測定：Bruker社製DRX300WB（7.1T）装置に，内径25mmまたは5mmのイメージング用バードケージ型RFコイルを装着して測定した。Spin-echo法により2次元または3次元のdata setsを得た。25mmのRFコイル用に，多検体同時測定用サンプルホルダーを作製し，測定の効率化を図った。

(3) 空洞容積の測定：3次元data setsからvolume rendering法により飯粒の体積および空洞容積を求め，空洞容積率（hollow ratio，総空洞容積／飯粒体積）の品種間差異を解析した。

【結果と考察】飯粒内部にはNMR信号が検出されない領域があった。実体顕微鏡による観察で，この領域は空洞であることが確認された。空洞の形成される様子は，炊飯過程における飯粒内の水分分布や飯粒の形態変化を経時的に観察することにより明らかになった（Fig.1）。水に浸漬した米粒にはヒビ割れが認められ，加熱により飯粒表層の澱粉が糊化，膨潤すると，そのヒビ割れの開口部は塞がれた。その直後に飯粒は大きく膨張し，それによりヒビ割れの間隙が広がることによって空洞が形成された。空洞はいずれの品種でも同じ過程をたどって形成され，その大きさは，沸騰開始前後で最大となり，沸騰の継続により次第に小さくなった（Fig. 2）。しかし，空洞形成の開始時期や大きさは品種によって異なった。空洞の形状や大きさの決定要因として，胚乳の組織構造や，長軸方向への伸長率が考えられた。空洞の存在は，飯粒内部の組織構造が不均一であることを示しており，飯粒の糊化特性の解析には，このようなNMR マイクロイメージング法による全粒分析が有効であることが示された。

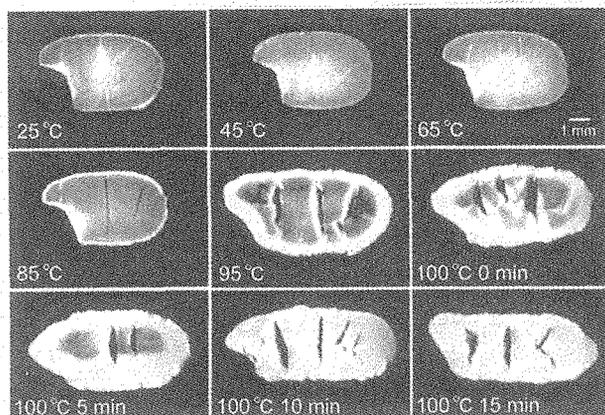


Fig.1. Longitudinal sections of center parts of rice grains, cv. Koshihikari, sampled at different timing during cooking. The spin-echo pulse sequence was used with a T_e of 3.9 ms and a T_r of 0.5 s. In-plane resolution was 39 μm .

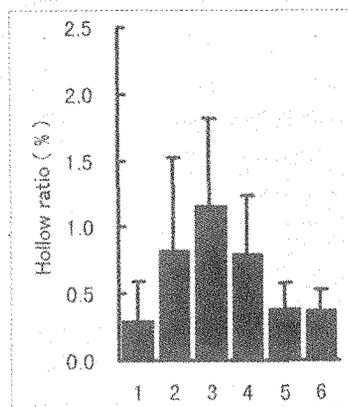


Fig.2. Changes of the hollow ratios (total hollow volume / grain volume) during cooking. The numbers, 1-6 correspond to the sampling time from 85°C to 100°C 15min in Fig.1.

MAS条件下での同種核二量子双極子相互作用をリカップルする パルス列を用いた、高い効率の帯域選択的磁化移動

(横浜国大・工¹、阪大蛋白研²) ○松木陽¹、藤原敏道¹、阿久津秀雄^{1,2}

Radio-Frequency Pulse Sequence for Efficient Band-Selective Magnetization Transfer by Recoupled Homonuclear Double-Quantum Dipolar Interaction under Magic-Angle Spinning Conditions

Yoh Matsuki¹, Toshimichi Fujiwara¹, Hideo Akutsu^{1,2}

1, Department of chemistry and biotechnology, Yokohama National University, Yokohama 240-8501,
Japan; 2, Institute for Protein Research, Osaka University, Suita 565-0871, Japan

Recently, solid-state NMR technique draws increasing attention for its potential for biological applications. Pulse sequences that recouple the homonuclear dipolar interaction under MAS condition are important tool for spectral assignments and structural constraints. Many researches have been done for developing pulse sequences that recouple dipolar interaction over a wide offset range with high efficiency and tolerance to rf-inhomogeneity. However, the broadband sequences such as C7, CMR7, POST-C7 and SPC5 usually require strong rf fields. Here we show that reducing the frequency bandwidth can improve the magnetization transfer efficiency by decoupling the dipolar interaction with spins outside of the effective bandwidth. Reduced rf field of the band-selective version also contributes to the ¹³C¹H-decoupling during the mixing period. Experiments were done on 15% [U-¹³C] alanine and the transfer efficiency between C α and C β was shown to be enhanced by ca. 35% compared to that of SPC5.

はじめに

近年、固体系のNMR測定法は、生体高分子の構造決定の分野でもますます注目されつつある。また、膜タンパク質や、絹のように固体状態に特有の構造をもつタンパク質、結晶化の難しいタンパク質に威力を発揮する。最近ではロドプシン中のレチナールの構造を明らかにした¹。

MAS 条件下において核スピン間に高い効率で磁化を移動する技術は、固体系の実験で必要不可欠のものである。通常スピン拡散や rf パルスによって磁化移動を推進するが、rf 推進法によって双極子相互作用を利用する方法は移動の効率が高く、移動に要する時間も短く抑えられることから緩和時間が短い系にも有利である。これまでには零量子双極子相互作用を復活する RFDR や二量子双極子相互作用を復活する POST-C7, SPC5 などが報告され^{2,3,4}、生体分子における信号の帰属にも応用されてきた。その中で問題にされてきたのは rf パルスが常に伴うオフセットの効果や磁場不均一性といったパルスの不完全性の補償であった。そこでは、より広い周波数帯域のスピンを一様にリカップルすることに重点がおかれてきた。

しかしながら、タンパク質やペプチドを測定対象とするような実験では、リカップリングの帯域が広すぎないことが重要な場合がある。固体系の実験では、まずアミノ酸種ごとのシグナル帰属をはじめに考えるため、側鎖カーボンのシフト値の決定が実験初期の重要なステップのひとつになる。アミノ酸種の識別にはシフト値の分散がもっとも大きい C β を用いるのが便利である。このために以前にもアミド窒素から α 炭素、 β 炭素の順に相関を得るようないくつかの NCACB 実験が設計された。Ernst らは C=O/C α の移動にスピン拡散を用いたが rf 推進法に比べて移動効率

固体 NMR, 同種核二量子双極子相互作用, リカップリング, マジック角試料回転, 安定同位体標識
まつきよう、ふじわらとしみち、あくつひでお

に問題がある⁵。HongらはCa/Cβ間の磁化移動にCMR7を用いたが、これは化学シフト値の近いCa/Cβ間のコネクには不必要な広い周波数特性を持つ。しかも観測チャンネルにMAS周波数の7倍強度をも要求することから残余の¹³C/¹H双極子相互作用に因って移動効率は40-45%程度と低く、感度に問題がある⁶。最近Griffinらが開発したSPC5では観測側への要求が5/7に軽減され広い帯域を維持しつつ、高磁場の実験における感度の点で前進した。ここではリカップルの有効帯域をCa/Cβ間だけの磁化移動を目的として30ppm程度に制限することで、磁化移動効率をSPC5より更に35%程度向上できることを報告する。帯域の調節は、用いるパルス列のパルス強度とパルス幅の二つをパラメータに含む。解析的な計算法に基づいてそれらのパルス列が全体として与える回転特性を計算、評価することで、帯域の中心付近において周波数特性が平坦な、いくつかの優れた帯域選択的リカップリング系列を開発した。また、同様の手法によってSPC5よりも広帯域の系列が実現できることも示す。

理論

$(A-b)_\phi(A)_{\pi+\phi}(b)_\phi$ [但し、 $180 < A < 360^\circ$, $0^\circ < b < 180^\circ$] の3パルスで構成されるコンポジットパルスをCエレメントと呼ぶ。たとえばSPC5は $A=360^\circ, b=270^\circ$ でCエレメント: $(90)_\phi(360)_{\pi+\phi}(270)_\phi$ である。位相 ϕ を、試料管がN回転する間にn回変える(スーパーサイクル)。すなわち、

$$\phi_p = p2\pi/n, \quad p=0, 1, \dots, n-1. \quad (z \text{ 軸についての回転})$$

このとき一般的に、ランク λ の相互作用の一次平均ハミルトニアンは、

$${}^{(1)}\tilde{H} = \frac{1}{n} \sum_{p=0}^{n-1} \sum_{\lambda, \mu} \tilde{\omega}_{\lambda, \mu}^{(m)} \exp\left(-i \frac{2\pi}{n} (\mu + mN)p\right) T_{\lambda, \mu}$$

と表わされる⁴。 $T_{\lambda, \mu}$ はランク λ 、スピン回転要素 μ の規約テンソル演算子である。ここで $n=5, N=2$ とするとランク2に関する要素だけが残る。従ってハミルトニアンは次のように純粋な二量子双極子部分だけで簡単にあらわされる。

$${}^{(1)}\tilde{H} = \tilde{\omega}_{2,2}^{(1)} T_{2,2} + \tilde{\omega}_{2,-2}^{(-1)} T_{2,-2}.$$

このようにrf周波数を試料回転に同期するような実験スキームではCエレメントの選択が実験全体に大きく影響する。パルスのオフセットでの効果や磁場不均一性のCエレメントに依存した補償がシーケンスの有効帯域や実験の安定性を決める一方、パルスによる回転角が大き過ぎるCエレメントは強いパルス強度を要求するから、残余の¹³C/¹H間双極子相互作用で感度が悪化するからである。

Cエレメントに含まれる3パルス(それぞれ回転軸 $\mathbf{n}_1, \mathbf{n}_2, \mathbf{n}_3$ と回転角 $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ を持つ)が引き起こす全体としての回転角 β_{123} と回転軸 \mathbf{n}_{123} は、解析的な計算で次のように求めることができる⁷。ここで $c_{123} = \cos(\beta_{123}/2)$, $s_{123} = \sin(\beta_{123}/2)$ 。

$$\begin{aligned} c_{123} &= c_1 c_2 c_3 - (s_1 s_2 c_3 \mathbf{n}_1 \cdot \mathbf{n}_2 + s_1 c_2 s_3 \mathbf{n}_1 \cdot \mathbf{n}_3 + c_1 s_2 s_3 \mathbf{n}_2 \cdot \mathbf{n}_3) + s_1 s_2 s_3 (\mathbf{n}_1 \times \mathbf{n}_2) \cdot \mathbf{n}_3 \\ s_{123} \mathbf{n}_{123} &= s_1 c_2 c_3 \mathbf{n}_1 + c_1 s_2 c_3 \mathbf{n}_2 + c_1 c_2 s_3 \mathbf{n}_3 - (s_1 s_2 c_3 \mathbf{n}_1 \times \mathbf{n}_2 + s_1 c_2 s_3 \mathbf{n}_1 \times \mathbf{n}_3 + c_1 s_2 s_3 \mathbf{n}_2 \times \mathbf{n}_3) \\ &\quad - s_1 s_2 s_3 (\mathbf{n}_1 (\mathbf{n}_2 \cdot \mathbf{n}_3) - (\mathbf{n}_3 \cdot \mathbf{n}_1) \mathbf{n}_2 + (\mathbf{n}_1 \cdot \mathbf{n}_2) \mathbf{n}_3) \end{aligned}$$

平均ハミルトニアン理論によれば、C エlementに含まれる各パルスの不完全性がおこす残余の回転は、 $\mathbf{n}_{123} \cdot \mathbf{e}_z \cong 0$ のとき、スーパーサイクルによって最も効果的に除去できる²。(\mathbf{e}_z は z 方向の単位ベクトル)

実験

$\beta_{123} \cdot \mathbf{n}_{123} \cdot \mathbf{e}_z$ の計算結果を参考にいくつかのシーケンスを選び出し、実験で検証した。(A,b)=(360,360), (360,270), (360,265.5), (270,225), (208,187), (240,210), (240,180), (180,180) の C Element を含むリカップリングパルス列を Figure 1 のようなシーケンスに組み込んだ。測定は均一ラベル Ala 15% 希釈試料について行い、C α /C β 間の磁化移動を観測した。Ala の C α /C β 間の化学シフト差は外部磁場 9.4T において 3.1kHz である。交差分極のあと炭素磁化を z 軸方向にフリップバックし、その後の $\tau=10\text{ms}$ のうちに残余の横磁化を減衰させる。その後 C α 磁化をガウスパルスで選択励起し、リカップルパルス列を入力する。全ての測定は Chemagnetics CMX-400 Infinity と、4 ϕ スピナー用ブロードバンド二重共鳴プローブを用いて室温で行った。

結果と考察

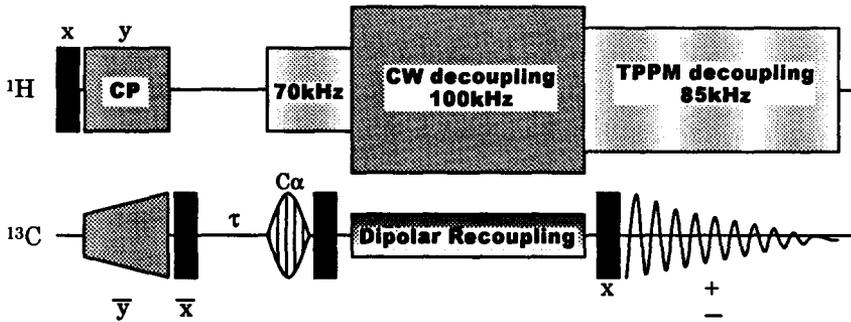


Figure 1. Timing scheme for a magnetization transfer experiment including a dipolar recoupling pulse sequence. This enables observation of the magnetization transfer exclusively between C α and C β . The block “Dipolar Recoupling” is composed of concatenated C-elements with five-folded phase shift, $\phi=0, 72, 144, 216, 286$.

今回、一連の(A, b)の組を持つ C Element について、 $\beta_{123} \cdot \mathbf{n}_{123} \cdot \mathbf{e}_z$ の値をオフセットの効果を加味して計算、評価した。 $\beta_{123} \cdot \mathbf{n}_{123} \cdot \mathbf{e}_z \cong 0$ のとき、エラー項が残す残余の回転がほぼ無いか、回転軸がほとんど完全に xy 平面内にあること示し、エラー項についてのより強い補償のひとつの目安となる。 $\beta_{123} \cdot \mathbf{n}_{123} \cdot \mathbf{e}_z$ の値と各パルス列が与えたりカップルの帯域を Table 1 にまとめている。 $\beta_{123} \cdot \mathbf{n}_{123} \cdot \mathbf{e}_z$ の増加とオフセット耐性の低下が強く関連していることがわかる。Figure 2 には、いくつかについて移動効率のオフセット依存性が示してある。(A,b)=(208°,187°)でおおよそ 3kHz 幅の帯域選択的なプロファイルが得られた。これには帯域の中心で周波数特性が非常にフラットで、あるオフセット周波数から急激に効率が落ちるような理想的なプロファイルが得られている。また、(A,b)=(270°,225°)を選択する事で、この帯域を 50%程度広げることも可能であった。

Table 1 Observed effective bandwidth, maximum magnetization transfer efficiency and the z component of the residual rotation.

(A,b)	(360,360)	(360,270)	(360,265.50)	(270,225)	(208,187)	(240,210)	(240,180)	(180,180)
Bandwidth at 90% maximum [kHz]	1.5	7	8	4.2	3	1.2	0.6	1.6
Bandwidth at 50% maximum [kHz]	5	19	25.5	9	6	4.9	2	4.4
max. transferred magnetization [%]	41.53	41.39	40.3	49.53	56	51.86	55.95	55.33
$\beta_{123} \cdot \mathbf{n}_{123} \cdot \mathbf{e}_z$ [-]*	1.0126	0.05466	0.01415	1.4753	2.2185	2.2876	14.6173	4.0737

*average of values calculated for offsets of 2, 4, 6, 8, 10kHz.

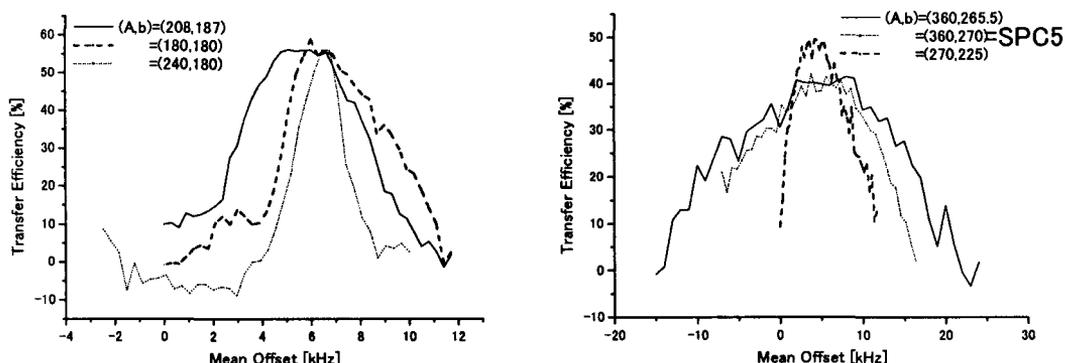


Figure 2 Experimental offset dependence of the DQ dipolar recoupling sequences studied in this work compared with that of SPC5. Transfer efficiency is plotted against the average chemical shift offset of α and C from center of the spectral width.

単純にパルス強度を落とすことでオフセット依存性を強めることは可能である。しかし (A,b) =(180°,180°)、=(240°,180°)などのデータが示すように、(A,b)に適切な組み合わせを選ばなければ $C\alpha$ - $C\beta$ のコネクットに十分な 3kHz 前後の帯域に不足するし、最大効率を与える周波数帯が非常に狭いものしか得られない。また、(A,b)=(360°,265.5°)の組み合わせは SPC5 より広い周波数特性を与えることが示された。以上の結果は今回のような、一般化した一連の C エlement が持つ回転軸の xy 平面からの逸脱を計算、評価する手法が、新しい特性のリカップリング系列の探索に役立つことを示している。

References 1, G. Grobner, I. J. Burnett, C. Glaubit, G. Chol, A. J. Mason and A. Watts, *Nature*, **405**, 810-813, 2000. 2, M. Hohwy and H. J. Jakobsen, M. Eden and M. H. Levitt, N. C. Nielsen, *J. Chem. Phys.*, **108**(7), 2686-2694, 1998. 3, Y. K. Lee, N. D. Kurur, M. Helmle, O. G. Johannessen, N. C. Nielsen, M. H. Levitt, *Chem. Phys. Lett.*, **242**, 304-309, 1995. 4, M. Hohwy, C.M. Reinstra, C. P. Jaronec, and R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.*, **110**(16), 7983-7991, 1999. 5, S. K. Straus, T. Bremi and R. R. Ernst, *J. Biomol. NMR*, **12**, 39-50, 1998. 6, S. K. Straus, T. Bremi and R. R. Ernst, *J. Biomol. NMR*, **12**, 39-50, 1998. 7, M. H. Levitt, *Prog NMR spec*, **18**, 61-122, 1985.

Frequency Switched Lee-Goldburg 法を用いた
 固体高分解能プロトンスペクトルの測定とペプチドへの応用

○山内一夫¹、黒木重樹²、安藤 勲²

日本ブルカー¹、東工大・工²

High-Resolution Solid-State ¹H NMR Spectral Observation of Peptides
 with Frequency-Switched Lee-Goldburg Decoupling Method

Kazuo Yamauchi¹, Shigeki Kuroki², Isao Ando²

¹ Bruker Japan

² Department of Chemistry and Materials Sciences, Tokyo Institute of Technology

The FSLG-2 (frequency-switched Lee-Goldburg) homo-nuclear dipolar decoupling method was combined with high speed MAS (magic angle spinning), in order to measure solid state ¹H NMR signal for the amide proton bonded directly to the amide ¹⁴N of peptides and polypeptides in the crystalline state. By using this method, high-resolution ¹H NMR spectra of peptides and polypeptides in the solid state were successfully measured and then gave more reasonable resolution for the amide proton signals as compared by other solid-state high-resolution ¹H NMR methods. From these results, it was found that the obtained amide ¹H chemical shifts provide useful information about the hydrogen-bonded structure,

緒言

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。固体状態でのペプチドやポリペプチドの水素結合中の分子(¹³C, ¹⁵N, ¹⁷O および ¹H)の化学シフトと水素結合距離について我々は考察してきた。その中でプロトン原子は感度はよいが固体状態での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い。ペプチド中で水素結合に関与しているアミドプロトンは窒素が化学結合しており、その窒素との双極子結合と核四極子結合によって広幅化するため CRAMPS(br24 など)の比較的低速 MAS でのプロトンの高分解能固体 NMR は十分なスペクトルが得られない。前回我々は高磁場と高速回転を用いた測定法により高分解能化することに成功したが、今回高速回転下でも双

固体高分解能 NMR、¹H、ペプチド、水素結合、化学シフト

やまうちかずお、くろきしげき、あんどういさお

極子相互作用を消し去ることができる frequency-switched Lee-Goldburg (FSLG)法を用いた測定法を開発した。このパルスプログラムを用いてペプチドの固体高分解能スペクトルを測定し化学シフトと固体中での水素結合距離と比較検討した。

実験

高速 magic angle spinning 下ではローターの回転周期時間が短いため同核双極子デカップルを行うためにはパルス周期も短いものを使う必要がある。今回パルス周期が 2 つのパルスのみで構成される frequency-switched Lee-Goldburg (FSLG)法[1],[2]を採用した。実際の測定では Figure 1 で示すような $2/\pi$ パルスの後 FSLG パルスで双極子デカップルを行い 1 周期ごとに FID ポイントのサンプリングを行い直接観測法でのパルスプログラムを製作した。測定は Bruker 社製 AVANCE DSX 300 に通常の 4mm MAS プローブを用いて MAS 回転速度 12kHz, 繰り返し時間 10sec, 積算回数 16 回, 周波数スイッチングタイム 0.2 μ sec で行った。また測定法の比較評価のために poly(L-alanine) のスペクトルを測定し(Figure 2)この手法の応用例として Figure 3 の脚注に示すグリシンを含むペプチド及びポリペプチドの測定を行った。化学シフト及び scaling factor の補正はグリシン(MAS 回転数 35KHz, 800MHz プロトン観測 [3])を用いた。

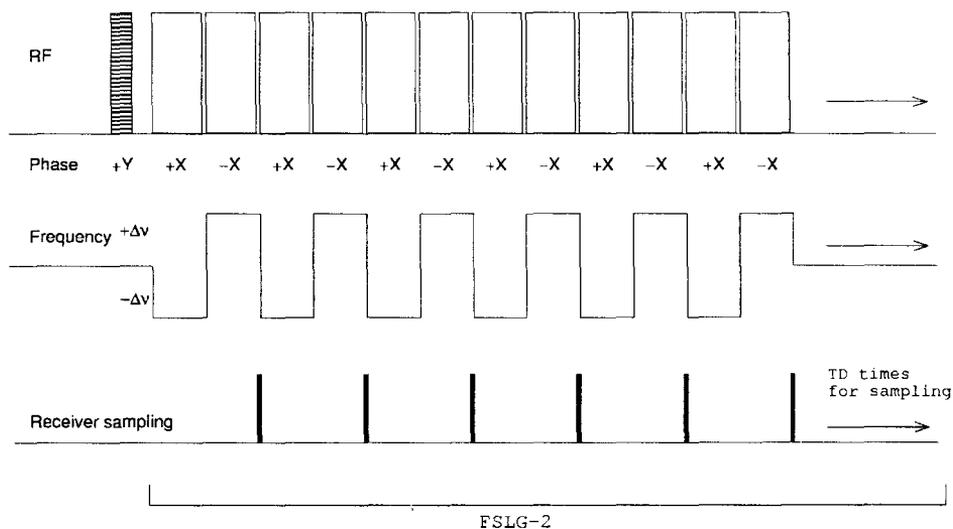


Figure 1 Schematic illustration of the pulse sequence (RF, pulse frequency, and receiver sampling) used in this experiment. The pulse length and its frequency are adjusted at FSLG-2 condition.

結果・考察

高速回転下での今回用いた手法の有用性を比較するため CRAMPS(br24)のスペクトル(回転数 2.3kHz, 12kHz)と FSLG 法(回転数 12kHz)のスペクトルを Figure 2 に示す。通常の CRAMPS スペクトル(br24 法)では高速回転下では高分解能スペクトルを得ることができない(Figure 2-b)が、今回開発した FSLG 法ではパルス周期が短いため高速回転下でも高分解能スペクトルを得ることができた。これらスペクトルを比較すると(Figure 2-a) br24 法(2.3kHz 回転)、および(Figure 2-c) FSLG 法(12kHz)は 4ppm 付近の α プロトンおよび 1ppm 付近のメチルプロトンは高分解能なスペクトルが得られているが ^{14}N と化学結合している 9ppm 付近のアミドプロトンは(Figure 2-a)では低速回転で双極子相互作用が除去できず広幅化しているが(Figure 2-c)でははっきりと観測でき今回用いた手法が有用であることがわかる。

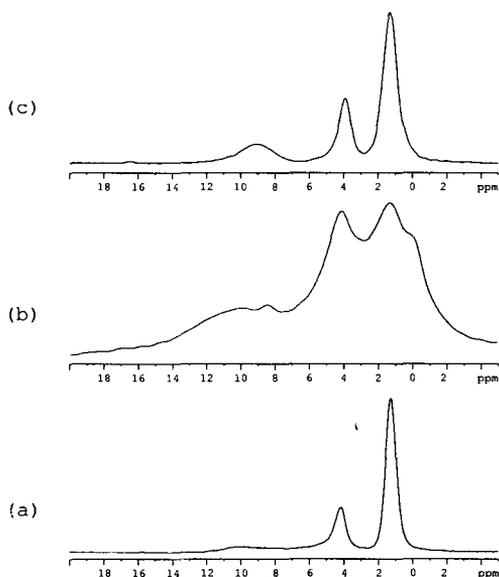


Figure 2 High-resolution ^1H NMR spectra of poly(L-alanine) in the solid state by (a) CRAMPS br24 at MAS rate of 2.3 kHz, (b) CRAMPS br24 at MAS rate of 12 kHz and (c) FSLG-2 with proton decoupling at MAS rate of 12 kHz.

グリシン残基に水素結合を形成している 9 種類のペプチドについて今回の FSLG 法で測定したスペクトルを Figure3 に示す。これらはアミドプロトンのピークも良好に観測されておりそれぞれのピークを帰属することができた。このスペクトルより得られる水素結合を形成しているアミドプロトン化学シフトと X 線構造解析から得られた水素結合距離($R_{\text{N}\dots\text{O}}$)の関係を Figure4 に示す。この図から水素結合間距離が短くなると化学シフトは低磁場に、距離が長くなると高磁場にシフトしていることがわかりこの結果は以前行った 800MHz NMR での結果および理論化学シフト計算の結果と一致している[3],[4]。

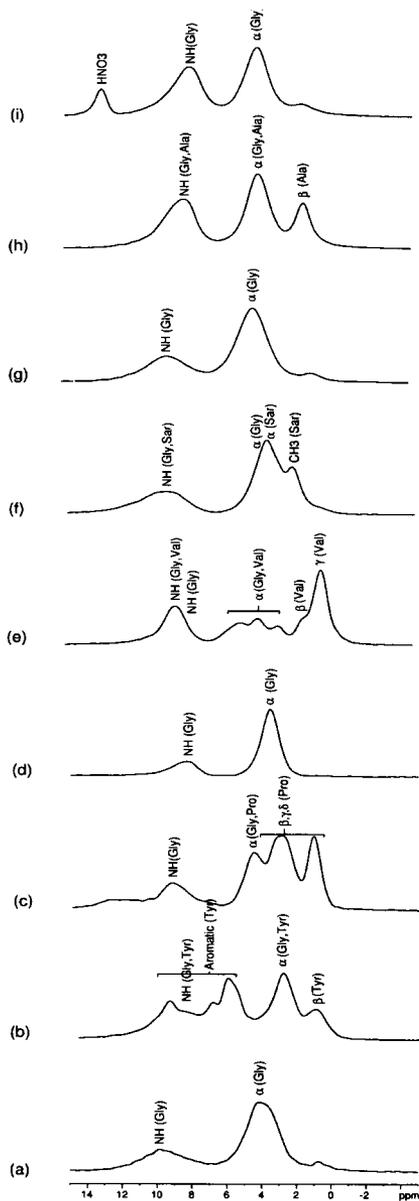


Figure 3 The FSLG ^1H MAS NMR spectra of glycine-containing peptides and polyglycines at MAS rate of 12 kHz. (a) polyglycine (form II), (b) Tyr-Gly-Gly, (c) Pro-Gly-Gly, (d) Gly-Gly, (e) Val-Gly-Gly, (f) Sar-Gly-Gly, (g) polyglycine (form I), (h) Ala-Gly-Gly, and (i) Gly-Gly \cdot HNO_3 .

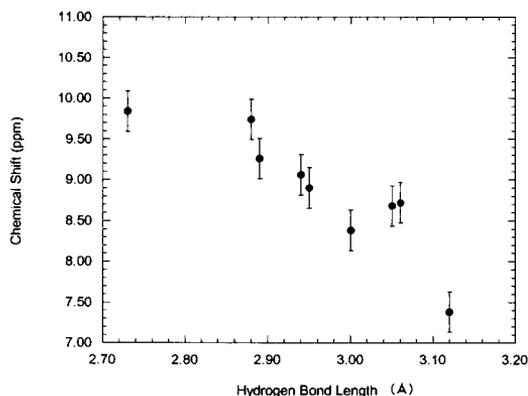


Figure 4 Plots of the determined ^1H chemical shift values(δ) of hydrogen-bonded Gly amide protons of Gly-containing peptides and polyglycines in the solid state against their hydrogen-bond lengths between amide nitrogen and oxygen atoms($R_{N...O}$) as determined from X-ray diffraction. The bars indicate the experimental errors in the spectra.

参考文献

- [1] M. Lee, W.I.Goldburg *Physical review* **140A** 1261 (1965)
- [2] A.Bielecki, A.C.Kolbert, M.H.Levitt, *Chem. Phys. Lett.*, **155**, 341 (1989)
- [3] K.Yamauchi, S.Kuroki, K.Fujii, I.Ando, *Chem. Phys. Lett.*, **324**, 435 (2000)
- [4] 山内、黒木、藤井、安藤 第38回NMR討論会, 48 (1999)

^{14}N overtone NMR 間接測定法のペプチドへの応用

(京大院理) ○矢野友海、竹腰清乃理、寺尾武彦

Application of indirect measurement of ^{14}N overtone NMR to peptides

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

○Tomomi Yano, K. Takegoshi, and Takehiko Terao

We have developed a technique to recouple ^{13}C - ^{14}N heteronuclear dipolar interactions under magic angle spinning (MAS) by applying cw rf irradiation at the overtone frequency between the $|+1\rangle$ and $|-1\rangle$ states of a ^{14}N ($I = 1$) spin[1]. High resolution ^{13}C NMR spectra of some peptides are measured under ^{14}N overtone irradiation and ^{14}N overtone NMR spectra are obtained by correlating ^{14}N overtone irradiation frequencies and ^{13}C line broadening. We will also discuss structural informations of peptides that can be extracted from the obtained ^{14}N overtone NMR spectra.

窒素はタンパク質やペプチドの主鎖を構成しており、それらの構造を知る上で重要な手がかりを与える元素である。窒素の同位体 ^{14}N は天然存在比が 99.63 % と高いにもかかわらず、数 MHz という大きな四重極相互作用により高分解能測定が非常に困難なためにその NMR はほとんど利用されていなかった。この問題を克服するために ^{14}N の $|+1\rangle$ と $|-1\rangle$ の状態間の遷移、すなわち overtone 遷移を観測する手法が開発された[2]。本来、overtone 遷移は禁制であるが、四重極相互作用により遷移が可能となっている。 ^{14}N の overtone 遷移の共鳴周波数は四重極相互作用の 1 次のシフトの影響を受けず、2 次のシフトの影響を受ける。したがって四重極相互作用の 1 次のシフトの影響を受ける $\Delta m = 1$ の遷移に比べて高分解能のスペクトルが得られることが期待される。Stewart らは、単結晶のペプチドの ^{14}N overtone NMR スペクトルを測定することによってペプチドの主鎖の二面角に対する知見を得ることを提案している[3]。しかし overtone の遷移確率は小さいため、一般に粉末試料の ^{14}N overtone NMR を直接測定することは難しい。そこで我々は、粉末試料の ^{14}N に overtone 照射することによって MAS 下において平均化されている ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用を復活させる手法[1]をペプチドに応用し、アミド窒素の四重極相互作用を求める手法を開発した。この実験では ^{14}N overtone 照射の下で ^{13}C の高分解能 NMR 測定を行い、照射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で間接的に ^{14}N overtone NMR スペクトルを得る。

^1H と ^{13}C の共鳴周波数はそれぞれ、400.28 MHz および 100.66 MHz、MAS 回転速度は 5.35 kHz

キーワード： ^{14}N overtone、 ^{13}C - ^{14}N 双極子相互作用、MAS、ペプチド

やのともみ、たけごしきよのり、てらおたけひこ

で測定を行った。Figure 1.に種々の周波数で ^{14}N overtone を照射したときおよび照射していないときの L-alanylglycylglycine (AG_1G_2)の3つの C_α のピークを示した。3組の C_α - ^{14}N の双極子相互作用はそれぞれ 57.832 MHz、57.890 MHz、57.898 MHz のラジオ波を照射したときに復活していることがわかった。Figure 2.に AG_1G_2 の四重極結合定数[3]を用いてシミュレートした MAS 下の ^{14}N overtone NMR スペクトルを示した。ただし、アラニン残基のアミノ窒素の四重極結合定数は決定されていないために L-alanine の ^{14}N の値を代用した。3組の C_α - ^{14}N の双極子相互作用が復活したときの照射周波数は Figure 2.のシミュレーションから予想される周波数とおよそ一致していることが示された。この測定法は、 ^{14}N に結合している ^{13}C を通して間接的に ^{14}N overtone NMR 測定を行っているので個々の ^{14}N の overtone NMR スペクトルを独立に得ることができるという利点がある。このようにして得られたスペクトルから ^{14}N の四重極相互作用に関する情報、さらにはペプチドの構造に関する情報を得ることを検討している。

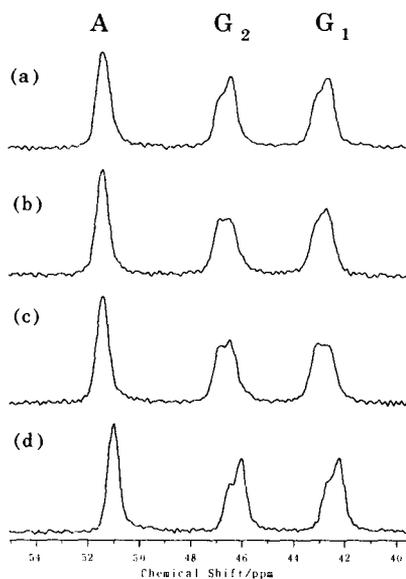


Figure 1. The ^{13}C NMR spectra of L-alanylglycylglycine under the ^{14}N overtone irradiation at 57.832 MHz (a), 57.890 MHz (b) and 57.898 MHz (c) and without irradiation (d).

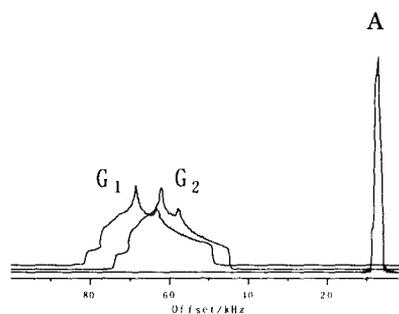


Figure 2. The simulated ^{14}N overtone NMR spectra of L-alanylglycylglycine (AG_1G_2) under MAS in a 9.4 T static field. Offset is calculated from 57.825 MHz.

References

- [1] 矢野友海、武田和行、竹腰清乃理、寺尾武彦、第38回 NMR 討論会講演要旨集, 225 (1999).
- [2] R. Tycko and S. J. Opella, *J. Chem. Phys.* **86**, 1761 (1987).
- [3] P. L. Stewart, R. Tycko, and S. J. Opella, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **84**(11), 3803 (1988)

¹H decoupling with third averaging in solid NMR

(京大院理) 竹腰清乃理、○溝上 潤、寺尾武彦

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

K. Takegoshi, ○ Jun Mizokami, and Takehiko Terao

We show that, by appropriately modulating rf amplitude of the two pulse phase modulation (TPPM) ¹H decoupling sequence in solid NMR, appreciable improvement of decoupling efficiency is achieved. Theory for optimal modulation is developed, and its efficiency is attributed to third averaging.

固体 NMR において ¹³C・¹⁵N 等の高分解能スペクトルを得ようとする場合、¹H との間の異種核双極子相互作用による、スペクトル幅の増大が問題となる。この問題を解決するために、固体高分解能 NMR では通常、¹H decoupling という技術が用いられる。これは、¹H 核に強いラジオ波を照射することで、¹H との異種核間双極子相互作用を平均化して取り除いてしまう技術である。

¹H decoupling の手法として、¹H 核に continuous wave (CW) を照射する CW-decoupling が標準的に用いられてきた。CW-decoupling の登場後も decouple 効率のさらなる向上を目指していくつかの手法が考案されたが、その中の 1 つである two pulse phase modulation (TPPM) decoupling [1] では、位相の異なる 2 種類のパルスを交互に照射することで decouple 効率を大幅に向上させた。この効率向上は、phase modulation による "second averaging" に起因する。今回、我々は TPPM decoupling に amplitude modulation を加えることによって "third averaging" を引き起こす実験 (Amplitude-Modulated TPPM:AM-TPPM) を考案し (Fig.1)、実際に ¹³C スペクトルでの分解能向上を確認した。

【理論】

まず、¹H-¹³C の 2 スピン系 (I-S) に TPPM decoupling を適用した場合 (Fig.2) を考える。この場合、¹H のハミルトニアンは次式のように表される。

$$H(t) = H_{rf1} + H_{rf2}(t) + H_{lb}(t) \quad (1)$$

$$H_{rf1} = \nu_1 \cos \phi I_X, \quad H_{rf2} = s(t) \nu_1 \sin \phi I_Y$$

H_{lb} は、S スピンのスペクトルの線幅増大に影響を及ぼすような相互作用を表す。また、 $s(t)$ は周期 ν_{PM} の方形波関数であり $s(t) = \pm 1$ である。

このハミルトニアンを、 $U_0(t) = \exp(-iH_{rf1}t)$ で表されるような回転系から見ると次のようになる。

$$\tilde{H} = U_0^{-1}(t) H_{rf2}(t) U_0(t) + U_0^{-1}(t) H_{lb}(t) U_0(t) \quad (2)$$

キーワード: ¹H decoupling, solid NMR, third averaging, TPPM

たけごし きよのり、○みぞかみ じゅん、てらお たけひこ

理想的には、 $H_{rf1} \gg H_{lb}$ であれば、 H_{lb} は平均化されて0になるはずである。しかし、実際には照射 RF 波の周波数オフセット等の効果により、完全にゼロになることは無い。この、平均化されずに残った成分を $H_{lb}^{(1)}$ とする。また、 H_{rf1} と H_{rf2} は可換ではないため、 H_{rf2} が平均化されずに残るためには、 $v_{PM} = |v_1 \cos \phi|$ の共鳴条件を満たす必要がある。この共鳴条件を満たした場合、 H_{rf2} は回転系において時間依存しない成分を持つようになるので、ハミルトニアンの一部は平均化されずに残るようになる。この、残った成分を $H_{rf2}^{(0)}$ とすると、式(2)は次のようになる。

$$\tilde{H} = H_{rf2}^{(0)} + H_{lb}^{(1)} \quad (3)$$

$H_{lb}^{(1)}$ は $H_{rf2}^{(0)}$ と可換ではないので、 $H_{rf2}^{(0)} > H_{lb}^{(1)}$ のときは、 $H_{lb}^{(1)}$ は $H_{rf2}^{(0)}$ による decoupling の効果を受けてなお一層小さくなる(second averaging)。以上が TPPM の大まかな原理である。

ここまでは RF 強度 v_1 は時間に依らず一定であったが、これを $v_1 \rightarrow v_1 + v_3 \cos(2\pi\nu_{AM} t)$ と置き換える(amplitude modulation)。すると式(1)は次のようになり、新しい項 H_{rf3} と H'_{rf3} が現れる。

$$H(t) = H_{rf1} + H_{rf2}(t) + H_{rf3}(t) + H'_{rf3}(t) + H_{lb}(t) \quad (4)$$

$$H_{rf3} = v_3 \cos(2\pi\nu_{AM} t) \cos \phi I_X, \quad H'_{rf3} = s(t)v_3 \cos(2\pi\nu_{AM} t) \sin \phi I_Y$$

ここで、先程と同様に $U_0(t) = \exp(-iH_{rf1}t)$ の回転系からハミルトニアンを見た場合、 H_{rf3} は H_{rf1} と可換なので、回転による影響を受けない。一方の H'_{rf3} は H_{rf1} と可換ではなく、また、一般には $U_0(t)$ による回転との共鳴条件を満たさない。よって、この回転系においては、 H'_{rf3} は平均化されて消えてしまう。以上より、この回転系でのハミルトニアンは次式のようになる。

$$\tilde{H} = H_{rf2}^{(0)} + H_{rf3} + H_{lb}^{(1)} \quad (5)$$

ここで second averaging の効果を見るために、さらに $U_1(t) = \exp(-iH_{rf2}^{(0)}t)$ となるような回転系に移るのだが、このときに、 v_{AM} を $U_1(t)$ による回転と共鳴するように選んでやると、 H_{rf3} の成分の一部は $U_1(t)$ の回転によって消えず、新しい回転系でのハミルトニアンは次式の様になる。

$$\tilde{\tilde{H}} = H_{rf3}^{(0)} + H_{lb}^{(2)} \quad (6)$$

(3)式と同様に、second averaging を ”生き延びた” $H_{lb}^{(2)}$ が、 $H_{rf3}^{(0)}$ により小さくなる (third averaging) ことが期待される。

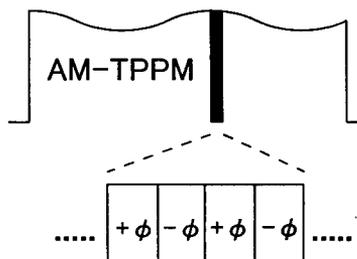


Fig.1. Pulse sequence for AM-TPPM decoupling.

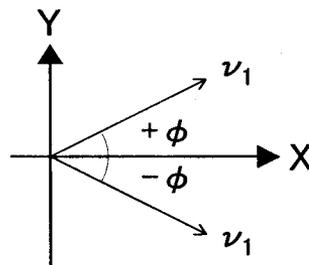


Fig.2. Two RF fields of TPPM decoupling in rotating frame.

References

- [1] A.E.Bennett, C.M.Rienstra, M.Auger, K.V.Lakshmi, and R.Griffin, *J. Chem. Phys.* 103, 6951(1995).

Magic Angle Spinning モジュールの

タービン形状の最適設計

理化学研究所 ○仲村 高志

Design of turbine for Magic Angle Spinning

RIKEN(Institute of Physical and Chemical Research) Takashi Nakamura

Magic Angle Spinning (MAS) is one of the most important techniques for high-resolution solid-state NMR experiment. We developed the much easier mechanical design of turbine impeller about MAS spinner. Some impellers designed for stabilize sample spinning at low speed and high speed, respectively. Also, we will report the design of the impeller for fast sample spinning.

はじめに 近年、MAS の高速回転の開発はメーカー主導に変化し、サンプル管の直径を小さくすることにより成し遂げられ、現在市販されているプローブとしては 35kHz(ϕ 2.5mm)が最高速である。しかし、本年の ENC では Samoson により、50kHz が報告された。これにより、MAS の高速化は新しい段階に達したと考えられる。これは、固体の測定でも、さらに高磁場化が進んできていること、高速 MAS 下でも交差緩和が行える手法が開発されてきたからである。

MAS が 35kHz(ϕ 2.5mm のサンプル管)で停止していた理由は二つの面で捉える事が出来る。一つは、アプリケーションからみて十分に高速な速度に達していたと考えられていたからである。MAS の高速化は、主に ^{19}F の信号の解析を可能にするために行われてきており、500MHz 程度の磁場強度においては 35 kHz で解析可能なレベルにある信号が得られていた。それ以外の核種の測定では、 ^1H はスピンの多量に存在し、かつ双極子相互作用が非常に大きいため、35kHz ではリーズナブルでない。また、交差緩和(Cross Polarization)を使用した測定では、高速になるにしたがって交差緩和と回転速度が干渉するため、交差緩和による信号の増大が得られなくなり高速化のメリットがなかったことである。もう一つは、ハードウェアからの要請である。直径を小さくすることにより、ドライブする物質の容量を減らし、相対的な駆動力を上げることで高速化を達成する。このため、サンプル量が非常に少なくなること(ϕ 5mm の約 10 分の 1)になり、サンプルおよびサンプル管に細心の注意が必要となる。さらに、駆動するためのタービンの加工が非常に難しくなるためである。

キーワード 固体高分解能 NMR 高速 MAS タービン

なかむら たかし

実験と考察

Chemagnetics CMX用φ5mmのサンプル管のドライブチップをリファレンスとし、このドライブチップと同寸のものを、通常に調達可能な直径1mmのエンドミルを使用し、3軸のフライス盤で加工出来るデザインで作成した。タービンはドライブエアに対して30度の角度をもつ5枚のインペラで実験を行った。(Fig.1)ドライブチップの材質はKel-Fを使用した。

市販のインペラは12枚で構成されており、この段階でも市販品のほうが効率良く回転することが予想できる。実験では、それぞれのドライブチップを装着したサンプルチューブをサンプル無しで回転させ、それぞれの安定性を比較したものがTable.1である。回転の安定性は市販品のほうが、格段に優れているが、最高到達速度はほとんど変わらないし、市販のものでも回転が良好でないものも存在し、メーカーの保証速度に達しないものもあった。

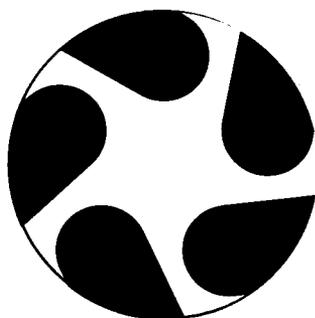


Fig.1 Design of impeller for sample spinning
(Bottom view)

このような簡単なタービンでもドライブエアの経路を十分に考慮し、設計すれば回転速度は得られる。さらに、加工精度を向上し、インペラを直線ではなく、曲線で構成し、駆動部での真空の発生を防ぐような加工を行えば、速度の向上と回転の安定性が得られる。

より詳細な実験結果はポスターにて紹介する

	Bearing(kPa)	Drive(kPa)	Speed(Hz)	S.D.
Vespe(Chemagnetics)	220	50	4074.8	1.2
	220	100	6716.6	1.1
	220	200	9425.8	61.3
MAX	380	260	10266.9	22.8
Kel-F	220	50	2017.1	32.7
	220	100	3399.5	98.7
	220	200	5163.7	236.9
	220	300	8465.9	205.3
	220	400	9291.8	245.5
MAX	180	400	10173.6	8.7

Table 1: Various speeds measured at each 1 seconds and averaged 10 min. spinning.

高温 *in-situ* T₁-SPRITE イメージングによる石炭軟化溶解過程解析

(新日本製鐵(株) 先端技術研究所) ○齋藤公児 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 T₁-SPRITE Microimaging Method based on Magnetization Preparation Techniques

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

a; Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Laboratories, b; JEOL Ltd.

Recent modified SPI, single-point ramped imaging with T₁ enhancement (SPRITE), consist of a ramped phase encode gradient in the primary phase encode direction and conventional phase encode gradients in the other directions. The use of a ramped phase gradient permits imaging with greater speed and with lower dB/dt, which is minimizes gradient vibration with compared with SPI. At the same time, a great time improvement is achieved with sample where T₁ relaxation times are on the order of the gradient rise time. Magnetization preparation is easily incorporated into the SPRITE sequence by sampling a single k-space point after each magnetization filter application. Balcom et al. have demonstrated that magnetization preparation permits accurate T₂ and T₁ mapping of samples with short relaxation times. In this paper, we at first are demonstrating 3D-SPRITE which has shown to be successful for studying short relaxation time systems and which is free from distortions due to susceptibility variations for coals with high resolution at a frequency of 400 MHz. The results obtained were discussed in relation to the three dimensional distribution of mobile component for 2 kinds of coal.

At the same time, inversion recovery preparation experiments (T₁ mapping), T₂* mapping based on SPRITE methods are presented in order to clarify the chemical heterogeneity of coals.

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⁾。特に石炭を対象に考えた場合、石炭自身がダイナミックに変化する軟化溶解の姿を *in-situ* で観測できれば、そのメカニズム及びコークスへの利用を考える上でも非常に有用と思われる、我々は高温温度可変 NMR イメージングを行うためのシステムを構築し、軟化溶解現象を初めて捉えることに成功し、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 *mobile* 成分の挙動から明らかにした²⁾。その結果次に、*mobile* 成分はなにかという疑問が生じる。そこで、従来の SPI 法と比較して感度も良く、プローブへのダメージも少ない (SPRITE single-point ramped imaging with T₁ enhancement) 法を利用し、脂肪族と芳香族の T₁ が異なることに注目し、T₁-SPRITE イメージング法³⁾から、石炭の軟化溶解挙動に関して、興味深い知見を得たので報告する⁴⁾。

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 であった。基本となる T₂* と T₁-SPRITE シーケンス及び実験状況を Fig.1 に示す。また *in-situ* 測定での一画像測定時間は約 5 分であった。主な測定条件は、パルス幅は 4 μs、echo 時間は 80 μs で、繰り返し時間は 10ms、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低いウイトバンク炭で、約 3 mm の粒を使用した。

イメージング、SPRITE イメージング、石炭

さいとう こうじ、こまき いくお、はせがわ けんいち

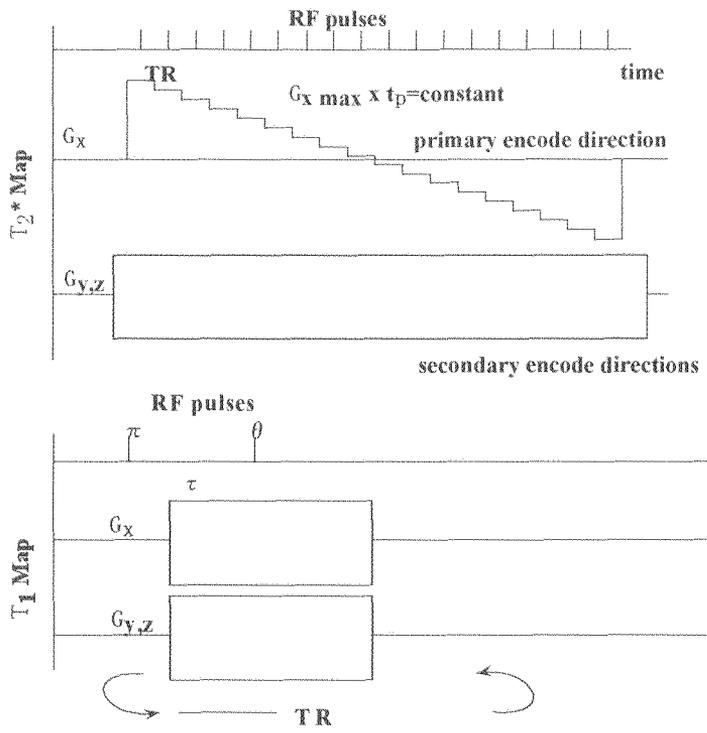


Figure 1 The pulse sequence of in-situ T_2^* and T_1 -SPRITE

3. 結果と議論

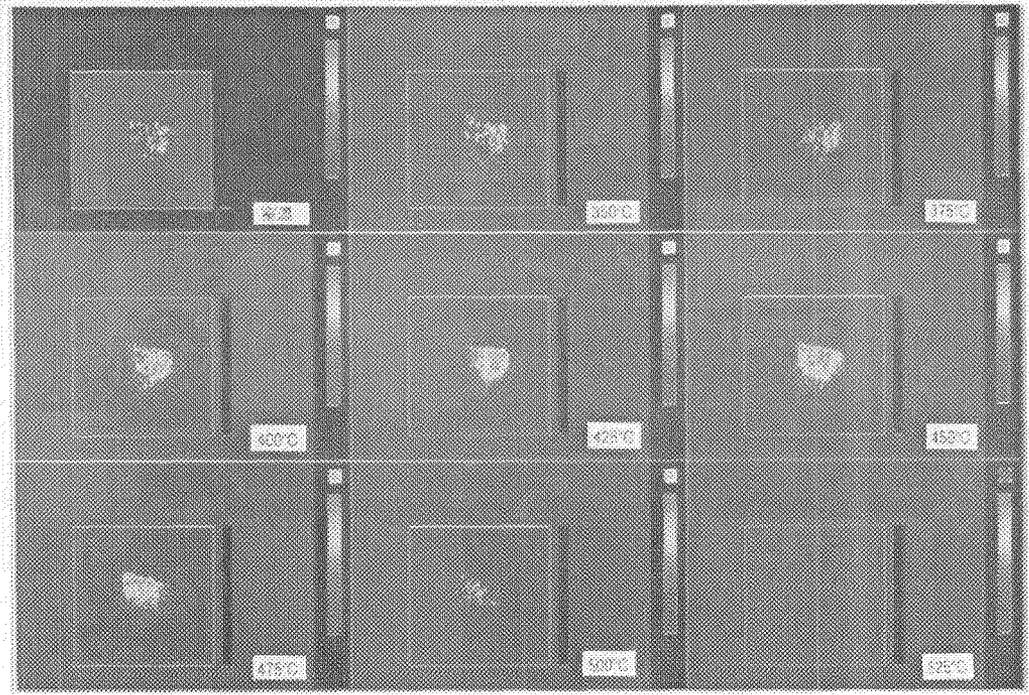


Figure 2 In-situ SPRITE Imaging of Goonyella Coal

構築した本システムで粘結性の高いグニエラ炭の T_1 -SPRITE 高温 in-situ イメージングを行った結果を Fig.2 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。対して、粘結性の低いウイトバンク炭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かった。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わかった。また SPRITE 法の採用で、従来の SPI 法と比較し、情報の差別化と短時間（8分→5分）で且つ S/N の高い測定が可能となった。

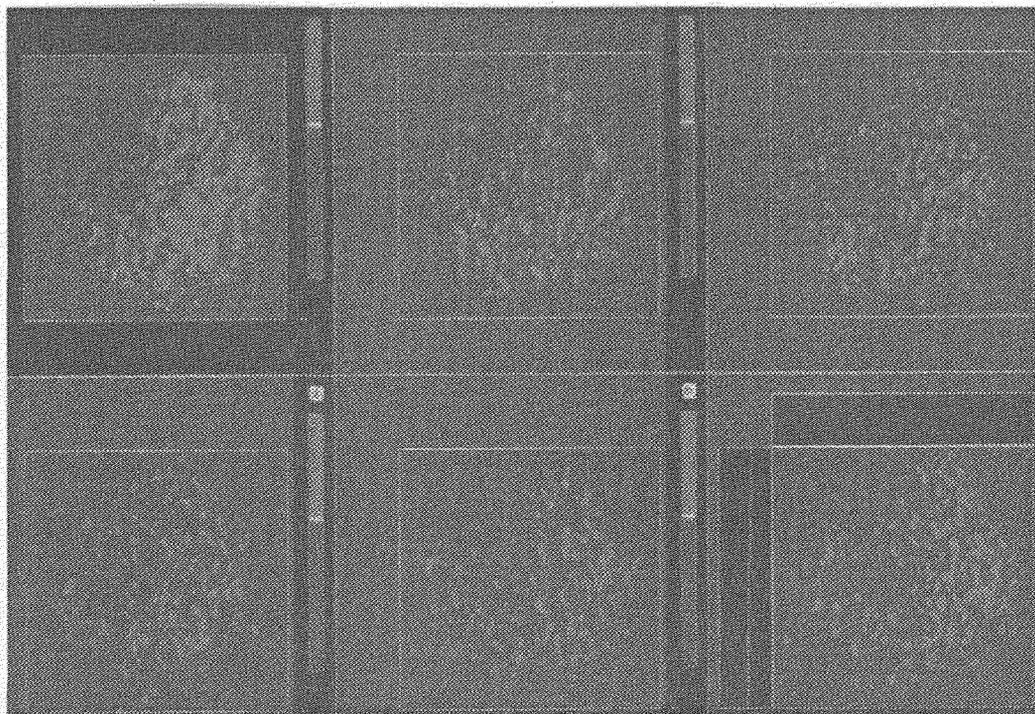


Figure 3 T_1 -SPRITE Images of Goonyella at various τ values

高温で増加・拡大する mobile 成分の正体を特定するために、 T_1 及び $T_1 \rho$ -CRAMPS 法から求めた脂肪族と芳香族の T_1 が異なることに着目し、 T_1 -SPRITE イメージングを実施した結果を Fig.3 に Goonyella、Fig.4 に Witbank を示す。Goonyella の場合、異なる τ 値による脂肪族と芳香族の T_1 値でのコントラストにほとんど差がない。これは両者の存在位置がほとんど同じためと思われる。対して、Witbank ではその存在位置が τ 値によってかなり異なり、いくつかの脂肪族リッチドメインができています。実際に高温 in-situ T_1 -SPRITE イメージングを行った場合、脂肪族リッチドメインは先に揮発していくことが明らかとなり、軟化溶解には脂肪族と芳香族が適度に混在した mobile 成分が重要な役割を果たしていることがわかった（データは当日示す）。つまり軟化溶解は脂肪族と芳香族が適度に共存してはじめて、粒内に拡がるのが可能となり、そのような分布を持つ炭種が軟化溶解性が高いと考えられる。

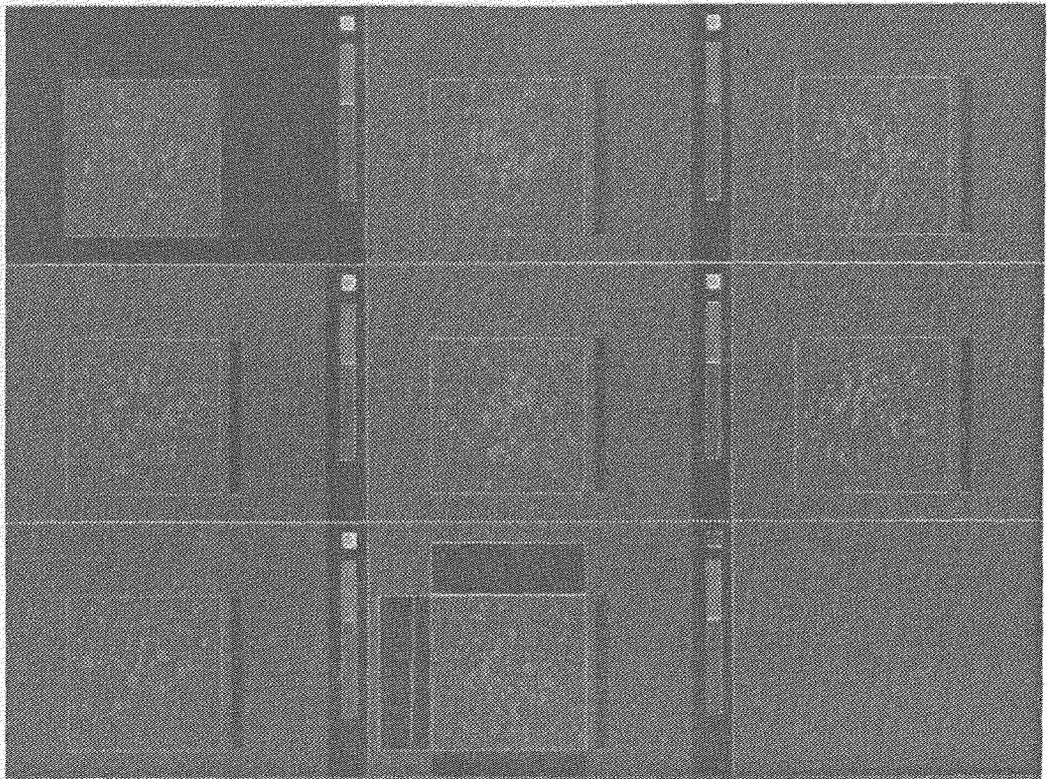
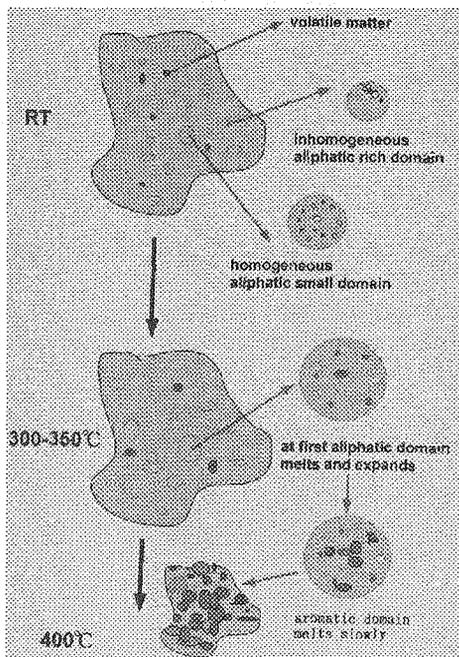


Figure 4 T₁-SPRITE Images of Witbank at various τ values

4. まとめ



今回開発した高温 in-situ T₁-SPRITE イメージング法は、石炭の軟化溶解過程を解析する上で非常に有効なツールである。また解析の結果から粘結性の高い石炭と低い石炭では mobile 成分の中身が異なる (Goonyella では同一 mobile 成分の分布中に脂肪族と芳香族が混在、Witbank では混在程度が低い) ことを明らかにでき、Fig.5 のような石炭軟化溶解モデルを提案できた。このモデルは既に鷹薮らによって提案されている自己溶解モデル⁵⁾と基本的な考え方は矛盾しない。

Figure 5

Our proposed softening & melting model for Coals

参考文献

- 1) B.Bluemich, P.Bluemler. and K.Saito, in 'Solid State NMR of Polymers' J.Ando and T.Asakura Ed. 1998, 123
- 2) K.Saito, I.Komaki, K.Hasegawa and H.Tsuno, Fuel 79 (2000), 405 他
- 3) S.D.Beyea, B.J.Balcom and P.J.Prado, J.Magn.Reson. 135,(1998),194

4) K.Saito, I.Komaki and K.Hasegawa, Solid State NMR ,submitted

5) T.Takanohashi, M.Iino, K,Katoh and K.Fukada, Tetsu-to-Hagane,82,(1996),22

Stray-Field-Imaging 法による高分子への溶媒浸透メカニズムの解析

新日本製鐵(株)先端技術研究所¹⁾、University of Surrey²⁾

○齋藤公児¹⁾、J.Godward²⁾、P.J.McDonald²⁾

The dynamic study of solvent ingress into rubber belt using STRAFI imaging

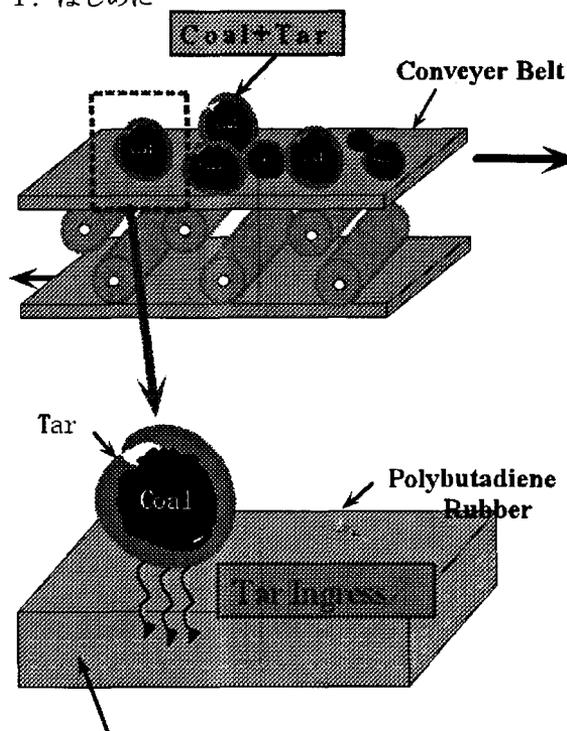
○Koji Saito¹⁾、J.Godward²⁾、P.J.McDonald²⁾

1) Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research lab.

2) University of Surrey Department of Physics

Solvent ingress into polymer is of widespread industrial importance. There are many trouble caused by solvent ingress phenomena in steel works, especially on the case of rubber belt. Experimentally, a rich variety of diffusion dynamics have been observed for liquids ingressing polymers, ranging from Fickian diffusion characterized by uptake varying with time as $t^{0.5}$ through anomalous diffusion to Case II diffusion characterized by uptake varying linearly with time t . In this paper, we at first explore pyridine and acetone solvent ingress into real rubber belt using STRAFI imaging and show the mechanism of ingress respectively. And we also present a special mechanism of Case II diffusion of tar into rubber arising from low surface flux of ingressing species. STRAFI imaging is powerful and useful to clarify the mechanism of tar ingress phenomena into real rubber belt.

1. はじめに



nylon code ; defense from Tar ingress

Fig.1 The scheme of Tar ingress into Rubber belt

高分子、イメージング、STRAFI

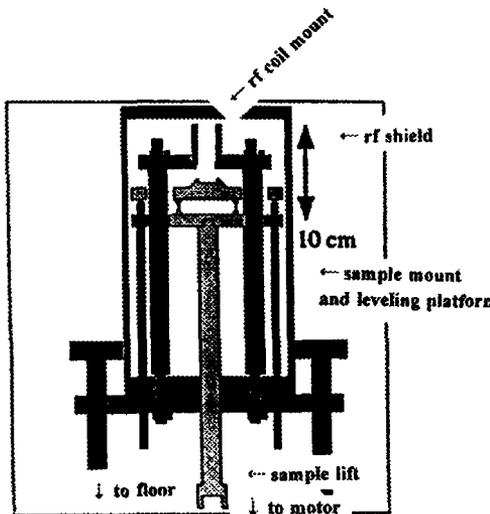
さいとう こうじ、じょん ぐっどわーど、ぴーたー まくどなるど

NMR イメージングは非破壊測定であるため、材料解析への応用にも期待されている¹⁾が、実材料に応用する場合、試料の線幅が重要な問題となる。大きな磁場勾配を持つ SCM の漏洩磁場を利用する STRAFI (STRAy Field Imaging) 法が 1988 年に Samoilenko ら²⁾から提唱されている。STRAFI 法では 9.4T の 89mm ポア径の SCM で約 50T/m 程度の磁場勾配が得られるため、線幅の非常に広い試料に対しても有効である³⁾。今回 STRAFI 法を実際の現場で生じている実材料での問題解決に応用した。製鉄所では原燃料の搬送に多くのゴムベルトが利用されているが、Figure1 のようにゴムベルトが膨潤し、搬送不能に陥るトラブルが多々あった。その主原因は、ゴムベルトへのタールの浸透と考えられるが、そのメカニズムは不明な点が多かった。そこでゴムベルトにタールがどのように浸透し且つそのメカニズムはどうなっているを検討するために、タールのモデルとして、ピリジンとアセトンそして実際のタールを使用して浸透過程を STRAFI 法で追跡し、興味深い結果を得たので報告する⁴⁾。

2. 実験

(1) 試料の調整と実験

アセトンとピリジン及びビタールの浸透過程解析に利用したゴム搬送ベルトはポリブタジエン系の実際に製鉄所で使用されているもので、張力強化の意味で、ナイロン繊維での強化が施されている。測定は9.4TのWB-SCMで58T/mの磁場勾配下で、Chemagnetics (VARIAN) CMX-400 Infinity及び自製のプローブ (Figure 2) で行われた。1次元のイメージング測定を共鳴周波数は236.82 MHz、パルスシーケンスは quadrature echo sequence を使用し、 τ 時間は $60 \mu\text{sec}$ で実施した。代表的な積算回数は32回程度で、約0.5時間毎に測定を実施し、in-situ で浸透過程を追跡した。磁場勾配量が一定であるため、試料を機械的に動かす事で位置情報を得た。このプローブでは、rf コイルと独立にサンプル設置面が動くように設計されている。また B1 に水平に於かれたサドル型コイルを使用している。Figure 3 に典型的な STRAFI の測定結果を示す。2つの試料の測定結果を併記してある。ひと固まりの測定結果の中は FID 信号の集団であることが容易にわかり、それぞれが測定に際して試料位置を動かした結果に対応しており、横軸は位置情報を反映している。この各 FID 信号に、例えば double-exponential 曲線を fit させ、T2 の long 成分と short 成分を得て、各位置における T2 値や成分比をつなぎあわせる事でイメージング profile を作り出すことができる。



● The University of Surrey
Department of Physics

Figure 2

A schematic diagram of a one dimensional stray field profiling probe

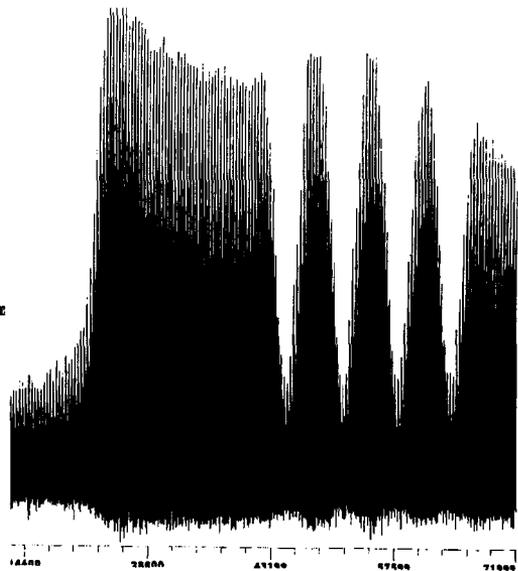


Figure 3

The echo profile of rubber bricks 2mm thick with 3 nylon codes reinforced

3. 結果

アセトンとピリジン溶媒の浸透現象追跡を STRAFI 法で追跡した結果を Fig.4 に示す。時間経過につれて、溶媒がゴムベルト中に浸透し、徐々に信号が増加していることが明らかにわかる。また興味深いことに、ナイロンコード以降への溶媒の浸透は観測されず、張力強化のためのナイロンコードが溶媒による膨潤も防いでいたことがわかった。Fig.5 に示すような結果を利用して $Y=AX^B$ (Levenburg-Marquardt) の回帰でフィッティングした⁵⁾。ここで A,B が浸透過程の性質を表すパラメータとなり、B の値が 0.5 程度で Fickian 型拡散、1.0 程度で Case II 型拡散と考えられている。解析の結果、ピリジンは Case II 型拡散、アセトンは Fickian 型拡散と帰属され、定法に従って式を解くとアセトンでは ($A=0.39, B=0.42, D=2.11 \cdot 10^{-11} \text{m}^2/\text{sec}$)、ピリジンでは ($A=0.48, B=0.93, D=2.54 \cdot 10^{-11} \text{m}^2/\text{sec}$) と拡散係数を得ることで、コンベアベルトの膨潤のメカニズム等を検討する上で貴重な情報を得ることができた。

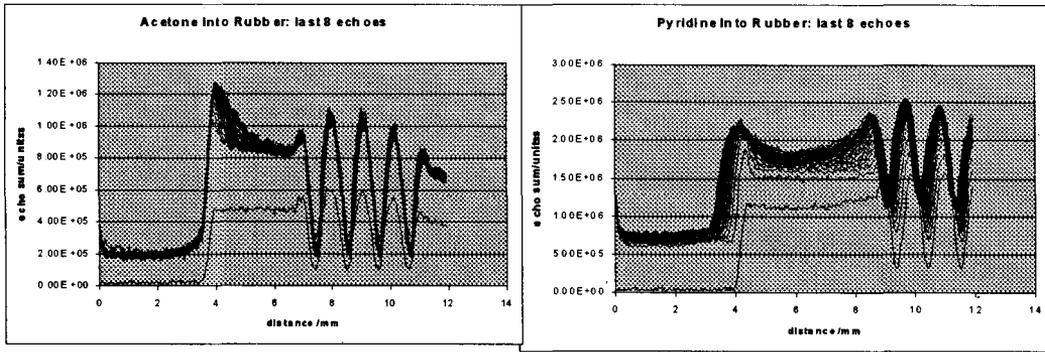


Figure 4 Profiles of pyridine or acetone ingressing rubber belt. Times between profiles are about 300 minutes. Data from summation of last 8 echoes

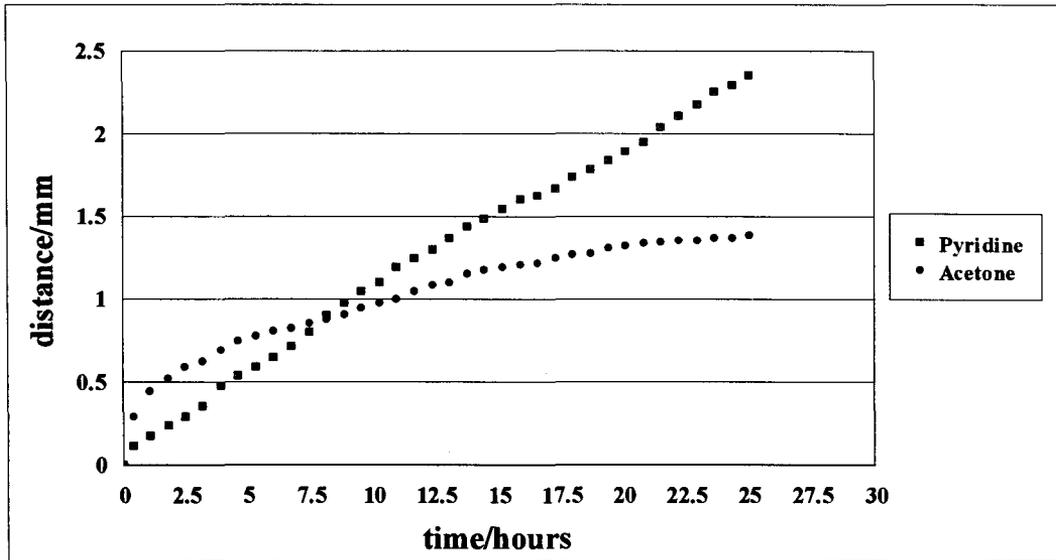


Figure 5 Movement of acetone or pyridine ingress front into the rubber ; experimental and fitted data

実際の現場ではタールによるベルト膨潤が起きていることが明らかで、その主原因はピリジン等の成分であり、アセトン等の成分ではないことが他の実験からわかっている。そこで上記の知見を利用して、タールでの浸透過程実験を実施した。タールはピリジンやアセトン以外に様々な溶媒が混在しており、その浸透過程のメカニズムは非常に複雑と考えられる。実際に得られた結果も、Fig.6 に示すようにタールの浸透パターンとゴムの構造緩和パターンが異なることがわかり、タール揮発成分の挙動が表面側で flux が強く作用しているためと思われる、また他の溶媒成分が Fickian 型拡散と Case II 型拡散でベルトに浸透していく現象が混ざり合った挙動となっている。この結果はトルエンとポリスチレンでの場合やいくつかの混合溶媒の場合と似た挙動であった⁶⁾。現在この理論的なモデル構築が検討されているが、表面での flux が減少するにつれて Fickian から Case II に移行することがわかっている。つまり実際の現場では、タール中の揮発成分が多く存在している場合には、まずタール中のアセトン等の成分が Fickian 型拡散で浸透し、その後揮発成分が表面近傍でなくなるにつれて、ピリジン成分等による Case II 型拡散に変わっていくと推定できる。この結果を受けて、現場で揮発成分の蒸発を阻害し、Case II 型拡散に移行しにくいことを狙ってベルト上をカバーで被った所、タールによるベルトの膨潤現象は低下し、現場トラブルは大幅に減少した。

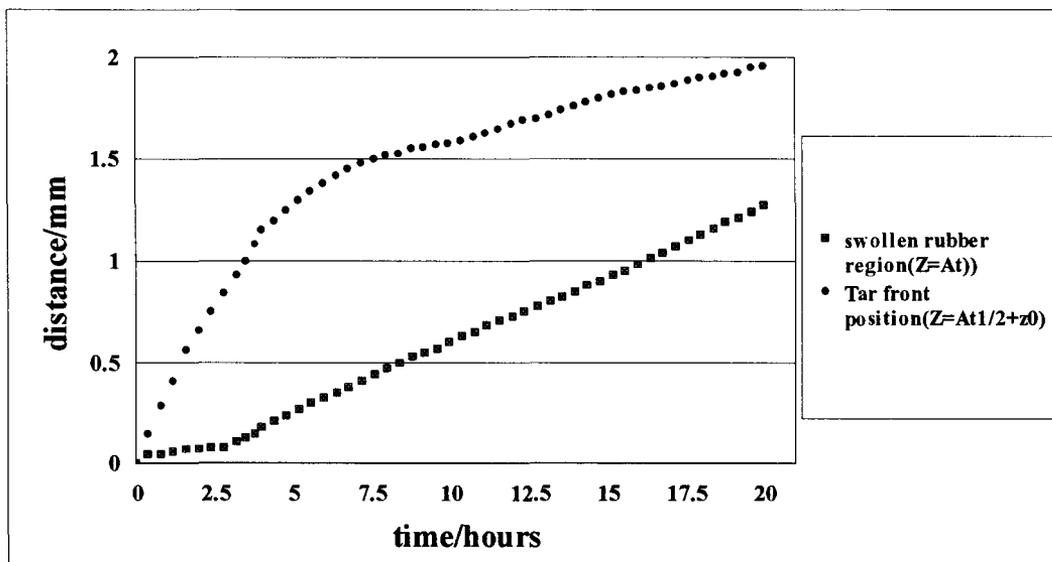


Figure 6 The tar front position relative to the original sample surface as function of time.
The width of the swollen rubber region for vapour ingress into rubber.

4. まとめ

STRAFI 法は従来法ではイメージングできなかった T2;50 μ sec 以下の固体高分子材料の解析に有効であり、また本研究のような溶媒の浸透過程解析に関しても、得られる情報としては一次元 Projection ではあるものの、溶媒と高分子の挙動解析が同時にできることから非常に有益な情報が得られる。STRAFI 法を含めた NMR イメージング法は高温で材料変化や溶媒と高分子の相互作用等の「現象の変化」を in-situ で捉えることのできる貴重な非破壊手法と考えられる。また最近開発されている薄膜解析法⁷⁾を含めて、今後 STRAFI 法は材料解析を行う上で幅広く活用される可能性が高い。

参考文献

- 1) B.Bluemich., P.Bluemler. and K.Saito, in '*Solid State NMR of Polymers*', I.Ando and T.Asakura Ed. 1998, 123. Elsevier, 1998
- 2) A.A.Samolienko et al. , JETP Lett., 47 (1988) 348
- 3) P.J.McDonald , Progress in NMR Spectroscopy , 30 (1997) 69
- 4) K.Saito et al. , J.Mater.Science, 74 (1998) 415
K.Saito et.al. , Fuel , submitted
- 5) N.L.Thomas and A.H.Windle, Polymer 23 (1982) 529
- 6) J.Godward, R.Sackin and P.J.McDonald ,proceeding of 30th AMPERE, 2000 (in press)
- 7) P.M.Glover et al. J.Magn.Reson. 126, (1999) 207

固体高分解能¹³C NMRによるバクテリオ ロドプシンの電荷依存構造変化の解析

¹姫路工業大学、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、Richard Needleman²、
Janos K. Lanyi³、内藤 晶¹、斉藤 肇¹

Charge Dependent Conformational Changes in Bacteriorhodopsin as studied by ¹³C Solid State NMR

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, Richard Needleman²,

Janos K. Lanyi³, Akira Naito¹ and Hazime Saitô¹

In the photocycle of bacteriorhodopsin (bR), the first protonation group is Asp85. In order to investigate effects of charge of Asp85 on the conformation of bR, we performed pH titration experiment of [1-¹³C]Val-labeled R82Q mutant, in which Asp85 has a higher pK_a value (7.8) compared with wild type (ca. 2.5), by using ¹³C solid state NMR methods. We found that the protonation state of Asp85 affects the conformation of Val49 probably through the side chain of Thr89. Such charge-induced conformational changes would cause pK_a changes of rather remote protonatable groups in the protein to achieve the proton pump effectively.

[序論] 光駆動プロトンポンプ、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、発色団のレチナールがLys216とシッフ塩基結合している。このシッフ塩基は基底状態ではプロトン化しており、レチナールの光異性化後はこのプロトンがAsp85へ移動することが知られている。このAsp85のプロトン化は、bR分子内で異なる位置にあるGlu194、Glu204およびAsp96の側鎖環境を変化させ、プロトン放出および取り込みを誘起することから、蛋白質分子内での遠達相互作用の存在が示唆されている。これまでの我々の研究において、Asp85を非荷電性残基Asnに置換したD85N変異株において、細胞外側膜表面領域とレチナールポケットに位置するVal49を含む劇的な構造および揺らぎの変化があることがわかった[1-3]。特に細胞外側膜表面領域の構造変化には、Asp85と細胞外側膜表面領域の中間に位置するArg82側鎖が配向することで誘起されることがわかった[2, 3]。本研究では、特にAsp85のVal49への寄与を解析するため、[1-¹³C]Val標識R82Q変異株のpH滴定を固体高分解能¹³C NMRを用いて行った。R82QではAsp85のpK_a値が野生株 (WT; 約2.5) に比べ高いため (7.8)、中性付近のpH変化によりその荷電状態を変化させることができる。これを利用し、Asp85の荷電状態の変化によるbR高次構造変化の解析を行った。

[実験] [1-¹³C]Val標識bRは、[1-¹³C]Valを含む合成培地で高度好塩菌を培養し精製した。標識試料は、5 mM MES/HEPES/TAPS/CHES、10 mM NaCl、0.025% (w/v) NaN₃ (pH6-10) の緩衝液に懸濁し、暗順応のため2~3日23℃で暗所放置し、NMR測定試料とした。100.6 MHz 固体高分解能¹³C NMR測定は、交差分極マジック角回転法 (CP-MAS) を用いた。測定条件は、MAS回転数; 4000 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; 10000-30000回、測定温度は20℃で遮光状態で行った。

固体NMR、コンフォメーション依存化学シフト、膜蛋白質、バクテリオロドプシン、プロトンポンプ

たにおみちかず、つじさとる、Richard Needleman, Janos K. Lanyi, ないとうあきら、さいとうはじめ

[結果と考察] Fig.1に[1-¹³C]Val標識R82Qの¹³C CP-MAS NMRスペクトルのpH変化を示す。pHの上昇に伴い、Val49および低磁場側の177.5 ppm付近(膜貫通ヘリックス; Peak A)の信号が高磁場シフトしており、また175 ppm付近(膜貫通ヘリックス)の信号強度が減少している。同様の信号強度の減少はWT、D85N、T89SおよびV49Aでも観測されるため、pH上昇によってMAS周波数(10⁴ Hz)または¹Hデカップル周波数(10⁵ Hz)と干渉する揺らぎが膜貫通ヘリックスの一部に誘起されることを示している。

pH 6から10の間のpH滴定実験から、Val49およびPeak Aの化学シフト値はpH依存性があることがわかった。pH 6と10間での化学シフト値の差(Δδ)は、Val49が0.27 ppm、Peak Aが0.36 ppmであり、Henderson-Hasselbalchの式から、これらのValの構造変化のpK_aはそれぞれ8.2および8.3であることがわかった。Val49のpH依存変化は、WTにおいても観測されたが(Δδ=0.12 ppm; pK_a=8.8)、T89SではこのようなVal49のpH依存変化は消失していた。これはVal49の構造変化にThr89側鎖のメチル炭素が関与していることを強く示唆する。

一方、R82QにおけるAsp85の荷電状態を可視吸収スペクトルのAsp85のプロトン化を示す618 nmの強度変化から解析すると、この変異株におけるAsp85のpK_a値は7.8であることがわかった。この値はVal49およびPeak Aの構造変化のpK_a値にきわめて近いことから

(Fig.2)、Asp85のプロトン化とVal49およびPeak AのValのそれぞれの主鎖構造変化がほぼ同時に起こることを示している。これらの結果は、実際のbRの光サイクルにおいて、Asp85のプロトン化が、Val49を含む主鎖構造変化を誘起し、他の解離性残基のpK_a変化を誘起しうることを示している。

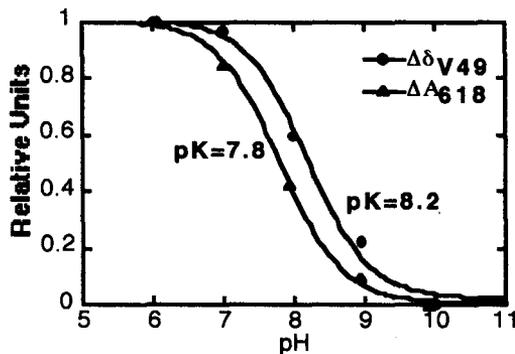


Fig. 2 pH dependent-change of the chemical shift of Val49 and the protonation state of Asp85 (Normalized at pH 6).

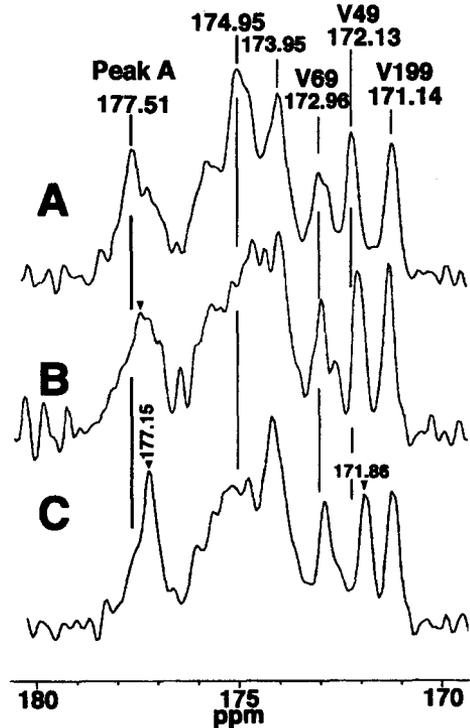


Fig. 1-¹³C CP-MAS NMR spectra of [1-¹³C]Val labeled R82Q at pH 6 (A), 8 (B) and 10 (C).

References

- [1] Tanio et al., *Biophys. J.* 77 (1999) 431-442.
- [2] Tanio et al., *Biophys. J.* 77 (1999) 1577-1584.
- [3] 第38回NMR討論会講演要旨集 P89.

固体NMR法を用いたナイロン6 / クレイの構造解析
 NIST ○浅野敦志、D.L. VanderHart、J.W. Gilman

Morphological Study of Nylon6/Clay Nanocomposites
 by Solid-State NMR

A. Asano,*¹ D.L. VanderHart*² and J.W. Gilman*³

*1,*2: National Institute of Standards and Technology, Polymers Division, USA

*3: National Institute of Standards and Technology, Fire Science Division, USA

*1: present; National Defense Academy, Department of Applied Chemistry, Japan

Solid-state ^{13}C and ^1H NMR techniques, including cross-polarization (CP), magic-angle-spinning (MAS) and multiple-pulse (MP), have been applied to various nylon6/clay nanocomposites to elucidate its morphology. The nylon6/clay nanocomposites, nominally 5% clay by mass, are obtained from both blending and in-situ polymerization with two kinds of clays, one is a synthesized diamagnetic laponite, the other is a naturally occurring, Fe^{3+} containing paramagnetic montmorillonite (mmt). ^{13}C CPMAS spectra reveal that the presence of the clay promotes the growth of the γ -crystalline phase over the usual α phase. Slow cooling ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) after melting produces a dominant γ -crystalline phase, and subsequent annealing at 214°C results in some conversion of the γ to the α phase. Uniformity of clay dispersion in the nylon6/mmt-clay nanocomposites is reflected in the ^1H spin-lattice relaxation time, T_1^{H} , and, more specifically in its paramagnetic contribution to T_1^{H} . This contribution propagates, via spin-diffusion, from the clay surfaces. Morphological information (mass ratio of the α - and γ -crystalline phases of nylon6, relative proximity of each kind of crystal phase to the clay surface, crystal domain size and crystallinity) is deduced using both ^{13}C detection and MP ^1H measurements. For example, the average repeat distance (crystalline plus non-crystalline dimensions) is found to be 15nm for nylon6 and the nanocomposites by the MP ^1H measurement. By assuming a lamellar structure and taking into account ^1H spin-diffusion between the α - and γ -crystalline phases along with the paramagnetic Fe^{3+} contribution from the mmt-clay surface, we succeeded in simulating T_1^{H} relaxation curves for both α and γ protons. This simulation shows that when the γ phase is assumed to lie next to the clay surface, sandwiching the α phase in the central region between clay layers, then the separation between clay layers is 44nm, a very reasonable separation based on stoichiometry. Finally, we observed sharp ^1H signals, associated with degradation products originating from a certain organic modifier that coats the clay surface. Organic modifiers function to improve the affinity between the inorganic clay and the organic polymer. The degradation products were identified by their spectrum. Other measurements indicated that these degradation products were phase separated in domains at least a few nm's from the clay surfaces.

キーワード：ナイロン6 / クレイ / ナノコンポジット / 固体NMR / スピン拡散

あさのあつし、D.L. VanderHart、J.W. Gilman

固体高分解能¹³Cおよび¹H NMR法を用いて、ナイロン6/クレイ ナノコンポジット材料のモルフォロジー (α、γ結晶相の比率、結晶化度、結晶相のドメインサイズ、クレイの分散度、α/γ結晶とクレイとの距離情報など) について研究した。用いたクレイは、反磁性を示す合成クレイのラポナイトと、自然界に存在していて鉄イオン (Fe³⁺) を有し常磁性を示すモントモリロナイトの2種類である。ナノコンポジットは、クレイとナイロン6とを機械的にブレンドしたものと、クレイとナイロン

6のモノマー (ε-カプロラクタム) を混合した溶液中でナイロン6を重合した2種類である。

結晶化度やα、γ結晶相の比率を求めるためにスピンロック時間を変えて¹³C CPMASスペクトルを測定した。ナイロン6の結晶相はα型結晶からのみで形成されているので、図1右側上に示したようにCH₂基領域にはα結晶特有の4本のピーク (26, 30, 37, 44ppm) が観測される。また、クレイと混合したナノコンポジットでは、さらにγ結晶特有の4本のピーク (30, 34, 38, 40ppm) が観測される。結晶化度はナイロン6およびナノコンポジット共にほぼ35-40%であり、アニーリングしたもので最大5%ほど結晶化度が上昇するが、クレイの有無や熱履歴には大きく依存しないことがわかった。しかしながら、α、γ結晶相の比率は熱履歴やクレイの有無に大きく依存している。熔融した後に急速冷却したナノコンポジットサンプルでは、α結晶の比率は20-45%であるのに対し、このサンプルをアニーリングした後は、α結晶の比率は50-75%に上昇する。また、非常にゆっくりと冷却した (1°C/min) サンプルでは、95%以上のγ結晶相を形成する。このことは、クレイが存在していることでα結晶よりも不安定なγ結晶がより安定化するが、結晶成長には長い時間を要し、γ型からα型への変換も容易であることを示している。

クレイの分散度を調べるために、混合プロセスのみが異なる3種類のナイロン6/モントモリロナイト ナノコンポジットを用いて、¹H核のスピン-格子緩和時間 (T₁^H) を測定した。結果を表1に示す。モントモリロナイトはFe³⁺常磁性を示すために、クレイ近傍のナイロン分子は極端に短いT₁^H値を示す。この層からクレイ間に存在する通常のT₁^H値を持つナイロン6分子に¹Hスピン拡散が起こることから、クレイが非常に良く分散した系においては、平衡状態のT₁^H値はナイロン6の通常のT₁^H値に比べて、短くなると考えられる。一方で、クレイの分散が不十分な系においては、その値はより通常のT₁^H値に近くなると考えられる。このことをふまえて、表1を見ると、観測したT₁^H値からクレイの分散度を評価できることがわかる。

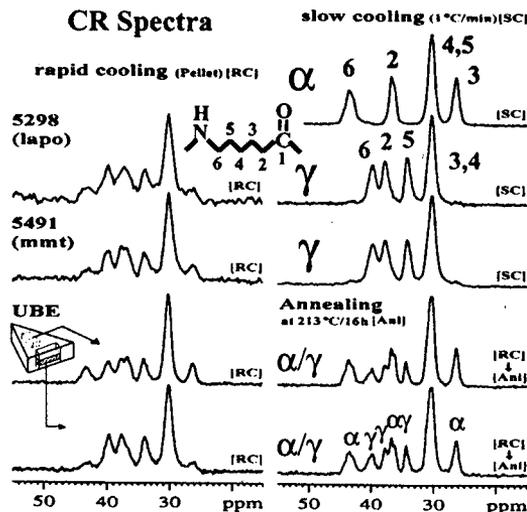


Fig.1. ¹³C CPMAS spectra for crystalline phase (CR) of N6/Clay nanocomposites.

Table 1 T₁^H values (s) for N6/mmt blend composites of 54 series. (same formulation, different clay dispersions.)

300MHz	5489	5490	5491	nylon6
T ₁ ^H (s)	0.880	0.938	0.599	1.625
T _{1(para)}	1.92	2.22	0.95	N/A

100MHz	5489	5490	5491	nylon6
T ₁ ^H (s)	0.400	0.421	0.327	0.52
T _{1(para)}	1.73	2.21	0.88	N/A

$$1/T_{1(para)} = 1/T_{1(obs)} - 1/T_{1(nylon6)}$$

^{89}Y -固体NMRによる、Eu-Y₂O₂S中の
Eu拡散の焼成温度依存性

(シーエーシーズ横浜分析センター¹・USRオプトニクス²・化成オプトニクス³・東京水産大⁴)

○原園としえ¹・安達隆二²・下村康夫³・渡部徳子⁴

Firing Temperature Dependence of Eu Diffusion in Eu-Y₂O₂S
Studied by ^{89}Y MAS-NMR

(Center for Analytical Chem. and Sci. Inc.,¹ USROptonix,²

Kasei Optonix,³ Tokyo University of Fisheries⁴)

○Toshie Harazono¹, Ryuji Adachi², Yasuo Shimomura³, Tokuko Watanabe⁴

^{89}Y MAS-NMR has been investigated to elucidate the Eu distribution in a red phosphor, Eu doped-Y₂O₂S (Eu-Y₂O₂S) fired at varying temperature. The spin-lattice relaxation times (T_1) were measured for Y atoms (Y^n ($n \geq 2$), 292 ppm) which are located at the second and more nearest neighboring from the doped Eu. It was found that the Eu distribution and the crystallinity were reflected to the T_1 values. Based on the T_1 values, therefore, the degree of Eu diffusion depending on the firing temperature was made clear.

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ドープ-Y₂O₂S (Eu-Y₂O₂S)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をドープ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(-0-, -0-)Y, Eu(-S-, -S-)Y, Eu(-0-, -S-)Y, Eu-S-Yに帰属されることを報告した。^{1,3)} また38回NMR討論会で、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 (Eu-Y¹-Eu)に帰属されることを報告した。^{2,3)} 今回、焼成温度を変えたサンプルにおける中心シグナル、 Y^n ($n \geq 2$, 292 ppm)、のスピナー格子緩和時間 (T_1) を測定することにより、 T_1 に結晶性とEuの分布状態が反映されることを見出した。それにより、焼成温度を変えた時のEuの拡散の様子が明らかになった。

試料及び測定方法：本研究で用いた試料は、アルミナるつばに Y₂O₃、Eu₂O₃、S、及び、融剤を混合して、種々の温度で焼成した。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 以下の濃度であった。

^{89}Y -MAS NMR、Eu、Y₂O₂S、Euドープ-Y₂O₂S、焼成温度

○はらぞの としえ・あだち りゅうじ・しもむら やすお・わたなべ とくこ

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:1.5M Y(NO₃)₃水溶液、デットタイム：150 μ s。

結果、及び、考察：

それぞれの焼成温度に対応した色度、輝度、粒径、X線ピーク(101)の半価幅、及び、2成分で解析したT₁の値を表1に示した。900℃から1200℃になるにつれて、粒子が成長し、X線の(101)ピークの半価幅が狭くなっていることより、結晶化度が上がっていることがわかる。また、色度xが増加し、yが減少してくることから、焼成温度の増加と共にEuの拡散が進むことがわかる。今回、このような現象が⁸⁹YのT₁に反映されることを見出した。T₁の長い成分を見ると、焼成温度が900℃から1000℃になるとT₁が長くなるが、これは、結晶性向上の効果と考えられる。1000℃から1200℃で温度上昇とともにT₁が短くなるのは、結晶成長の効果(T₁増加)よりも、Euの拡散によるT₁減少効果が強く現れたためと考えられる。Euの拡散が進むと、Euの分布が均一になり、観測されているYからみて第2近接Yを置換するEuの数が増加し、T₁が短くなることが予想される。³⁾ 1000℃から1100℃の温度領域で急速に拡散が進むことがわかる。1100℃から1200℃の領域では、ほぼ一定の拡散状態である。1350℃になるとX線ピークと⁸⁹Y NMRスペクトルより、Y₂O₂Sの他にY₂O₃が生成した。T₁の短い成分は、第1近接Yに2個のEuが置換した(Eu-Y¹-Eu)、あるいは、Euから見て距離の短い2近接Yを、1個以上のEuが置換したYⁿ (n ≥ 2)の影響によると考えられる。詳細については、現在考察中である。

Table 1. Sample list of Eu-Y₂O₂S. Eu=4 mol%: (Y_{0.9615}Eu_{0.0385})₂O₂S, Tb=10 ppm

Firing Temp. °C	Chromaticity Coordinates x/y ¹⁾	Brightness %	Particle size d ₅₀ /μm	Half-width 2θ	T ₁ (%) s Long	T ₁ (%) s Short
900	0.646/0.346	98	3.4	0.169	273 (91.5)	8 (8.5)
1000	0.648/0.344	120	3.8	0.139	516 (56.3)	58 (43.7)
1100	0.651/0.342	126	5.3	0.116	353 (60.3)	67 (39.7)
1200	0.652/0.341	125	6.2	0.114	343 (73.5)	42 (26.5)
1350	0.650/0.339	77	23.0	0.152	408 (63.7)	49 (36.3) (292 ppm, Y ₂ O ₂ S)
					692 (71.9)	1.6 (28.1) (330 ppm, Y ₂ O ₃)

1) Phosphor Handbook, CRC Press, p. 805; 1998.

References

- 1) 原園、安達、渡部、第36回NMR討論会要旨集、p. 67、駒場エミナーズ、1997.
- 2) 原園、安達、渡部、第38回NMR討論会要旨集、p. 268、北海道大学、1999.
- 3) T.Harazono, R.Adachi, N.Kijima, T.Watanabe, Bull. Chem. Soc. Jpn., 72, 2655-2664, (1999).

^{29}Si , ^{13}C NMR 法による 6 員環および直鎖シランの構造とダイナミクス

京大化研 ○梶 弘典・山田 周作・堀井 文敬

Structure and Dynamics of Six-membered Cyclic Silane and Linear Silane by ^{29}Si and ^{13}C NMR Methods

Hironori Kaji, Shusaku Yamada, and Fumitaka Horii

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011

The structure and dynamics of a six-membered cyclic silane, dodecamethylcyclohexasilane (DMCHS), $(\text{Me}_2\text{Si})_6$, have been analyzed by ^{29}Si and ^{13}C NMR. DMCHS was prepared by a Wurtz-type reaction of dichlorodimethylsilane with metal Li in THF. In CP/MAS ^{29}Si and ^{13}C spectra, chemically nonequivalent three and six resonance lines are observed respectively below -40°C . Above -20°C , these lines coalesce and ^{29}Si CSA lineshapes become axially symmetric, suggesting that DMCHS molecules, which are in the chair conformation below -40°C , are flattened and undergo a rotational motion around the C_3 rotation axis. More detailed studies are needed since the above results can be explained also by ring inversion. Above 70°C where a transition is observed by DSC, all the anisotropies in ^{29}Si CSA lineshapes are averaged. This indicates that DMCHS is in the plastic crystalline state, where the molecules undergo random and isotropic motion at each lattice site.

1. 緒言

固体 NMR 法は、C, H, O を中心とした固体材料の構造解析、分子運動解析に大きく寄与してきた。現在、材料開発の多様化に伴い、多核 NMR 測定における構造、分子運動解析が重要になりつつある。 ^{29}Si 核は、天然存在比 4 %、スピン数 $I = 1/2$ の、測定が容易な核であり、比較的早い時期から多くの測定がなされてきた。特に、Si-Si 結合からなる主鎖をもつポリシランおよびその共重合体¹では、主鎖のコンホメーションが σ 共役性を通じてその光物性に大きく影響するため、コンホメーションの解析は必要不可欠である。多くの場合、 ^{29}Si 化学シフトによりコンホメーションの解析がなされてきた^{2,4}が、 ^{29}Si 化学シフトとコンホメーションの関係は、いまだ明確になっているとは言い難い。本研究では、6 員環および直鎖シランの構造、さらには運動に関し、固体 ^{29}Si および ^{13}C NMR 法により解析を行うとともに、 ^{29}Si 化学シフトとコンホメーションの関係について検討した。

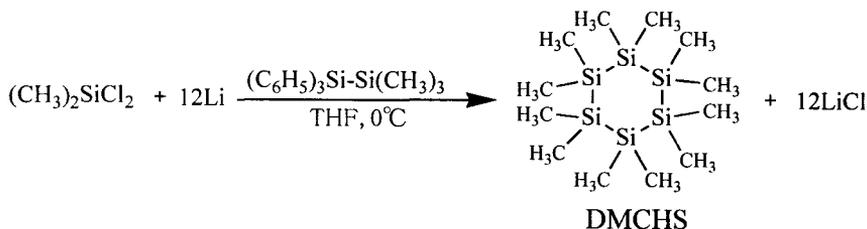
2. 実験

試料である環状シラン dodecamethylcyclohexasilane (DMCHS)は、Scheme 1 に示したように、dichlorodimethylsilane から金属 Li による Wurtz 型反応により合成した⁵。

キーワード：環状シラン、直鎖シラン、コンホメーション、 ^{29}Si NMR、CP/MAS

かじ ひろのり、やまだ しゅうさく、ほりい ふみたか

得られた試料を THF とエタノールによる再結晶化により不純物を取り除き、単結晶を得た。その単結晶を粉末状にした試料に対し、DSC 測定を TA instruments DSC-2910 (昇・降温速度：10°C/min) により、固体 ^{29}Si および ^{13}C NMR 測定を Chemagnetics CMX-400 分光計により 9.4T の静磁場下で行った。



Scheme 1. Synthesis of DMCHS.

3. 結果と考察

3.1. DSC 測定

再結晶化した DMCHS の DSC 測定の結果、等方相からの降温過程では 52°C と 236°C に発熱ピークが、また、10°C/min で徐冷した試料の昇温過程では 69°C と 246°C に吸熱ピークが観察された。これらの結果から、DMCHS の結晶相と等方相の間に中間相が存在していることがわかる。

室温での DMCHS の構造に関し、広角 X 線回折(WAXD)測定が行われている⁶。DMCHS は室温で、平たくなったイス型コンホメーションをとっており、3 種の Si 原子および 6 種の C 原子が存在している。また、Si-Si 結合の結合角は 112°、二面角は 53-54° である。

3.2. NMR 測定

図 1 に固体 CP/MAS ^{29}Si NMR スペクトルの温度変化を示す。-150°C における ^{29}Si 共鳴線は、面積強度の等しい 3 本の共鳴線により再現できる。これらの共鳴線は、温度上昇とともに平均化され、-20°C 付近で 1 本になっている。また、低磁場シフトが観察される。この低磁場シフト、およびすべての Si サイトが化学的に等価になるという今回の結果を WAXD の結果とあわせて考

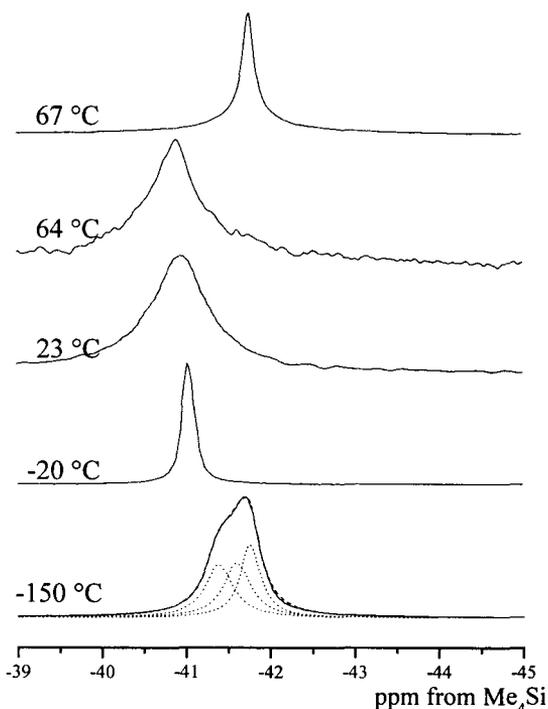


Fig. 1. CP/MAS ^{29}Si NMR spectra of DMCHS at various temperatures.

えると、温度上昇とともに Si 6 員環が平面的になり、その 3 回回転軸まわりに、DMCHS 分子が回転運動を行っていると考えられる。-20℃から 64℃における共鳴線幅の増大は、この運動周波数が、 ^1H dipolar decoupling 周波数に近づくことによる(motional broadening)。このような運動のモードは、 ^{29}Si CSA スペクトルの温度変化からより直接的に解析できる(図 2)。-20℃以下では、複数のサイトからなる共鳴線の重なりのため、その解析は複雑であるが、-20℃で見られる CSA には、化学シフトの主値 σ_{11} 、 σ_{22} 、 σ_{33} に対応するピークおよび肩が観察される。23℃以上では σ_{11} と σ_{22} が平均化した軸対称スペクトルになり、 σ_{33} 軸周りの 2 kHz 程度の運動が起こっていることがわかる。ただし、6 員環の反転により、これらのスペクトル変化が起こる可能性も否定できない。今後、単結晶試料を用いて、 ^{29}Si 化学シフトテンソルの主軸方向の帰属を行うとともに、その二次元 ^{29}Si 交換スペクトルの測定により、さらに詳細なダイナミクス解析を行う予定である。

さらに高温では、DSC で観測された転移温度とほぼ対応する温度範囲で急激な変化が見られる。CP/MAS ^{29}Si スペクトルは線幅が狭くなるとともに高磁場シフトし、 ^{29}Si CSA スペクトルは、すべての異方性が平均化した共鳴線になっている。これらの結果から、この転移温度以上で DMCHS 分子は各格子点を中心としたランダムで等方的な運動を行うとともに、その環構造が歪みのない低温(-150℃)の状態にもどることが明らかとなった。すなわち、この中間相で、DMCHS は plastic 結晶状態にあると考えられる。

図 3 には、CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルの温度変化を示す。-40℃以下では共鳴線が 6 本に分裂している。これは、3 種の Si 核の各々が axial および equatorial の CH_3 炭素を持っていることに対応している。温度上昇に伴う ^{13}C NMR 共鳴線の変化は、上記の考察でうまく説明できる。

今回、固体 NMR 測定により得られた結果は、上述の WAXD 測定から得られた構造、およびそれから推察される運動とよい一致を示している。

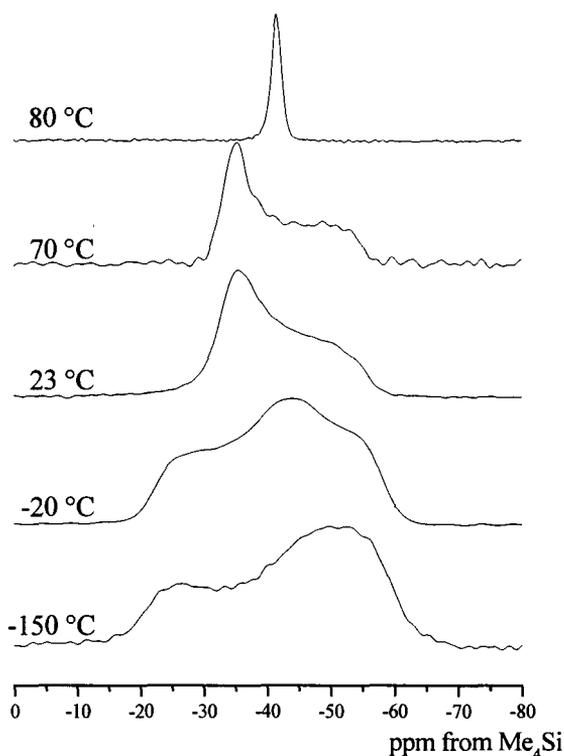


Fig. 2. Static ^{29}Si CSA spectra of DMCHS at various temperatures.

3.3. ^{29}Si 化学シフトとコンホメーションの相関

図 1 に示した DMCHS のイス型コンホメーション(*gauche*)における等方化学シフト(-42 ppm)は、polydimethylsilane (PDMS) の *trans* 状態の等方化学シフト(-34 ppm)と比較し、8 ppm 高磁場に現れる。このコンホメーションによる化学シフトの変化は、高山らの結果²とは、矛盾しているが、Lovinger、Schilling、Bovey らの PDMS³、poly(*di-n*-butylsilane)⁴ および poly(*di-n*-hexylsilane)⁴ の CP/MAS ^{29}Si スペクトルの温度変化に対する結果とは一致している。また、 ^{13}C 核に対する γ -*gauche* 効果とも一致している。

この ^{29}Si の γ -*gauche* 効果は、図 1 に見られる化学シフトの変化を説明できないが、DMCHS の場合、温度上昇による環構造の平面化に伴う、共有結合角の増大の影響が大きい。この場合、 γ 位にあるケイ素との距離はあまり変化がなく、より近距離にある β 位のケイ素との距離が長くなるため、二面角の変化から予想される化学シフトと異なる結果が得られると推察される。これらの考察を明確にするためには、WAXD による結晶構造の温度変化の測定が必須であろう。

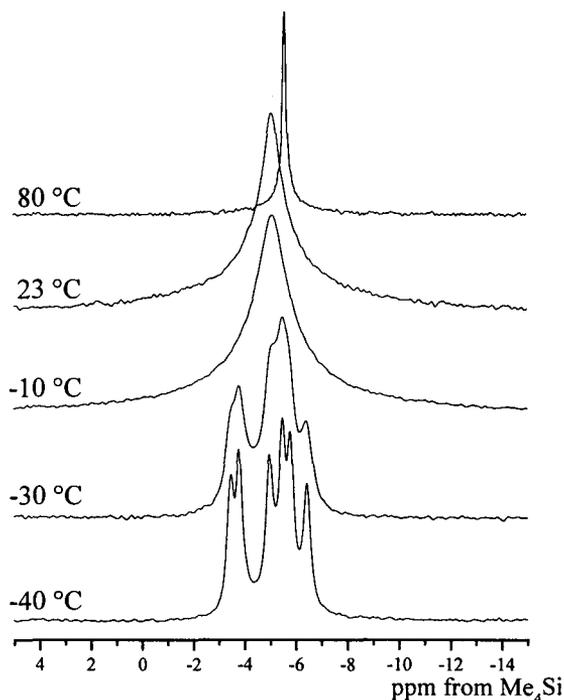


Fig. 3. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of DMCHS at various temperatures.

References

- 1) 山田、梶、堀井、第 39 回 NMR 討論会講演要旨集、P87.
- 2) Takayama, T. Solid-State NMR of Polymers. In Studies in Phys. Theor. Chem.; Ando, I.; Asakura, T., Eds., Elsevier: Amsterdam, 1998; Vol. 84, p. 613.
- 3) Lovinger, A.J.; Davis, D.D.; Schilling, F.C.; Padden, Jr. F. J.; Bovey, F.A. *Macromolecules*, 1991, 24, 132.
- 4) Schilling, F.C.; Lovinger, A.J.; Zeigler, J.M.; Davis, D.D.; Bovey, F.A. *Macromolecules*, 1989, 22, 3055.
- 5) Chen, S.; Katti, A.; Blinka, T. A.; West, R. *Synthesis* 1985, 684.
- 6) Carrel, H. L.; Donohue, J. *Acta Cryst.* 1972, B28, 1566.

3. 結果と考察

再沈殿後および 100°C で 1~15 時間結晶化させた試料の DSC 測定の結果から、PS6P2 は $T_g=19^\circ\text{C}$ 、 $T_m=131^\circ\text{C}$ であり、結晶・非晶構造をもつことがわかった。また、熔融状態から急冷した試料では T_g のみが観測され、非晶状態にあることがわかった。100°C で 15 時間結晶化させた PS6P2 の CP/MAS ^{29}Si NMR 測定の結果を Figure 1 に、その Si1、Si2、Si3 の帰属を Figure 3 に示す。

スピン格子緩和時間測定の結果から、Figure 1 における各ケイ素の低磁場側の共鳴線 (Si1C, Si2C, Si3C) は結晶成分であることが明らかとなった。温度上昇によって、Si2C と Si3C の共鳴線は低磁場にシフトするが Si1C のそれは変化しないことがわかる。これらの化学シフトの温度変化を Figure 2 に示す。得られた結果に対して、結晶領域では trans に近いコンホメーションをとると仮定し、 γ -gauche 効果を考慮した解析を行った。その結果、Figure 3 に示すように、結晶領域では Si1-Si2 と Si3-Si3' 結合のコンホメーションは温度上昇により trans に

近い状態に変化するが、Si2-Si3 結合のコンホメーションはほぼ固定されていると推定される。一方、急冷した試料では、Si1、Si2、Si3 の共鳴線すべてが低磁場にシフトしたことより、非晶領域においてはすべてのケイ素結合のコンホメーションは温度上昇によって gauche に近い状態から trans へ変化すると解析された。PS1P2 と PS2P2 に関しては 1 本の共鳴線のみが観測され、結晶・非晶における共鳴線の違いは見られなかった。PS2P2 の化学シフトは温度上昇によって $m=6$ と同程度変化したが、PS1P2 に関しては変化が見られなかった (Figure 2)。これらのコンホメーション変化は、 σ 共役状態に変化を及ぼしていると考えられる。今後は、X 線回折法や UV 測定により、上記の trans、gauche の帰属を確認するとともに、光特性についても解析する予定である。

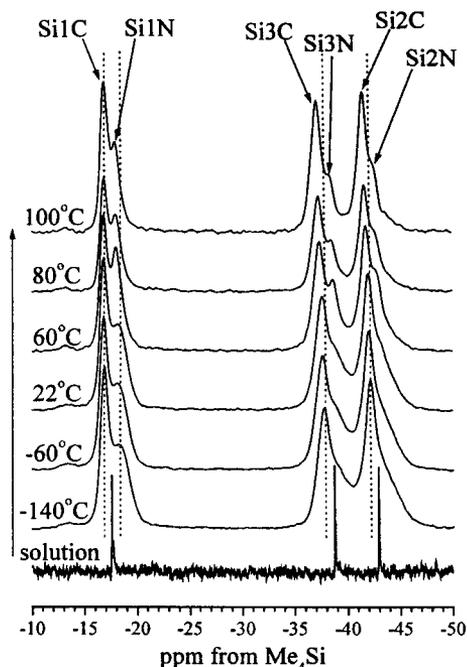


Figure 1. CP/MAS ^{29}Si spectra of PS6P2 crystallized at 100 °C for 15 h.

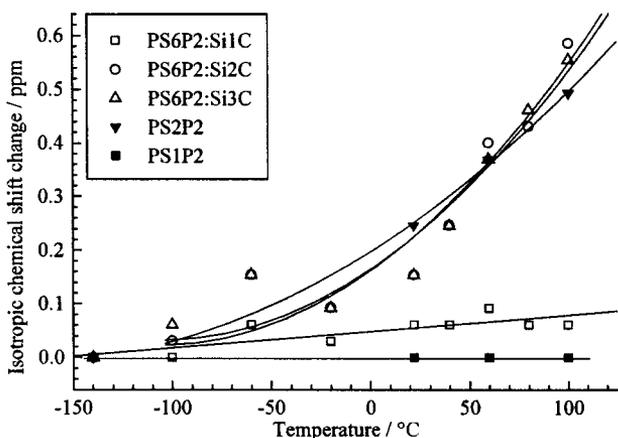
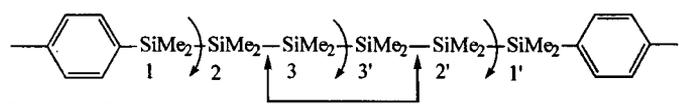


Figure 2. Chemical shift changes of CP/MAS ^{29}Si spectra for different samples.

Crystalline component



Noncrystalline component

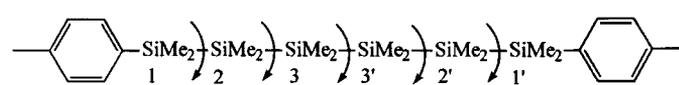


Figure 3. Conformation changes of PS6P2.

固体2次元 ^1H - ^{13}C HETCOR 法による
ポリビニルアルコール (PVA) の水素結合に関する研究

京大化研 ○増田 憲二、梶 弘典、堀井 文敬

Solid-State 2D ^1H - ^{13}C HETCOR Studies of Hydrogen Bondings for Poly(vinyl alcohol)

Kenji Mausda, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii
Institute for Chemical Research, Kyoto University

Different types of hydrogen bondings in poly(vinyl alcohol) (PVA) films with different tacticities have been characterized by solid-state ^{13}C NMR, ^1H CRAMPS, and 2D ^1H - ^{13}C HETCOR analyses. The CH lines of CP/MAS ^{13}C NMR spectra of the crystalline and noncrystalline components in PVA films are well resolved into several constituent lines reflecting downfield shifts due to the formation of intramolecular hydrogen bonding and upfield shifts owing to the γ -gauche effect. ^1H CRAMPS analyses also reveal the existence of three types of OH protons; intra- and intermolecular hydrogen bonded OH protons and OH protons free from hydrogen bonding. Furthermore, evident correlations between the main CH carbon lines and ^1H lines described above are separately observed in the 2D ^1H - ^{13}C HETCOR spectrum for the main-chain deuterated A-PVA films. These results clearly indicate the validity of the previous assignment for the CH triplet resonance lines of CP/MAS ^{13}C NMR spectra of solid PVA samples.

1. 緒言

ポリビニルアルコール(PVA)の結晶成分のCP/MAS ^{13}C NMRスペクトルのCH共鳴線は、約6ppmずつ離れた3本に分裂する。我々は、この分裂が分子内水素結合の形成に基づくと考え、種々の状態におけるPVAの水素結合に関して固体 ^{13}C NMR法により解析を行ってきた^{1,2}。しかし、このようなCH共鳴線の分裂を、OH基の置換基効果により説明しようとする試みや、分子間水素結合も考慮すべきという主張が存在する^{3,5}。本研究では、立体規則性の異なるPVAフィルムに関して固体 ^{13}C NMR法および ^1H CRAMPS^{6,7}とともに2D ^1H - ^{13}C HETCOR法⁸⁻¹⁰を用いた解析を行い、我々のCH共鳴線の帰属の妥当性を示す。

2. 実験

クラレ(株)から提供された立体規則性の異なるPVAおよびアタクチックPVAの主鎖を重水素化した試料(A-PVA- d_3)を用いた。溶液 ^1H NMR法より決定した $triad$ のモル分率比 $mm:mr:rr$ は、それぞれS-PVA (0.19:0.48:0.33)、A-PVA (0.23:0.50:0.27)、A-PVA- d_3 (0.22:0.50:0.28)、LI-PVA (0.50:0.39:0.11)、MI-PVA (0.66:0.28:0.06)、HI-PVA (0.79:0.19:0.02)である。各PVAフィルムは、それぞれ水溶液からcasting法により作製し、50℃で48時間減圧乾燥後アルゴン気流中において180℃で10分間熱処理した。固体 ^{13}C NMRおよび ^1H CRAMPS測定は、Chemagnetics CMX400分光計により、9.4Tの静磁場下で行った。 ^1H CRAMPS測定における多重パルスとしてBR-24¹¹を用いた。

キーワード：水素結合、ポリビニルアルコール、2D ^1H - ^{13}C HETCOR、 ^1H CRAMPS

ますだけんじ、かじひろのり、ほりいふみたか

その際のパルス幅およびパルス間隔はそれぞれ1.3、3.0 μ sとした。2D ^1H - ^{13}C HETCOR測定において ^1H - ^1H 双極子相互作用の消去はFSLGパルスシーケンス¹²により行った。

3. 結果と考察

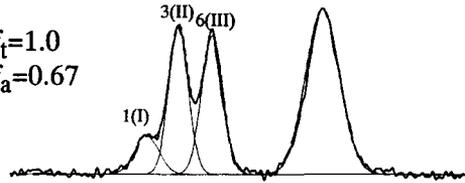
図1に、A-PVAフィルムの結晶および非晶成分のCP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを示す。これらのスペクトルは、 ^{13}C スピン-格子緩和時間($T_{1\rho}$)の違いにより分離・測定した。結晶成分のCH共鳴線は、約6ppmずつ離れた3本(I, II, III)に分裂することがわかる。共鳴線I, II, IIIは、平面ジグザグPVA鎖において分子内水素結合をそれぞれ2, 1, 0個形成したOH基に結合したCH炭素に帰属される¹³。一方、非晶成分のCH共鳴線も見かけ上3本に分裂するが、それらの化学シフトは結晶成分のそれらとは必ずしも一致しない。このことは、非晶成分は種々のコンホメーションをとりうることから、 γ -gauche効果^{14,15}に基づく高磁場シフトおよび種々のケースで形成される分子内水素結合による低磁場シフトを考慮する必要があることを示す。全てのコンホメーションおよび分子内水素結合の形成について検討した結果、CH炭素については9つの化学シフトの異なる状態が存在することが明らかになった。得られた9つの状態に相当する共鳴線を、低磁場側から共鳴線1-9とした。図1に示すように、結晶成分に関しては共鳴線1, 3, 6(I, II, IIIに対応)、非晶成分に関しては共鳴線1-6により実測スペクトル(太い実線)を再現できる。また、上記の9つの状態の存在確率の式を、C-C結合のtransの確率 f_t および適当な隣接OH基と分子内水素結合を形成する確率 f_a の関数として導いた。図1には、これらの式を用いることにより、A-PVAフィルムの結晶および非晶成分について上記波形解析から得られた相対強度を説明する最適の f_t および f_a 値を求め、示した。なお、図1に示したように、非晶成分の CH_2 共鳴線についても γ -gauche効果のみを考慮した3本の共鳴線により波形解析を行った。得られた CH_2 共鳴線に関する f_t 値は0.91となり、CH共鳴線より得られた値と良く一致した。以上示したように、固体 ^{13}C NMR解析より、結晶および非晶領域におけるコンホメーションおよび分子内水素結合の解析を精密に行うことができた。

図2には、種々の立体規則性PVAフィルムの ^1H CRAMPSスペクトルを示す。各共鳴線にGauss曲線を仮定して波形

Crystalline

$$f_t=1.0$$

$$f_a=0.67$$



Noncrystalline

$$f_t=0.92$$

$$f_a=0.97$$

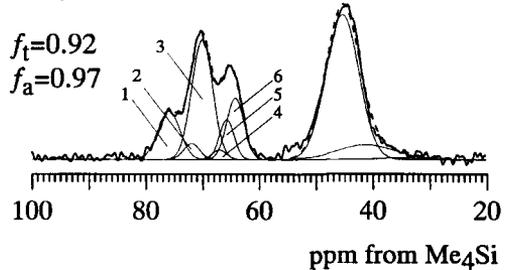


Figure 1 Lineshape analyses of the crystalline and noncrystalline components in A-PVA films

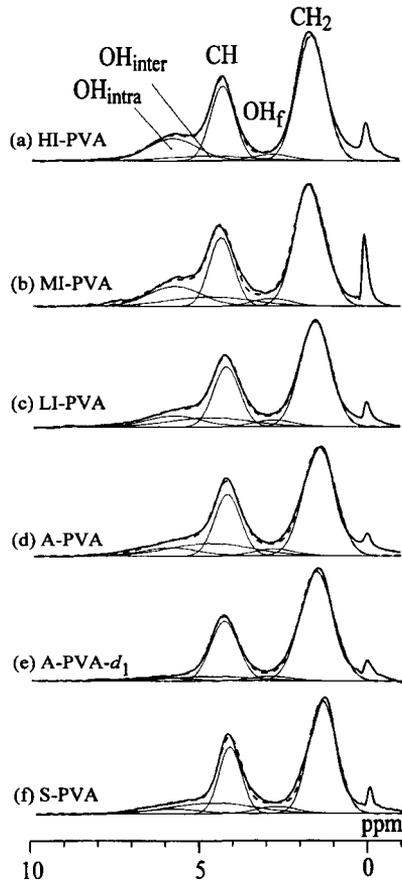


Figure 2 ^1H CRAMPS spectra of PVA films with different tacticities

解析を行い、低磁場側から OH、CH、CH₂ プロトンに帰属した¹⁶。この OH 基は分子内または分子間水素結合のいずれかに関与する OH 基である。さらに、OH 基を重水素化した A-PVA-d₁ との比較により、CH および CH₂ 共鳴線の間にも OH プロトンによる共鳴線が存在することを見出し、この共鳴線を結晶領域において水素結合を形成していない OH プロトンに帰属した¹⁷。しかし、この解析より得られた水素結合フリーの OH 基の結晶領域における分率は、0.24-0.60 と異常に大きい値となることが分かった。したがって、分子間および分子内水素結合を考慮した

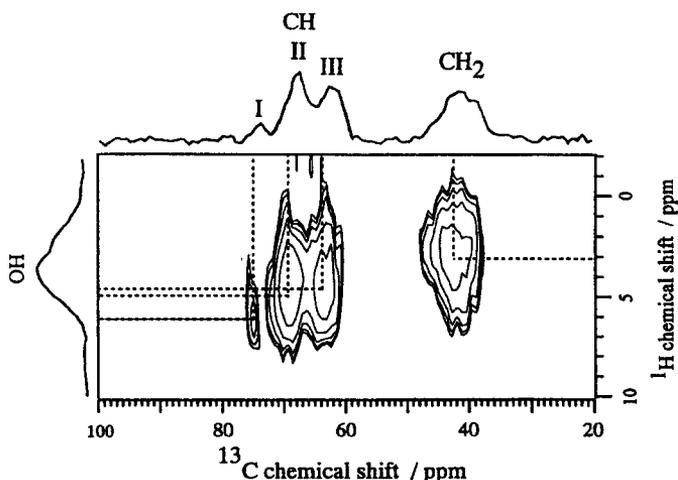


Figure 3 2D ¹H-¹³C HETCOR spectrum of A-PVA-d₃ films measured at 24 °C with a contact time of 120 μs. The top and left spectra are projection spectra.

解析が必要であると考えられる。そこで、これまでの固体¹³C NMR 解析により明らかにしたように、HI-PVA では分子内水素結合が、S-PVA では分子間水素結合が主として形成されることに着目し、それぞれの OH 共鳴線を分子内および分子間水素結合した OH プロトンの共鳴線と仮定した。これらを、出発基準共鳴線とし、種々の PVA 試料について trial and error 法による波形解析を繰返した。図 2 には、最終的に得られた best fitting の結果を示す。この結果に基づけば、分子内および分子間を形成する OH 共鳴線 (OH_{intra}、OH_{inter})、および水素結合フリーの OH プロトンの共鳴線 (OH_f) は、立体規則性に無関係にそれぞれ 5.80、4.70、2.85 ppm に現れることが明らかになった。また、各共鳴線の線幅も立体規則性に依存せずほぼ一定であることが明らかになった。これらのことより、¹H CRAMPS により PVA フィルムにおける水素結合状態の異なる 3 種類の OH 基を精度よく解析できると結論した。

図 3 には、CP 接触時間を 120 μs とした場合における A-PVA-d₃ フィルム 2D ¹H-¹³C HETCOR スペクトルを示す。ここでは、OH プロトンと CH 炭素の相関を効率良く観測するため、主鎖を重水素化した A-PVA を用いた。¹H CRAMPS スペクトルと比べて、図 3 に示した ¹H スペクトルの分解能はかなり低い。OH 共鳴線と各 CH 共鳴線の間には明確な相関が認められる。共鳴線 I、II、III と相関する ¹H 共鳴線のピークトップの ¹H 化学シフトは、それぞれ 5.9、5.0、4.7 ppm であり、これらは明確に区別できる。また、5.9 および 4.7 ppm の値は、OH_{intra} および OH_{inter} プロトンの化学シフトとほぼ一致する。この結果は、CH I 炭素は分子内水素結合を形成した OH 基と結合し、CH III 炭素は、主として分子間水素結合を形成している OH 基に結合していることを示していると結論できる。また、CH II 共鳴線と相関する ¹H ピークの化学シフトは OH_{intra} と OH_{inter} の中間に位置することから、OH_{intra} および OH_{inter} 両共鳴線からの寄与があることがわかる。したがって、CH II 炭素は、分子内および分子間水素結合のどちらかを形成した OH 基に結合しているといえる。さらに、CH II、III 共鳴と相関する ¹H の共鳴線は、高磁場側にまで分布していることから、これらには水素結合フリーの OH プロトンの寄与が存在することが分かる。したがって、2D ¹H-¹³C-HETCOR 測定により得られたこれらの結果は、上記の固体¹³C NMR および ¹H CRAMPS 解析結果と良く一致し、CH 共鳴線に関する我々の帰属の妥当性を示している。

- (1) Horii, F.; Hu, S.; Ito, T.; Kitamaru, R.; Matsuzawa, S; Yamaura, K. *Polymer* **1992**, *33*, 2299.
- (2) Hu, S.; Tsuji, M.; Horii, F. *Polymer* **1994**, *35*, 9516.
- (3) Ketels, H.; de Hann, J.; Aerdt, A.; van der Velden, G. *Polymer*, **1990**, *31*, 1419.
- (4) Imashiro, F.; Obara, S. *Macromolecules*, **1995**, *28*, 2840.
- (5) Kobayashi, M.; Ando, I.; Ishii, T.; Amiya, S. *Macromolecules*, **1995**, *28*, 6667.
- (6) Gerstein, B. C.; Chou, C.; Pembleton, R.G.; Wilson, R.C. *J. Phys. Chem.* **1997**, *81*, 565.
- (7) Des, S. F.; Bronnimann, C. E.; Wind, R. A.; Maciel, G. E. *J. Magn. Reson.* **1989**, *82*, 454.
- (8) Burum, D. P.; Linder, M.; Ernst, R. R. . *J. Magn. Reson.* **1981**, *44*, 173.
- (9) Caravatti, P.; Bodenhausen, G.; Ernst, R. R. *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *89*, 363.
- (10) Caravatti, P.; Braunschweiler, L.; Ernst, R. R. *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *100*, 305.
- (11) Burum, D. P.; Rhim, W. K. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 944.
- (12) Bieckecki, A.; Kolbert, A. C.; Levitt, M. H. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *155*, 341.
- (13) Terao, T.; Maeda, S.; Saika, A. *Macromolecules* **1983**, *16*, 1535.
- (14) Tonelli, A. E. *NMR Spectroscopy and Polymer Microstructure: The Conformation Connection*; VCH: New York, **1989**.
- (15) Born, R.; Spiess, H.W. *Ab Initio Calculations of Conformational Effects on ¹³C NMR Spectra of Amorphous Polymers*; Springer: Berlin, **1997**.
- (16) Horii, F.; Hu, S.; Deguchi, K.; Sugisawa, H.; Ohgi, H.; Sato, T. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3331.
- (17) Masuda, K.; Kaji, H.; Horii, F. *Polym. J.* **1999**, *31*, 105.

α,ω -アルカンジオールおよび n -アルカンチオールの各結晶相における構造とダイナミックス

(京大化研¹、熊本大理²) ○桑原 和弘¹、堀井 文敬¹、小川 芳弘²

Studies on the Structure and Dynamics for α,ω -Alkanediols and n -Alkanethiols in Different Crystalline States

(Institute for Chemical Research, Kyoto University¹, Faculty of Science, Kumamoto University²)
Kazuhiro Kuwabara¹, Fumitaka Horii¹, and Yoshihiro Ogawa²

Solid-state NMR analyses have been performed to obtain information about the structure and molecular motion for α,ω -alkanediols and n -alkanethiols in different crystalline states. The existence of two magnetically different structures at the chain ends for the monoclinic phase of 1,20-eicosanediol (HO-(CH₂)₂₀-OH), which was not detected by X-ray diffractometry, has been observed by the ¹H CRAMPS and CP/MAS ¹³C NMR measurements. In the CP/MAS ¹³C NMR spectrum for the monoclinic phase of n -tetracosanethiol (n -C₂₄H₄₉SH), which was crystallized from the melt, the resonance lines assigned to the α -CH₂ and β -CH₂ carbons at the SH chain end are broader than those at the CH₃ chain end. This fact reveals that the molecular motion with the rate much higher than 10⁵ Hz is somewhat hindered at the SH chain end compared to at the CH₃ chain end. ¹³C spin-lattice relaxation time (T_{1c}) measurements have also revealed that the order of molecular mobility is CH₃ chain end > SH chain end > inner chain.

1. 緒言

長鎖 α,ω -アルカンジオール (HO-(CH₂) _{n} -OH) および n -アルカンチオール (CH₃-(CH₂) _{n} -SH) は、無機基板上に配列させることにより、あるいは高分子重合のモノマーとして、機能性材料の創出に用いられていることはよく知られている¹⁾。また、これらの n -アルカン系低分子の集合体は、結晶相転移の上からも興味深い挙動を示す。すなわち十分低い温度では、その構造がメチレン数と結晶化条件により決定される単斜晶あるいは斜方晶の結晶を形成し、温度上昇に伴い六方晶 (回転相) へと転移する^{2,3)}。各結晶相における構造とダイナミックスを固体 NMR 法により明らかにし、 n -アルカン⁴⁾およびポリエチレン⁵⁾と比較することは、OH 基および SH 基の影響を考える上で重要である。本報告では、これまで研究を行ってきた 1,20-アイコサンジオール (HO-(CH₂)₂₀-OH)⁶⁾、1,23-トリコサンジオール (HO-(CH₂)₂₃-OH)⁷⁾、および n -テトラコサンチオール (n -C₂₄H₄₉SH)⁸⁾ に対する結果を述べる。

2. 実験

1,20-アイコサンジオールは、1 %トルエン溶液から徐冷して結晶化し、室温において図 1 に示す単斜晶を形成する試料を得た⁶⁾。

キーワード：アルカンジオール、アルカンチオール、結晶、固体 NMR、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

1,23-トリコサンジオールは、エタノール溶液から徐冷して結晶化し、室温において図 2 に示す斜方晶を形成する試料を得た⁷⁾。

n-テトラコサチオールに対しては、融液からの結晶化および *n*-ヘプタン溶液からの急冷結晶化の 2 通りの方法で試料を作製した⁸⁾。いずれの試料も室温において単斜晶を形成する。図 3 に示すように、CH₃ 基-CH₃ 基間には van der Waals 力が存在し、SH 基-SH 基間には非共有結合性の S···S 相互作用が存在する⁹⁾。

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。Dipolar decoupling の振幅 ν_{1H} はすべての測定において 62.5 kHz とした。¹³C スピナー格子緩和時間 ($T_{1\rho}$) の測定には、CPT1 法を用いた。

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

1,20-アイコサンジオールに対する DSC 測定の結果、昇温過程において単斜晶 (M 相) から単斜晶 (M' 相) への転移が 80 °C に、単斜晶 (M' 相) から六方晶への転移が 95 °C に、それぞれ吸熱ピークとして観測された⁹⁾。また、1,23-トリコサンジオールに対する DSC 測定の結果、昇温過程において斜方晶-六方晶転移に帰属される吸熱ピークが 91 °C に観測された⁷⁾。

図 4 には、 α,ω -アルカンジオール各結晶相に対する CP/MAS ¹³C NMR スペクトルを示す。1,23-トリコサンジオール斜方晶における CP/MAS ¹³C NMR スペクトルには、内部 CH₂ に帰属される共鳴線が 32.9 ppm に観測され、この化学シフト値は、斜方晶 *n*-アルカン⁴⁾ の内部 CH₂ に対する値、および斜方晶ポリエチレン⁵⁾ に対する値と同じである。この結果は、OH 基が存在しても結晶鎖のパッキングとコンホメーションが同じであれば、内部 CH₂ の化学シフトは同一の値をとることを示す。すなわち、ゴーシュ分率算出にあたり、すべてトランスコンホメーションからなる CH₂ 鎖結晶の標準物質として *n*-アルカンを用いることは、妥当であることが確認された。 α -CH₂ および γ -CH₂ に帰属される共鳴線は doublet としてそれぞれ 63.0 ppm と 62.2 ppm、および 28.4 ppm と 27.0 ppm に観測された。これらの共鳴線が doublet に分裂する原因は、図 2 に示すように分子鎖末端のコンホメーションがトランスとゴーシュの 2 種類存在するためである。

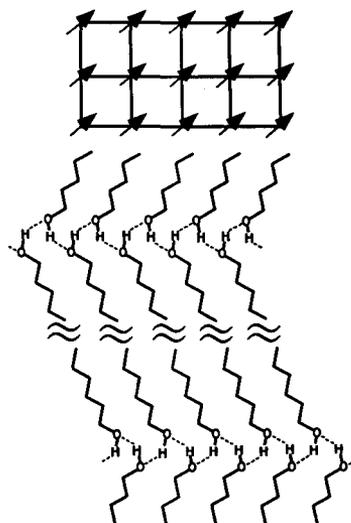


Fig. 1. Molecular arrangement of monoclinic α,ω -alkanediol.

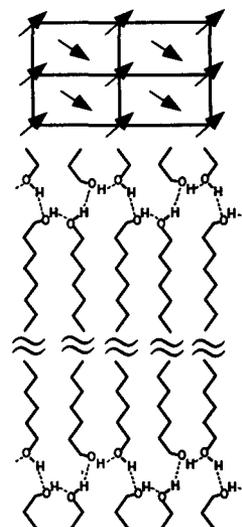


Fig. 2. Molecular arrangement of orthorhombic α,ω -alkanediol.



Fig. 3. Self-recognition supramolecular synthons of CH₃ and SH groups in *n*-alkanethiol chain ends.

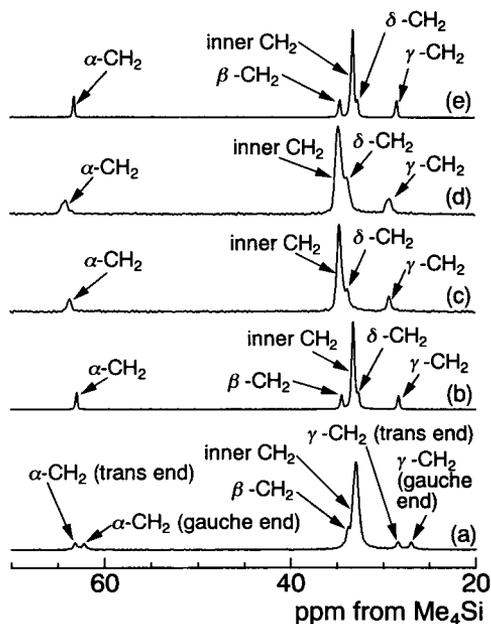


Fig. 4. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of α,ω -alkanediols in different crystalline states: (a) orthorhombic phase of $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{23}\text{-OH}$ at 38°C ; (b) hexagonal phase of $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{23}\text{-OH}$ at 94°C ; (c) monoclinic (M) phase of $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{20}\text{-OH}$ at 38°C ; (d) monoclinic (M') phase of $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{20}\text{-OH}$ at 90°C ; (e) hexagonal phase of $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{20}\text{-OH}$ at 97°C .

六方晶における内部 CH_2 の化学シフトは、1,20-アイコサンジオール、1,23-トリコサンジオールとも、六方晶 n -アルカンの内部 CH_2 より高磁場シフトしており、ゴーシュコンホメーションが存在していることを示している。ポリエチレンの六方晶⁵⁾に対する場合と同様にこの化学シフト値を評価した結果、約3%のゴーシュコンホメーションが含まれていることを明らかにした⁹⁾。

図5には、1,20-アイコサンジオール各相における各 CH_2 の T_{1c} の値を示す。単斜晶においては各 CH_2 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 CH_2 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。この結果より、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6には、1,20-トリコサンジオールにおける各 CH_2 の T_{1c} の値を示す。斜方晶においては、トランス末端の $\gamma\text{-CH}_2$ と $\alpha\text{-CH}_2$ の T_{1c} の値はそれぞれ11sと0.59s、ゴーシュ末端ではそれぞれ49sと19sであった。ゴーシュ末端の方が分子運動性が低いのは、水素結合による安定化のためと考えられる。六方晶における T_{1c} の値は1,20-アイコサンジオールと同様であり、顕

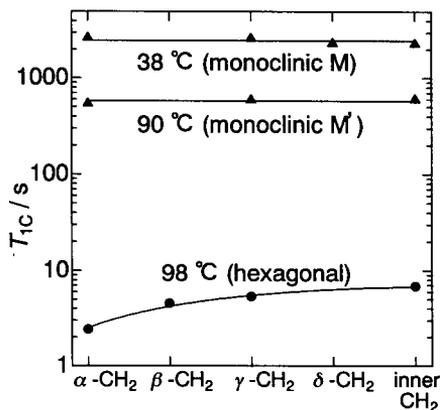


Fig. 5. T_{1c} values for the respective CH_2 carbons of $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{20}\text{-OH}$ in different phases.

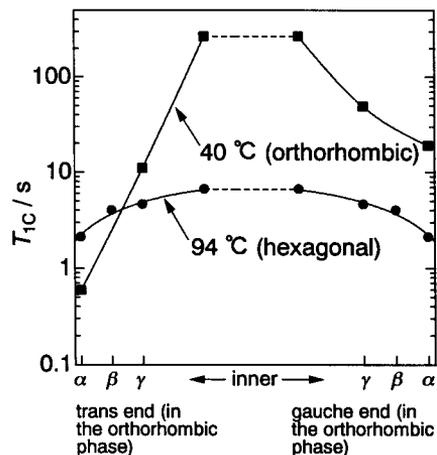


Fig. 6. T_{1c} values for the respective CH_2 carbons of $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{23}\text{-OH}$ in the orthorhombic and hexagonal phases.

著な偶奇効果は観測されなかった。

図7には、 α,ω -アルカンジオール各結晶相に対する ^1H CRAMPS スペクトルを示す。1,20-アイコサンジオールのOH基の共鳴線は、単斜晶(M)においてはdoubletとして観測され、磁気的環境の異なる2種類のプロトンが存在することを明らかにした。この区別は、X線回折ではなされていない。

単斜晶(M')においては2種類のOH基間で平均化が起り、共鳴線はsingletとなる。このOH基の共鳴線は、六方晶へ転移しても変わらない。 ^1H CRAMPSと T_{1c} 測定の結果は、六方晶のOH基において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っていることを示す⁶⁾。

図7を詳細に解析すると、1,23-トリコサンジオール斜方晶におけるOH基の共鳴線も、単純なsingletではなかった。この原因については現在検討中である。

図8には、 n -テトラコサンチオール溶融結晶化試料に対して、40°Cで得られたCP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを示す。 $\alpha\text{-CH}_2$ と $\beta\text{-CH}_2$ に帰属される共鳴線の線幅に注目すると、SH末端側の方が CH_3 末端側より線幅が広い。

本試料の40°Cにおける T_{1c} の値は、内部 CH_2 が58 sであるのに対し、 CH_3 末端側は $\beta\text{-CH}_2$ 、 $\alpha\text{-CH}_2$ および CH_3 がそれぞれ12 s、6.4 s、1.9 sであり、SH末端側は $\beta\text{-CH}_2$ および $\alpha\text{-CH}_2$ がそれぞれ14 sと12 sであった。これらの T_{1c} の値は、分子鎖末端の分子運動性は n -アルカン⁴⁾と同様に内部 CH_2 より顕著に大きいこと、SH末端側の分子運動性は CH_3 末端側ほどには大きくないことを示す。

溶液結晶化 n -テトラコサンチオール試料に対しては、CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルの形状および T_{1c} の値に関して、溶融結晶化試料との本質的な違いは観測されなかった。

今後、他の温度での測定および化学シフト異方性(CSA)の測定を行うことにより、 n -テトラコサンチオールにおける分子運動の周波数とモードを明らかにする予定である。

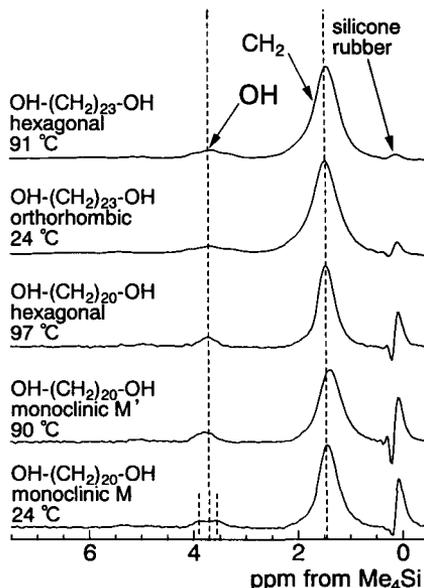


Fig. 7. ^1H CRAMPS NMR spectra of α,ω -alkanediols in different crystalline states.

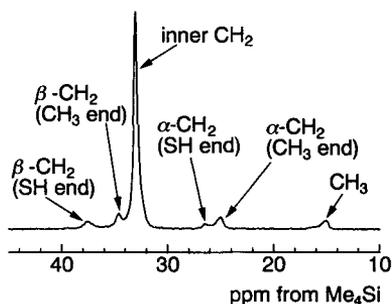


Fig. 8. CP/MAS ^{13}C NMR spectrum of $n\text{-C}_{24}\text{H}_{49}\text{SH}$ at room temperature.

- 1) For example: Aizenberg, J.; Black, A. J.; Whitesides, G. M. *Nature* **1999**, *398*, 495. 2) Nakamura, N.; Ogawa, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 943. 3) Ogawa, Y.; Ooyama, E.; Nozaki, K. *Polym. Prep. Jpn.* **2000**, *49*, 440. 4) Kitamaru, R.; Horii, F.; Nakagawa, M.; Takamizawa, K.; Urabe, Y.; Ogawa, Y. *J. Mol. Struct.* **1995**, *355*, 95. 5) Kuwabara, K.; Horii, F. *Macromolecules* **1999**, *32*, 5600. 6) Kuwabara, K.; Horii, F.; Ogawa, Y. *J. Mol. Struct.* **2000**, *525*, 163. 7) Kuwabara, K.; Horii, F.; Ogawa, Y. *Polym. Prep. Jpn.* **2000**, *49*, 446. 8) Kuwabara, K.; Horii, F.; Ogawa, Y. *Polym. Prep. Jpn.* **2000**, *49*, in press. 9) Shustov, G. V.; Spinney, R.; Rauk, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1191.

¹³C NMR によるサーモトロピック液晶の研究

(金沢大理¹、The University of Akron²) ○松澤英和¹、平井篤樹¹、
水野 元博¹、遠藤一央¹、須原正彦¹、Chang Dae Han²

¹³C NMR Studies of Thermotropic Liquid Crystal

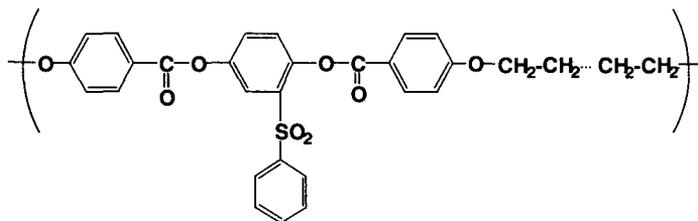
○Hidekazu Matsuzawa¹, Atsuki Hirai¹, Motohiro Mizuno¹, Kazunaka Endou¹, Masahiko Suhara¹,
Chang Dae Han²

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanazawa University¹, Department of Polymer
Engineering, The University of Akron²

The molecular motion and odd-even effect of the spacer in liquid crystalline copolymer of poly-[(phenylsulfonyl)-p-phenylenealkylenebis(4-oxybenzoate)]_s (PSHQ_n; n is the number of spacer carbon) were investigated by CP-MAS ¹³C NMR. ¹³C NMR T₁ of the spacer is dominated by the fluctuation of the dipole interaction due to the trans-gauche exchange. The activation energy of the trans-gauche exchange estimated from T₁ revealed the odd-even effect. This phenomenon is considered to be caused by the difference of the molecular packing. The packing between the molecules for the even numbered samples is more suppressive than that of the odd numbered sample.

【序】

サーモトロピック液晶である poly-[(phenylsulfonyl)-p-phenylene-alkylenebis(4-oxybenzoate)]_s (以下 PSHQ_n; nはスペーサーの炭素数) は Fig.1 に示すように rigid なメソゲンと flexible なスペーサー部分から構成されている。PSHQ_n はスペーサーを構成する炭素数 n が偶数か奇数かにより相転移点に変化する偶奇性を示すことが知られている。また、分子の形状は n が偶数の場合は直線的であるのに対し、奇数の場合は曲線的であることが報告されている [1]。本研究では PSHQ_n について、固体 ¹³C NMR のスペクトルおよびスピン-格子緩和時間 T₁ を測定し、スペーサーのコンフォメーションや分子動と n との関係を考察した。

Fig.1 Structure of PSHQ_n

キーワード：サーモトロピック液晶、¹³C NMR、偶奇性

まつざわひでかず、ひらいあつき、みずのもとひろ、えんどうかずなか、すはらまさひこ、
Chang Dae Han

【実験】

測定には CMX-300 スペクトロメーターを用い、 ^{13}C の共鳴周波数は 75.06MHz、MAS speed は 3.7kHz、CP の contact time は 1.0ms、測定温度は室温 \sim 520K で行なった。また、スペクトルの測定には、スピニングサイドバンド (SSB) を除去するために CP TOSS 法を用いた。 T_1 の測定には Torchia のパルス系列を用いた。

【結果と考察】

① ^{13}C NMR スペクトル

Fig. 2 に $n=12$ ($T_g=357.6\text{K}$, $T_M=439.9\text{K}$) の 293K のスペクトルを示す。ピーク (1) はメチレン炭素、(2) は $\text{O}-\text{CH}_2$ の炭素、(7) は $\text{C}=\text{O}$ の炭素、(3)~(6)、(8)、(9) のピークはコア部分のベンゼンの炭素とそれぞれ帰属できた。293K から徐々に温度をあげていくとピーク (1) はシャープになり、高温では 2 本のピークが観測された。これは γ -gauche 効果による高磁場シフトで説明できる。 T_g 以下で trans コンフォメーションをとっていたメチレンスパーサーが温度上昇とともに gauche コンフォメーションをとるようになるが、 γ 位の炭素が gauche コンフォメーションの場合、trans コンフォメーションに比べ、高磁場に現われるために、このような分裂が生じると考えられる。一般に γ -gauche 効果による高磁場シフトは 5ppm 程度であるが、観測された 2 本のピークのシフト差は 3~4ppm であり、2 つのコンフォメーションが速く交換していることが示唆される。

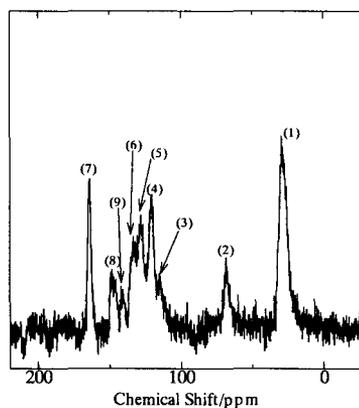


Fig.2 ^{13}C NMR spectrum of PSHQ12

② ^{13}C NMR スピナー格子緩和時間

ピーク (1) の T_1 は温度上昇に伴い指数関数的に増加していった。 T_1 は trans と gauche の交換に支配されていると考えられる。アレニウスの活性化プロセスを仮定し T_1 の温度変化から活性化エネルギー (E_a) を求めた。Fig. 3 に T_1 から見積もった trans と gauche の交換における活性化エネルギーの n 依存性を示す。 E_a は n が偶数の試料のほうが奇数の試料より大きいという偶奇性を示した。これは液晶分子のパッキングの違いにより生じていると考えられる。 n が偶数の場合、分子形状が直線的であるのに対し、奇数のほうは丸みを帯びた形状であり、両者のパッキングを比べた場合、偶数の方が密になる。このため、偶数のほうが trans-gauche の交換が起こりにくい環境となり、 E_a が大きくなると考えられる。

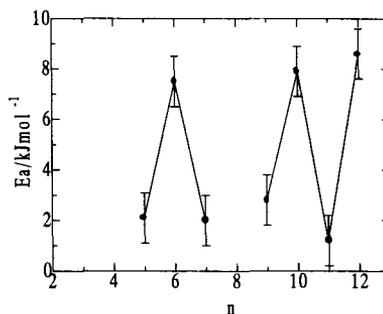


Fig.3 Activation energy for trans-gauche exchange estimated from T_1

【参考文献】

- [1] S. Chang and C. D. Han, *Macromolecules*, **30**, (1997) 1670.

単結晶 ^2H NMR による $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ の構造相転移の研究

(金沢大理) ○飯島隆広、水野元博、須原正彦

Studies of Structural Phase Transitions in $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ by means of Single Crystal ^2H NMR

Takahiro Iijima, Motohiro Mizuno, and Masahiko Suhara

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanazawa University

The temperature and angular dependences of ^2H NMR spectrum were measured for single crystal of $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$. At 283 K, the deuteron electric field gradient (EFG) tensors averaged by fast 180° flip of water molecules were determined. (e^2Qq/h , η) of ^2H corresponding to three water molecules in $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ octahedra, related each other by the pseudo three-fold axis, were obtained as (128 kHz, 0.72), (123 kHz, 0.82) and (106 kHz, 0.80). In phase II, the jumping rate for the reorientation of $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ around the three-fold axis (k) was obtained from the simulation of ^2H NMR spectra at the crystal orientation of $\theta_X = 135^\circ$. The rate at infinite temperature and activation energy for the reorientation of $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ were estimated from the temperature dependence of k as $k_0 = 3 \times 10^{16} \text{ s}^{-1}$ and $E_a = 64 \text{ kJmol}^{-1}$, respectively.

《緒言》 $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ は逐次相転移を起こし、5つの安定相が存在する。高温から順に I, II, III, IV, V 相とすると II 相は不整合相である。近年我々の行った多結晶試料における ^2H NMR 測定の結果、相転移は $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの再配向運動と密接な関係があることが分かった。そこで本研究では、 $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ 中の水分子や $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの局所構造や運動をより詳細に調べるために、H サイトの環境変化を極めて鋭敏に観測できる単結晶試料を用い ^2H NMR スペクトルの温度依存性、及び磁場方向依存性を測定した。

《実験》 ^2H NMR スペクトルは CMX-300 分光器を用い、共鳴周波数 45.825 MHz、四極子エコー法で測定した。II 相での空間群は $P\bar{3}$ であり、3 回軸に平行に単結晶試料の結晶固定座標の Z 軸をとった。

《結果と考察》 Fig. 1 に 283 K (IV 相) における ^2H NMR の四極子分裂 $2(\Delta\nu)$ の結晶座標軸 (X, Y, Z) 回りの角度依存性を示す。 $2(\Delta\nu)$ の角度依存性のフィッティングを Volkoff 法により行った結果、3つの ^2H の EFG テンソルの存在が認められた。この温度では、水分子の2つの ^2H の EFG テンソルは速い 180° フリップによって平均化されていると考えられる。フィッティングの結果得られた EFG テンソルを対角化し、主値と結晶座標に対する方向余弦を求めたところ、3つの非同値な水分子 $\text{H}_2\text{O}(1)$, $\text{H}_2\text{O}(2)$, $\text{H}_2\text{O}(3)$ に対応する ^2H の (e^2Qq/h , η) がそれぞれ (128 kHz, 0.72), (123 kHz, 0.82), (106 kHz, 0.80) と見積もられた。IV 相では空間群が $P2_1/c$ であるため Z

^2H NMR、核四極相互作用

いじまたかひろ、みずのもとひろ、すはらまさひこ

軸は擬3回軸となるが、これら3つの水分子は $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 八面体の6つの水分子のうち、擬3回軸によって関係づけられる水分子であることが分かった。

$\theta_x = 135^\circ$ における ^2H NMRスペクトルの温度変化を測定した。II相に入ると急激なスペクトルのブロードニングが起き、温度上昇とともにスペクトルの線幅は減少していった。Fig. 2に328 K (II相)における ^2H NMRの実測スペクトルを実線で示す。スペクトル中央付近の鋭いピークは単結晶試料に取り込まれたフリーな水によるものである。II相でのスペクトルの温度変化について、 $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの3回軸まわりの再配向運動モデルを用いてシミュレーションを行なった。シミュレーションに用いる ^2H のEFGテンソルの主値や主軸方向は、IV相での角度変化から得られた結果を利用した。Fig. 2の破線で示すように実測スペクトルをうまく再現できた。シミュレーションの結果得られた $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの再配向運動の速さ k を図中に示す。Fig. 3に k の温度依存性を示す。フィッティングから、この再配向運動の頻度因子、活性化エネルギーはそれぞれ $k_0 = 3 \times 10^{16} \text{ s}^{-1}$ 、 $E_a = 64 \text{ kJmol}^{-1}$ と見積もられた。

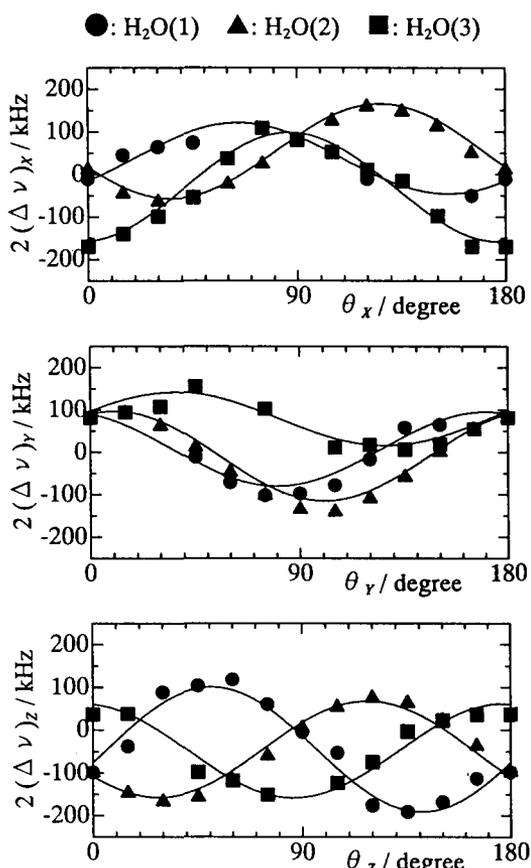


Fig. 1. Angular dependences of the quadrupole splittings, $2(\Delta\nu)$, around X, Y and Z axes in $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ at 283 K (phase IV). The solid lines show the theoretical curves.

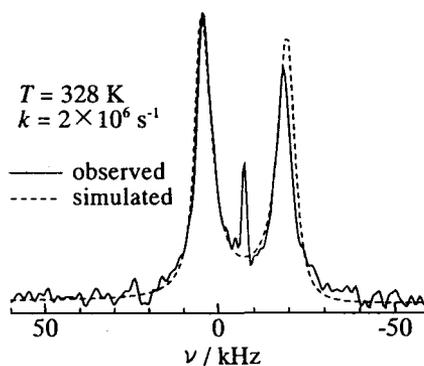


Fig. 2. ^2H NMR spectrum in $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ at $\theta_x = 135^\circ$ for X rotation.

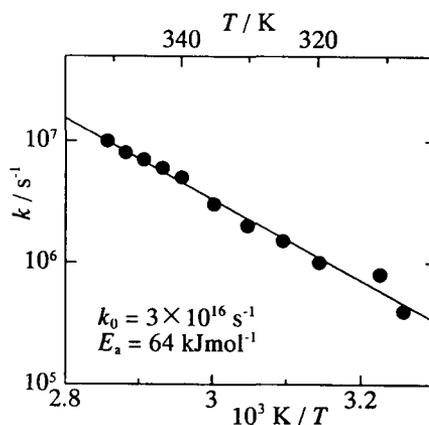


Fig. 3. Temperature dependence of the jumping rate (k) for the reorientation of $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ in phase II.

ナイロン46結晶化物の構造と分子運動性

(群馬大・工) ○栗原良仁・上原宏樹・山延 健・甲本忠史

Structure and molecular mobility of Nylon46

Department of Chemistry, Gunma University

Yoshihito Kurihara, Hiroki Uehara, Takeshi, Yamanobe, and Tadashi Komoto.

NMR measurements were carried out for nylon46 crystallized under several conditions in order to investigate the structure and molecular mobility. From CPMAS spectra, NMR chemical shift of carbonyl carbon dose not depend on samples. On the other hand, NMR chemical shifts for methylene carbons varied with crystallization time. Spectra for crystalline and amorphous phases were recorded by using T_1 difference and NMR chemical shifts for crystalline and amorphous phases are attributed. From NMR chemical shifts, it was found that methylene carbon for crystalline phase takes trans conformation rather than gauche conformation.

1. 緒言

ナイロン46は、そのアミド基間で水素結合を形成するため高強度、高融点を有し、さらに高い熱容量、結晶化速度、結晶化度そして寸法安定性をも兼ね備えているエンジニアリングプラスチックの一つとして知られている。ポリマーの物性を決定する上で、そのモルフォロジー、コンフォメーションや分子運動などは非常に重要な因子となっている。本研究では、ナイロン46のモルフォロジー、結晶部や非晶部の分子鎖のコンフォメーション、分子運動性や結晶化機構についてNMRを用いて検討する。

2. 実験

急冷試料 (MQ) はナイロン46を320℃で熔融後、氷水中にて急冷し作製した。単結晶試料 (SGC) は、1,4-ブタンジオール溶液中 (0.05wt/t%) でナイロン46を溶解、除冷し、180℃で15分間セルフシーディングした後、次いで140℃で24時間等温結晶化したものを濾過後、エタノールで十分に洗浄し、真空下で室温で24時間乾燥させ、作製した。また、結晶化試料はナイロン46を窒素雰囲気下にて320℃で5分間熔融後、270℃で所定の時間内 (1M、5M、10M、30M、1H、3H、6H、12H、24H) で結晶化することにより作製した。これらの試料を、室温にて固体 ^{13}C CPMAS NMRスペクトルおよび ^{13}C T測定などを行い、構造と分子鎖の運動性を検討した。NMR測定はJOEL EX 270 W.B. を使い、CPMAS法により測定した。

3. 結果と考察

DSCの測定結果より、結晶化度は最初の1時間で急激に上昇し、さらに6時間くらいまでは上昇し続け、約6時間以降はほぼ一定であった。

図1に、ナイロン46単結晶の ^{13}C CPMAS スペクトルを示した。173ppm付近のピークはカルボニル炭素のピークである。42、36、27、26ppmのピークはメチレンのピークであり、それぞれ α 、 α 、 β 、 β に帰属される。

図2に、各試料の ^{13}C CPMASスペクトルのメチレン部を示した。MQから、結晶化時間が変化するとピークが徐々にシャープになっていくのがわかる。これは、結晶化が進み構造が均一

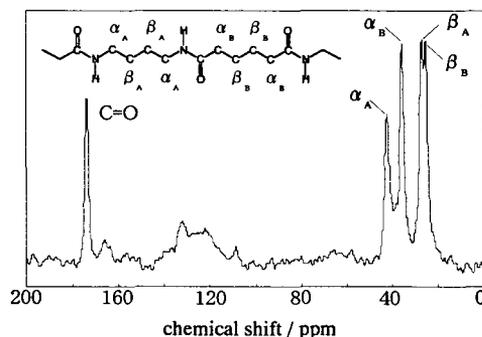


Figure 1. ^{13}C CPMAS spectrum of Nylon 46 single crystal in solid state at room temperature.

になっていることを示している。 α の部分に着目すると、結晶時間が30分位までにピークが急激に変化している。この変化は非晶から結晶への構造変化に伴う、コンフォメーションの違いを反映している。

次に図3に、 β 炭素の緩和曲線を示した。Tが1秒未満の成分と、Tが長い30秒以上の成分が存在することがわかる。結晶化時間の短い試料ではTの長い成分は少ないが、結晶化時間が長くなるにつれて長いTの割合が増加することから、Tの短い成分が非晶成分、Tの長い成分が結晶成分である。両成分とも結晶化時間の増加に伴いTが増加している。つまり、結晶化時間の増加に伴い、非晶から結晶への構造変化と同時に、結晶、非晶の両成分の運動性は低下していることがわかる。

結晶と非晶のTの値を考慮し、結晶部と非晶部のそれぞれのスペクトルを示したのが図4である。図4 (a)は、Torchiaのパルスで $\tau=15$ sec.でのスペクトルである。非晶のTは約1秒程度であり、 $\tau=15$ では完全に緩和していると考えられる。これに対して、図4 (b)は、DD/MAS法で待ち時間を0.1秒にしたときのスペクトルである。この条件では、結晶成分は飽和してスペクトルには寄与していない。結晶と非晶のスペクトルを比べると、結晶と非晶で化学シフトに差があることがわかる。最も大きな変化は α^A であり、結晶が約43、非晶が41ppmである。

一般に、化学シフトはコンフォメーションに強く影響される。 γ 効果を用いて解釈すると、 α に対して γ 位はもう一つの α^A と α^B である。アミド基は、通常トランスコンフォメーションをとることから、結晶と非晶で $\alpha^A-\alpha^A$ のコンフォメーションの違いがあると考えられる。 α^A メチレン同士の γ 効果であるので、結晶が非晶に比べて低磁場にあるということは、結晶の中の $\alpha^A-\alpha^A$ はトランスコンフォメーションをとり、伸びきった構造であると考えられる。カルボニル炭素は、隣接するNHと水素結合を形成するが、その化学シフトが変化していないということは、水素結合は結晶化の初期に形成されて、結晶化時間と共にメチレン部の構造変化が進行すると考えられる。

キーワード：ナイロン46、結晶化

くりはらよしひと、うえはらひろき、やまのべたけし、こうもとただし

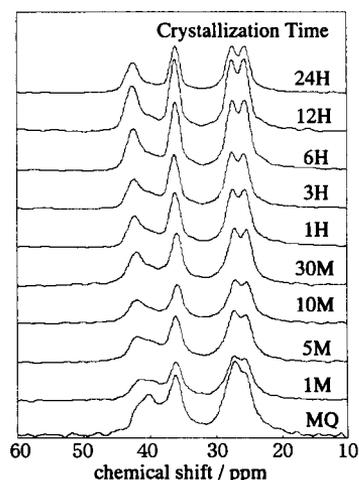


Figure 2. ^{13}C CPMAS NMR spectra.

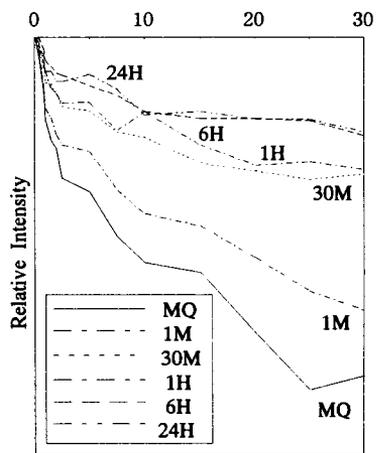


Figure 3 Relaxation curves.

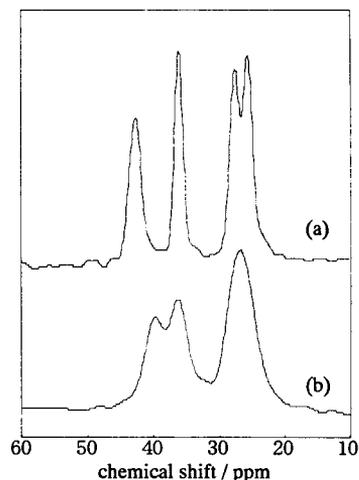


Figure 4. ^{13}C CPMAS spectra of methylene part : (a) crystalline phase. (b) amorphous phase.

アイソタクチックポリプロピレン重合パウダーの構造と分子運動

(群馬大・工) ○植木克典、上原宏樹、山延 健、甲本忠史

Structure and Molecular Mobility of Nascent Isotactic Polypropylene Powders

○Katsunori Ueki, Hiroki Uehara, Takeshi Yamanobe, and Tadashi Komoto
(Department of Chemistry, Gunma University)

Nascent polyolefine powders have the characteristic morphology. The origin of these structural details, however, has not been revealed. In this work, structure and molecular mobility of nascent isotactic polypropylene (iPP) powders and crystallized samples by several crystallization conditions were investigated. From the comparison of solid-state ^{13}C NMR spectra, nascent powder exhibits almost the same spectrum as melt-quenched sample. On the other hand, in the spectrum of nascent powder, peak of amorphous region appeared stronger than those for other samples. This suggests that amorphous chain of nascent powder possess high mobility. TEM micrograph of nascent powder dose not show typical lamellar structure. From these results, it is found that the amorphous phase of nascent powder is fairly different from other samples.

1. 緒言

ポリオレフィン重合パウダーは、種々の特異なモルフォロジーを有することが知られている。重合パウダーでは、溶液もしくは熔融結晶化のような比較的穏やかな結晶化条件とは異なり、重合時において触媒活性点からの急速な結晶化が予想される。そのため、重合パウダーは、溶液、熔融結晶化物とは異なったモルフォロジーを有し、また、分子運動性の点でも違いがあるものと考えられる。本研究では、アイソタクチックポリプロピレンについて、重合パウダーと熔融結晶化物との比較から、重合パウダーに特徴的な構造についての知見を得ることを目的とした。

2. 実験

試料として、アイソタクチックポリプロピレン (iPP) の重合パウダー及びペレットを用いた。重合パウダーについてはパウダーそのものの他に、210°Cで熔融後、氷水中で急冷した試料 (PMQ) を作製した。iPP ペレットからは、210°Cで熔融後、135°Cにて等温結晶化したもの (IC) と氷水中にて急冷したもの (MQ) を作製した。これら4種の試料について、温度可変 ^{13}C CP/MAS NMR 測定を行い、その構造と分子の運動性を検討した。また、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察、示差走査熱量計 (DSC) 測定等を行った。

3. 結果と考察

Fig.1に各試料の室温での ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す。メチレン、メチン、メチル炭素のピークがそれぞれ44.0、26.3、21.8ppm付近に観測された。重合パウダーについては、熔融—急冷試料であるMQ、PMQとほぼ同様のスペクトルを与えることがわかる。また、DSC測定から試料の結晶化度を見積もった結果、重合パウダー、MQ、PMQ、ICの結晶化度はそれぞれ34.2、43.8、46.7、63.3%であり、重合パウダーの結晶化度はMQ、PMQよりも低いことが確認された。

結晶性の低い重合パウダーにおける分子鎖の挙動を検討するため、温度可変 ^{13}C CP/MAS NMR 測定を行った。Fig.2に100°Cでの各試料のスペクトルを示す。各スペクトルにおいて、メチレン炭素及びメチン炭素ではピークが2本観測され、高磁場側が結晶、低磁場側が非晶のピークである。室温においては、非晶部の分子運動の速さが数十kHzの速さであるために、いずれの試料において

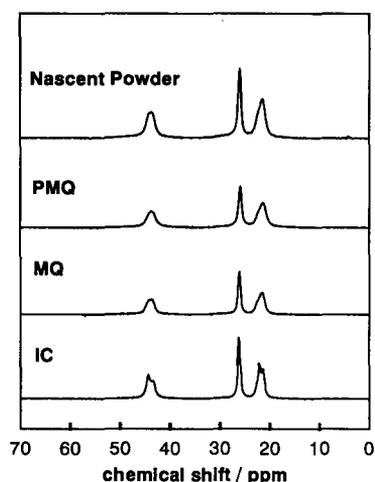


Fig.1 ^{13}C CP/MAS NMR spectra at room temperature

も非晶のピークは観測されない。温度上昇に伴い、非晶のピークの強度は徐々に強くなり、分子運動の目安となる。100℃のスペクトルを各試料と比較してみると、重合パウダーでは、非晶のピークが他の3つの試料に比べ非常に強く出ており、特にメチレン炭素ピークでは結晶ピークよりも非晶ピークの方がピークの高さが高い。このことは、重合パウダーの非晶分子鎖の運動性が他の試料に比べて高いことを示している。室温でのスペクトルではMQと重合パウダーはほとんど同じスペクトルを示していたことを考慮すると、重合パウダーの非晶部の分子運動は、温度上昇により急激に激しくなることがわかる。このことは重合パウダーの非晶部の環境がMQなどとは異なり、周りの分子からの束縛が小さいことを意味している。そこで次に、TEMを用いて各試料のモルフォロジー観察を行った。TEM観察では、四酸化ルテニウム電子染色/超薄切片法によって観察用試料を作製した。Fig.3に重合パウダーとMQ試料のTEM写真を示す。染色剤である四酸化ルテニウムは試料の非晶分子鎖にのみ選択的に結合し、電子密度を上昇させるため電子線の透過を妨げ、TEM写真においては非晶部が黒く写る。逆に電子線の透過する結晶部は白く写り、MQでは白い筋状のラメラが観察された。IC、PMQにおいても同様のラメラが観察された。また、これらの試料ではラメラが格子状に観察されるiPPに特徴的なクロスハッチラメラ構造も確認された。つまり、これらの試料ではある程度長周期の構造が存在していることがわかる。一方、重合パウダーについては他の3つの試料と異なり、明瞭なラメラ構造がほとんど観察されなかった。重合パウダーでは分子鎖が折りたたみ構造をとらず、結晶は非常に細かい微結晶として存在することが予想される。つまり、分子鎖のごく周りだけに注目すると他の試料とはあまり変わらないが、少し大きな範囲に注目すると違いがあることがわかる。このような構造の違いが分子運動の差に現れていると考えられる。

以上のように、非晶分子鎖の高い運動性、ラメラ構造をとらないモルフォロジーなど、重合パウダーの構造は重合時における結晶化の特異性を示すものである。さらに、パルスNMRによる緩和時間測定等を行い、構造と分子運動の面から議論する予定である。

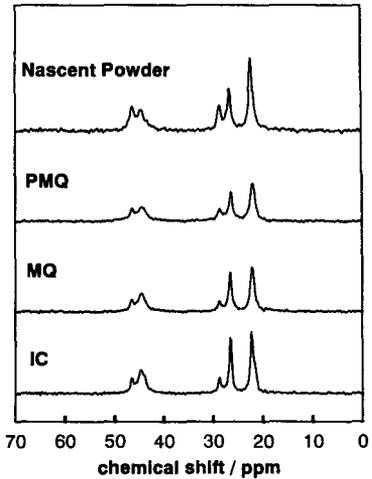


Fig.2 ^{13}C CP/MAS NMR spectra at 100°C

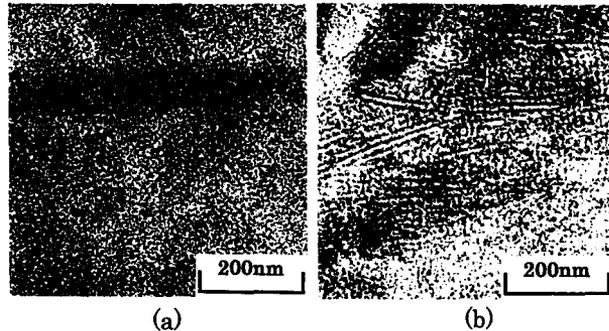


Fig.3 TEM micrographs of samples, (a):nascent powder, (b):MQ

キーワード：アイソタクチックポリプロピレン、重合パウダー

うえきかつのり、うえはらひろき、やまのべたけし、こうもとただし

¹³C および ¹H の T₁ および T_{1ρ} からみた凍結乾燥製剤の分子運動性
(国立衛研) ○吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄

Interpretation of Molecular Mobility of Lyophilized Protein Formulations Based on T₁ and T_{1ρ},
Measured by ¹H and ¹³C Solid-State NMR

(National Institute of Health Sciences) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima

The T₁ and T_{1ρ} of dextran protons in lyophilized bovine serum γ-globulin formulations containing dextran were determined by solid-state pulsed ¹H-NMR. The T₁ and T_{1ρ} of dextran methin carbons were also determined by solid-state high resolution ¹³C-NMR. Temperature dependence of the T₁ and T_{1ρ} changed around the critical temperature of appearance of Lorentzian relaxation (T_{mc}). T_{1ρ} exhibited a larger change than T₁, and can be considered to be a more useful parameter to detect changes in molecular motion of formulations. Temperature dependence of T₁ and T_{1ρ} of protons was similar to that of methin carbons, indicating that the motion of protons is similar to that of carbons. Lyophilized formulations with higher water activities showed a temperature dependence of T_{1ρ} with a minimum. Temperature dependence of τ_c calculated from the observed T_{1ρ} showed a distinct break at a temperature approximately 30°C higher than the T_{mc}.

【目的】タンパク質凍結乾燥製剤の安定性は製剤の分子運動性に影響されることが知られている。今回、凍結乾燥製剤の分子運動性を表す有用な指標を見出すことを目的とし、デキストランを高分子添加剤として用いた凍結乾燥製剤について、¹³C および ¹H それぞれの T₁ および T_{1ρ} を測定し、その温度依存性を明らかにした。また、T_{1ρ} に極小値が観察された製剤については、相関時間(τ_c)を算出し、その温度依存性を考察した。

【実験】デキストラン(40k)および牛血清γグロブリンを重量比 50 : 1 で重水に溶解した溶液を凍結乾燥してタンパク質凍結乾燥製剤を調製した。製剤を一定湿度下 (12%~86%RH) に保存し、水分含量を調整した。製剤中のプロトンのスピン-格子緩和時間(T₁)および回転系におけるスピン-格子緩和時間(T_{1ρ})をパルス NMR (MU-25、日本電子) を用いて測定した。T₁ の測定は Inversion-recovery法で行った。T_{1ρ} は 10 ガウスのスピンロッキング磁場を照射して測定した。また、デキストランのメチン炭素の T₁ および T_{1ρ} を固体高分解能 ¹³C-NMR (Varian) を用いて測定した。T₁ の測定には Torchia のパルス系列を用い、T_{1ρ} の測定には 54 ガウスのスピンロッキング磁場を用いた。

【結果】水分活性 0.12~0.86 の凍結乾燥製剤について測定した ¹³C および ¹H の T₁ を Fig.1(A)

タンパク質、凍結乾燥製剤、分子運動性、緩和時間、温度依存性

よしおかすみえ、あそゆきお、こじましげお

に、 T_{1p} を Fig.1(B)に示す。 ^1H のスピン-格子緩和は、いずれの水分活性の製剤においても測定温度の全領域で一相性の減衰を示し、 T_1 は温度上昇とともに減少した。それに対し、 ^1H の回転系におけるスピン-格子緩和は、水分活性の高い(0.86 および 0.75)製剤では高温領域で二相性の減衰を示し、その領域では T_{1p} は温度上昇とともに増大したため、 T_{1p} の極小値が観察された。 T_{1p} の極小値は水分活性の高い製剤ほど低温側に移動した。また、水分活性が 0.60 および 0.75 の製剤では、それぞれ約 35°C および 25°C を超えると、 T_1 および T_{1p} いずれも温度上昇に伴う低下率が大きくなった。その温度は前回に報告した ^1H のスピン-スピン緩和においてロレンツ型緩和が現れ始める温度 (T_{mc}) とほぼ一致した。 T_{mc} 付近における温度依存性の変化は、 T_{1p} の方が T_1 より大きかった。

水分活性の高い製剤について測定した ^{13}C の T_1 および T_{1p} は、 ^1H と同様の温度依存性を示し、 T_{1p} では極小値がみられた。 T_{mc} 付近における温度依存性の変化は ^1H と同様に、 T_{1p} の方が T_1 より大きかった。

T_{1p} に極小値がみられた水分活性の高い製剤について、 ^{13}C および ^1H の T_{1p} の観測値から計算した τ_c の温度依存性を Fig.2 に示す。また ^{13}C の T_1 の観測値から炭素と水素の双極子-双極子相互作用が支配的であると仮定して計算した τ_c の温度依存性も Fig.2 に示す。いずれの τ_c も高温領域で直線から外れた温度依存性を示した。

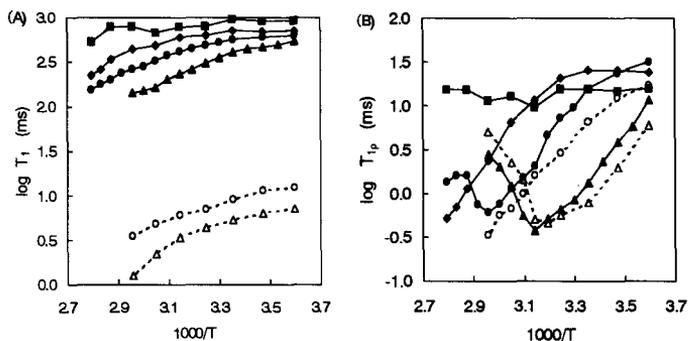


Fig.1. Temperature dependence of T_1 (A) and T_{1p} (B) of protons (solid symbol) and carbon (open symbol). water activity: 0.12 \blacksquare , 0.60 \blacklozenge , 0.75 \bullet , 0.86 \blacktriangle

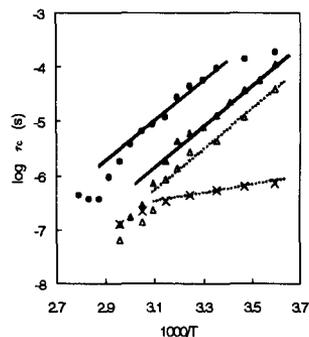


Fig.2. Temperature dependence of τ_c . X: calculated from T_1

【考察】 ^{13}C および ^1H ともに T_{mc} 付近において T_1 および T_{1p} の温度依存性が変化し、 T_{mc} を超えると製剤の運動性が急激に高まることが示されたが、 T_{1p} は T_1 に比較して変化の程度が大きく、製剤中の遅い動きの変化をより感度良く検出できることが分かった。また、 T_1 および T_{1p} の温度依存性が ^{13}C および ^1H で大きな違いが観察されなかったことから、製剤中のデキストラン分子のプロトンはメチン炭素と同様の運動性をもっていると考えられる。 τ_c の温度依存性は製剤の T_{mc} よりも約 30°C 高い温度で直線から外れ、 T_{1p} によって観察される運動性が変化していることが示唆された。

雲母及びオクトシリケート層間における
ドデシルトリメチルアンモニウムイオンの構造と運動

(筑波大化) ○篠原絵美、山内美穂、石丸臣一、池田龍一

Structures and Dynamics of *n*-Dodecyltrimethylammonium Ions Intercalated into Tetrasilicicfluormica and Octosilicate

Emi Shinohara, Miho Yamauchi, Shin'ichi Ishimaru, Ryuichi Ikeda
Department of Chemistry, University of Tsukuba

Arrangements of *n*-dodecyltrimethylammonium ions intercalated into octosilicate and tetrasilicicfluormica were revealed by powder X-ray diffractions and ^{13}C CP/MAS NMR spectra that the long axis of these ions are inclined about 46° and almost parallel to the silicate layer, respectively. The dynamic behavior of these ions in the 2-D space formed between silicate layers was also investigated by measuring temperature dependences of ^1H NMR spin-lattice relaxation times (T_1) and second moments (M_2) of the resonance lines. We discuss these results in connection with differences in each silicate layer structures.

1. 序論

雲母などの層状鉱物は、縮合オキシ酸の層と、容易にイオン交換する層間の陽イオンからなる化合物である。この層間イオンは二次元に限られた空間に存在するため、バルクとは異なる分子配向や運動が予想される。

オクトシリケート ($\text{Na}_2\text{Si}_8\text{O}_{17} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) とフッ化四ケイ素雲母 ($\text{Na}_2\text{Mg}_{3-x}\text{Si}_4\text{O}_{10}\text{F}_2$, $x=0.3-0.4$) はいずれも合成層状鉱物であるが、オクトシリケートは均一な層格子を持っているのに対し、雲母では層中央の Mg の約 1/10 が無秩序に欠損することにより負電荷を生じるため、層間の環境は大きく異なるものと考えられる。

本研究では層構造の異なる二つの層状鉱物、オクトシリケートとフッ化四ケイ素雲母を取り上げ、それぞれにインターカレートしたドデシルトリメチルアンモニウムイオンの構造と運動を明らかにすることを目的とし、粉末 X 線回折、示差熱分析 (DTA)、 ^1H 及び ^{13}C NMR 測定を行った。

2. 実験

Na-オクトシリケートは、モル比で 4 : 1 の二酸化ケイ素と水酸化ナトリウムを混合し、 100°C で 14 日間水熱合成を行った。得られた沈殿を pH9.5 の水酸化ナトリウム水溶液で洗浄し、ろ過後乾燥した。同定は蛍光 X 線分析、粉末 X 線回折測定により行った。Na-フッ化四ケイ素雲母 (コープケミカル) は市販のものをそのまま使用した。イオン交換は、それぞれのイオン交換容量の 2 倍量の陽イオンを含む塩化ドデシルトリメチルアンモニウム水溶液に層状鉱物を分散させて行った。生成した層間化合物は遠心分離し、蒸留水で洗浄した後に乾燥した。以下雲母・オクトシリケートそれぞれのインターカレーション化合物を DTMA-MC, DTMA-OC と略す。DTA 測定は DTMA-MC については 82-426 K、DTMA-OC については 85-331 K の温度範囲で行った。 ^{13}C CP-MAS NMR は測定周波数 75.5 MHz、室温で測定した。 ^1H NMR 吸収線の二次モーメント (M_2) は、DTMA-MC については温度範囲 100-390 K、DTMA-OC については 100-280 K で測定した。 ^1H NMR スピン格子緩和時間 (T_1) は、それぞれ測定周波数 33.8 MHz と 54.3 MHz、DTMA-MC については温度範囲 100-400 K、DTMA-OC については 100-270 K で測定した。

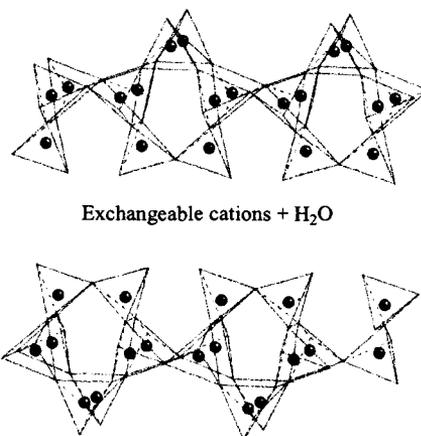


Fig.1 Schematic model of octosilicate.

^{13}C CP/MAS、層間化合物、粘土鉱物、構造、分子運動

しのはら えみ、やまうち みほ、いしまる しんいち、いけだ りゅういち

3. 結果と考察

DTA 測定では、両化合物とも上記の温度範囲において相転移は検出されなかった。

室温における粉末 X 線回折ピーク (Fig.2) より DTMA-MC、DMTA-OC の層間距離を決定した。(001) 面の反射から面間距離はそれぞれ $19.4 \pm 0.3 \text{ \AA}$ 、 $23.7 \pm 0.8 \text{ \AA}$ と見積もられた。ケイ酸層の厚さを考慮すると層間距離としてそれぞれ $9.8 \pm 0.3 \text{ \AA}$ 、 $14.2 \pm 0.8 \text{ \AA}$ が得られた。

^{13}C CP-MAS NMR スペクトル測定の結果は Fig.3 のようになった。この結果より、オクトシリケート層間の DTMA のアルキル鎖は秩序だって並んでおり、オールトランス型のコンフォメーションをとっていることがわかった。一方 DTMA-MC ではインターカレートした DTMA の立体配座と層間での配向はかなり乱れていると考えられる。この結果と粉末 X 線回折で求められた層間距離をあわせて考慮すると、DTMA-OC では、DTMA のアルキル鎖の長軸はケイ酸層に対し約 46° で傾き、またその配座の乱れは小さいと考えられる。しかし DTMA-MC の配座は乱れており、アルキル鎖の長軸の配向も秩序がないと予想される。これはオクトシリケートのイオン交換容量が雲母よりも大きく、また、雲母の電荷中心が層格子内で乱れて分布しているのに対し、オクトシリケートでは結晶学的に定まった位置に存在していることによるものであると考える。

層間での DTMA の運動を調べるために ^1H NMR 吸収線の M_2 および T_1 の測定を行った。それぞれの層間化合物について測定した M_2 の温度変化の様子を Fig.4 に示す。DTMA-OC の測定結果と DTMA について考えられる運動状態に対して得られた計算値との比較からオクトシリケート層間では、DTMA は 100 K で既にメチル基の回転運動が起こっており、110–160 K でアンモニウム基の回転運動が起こり、160 K 以上では分子全体の一軸回転運動が徐々に励起されていることがわかった。一方雲母の層間では、前述のように DTMA が不均一に配向していることを考えると、各分子を束縛する環境はそれぞれ異なっており、 M_2 が広い温度変化にわたって徐々に変化することを説明できる。

DTMA-OC の ^1H NMR の T_1 の温度変化は、3つの理論曲線の重ね合わせでよく説明することができた。この理論曲線の極小値から運動による二次モーメントの変化量 (ΔM_2) を求めた結果、低温側の2つの極小を N 末端メチル基の回転、高温側の極小をアンモニウム基の回転に帰属した。

以上の結果より、ドデシルトリメチルアンモニウムイオンはオクトシリケート中では二次元結晶、フッ化四ケイ素雲母中では二次元アモルファス構造と呼び得る状態を形成していることが明らかになった。

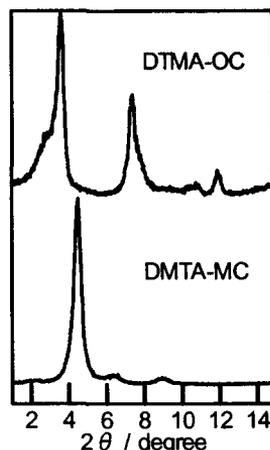


Fig.2 Powder X-ray diffraction patterns of intercalation compounds.

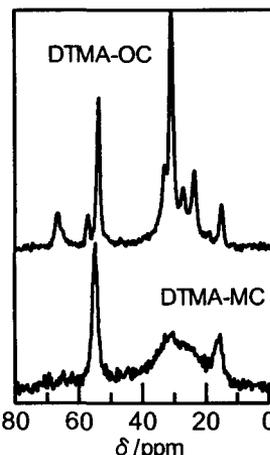


Fig.3 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of intercalation compounds.

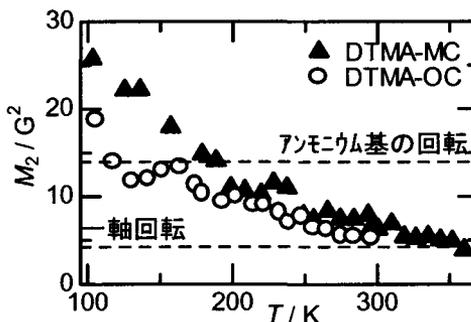


Fig.4 Temperature dependence of M_2 in intercalation compounds.

エコーフーリエ変換を可能にした固体NMRイメージング

筑波大学 物理工学系 ○斉藤誠治、松井 茂

Solid-State NMR Imaging Using Echo Fourier Transformation

S. Saito and S. Matsui

*Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba,
Ibaraki 305-8573, Japan*

A method of solid-state NMR imaging which permits echo Fourier transformation (FT) has been developed using a magic echo train. The echo FT imaging can be implemented simply by modifying the gradient pulse sequence in the previous magic echo imaging (TREV-16TS) so that the one-dimensional k-space trajectory follows the sampling points which are symmetric about the k origin. The implemented ability of echo FT improves the performance of the magic echo imaging: the sensitivity gained by $\sqrt{2}$, the phase correction unnecessary, and the digital resolution doubled. 1D and 2D imaging experiments have been conducted on some solid samples, confirming the improved performance and revealing a TREV-16TS adjustment parameter which is critical for the successful echo FT imaging.

一般に、液体のNMRイメージングにおいてはFIDではなくECHOの形でイメージング信号を取得しそのフーリエ変換を行う。これは、FIDの代わりにECHOを用いることによりフーリエ変換された信号の虚数部(分散成分)をゼロにすることができる(1)という事実を画像再構成における利点として活用できるためである。すなわち、ECHOを用いれば変換された信号の絶対値表示を行っても、虚数部に帰因する分解能の低下を招くことなく高分解能画像が得られるためである。当然のことながら、信号の位相補正も不要となる。

一方、固体のNMRイメージングでは、このような利点があるにもかかわらず通常、FIDの形でイメージング信号が取得され、ECHOを用いた実験例はほとんどない。これは、固体のイメージングにおいてはdipolar interaction消去のためにline narrowing等を行う必要があるためECHOの形で信号を取得する技術的余裕がないためと思われる。我々の知る限り唯一のECHOを用いたイメージング実験は、MREV-8によるline narrowing下で単一の 180° パルスを印加してECHOを発生させたものである(2)。しかし、このタイプのECHO発生法では、非常に高度なline narrowingが実現できなければ、本来時間原点(k origin)について対称であるべきECHOが容易に非対称になってしまうという欠点がある。ECHOの非対称化は虚数成分の消去を不完全なものにする。

今回我々は、マジックエコーを用いた固体イメージング法(3)において、磁場勾配の印加の仕方に簡単な変更を加えることにより、実質的にECHOの形で信号を取得することに気づき、その有効性を確認する目的で種々の実験を行った。今回報告する方法は、液体におけるCPMG法を用いたイメージング(4)を応用したものであり、line narrowingの効率低下に伴うECHOの非対称化が起りにくいという長所を持っている。

キーワード： 固体イメージング、エコーフーリエ変換、k空間、絶対値表示、マジックエコー

さいとうせいじ、まついしげる

ECHO フーリエ変換を可能にすることで、位相補正が不要になる以外にデジタル分解能の2倍向上、更にS/N比の $\sqrt{2}$ 倍向上が期待される。

図1にマジックエコー固体イメージング法のパルス系列TREV-16TS(a)、及びそれに対応する信号のサンプリング点のk空間(1次元)における位置(b)を示す。従来は磁場勾配パルス系列(A)を用いて、対応するk空間サンプリング点を得ていた。図1bからわかるようにこのサンプリング点はk空間の原点に関して対称でない。したがって、偶数番目と奇数番目のサンプリング点を各々別個のFIDとしてフーリエ変換する必要がある。しかし、磁場勾配パルス系列(B)を用いればk空間のサンプリング点是对称化され、サンプリング点全体を一つのECHOとしてフーリエ変換できる。この時、視野幅を(A)と(B)で共通にするためには、(B)では(A)の4倍の磁場勾配強度を用いる必要がある。

実験は、プロトン共鳴周波数60MHzの自作の装置を用いて行った。テストサンプルとしてnatural rubber, adamantane, polycarbonateを用い、空間1D、2Dのイメージング実験を行った。RF磁場強度は約100kHzである。視野幅は約9mmとした。実験結果の詳細は討論会当日に発表するが、line narrowingの程度にほとんど影響されることなくほぼ期待通りの結果が得られ、本方法の有効性が確認された。

<謝辞> 本研究を行うにあたり、激励とデータ処理に関する協力を頂いた井上多門博士(筑波大名誉教授、応用数理研究所)、橋本雄幸博士(横浜創英短期大)に感謝致します。

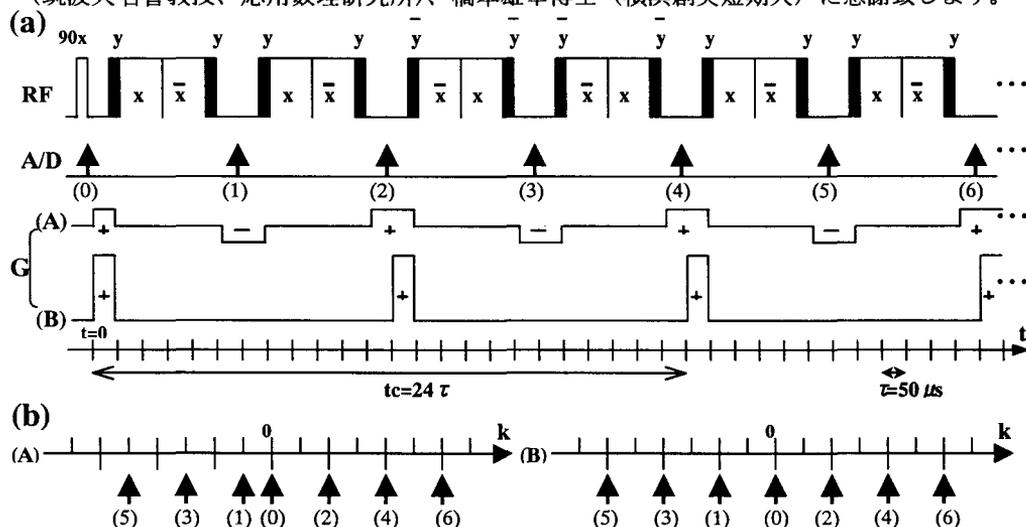


Fig. 1 Pulse sequences for magic echo solid-state NMR imaging (TREV-16TS) (a) and the corresponding signal sampling points in the 1D k-space (b). Gradient sequence (A) is modified to gradient sequence (B) to allow symmetric echo acquisition.

<文献>

- (1) A. Bax, A. L. Mehlkopf, and J. Smidt, *J. Magn. Reson.* **35**, 373 (1979).
- (2) G. C. Chingas, J. B. Miller, and A. N. Garroway, *J. Magn. Reson.* **66**, 530-535(1986).
- (3) S. Matsui, *Chem. Phys. Lett.* **179**, 187-190 (1991); *J. Magn. Reson.* **95**, 149-153 (1991); *J. Magn. Reson.* **98**, 618-621 (1992);
S. Matsui, Y. Ogasawara, and T. Inouye, *J. Magn. Reson. A* **105**, 215-218 (1993);
S. Matsui, M. Nonaka, T. Nakai, and T. Inouye, *Solid State NMR* **10**, 39-44 (1997).
- (4) D. J. O. McIntyre, F. Hennel, and P. G. Morris, *J. Magn. Reson.* **130**, 58-62 (1998).

高気体透過性ポリマーPTMSPにおけるXenonのダイナミクスの研究
(帝人¹、阪大院理²、東大原総セ³)

○永阪文惣^{1,3}、尾身洋典²、江口太郎²、中村亘男²、伊藤泰男³

High-Pressure NMR Study on Dynamics of Xenon in Poly(1-trimethylsilyl-1-propyne)

○Bunsow Nagasaka^{1,3}, Hironori Omi², Taro Eguchi², Nobuo Nakamura², and Yasuo Ito³

¹Material Analysis Research Laboratories, Teijin Ltd., Hino, Tokyo 191-8512

²Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043

³Research Center for Nuclear Science and Technology, The University of Tokyo, Tokai, Ibaraki 319-1106

Dynamics of the xenon confined in the micropore in a highly permeable poly(1-trimethylsilyl-1-propyne), PTMSP, have been investigated by ¹²⁹Xe high-pressure NMR. A ¹²⁹Xe signal due to the confined xenon in the micropore was observed at low-field (190 – 208 ppm) in the pressure range between 0.5 and 8.0 MPa. The chemical shift value extrapolated to 0 MPa implies that relatively small micropores exist in PTMSP. Temperature dependence of ¹²⁹Xe 2D-exchange NMR suggests that the chemical exchange takes place between the free xenon and the confined one in Xe / PTMSP, indicating that PTMSP is highly permeable.

高い気体透過性をもつポリ(トリメチルシリルプロピン) PTMSP中の micropore の特性とそこに閉込められた xenon のダイナミクスを高圧 ¹²⁹Xe NMR を用いて調べた。陽電子消滅法から PTMSP には 2 種類のサイズの異なる micropore が存在すると考えられているが[1]、高圧下 (Xe, 8 MPa) で ¹²⁹Xe NMR を測定すると confined xenon peak 1 本だけが観測され、その 0 MPa 補外値 (190 ppm) から PTMSP が比較的小さな micropore をもつことがわかった[2]。また低圧下 (~ 0.5 MPa)

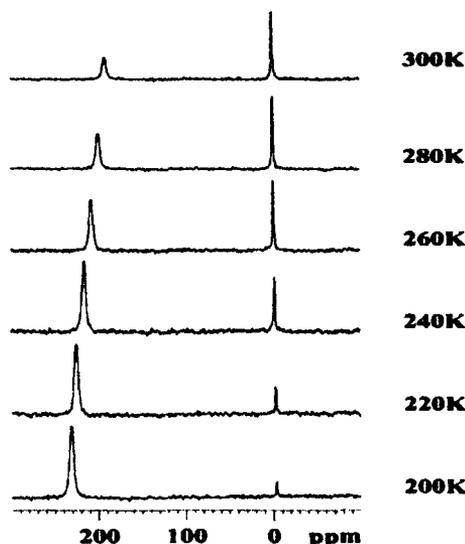


Fig. 1 Temperature dependence of ¹²⁹Xe NMR spectra of Xe / PTMSP at ca. 0.5 MPa.

Key words: 高圧 ¹²⁹Xe NMR、ダイナミクス、PTMSP、気体透過性、高分子

ながさかぶんそう、おみひろのり、えぐちたろう、なかむらのぶお、いとうやすお

で ^{129}Xe NMR の温度依存性を調べると (図 1)、温度降下とともに confined xenon の数が増加し、低磁場シフトすることがわかった。PTMSP は Polycarbonate などの高分子と同程度の ^{129}Xe NMR 化学シフトを与えるが、これらの高分子で観測されているような confined xenon peak の線幅の著しい温度依存性を示さない [3]。一方、図 2 の ^{129}Xe 2D-exchange NMR から、室温で free Xe との化学交換が起こっていることがわかるが、これは PTMSP の高い気体透過性を裏付ける [4]。他の高分子の分子運動と PTMSP 中の分子運動とを比較検討すると同時に、micropore 内の xenon の臨界現象や凝集状態についても報告する。

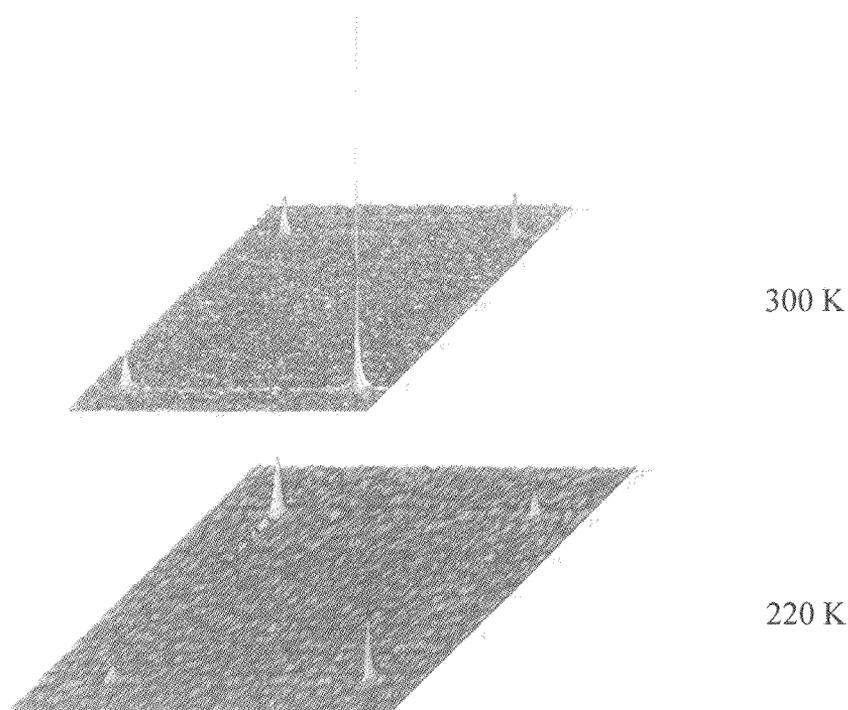


Fig. 2 ^{129}Xe 2D-exchange NMR spectra of Xe / PTMSP at ca. 0.5 MPa. Mixing time = 0.5 s.

References

1. G. Consolati, I. Genco, M. Pegoraro, L. Zanderighi, *J. Polym. Sci. Pt B: Polym. Phys.* **34**, 357 (1996).
2. B. Nagasaka, T. Eguchi, H. Nakayama, N. Nakamura, Y. Ito, *Rad. Phys. Chem.* **58**, 581 (2000).
3. 永阪、中山、上田、江口、中村, 第36回 NMR 討論会, 東京 (1997).
4. B. Nagasaka, H. Omi, H. Nakayama, T. Eguchi, N. Nakamura, submitted in *J. Magn. Reson.*

固体NMRにおけるバックグラウンド消去法の定量性について

(株)東レリサーチセンター ○ 三輪優子、片桐元
(財)石炭利用総合センター 原田道昭

Quantitative reliability of Background Suppression technique in Solid State NMR measurement

Yuko MIWA, Gen KATAGIRI(Toray Research Center,Inc.)

Michiaki HARADA (Center for coal utilization, JAPAN)

Abstract: As is well known DD/MAS NMR is more quantitative than CP/MAS NMR. However, the background signals from the spinning module are a common problem in DD/MAS NMR and affect the quantitativity of the measurements. Vespel spinning module has appreciable ^{13}C background signals in DD/MAS spectra. This background can be almost completely suppressed using composite pulse sequences. We have investigated the quantitative reliability of Background Suppression technique in solid state NMR measurement.

1. 緒言

固体 NMR の定量測定には通常 DD/MAS 法が用いられる。汎用型のベスペル型プローブでは検出器まわりからのバックグラウンドピークが観測されてくるため、このピークの取り扱いが問題となる。本報告では、近年市販されはじめたバックグラウンドフリーのプローブで測定したスペクトルとパルスシーケンスによりバックグラウンドを除去したスペクトルの定量性を比較検討した結果を報告する。

2. 実験

バックグラウンドサプレッション法の定量性の検討にはヘキサメチルベンゼン(以下 HMB と略す)を用いた。また実測定用サンプルとしてはバックグラウンドピークがサンプルのピークに完全に重なってしまう石炭を選んだ。サンプルは炭化度の異なる 3 種(SS001AUS,SS002AUS,SS005JPN)とした。測定装置は、Chemagnetics 社製 CMX300(7.05T)を用い、5mm ϕ 用プローブで ^{13}C バックグラウンドの観測される汎用

DD/MAS 法、バックグラウンドサプレッション法、セラミックス型プローブ、石炭

○みわゆうこ、かたぎりげん、はらだみちあき

的なベスペルスピニングモジュール型(以下ベスペル型と略す)のプロープと ^{13}C バックグラウンドの観測されないセラミックススピニングモジュール型(以下セラミックス型と略す)のプロープで測定した。石炭サンプルの試料回転数はスピニングサイドバンドの影響を除くため 10.5KHzとした。なお、バックグラウンドサプレッション法の定量性を検討するために用いた HMB には、内栓としてテフロン製のものを用いた。なお、石炭測定サンプルは内栓として ^{13}C バックグラウンドのでないボロンナイトライドを用いた。バックグラウンドサプレッション測定法^{1,2)}の測定は Four-pulse composite 90° pulse を用いた。

3. 結果と考察

3-1. バックグラウンドの評価

Fig.1 にはベスペル型プロープとバックグラウンドフリーのセラミックス型プロープのバックグラウンドスペクトルと、これらを用いて測定した HMB の DD/MAS スペクトルを示した。

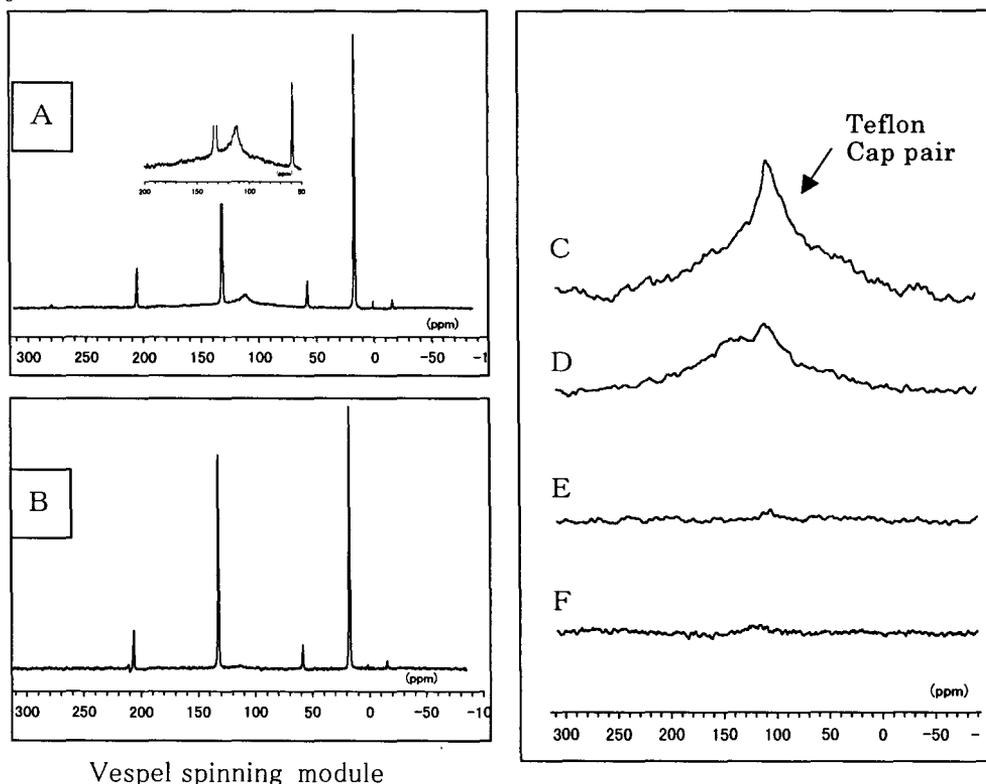


Fig.1 (A)Conventional DD/MAS and (B)Background Suppression Spectra of HMB. Background Spectra of Empty Rotor (C)with Teflon Cap pair, (D)with Boron Nitride Cap pair, (E)Background Suppression technique using a Vespel probe, and (F)conventional DD/MAS with Boron Nitride Cap pair using a Ceramics probe.

Fig.1-A には HMB のベンゼン環部分ピークの裾にバックグラウンドピークがブロードな盛り上がりとして観測されている。また、テフロンの内栓は 110ppm に比較的シャープなピークとして観測されている。 Fig.1-B のバックグラウンドサプレッション法によるパルスシーケンスで測定したスペクトルではバックグラウンドピークはきれいに消去されている。

表1. にベスペル型プローブとセラミックス型プローブを用いて、通常の DD/MAS 法と、バックグラウンドサプレッション法で測定した HMB の定量結果を示す。いずれの測定法でもピーク分割法を用いれば、HMB のベンゼン環ピーク/メチルピークの比がほぼ 1 となり、定量性が満足されていることがわかる。しかしながら、石炭などではサンプル由来のピークが非常にブロードであるため、バックグラウンドピークは、サンプル由来のピークの中に完全に含まれてしまう。このような場合にピーク分割法でバックグラウンドピークを除去することは非常に難しい。

Table1. Result of quantitative analysis of conventional DD/MAS and of Background Suppression technique

Using probe Broadening Factor	Ratio of benzene ring/CH ₃ carbon		Ratio of background to all carbons (%)	
	20Hz	150Hz	20Hz	150Hz
Vespel probe (DD/MAS)	1.05	1.03	47	39
Vespel probe (B.G.S)	1.06	1.08	6	6
Ceramics probe (DD/MAS)	1.01	0.99	< 0.5	
Ceramics probe (B.G.S)	1.10	1.10	0	

B.G.S: Background Suppression technique

3-3. 測定法の違いによる石炭スペクトルの比較

バックグラウンドフリーのセラミックス型プローブで測定した DD/MAS スペクトル (A) とバックグラウンドサプレッション法で測定したスペクトル (B)、およびバックグラウンドの観測されるベスペル型プローブで測定した通常 DD/MAS スペクトル (C) とを Fig.2 に示す。

Fig.2 に示したようにいずれのサンプルでもベスペル型プローブで測定したスペクトルは芳香族部分のピークがブロードになっており、しかもピークトップの高磁場側にプローブからのバックグラウンドピークが観測されている。また、バックグラウンドサプレッション法で測定したスペクトルではバックグラウンドは消失し、バックグラウンドフリーのスペクトルと同様なピーク型を呈しているが、ピーク強度は微妙に異なっている。表2 にピーク分割法より求めた fa 値を示す。これより、バックグラウンドサプレッション法を用いて評価した fa 値は、セラミックス型プローブで測定し評価した結果より ~10% 程度高く見積もられていることがわかる。これらのことより、B.G.S 法は緩和の速い成分が混在するサンプル系ではやや定量性が低下することが示唆される。また、この現象は励起パルス幅が長くな

るほど顕著になることも示された。

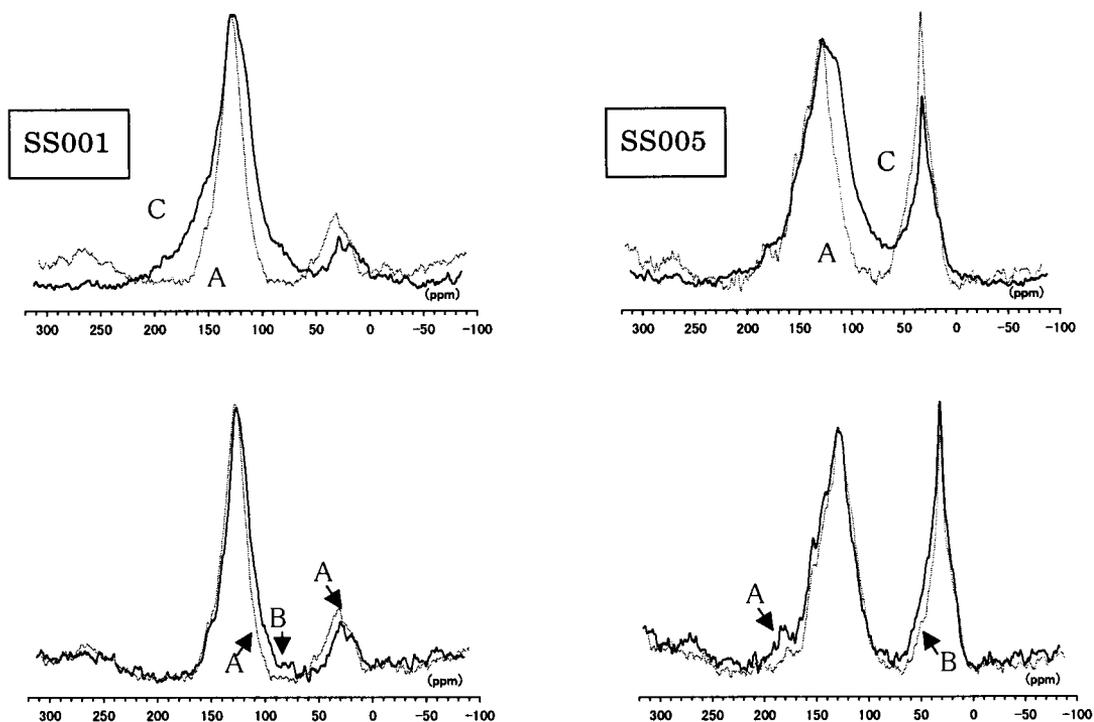


Fig. 2 DD/MAS Spectra of coals obtained using (A) a ceramics probe, (C) a Vespel probe, and (B) Background Suppression technique with a ceramics probe.

Table.2 Fraction of aromaticity (fa) evaluated by conventional DD/MAS and Background Suppression technique

	Conventional DD/MAS	Background Suppression technique
SS001AUS	0. 75 ₃	0. 84 ₂
SS002AUS	0. 64 ₉	0. 66 ₁
SS005JPN	0. 56 ₈	0. 62 ₆

引用文献

- 1) J.L. White, L.W. Beck, D.B. Ferguson, and J.F. Haw, *J Magn Reson*, 100, 336 (1992)
- 2) A.Bax, *J Magn Reson*, 65, 142 (1985)

固体NMRによる絹繊維の不均一構造の解明

(東京農工大学) ○亀田恒徳、山根 努、Yao Juming、
中澤靖元、朝倉哲郎

Heterogeneous structure of *B. mori* silk fibroin fiber studied by solid-state NMR

*Tsunenori Kameda, Tsutomu Yamane, Yao Juming, Yasumoto Nakazawa,
and Tetsuo Asakura*

*Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and
Technology, 2-24-16 Nakacho, Koganei,
Tokyo 184-8588, JAPAN*

The asymmetric peaks centered at 17.3, 20.6 and 22.8 ppm, were observed for the Ala C_β carbons in the ¹³C CP/MAS spectra of *B. mori* silk fibroin and (Ala-Gly)₁₅, indicating heterogeneous structure of Silk II. The *ab initio* chemical shift calculation indicate that the peak at 22.8 ppm can be assigned to the methyl carbons in model A and 20.6 ppm to the methyl carbons in model B. Here, in the model A, all of the methyl groups of Ala residues have the same direction, but in the model B, the methyl groups alternately align to the reverse directions in the adjacent sheets. 17.3 ppm was assigned to random coil. The ¹³C chemical shift anisotropies ($\delta_{33}-\delta_{11}$) were determined by spinning sideband analysis, supported these assignments. The ¹³C relaxation times, T_{1c}, also were observed.

【緒言】

Silk I型に調製した絹シーケンスモデル化合物(Ala-Gly)₁₅のCP/MAS NMRにおいて、Ala C_βはシャープなピークとなるが、その試料をギ酸処理によってSilk II型に調製すると、少なくとも3本に分裂する。この結果から、我々はSilk II型が不均一な構造であることを指摘した[1]。

そもそもSilk II型の絹の繊維状態の構造モデルとして、Marshら[2]による逆平行βシート構造がよく知られている。一方、Lotzら[3]、高橋ら[4]による詳細なX線解析の結果から、絹の結晶の乱れが指摘され、それ以外の構造存在が示唆されてきた。例えば、高橋ら[4]は、βシート面に垂直方向を向いてい

絹フィブロイン、ペプチド化合物、βシート構造、CP/MAS、T₁緩和

かめだ つねのり、やまね つとむ、Yao Juming、なかざわ やすもと、
あさくら てつお

るAla残基側鎖の配列が不均一であることを指摘しており、すべてのAla側鎖メチル基がシート面に対して同方向を向いた構造(Fig.1A)と、互いに向かい合った構造 (Fig.1B) が1:2の割合で存在していると述べている。

本研究では、 ^{13}C CP/MAS NMR測定から得られる、Silk II型の3本のAla C_β ピークの化学シフト値とMO計算から得られる磁気遮蔽定数を比較して、NMRピークと絹繊維の局所構造との対応を行うことを試みた。さらに磁気

緩和測定を通して分子運動性の観点から、この絹繊維の不均一性について検討した。

【実験】

固体高分解能 NMR は CMX Infinity400NMR分光計(Chemagnetic Co)を用い、 ^{13}C 核を観測核とした。 ^{13}C および ^1H 核の共鳴周波数は、それぞれ100および400MHzであった。CP/MAS測定は ^{13}C - ^1H 核間 50kHzで交差分極を行い、接触時間は1.0 msecとした。 ^1H デカップリングは62kHzでTPPM法によって行った。また、 ^{13}C T_1 緩和測定は、Torchiaのパルスシーケンスを用いて行った。測定試料は、Ala C_β 炭素を同位体ラベルした家蚕絹フィブロインおよびそのモデル化合物である(Ala-Gly) $_{15}$ を用いた。モデル化合物は、Fmoc固相法により合成した後、ギ酸処理によってSilk II型に調製した。また、MO法による構造最適化および磁気遮蔽定数計算は、Gaussian98プログラムを用いて行った。

【結果および考察】

Fig.2に、29番目のAla残基 C_β 炭素をラベルした(Ala-Gly) $_{15}$ (Silk II型)のAla残基 C_β 炭素ピークを示した。17.3、20.6および22.8 ppmの3成分からなること、および20.6ppmと22.8 ppmの強度比がほぼ2:1であることがわかる(各ピークのCP効率はほぼ同じであった)。これと同様な3成分からなるAla C_β ピ

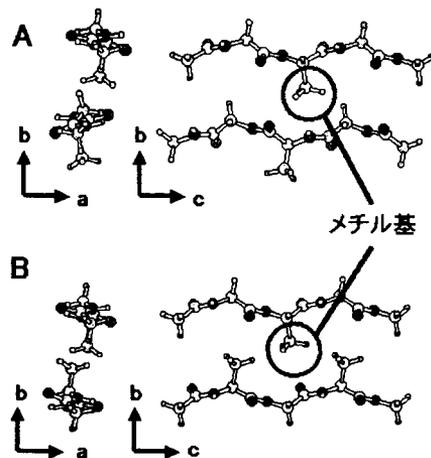


Fig.1 The crystal structure of the silk II form proposed by Takahashi *et al.*[4] In the model A, all of the methyl groups of Ala residues have same direction, but in the model B, the methyl groups alternatively align to the reverse directions in the adjacent sheet.

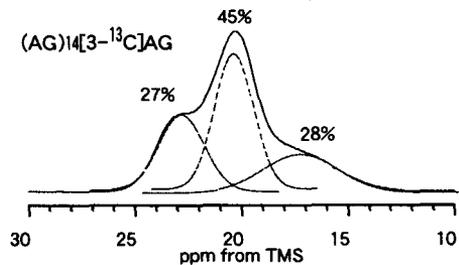


Fig.2 C-13 CP/MAS NMR spectrum concentrated on Ala C_β region of (AG) $_{14}$ [3- ^{13}C]AG with silk II form.

ークが家蚕絹織維試料についても得られた。17.3ppmはSilk I型試料のピーク位置と一致することより、Ala残基の二面角の平均値(ϕ, ψ)はSilk I型とほぼ同じであるが、その二面角値を中心として分布したランダムコイル構造と推察される。また22.8、20.6ppmのピークは逆平行 β シート構造を反映している[5, 6]。

Ala C_α ピークはシャープであり、逆平行 β シート構造の値と一致することから、Ala C_β ピークの22.8および20.6ppmの2本の分裂は、分子の外側に出ているメチル基が分子間配置の違いを敏感に反映したものと考えた。実際、Fig.1AおよびB構造をモデルとしてAla残基 C_β 炭素の化学シフト計算を分子軌道法によって行った結果、Fig.1Aの中央メチル基の遮蔽定数は174.8、Fig.1Bの中央メチル基の遮蔽定数は177.3と得られ、後者が2.5ppm高磁場側に出現することがわかり、実測のシフトと一致した。従って、22.8ppmはすべてのメチル基が同方向を向いた構造(Fig.1A)、20.6ppmが互いに向かい合った構造(Fig.1B)であると帰属できる。

次に、これらのピークの帰属と化学シフトテンソルの主値との対応を試みた。一般に、Ala残基 C_β 炭素の化学シフト異方性は小さく、またFig.2から明らかのように、各ピークは大きく重なっている。さらに、これら3つのピークは全てAla残基 C_β 炭素に由来するので、選択同位体ラベルによって個々のピークを分離することも不可能である。よって、粉末パターン解析やHertzfeld-Berger法[5]、および種々の2次元NMR法によっても主値を決定することが困難である。そこで、我々は、等方平均化学シフトピークと、その高磁場側に現れる1本のサイドバンドピーク(-1)との強度比のみに着目し、スピニング速度が1600, 1800, 2000, 2400Hzの場合に得られる強度比に対して $(\delta_{11}-\delta_{33})$ と $(\delta_{11}-\delta_{33}-2\delta_{22})$ をパラメーターとしたシミュレーション解析を行った[5]。この結果をFig.3に示す。実測と理論値との誤差を計算し、その誤差が小さいほど濃い色で示した。この結果、17.3ppmのピークは20.6および22.8 ppmと比較して異方性 $(\delta_{11}-\delta_{33})$ が小さいのに対して、20.6および22.8 ppmのピークは同程度の異方性を有していることがわかった。また、これらの試料の粉末スペクトル観測の結果、

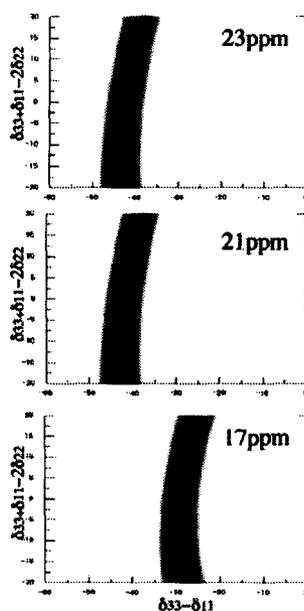


Fig.3 Deviation χ^2 between simulated and experimental spinning sideband data, as a function of the CSA parameters of $(\delta_{11}-\delta_{33})$ and $(\delta_{11}+\delta_{33}-2\delta_{22})$ for the peaks at 22.8, 20.6 and 17.3 ppm. The dark regions represent the best-fit CSA values.

定性的に17.3ppmは軸対象テンソルとなり、20.6および22.8 ppmは軸対象からずれていることがわかった。

さらに、17.3、20.6および22.8 ppmの3つのピークについてスピン-格子緩和時間 T_{1c} 測定を行った。一例として家蚕の22.8ppmピークに関する T_{1c} 測定の結果を示す(Fig.5)。解析は、時間 τ の異なるすべてのスペクトルに対して、バックグラウンド補正と3ピークの分離を行った後 T_{1c} を決定した。3つのピークとも T_{1c} の異なる2成分から成ることがわかる(Table 1)。両試料において20.6ppmの T_{1c} が他のピークと比較して短いことがわかる。これは、20.6ppmピークに相当するメチル基が互いに向かい合った構造(Fig.1B)では、接近する隣接メチル基との効果によって緩和時間が短くなったと考えられる。しかしながら、各ピークには T_{1c} が5~7倍も異なる2成分が存在していることの原因に関しては明確でない。ただし、家蚕絹フィブロインと $(AG)_{14}[3-^{13}C]AG$ を比較すると、同様の結果が得られたことより、この2成分は家蚕絹中での一次構造の違いや、分子鎖内での部位の違いによるものではないことがわかる。

なお、本研究は一部、生研機構の基礎研究推進事業により行われた。

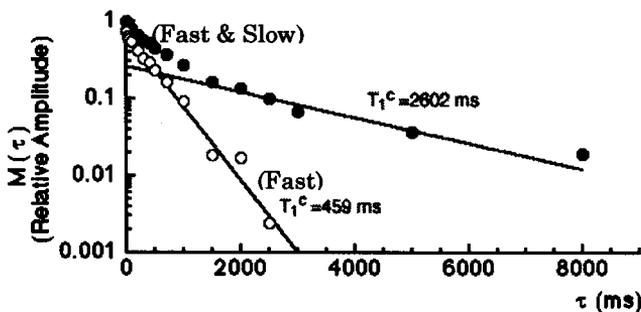


Fig. 5 Plots of relative ^{13}C peak intensities of the peak at 22.8 ppm for *B.mori* silk fibroin vs. delay time.

Table 1 The observed T_{1c} values and fraction of the peaks at 22.8, 20.6 and 17.3 ppm for *B.mori* silk fibroin and $(AG)_{14}[3-^{13}C]AG$.

Chemical Shift (ppm)		<i>B.mori</i>		$(AG)_{14}[3-^{13}C]AG$	
		T_{1c}/ms	Fraction	T_{1c}/ms	Fraction
22.8	Comp. 1	459	0.16	554	0.16
	Comp. 2	2602	0.06	2530	0.09
20.6	Comp. 1	254	0.42	268	0.53
	Comp. 2	1292	0.14	1495	0.08
17.2	Comp. 1	412	0.19	433	0.11
	Comp. 2	2648	0.04	2237	0.03

【参考文献】

- 朝倉哲郎. (2000) 第49回高分子年次大会予稿集 (p. 51).
- Marsh, R.E., Corey, R.B. & Pauling, L. (1955). *Biochimica et Biophysica Acta*, **16**, 1-34.
- Lotz, B., Brack, A. & Spach, G. (1974). *J. Mol. Biol.*, **87**, 193-203.
- Takahashi, Y., Gehoh, M. & Yuzuriha, K. (1999). *Int. J. Biol. Macromol.*, **24**, 127-138.
- Herzfeld, J. & Berger, A.E. (1980). *J. Chem. Phys.* **73**, 6021-6030.

固体高分解能 ^{13}C -NMR 法によるポリペプチドの高次構造の安定性
(東工大)○村田勝義、中野治朗、黒木重樹、安藤勲

A Study of Conformational Stability of Polypeptides by Solid State ^{13}C NMR

K. Murata, J. Nakano, S. Kuroki, and I. Ando

Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology

^{13}C CP/MAS NMR measurements of polyglycine (PG), poly(L-alanine) (PLA), poly(D-alanine) (PDA), poly(L-valine) (PLV), PG/PLA, PLA/PLV, and PDA/PLV blends prepared from the solution have been carried out. From these experimental results, the conformational stability of these polypeptides in the solid state was successfully elucidated.

緒言

ポリペプチドの固体高分解能 ^{13}C -NMR 化学シフトは、コンフォメーションに依存することが知られている¹⁾。本研究では、固体高分解能 ^{13}C -NMR 法によりポリペプチド(Poly(L-alanine)(PLA)と Polyglycine (PG) 及び Poly (L-alanine) (PLA) 及び Poly (D-alanine) (PDA) と Poly (L-valine) (PLV))の高次構造の安定性について研究を行った。PLA 及び PDA は α -helix、PLV は β -sheet、PG は 3_1 -helix 及び β -sheet の安定な高次構造をとることが知られている。PLA 又は PDA と PLV 及び PLA と PG をブレンドすることにより分子間相互作用を変化させ、それぞれのポリペプチドがどのような安定構造をとるかを検討した。

実験

購入したポリペプチド(PG、PLA、PDA、PLV)について、任意の量をそれぞれ採取し、溶媒に溶解後、水中で固化し減圧乾燥させ試料とした(一部の試料については、精製水による固化を用いずに、溶媒に溶解後、直接溶媒を減圧除去した)。測定は CP/MAS アクセサリーの装備されている JEOL GSX-270 及び Bruker DSX300 を用いた。

結果と考察

PLA/PG(100/0)及び PLA/PG(0/100)は dichloroacetic acid(DCA)に溶解し、水中で固化させたが高次構造の変化はなかった。同様に PLA/PG(75/25, 50/50, 25/75)を処理後、測定した結果、PG は 3_1 -helix 構造の他に β -sheet 構造に由来するピークが確認され、

ポリペプチド、固体高分解能 NMR、固体構造、 ^{13}C -NMR、NMR

むらたかつよし、なかのじろう、くろきしげき、あんどういさお

PLA は α -helix 構造の他に β -sheet 構造に由来するピークがそれぞれ確認された。PLA と PG をブレンドすることにより PLA の高次構造は一部 α -helix 構造から β -sheet 構造へ、PG の高次構造は一部 3_1 -helix 構造から β -sheet 構造へ変化していることが解った。なお、PLA/PG(50/50)の試料の変化が最も大きく、PLA/PG の仕込み比により高次構造の変化の割合に差が生じたものと推定した。また PLA/PG 混合溶液を減圧し、直接 DCA を気化(除去)させた試料では高次構造の変化は確認できなかった。このことから高次構造の変化は、固化させる操作での析出速度又は水との相互作用に影響していると思われる³⁾。また、PLA/PLV についても同様な実験を行った結果、それぞれの高次構造の変化は確認できなかった(Table 1)。これは、ブレンド条件によるものと思われるため、現在も最適なブレンド条件を探索中である。この結果を含め当日に詳細な報告を行う。

Table 1 Obtained Solid-State ^{13}C Chemical Shifts of PLA, PG, PLV and PLA/PG, PLA/PLV Blends

Polypeptide Sample	^{13}C Chemical Shift (ppm)				Conformation
	C=O	C_α	C_β	C_γ	
PLA	177.2	53.2	15.6	—	α -Helix
	172.5	49.9	20.6	—	β -Sheet
PG	173.0	42.9	—	—	3_1 -Helix
	168.4	43.2	—	—	β -Sheet
PLV	174.9	65.5	28.7	20.9/19.0	α -Helix
	172.3	59.0	33.0	19.1	β -Sheet
PLA/PG (50/50)	176.9	53.2	15.7	—	PLA α -helix
	173.0	49.3	20.7	—	PLA β -sheet
	173.0	43.4	—	—	PG 3_1 -helix
	169.7	44.3	—	—	PG β -sheet
	—	—	18.1	—	PLA 3_1 -helix in PG
	—	—	22.9	—	PLA β -sheet in PG
PLA/PLV (50/50)	177.2	53.2	15.6	—	PLA α -helix
	172.3	59.0	33.0	19.1	PLV β -sheet

文献

1. I. Ando and T. Asakura (Ed), *Solid State NMR of Polymers*, 819 (1998)
2. J. Nakano, S. Kuroki, I. Ando, T. Kameda, H. Kurosu, T. Ozaki, A. Shoji, *Biopolymers*, 54, 81 (2000)

固体¹³C CP/MAS NMRと量子化学計算を用いた
全芳香族高分子のコンホメーション解析

東工大院理工 ○相見 敬太郎・安藤 慎治

Conformational Analysis of Fully Aromatic Polymers
using Solid State ¹³C NMR and MO Calculations

Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology
Keitaro Aimi and Shinji Ando

Solid state ¹³C CP/MAS NMR and *ab initio* shielding constants calculations have been used to estimate the dihedral angles of bis(4-hydroxyphthalimide) (BHPI) and poly(benzimidazole) (PBI). The TOSS and TOSS&DD pulse sequences were used in the NMR measurements to determine the exact chemical shifts of each carbon. Shielding constants were calculated on model compounds by varying the dihedral angles from 0° to 180° (for BHPI) and 0° to 90° (for PBI) with an interval of 10° using B3LYP/6-31G(d) and RHF/6-31G(d) basis sets. The NMR chemical shifts of some carbons show significant variations with dihedral angles. By comparing the experimental chemical shifts with the calculated NMR shieldings, the dihedral angles of BHPI, PBI and their model compounds were estimated.

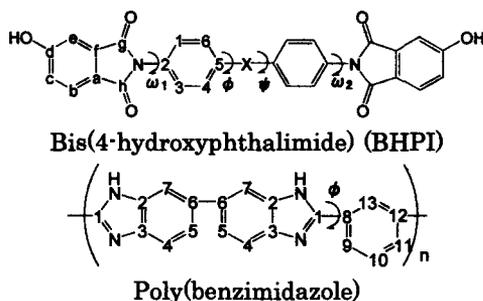
1. 緒言

ビス 4-ヒドロキシフタルイミド (BHPI) やポリベンゾイミダゾール (PBI)¹⁾ は右のような構造の全芳香族化合物である。単位構造における二面角 (ω , ϕ , ϕ) によって規定されるコンホメーションは、高分子の物性発現に重要な役割を果たしているが、これらの高分子の単結晶作製は容易でないことから、より簡便な構造決定法が望まれている。そこ

で我々は固体 ¹³C NMR 及び *ab initio* 磁気遮蔽定数計算を用いて二面角を推定する検討を進めており、すでにビフェニル構造とイミド構造について実験値と計算値の一致をみている²⁾。本研究では、BHPI 及び PBI の二面角の推定を行うとともに、この手法の全芳香族高分子への拡張を検討した。

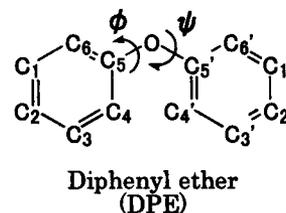
キーワード：固体 ¹³C CP/MAS NMR, 磁気遮蔽定数計算, コンホメーション, 全芳香族高分子
二面角

あいみけいたろう、あんどうしんじ



2. 低分子のコンホメーション解析—Bis(4-hydroxyphthalimide)

[実験] 試料として、中心部が $X = -O-(\text{BHPI-DPO}), -\text{CO}-(\text{BHPI-DPCO})$ 2種の BHPI, OH 基のない BPI-DPO, BHPI-DPO の重合体と考えられるポリイミド(ODPA/ODA)を合成した³⁾。NMR 測定は固体 ^{13}C CP/MAS NMR (JEOL GSX-270) で TOSS 及び TOSS&Dipolar Dephasing パルスシーケンスを用いて測定を行った。量子化学計算は、右に示した DPE をモデルとして、Gaussian98



で B3LYP/6-31G(d) 基底を用い、環を平面として二面角 (ϕ, ψ) を 10° おきに变化させて結合長及び結合角の構造最適化を行った後、コンホメーションエネルギーの等高線図を作成した。また、RHF/6-31G(d) 基底を用いて、それぞれの最適化した構造について GIAO-CHF 法により ^{13}C -磁気遮蔽定数 σ を計算した。なお、この基底関数の組み合わせは、 σ の計算に必要な組み合わせとされている⁴⁾。

[結果と考察] 二面角 ω の推定は、*N*-phenylphthalimide (NPPI) のベンゼン環のイミド基に対してオルト位にあたる C_i 炭素の固体化学シフトと溶液化学シフトの差 (Δ) と ω の間の相関関係⁵⁾ を用いて行った。これは NPPI の二面角 ω が増加するに従って Δ が減少するというものである。BHPI-DPO では、 C_i の化学シフトは固体で 127.1ppm、溶液中で 129.0ppm であり、 $\Delta = -1.9\text{ppm}$ から $\omega = 60^\circ$ と推定された。その他の試料についても同様の方法により表1に示す ω と推定した。二面角 ϕ, ψ の推定は、*ab initio* 法による遮蔽定数計算の結果と固体 ^{13}C -NMR スペクトルを比較して行った。分子軌道計算を用いた等高線図と X線回折のデータ^{6,7,8)} から、ジフェニル構造の結晶構造は、 $\phi = \psi$ (A) と $\phi + \psi = 90^\circ$ (B) の線上に多く分布している傾向が見出された。計算の結果、図1,2に示すように、遮蔽定数は二面角と相関関係があり、(A) の場合には C_i と C_i'

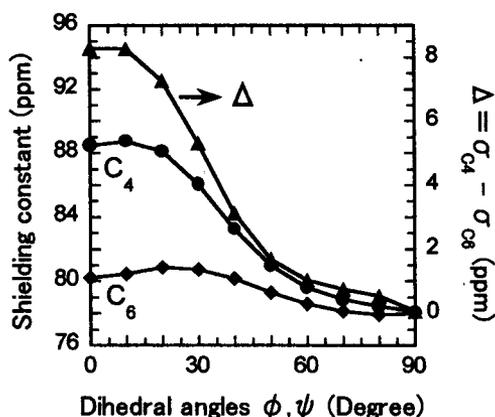


Fig.1 Dependence of nuclear shielding constance on the dihedral angles. (case A).

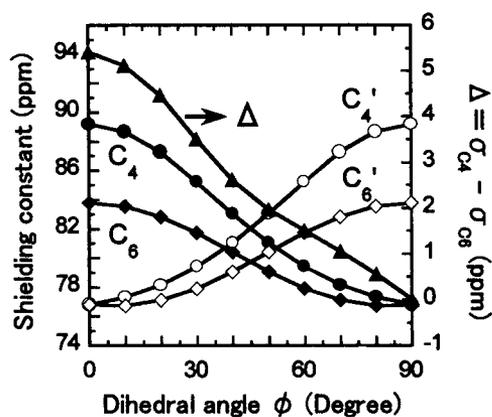


Fig.2 Dependence of nuclear shielding constance on the dihedral angle. (case B).

のように2つの環の対応する炭素は同じ化学シフトとなり、一方(B)の場合にはそれぞれの炭素が異なる化学シフトを示すことがわかった。従って、スペクトルに現れるピークの本数と化学シフトの値から二面角(ϕ , ψ)を推定することが可能となる。そこで、イミド部分と中心構造 X の置換基効果の影響が少なく、しかも二面角の変化が化学シフトに反映されやすい C_4 と C_6 の化学シフトを利用して(ϕ , ψ)の推定を行った。BHPI-DPO の TOSS&DD スペクトル(図3b)では、 C_2 と C_3 のピークが1本ずつしか観測されないことから $\phi = \psi$ であることがわかる。さらに TOSS スペクトル(図3a)より C_4 (122.2ppm)と C_6 (119.0ppm)の化学シフト差は 3.2ppm となり、これを図1に当てはめると、 $\phi = \psi = 42^\circ$ と推定された。他の試料についても同様の方法により二面角の推定を行った結果を表1に示す。

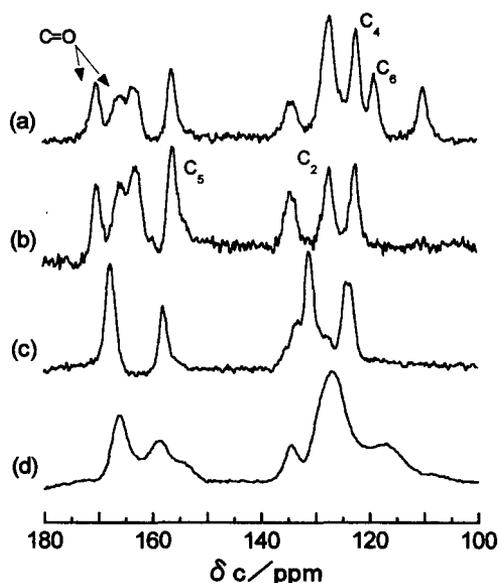


Fig.3 ^{13}C TOSS spectra of (a)BHPI-DPO, (b)BHPI-DPO(TOSS&DD), (c)BPI-DPO, and (d)ODPA/ODA.

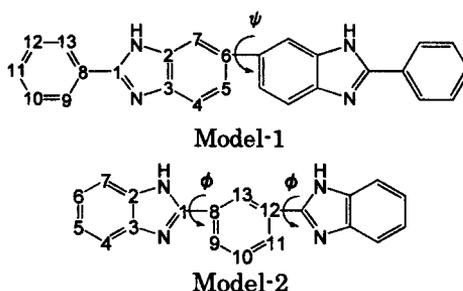
Tab.1 Estimated dihedral angles.

	ω_1, ω_2	(ϕ, ψ)	Type
BHPI-DPO	60°	$(42^\circ, 42^\circ)$	A
BHPI-DPCO	55°	$(30^\circ, 30^\circ)$	A
BPI-DPO	$45^\circ, 90^\circ$	$75^\circ \sim 90^\circ$	A
ODPA/ODA	45°	$75^\circ \sim 90^\circ$	A

3. 高分子のコンホメーション解析—Poly(benzimidazole)

[実験] 試料にはポリベンゾイミダゾール(PBI)粉末(クラリアントジャパン社より提供)及びその単位構造を取り出した2種のモデル化合物(Model-1, Model-2)を用いた。モデル化合物は、対応するジアミンとジカルボン酸をポリリン酸中で反応させ、反応溶液を水中に投入し析出させることにより合成した。NMR 測定及び量子化学計算は前項と同様の条件で行った。

[結果] ポリベンゾイミダゾールとそのモデル化合物の固体 ^{13}C NMR スペクトルを図4に示す。各々のピークは、加成則および遮蔽定数計算の結果を考慮して帰属を行った。遮蔽定数計算からは、特に C_2 , C_4 , C_5 , C_{11} , C_{13} の化学シフトが二面角 ϕ の増加に従って変化することがわかった。そこで TOSS&DD スペクトル(図4(a,b,d))においてピークの帰属が容易な C_2 , C_4 , C_5 に着目し、それらの化学シフトの差(Δ)から ϕ, ψ を推定した(図5,6)。Mode-1 では、 C_2 (132.0ppm)



と C_6 (136.6ppm)を用いて、その差 $\Delta=4.6$ ppmを図5に当てはめ、 $\phi=48^\circ \pm 5^\circ$ と推定された。Model-2では、 C_2 (135.1ppm)と C_6 (130.7ppm)を用いて、 $\Delta=4.4$ ppmとなり、図6から、 $\phi=15^\circ \pm 5^\circ$ と推定された。ポリマーでは、 C_2 (134.2ppm)と C_6 (129.7ppm)から $\Delta=4.5$ ppmであり図6より $\phi=10^\circ \pm 5^\circ$ 、 C_2 と C_6 (135.9ppm)から $\Delta=1.7$ ppmであり、図5より $\phi=30^\circ \pm 5^\circ$ と推定された。

以上から、Model-1のビフェニル部分は大きくねじれており、Model-2のイミダゾール部分は平面に近い構造をとっていることがわかった。PBIはビフェニル部分のねじれが小さくなり全体として平面に近いコンホメーションをとっていると考えられる。また、すでにX線により構造が明らかにされているイミダゾール構造を有する化合物の二面角は、 0° から 36.5° の範囲をとっており^{9,10,11}、推定された値は妥当な値であると考えられる。

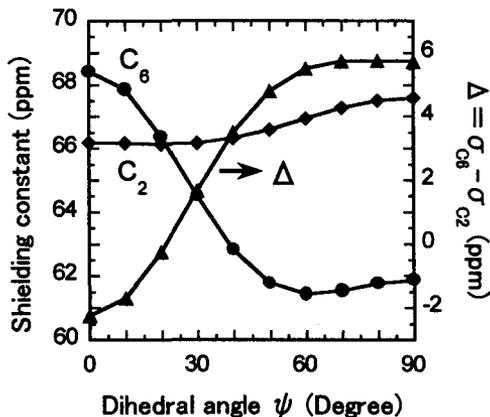


Fig.5 Dependence of shielding constant difference (Δ) on the dihedral angle ψ .

- 1) E. W. Neuse, *Adv. Polym. Sci.*, **47**, 1 (1982) 2) S. Ando et al., *Mag. Reson. Chem.*, **38**, 241 (2000) 3) S. Sasaki, Y. Hasuda, *J. Polym. Sci. Polym. Lett.*, **25**, 377 (1987) 4) J. R. Cheeseman et al., *J. Chem. Phys.*, **104**, 14 (1996) 5) H. Ishii, S. Ando (to be submitted) 6) T. Straßner, *Can. J. Chem.*, **75**, 1011 (1997) 7) M. P. Makowski, *Comput. Polym. Sci.*, **3**, 1 (1993) 8) M. Feigel, *J. Mol. Struct.*, **366**, 83 (1996) 9) N. V. Novozhilova et al., *Zh. Strukt. Khim.*, **28**, 84 (1987) 10) B. L. Trus et al., *Acta Crystallogr., Sect. B*, **29**, 2298 (1973) 11) N. M. Blaton et al., *Cryst. Struct. Commun.*, **9**, 181 (1980)

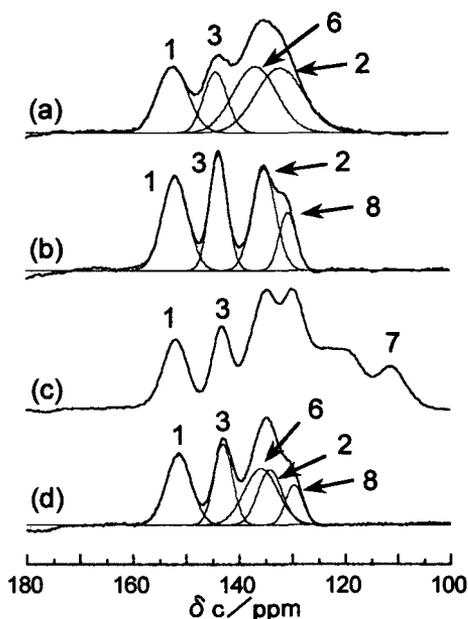


Fig.4 NMR spectra of PBI and related model compounds. (a) TOSS&DD spectrum of Model-1 (b) TOSS&DD spectrum of Model-2 (c) TOSS spectrum of PBI (d) TOSS&DD spectrum of PBI.

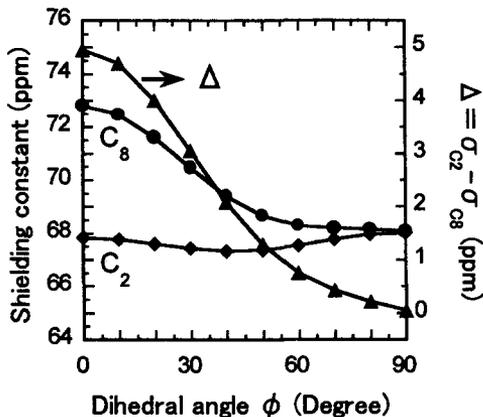


Fig.6 Dependence of shielding constant difference (Δ) on the dihedral angle ϕ .

NMR 緩和時間測定による高分子固体の局所磁場勾配と拡散*

(東工大院生命理工) ○浅川直紀, 梶川達朗, 佐藤耕平, 櫻井 実, 井上義夫

Measurements of Local Magnetic Field Gradient and Diffusion in Solid Polymers by Transverse Relaxation Time Measurements

Naoki Asakawa, Tatsuo Kajikawa, Kohei Sato, Minoru Sakurai, Yoshio Inoue, Graduate School of Bioscience and Biotechnology Tokyo Institute of Technology

4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, JAPAN Tel:045-924-5796 FAX:045-924-5827 e-mail: nasakawa@bio.titech.ac.jp

Solid state structure and molecular motion of some five-membered ring π -electron conjugated polymers with high regio-regularity, 99% head-to-head poly(4-methyl-thiazole-2,5-diyl) (HH-P4MeTz) and 99% head-to-head poly(3-methyl-thiophene-2,5-diyl) (HT-P3MeTh), were investigated by the ^1H solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The ^1H transverse relaxation time measurements by two pulse Hahn echo (TPHE) and Carr-Purcell Meiboom Gill (CPMG) sequences under homogeneous external magnetic field and supercon fringe field (SFF) conditions indicate that 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 $10^3 \text{ T}\cdot\text{cm}^{-1}$.

はじめに

高分子における輸送過程は、生体膜の側方拡散・高分子ゲル中の物質拡散・イオン伝導性高分子・ π 電子共役系高分子の導電性など、様々な場面で現れる。 ^1H 磁気共鳴法は試料を非破壊で輸送過程を探ることができるため、近年急速に用いられるようになってきている。最近ではより遅い物質拡散を測定しようとするいくつかの試みがなされつつある。中でも固体中の拡散測定をターゲットとした Pulse Field Gradient (PFG) 法は強い磁場勾配パルスを生じさせることにより遅い拡散を捉えようとするものであり、注目されている。しかし、固体試料における物質拡散測定に従来の PFG 法を用いた場合には以下のような問題が生じる。

1. PFG の印加による磁化の乱れ・消失あるいは感度の低下
2. 低速の拡散測定を行なうために必要な PFG 強度の不足
3. 印加する PFG 強度に内部磁場勾配強度が匹敵する場合の拡散係数の見積り誤り

これらは拡散係数の決定に支障をきたす重大な問題である。問題 1, 2 は従来から指摘されており、パルスシーケンスの開発や PFG 強度の増大の努力がなされてきている。しかし、固体試料の拡散測定の場合には 3) に挙げた問題が一番の問題となる。すなわち、系の内部磁場勾配強度が PFG 強度に匹敵する場合、

$$\gamma G^2 = \gamma(G_i + G_e)^2 \quad (1)$$

$$= \gamma G_i^2 + \gamma G_e^2 + 2\gamma G_i G_e \quad (2)$$

$$G_e > G_i \quad (3)$$

式 2 の右辺第 3 項を無視することができなくなり、拡散係数の誤った評価をしてしまう。局所的な内部磁場勾配が大きい場合であっても、拡散係数が磁場勾配の変化の周期に比べて大きい場合には問題にしている内部磁場勾配の平均化が起こり G_i は非常に小さな値になると考えられ、問題にならないであろう。大きな拡散係数を持つ系の多くはこの場合にあってはまる。しかし、拡散係数が小さく内部磁場勾配の周期と同程度になると内部磁場勾配が平均化されずに残存し核スピンと相互作用すると考えられる。高分子の結晶部分の局所的な磁場勾配の変化には周期性が存在し、その磁気的環境下で分子は遅い並進運動を行っていると考えられる。また、ガラス状高分子や柔粘性結晶では、磁場勾配の変化には周期性がなくとも勾配強度の変化は存在すると考えられるので、高分子の結晶部分と同様に、平均化されていない局所磁場勾配にさらされているであろう。以上のような場合には、外部から印加した磁場勾配と実際に観測核が感じる磁場勾配との間に大きな差が生じることとなる。現時点では、内部磁場勾配の効果を打ち消すためには $G_e \gg G_i$ の条件をみたすような強力な磁場勾配を生じさせる必要がある。PFG 法によってこの条件を満足するのは難しく、以下の二つ方法が考案されている。

- 反ヘルムホルツ磁場勾配磁石により静的な磁場勾配を生じさせる
- 均一磁場発生用超伝導磁石の周縁部にある磁場勾配を利用する (Supercon Fringe Field: SFF)

反ヘルムホルツ超伝導磁場勾配磁石を用いることにより最大 $200 \text{ T}\cdot\text{m}^{-1}$ 程度、SFF 法の場合には最大 $60 \text{ T}\cdot\text{m}^{-1}$ 程度の磁場勾配が得られる。これらの方法は外部から強力な磁場勾配を印加することにより内部磁場勾配に関する情報を打ち消そうとする試みである。しかし我々は、そもそも内部磁場勾配そのものに系特有の性質を反映していて、高分子の立体構造や電子物性と関係があるのではないかと考え、局所的な磁場勾配を決定する方法論の開発と構造物性相関の研究への応用を模索している。

実験

均一磁場条件下および SFF 条件下で ^1H の横緩和時間 (T_2) 測定を行った。拡散の効果を強く受ける 2 パルス Hahn エコー (TPHE) 法と遅延時間 τ を変化させること

キーワード: スピン-スピン緩和時間, 物質拡散, スピン拡散, π 共役系高分子, 長鎖脂肪酸
あさかわなおき, かじかわたつお, さとうこうへい, さくらいみのる, いのうえよしお

により拡散の効果を抑制した Carr-Purcell Meiboom-Gill(CPMG)法を併用し、拡散係数 D と局所磁場勾配 G を評価した。

結果と考察

理論的には TPHE と CPMG に現れる拡散の効果は、以下の二通りが考えられる。

1. 磁場勾配は時間に対して一定で、その中で物質拡散する場合
2. 物質拡散は起きず、磁場勾配波が拡散する場合(スピン拡散が含まれる)

今回我々は、regio-regularity を高度に制御した Head-to-head(HH)-poly(4-methyl-thiazole-2,5-diyl)[99% HH-P4MeTz] ($M_w = 3.2 \times 10^3$) を用いた。HH-P4MeTz は末端を除くとメチル基部分にのみ水素が存在する稀な有機化合物である。X線回折による HH-P4MeTz の結晶構造解析から HH-P4MeTz の結晶部部分は二次元的に広がるメチル基層と π スタック層とが交互に積層した構造をもつことがわかっていて、すなわち、水素核が二次元的に存在する層と、 π 電子共役系が二次元的にスタックしている層からなる。

Two Pulse Hahn-echo(TPHE) 法および Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG) 法を用いて ^1H スピン緩和時間 (T_2) 測定を行った。Fig.1 に 9.4T の均一磁場条件下の ^1H TPHE 法(共鳴周波数 400MHz) 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。64kHz の rf 強度を用いた。TPHE の減衰曲線は二成分から構成され、各々 $\exp(-\tau)$ 依存性を有していた。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 ($T_2^{\text{TPHE}} = 42\mu\text{s}$) であった。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。また、自由拡散の場合に見られるような $\exp(-\tau^3)$ 依存性は用いた時間領域では観測されなかった。エコー時間 $2\tau \geq 150\mu\text{s}$ の領域では、信号は尖鋭化されており、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、エコー時間が長いため、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(またはスピン拡散)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.2 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.2 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 [$\text{T}\cdot\text{cm}^{-1}$] D :拡散係数 [$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$] γ :磁気回転比 [$\text{rad}\cdot\text{ms}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$])

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

$$\frac{1}{T_2^{\text{CPMG}}(\tau)} = -\frac{17}{13440} \frac{a^6 \gamma^2 G^2}{D^2 \tau} + \frac{1}{T_2^{\text{TPHE}}} \quad (5)$$

(Fig.2中の直線 (semilogプロットに注意))

により実験結果を解析し、Table Iに示した aG および a^2/D の値を得た。均一磁場条件では観測磁場が大きいほど a^2/D の値が小さくなり、高磁場ほど拡散が捉えやすくなっていることがわかる。また、同程度の磁場強度では磁場勾配強度が大きいほど拡散を a^2/D 値が小さく、磁場勾配強度が大きいほど拡散が捉えやすいことと合致している。

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 波の起源が二次元的なメチル基層内のメチル水素間スピン拡散であるならば $a=7.05 \text{ \AA}$ となる。最も高磁場である 400MHz の結果を使うと $G=4800 \text{ T/cm}$ 、 $D=6.2 \times 10^{-11} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ となる。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。 π 共役系高分子では、電子スピンとの超微細結合が深く関わっている可能性もあり今後の検討を要する。

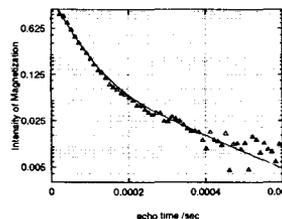


FIG. 1. 295Kにおける Two pulse Hahn echo (TPHE) NMR 法による HH-P4MeTz のスピンエコー減衰曲線

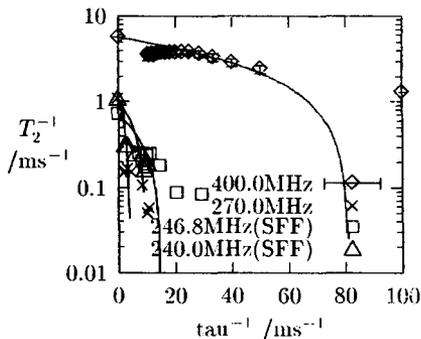


FIG. 2. 295Kにおける ^1H CPMG NMR 法による HH-P4MeTz のスピン-スピン緩和時間 (T_2) のエコー時間 τ 依存性

TABLE I. The values of experimental aG and a^2/D determined by TPHE and CPMG Transverse relaxation time measurements

Freq./MHz	HMF/SFF ^a	$aG / \times 10^{-4} \text{ T}$	$a^2 \cdot D^{-1} / \mu\text{s}$
400.0	HMF	3.4	0.58
270.0	HMF	0.34	1.6
246.8	SFF	0.52	6.13
240.0	SFF	2.9	0.14

^a HMF: Homogeneous Magnetic Field, SFF: 6.34T SCM Fringe Field

固体高分解能 NMR による膜蛋白質疎水領域の立体構造の解析
 (姫路工大・理¹、ウェイン州立大²、カリフォルニア大³) ○辻 暁¹、
 長谷川 潤¹、河南るり子¹、Richard Needleman²、Janos K. Lanyi³、
 内藤 晶¹、斉藤 肇¹

A Solid State NMR Study of Structure of Transmembrane Region of Membrane Protein (Himeji Institute of Technology¹, Wayne State University², University of California³) Satoru Tuzi¹, Jun Hasegawa¹, Ruriko Kawaminami¹, Richard Needleman², Janos K. Lanyi³, Akira Naito¹, and Hazime Saito¹)

Structure of bacteriorhodopsin (bR) at the physiological condition was examined by the solid state ¹³C NMR spectroscopy. Mn²⁺-treatment and site-directed mutagenesis were utilized for selective observation of the transmembrane region and assignment of the signals, respectively. The signal of Ala184 located at the functionally important kink of the helix F was newly assigned, and used as a probe of the kink angle. The mainchain conformations of bR at the physiological condition observed by the solid state NMR are found to be not identical with the X-ray model structure obtained at low temperature in crystal. This finding reveals that the main chain conformation of bR can be affected by the environment of protein, and the solid state NMR is a suitable mean to examine the structure-function relationship at the physiological condition.

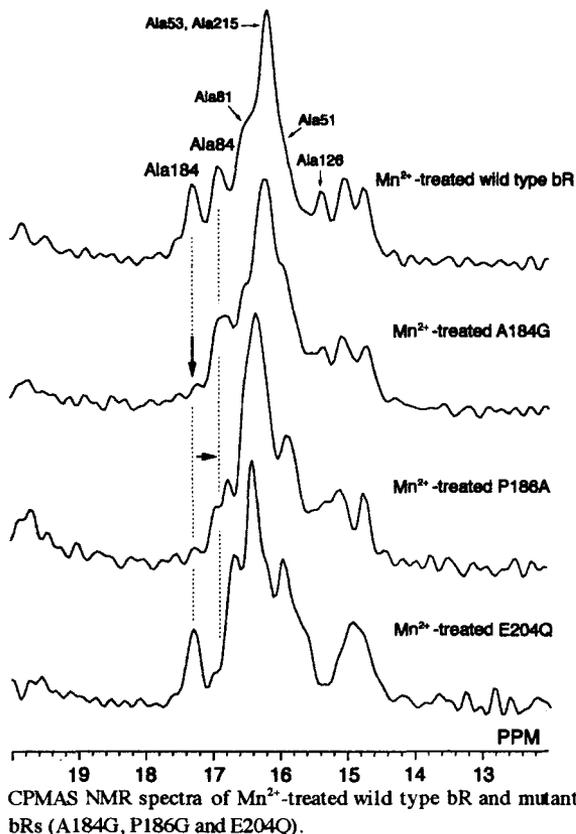
近年、膜蛋白質の結晶化法、回折法の発達により、いくつかの膜蛋白質について、三次元立体構造モデルが与えられている。これらの低温下、結晶中における高分解能の構造情報を生体中における膜蛋白質の機能と関連づけるためには、生理的条件下において生体膜中に含まれる膜蛋白質を対象として原子レベルでの立体構造情報をあたえる解析法が必要と考えられる。これまで、本研究室ではバクテリオロドプシン (bR) をモデルとして、固体高分解能 NMR が生理的条件下の生体膜中における膜蛋白質の局所構造を残基毎に解析しうる手法であることを示してきた^{1,2}。ここでは、bR の膜貫通部位に注目し、緩和試薬の利用、部位特異的変異導入などの手法を用いて、膜貫通部位由来の信号の帰属を行い、野生型および変異型 bR の立体構造を解析した。X 線結晶解析により得られている構造モデルとの比較より、生理的条件下の膜蛋白質立体構造は一部で低温下、結晶中の構造と異なることが見出された。

生理的条件下において bR を含む生体膜 (紫膜) 表面に存在する二価カチオン (Ca²⁺、Mg²⁺) を NMR 緩和試薬である Mn²⁺ に置換することにより、bR の親水的表面近傍に位置する残基の NMR 信号を広幅化し、膜貫通部位を選択的に観測できる。部位特異的変異導入による帰属から、Mn²⁺ 処理した bR のアラニン残基側鎖メチル炭素のスペクトルには、Ala51、53、81、84、126、196、215 由来の信号が含まれることを既に報告しているが、ここではさらに bR の機能上重要な膜貫通ヘリックス F のキック部位に位置する Ala184 の信号を帰属した (図)。Ala184 は膜貫通ヘリックスに含まれるにも関わらず、その化学シフト値は 17.27 ppm をとり、Ala51、Ala53 等他の α -ヘリックス中の残基に比較して低磁場に信号を与える。この点は Pro186 に由来するヘリックス F 中の水素結合の欠如により、ヘリックス F が bR の基底状態において Ala184 近傍でキックしており、Ala184 の二面角が通常の α -ヘリックスと異なっていることを

固体 NMR、膜蛋白質、バクテリオロドプシン、緩和試薬

つじ さとる、はせがわ じゅん、かわみなみ るりこ、Needleman Richard、Lanyi Janos K.、
 ないとう あきら、さいとう はじめ

示している。Pro186をAlaに置換することで、ヘリックス構造のキックが除かれ、Ala184信号の低磁場シフトが解消されることが、図よりわかる。基底状態の野生型 bR (WT bR) における Ala184 の X 線構造モデル³ 中の二面角(-75.1°, -24.1°)は通常の α -ヘリックス中の残基の示す二面角 (Ala51:(-70.1°, -43.7°), Ala53:(-64.4°, -36.8°)等)と比較して典型的 α -ヘリックスの二面角(-57°, -47°)から大きくずれており、Ala184 の特異な化学シフト値と対応している。これに対し、構造モデル中では Ala184 に近い二面角(-76.7°, 16.3°)をとり、 π -バルジ構造に含まれると報告されている Ala215 は Ala53 の化学シフト (16.14 ppm) に非常に近い化学シフト (16.20 ppm) を示す。この点は、生理条件の生体膜中における Ala215 近傍のヘリックス構造が通常の α -ヘリックスに近いことを示している。



CPMAS NMR spectra of Mn^{2+} -treated wild type bR and mutant bRs (A184G, P186G and E204Q).

基底状態の WT bR と Glu204 を Gln に置換した変異 bR (E204Q) の Mn^{2+} 処理後のスペクトルを比較すると、膜貫通部位において、変異導入により活性部位近傍に位置する Ala84 の化学シフトが高磁場側へシフトしており、活性部位近傍の主鎖立体構造が変化していることがわかる。また、16.2 ppm を中心とする強い信号が低磁場シフトしていることから、Ala84 と同様に活性部位近傍に位置する Ala53、Ala215 を含む膜貫通ヘリックス構造に変化があることが示唆される。これに対して、Ala184 の信号は WT bR と E204Q の間で全く変化せず、変異導入によるヘリックス F キック部位の立体構造が変化しないことがわかる。このような変化に対応する二面角変化の傾向は X 線構造解析による WT bR および E204Q の構造モデル中には見出されない。

これらの知見は、生理的条件下の生体膜中における bR の主鎖構造と低温、結晶中における主鎖構造が必ずしも一致しないことを示している。このような不一致の原因として、結晶中における蛋白質間パッキングによる構造の制限、低温下における蛋白質構造の揺らぎの凍結、低温による脂質の構造化の影響などが考えられる。この結果は、固体 NMR による観測が膜蛋白質の結晶構造と生理条件下の機能を関係づける上で有用であることを示している。

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. Luecke, H., Shobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J. P. and Lanyi, J. K. (1999) *J. Mol. Biol.*, 271, 899-911.

ヒトカルシトニンのアミロイド繊維

：原子間距離測定に基づく高次構造と反応機構

(姫路工大・理¹、新潟経営大²) ○上平 美弥¹、土肥 輝美¹、
辻 暁¹、野坂 篤子²、斉藤 肇¹、内藤 晶¹

Structure determination of amyloid fibril formed by human calcitonin

¹Department of Life Science, Himeji Institute of Technology, ²Niigata University of Management
M. Kamihira¹, T. Dohi¹, S. Tuzi¹, A.Y. Nosaka², H. Saitô¹, and A. Naito¹

Fibril structure formed by human calcitonin (hCT) was obtained from measurements of interatomic distances by ¹³C REDOR method. It was revealed that the intermolecular atomic distances between ¹³C and ¹⁵N in [¹⁻¹³C]Gly¹⁰, [¹⁵N]Phe²²-hCT fibril were longer than those between the ¹³C and ¹⁵N atoms that form hydrogen bonds, but shorter than those apart from two residues. Further, the fibril samples of [¹⁵N]Gly¹⁰, [¹⁻¹³C]Pro²³-hCT diluted with natural abundance hCT did not show any ¹³C...¹⁵N dipolar interactions. Those results indicate that Gly¹⁰ is adjacent to Phe²² in the neighboring molecules.

<序> ヒトカルシトニン (hCT) は、32アミノ酸残基からなるペプチドホルモンの一種であるが、高濃度水溶液中ではアミロイド繊維を形成する性質がある。アミロイド繊維の高次構造については、種々の分光法による解析が行われている。我々はコンフォメーション依存化学シフト値から、中性水溶液中で生成した繊維中のhCT分子中央部はβ-シート構造、C端側がランダムコイルであることを明らかにした¹。そのβ-シート構造は、Asp¹⁵、Lys¹⁸側鎖の荷電により生じる分子内電気双極子モーメントを打ち消す、逆平行型であることが示唆される。本研究では、hCTが形成するアミロイド繊維の、より詳細な高次構造と分子配列の決定を目的とし、繊維を形成した際に分子間で水素結合を形成して近接すると考えられる残基のカルボニル炭素とアミド窒素を、それぞれ¹³C、¹⁵N標識したhCT繊維のREDOR法による原子間距離測定を行った。この結果、繊維中の分子配置と繊維構造についての詳細な情報を得ることができたので報告する。

<実験> 二種類の二重標識hCT (I:[¹⁻¹³C]Gly¹⁰, [¹⁵N]Phe²²-hCT, II:[¹⁵N]Gly¹⁰, [¹⁻¹³C]Pro²³-hCT)、及び非標識hCTは、ABI431Aペプチド合成機によりFmoc固相法で合成した。脱保護、精製後、酸化反応によりCys¹-Cys⁷のジスルフィド結合を形成させ、さらに精製を行った。精製後のhCTを中性水溶液 (0.1 M CH₃COONa, 1.5 mg/ml, pH 7.5) 中で繊維化し、熟成後凍結乾燥した粉末30 mgを5 mmφ NMR試料管中央部に封入した。また試料Iについては、標識率30 %試料を作成し同様に調製した (試料IIIとする)。

NMR測定は、Chemagnetics社製CMX400、およびInfinity 400 NMR分光器により、¹H、¹³C、¹⁵Nの共鳴周波数をそれぞれ400.15、100.63、40.54 MHzとして行った。測定温度は20℃で、試料管は6000 Hzでマジック角回転させた。¹³C REDOR測定においては、¹⁵N核の照射にはXY4パルスシーケンスを用いた。REDORとFull Echoの実験から観測されたΔS/S₀ [= (Full Echo - REDOR) / Full Echo]値に対して、3スピン系の解析を行い原子間距離を見積もった²。

固体NMR、ヒトカルシトニン、高次構造、アミロイド、原子間距離測定

かみひら みや、どひ てるみ、つじ さとる、のさか あつこ、さいとう はじめ、
ないとう あきら

〈結果・考察〉 図1に、試料Iの各NcTrに対する $\Delta S/S_0$ 値 (A) と、NcTr = 18 msecでの ^{13}C Full echoスペクトル (B)、およびFull Echoと ^{13}C REDORの差スペクトル (C) を示す。二重標識hCTが分子間で典型的な逆平行型 β -シート構造を形成すると、 ^{13}C 核の近傍にはシート内で隣り合う2分子に ^{15}N 核が存在する。そのため、 S_1 -I- S_2 の3スピン系で解析を行った。図1Aには、 $^{13}\text{C}_1 \cdots ^{15}\text{N}_j$ が水素結合を形成、 $^{13}\text{C}_i \cdots ^{15}\text{N}_{j-1}$ が水素結合を形成 (1残基隣)、 $^{13}\text{C}_1 \cdots ^{15}\text{N}_{j-2}$ が水素結合を形成 (2残基隣) する各場合の、 $\text{C} \cdots \text{N}_1$ 、 $\text{C} \cdots \text{N}_2$ 距離と $\text{N}_1 \cdots \text{C} \cdots \text{N}_2$ の角度から得た理論曲線を重ねて記した。これらの結果から、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{10}$ は $[^{15}\text{N}]\text{Phe}^{22}$ と分子間で直接水素結合を形成しているのではなく、 Phe^{22} から一残基以上隣に位置する残基と水素結合を形成すると考えられる。

分子内、分子間の $^{13}\text{C} \cdots ^{15}\text{N}$ 双極子相互作用の寄与を見積もるため、希釈試料 (試料III) を用いて同様に測定、解析を行った。その結果、ほとんどREDOR効果が観測されなかった (図1D)。つまり、試料Iで観測されたのは、分子間の原子間距離で、ターンの形成による分子内水素結合の存在はないことが確認された。

一方、試料IIの測定結果においても、有意なREDOR効果が観測されなかった。この結果は、 $[^{15}\text{N}]\text{Gly}^{10}$ と分子間で水素結合を形成する残基は、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Pro}^{23}$ から2残基以上離れていることを示している。化学シフト値からの2次構造情報と今回の原子間距離測定の結果から、図1Eに示すhCT繊維の分子構造モデルが示唆される。

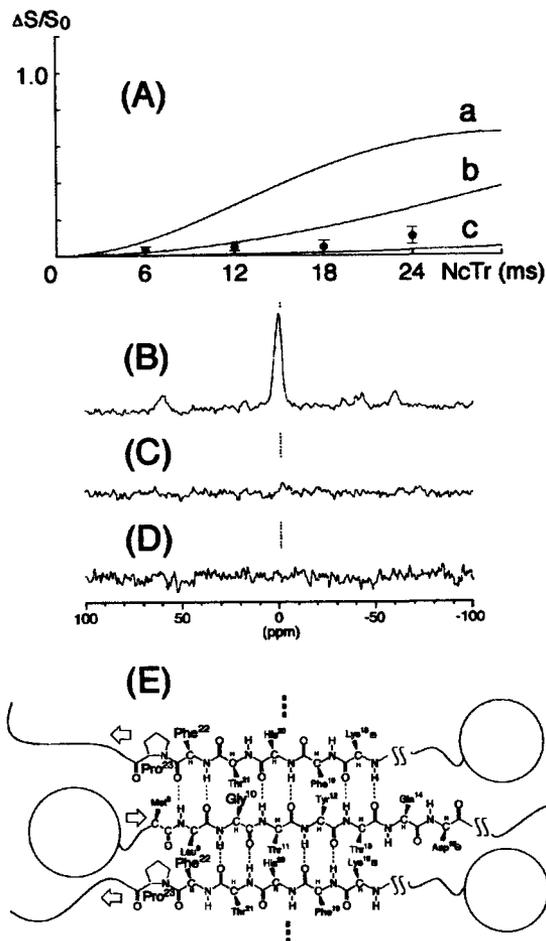


Fig.1 Plot of $\Delta S/S_0$ values against NcTr of sample I (A). Curves were calculated using (a) $r_{\text{CN}_1} = 4.2 \text{ \AA}$, $r_{\text{CN}_2} = 5.2 \text{ \AA}$, $\angle \text{N}_1\text{CN}_2 = 180^\circ$, (b) $r_{\text{CN}_1} = 5.7 \text{ \AA}$, $r_{\text{CN}_2} = 6.0 \text{ \AA}$, $\angle \text{N}_1\text{CN}_2 = 95^\circ$, (c) $r_{\text{CN}_1} = 8.2 \text{ \AA}$, $r_{\text{CN}_2} = 9.1 \text{ \AA}$, $\angle \text{N}_1\text{CN}_2 = 65^\circ$. ^{13}C Full Echo spectrum of I (B) at NcTr = 18 msec and the difference spectra between Full Echo and REDOR for I (C) and for III (D). A model of antiparallel β -sheet structure of hCT in the fibril state (E).

1. M. Kamihira, A. Naito, S. Tuzi, A.Y. Nosaka, and H. Saitô (2000) *Protein Sci.* **9**, 867-877.
2. (a) A. Naito, K. Nishimura, S. Tuzi, and H. Saitô (1994) *Chem. Phys. Lett.* **229**, 506-511.
(b) K. Nishimura, A. Naito, S. Tuzi, and H. Saitô (1999) *J. Phys. Chem. B.* **103**, 8398-8404.

PFG-NMRによる柔粘性結晶の拡散係数測定

(分子科学研究所) ○大石 修

Measurement of Self-Diffusion Coefficients for plastic crystal by PFG-NMR

(Institute for Molecular Science) Osamu OISHI

Direct measurements of self-diffusion coefficients in solids were made possible without resorting to classical indirect methods such as line width or relaxation time measurements. This experiment was made possible with an automatic PGSE apparatus equipped with a quadrupole coil and a high power FG current driver. The diffusion coefficient D as small as $10^{-13}m^2s^{-1}$ was measured in the plastic crystalline phase of hexamethylethane (HME). The activation energy E_a was found to be $89kJmol^{-1}$.

【序論】

パルス磁場勾配NMR(PFG-NMR)法による自己拡散係数測定は物質が拡散した距離を直接共鳴周波数に変換して測定するため、凝縮物質のダイナミクスを研究する上で非常に有用な方法になっている。また既に液体の自己拡散係数測定の方法としては標準的な方法になっている。しかしながら、液晶や固体のような非常に強く双極子結合して非常に短い T_2 を伴うスピン系においてはPFG-NMRで自己拡散係数を測定することはいまだ困難な方法であった。当研究グループではスペクトルの尖鋭化と四極コイルを用いた強磁場勾配の発生装置を作ることにより、液晶の異方的な自己拡散係数をテンソル量として測定する方法を開発してきた^{1,2)}。本研究では液晶よりも更に拡散係数の小さな柔粘性結晶をターゲットとして装置及びパルス系列を改良してきて、今回柔粘性結晶ヘキサメチルエタンの拡散係数を測定することに成功した。

【実験】

1. 装置：1.4T(60MHz)の電磁石に磁場勾配発生コイルに四極コイルを用いた自作の装置で測定を行った¹⁾。
2. 試料：ヘキサメチルエタンを密封した容器の中で昇華させ、市販のNMR5mm管に封入した。サンプル管内で試料が存在しない余剰の空間に硝子棒を入れて封管することによりサンプルが昇華によってサンプル管内を移動しないようにした。
3. パルス系列：以下のパルス系列を持つstimulated-echoを使用した。
4. 測定条件：約6T/mの強度の磁場勾配を用い、温度を60-96℃, 2℃おきに変化させ、またパルス幅を $\Delta=0.5s$, $\delta=0.6-1.4ms$ を0.2msおきに変化させるパラメータを設定し、エコーの強度を自動測定した。

パルス磁場勾配、拡散係数、柔粘性結晶、stimulated-echo

○おおいしおさむ

5. 四極コイルのコイル定数はグリセリンの拡散係数の測定値と文献値から導き出したものを用い、磁場勾配の安定性はHMEの測定条件と同じ条件におけるポリジメチルシロキサン¹⁾の拡散係数測定で確認している。

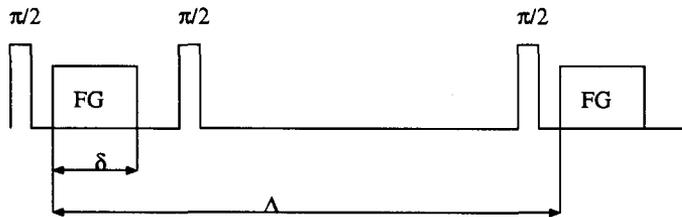


Figure 1. Pulse sequence for PFG-stimulated-echo

【結果及び考察】

Figure 2は得られたエコー強度の変化から計算した拡散係数 D の値を温度に対してプロットしたものである。HMEの拡散係数は液体の約 $1/1000$ 、液晶の約 $1/100$ 程度の値を示しており、 $10^{-13} \text{m}^2/\text{s}$ の値まで直線的に変化している。低温におけるデータのばらつきは相転移点付近での急激な T_2 の減少によるものである。またこのアレニウスプロットより求めたHMEのプラスチック相での活性化エネルギーは 89kJmol^{-1} であった。

このようにして今回純粋固体の拡散係数をPFG-NMRにより直接的に測定することに成功し、その結果として現在は、液相、液晶相、固相の全凝縮相において拡散係数を直接的に測定することが可能となった。また、これら複数の凝縮相の拡散係数を連続的に測定することが可能となったため、PFG-NMRは相転移や過冷却などの物理現象を研究する上での優れた手法となった。

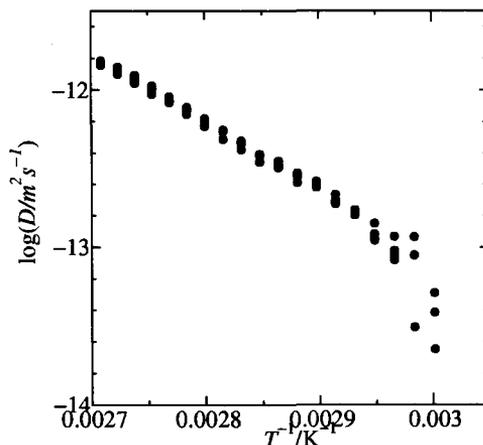


Figure 2. Temperature-dependence of the diffusion coefficient in the plastic crystalline phase of HME.

参考文献

- 1) Osamu OISHI and Seiichi Miyajima, *J. Magn. Reson. A*, **123**, 64-71 (1996)
- 2) 大石 修, 宮島清一, 1999年日本液晶学会討論会講演予稿集, 3A04, 430-431(1999)

固体重水素NMRによるコポリ(γ -アルキルグルタメート)
主鎖のダイナミクス研究
北大院工 堀 耀広、森越信之、平沖敏文

Studies of Main Chain Dynamics in Copoly(γ -alkyl L-glutamate)s
by Solid State $^2\text{H-NMR}$

Akihiro Tsutsumi, Nobuyuki Morikoshi and Toshifumi Hiraoki
*Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering,
Hokkaido University, Sapporo, 060-8628, Japan*

In order to study the main chain dynamics in copoly(γ -alkyl L-glutamate)s, the solid state $^2\text{H-NMR}$ measurements were made on samples deuterated at main chain amide protons. Most of samples showed the Pake powder pattern having the anisotropic factor 0.19 at room temperature. With increasing temperature, the peak separation ($2V_{xx}$) did not change while that for shoulders ($2V_{yy}$) decreased linearly, indicating that peptide plane undergoes the anisotropic rotational oscillation. The rate of the oscillation was estimated from the spin-lattice relaxation time. It was found that the amplitude and the rate of oscillation strongly depend on the length of side chain and copolymer composition. These facts imply that the main chain dynamics is considerably affected by the motion and micro structure of the side chain.

我々は α -ヘリックス構造をとる堅い棒状ポリペプチド主鎖内の分子運動を研究するため、主鎖アミドプロトンを重水素置換し、固体中での固体重水素NMR測定を行っている。これまで、ポリ(γ -ベンジルグルタメート)(PBLG)等についてペプチド平面の異方的微小回転振動について報告した。今回は、Hairy-Rod Polymerとして知られる長い側鎖を有するコポリ(γ -アルキルグルタメート)について、側鎖長、コポリマー組成が主鎖の分子運動に与える影響を調べた。

試料にはポリ(γ -メチル L-グルタメート)(PMLG)とのエステル交換反応により調整した3種のコポリマー、poly(MLG-co-SLG)(PMSTG)、poly(MLG-co-PLG)(PMPEG)、poly(MLG-co-CLG)(PMCPG)を用いた。ここで、MLG: γ -methyl L-glutamate、SLG: γ -stearyl L-glutamate ($n=18$)、PLG:-pentadecyl L-glutamate ($n=15$)、CLG: γ -capryl L-glutamate ($n=8$)、 n :側鎖アルキル炭素数、である。コポリマー組成は CDCl_3 :trifluoroacetic acid(TFA) (7:3)混合溶媒中での $^1\text{H-NMR}$ スペクトルより見積もった。主鎖アミド基の重水素化は CHCl_3 :TFA- d_1 中、室温で2時間溶解攪拌後、エタノールで沈殿回収する事により行った。赤外吸収スペクトルより求めた各試料の重水素化率はほぼ80%であった。重水素NMR測定にはBruker DSX-300を用い、温度範囲 $-25 \sim 140^\circ\text{C}$ で行った。Inversion Recovery法により

キーワード：固体重水素NMR、ポリペプチド、主鎖ダイナミクス、スペクトルシミュレーション、
スピン格子緩和時間

つつみあきひろ、もりこしのぶゆき、ひらおきとしふみ

スピナー格子緩和時間 T_1 を測定した。

Fig.1にPMLG、PMSTG90、PMCOG94(PMOCG94)のスペクトルの温度依存性を示す。(最後の数字は置換率%) いずれの試料においても見られる中心ピークは、残存TFA-d₃による。PMLGでは全温度域で典型的なPake powder patternを示し、殆ど温度変化が見られない。特に、ピーク(垂直成分)分離幅(2V_{xx})は一定値(122kHz)を保つ。しかし、ピーク肩分離幅(2V_{yy})は177kHz(-20°C)から168kHz(140°C)に温度上昇により減少する。これより、PMLGペプチド平面はPAS系X軸(C_α-C_αにほぼ並行)周りに微小回転振動を行っていることが分かる。スペクトル解析より求めた振動の振幅は140°Cで12°であった。一方、PMSTG90では40°Cより、PMCOG94では25°Cよりピークが先鋭化すると共に裾(平行成分)のピーク化が生じている。また、高温域で垂直成分は単一のシャープなピークとなり、effectiveな異方性因子の値が $\eta=0$ (V_{xx}=V_{yy})であることを示す。このような線形の変化は微小回転振動の振幅が20°以上(振動周波数10⁶Hz程度-T₁からの結果と一致)で生じることがスペクトルシミュレーションより分かった。しかし、この温度域ではピーク分離幅(2V_{xx})の増加が生じることからヘリックス軸(PAS系のZ軸にほぼ並行)周りの回転振動も同時に生じていることがわかる。これらの結果は主鎖ペプチド基の運動は側鎖と強く相関していることを示す。側鎖長、コポリマー組成依存性について議論する。

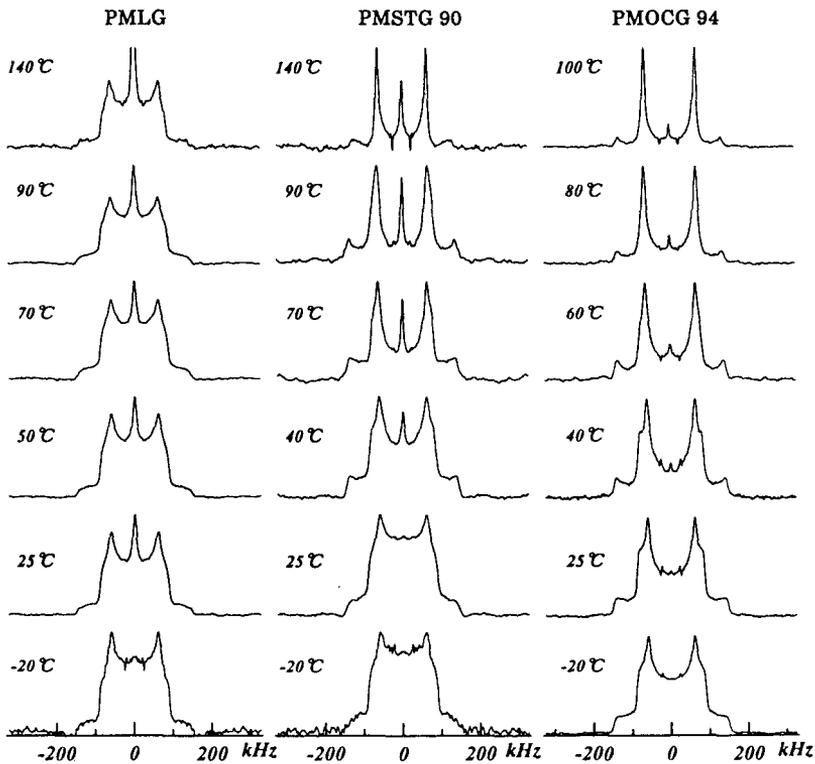


Fig.1 Temperature dependence of ²H-NMR spectra for poly(γ-alkyl L-glutamate)s

SPS-芳香族炭化水素系コンプレックスのゲスト分子の運動性評価

(名工大・工)○山本裕輔・吉水広明・辻田義治・木下隆利

**Estimation for the Mobility of Guest Molecule in the Complex of
SPS-Aromatic Hydrocarbon Systems**

Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho,
Showa-ku, Nagoya 466-8555: Tel 052-735-5272, Fax 052-735-5272 e-mail yusukey@mse.nitech.ac.jp
Yusuke YAMAMOTO, Hiroaki YOSHIMIZU, Yoshiharu TSUJITA, and Takatoshi KINOSHITA:

Syndiotactic Polystyrene (SPS) is one of polymorphic polymers, namely it has four crystalline structures. The δ form, which is one of the crystalline forms for SPS, consists of the complex with SPS and its good solvent as a guest molecule. In this study, various aromatic hydrocarbons were used as guest molecules of the complex, and the thermal stabilities and mobilities of the guest molecules were estimated by means of thermal and spectroscopic analyses. These complexes showed different thermal stabilities and complex contents due to the size and shapes of the guest molecules. ^{13}C -NMR spectra of methyl carbons for xylene isomers in these complexes showed one peak and two peaks for p-xylene and m-xylene, respectively. This finding indicates that the different environments for guest molecules exist in the SPS-Xylene isomers complexes.

1. 緒言

シンジオタクチックポリスチレン(SPS)の結晶構造は熟履歴や調製方法に依存し、4種類に大別される。その中でも我々は種々の低分子とコンプレックスを形成した δ 形結晶に注目している。このコンプレックスの熱安定性やコンプレックス含率はゲスト分子によって大きく異なり、SPSを用いた物質分離への応用が可能である。またこれらの特徴は、コンプレックス中に存在するゲスト分子の分子運動性や周りの環境等の情報を得ることで説明付けられると考えられる。本研究では、ゲスト分子の脱離温度とコンプレックスの形成量がそれぞれ異なるいくつかの芳香族炭化水素をゲスト分子に用い、コンプレックス中における分子運動性について検討した。

2. 実験

SPS($M_w=211,000, M_w/M_n=3.45$)ペレットは出光石油化学(株)より提供されたものをトルエン、p-キシレン、m-キシレン、メシチレンに沸点以上で溶解し、その後室温まで急冷して10wt%サンプルを調製した。またNMRサンプルはその後室温にて真空乾燥して余分な溶媒を除去した。DSC及びTG測定は測定温度範囲25から300 $^{\circ}\text{C}$ 、昇温速度2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で行った。 ^{13}C NMR DDMAS、CP/MAS測定ともに、待ち時間5s、MAS速度5000Hz、積算回数は明瞭なスペクトルが得られるまで行った。またスピン-格子緩和時間は、Torchiaのパルスシーケンスを用い、室温で行なった。 ^{13}C の観測周波数は100.579Hz、 ^1H デカップリング強度は約60kHzである。

シンジオタクチックポリスチレン、コンプレックス、 ^{13}C NMR、スピン-格子緩和時間、キシレン異性体

やまもと ゆうすけ、よしみず ひろあき、つじた よしはる、きのした たかとし

3.結果と考察

各サンプルのゲスト分子脱離温度をDSC測定より評価した。トルエン系はトルエンの沸点より高いゲスト分子脱離温度を示した。またp-キシレン系ではm-キシレン系よりも高いゲスト分子脱離温度を示した。用いたゲスト分子の中でメシチレンは最も低いゲスト分子脱離温度を示した。ゲスト分子の脱離はコンプレックスの崩壊を意味するため、より高温におけるゲスト分子脱離はコンプレックスの熱安定性がより高いといえる。またTG測定の結果、各サンプルは温度上昇と共に比較的低温で生ずる自由溶媒の重量減少、そしてゲスト分子脱離温度と一致するゲスト分子の重量減少と二段階の減少を示した。二段階目のゲスト分子の重量減少はトルエン、p-キシレン、m-キシレン、メシチレンの順に多い為、コンプレックス含量も同様であるといえる。コンプレックスの熱安定性及びその含量は、メチル基が2つ配置したp-キシレンとm-キシレン系では、3つのメシチレン系より多く、ゲスト分子のサイズに関連付けられる。また、キシレン異性体間では、パラ位の方がメタ位よりも高く、メチル基の配置に関連付けられる。p-キシレン及びm-キシレンの ^{13}C NMR DD/MAS及びCP/MASスペクトルをFig.1, 2に示す。メチル基に帰属されるシグナルは、DD/MASスペクトルにおいて顕著である為、比較的メチル基の運動性は高いといえる。またp-キシレン及びm-キシレンでは、シグナル数が異なった。コンプレックス中においてm-キシレンの2つのメチル基は異なる環境下に存在すると考えられる。さらにスピン-格子緩和時間(T_1^c)測定を行った。得られた緩和曲線は直線性を示さず、緩和の速い成分と遅い成分の2成分が示唆された。トルエン及びp-キシレン系の各成分はほぼ同じ T_1^c 値を示した。一方、m-キシレン系の21ppmのメチル基はトルエン、p-キシレン系とほぼ同じ値であったが23ppmのメチル基は異なる値を示した。これらの結果から、コンプレックス中ではメチル基の配置によってその存在する環境が異なり、これがコンプレックスの熱安定性、含量等に影響を及ぼす要因の一つといえる。本研究の一部は(財)科学技術交流財団の補助を受けて行われた。

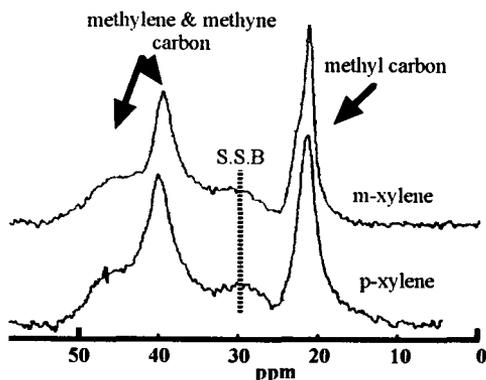


Fig.1 DD/MAS ^{13}C NMR spectra of SPS-Xylene isomers at room temperature.

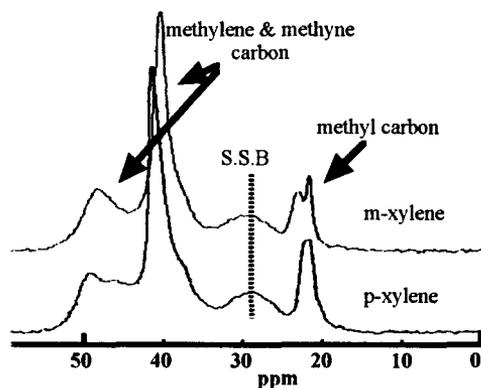


Fig.2 CP/MAS ^{13}C NMR spectra of SPS-Xylene isomers at room temperature.

固体高分解能 ^{13}C NMR 及び ^{113}Cd NMR 法による Cd 塩エチレンアイオノマー
のイオン会合体と分子運動性

(名工大 工) ○杉浦 寿史、吉水 広明、辻田 義治、木下 隆利

Structure Analysis and Estimation of the Mobility for Ionic Aggregates in the Cd salt of Ethylene
Ionomer by High-Resolution Solid State ^{13}C and ^{113}Cd NMR spectroscopy

Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology,

Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8555, Japan

○Hisashi Sugiura, Hiroaki Yoshimizu, Yoshiharu Tsujita and Takatoshi Kinoshita

In this study, we prepared the Cd salt of ethylene ionomers with various degree of neutralization and various content of methacrylic acid, in order to investigate the structure of ionic aggregates and polyethylene matrix for this ionomer. From the SAXS measurements, the size of ionic aggregates of this ionomer become larger with the degree of neutralization. Moreover, through the ^{13}C DD/MAS NMR spectroscopy, it was confirmed that the degree of crystallinity in the polyethylene matrix of this ionomer becomes lower with increasing the degree of neutralization. Through the ^{113}Cd CP and DD/MAS NMR, it was confirmed that the mobility of the ionic aggregates of this ionomer becomes higher with increasing temperature.

(緒言)アイオノマーはホストポリマーだけでは実現することのできない様々な特性を発現させる。これらの機能はアイオノマー中のイオン基が静電的相互作用により会合し、イオン会合体を形成することに起因する。本研究ではエチレンアイオノマーを対象として、これまでに報告がなく、他の金属イオンと比較して原子半径の大きい Cd で中和した試料を調製し、Cd 塩エチレンアイオノマーの形成するイオン会合体及びエチレンマトリックス相の構造について検討した。

(実験)酸含量 3.5 mol%及び 5.4mol%のエチレン-メタクリル酸共重合体(E-0.035MAA;膜厚約 23.8 μm 、E-0.054MAA;膜厚約 20.2 μm)を酢酸カドミウム・二水和物を溶解させたエタノール中に適当な温度で浸漬させることにより種々の Cd 塩エチレンアイオノマー(E-0.035MAA-xCd、E-0.054MAA-xCd;xは中和度)を調製した。小角 X 線散乱測定はリガク社製 RAD-C を用い、 $2\theta = 1.2 \sim 15^\circ$ で出力 32 k W、スキャン速度 1deg./min.、膜厚約 100 μm 、積算回数 10 回で透過法により行った。 ^{13}C DD/MAS 及び ^{113}Cd NMR 測定は Varian 社製 UNITY400puls NMR 分光計を用いた。観測周波数 100.58MHz(^{13}C)及び 88.71MHz(^{113}Cd)、 ^1H デカップリング磁場強度は約 60kHz、マジック角スピン(MAS)速度は約 4.5kHz で繰り返し時間は 10 秒、測定温度 25~95 $^\circ\text{C}$ とし積算回数は良好な S/N 比を得られるまで行った。

固体高分解能 ^{13}C NMR、固体高分解能 ^{113}Cd NMR、Cd 塩エチレンアイオノマー、イオン会合体、分子運動性

○すぎうら ひさし、よしみず ひろあき、つじた よしはる、きのした たかとし

(結果と考察)各酸含量試料とも、中和度の異なる試料についての小角 X 線散乱測定では、実測されたイオン会合体に由来する X 線散乱ピークの中和度の増加に伴う小角側へのシフトが確認された。これは中和度の増加に伴い、イオン会合体サイズが大きくなる為と考えられる。その為 Cooperらによって提唱された修正剛体球モデルによってイオン会合体のサイズについて検討した。その結果、Cd 塩エチレンアイオノマーではイオン会合体はエチレン主鎖をイオン会合体周りに多く取り込んで、そのサイズを大きくしていると考えられる。

各中和度の Cd 塩エチレンアイオノマーの DSC 測定では、熱処理後の冷却過程により生成したポリエチレン結晶の融解に基づく高温側吸熱ピークと室温でのエージングにより等温結晶化したポリエチレン微結晶の融解に基づく低温側吸熱ピークの 2 つの吸熱ピークが確認された。この高温側吸熱ピークは中和度の増加に伴い低温側へシフトし、その吸熱量も減少した。また低温側吸熱ピークは中和度の増加に伴い高温側へシフトし吸熱量は増加した。これは SAXS 測定によって示唆された中和度が増加に伴い大きくなったイオン会合体がエチレン主鎖を多く取り込みエチレン主鎖の自由度を抑制し、冷却過程での結晶化を制限し、その結晶化度を低下させている為であると考えられる。そこで結晶化度について検討するため、定量的な議論が可能である ^{13}C DD/MAS NMR 測定を行った。得られたスペクトル中のポリエチレン結晶と非晶ピークの相対面積強度により結晶化度を算出した結果、中和度の増加に伴い結晶化度の低下が確認され、95°C では各中和度サンプルとも結晶融解を示す 0%であった。

イオン会合体の構造について検討するために直接 Cd 核を観察可能な固体 ^{113}Cd NMR 法で測定を行った。固体 ^{113}Cd CP/MAS NMR 及び ^{113}Cd DD/MAS NMR 測定により得られたスペクトルを Figures 1, 2 に示す。室温における固体 ^{113}Cd CP/MAS NMR 測定では、酢酸カドミウム・二水和物のピークよりも Cd 塩エチレンアイオノマー中のイオン会合体のピークはブロードに観察されたことから、イオン会合体中の Cd は 1 つの配位構造だけでなく幾つもの配位構造を持っているものと解る。また 95°C の測定において、固体 ^{113}Cd CP/MAS NMR 測定ではイオン会合体ピークが消失し ^{113}Cd DD/MAS NMR 測定では明確なイオン会合体ピークが観測されたことから、イオン会合体は室温ではその運動性が低いが 95°C にもなるとイオン会合体といえども運動性が上昇することが確認された。

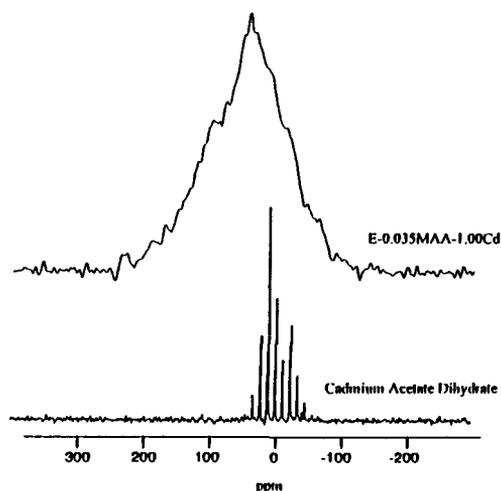


Figure 1 ^{113}Cd CP/MAS spectra of E-0.035MAA-1.00Cd and Cadmium Acetate Dihydrate.

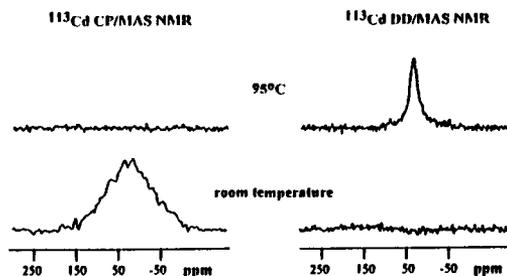


Figure 2 ^{113}Cd CP/MAS NMR and ^{113}Cd DD/MAS NMR spectra E-0.035MAA-0.90Cd at room temperature and 95°C.

高分子中に存在する ^{129}Xe 核の NMR 化学シフト値

名工大・工 ○鈴木智幸、吉水広明、辻田義治、木下隆利

NMR Chemical Shifts of the ^{129}Xe Sorbed in Polymers

○Tomoyuki Suzuki, Hiroaki Yoshimizu, Yoshiharu Tsujita, and Takatoshi Kinoshita

Department of Materials Science and Engineering, Polymeric Materials Course,

Nagoya Institute of Technology

In this study, we observed the ^{129}Xe NMR spectra of the ^{129}Xe in the glassy poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide) (PPO) / polystyrene (PS) blend under various pressure of Xe in order to estimate the change of the microvoids by the blending. We investigated the relationships among the ^{129}Xe NMR chemical shifts, the Xe sorption properties, and the densities of PPO/PS blend system. The densities and Xe sorption properties of PPO/PS blend system indicated the reducing of the microvoids by the blending. The estimation of the microvoids in PPO/PS blend system by means of ^{129}Xe NMR spectroscopy was coincident with the results of the density and Xe sorption.

[目的] 一般に相溶性ポリマーブレンド系では、自由体積(あるいはマイクロポイド)をブレンド組成によって制御可能なので、その Xe 吸着測定および ^{129}Xe NMR 測定から、マイクロポイドと NMR 化学シフト値との相関をより詳細に検討できる。ガラス状高分子中に存在するマイクロポイドとはいわゆる未緩和体積のことである。ゴム状態にある高分子が温度の低下によりガラス転移を起こしてガラス状態になると、主鎖の分子運動が完全に緩和しきれずに凍結し、分子レベル、あるいはそれに近いオーダーの空孔が形成される。

空孔に吸蔵された ^{129}Xe 原子の NMR 化学シフト値 δ は、 $\delta = \delta(\text{S}) + \delta(\text{E}) + \delta(\text{Xe})$ で表される。ここで $\delta(\text{S})$ は Xe 原子と空孔内壁との衝突による項、 $\delta(\text{E})$ は電場による分極あるいは電荷移動に起因する項である。そして $\delta(\text{Xe})$ は Xe 原子同士の衝突による項で、Xe 密度の上昇に伴い線形的に増加する。本研究では相溶性 PPO/PS 系ポリマーブレンドの自由体積およびマイクロポイドに関する情報を、 ^{129}Xe NMR 法と Xe 吸着測定の両面から評価した。

[実験] Xe は名古屋興産(株)社製のものを用いた。PPO、PS およびそのブレンドフィルムは、共通溶媒にクロロホルムを用い、溶液キャスト法により調製した。Xe 吸着測定は CAHN 社製精密電子天秤(CAHN-2000)を用い、重量法により行った。 ^{129}Xe NMR 測定は日本電子(株)製の

キーワード : ^{129}Xe NMR 化学シフト, Xe 吸着測定, マイクロポイド, 二元吸着モデル

○すずきともゆき, よしみずひろあき, つじたよしはる, きのしたたかとし

GX400NMR 分光計を用いて行った。各サンプルをテフロン製バルブの付いた NMR 管 (Wilmand 社製) に約 1g 充填した後、十分乾燥してから所定の圧力に相当する Xe を導入した。Xe 導入後少なくとも 24 時間放置した後に、観測周波数 110.5MHz にてシングルパルス法で測定した。

[結果と考察] Xe 吸着測定を行ったところ、各サンプルともガラス状高分子に特有な二元吸着型の吸着等温曲線を示した。二元吸着理論では、ガラス状高分子の気体吸着量 C は、Henry 則に従う量 C_D と Langmuir の吸着理論に従う量 C_H との総和として表される。Henry 型の吸着機構は、ゴム状高分子の場合と同様に、吸着量が圧力の増加に伴い線形的に増加する。一方 Langmuir 型の吸着機構は、ガラス状高分子中に多数存在するマイクロポイドへの気体分子の吸着である。得られた吸着等温曲線に二元吸着モデルを適用してガラス高分子中のマイクロポイドの総量を表すパラメーターである Langmuir 飽和定数 C'_H を算出し、PPO 分率に対してプロットしたところ、体積加成性から予想される値よりも小さな値をとった。これは相溶化によるマイクロポイドの減少を意味している。

次に各サンプルに種々の圧力で Xe を吸着させて ^{129}Xe NMR 測定を行ったところ、NMR 化学シフト値は Xe 吸着量の増加とともに低磁場シフトした。これは吸着量の増加に伴い Xe 原子同士の衝突頻度が高くなる為である。化学シフト値を Xe 吸着量に対してプロットしたところ、ゴム状高分子の場合とは異なり、線形的なシフトを示さなかった。これは Henry および Langmuir サイト間の Xe の交換に因るものであると考えねばならない。また得られた ^{129}Xe NMR スペクトルは対称性の良い単一のピークを示したことから、Xe 原子は Henry サイト

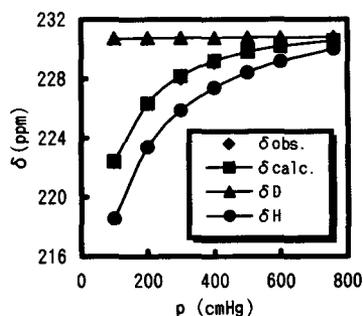


Figure 1 The plots of ^{129}Xe NMR chemical shifts vs. pressure of Xe for PS at 25°C.

と Langmuir サイトという異なったサイト間を、NMR 観測タイムスケールにおいて速い速度で交換していると言える。そこで Xe 吸着測定より得られた二元吸着パラメーターと、両サイト間の Xe の速い交換を仮定したモデル式を適用して各サイトの NMR 化学シフト値を見積った。一例として PS における結果を示す (Figure 1)。Henry サイトの NMR 化学シフト値は実測値よりも低磁場側に、Langmuir サイトでは高磁場側に位置した。Langmuir サイトの NMR 化学シフト値を Xe 吸着量 (密度) ゼロに外挿した時の値が Xe 原子と空孔内壁との衝突による NMR 化学シフト値 $\delta(S)_H$ である。この値を PPO 分率に対してプロットしたところ、加成性から予想される値よりも大きかった。これは相溶化によるマイクロポイドの収縮を意味し、Xe 吸着測定の結果と併せて評価すると、PPO/PS 系ポリマーブレンドは相溶化によりマイクロポイドの総量が減少するとともに、そのサイズも小さくなると言える。

以上本研究より、高分子中に吸着した ^{129}Xe 核の NMR 化学シフト値を解析することにより、高分子の微細構造の評価が可能である。

固体 ^{23}Na -NMR による層状ケイ酸塩化合物中の層間カチオンの状態解析

シーエーシーズ(株)四日市分析センター¹、横浜分析センター²

○田畑 祥生¹、坂田 育幸²、植垣 隆浩²

Characterization of Interlayer Cation of Layer Silicate Compounds

Revealed by Solid State ^{23}Na -NMR Spectroscopy

Sachio Tabata¹, Yasuyuki Sakata², Takahiro Uegaki²

Yokkaichi Research Center¹ and, Yokohama Research Center², CACs, Inc.

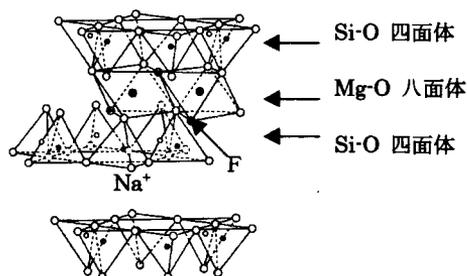
We attempted to elucidate the property of interlayer sodium cation for two types of tetrasilicic sodium fluor mica by using solid state ^{23}Na -NMR Spectroscopy. Single pulse method, T_1 measurements, and MQ-MAS method were investigated. The results show that the exchangeable sodium cation consists of at least two components having different lineshapes and T_1 values.

目的

層状ケイ酸塩化合物は、層間に金属イオンを有し、膨潤性やイオン交換性等を持つため、土壌改良材、化粧品、高分子添加剤、放射性廃棄物の除去剤等に広く用いられている。本研究ではNaを層間イオンに持つ合成雲母化合物に着目し、固体NMRによりNaの状態について検討を行なった。

膨潤性合成フッ素雲母化合物について

標記化合物は2:1型層状ケイ酸塩であり、Mg-Oの八面体層をSi-Oの4面体構造が上下から一層ずつ挟み込んだ構造となっている。電荷の不足分を補うために、層間にNa⁺のようなカチオンが入ることにより安定構造となっている。固体 ^{23}Na -NMRによる解析については相馬¹⁾らによる報告があり、層間には少なくとも交換性、非交換性の2種のNaが存在することが示唆されている。本研究では T_1 測定や多次元測定法を用いることにより、より詳細な情報が得られないかどうか検討した。試料は市販されている以下の膨潤性Na型合成フッ素雲母を用いた。



1)コープケミカル(株)製 ME-100

2)トピー工業(株)製 Na-TS

組成はほぼ同一であるが、製造法が異なっている^{2,3)}。本研究ではこれらの試料をいずれも特に物理的、化学的処理を施さずそのまま実験に用いた。

シングルパルス+MAS法および T_1 測定

GSX-270W(6.35T)とChemagnetics CMX-400(9.4T)を用いた。両試料とも2種類の共鳴線が観測された。低磁場側は非交換性Na、高磁場側は交換性のNa由来と帰属されている¹⁾。高磁場の装置で測定することにより、交換性Naの共鳴線の形状に違いが見られ、静磁場の強度に依存して線形が影響を受けやすい成分と受けにくい成分とが同時に存在している可能性があることが示唆された。また、 T_1 を測定するとME-100では幅の広い成分は T_1 が非常に短いのに対し(<1ms)、もう一方の成分は1.8sと長く、3オーダーも異なっている。Na-Tsも同様の傾向であるが、緩和時間の短い成分は線幅が小さく、長い成分は共鳴線の形状が異なる。交換性Naの主成分(線幅の狭い成分)は水分子が配位した状態に由来し、幅の広い成分は、結晶格子の欠陥部分や、端面、表面などに存在するNaによるものではないかと考察している。

MQ-MAS スペクトルとその解釈について

1995年にFrydmanとHarwoodによって発表されたMQ-MAS法⁴⁾はMASプローブで四極子核の高分解能スペクトルを得る測定法として、近年特に注目されている。今般前述の試料について、Naの状態につい

合成雲母、層間カチオン、MQ-MAS

たばた さちお、さかたやすゆき、うえがきたかひろ

てより詳細な情報を得るためにMQ-MAS測定を試みた。装置はChemagnetics CMX-400を用い、MAS回転数は12.5kHz、Zフィルターを用いた3パルスシーケンスを用いた。得られたスペクトルをFig3,4に示す。パルス幅等の最適化については現在も検討中である。いずれの成分も化学シフト方向に線幅が広がっているのが特徴である。これは交換性Naが化学シフトに大きな分布を持っているためであると考えられる。また、シングルパルス法やT₁測定では分離しにくかった成分もMQMASでは分離可能になる可能性が示唆された。

謝辞

MQ-MASの測定に関しては日本電子(株)応用研究センターの杉沢寿志氏にお世話になった。また、測定結果の解釈については通産省九州工業技術研究所の野間弘昭博士に貴重なご助言をいただいた。この場を借りて感謝したい。

文献

- 1) M. Soma, A. Tanaka, H. Seyama, S. Hayashi, and K. Hayamizu, *Clay Science*, **8**, 1-8. (1990).
- 2) H. Tateyama, S. Nishimura, K. Tsunematsu, K. Jinnai, Y. Adachi, and M. Kimura, *Clay Clay Miner.*, **40** (2), 180-185 (1992).
- 3) 杉森健一郎、粘土科学、**26** (2), 127-137(1986).
- 4) L. Frydman, J. S. Harwood, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5367 (1995).

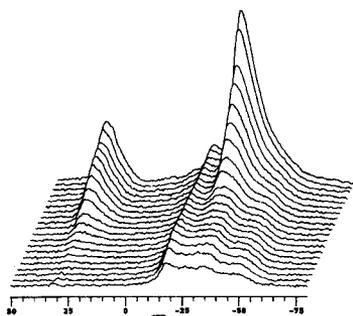


Fig.1 T₁ measurement of ME-100 ($\tau=1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, 300, 500, 700\text{ms}, 1, 1.5, 2, 5, 10\text{s}$)

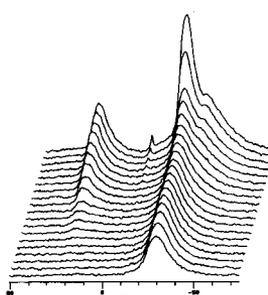


Fig.2 T₁ measurement of Na-Ts($\tau=2, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, 300, 500, 700\text{ms}, 1, 1.5, 2, 5, 10\text{s}$)

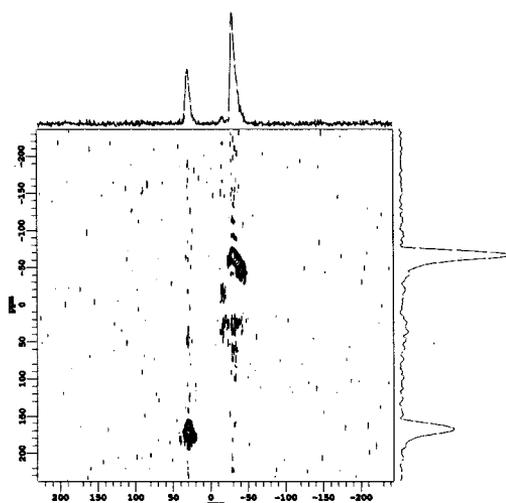


Fig.3 ²³Na-MQ-MAS NMR spectrum of ME-100.

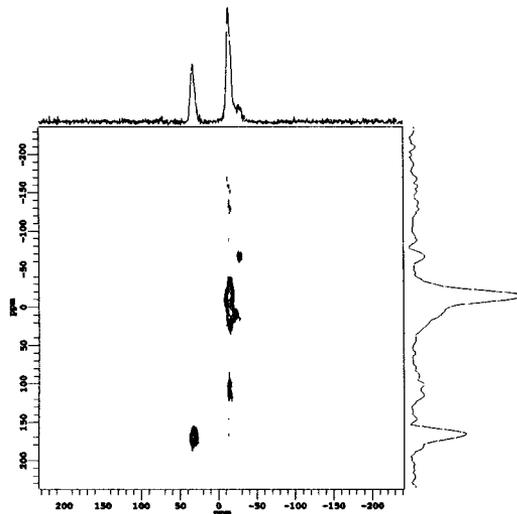


Fig.4 ²³Na-MQ-MAS NMR spectrum of Na-Ts.

分子認識系におけるゲスト-ホスト相互作用の研究

(京大院理) ○中村新治、今城文雄、竹腰清乃理、寺尾武彦

Host-guest interactions for cholic acid/ γ -valerolactone inclusion compound by two-dimensional exchange ^{13}C solid-state NMR

(Kyoto u.) S. Nakamura, K. Takegoshi, F. Imashiro, and T. Terao

Host-guest interactions between cholic acid / γ -valerolactone inclusion compound (CA/VAL) which exhibits efficient optical resolution are studied by ^{13}C solid-state NMR methods. The ^{13}C solid-state NMR spectrum of C24 in CA/VAL (Fig. 1) give a triplet signal. This is compatible with our previous study on one-dimensional alignment of VAL enclathrated in CA, in which S-domain, R-domain, and their boundary are formed. In this report, we observed spin diffusion between the C24 carbon of CA and the C5 carbon of VAL measured by two-dimensional exchange ^{13}C solid-state NMR. The triplet signals of C24 were attributed to host-guest interactions between CA and VAL.

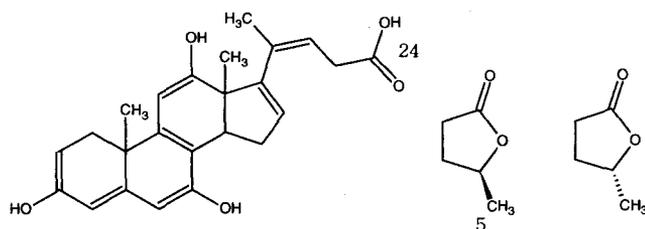


Figure 1 cholic acid and γ -valerolactone

包接化合物は混合物質の分離や精製，不安定な医薬品の安定化など機能材料として重要である一方，無機，有機および物理化学の基礎研究の対象としても興味を持たれている。包接化合物が示す興味ある物性の一つに，光学異性体の片方を選択的に包接するという分子認識がある。例えば，cholic acid (CA) 結晶はラセミ体 γ -valerolactone (VAL) の光学異性体 (S体とR体) の片方 (S体) を分子認識して，S体：R体=68:32 の包接化合物を形成することが知られている¹⁾。さらにこの分子認識が，VAL分子がCA結晶の層間に挿入することにより行われることも分かった。このことは，CA集合体がVALの吸着と脱着に可逆的に応答してその構造を変形できる柔軟な構造を持っていることを意味していると考えられる。そのためにCA/VAL包接化合物の分子認識は，構造化学的に興味もたれるだけでなく，分子集合のあり方によって活性を示す生体分子の分子認識との関連が考えられことから，この機構を解明す

なかむらしんじ、いましろふみお、たけごしきよのり、てらおたけひこ

キーワード：固体NMR 分子認識 光学分割 スピン拡散

ることが望まれてきた。

CA/VALの構造については、これまで主にX線と固体NMRによって研究されてきた。X線構造解析では²⁾、VALはCA分子の層間にできた空洞に一次元分子集合体として存在していることが示された。また固体NMR法では³⁾、包接結晶中のS体とR体が異なるコンフォメーションをとっていることが示された。さらにS体の多く包接される理由は分子力場計算により、S体のとるコンフォメーションの方がより安定であることにより説明された。一方で、分子間の構造的な相関が分子認識の機構に影響を与えている可能性も考えられてきた。CA/VALでは、ゲスト分子間において分子認識を左右するような相互作用が働いていることが考えらる。そこで以前に我々は⁴⁾、S体とR体がランダムに包接されているのか、もしくは何らかの統計的な秩序に従って包接されているのかに興味をもち、VALの一次元集合体の配列を決定することを試みた。その結果、S体とR体はランダムな配列であるベルヌーイ試行から大きく外れて、同種の光学異性体がドメイン(ドメイン配列)を作っていることを示していた。すなわち、分子認識が同種光学異性体間での強い引力的な相互作用の下で起きていることを示している。これはS体が一旦包接されるとS体の鑄型ができ、引き続いてS体が包接されやすくなることを示唆するものと思われる。

これまでの研究において、ドメイン配列の形成時にできたと思われる鑄型の影響は、¹³C 固体NMRスペクトルにおける化学シフトの違いとして観測されていた。例えば、CAのC 2 4はS体のみを包接したCA/VALにおいては1種類であったのに対して、S体とR体とも包接している場合には少なくとも3種類のピークとして観測された。このピークの分裂はコール酸がS体ドメイン、R体ドメイン、及びそのドメインの境界にあるVALと構造的な相関を持つためではないかと考えられた。本研究では、コール酸とVAL間の構造的な相関に着目して、コール酸C 2 4の帰属を行うために、[24-¹³C]CA/[5-¹³C]VALを用いてホストとゲストの間のスピン拡散を2次元交換NMR法により観測した。

reference

- 1) M. Miyate, M. Shibakami, and K. Takemoto, *J. Chem. Soc. Commun.*, 655(1988).
- 2) K. Miki, N. Kasai, M. Shibakami, K. Takemoto and M. Miyata, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1757 (1991)
- 3) F. Imashiro, D. Kuwahara and T. Terao, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 1759 (1993).
- 4) S. Nakamura, K. Takegoshi, F. Imashiro, and T. Terao, 第37回NMR討論会要旨(1998)

^{129}Xe 高圧 NMR による(±)-[Co(en)₃]Cl₃ 結晶のマイクロ細孔の
 キャラクターゼーション

阪大院理 ○上田貴洋、江口太郎、中村亘男

High-Pressure ^{129}Xe NMR Characterization of Micropore
 in (±)-[Co(en)₃]Cl₃ crystal

Takahiro Ueda, Taro Eguchi, and Nobuo Nakamura

(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University)

(±)-[Co(en)₃]Cl₃ crystal forms a micropore of the diameter of 0.58 nm along the crystallographic *c*-axis which reversibly absorbs water molecules up to 4 per formula unit. We carried out high-pressure ^{129}Xe NMR measurements on this material under the dehydrated condition to characterize the micropore. The ^{129}Xe NMR spectrum measured at 0.24 MPa shows powder pattern due to the axially symmetric chemical shift tensor, from which the isotropic value of the chemical shift ($\delta_{\text{iso}} = 209$ ppm), and the anisotropy ($\Delta = 62$ ppm) were obtained. This finding implies that this compound possesses an axially symmetric micropore under the dehydrated condition. The principal values of the chemical shift tensor are determined to be $\delta_{\parallel} = 270$ ppm and $\delta_{\perp} = 178$ ppm, suggesting that the Xe atoms are arranged linearly in the cylindrical.

緒言

(±)-塩化トリスエチレンジアミンコバルト(III)水和物 ((±)-[Co(en)₃]Cl₃·*n*H₂O)の結晶は、空間群 $P\bar{3}c1$ に属する三方晶系の格子を形成し、その *c* 軸方向に直径 0.58 nm の均一なマイクロ細孔を有する。この細孔は結晶水を錯体分子 1 個当たり最大 4 個まで吸蔵できる。さらに、この結晶水は可逆的に吸蔵・脱離が可能な zeolitic water として振舞うことが知られている。このことは、(±)-[Co(en)₃]Cl₃ 結晶が有するマイクロ細孔が、結晶水の脱離後も壊れずに保持されている可能性を示唆している。もし、このマイクロ細孔が無水物においても安定に保持されているならば、細孔径分布の極めて狭い、非常に均一な細孔をもったマイクロ細孔材料として、分子ふるいや不均一触媒の担持媒体への応用が期待できる。本研究では、細孔構造に非常に敏感な ^{129}Xe 高圧 NMR 法を用いて、この化合物の無水物におけるマイクロ細孔のキャラクターゼーションを行い、その性質について研究した。

実験

塩化トリスエチレンジアミンコバルト(III)水和物は、既知の方法[1]により合成した。さ

マイクロ細孔、 ^{129}Xe 高圧 NMR、圧力依存性、化学シフトの異方性

うえだたかひろ、えぐちたろう、なかむらのぶお

らに、加熱・脱水することにより結晶水を出来るだけ取り除いた試料を ^{129}Xe NMR の測定に用いた。 ^{129}Xe 高压 NMR スペクトルは、Bruker 社製 MSL 200 および DSX 200 分光計に研究室既設の高压 NMR プローブ[2]を装着し、 ^{129}Xe の共鳴周波数 55.6 MHz で、室温において 0.24 MPa ~ 40 MPa の圧力範囲で測定した。

結果及び考察

Fig. 1 に室温において観測された ^{129}Xe NMR スペクトルの圧力依存性を示す。スペクトルは異方的な化学シフトに特徴的な粉末パターンを示した。化学シフトテンソルの異方性を仮定した線形シミュレーションにより、各圧力における化学シフトパラメータを決定した。

最も低圧 (0.24 MPa) では、化学シフトの等方値 $\delta_{\text{iso}} = 209$ ppm、異方性 $\Delta = 62$ ppm を得た。一般に、 ^{129}Xe の化学シフト値は細孔径が小さくなるほど低磁場シフトすることが知られている。したがって、この大きな化学シフト値は、 $(\pm)\text{-}[\text{Co}(\text{en})_3]\text{Cl}_3$ 結晶が比較的細孔径が小さく、異方性の大きな細孔を有していることを示唆している。さらに、化学シフトテンソルの主値として、 $\delta_{\parallel} = 270$ ppm および $\delta_{\perp} = 178$ ppm を得た。結晶構造から予想されるマイクロ細孔の形状が 1 次元の円筒であることから、細孔の長軸方向に δ_{\parallel} が、それと直交する方向に δ_{\perp} が配向しているといえる。また、 δ_{\parallel} の値がバルクの Xe 結晶で観測されている化学シフト値にほぼ一致していることから、Xe 原子は細孔内で 1 次元に配列した構造をとっていると考えられる。圧力を 4.0 MPa まで上げると、 δ_{\perp} には 30 ppm にも及ぶ低磁場シフトが生じたが、 δ_{\parallel} はほとんど変化しない。これは、圧力上昇に伴い、Xe 原子と細孔壁との相互作用が強くなることを示している。

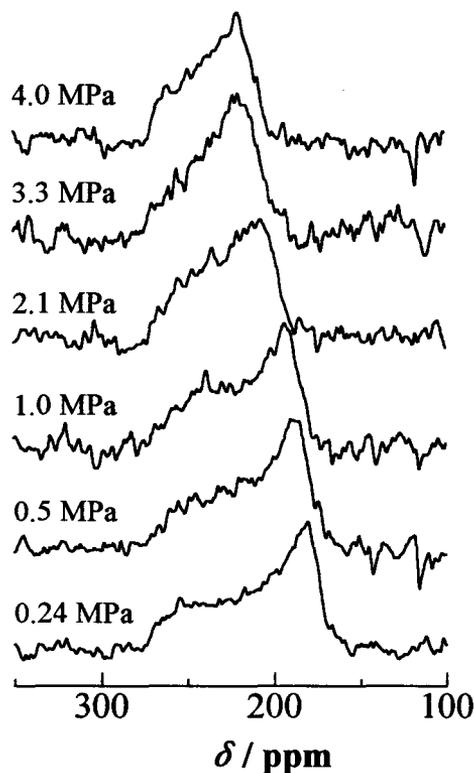


Fig. 1 Pressure dependence of ^{129}Xe NMR spectrum for $(\pm)\text{-}[\text{Co}(\text{en})_3]\text{Cl}_3$ crystal. ^{129}Xe chemical shift is referred to the signal for Xe gas.

参考文献

- [1] K. Nakatsu, Y. Saito, and H. Kuroya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **29**, 428(1956).
- [2] 永阪文惣、江口太郎、中山尋量、中村亘男、第 38 回 NMR 討論会講演要旨集、p.55(1999).

各種 MQMAS パルスシーケンスを用いた Al 含有化合物の解析 (新日鐵先端研^[1]、日本電子^[2]) ○金橋康二^[1]、齋藤公児^[1]、杉沢寿志^[2]

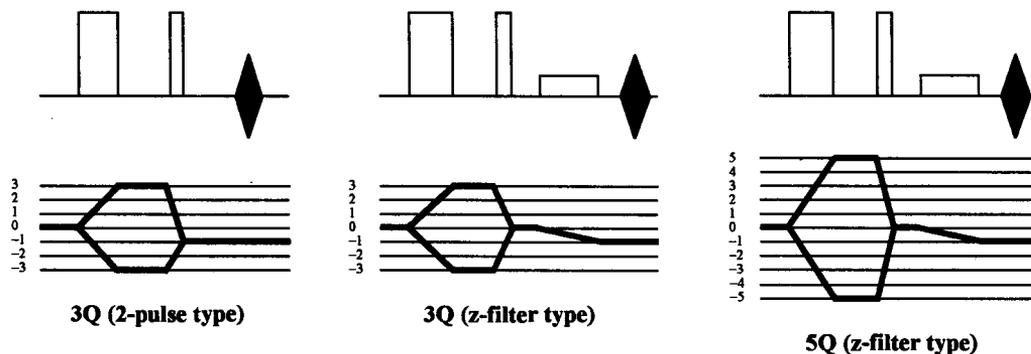
Analysis of Al-Containing Compounds Using Various MQMAS Pulse Sequences

Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Laboratories^[1], JEOL Ltd.^[2]
○Koji Kanehashi^[1], Koji Saito^[1], Hisashi Sugisawa^[2]

2D MQMAS (Multiple-Quantum Magic-Angle-Spinning) NMR being capable of elimination of the second-order quadrupolar interaction using common MAS probe is very useful method in the analysis of half-integer quadrupolar nuclei. ^{27}Al -MQMAS NMR method with several pulse sequences was applied to the structural analysis of AlPO_4 and $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$. In AlPO_4 , three cross peaks were observed when simple two-pulse 3QMAS sequence or 3QMAS with z-filter sequence was selected. Compared with two-pulse type, application of z-filter type eliminated artifacts caused by the asymmetry of coherence transfer, and the projection of 3QMAS spectrum onto F2 axis was more similar to the lineshape of conventional MAS spectrum. The resonances were better resolved in 5QMAS with z-filter than 3QMAS although the excitation of 5Q coherence is less efficient than that of 3Q coherence. $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ was also found to have the tendency similar to AlPO_4 .

【緒言】

近年、四極子核の固体 NMR 解析において、通常の MAS プローブでの測定が可能な MQMAS NMR 法[1]が世界的に注目され、様々な無機化合物、触媒、ガラス系化合物の構造解析に応用展開されつつある。昨年我々は本討論会において、2パルス型 3QMAS シーケンスを用いた B_4C 及び $h\text{-BN}$ の構造解析を行い、2D 3QMAS スペクトルから等方性化学シフト $\Delta\sigma$ 及び核四極子結合定数 C_Q を決定したところ、 B_4C と $h\text{-BN}$ とでは B 配位数の違いにより、 $\Delta\sigma$ 及び C_Q が大きく異なっていることを明らかにした[2,3]。また、これまでにいくつかの MQMAS 用パルスシーケンスが開発されており、必要な情報に合わせてそれらのシーケンスを選択することができるようになってきた。特に、 ^{17}O や ^{27}Al などの $I=5/2$ の核においては、3Q だけでなく、5Q コヒーレンスも利用できるため、さらにその選択肢が広がる。今回我々は、2パルス型 3QMAS、z-フィルター型 3QMAS 及び z-フィルター型 5QMAS の各シーケンスを用いてリン酸アルミニウム (AlPO_4) 及びカオリナイト ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) 中の Al 構造を検討したところ、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 ^{27}Al -NMR スペクトル測定には、Chemagnetics CMX-300 (^{27}Al 観測周波数 78.3 MHz) 分光計を使用した。 AlPO_4 及びカオリナイトはそれぞれ和光純薬工業、Aldrich から購入したものをそのまま用いた。2D MQMAS スペクトルは、Hypercomplex シーケンスにより純粋吸収スペクトルを得た[4]。データ処理においては、Shearing 変換を行いピークを F2 軸に平行にした。 ^{27}Al -NMR の化学シフト基準は、1 M AlCl_3 水溶液のピークを -0.10 ppm とした。

^{27}Al -MQMAS、核四極子相互作用、 AlPO_4 、カオリナイト

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】

AlPO₄の²⁷Al-MAS スペクトル(シングルパルス)は3つのピークを示し(Fig. 1)、40.2 ppm、-11.8 ppm がそれぞれ4配位 Al、6配位 Al に相当し、12.7 ppm は Al-P REDOR の結果から第2近接の P を含めた5配位 Al と推定されている[5]。しかし、シグナルはブロード化しており、2次の核四極子相互作用(2nd-QI)を含んだ情報であるため、表示されるシフトは等方性化学シフトではない。したがって四極子核 NMR の MAS スペクトルシフト値から詳細な構造を議論することは一般的に困難である。

次に、各種 MQMAS パルスシーケンスを用いたときの、AlPO₄の 2D MQMAS スペクトルを Fig. 2 に示す。3QMAS では大きく3つのクロスピークを示し、AlPO₄中の Al が少なくとも3種の化学構造を有することが明らかとなった(Fig. 2(a), (b))。2パルス型、z-フィルター型共にスペクトルの外形に大差はないが、詳細を比較すると z-フィルター型のほうがアーティファクトは少なく(スライスレベルを下げて確認)、F2 軸方向のプロジェクションが MAS スペクトルをより良く再現していた。これは z-フィルター型シーケンスでコヒーレンスの非対称性が解消されるためであると考えられる。また、3QMAS スペクトルの F1 軸プロジェクションは F2 軸に比べてかなりのナローイングが見られていることから、MAS スペクトルのブロードニングの原因として 2nd-QI が支配的であることが明らかとなった。3QMAS スペクトルから決定した $\Delta\sigma$ 及び C_Q は、6配位 Al[-2.04 ppm, 2.7 MHz]、5配位 Al[21.5 ppm, 2.0 MHz]、4配位 Al[50.3 ppm, 2.4 MHz]であり、MAS スペクトルでは、各々のピークが 2nd-QI により約 10 ppm 程度高磁場側へシフトしていることが明らかとなった。続いて z-フィルター型 5QMAS シーケンスを用いたところ、5Q 励起効率が 3Q に比べて悪くなるため感度の大幅な低下(一桁程度)が見られたものの、分解能が向上し、さらにもう1成分の Al の存在を示唆した(Fig. 2(c))。

また、カオリナイトに対しても AlPO₄ 同様、種々のパルスシーケンスを用いて検討を行った。詳細は当日ポスターにて報告する。

以上のように、Al 化合物の構造解析にはこれらの手法を組み合わせる用いることが非常に有効であることが明らかとなった。

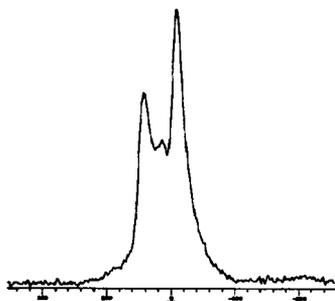


Fig. 1 ²⁷Al-MAS spectrum of AlPO₄
acquisition number: 80.

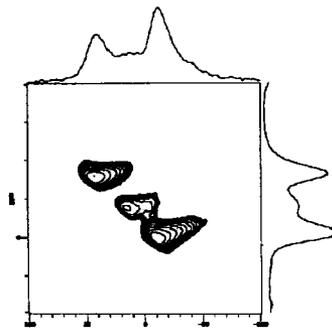


Fig. 2(a) ²⁷Al-3QMAS (2-pulse type) spectrum of AlPO₄
acquisition number: 240.

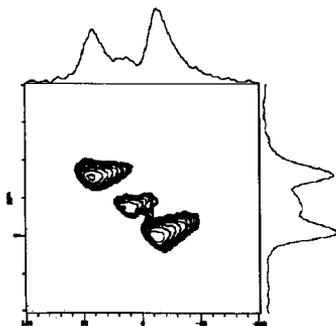


Fig. 2(b) ²⁷Al-3QMAS (z-filter type) spectrum of AlPO₄
acquisition number: 240.

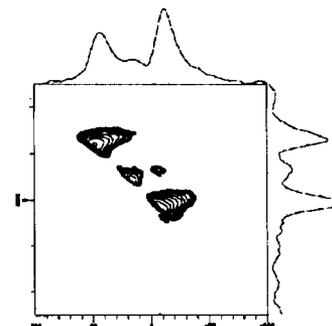


Fig. 2(c) ²⁷Al-5QMAS (z-filter type) spectrum of AlPO₄
acquisition number: 16000.

【文献】

- [1] L. Frydman and J. S. Harwood, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 5367.
- [2] 金橋康二、齋藤公児、杉沢寿志, 第 38 回 NMR 討論会要旨集, (1999) 282.
- [3] K. Kanehashi, K. Saito and H. Sugisawa, *Chem. Lett.*, **6** (2000) 588.
- [4] D. Massiot, B. Touzo, D. Trumeau, J. P. Coutures, J. Virlet, P. Florian and P. J. Grandinetti, *Solid State NMR*, **6** (1996) 73.
- [5] H. Kraus and R. Prins, *J. Phys. Chem.*, **100** (1996) 16336.

固体¹³C-NMRにおけるスペクトル編集テクニック

(Wuの方法)の実材料への応用

(日鐵テクノロジー¹、新日鐵先端研²、日本電子³、日本電子データム⁴)
 ○ 岡山盛明¹、齋藤公児²、杉沢寿志³、出口健三⁴

Application of the spectral editing techniques (Wu's method) in the solid state ¹³C-NMR to real materials
 Nippon Steel Techno Reseach¹, Nippon Steel Corporation Advanced Research Lab.², JEOL Ltd.³, JEOL Datum Ltd.⁴
 ○ Moriaki Hatakeyama¹, Koji Saito², Hisashi Sugisawa³, Kenzo Deguchi⁴

CP/MAS is very powerful to analyze polymer structures but sometimes it is difficult to decide the peak assignment because of broad and overlapped peaks. DEPT method is useful in the solution NMR field, however, there is no suitable method in the solid state NMR field. The spectral editing techniques which was developed by Wu et. al. show remarkable effects in order to distinguish C, CH, CH₂, CH₃ groups in the case of natural products. Therefore we have applied these method to real materials, ex. some polymer and coals. It is clear that Wu's method is helpful to analyze structures, when the experimental conditions are optimized.

【はじめに】

固体¹³C-CP/MAS NMRは高分子の構造解析には不可欠な手法であるが、構造が未知の場合は吸収線の重複や線幅が比較的幅広いため、帰属に戸惑う場面がある。これは固体NMRでは溶液のNMRにあるようなスペクトル編集テクニック(溶液NMRでのDEPT法¹⁾等)がないためである。過去に似たような狙いでダイポーラディフェージング²⁾を利用した方法や多重パルス³⁾を利用した方法が開発されたが、分子運動等の影響を受けてDEPT法ほどの正確さが無いのが実際で、あまり広くは利用されていない。Wuら⁴⁾のグループによって提案された固体¹³C-CP/MAS NMRでの新しいスペクトル編集テクニックはほぼ完全にCH₃、CH₂、CH、四級炭素、それぞれの区別を容易に行うことが可能となり、またS/Nも良く実用に耐えうる結果が得られている。今回我々はこの方法を高分子や石炭等の実材料に応用するために測定条件の最適化を行った。CH₂/CH基と四級炭素/CH₃基を明確に区別することが容易にでき同方法が実材料の構造解析に非常に有効であることが明らかになったので報告する。

【実験】

固体¹³C-NMRの測定はChemagnetics CMX300 (7.0T、¹³C観測周波数75.5MHz)、7.5mm^φ CP/MAS用プローブを使用した。pw90H=4.5μsecであった。化学シフト基準としてヘキサメチルベンゼンを使用した。試料回転速度を上げると、磁化移動速度がMASにより複雑に変調を受け、有効に機能しないため試料回転数を4kHzとした。

Wuらにより開発されたパルスシーケンスFig.1~3を使用し測定を行った。基本的な考えは、交差分極が2つの段階に分けられていることであり⁵⁾、近傍に存在する水素核の数に応じて、後半の脱分極時間を適当に選ぶことで、CH₃、CH₂、CH、四級炭素の区別を行うことができる。

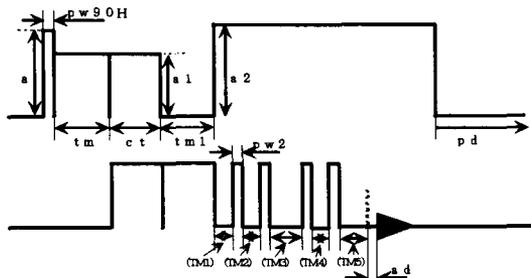


Fig. 1 : 一般的なCPMAS toss (LCP)で十分なコンタクト時間(ct)を取り全てのピークを観測する測定とコンタクト時間を縮め交差分極の初期ステージのみを観測する測定に使う。

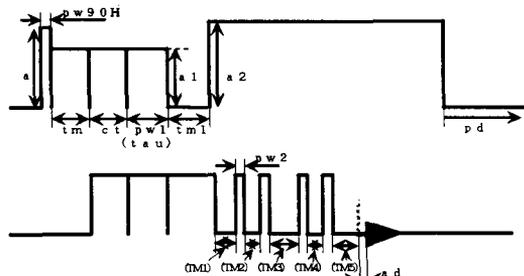


Fig. 3 : CPMAS toss Polarization Inversion (SCPPI)で交差分極の初期ステージで磁化を作り反転時間(tau)を適切に選ぶことでCH₃基の信号を消去できCH₂基のみを得る測定に使用。

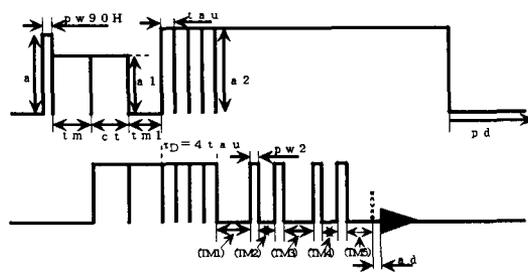


Fig. 2 : CPMAS toss with Depolarization (LCPD)で適切な脱分極時間(tau)を選ぶことでCH₂基とCH基をほぼ完全に消去する測定に使用する。

固体¹³Cスペクトル編集、高分子、石炭

はたけやまもりあき、さいとうこうじ、すぎさわひさし、でぐちけんぞう

【結果と考察】

標準試料としてモノエチルフマレートを用い、測定条件の最適化を行った。各パラメーター(回転数、 ct 、 τ 、 τ_a)を調整することにより、Fig.4に示すように選択的に CH_3 、 CH_2 、 CH 、四級炭素を区別することが出来た。

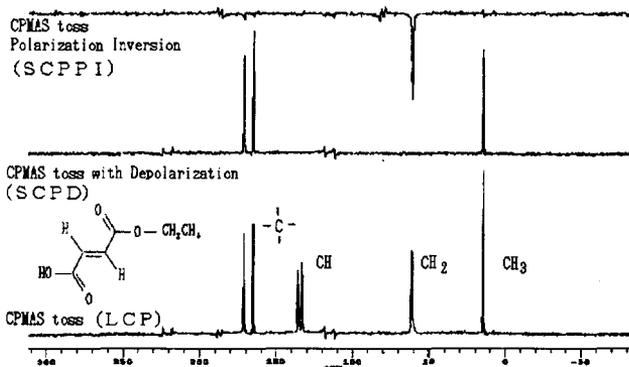


Fig. 4 ^{13}C -NMR spectra of fumaric acid monoethyl ester (LCP,LCPD,SCPPI)

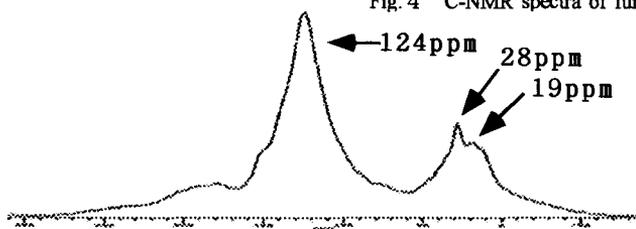


Fig.5 ^{13}C -NMR spectra of Witbank coal (LPD)

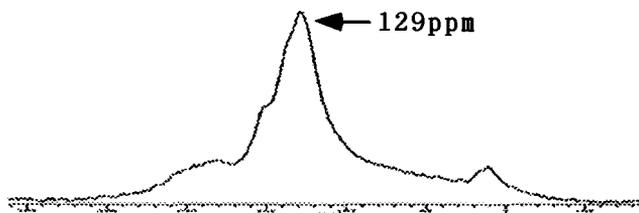


Fig.6 ^{13}C -NMR spectra of Witbank coal (SCPD)

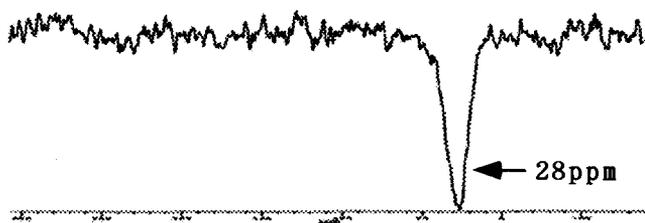


Fig.7 ^{13}C -NMR spectra of Witbank coal(SCPPI)

次に、実材料への応用として高分子や石炭等の構造解析にWuの方法を適応し測定条件の検討を行った。

Fig. 5～7に石炭(Witbank)の測定結果を示す。

通常、石炭のCP/MAS toss (LCP)では CH_3 、 CH_2 、 CH 、四級炭素のピークが混在しているが、SCPPIの結果より、28ppmのピークが CH_2 炭素に相当することが明らかになった。

さらに SCPD のスペクトルから 19ppm は CH_3 炭素、また 129ppm をピークトップとするブロードなピークは四級炭素に相当していることが明らかとなった。以上の結果から Wu の方法は石炭のような複雑な化合物の構造解析にも有効であることがわかった。しかし、各パラメーターがサンプルによって最適値が大きく変化するため測定サンプルの構造が異なる場合はパラメータの最適化をその都度行う必要がある。

【まとめ】

本手法は試料毎に測定条件の最適化が必要であるが、溶液のDEPTと同じような情報が得られるため石炭のような化合物の構造解析に有効であることがわかった。

【参考文献】

- 1) P.H.Bolton, *J.Magn.Reson.*, 41, 287 (1980); D.M.Doddrell, D.T.Regg, M.R.Bendall, *J.Magn.Reson.*, 48, 323 (1982); D.T.Pegg, D.M.Doddrell, M.R.Bendall, *J.Chem.Phys.*, 77, 2745 (1982).
- 2) N.K.Sethi, *J.Magn.Reson.*, 94, 352 (1991)
- 3) D.P.Burum and A.Bielecki, *J.Magn.Reson.*, 95, 184 (1991)
- 4) X.Wu et al, *J.Magn.Reson.*, A111, 29 (1994)
- 5) X.Wu et al, *Phys.Rev.*, B37, 9827 (1988)

ZSM-5 細孔内のニトロアニリンの挙動
 : Si/Al 比・カチオンの影響
 (物質研) ○小森佳彦・林繁信

***p*-Nitroaniline in the micropore of ZSM-5: effects of Si/Al ratio and cations.** (National Institute of Materials and Chemical Research) Yoshihiko Komori and Shigenobu Hayashi

Environments of *p*-nitroaniline (*p*NA) molecules in several kinds of ZSM-5 have been investigated by means of solid-state NMR. ZSM-5 and *p*NA were mixed under N₂ atmosphere and the sample tubes sealed in vacuum were heated at 423 K. ¹³C CP/MAS NMR spectra of *p*NA incorporated in ZSM-5 showed four signals of *p*NA. The profiles of the signals depended on the kinds of ZSM-5 which have different Si/Al ratio and cations, indicating that chemical environments of micropores in the ZSM-5 have a various influence on the behavior of *p*NA molecules.

1. 緒言

無機有機ナノ複合体は無機物（ホスト）と有機物（ゲスト）の双方の利点を兼ね備えた新しい材料として期待され、基礎・応用の両面から広く研究が行われている。その物性はホスト、ゲストの構造、性質に依存するだけでなく、ホスト-ゲスト間相互作用を反映すると考えられ興味深い。無機ホストのひとつであるゼオライトは多孔性の結晶性アルミノケイ酸塩であり、規則的な細孔構造を有している。*p*-ニトロアニリン (*p*NA) 等の機能分子を吸着させることで、非線形光学特性を示すことが知られている。本研究では酸素10員環からなる直径約0.54 nmの一次元チャンネルを有するZSM-5型ゼオライトに着目し、細孔内での*p*NAの挙動を固体NMRを用いて検討した。特にZSM-5のSi/Al比や細孔内のカチオンを変化させ、ゲスト分子の挙動に与える影響を調べた。

2. 実験方法

ZSM-5は触媒学会から配布されている参照触媒 (SiO₂/Al₂O₃が1000, 70でNaイオンを有するJRC-Z5-1000Na, 70Na, SiO₂/Al₂O₃が1000, 70, 25でHイオンを有するJRC-Z5-1000H, 70H, 25H) を用いた。ZSM-5を473Kで3h真空排気した後、窒素雰囲気下で単位格子当たり約4分子の*p*NAを導入し、混合物の入った試料管を真空下で封じた。これを*p*NAの融点(419K)を考慮し、423Kで3日間、加熱処理することで吸着反応を進行させた。

ゼオライト、ニトロアニリン、ナノ空間、分子運動、固体NMR

こもりよしひこ、はやししげのぶ

固体NMR測定は Bruker ASX400 で行った。測定周波数は ^{13}C が 100.61 MHz、 ^{29}Si が 79.49 MHz で、外径 7 mm のジルコニア製ローターに試料を充填し、3.5 kHz で試料を回転させて測定した。

3. 実験結果・考察

^{29}Si MAS NMR スペクトルにおいて $p\text{NA}$ の反応前後で Si の Q^4 シグナルに変化が見られた。これは反応前後でゼオライト骨格に変化が起きたことを示しており、 $p\text{NA}$ 分子が細孔内に取り込まれたことが確認された。

Fig. 1(a)に Z5-1000Na に $p\text{NA}$ を吸着させた試料 (1000Na/ $p\text{NA}$) の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す。112、127、138、155 ppm のシグナルとそれらのスピニングサイドバンドが観察された。また 1000H/ $p\text{NA}$ でも同様なスペクトルが観察された。図中、ベンゼン環の b,c に帰属される 127、112 ppm のシグナルの線幅が広がっており、 ^1H デカップリングの R F 強度に相当する 50kHz 程度のベンゼン環の回転運動によると考えられた。

(P 1 1 6 参照) 一方、70Na/ $p\text{NA}$ のスペクトル(Fig.1b)では b, c だけでなく、a, d に帰属されるシグナルにおいても線幅の広がりが観察された。 $p\text{NA}$ 分子の吸着状態が一様でないことが推測され、細孔内に存在する Na イオンの影響と考えられる。70H/ $p\text{NA}$ (Fig. 1c)、25H/ $p\text{NA}$ のスペクトル

では $p\text{NA}$ に帰属される明確なシグナルは得られなかった。これは、この試料の ESR 測定により確認されたラジカルの生成が原因と考えられた。

4. まとめ

Si/Al 比やカチオンの種類の異なる ZSM-5 に $p\text{NA}$ を吸着させ、固体NMRを用いて分析した。その結果、Si/Al 比が変化すると細孔内に吸着した $p\text{NA}$ の状態が異なることが示唆された。また細孔内のカチオンの種類も $p\text{NA}$ に大きな影響を与えることがわかった。

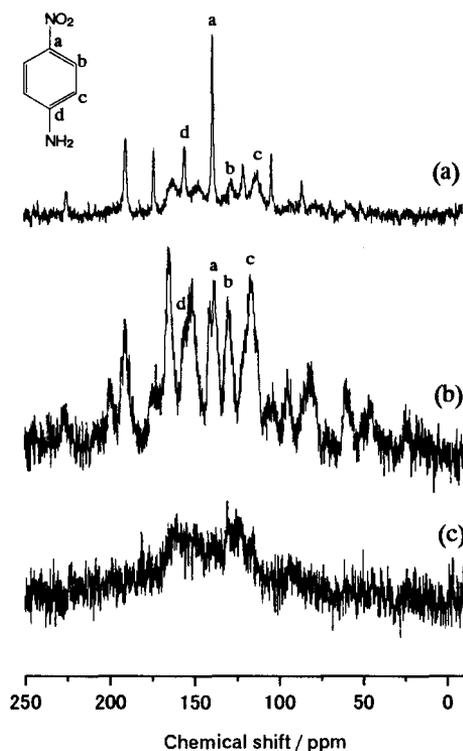


Figure 1. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (a) 1000Na/ $p\text{NA}$, (b) 70Na/ $p\text{NA}$ and (c) 70H/ $p\text{NA}$ at room temperature. The spinning rates were 3.5 kHz.

高Si/Al比ZSM-5ゼオライト細孔内における
p-ニトロアニリンの運動
 (物質研) 〇林 繁信、小森 佳彦

Dynamics of *p*-nitroaniline in the micropore of zeolite ZSM-5 with a high Si/Al ratio

(National Institute of Materials and Chemical Research) Shigenobu Hayashi and Yoshihiko Komori

Dynamics of *p*-nitroaniline (*p*-NA) guest molecules in zeolite ZSM-5 have been studied by means of solid-state NMR. ¹³C CP/MAS NMR spectra of *p*-NA incorporated in ZSM-5 show large line broadenings of the two C-H signals. These broadenings are temperature dependent and reversible. Thus, the broadening is related with molecular motions, probably the motion of the benzene ring because only the C-H signals are broadened. The frequency of the motion is of the order of 50 kHz, which is comparable to the strength of the ¹H decoupling field.

1. はじめに

ゼオライトは、多孔性の結晶性アルミノケイ酸塩であり、規則的な細孔構造をしている。ZSM-5型ゼオライトでは、直線状にのびた一次元チャンネルにジグザグにのびたチャンネルが交叉している。チャンネルは、酸素10員環からなり、その直径は約0.54 nmである。*p*-ニトロアニリン(*p*-NA)分子は直線状チャンネルに向きをそろえて配向することにより、結晶状態では示さない非線形光学特性を示すことが知られている。本研究では、固体NMR法を用いて、ゲスト分子の局所構造や運動について調べた。

2. 実験

ZSM-5は、触媒学会から配布されている参照触媒JRC-Z5-1000Na(Na型で公称Si₂O/Al₂O₃比が1000のZSM-5)を用いた。473 Kで14 h真空排気した後、乾燥窒素雰囲気下で単位格子あたり3分子の*p*-NA(和光純薬)を導入した。混合物の入った試料管を真空下で封じた後、423 Kで6日間加熱処理した。

固体NMR測定は、ブルカーASX400及びMSL400で行った。測定周波数は、²⁹Siが79.49 MHz、¹³Cが100.61 MHzである。外径7 mmのジルコニア製ローターに試料を充填し、3.5~5 kHzで試料を回転させてMAS(マジック角回転)スペクトルを測定した。

3. 結果及び考察

Fig. 1Aに室温で測定した*p*-NAの¹³C CP/MAS NMRスペクトルを示した。固体*p*-NAゼオライト、ニトロアニリン、ナノ空間、運動、¹³C CP/MAS NMR

はやししげのぶ、こもりよしひこ

は、テトラメチルシラン基準で 155.4 ppm (C(1)·NH₂)、136.3 ppm (C(4)·NO₂)、128.7 及び 127.7 ppm (C(3)·H と C(5)·H)、113.5 ppm (C(2)·H と C(6)·H) にシグナルを示した。他のピークはスピニングサイドバンドである。繰り返し時間を 7000 s と非常に長くとりないとシグナルが観測されない。これは、¹H のスピナー格子緩和時間が数千秒と非常に長いためであり、固体 *p*-NA では分子運動がほとんど凍結されていることがわかった。

Fig. 1B には、ZSM-5 細孔内の *p*-NA の室温でのスペクトルを示した。154.6、138.4、127、113 ppm にシグナルが観測された。固体 *p*-NA とはシグナル位置が

変化しており、分子のおかれる環境の変化を反映していると考えられる。また、繰り返し時間を 15 s と短く設定してもシグナルが観測されており、何らかの分子運動が存在して ¹H のスピナー格子緩和時間が短くなったものと推測される。Fig. 1B を Fig. 1A を比較した場合、もっとも顕著な違いは 127 及

び 113 ppm のシグナルの線幅が広がっていることである。いずれも C·H に帰属されるシグナルである。温度の上昇とともにこの線幅は狭くなった。室温に戻すとまた線幅が広くなり、温度に対して可逆的な変化を示した。このことは C·H シグナルの線幅の増大が *p*-NA 分子の運動に起因することを示している。ベンゼン環が室温で ¹H デカップリングの RF 強度に相当する 50 kHz 程度の速さで運動しているためと考えられる。

4. 結論

ZSM-5 の一次元チャンネル内での *p*-NA 分子の運動状態が固体 *p*-NA とは全く異なることを示した。C·H シグナル線幅の増大から、ベンゼン環が室温で 50 kHz 程度の速さで運動していると考えられる。

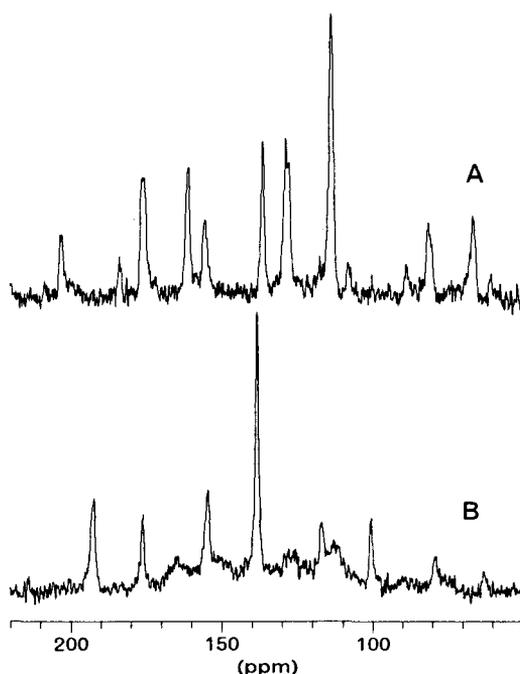


Fig. 1. ¹³C CP/MAS NMR spectra of (A) *p*-NA and (B) ZSM-5/*p*-NA at room temperature. The contact time was 1 ms, and the repetition times were (A) 7000 s and (B) 15 s. ¹H CW decoupling was applied. The spinning rates were (A) 4.8 kHz and (B) 3.8 kHz.

Modern Solid State NMR Methods in Catalysis Science

Subramanian Ganapathy

Solid State NMR Group, National Chemical Laboratory,
Pune 411 008, India

Two major areas of research in catalysis science are the synthesis of novel materials and their detailed characterization at the molecular level. The intricate relationship between the catalytic performance and the structural characteristics brings in new challenges in the development of analytical techniques. In our laboratory, there has been a continuing effort to introduce modern solid state NMR methods for a more effective characterization of catalytically important materials. We have addressed the problem of isomorphic heteroatom substitution and T-site ordering in the zeolite framework by monitoring and studying the disruption of tetrahedral symmetry through experimental determination and theoretical quantum chemical calculations of ^{29}Si shielding tensors. We have used ^{23}Na MQ-MAS and ^{29}Si - ^{23}Na REAPDOR experiments and cation modeling to study the cation site distribution and location in molecular sieves. This is demonstrated in the novel titanosilicate ETS-10. We have employed MQ- t_2 REDOR in ^{27}Al - ^{31}P and ^{27}Al - ^1H double resonance experiments to provide structural characterization of framework T-sites and acidic proton sites in molecular sieves. In heteropolyacids (HPA's), which are solid acids that have broad applications in catalysis, we have used ^1H - ^{31}P / ^{31}P - ^1H REDOR NMR, aided by Density Functional Theory (DFT) quantum chemical calculations, to determine the proton locations within the primary structure building and thermally stable Keggin unit of $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ and $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$. The presentation will focus on various experimental methods and how they have been used to address some basic structural issues in Catalysis Science.

Catalysis, MQ-MAS, REAPDOR, REDOR, Density Functional Theory

すぶらまにあん がなばしー

直流電場 NMR 装置の製作とリチウム二次電池材料測定への応用 (大工研, 神戸大自然科学¹, 日本電子²) ○片岡 弘, 齋藤 唯理亜, 境 哲男, 蔭山 博之, 出来 成人¹, 池田 武義²

APPLICATION OF ELECTROPHORETIC NMR TO CHARACTERIZATION OF MATERIALS FOR LITHIUM SECONDARY BATTERY

Hiroshi Kataoka, Yuria Saito, Tetsuo Sakai, Hiroyuki Kageyama, Shigehito Deki¹ and Takeyoshi Ikeda²

(Osaka National Research Institute, Kobe University¹, JEOL²)

Transport properties of lithium, anion group and nonaqueous solvents were investigated by electrophoretic NMR technique. The transference number of lithium ion in 1M LiN(CF₃SO₂)₂/EC/DEC electrolyte at 25°C was estimated as 0.34 ± 0.08 from the apparent mobilities of Li⁺ and N(CF₃SO₂)₂⁻, whereas 0.44 by the conventional self-diffusion coefficients. The difference clearly suggested that the electrophoretic NMR measurement could take out only the ionic information.

磁場勾配 NMR による拡散係数測定は等方的な液体に留まらず、コロイドや膜など異方性をもつ系など多岐に渡り応用されている。われわれもこれまで磁場勾配 NMR を用いてリチウムイオン二次電池に使用されているポリマーゲル電解質中でのリチウムイオンやカウンターアニオンの挙動を検討してきた[1]。しかしリチウム二次電池で用いられる電解液のリチウム塩濃度は通常 1M のオーダーであるため、観測される拡散係数はイオンとイオンペアの平均値となるので、材料開発において重要な指標となるリチウムイオンの輸率などの評価には必ずしも最適とはいえない。そこで今回、イオンのみの情報を選択的に取り出すため、直流電場 NMR[2,3]を用いた評価を試みた。これは直流電場を印加することによりイオンのみを選択的にドリフトさせて電気化学的情報を取り出すことが出来るため、イオン導電特性評価に有効な手法である。この手法はこれまで主に水溶液系[2]で行われており、非水溶媒系[3]での研究例はほとんどない。また観測核は ¹H, ⁷Li が主で、¹⁹F などの測定は行われていない。われわれは直流電場印加可能なリチウム用および水素・フッ素用の NMR プローブと電源を製作し、イミド系リチウム塩電解質中のリチウムイオンおよびアニオングループの易動度の測定を試みた。

キーワード 直流電場, 易動度, ⁷Li, ¹⁹F, ポリマーゲル電解質

かたおか ひろし, さいとう ゆりあ, さかい てつお, かげやま ひろゆき, でき しげひと, いけだ たけよし

測定は JEOL/ECP300W 分光器(共鳴周波数 ^1H 核 300.5MHz)を用いて 25°C にて行った. 通常の磁場勾配測定で得られるエコー強度 $M(2\tau) \propto \exp[-\gamma^2 g^2 \delta^2 D_s (4\Delta - \delta) \pi^{-2}]$ は電場を印加した場合

$$M_v(2\tau) \propto \cos(2\gamma g v \delta \Delta / \pi) M(2\tau) \quad (1)$$

と表される[4]. ここで γ : 観測核の磁気回転比, g : 磁場勾配強度, D_s : 自己拡散係数, δ : 磁場勾配パルス幅, Δ : 磁場勾配パルス間隔(拡散時間)である. 磁場勾配パルスはパルスの mismatch を避けるため矩形波ではなくサイン波を用いた. v はイオンの泳動速度であり, イオンが電場により泳動された場合は電場強度に比例する. 試料への電場印加は, 静磁場方向に設置した円筒型サンプルセル(直径 3.5-10mm, 電極断面積 0.10-0.28cm², 電極間距離 32mm)を用い, 電極-電極間での定電圧制御電源で行った. 試料の分解や分解を防ぐために電極極性を反転させながら測定した. 典型的な実験条件は, $g=62 (^7\text{Li}) / 17 (^1\text{H}, ^{19}\text{F}) \text{ Gauss cm}^{-1}$, $\delta=0\text{-}3\text{ms}$, $\Delta=1.5\text{s}$, 最大印加電圧 75V であった. 試料のポリマーゲル電解質は, リチウムイミド塩 $\text{LiN}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2$ の EC/DEC(v/v 2/3) 1M 溶液とポリフッ化ビニリデン(PVdF)-ヘキサフルオロプロピレン(HFP)を重量比 98:2 で混合し, キャスティング法により最終物を得た.

磁場勾配パルス幅の δ 変化によりエコーの強度変化が観測された. 同一条件下で測定を行い, (1)式から得られたリチウムイオンとアニオングループの見かけの易動度 $\mu_{\text{app}}(\text{Li}^+)$ と $\mu_{\text{app}}((\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-)$ を用いてリチウムイオンの輸率 $t(\text{Li}^+) = \mu_{\text{app}}(\text{Li}^+) / [\mu_{\text{app}}(\text{Li}^+) + \mu_{\text{app}}((\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-)]$ を評価した. その値 0.34 ± 0.08 は通常の自己拡散係数から評価した値 0.44 とは異なり, 拡散係数がイオンとイオンペアの平均値であることと定性的に一致しており, 電場印加でイオンのみの情報を取り出していることを示唆している. しかし今回は定電圧制御のため試料中の有効電圧は印加電圧と必ずしも一致していない. また見かけの電圧を上げていくと, 電場勾配が 30V/3.2cm 以上では理想的には観測されないはずの溶媒分子(EC,DEC)の変化も観測された. これらは発熱による対流や分解, あるいは解離度の変化などが考えられる. これらの点を明確にするため, 現在, 定電流制御下での挙動を検討中であり, 当日はそれらの結果もあわせて測定法および物性の議論を行う.

参考文献

- [1] Y. Saito et al., *J. Phys. Chem. B* **104**, (2000) 2189.
- [2] M. Holz, *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, 165.
- [3] H. Dai and A. Zawodzinski, Jr., *J. Electrochem. Soc.*, **143**, L107 (1996).
- [4] W. S. Price et al., *J. Magn. Reson.*, **139**, 205 (1999).

超臨界水用高温 NMR プローブの開発

(日本電子¹、日本電子データム²) ○ 池田武義¹、江口剛史¹、杉沢寿志¹、櫻井智司¹、藤戸輝明²

Development of High Temperature NMR Probe for Supercritical Water

(JEOL Ltd.¹, JEOL DATUM²) ○ Takeyoshi Ikeda¹, Takefumi Eguchi¹, Hisashi Sugisawa¹, Satoshi Sakurai¹, Teruaki Fujito²

The importance of supercritical fluids as reaction media is now increasing in environmental chemistry. NMR spectroscopy has proved to be the most powerful tool to study on solvation, dynamics behavior of molecules, and molecular structure. Then, the NMR system for supercritical fluids is becoming promised equipment. Last year, we reported the successful development of NMR sample tube for supercritical carbon dioxide. This year, we extend the NMR system to supercritical water region. From our previous experiment, we found that the most affective factor to spectral resolution in supercritical fluids was the temperature gradient. Therefore, our new probe for the supercritical water is so designed as to reduce the thermal gradient at high temperature (400 °C).

超臨界水用 NMR プローブの開発の目的

物質には気体、液体及び固体の3態がある事はよく知っているが、更に臨界点以上の温度、圧力(例えば水の場合、温度 373 °C以上、圧力 23MPa 以上)では、高密度に圧縮しても液化することのない流体相が存在する。この状態にある物質を超臨界流体という。超臨界流体は、気相と液相の間中間的な物性を持つ。一方 NMR 分光法は、これまで化合物の構造や性質、さらには化学反応における動的挙動解析の有力な手段として活用されており、超臨界流体中において溶解している化合物も、同様に観測できれば、超臨界流体中での化学反応や構造情報をえる強力な手段となる。

このような要求から当社では、超臨界流体用 NMR プローブ、サンプルチューブの開発を数年前から進めており、昨年は既存 NMR 装置をそのまま使用できる超臨界水流体用 NMR サンプルチューブの開発を行い、まず比較的容易に扱える超臨界二酸化炭素中の NMR 測定から始めた。一方我々の最終目標は超臨界水(温度 373 °C、圧力 23MPa)の NMR 測定である。それを実現するため、今年は超臨界水を対象とした、他核種観測用の超臨界流体用高温 NMR プローブ(試料管径 10mm φ)の開発を行った。

本プローブの開発のポイント

昨年の測定の経験から超臨界流体 NMR 測定上の一番の問題点は、試料管内の温度勾配によって生じる試料の対流であり、その影響でスペクトルの線巾が広がること等も判明した。

特に、今回開発目標とした、多核種観測型プローブの場合、感度を上げるために試料管の外径を 10 φとした点と、超臨界水をターゲットにするために温度を 400 °C以上と高温にしなければならぬ点があり、温度勾配がより大きくなる。従来型の構造では、それによって生じる対流による線幅の増大が顕著になると予想された。そこで、試料管内の温度勾配を低減するために、以下の対策を行った。

キーワード 高温 NMR プローブ 超臨界流体 超臨界水

いけだたけよし、えぐちたけふみ、すぎさわひさし、さくらいさとし、ふじとてるあき

- 試料の加熱方法は、従来どおりプローブ下部よりの熱風加熱方式であるが、熱風の経路の断熱の強化を可能な限りおこなった。
- プローブの上部に補助ヒータをとり付け、試料管の上部からも加熱し試料の温度勾配を改善する。その補助ヒータとしては非磁性の白金線を使用し無誘導巻きとし、補助ヒータを付加することによる悪影響を防いだ。

本超臨界水用 NMR プローブの主な仕様

試料管径	最大 10mm ϕ
主な測定核	^{31}P 、 ^{11}B 、 ^{13}C 、 ^{29}Si 、 ^2H 、 ^{17}O 及び ^1H (モニター可)
照射核	^1H 核
温度可変範囲	室温～ 400 $^{\circ}\text{C}$ 以上
標準使用試料管	外径 10mm ϕ 、内径 3mm ϕ のサファイヤ管 (耐圧 40MPa 以上)

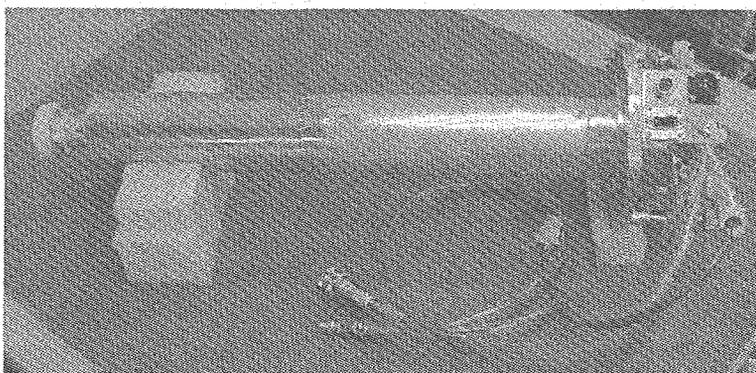


Fig1 High Temperature NMR Probe

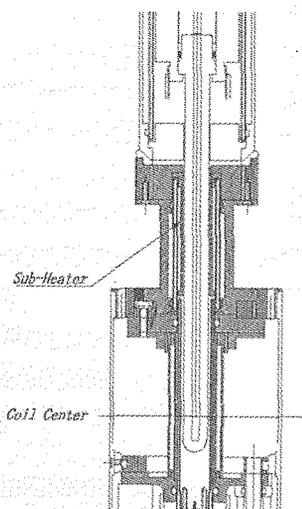


Fig3 Temperature Calib. Tool

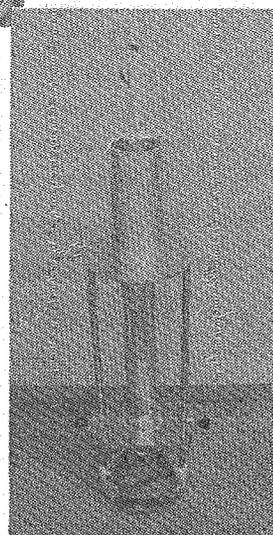


Fig2 Sub-Heater

参考文献 第 38 回 NMR 討論会講演要旨 超臨界流体用 NMR サンプルチューブの開発

MASスピナーの改良

(日本電子) ○樋岡克哉

Improvement of magic angle spinner
Katsuya Hioka, JEOL Ltd.

We reported to improve the air bearing system, giving careful consideration to the stator and the turbine of the conventional 6mm spinner, and we report the advanced air bearing system for 4mm spinner. Preventing the whirl phenomenon, we grooved inside the stator and improved the efficiency of rotation, the design of turbine is modified. With them, the higher speed spinning of 4mm magic angle spinner is achieved.

【はじめに】

固体高分解能NMRにはMAS法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を少なくし、高速回転を得るためには、非常に精密な空気軸受が要求される。そこで前回の6mmMASスピナーの報告に続き¹⁾、ステータの構造の改良、タービンの検討をした4mmMASスピナーを作成したので、その結果を報告する。

【理論的背景】

空気軸受 空気軸受(エアベアリング)は、ロータとステータの狭い隙間(クリアランス)に、給気孔から圧縮空気を送り込むことで、ロータを保持する。この保持力は、狭い隙間を粘性のある流体が高速で流れることによって発生する。空気は、油などに比べると粘性が小さいため、ロータを保持する力は小さいが、同時に適切な保持力で高速で安定な回転が得られるという特長がある。

ロータに作用する遠心力 ロータに作用する遠心力によって、円周方向の引張り応力が生じる。引張り応力がロータの素材の強度を超えると破壊してしまう。遠心力は、ロータの密度と回転速度の2乗に比例する。高速回転でも破壊しないためには、高強度で密度の小さな素材を選択する必要がある。

回転方向に作用する力 ロータの回転方向に作用する力は、タービンに加わるエアジェットによる力と、ステータとロータの隙間の空気の粘性による抵抗の2つである。先細ノズルのエアジェットの速度はほぼ音速で一定なので²⁾、エアジェットの運動量は、密度つまり圧力に比例する。また、タービンに作用する力は、エアジェットとタービンの速度差に比例する。粘性による抵抗は、回転速度に比例する。回転速度は、これらのタービンに作用する力と粘性による抵抗力の釣り合いによって決まる。高速回転を得るためには、粘性による抵抗を小さくし、エアジェットの力を大きくするとともに、

キーワード: MAS、空気軸受

ひおか かつや

タービンの効率が良いことが重要である。

振れ回り(Whirl) ロータがステータ内部で偏心した場合、好ましい反応は、ロータが中心に押し戻されることである。ところが、ロータが高速で回転していると、回転によって空気が狭い隙間に巻き込まれ、圧力分布が非対称になり、ロータが中心から外れた位置に戻るようになる。その結果、ロータの重心が回転を始める。この現象を「振れ回り」(Whirl)と呼ぶ。振れ回りが発生すると、ロータがステータと接触し、摩擦熱で焼付いたり、機械的変形や衝撃で破壊する。高速回転を実現するためには、「振れ回り」の発生を抑えることが非常に重要である。「振れ回り」の発生を防ぐためには、①空気の巻き込みを少なくする、②ロータの慣性を小さくする(中心への復元が早い)などの対処が特に重要である。

【設計】

前回の報告では、従来の直径6mmMASスピナーのステータとロータの材質に考察・改良を加えることによって、最高回転速度13.5krpsを達成したことを報告した。今回の実験では、ロータの直径を4mmとし、タービンの形状にも検討を加えた。

軸受の構造 前述の理論的背景をふまえて、ステータを設計した。軸受の抵抗を小さくするために、給気孔部分以外は軸受を無くし、有効な軸受面積を大幅に減らした。振れ回りの発生を抑えるために、ステータ内部に空気の巻き込みを防止する溝を設けた。

ロータの材質の選択 高速回転による遠心力による変形や破壊を防ぐために、前回の実験同様に、機械強度特性に優れた窒化ケイ素を用いた。

タービンの形状 タービンを効率よく回転させるためには、エアジェットからタービンへの運動量の伝達効率を上げることが必要である。そのためには、エアジェットがタービンに接触する時間を長くなるようにすれば良く、タービンの羽根の形状を最適化する必要がある。

ステータ・ロータ・タービンの形状の詳しい形状については、ポスターで説明する。

【実験】

前述の設計に基づくステータとロータを用いた4mmMASスピナーを製作した。軸受エアの圧力を一定に保ちながら、ドライブエアの圧力を変化させて回転速度を計測した。タービンの形状による回転効率の違い、エアジェットとタービンの関係による回転効率の違いを計測した。

実験結果については、ポスターで詳しく説明する。

【まとめ】

MASスピナーの空気軸受において、ステータの内面の構造の工夫、ロータの材質の選択、タービンの形状に考察・改良を加えたことによって、回転速度の向上が図られた。

参考文献

- 1) 樋岡克哉、第38回NMR討論会要旨集、p298(1999)
- 2) 岩本順二郎、圧縮性・粘性流体力学、東京電気大学出版局、p22(1987)

化合物半導体を用いた高感度前置増幅器の ^{13}C 観測への応用
(日本電子)○松倉順一、末松浩人

Ultra Low Noise Preamplifiers for the detection of ^{13}C
(JEOL LTD.)○Junichi Matsukura, Hiroto Suematsu

Ultra-low noise preamplifiers using GaAs HEMT technology have been developed to observe NMR signals for the use of spectrometers from 300MHz to 800MHz(1)(2).

This technology has been applied to the detection of ^{13}C signals at 500MHz and 600MHz field, and preamplifiers with noise figures of 0.2dB~0.4dB for those frequencies have been obtained.

我々は 300MHz から 800MHz までの NMR 装置に於て 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 500,600MHz NMR における ^{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。本前置増幅器を使用することにより、従来に比べ ^{13}C 感度は 600MHz 装置において 30%前後改善し、500MHz 装置では 20%前後改善された。本前置増幅器を使用した 800MHz,600MHz,500MHz NMR における ^{13}C 感度(ASTM)をそれぞれ[Fig.1][Fig.2][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。

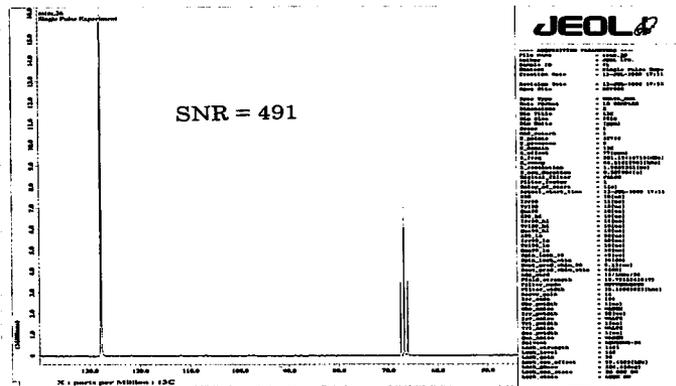
参考文献

(1) 末松, 栗原, 第 37 回 NMR 討論会要旨 (1998)

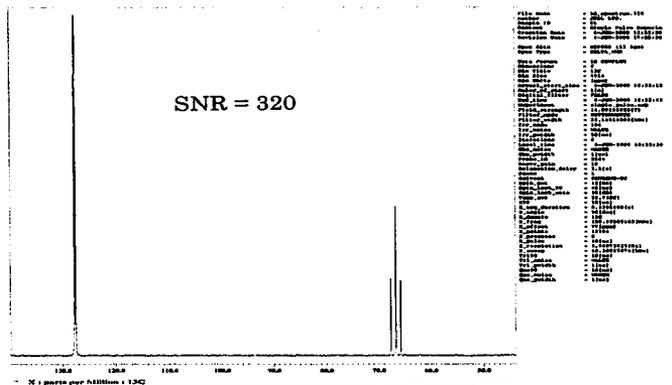
(2) 末松, 栗原, 第 38 回 NMR 討論会要旨 (1999)

^{13}C 、感度、化合物半導体、前置増幅器

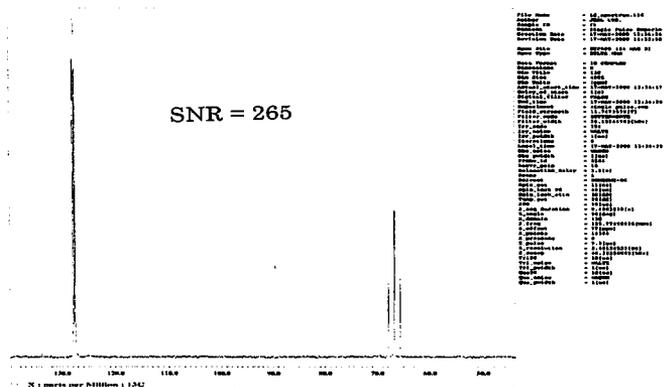
まつくら じゅんいち、すえまつ ひろと



[Fig.1] ^{13}C sensitivity at 800MHz with tunable FG probe



[Fig.2] ^{13}C sensitivity at 600MHz with tunable FG probe



[Fig.3] ^{13}C sensitivity at 500MHz with tunable FG probe

有機ゲルマニウム化合物の固体高分解能 ^{73}Ge NMR スペクトルの観測
(神奈川大理・工) ○西川実希、竹内敬人、田中克己、高山俊夫

High-resolution Solid-state Ge-73 NMR of Some Organogermanium Compounds

Miki Nishikawa, Yoshito Takeuchi, Katsumi Tanaka, Toshiro Takayama

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University

As compared with nuclei with $I = 1/2$, the magnetic resonance of ^{73}Ge has been much less studied chiefly because observation of ^{73}Ge resonance is generally difficult because of its low value of gyromagnetic ratio, and nuclear spin of $-9/2$ with a large quadrupolar moment. Such tend to cause excessive broadening of ^{73}Ge signals, and hence the observation of ^{73}Ge resonances in the solid-state would be even more difficult. To the best of our knowledge, there have been no reports on ^{73}Ge signals of organogermanium compounds in the solid-state. Here we report the observation of the ^{73}Ge NMR signals of some organogermanes in the solid-state. The resonances from germanium nuclei in solid-state were recorded using magic angle spinning.

比較的最近まで、 ^{73}Ge NMR の研究は、他の 14 族元素、炭素 (^{13}C)、ケイ素 (^{29}Si) さらにはスズ (^{119}Sn) や鉛 (^{207}Pb) と比較してかなり限られていた。これには、測定上の困難のみならず、有機ケイ素、有機スズ、有機鉛化合物には、実用的な用途があるため、工業規模で製造されるのに対し、有機ゲルマニウム化合物には、そのような実用的な用途が知られていなかったという背景がある。しかし、近年の有機ゲルマニウム化学の発展に伴い、分析手段として ^{73}Ge NMR の果たす役割も大きくなった。

^{73}Ge 核は、核スピンの大きな四極子核 ($I = 9/2$) であり、さらに共鳴周波数が非常に低いため、NMR の観測が困難な核である。固体 ^{73}Ge NMR は、著しく線幅の広いスペクトルを与えることが予想され、これまで報告例はない。そこで我々は、固体高分解能 ^{73}Ge NMR 法の開拓を目指して研究を行った。今回は、最初の試みとして、いくつかの有機ゲルマニウム誘導体を試料として、MAS ^{73}Ge NMR スペクトルの観測結果を報告する。

本研究で使用した核磁気共鳴装置は、日本電子社製 ECP 300 で、低周波用 MAS プロブの改良型を用いた。MAS (マジック角回転) を行いながら、シングルパルスで励起して観測を行った。

キーワード：固体 ^{73}Ge -NMR、有機ゲルマニウム化学、マジック角回転

著者ふりがな：にしかわみき、たけうちよしと、たなかかつみ、たかやまとしお

ゲルマニウム原子の周りが対称に置換された化合物においては、固体状態における ^{73}Ge 核の共鳴線が、いずれも一重線として観測された (Figure 1, Table 1)。観測された共鳴線は、 $1/2 \rightarrow -1/2$ の遷移に基づく、いわゆる中央遷移であると考えられる。

これらの共鳴線の半値幅には、著しい差が観測された。この事実は、ゲルマニウム原子の周りの対称性のわずかな差に起因すると推定される。すなわち、 Ph_4Ge および $(\text{C}_6\text{F}_5)_4\text{Ge}$ は、完全な S_4 対称分子であるのに対し、他の化合物は近似的な S_4 対称であるが結合長あるいは結合角にわずかに違いがある。

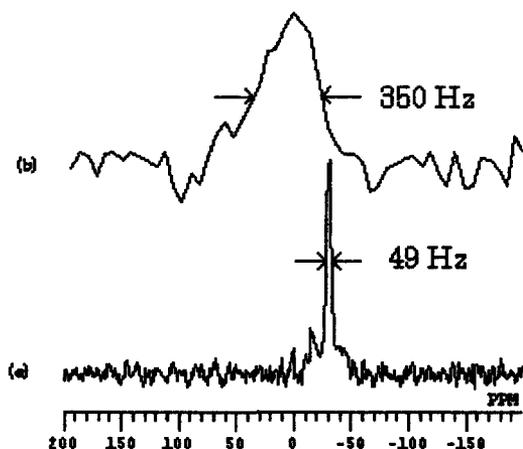


Figure 1. Solid-state high resolution ^{73}Ge NMR spectra of Ph_4Ge (a) and $(\text{PhCH}_2)_4\text{Ge}$ (b).

Table 1. ^{73}Ge NMR Chemical Shifts and Half Width

compounds	Solid-state		Solution (CDCl_3)	
	chemical shift (ppm)	Half width (Hz)	Chemical shift (ppm)	Half width (Hz)
Ph_4Ge	-31.0	49	-32.6	6.0
$(\text{C}_6\text{F}_5)_4\text{Ge}$	-22.0	225	-27.8	12.7
$(\sigma\text{-Tol})_4\text{Ge}$	-28.2	342	-33.1	18.5
$(m\text{-Tol})_4\text{Ge}$	-32.2	391	-32.9	11.4
$(p\text{-Tol})_4\text{Ge}$	-32.4	400	-31.6	11.3
$(\text{PhCH}_2)_4\text{Ge}$	-0.6	350	-0.04	24.0

in situ パラ水素信号増強 NMR 法を用いた
RhCl(CO)(PPh₃)₂ の水素化反応の研究

(阪大院理) ○ 高橋 信幸・増井 大二・上田 貴洋・中村 亘男

Para-Hydrogen Induced Polarization NMR Study of
Hydrogenation of RhCl(CO)(PPh₃)₂

N. Takahashi, H. Masui, T. Ueda and N. Nakamura

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University

A small amount of new binuclear hydride complex [(PPh₃)₂ClHRh(μ-Cl)(μ-H)Rh(CO)(PPh₃)] in the hydrogenation reaction of RhCl(CO)(PPh₃)₂ was detected by means of *para*-hydrogen induced polarization NMR method. This method was also used to examine the intermolecular chemical exchange process in the main product [H₂Rh(PPh₃)₂(μ-Cl)₂Rh(CO)(PPh₃)]. Simulation of PHIP spectrum at various temperatures by a mutual two-site exchange led to accurate activation energy $E_a = 64.4 \pm 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$.

【序論】

RhCl(CO)(PPh₃)₂ を水素化すると、ヒドリド錯体が生成するが、ふつうの水素を使って水素化するとその NMR 信号は観測できない。しかし、パラ水素信号増強(PHIP) NMR 法^{1,2} を使うと信号強度が数千倍に増強されるため、非常に低濃度のロジウム二核ヒドリド錯体[H₂Rh(PPh₃)₂(μ-Cl)₂Rh(CO)(PPh₃)]でも検出できる。この錯体では、PHIP 2D-Exchange Spectroscopy NMR の温度変化の測定によって、分子内化学交換過程の活性化エネルギー $E_a = 56 \pm 9 \text{ kJ mol}^{-1}$ が得られている^{3,4}。本研究では、この交換過程を PHIP NMR で詳細に追跡し、化学交換による線形変化のシミュレーションを行い、精確な活性化エネルギーを決定した。また、これまで検出されていなかったヒドリド錯体の信号も観測し、反応過程に関して新たな知見を得た。

【実験】

RhCl(CO)(PPh₃)₂ は、市販品(和光純薬工業株式会社)を用いた。Aldrich の重水素化ベンゼン(C₆D₆)をモレキュラーシーブス(3A, 和光純薬工業株式会社)で脱水し、溶媒として使用した。反応溶液は、真空ラインで準備し、脱気した。約 2 atm の水素を Fe₂O₃ といっしょに液体窒素温度まで冷やしてパラ水素の比率を上げた。試料溶液を凍結させた NMR 試料管に水素ガスを吹き込み、測定直前に解凍したのち、すぐにプローブに挿入して *in situ* NMR 測定を行った。

JEOL JMR-EX270 (¹H Larmor frequency of 270.158 MHz)を用い、45° パルス(5.4 μs)で ¹H-NMR を観測した。積算回数は、図 1(a)が 256 回で、その他は 8 回であった。化学シフトは、C₆D₆ の残留プロトンの値(δ = 7.15 ppm)を基準とした。測定温度は、分光器付属のコントローラーで 0.5 °C 以内に制御した。脱水したエチレングリコールで温度を校正した。

Key word : *para*-Hydrogen induced polarization · hydrogenation · hydride · simulation · chemical exchange

たかはし のぶゆき・ますい ひろつぐ・うえだ たかひろ・なかむら のぶお

【結果と考察】

図 1(a)に、348 K で測定した $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。化学シフトが -19.5 ppm 付近の信号が $[\text{H}_2\text{Rh}(\text{PPh}_3)_2(\mu\text{-Cl})_2\text{Rh}(\text{CO})(\text{PPh}_3)]$ に帰属されている。この信号の線幅が広がっているのは、化学交換過程によるものである。 -16.3 ppm と -14.3 ppm 付近の信号は、未知のヒドリド錯体に帰属され、348 K 以下では観測できなかった。この錯体について、NMR シミュレーションで解析した結果を図 1(b)に示す。分裂の本数と化学シフトの位置からこの錯体を $[(\text{PPh}_3)_2\text{ClHRh}(\mu\text{-Cl})(\mu\text{-H})\text{Rh}(\text{CO})(\text{PPh}_3)]$ と同定した。このような塩素原子と水素原子の二つで架橋される錯体としては、類似の $\text{RhCl}(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2$ の水素化反応において生成する $[(\text{PMe}_3)_2\text{ClHRh}(\mu\text{-Cl})(\mu\text{-H})\text{Rh}(\text{CO})(\text{PMe}_3)]$ があるが⁵⁻⁶、 $\text{RhCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2$ の水素化でこの型の二核錯体が観測されたのは今回が初めてである。結局、Scheme 1 に示してある経路で $\text{RhCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2$ の水素化が進むと考えられる。

図 2 の左側に各温度で観測した $[\text{H}_2\text{Rh}(\text{PPh}_3)_2(\mu\text{-Cl})_2\text{Rh}(\text{CO})(\text{PPh}_3)]$ のスペクトルを示す。このスペクトルは、298 K 以上で観測され、温度上昇とともに分子内化学交換によって線形が変化する。この化学交換過程を NMR シミュレーション⁷⁻⁹ で定量的に解析した。解析に用いたモデルは、Scheme 2 の上に示した 5 スピン系である。化学交換は、二つのヒドリド配位子間の 2 サイトで起こると仮定した。結果を図 2 の右側に示す。シミュレーションから求めた交換速度の温度変化から Arrhenius 活性化過程を仮定して、活性化エネルギー $E_a = 64.4 \pm 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ を決定した。この値は、既に報告されている値よりも、ずっと精度が高い。また、 $^1\text{H-NMR}$ からは、Scheme 2 における A と B の交換過程を区別できないけれども、この活性化エネルギーの大きさから B の交換が起こっていると考えられる。

【参考文献】

- [1] J. Natterer, and J. Bargon, *Prog. NMR. Spectro.*, **31**, 293(1997).
- [2] S. B. Duckett, and C. J. Sleight, *Prog. NMR. Spectro.*, **34**, 71(1999).
- [3] S. B. Duckett, and R. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 5292(1993).
- [4] P. D. Morran, S. B. Duckett, P. R. Howe, J. E. McGray, S. A. Colebrooke, R. Eisenberg, M. G. Partridge, and J. A. B. Lohman, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3949(1999).
- [5] S. B. Duckett, R. Eisenberg, and A. S. Goldman, *Chem. Commun.*, 1185(1993).
- [6] P. D. Morran, S. A. Colebrooke, S. B. Duckett, J. A. B. Lohman, and R. Eisenberg, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3363(1998).
- [7] Smith, S.A.; Levante, T. O.; Meier, B. H.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson., Ser. A.*, **106**, 75(1994).
- [8] P. D. Buckley, K. W. Jolley, and D. N. Pinder, *Prog. NMR. Spectro.*, **10**, 1(1975).
- [9] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Oxford Science Publications, 1987.

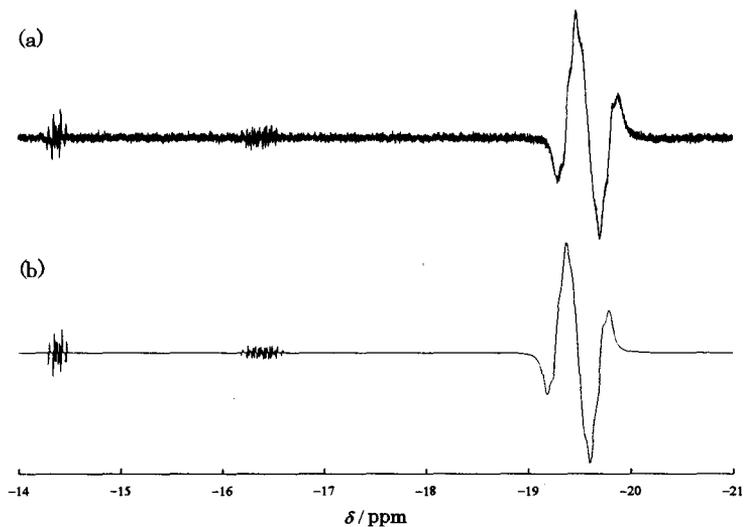
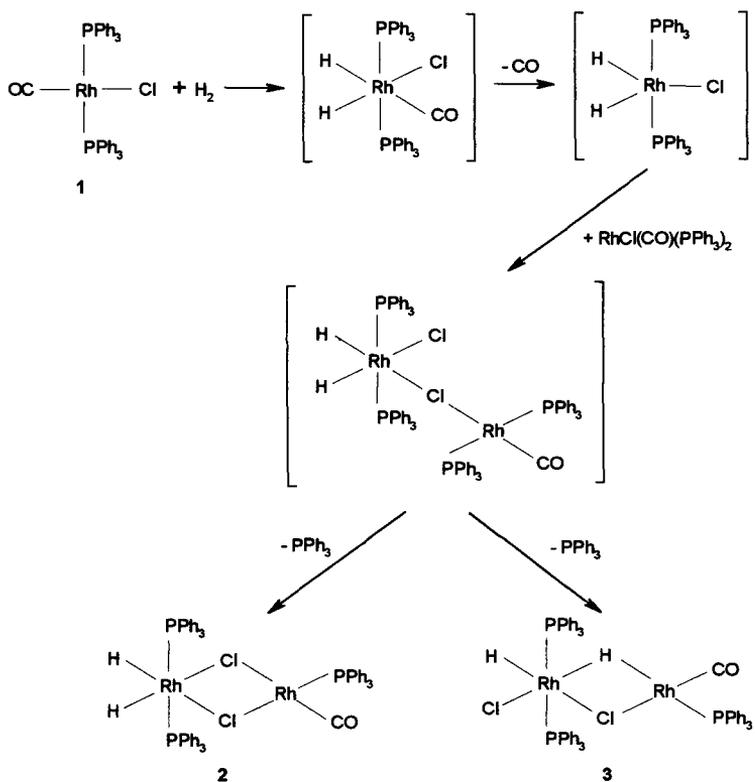


Figure 1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of binuclear dihydride complexes. (a) experimental spectrum at 348 K. (b) simulated spectrum.



Scheme 1.

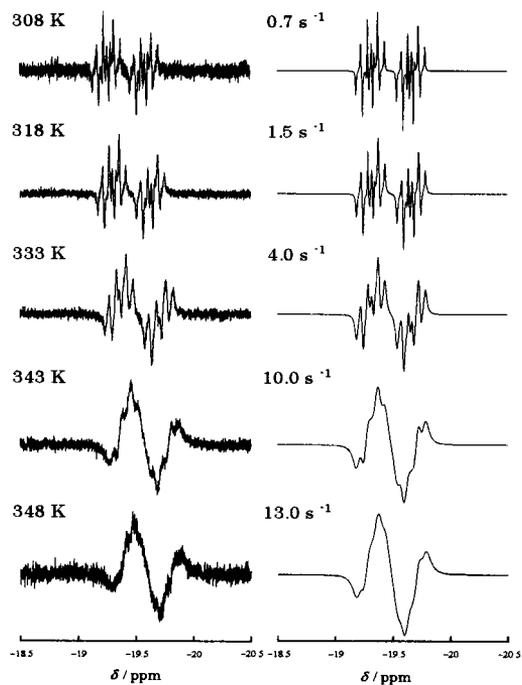
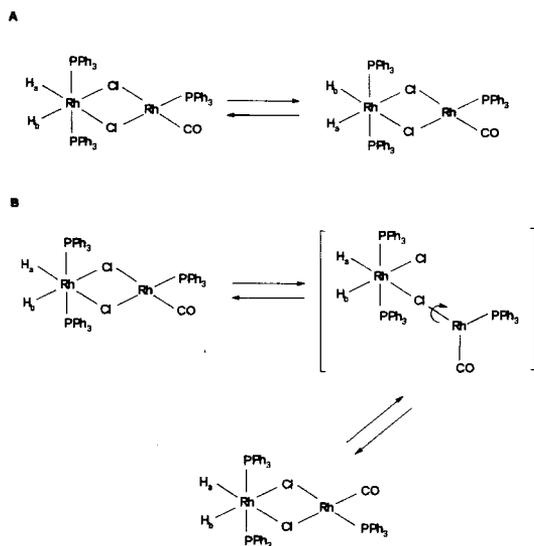
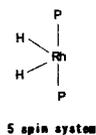


Figure 2. ^1H -NMR spectrum of the binuclear complex **2**.
Left: experimental spectrum. Right: simulated spectrum.



Scheme 2.

琵琶湖湖底堆積物中の有機物質、鉱物、リン物質の
固体NMR法を用いての成分解析

(神奈川大工) ○高山 俊夫、佐藤 祐一 (岡山大資生研) 中島 進

Characterization of organic matters, minerals, and phosphorus species in the bottom sediment of Lake Biwa by solid state NMR

T. Takayama, Y. Sato and S. Nakashima*

Dept. Appl. Chem., Kanagawa Univ., *Res. Inst. Biores., Okayama Univ.

To clarify the geochemical and environmental behavior of the high manganese content of sediment point 5 in Lake Biwa which S. Nakashima previously made a report, some samples of five sediment points (1~5) and two sediment core parts (4cm depth at 2cm intervals: L1~L3 and 6cm depth at 2cm intervals: H2~H4) were collected from the northern and southern parts of the lake. The organic matters, minerals and phosphorus species in the bottom sediment were analyzed by the solid state ¹³-C, ²⁷-Al, ²⁹-Si, and ³¹-P NMR.

After all, we presumed that the organic matters and minerals play an important role in enrichment of manganese content in the sediment point 5 of Lake Biwa.

1. はじめに

琵琶湖は日本一の湖面積を有し、水深も北湖の湖心部では60~104m (琵琶湖北湖の平均深度41m) ときわめて深く、湖底の堆積物が、過去から現在に至る間のその湖の状態の変遷を反映しているとみなされる。近年、琵琶湖の周囲の著しい都市化や人間活動に伴って排出される窒素やリンによる湖水の富栄養化現象と共に、湖水や堆積物の汚染が懸念されており、湖底堆積物に関する研究が広範囲に渡って行なわれることが最も要求される湖の一つである。

著者の一人(中島)はすでに琵琶湖堆積物中の重金属元素の分布及蓄積挙動に関して詳しい考察を加えているが堆積物中の重金属元素がどのようなスカベンジャー(除掃担体)と結合しているのかの解明を今後の課題とした¹⁾。

そこで、著者等は琵琶湖湖底堆積物中の表層堆積物及び柱状堆積物の有機物質、鉱物、リン物質成分を化学的処理を行うことなく直接的に明らかにする目的で、¹³-C, ²⁷-Al, ²⁹-Si, and ³¹-P 固体NMR測定を行った。そして、その成分と湖底堆積物の重金属元素(特にマンガン)の分布との相関を検討した。

2. 試料および固体NMR測定

2.1) 試料

実験に用いた琵琶湖の柱状堆積物および表層堆積物の採取地点をFig.1に示した。

キ-ワード : 琵琶湖湖底堆積物、有機物質、鉱物、リン物質、固体NMR法

○たかやまとしお、さとうゆういち、なかしますすむ

2.2 固体NMR測定

天然存在の ^{13}C , ^{27}Al , ^{29}Si , ^{31}P /MAS NMRスペクトルの測定はJEOL EX270WB 装置を用いて行なった。 ^{27}Al , ^{29}Si , ^{31}P 核の測定は該当核がプロトンと結合していないことが予想されたので、近くに存在する非結合プロトンを照射したシングルパルス法にて測定した(GHDMAS)。その核照射はそれぞれ30~45度パルスで、繰り返し時間は10~15秒(堆積物中には重金属元素として常磁性の鉄やマンガン等が含まれているために常磁性緩和のため繰り返し時間を長くとる必要がなかった。 ^{27}Al は四極子核なので四極子緩和を更に伴うのでもっと短い5秒とした)とした。 ^{13}C 核は通常のCP/MAS法で行なった。基準は各々 ^{13}C (TMS: $\delta=0.0$), ^{27}Al (Al(6): $\delta=0.0$), ^{29}Si (TMS: $\delta=0.0$), ^{31}P (H_3PO_4 : $\delta=0.0$)に換算した。NMRスペクトルの線型分離は、ロ-レンツ型(Lorentzian)、ガウス(Gaussian)、およびその混合型(Mix)の基本波型の重ね合わせによって近似し、非線形最小二乗法を用いてピーク位置、ピーク強度および半値幅を最適化するプログラムを用いた。

3. 結果および考察

3.1 湖底有機物質成分

琵琶湖湖底堆積物中の重金属元素の分布及蓄積挙動の違いが堆積物中の有機物によって異なるのかを見るために湖底堆積物の有機物の成分の検討を行った。表層堆積物の採取地点2の ^{13}C CP/MASNMR線型解析スペクトル(混合型)の各ピークの計算結果(化学シフト、半値幅、面積比)をFig.2に示す。全部で8個のピークに分離した分離波型の合成波型が観測波型をかなり良く表示していることがその差分波型より分かった。土壌有機物の芳香族性の指標と見なせる、COOHのCを除いた式:

$$f_{a2} = \frac{\text{芳香族ピーク範囲}(110-160\text{ppm})}{\text{全ピーク範囲}-\text{COOHピーク範囲}(160-190\text{ppm})} \times 100 (\%)$$

から求めた湖底堆積物中の芳香族性と非芳香族性の割合をTab.1に示す。採取地点5での非芳香族性は54%と最も大きな値であった。中島らの化学分析の結果¹⁾、地点5ではマンガンの含有率が他の地点より異常に大きい値(14100 mgL⁻¹)であった。これは地点5では湖水中に存在するマンガン(II)が水和酸化物に変わったり、粘土鉱物、有機物や鉄・マンガ水和酸化物に吸着、共沈して湖底に沈降し堆積物中に取り込まれる量が他の地点より多いと中島は考察していた。 ^{13}C 固体NMRの結果からもこの地点では炭化水素成分(例えば糖質等)が多く存在し、重金属元素(この場合、マンガン)の水和酸化物を吸着していることと傾向が一致していた。

3.2 湖底鉱物質成分

湖底の堆積物が粘土鉱物組織であるか、一次鉱物組織であるかは堆積物をスカベンジャーとして考えるときに非常に重要なファクターとなる。鉱物成分の同定は固体 ^{27}Al , ^{29}Si NMRにより、1) Al(4), Al(6)の存在の証明, 2) Al(4)/Al(6)比の決定, 3) Si原子周囲の微細配位構造の決定など、より詳細な構造を決定することが可能となる。

3.2.1 アルミニウム成分

採取地点2の ^{27}Al -GHDMAS線型解析スペクトル(混合型)を各ピークの計算結果(化学シフト、半値幅、面積比)とともにFig.3に示す。Al(4)、Al(6)のピークはそれぞれ化学シフト異方性が大きいために、スピニングサイドバンド(SSB)が見られた。Al(4)とAl(6)との定量

性を議論する場合は全てのSSBを線型分離した強度面積を合計して比較する必要がある。各地点でのAl(4)に相当するピークと、Al(6)に相当するピークの強度を加えた値の強度比をTab.2に示した。1:1層の粘土質であればAl(4): Al(6)=1:1, 2:1層であればAl(4): Al(6)=2:1である。Tab.2によれば、地点5ではAl(4)/Al(6)の値が各採取地点のうち最も大きな1.3を示していた。このことは2:1層の割合が多く存在していることを示している。2:1層は層電荷によって層間に陽イオンを引き付ける傾向がある。すなわち、その層電荷によって琵琶湖湖底堆積物中の重金属イオンが多く引き付けられていると考えられる。そのことが化学分析の結果の地点5での重金属元素(特にマンガン成分)が他の地点より多いことと相関があるように思われる。

3.2.2 ケイ素成分

湖底堆積物のケイ素成分をみるために²⁹SiNMR測定を行った。そのスペクトルから、アルミニウム成分を含まない鉱物質であるQ₄テクトケイ酸塩SiO₄⁻⁰Al成分とそれ以外の成分とを見較べた。各採取地点の²⁹Si-GHDMASスペクトルをFig.4に示す。このスペクトルはNMRプローブからのバックグラウンド(BG)を引いた差スペクトルである。各スペクトルは大きく2つの幅広いピーク約-95ppmと約-105ppmに集約された。これらの2つのピークから大雑把にいて-95ppm付近では縮重度Q₃、-105ppmではQ₄成分が多いといえる。Q₄テクトケイ酸塩SiO₄⁻⁰Al成分(-102~-114ppm)の多い地点は4, 5, L1, L2, H2, H3であり北湖にQ₄テクトケイ酸塩SiO₄⁻⁰Al成分が多いことを示している。これは琵琶湖湖底水が比重の小さい粘土鉱物質を南湖に移動させ、北湖にQ₄テクトケイ酸塩SiO₄⁻⁰Al成分の多い鉱物が残ったと考えられる。

3.2.3 リン成分

琵琶湖湖底堆積物中のリン化合物の成分の検討を行なうことは湖水の富栄養化現象の解明に重要である。分別クロマト法によって分けた土壌中のリン成分の分析をCondon²⁾は固体³¹P-NMR法で行った。その結果、土壌中のリン成分は無機リン(δ=6.28~5.3)、リン酸モノエステル(δ=5.3~3.5)、リン酸ジエステル(δ=0.0~-0.8)、ピロリン酸(δ=-4.39~-5.5)、ポリリン酸(δ=-18~-19)に分離した。

我々は分別クロマト分析を行なうことなく琵琶湖湖底堆積物そのままの状態直接固体³¹P-NMR測定を行うことによってリン成分の分析を試みた。³¹P核は自然含有率100%なので検出容易な核であるが、スペクトルのS/Nを良くするために積算を約12,000回必要としたことから、この堆積中に占めるリン成分の割合は微量であることを示している。リン成分が湖底堆積物として取り込まれるよりも湖水中に溶出しやすい形態で存在していることを示す。このことは湖水の富栄養化現象として深刻な問題と思われる。

各採取地点の³¹P-GHDMASNMRスペクトルをFig.4に示した。各地点でのスペクトルから混合型で分離した各リン成分の結果をTab.3に示す。リン酸モノエステルとリン酸ジエステルの合計である有機リン化合物は地点3(86%)、4(84%)そしてH3(72%)が多く、この地点はほとんど有機リン成分であることが分かった。無機リン(PO₄³⁻)の最も多い地点H4は鉱物成分のうちAl(4)成分が最も少ない地点であり、鉱物成分のAl(4)と無機リンが置換し、リン鉱物成分が多くなっていることと矛盾しない。

1) 中島 進・森井ふじ: 農学研究, **59**, 189(1982). 2) L.M. Condon, E. Frossard, H. Tiessen, R.H. Newman and J.W.B. Steward, *J. Soil Science.*, **41**, 41-50(1990).



Fig.1 The Collected Points of Five Bottom Sediments and two Sediment Core Parts in Lake Biwa.

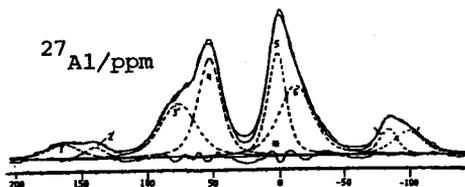


Fig.3 ²⁷Al-GHDMAS NMR Spectrum and the Line- Convolutions at the Sediment Point 2 of Lake Biwa.

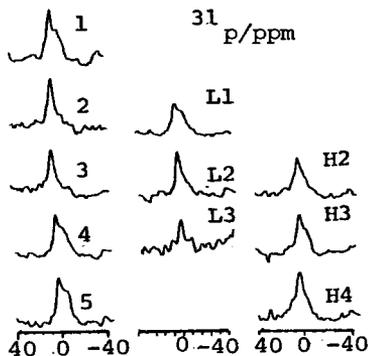


Fig.5 ³¹P-GHDMAS NMR Spectra of the Bottom Sediment of Lake Biwa.

Tab.2 Al(4) and Al(6) Species in the Bottom Sediment of Lake Biwa(%).

地点番号	Al(4)	Al(6)	Al(4)/Al(6)
1	52	48	1.1
2	55	45	1.2
3	56	44	1.3
4	52	48	1.1
5	57	43	1.3
L 1	55	45	1.2
L 2	56	44	1.3
L 3	50	50	1.0
H 2	50	50	1.0
H 3	51	49	1.0
H 4	47	53	0.9
平均	53	47	1.1

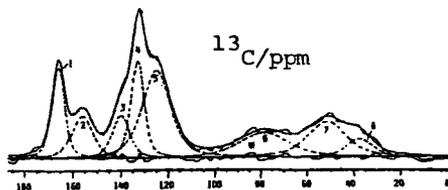


Fig.2 ¹³C-CPMAS NMR Spectrum and the Line- Convolutions at the Sediment Point 2 of Lake Biwa.

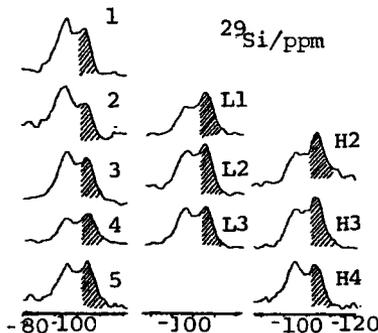


Fig.4 ²⁹Si-GHDMAS NMR Spectra of the Bottom Sediment of Lake Biwa. "////" means Q₄SiO₄-⁹Al.

Tab.1 Aromatic and Non-aromatic Compounds in the Bottom Sediment of Lake Biwa(%).

地点番号	芳香族	非芳香族
1	58	42
2	62	38
3	63	37
4	51	49
5	46	54
L 1	64	36
L 2	64	36
L 3	65	35
H 2	52	48
H 3	50	50
H 4	51	49
平均	57	43

L n, H n : 表層より2 × (n-1) (cm) の垂直部分

Tab.3 Organic- and inorganic Phosphorus Species in the Bottom Sediment of Lake Biwa.

地点番号	無機リン	リン酸モノエステル	リン酸ジエステル	ピロリン酸	ポリリン酸
1	11	28	18	42	1
2	17	28	7	41	8
3	0	75	11	5	9
4	7	65	19	8	2
5	7	44	15	22	13
L 1	12	21	19	45	3
L 2	8	33	16	39	4
L 3*
H 2	12	47	10	28	3
H 3	5	34	18	19	5
H 4	27	43	14	15	1
平均	11	44	15	26	5

*S/N不良

構造解析における LC-MS/NMR の応用

(日本電子) ○藤本 孝子・藤井 直之・森田 徹一郎・高橋 豊・樋口 哲夫

Application of LC-MS/NMR in Structural Elucidation

(JEOL LTD.) Takako Fujimoto, Naoyuki Fujii, Testsuichiro Morita,

Yutaka Takahashi, Testuo Higuchi

The recent development of HPLC coupled with MS-NMR has made the analysis of complex mixtures faster and easier. A common problem in the MS-NMR detection is that shift of mass spectra caused by the use of deuterium solvents as the eluent in LC-MS/NMR. A possible solution to this problem is presented.

1.はじめに

混合物の迅速な構造解析を可能とする分析装置として LC-NMR が注目を集めている。この LC-NMR にさらに MS を接続した LC-MS/NMR は、互いを相補する情報が同時に得られるので確実に迅速な構造解析手法である。しかしながら期待に反してその報告例はまだ少ない。LC-MS/NMR の実用化に向けた諸問題の検討と応用調査が本研究の目的である。

我々は LC-MS/NMR システムを構築し、MS 信号をトリガーとして用いることのできる STOP&FLOW 測定を報告している。この方法はイオン化できる化合物に対して適用することができ、LC-NMR の応用範囲を拡大することが可能であることが明らかになった。MS を LC-NMR の検出器として考慮した場合、MS の選択性の高さを利用することにより選択性の高い分析が可能となる。今回はマスクロマトグラムもしくは加算クロマトグラムやリンクドスキャンテクニックを利用した LC-MS/NMR について検討した。

一方、LC-MS/NMR 測定の問題点として LC の移動相に重水素化溶媒を用いることに起因する MS のシフトが挙げられる。この問題についても検討を行った。

2.装置

質量分析計および核磁気共鳴装置は、日本電子 JMS-LCmate および JNM-ECP500 を用いた。液体クロマトグラフは島津 10ADvp を使用した。Fig1 に LC-MS/NMR システムを示す。カラムで分画された成分は、UV 検出器を通過した後に三方コネクタによりスプリットされ 1/10 程度が MS 側に導入される。LC-MS/NMR システムでは NMR に

おいて感度良く測定を行うために移動相に重水素化溶媒を使用する。この移動相の重水素

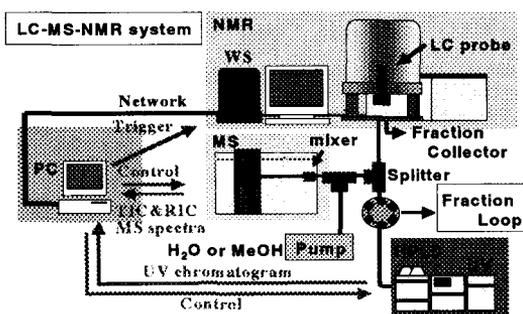


Figure 1. Schematic diagram showing the configuration of the instruments.

化溶媒により、水酸基など交換性のある官能基を有する化合物などによっては重水素交換によるマススペクトルのシフトが引き起こされ、未知試料の分析において正確な分子量情報を得ることが難しくなる。そこで MS 側にスプリット後、イオン源の手前でポストカラムよりメタノールや水などの軽溶媒を添加して、ミキサー部分で再置換を行うことにより重水素置換によるマススペクトルのシフトを抑制するシステムを採用した。

3.実験と結果

MS の選択性を利用した LC-MS/NMR 測定法を検討するために、今回はリンクドスキャン法によって得られる TIC の情報を用いて STOP&FLOW 測定を行った。尚、ニュートラルロスにカテキン類の galloyl 基部位に相当する m/z 170 を設定して、ニュートラルロススキャン測定を行った。試料としては緑茶を用いた。緑茶を遠心分離後、 $0.5\mu\text{m}$ のフィルターを通過させて試料とし、試料中のカテキン類について選択的に NMR 測定を行った。

その結果、目的物質であるカテキン類を選択的に効率良く NMR 測定を行うことが可能であった (Fig2)。

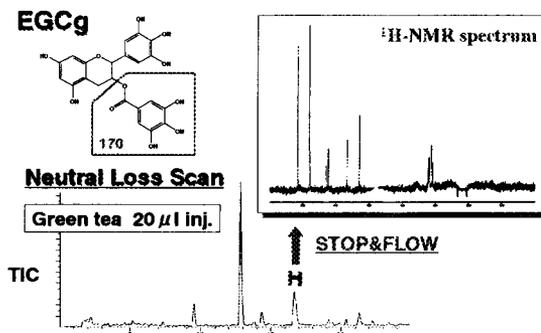


Figure 2. Catechin in Green tea analysis by using stop & flow method with Neutral loss scan.

一方、同時に得られた MS スペクトルは、イオン源前に何も添加しない場合、かなり複雑なスペクトルになる。しかしポストカラムから酢酸水溶液を添加することにより $[M+1]$ の分子イオンピークのみを確認することができた (Fig3)。従って、この方法を用いることにより選択的に正確な分子量情報と NMR による構造情報を得ることができることが明らかとなった。

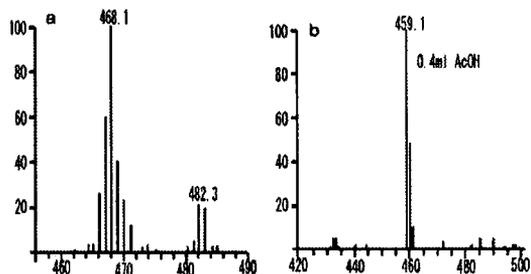


Figure 3. Positive-ion Mass spectra of Catechin (M.W.458) a) before reverse D/H exchange b) after reverse 0.4ml / min

インターネット上の SDBS-NMR のアクセス状況 (その 1)

(物質工学工業技術研究所¹, 先端情報計算センター²)

早水紀久子¹, ○齋藤剛¹, 矢部篤子¹, 衣笠晋一¹, 塚本啓一², 小島功²

Access Status of SDBS-NMR on Internet (Part I)

Kikuko Hayamizu¹, ○ Takeshi Saito¹, Atsuko Yabe¹, Shinichi Kinugasa¹, Keiichi Tsukamoto², and Isao Kojima²

¹ National Institute of Materials and Chemical Research (NIMC), ² Tsukuba Advanced Computing Center (TACC)

SDBS is a spectral data base system that contains six kinds of spectra under a compound dictionary. Since 1997, we open the system to the public, free of charge, through Internet; home page address is "http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/". Total number of access at the end of July, 2000 exceeded 7.6 million and proved the importance and necessity of SDBS. We started to investigate an access log of SDBS for improving it. About half of our uses came from academic sites. This suggests importance of SDBS to educational applications. Solvents were among the most frequent accessed species. ¹H NMR spectra were accessed more than other kinds of spectra. Although very few, Raman and ESR were also accessed. Finally, we keep advancing SDBS by updating data, advancing search capabilities, and adopting new technologies.

はじめに: SDBS (Integrated Spectral Data Base System for Organic Compounds、有機化合物のスペクトルデータベース)は一般試薬を対象に化合物辞書の下に6種類(MS、¹H NMR、¹³C NMR、IR、Raman、および ESR)の精度の高いスペクトルを専門家の手で収録した総合的なスペクトルデータベース(DB)である。1970年代にスペクトル DB 構築の研究開始以来、データ集積と高度化利用のための研究や、データの追加更新活動を現在も継続している。我々は、工業技術院先端情報計算センター(TACC)のデータベース公開プロジェクト(RIODB)の一環で1997年からSDBSをインターネットに公開している(http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS)。公開以来アクセス数は着実に上昇しており(図1参照)、総数は本年7月末で760万を超えた。これはSDBSの必要性と、日本が世界へ誇れる信頼性の高いDBとして重要な役割を実証している。インターネットでは3種類の検索機能が用意され、これらの機能は“AND”ロジックで結合している。Search Compoundsでは化合物名、分子式、分子量、元素数、CAS登録番号、SDBS番号などに、%記号をワイルドカードとして検索できるが、決められた優先順位に従って検索が行われる。Search NMRは¹H NMRと¹³C NMRのシフト値を独立に検索でき、許容範囲のが設定されているがこれをそれぞれ独立に変更できる。ピークの無い部分の指定も可能である。Search MSはMSスペクトルの質量数とピーク強度の検索を実行する。

データベース、データマイニング、インターネット

はやみずきくこ、さいとうたけし、やべあつこ、きぬがさしんいち、つかもとけいいち、こじまいさお

アクセスログの解析: 図 1

に示した月別アクセスの30%以上がアメリカからある。アクセスの月変動は、毎年4月にピークを迎え、8月に向けて減少するアメリカからのアクセス傾向に影響されている。国内からのアクセスが増加してきているが少ない点は残念である。Search NMR と Search MS は

1999年8月に新しく導入された検索機能である。1999年9月から1年間の検索機能のアクセスログを解析した結果、全体の85%を越す割合で Search Compounds が利用されている事がわかった。この中でも、化合物名の利用頻度が極めて高い。同じ1年間にアクセスされた辞書の構造式とスペクトルの総数は構造式へのアクセス件数と¹H NMR スペクトルへのアクセス多い。また稀少だが Raman や ESR スペクトル

にも常にアクセスがある。図 2 は、本年6~8月にアクセス総数の上位10化合物の¹³C NMR、¹H NMR スペクトルとその他のアクセスの総数である。アクセス頻度の高い化合物は溶媒が多く、NMR のアクセスが際立つ化合物が多い。特にメタノールは¹H NMR スペクトルが3種類入っているため、¹H NMR へのアクセスが顕著に多くなっている。

将来展望: データ追加更新作業

を継続し、内容をより一層充実して行く。また、Search Compounds の検索論理の変更、部分構造検索を可能にする、またスペクトルを拡大できるようにするなどの機能拡張を計画している。コンピューター技術の発展に伴うデータの取り扱い方、測定技術の進歩にあわせ解析が困難であった化合物のスペクトル DB 化、環境関連物質などの社会的ニーズに合った化合物の充実など、その時代に合わせた多様化を繰り返しながら質の高いDBを継続し発展して行く計画である。

Figure 1 Monthly Access Dependency of SDBS

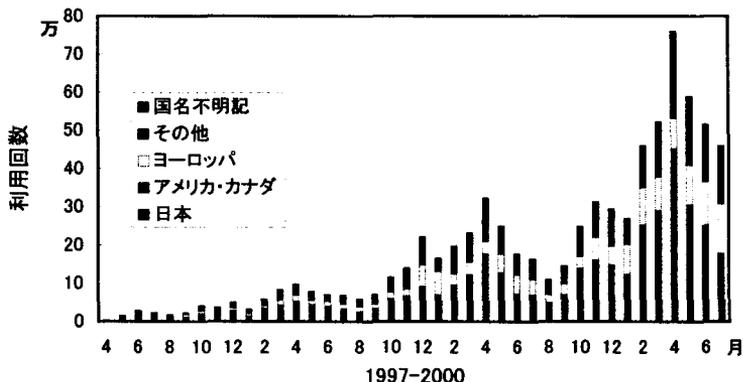
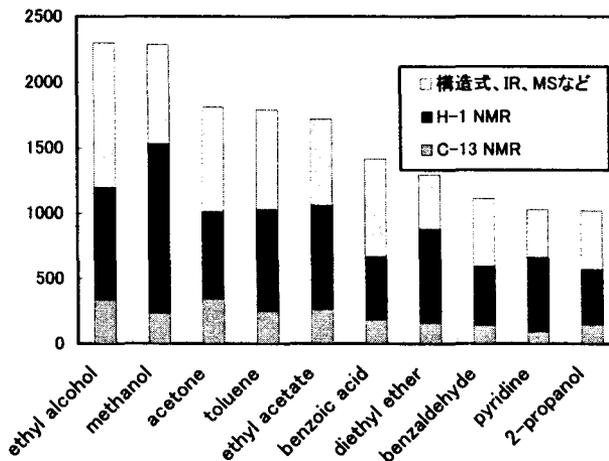


Figure 2 Ten Most Accessed Compounds between June and August 2000.



CAST法による立体化学の規範的コード化と NMR化学シフト予測システムへの適用

(理研¹, 科技団さがけ21², 豊橋技科大³)
○越野広雪¹, 佐藤寛子^{1,2}, 船津公人³, 中田 忠¹, 鶴澤 洵¹

Canonical Coding Method of Stereochemistry, CAST and its Application to a new ¹³C-NMR Chemical Shift Prediction System

(RIKEN¹, JST PRESTO², Toyohashi Univ. of Tech.³)
H. Koshino¹, H. Satoh^{1,2}, K. Funatsu³, T. Nakata¹, J. Uzawa¹

A new canonical coding method for representation of 3D structures, CAST (CANonical-representation of STereochemistry) has been developed. CAST represents a conformational and configurational information of the input structures. The CAST notation method that is extended for considering stereochemistry around the specific carbon atom is applied to our new ¹³C-NMR chemical shift prediction system. We achieved accurate chemical shift prediction by the ¹³C-NMR chemical shift prediction system using the model database of NMR data with CAST notation considering stereochemistry.

¹³C-NMRスペクトルは有機化合物の構造決定や同定などに広く利用されている。しかし、現状では1次元のスペクトルのみから正確な帰属を行い、化学シフト値から立体化学を予測することは困難な場合が多く、優れた¹³C-NMR化学シフト予測システムの開発が待たれている。¹³C-NMRは、¹H-NMRと比較して測定溶媒などの測定条件によって受ける影響が比較的少なく、データベース化とそれに基づく化学シフト予測に特に適した核種である。実際に多くのプログラムシステムが開発され、実用化されている。しかし、そこで用いられているデータベースの分子構造情報は基本的に平面構造情報である。従って、それらのシステムでは立体異性体を区別したシフト予測や複数の不斉中心がある化合物のシフト値を正確に予測することは不可能である。データベースに入力されている構造式が立体化学的に表示出来るように記述されていても、分子の各炭素を中心とする部分構造の立体環境の相違を適確に比較し、同一の立体環境を有するデータのみを集める手続きは決して簡単ではない。我々は、立体化学は分子構造の重要な化学情報であるとの認識から、立体化学表現法の開発に着手し、立体化学の規範的コード化法CAST (CANonical-representation of STereochemistry)を開発した。¹⁾ CASTコードは、平面構造表記法と並列表記できる、二面角情報に基づいた立体コード化方法である。

CAST, 立体化学, 化学シフト予測, データベース, 天然有機化合物

こしのひろゆき, さとうひろこ, ふなつきみと, なかたただし, うざわじゅん

平面構造表記法としては CANOSTコードを用いた。²⁾ CAST法では二面角範囲に重みを持たせた12のグループに分け、時計の0~11時に対応する12種の基本コードを英語の頭二文字である ze, on, tw, th, fo, fi, si, se, ei, ni, te, el で定義している。入力した分子構造のMDL mol ファイルと二面角ファイルを用いて、各原子にCASTコードを割り振る。分子全体を表現する場合は三結合以上離れた任意の二つの原子を出発点とした CASTコードで分子全体の立体配座情報を含んだ立体化学を表現できる (Conformational CAST)。NMRシフト予測に用いるための特定の原子の周りの立体環境は、着目した原子からの CASTコードに隣接する原子からのCASTコードを加え重複する部分を除いたもので表現できる。分子の立体配置を取り扱う場合には、原子あるいは部分構造を表すCANOSTコードの優先順位の最も高いものを anti の位置 (CASTコードでは si の位置) に来るように二面角を回転させてから CASTコードを割り振ることにより、立体配座に依存することなく立体配置を比較できる。

正確なシフト予測を行う為には、質の高いデータベースを構築する必要がある。そこで我々は主に最近報告された論文であり、かつ2次元NMRデータに基づいて帰属が行われたデータと、独自に帰属したデータを中心にデータベースを構築している。報告されているデータの帰属の間違いや入力時のミスは、本システムの実行によって比較的容易に発見できるので随時訂正している。実際の手順を簡単に以下に説明する。データベースに加える化合物の構造をChemDrawで立体化学を含めて入力し、Chem3Dで3次元構造に立ち上げ、MM2で構造最適化を行った分子構造のMDL mol ファイルと二面角ファイルを作成する。化学シフト値に関してはserial no, 化学シフト, 分裂パターン (s, d, t, q) と溶媒情報を含む text ファイルを作成する。シフト予測したい化合物も同様にしてMDL mol ファイルと二面角ファイルを作成する。これらの情報をもとに CAST, CANOSTコードと化学シフト値を組合わせたデータベースを構築する。データベースから鏡像関係にあるデータも利用出来るようにするために、予測する分子は、鏡像体に相当する CASTコードも同時に作成する。

新たに開発した ¹³C-NMR化学シフト予測システムでは、シフト予測したい炭素に着目し、そこから任意の位置 までの平面構造が一致し、立体化学が同一なものをデータベースから検索し、それらの化学シフト値を平均して、それを予測値とする。部分構造の比較する範囲は γ 効果を評価できる γ 位までを基本として考えているが、精度の向上など、目的に応じて範囲を自由に設定することができる。一般的にはConfigurational CASTを用いて相対配置の同一な部分構造を検索対象とする。

今回モデルデータベースとしてテルペノイドを中心に天然有機化合物を対象にできるものを構築した。本システムでは CASTコードにより立体化学を考慮できるため、置換基の立体異性体や、平面構造的には同じでもシフト値の大きく異なる立体環境の異なる部分についても¹³C-NMRシフト値を適確に予測する事ができた。

参考文献

- 1) H. Satoh, H. Koshino, K. Funatsu, T. Nakata, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **40**, 622 (2000).
- 2) H. Abe, Y. Kudo, T. Yamasaki, K. Tanaka, M. Sasaki, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **24**, 212 (1984).

2種類の配向試料に対する分子の配向テンソルの
相対方向の決定法の開発

(都立大理) ○野村薫、甲斐荘正恒

**Relative Orientations of Molecular Alignment Tensors Obtained
by Different Anisotropic Media**

Kaoru Nomura and Masatsune Kainosho

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

Abstract

The relative orientation between alignment tensors for the macromolecules, dissolved in two different anisotropic media, can easily be correlated by the two sets of residual dipolar couplings measured in these media. The correlation obtained for the alignment tensors shows various patterns, as for a two-dimensional separated local field spectrum of a polycrystalline powder, and the relative orientation between tensors can be determined from the observed pattern.

Direct measurements of the relative orientations of inter-nuclear dipolar vectors, inter-nuclear distances, and angles for bio-macromolecules through residual dipolar interactions have become possible by recent developments in the applications of various anisotropic media to partially align macromolecules in solution. Therefore, we can use these new structural parameters as

キーワード：分子配向テンソル、液晶溶媒、双極子相互作用

のむらかおる、かいのしょうまさつね

extra constraints to determine the three-dimensional structures of proteins and nucleic acids. The orientations of the inter-nuclear vectors with respect to the molecular alignment frames, however, cannot be uniquely determined with a single set of residual dipolar coupling measurements, because of the uncertainty due to the “taco-shaped” cone nature of the unique axis of the alignment tensor. This problem can be alleviated by introducing an additional orientation to the alignment tensor. As the orientation of the tensor with respect to the protein is not known *a priori*, the degrees of freedom can be optimized during the simulated annealing procedures. Therefore, in the case where two different molecular alignment tensors are being used, much computational time is required to determine the relative orientation for each alignment tensor with respect to the protein. Furthermore, this procedure may produce unrealistic structures, corresponding to a local minimum, during the Powell minimization process. In this study, we propose a new method to determine the relative orientation between two different molecular alignment tensors. In this approach, the relative orientation can be easily determined by correlating the two sets of residual dipolar couplings. Since the correlation pattern is strongly dependent on the relative orientation between the two different molecular alignment tensors, the relative orientation is determined by fitting to the simulated pattern. This will be demonstrated for labeled ubiquitin as a model system.

Reference

- 1)M. Linder, A. Hohner, and R.R.Ernst, *J. Chem. Phys.* **73**, 4949 (1980).
- 2)G. M. Clore, A. M. Gronenborn, and A. Bax, *J. Magn. Reson.* **133**, 216-221 (1998) .
- 3)B. E. Ramirez and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 9106-9107 (1998).

キーワード索引

(数字・アルファベット)

¹ H	P77	chemical shift	P9	MD 計算	3L3
¹ H	2L13	chemical exchange	P123	MIP	P66
¹ H DQF-NMR 法	P62	complex	3L8	model-free 解析	P12
¹ H decoupling	P79	complex	P3	molten globule	P36
¹ H CRAMPS	P88	conformational change	P3	MQ-MAS	P110
¹²⁹ Xe	2L3	CP/MAS	P86	MQ-MAS	P117
¹²⁹ Xe	P64	CP/MAS	P99	MRI	2L4
¹²⁹ Xe NMR	P109	CPMG	P2	MRM	P66
¹²⁹ Xe 高圧 NMR	P112	CPXP モチーフ	P31	MR マイクロスコープ	2L4
¹³ C-NMR	P73	DDS	P60	MR マイクロスコープ	P68
¹³ C	P61	deconvolution	3L8	MR マイクロスコープ	P70
¹³ C CP/MS	P95	density functional theory	P117	multinuclear NMR	3L8
¹³ C CP/MAS NMR	P116	DinI	P39	Myb 様ドメイン	P13
¹³ C	P121	Direct3D	P67	nitrogen	P46
¹³ C NMR	P90	DNA binding	P37	NMR	1L2
¹³ C NMR	P100	DNA 結合	2L15	NMR	2L13
¹³ C NMR	P107	DNA 結合ドメイン	P5	NMR	P14
¹³ C- ¹⁴ N 双極子相互作用	P78	DNA 結合蛋白質	P34	NMR	P15
¹³ C グルコース経口投与	P61	DOR	P57	NMR	P18
¹⁴ N overtone	P78	DOSY	P48	NMR	P24
¹⁵ N-relaxation	P38	DSP	P60	NMR	P51
¹⁵ N 緩和解析	P12	dynamic	P38	NMR	P100
¹⁵ N 緩和時間	2L6	Eu	P85	NMR/CD	P31
¹⁹ F	P118	Eu-Y ₂ O ₂ S	P85	NMR イメージング	2L2
² H NMR	P91	foldng	P36	NMR マイクロイメージング	P75
²³ Na NMR	P110	GABA _A 受容体	P35	NMR ロック	P63
²⁷ Al MQMAS	P113	GABARAP	P35	NMR 構造解析	P35
²⁹ Si NMR	P86	GPCR	P4	NMR 量子コンピュータ	2L10
²⁹ Si NMR	P87	Greek key モチーフ	P29	OMAS	P54
³¹ P _{NC}	P21	GTP 結合タンパク質	P38	OpenGL	P67
⁷ Li	P118	halfFourier	P72	PACAP	P4
⁸⁹ Y MAS NMR	P85	high pressure	P21	<i>para</i> -hydrogen induced polarization	P123
1, 3, 5-tri alkyl-置換ベンゼン	P47	His-Asp リン酸転移情報伝達	P34	perturbation	P9
2T 人体用 MR システム	P61	HIV-Tat タンパク質	3L7	PGSE-NMR	P44
3D ポインタデバイス	P71	hmqc	P73	phosphate	P46
3 次元構造	3L10	hydride	P123	pK	P16
3 次元構造	P6	hydrogen bond	P21	polyuridine	P3
ABX ₃ 型	P50	hydrogen bond	P46	protein G	P21
AlPO ₄	P113	hydrogenation	P123	protein-RNA interaction	P27
beryllium phosphate	3L8	hydrolase (YUH1)	P41	PTMSP	P97
bicelle	P17	I/Q 変調器	P60	Ras	P38
C-1027	P23	imino group	P46	realtime3D-MRI	P72
Ca ²⁺ -binding	P36	j_hmbc 法	P45	REAPDOR	P117
CAST	P127	JAM モデル	2L8	RecA	P37
catalysis	P117	killer toxin	P29	RecA	P39
CDR ループ	2L8	k 空間	P96	recognition motif	P11
CD スペクトル	P14	LC-MS-NMR	P125	recombination	P37
Cd 塩エチレンアイオノマー	P108	LC-NMR	P48	REDOR	2L12
		lysozyme	P36	REDOR	3L3
		MAS	P78	REDOR	P57
		MAS	P120	REDOR	P117

Residual dipolar coupling	P43	γ -gauche 効果	P87	塩化マグネシウム	P52
resonance	P9	π 共役系高分子	P102	オリゴペプチド	P15
RF 照射加熱	P2	σ - π 共役	P87	温度変化	P65
RMSD	2L12	(あ行)		(か行)	
RNA	2L10	アイソタクチックポリプロピレン	P93	カオリナイト	P113
RNA	P11	アキレス腱	P62	ガラス転移温度	P94
RNA-binding domain	P27	アストログリア細胞	P73	カルモジュリン	3L5
RNA アプタマー	3L7	アミノ酸残基代謝標識	P25	ガレクチン	P10
scalar coupling	P21	アミロイド	P104	化学シフト	P58
SDS ミセル	P18	アミロイド繊維体	P30	化学シフト	P77
sex-lethal	P3	アルカンジオール	P89	化学シフト	P109
side-chain	P9	アルカンチオール	P89	化学シフト異方性	1L4
simulation	P123	アルゴリズム	2L10	化学シフト異方性	P54
SMPI	P26	アレルゲン	P33	化学シフトの異方性	P112
solid NMR	P79	圧縮率	P20	化学シフト予測	P127
splicing	P27	圧力	P52	化学交換	P49
SPRITE イメージング	P81	圧力依存性	P112	化合物半導体	P121
ssDNA	P39	圧力変性	P20	画像	2L1
SS 結合	2L7	安定性	P31	拡散	P54
stimulated-echo	P105	安定同位体標識	P8	拡散係数	P49
STRAFI	P82	安定同位体標識	P22	拡散係数	P105
stress-shielding	P62	安定同位体標識	P40	拡散計測	P65
T1 緩和	P99	安定同位体標識	P76	核酸の構造	P43
T1 強調画像	2L2	安定同位体利用 NMR	1L4	核四極子相互作用	P113
T2	P2	イオン会合体	P108	核四極相互作用	P91
tautomerism	P46	イオン性液体	P44	核双極子線幅	P59
TCA 回路速度	P61	イオン導電率	P44	活性ループ	P26
TCR	2L8	イメージング	P65	活性構造	2L14
third averaging	P79	イメージング	P81	感度	P121
tmRNA	P42	イメージング	P82	環状シラン	P86
TPPM	P79	インターネット	P126	関節軟骨	2L1
trans-translation	P42	インフルエンザ	P18	緩和解析	P7
TRMA	P4	インフルエンザ	P43	緩和試薬	P103
TRNOE	P4	位置・立体選択的同位体標識	P25	緩和時間	2L3
TRNOE	P51	位置特異的 ^{13}C 標識グルコース	P25	緩和時間	P41
TROSY	1L2	易動度	P118	緩和時間	P47
tubulin	P35	異種核 long range coupling	P45	緩和時間	P49
U2AF	P27	異方性	P7	緩和時間	P53
ubiquitin	P41	遺伝アルゴリズム	P55	緩和時間	P94
Ves1-1S	P19	遺伝子工学	P6	キシレン異性体	P107
Ves1/Homer	P19	遺伝子発現	3L10	機器評価	P60
volume rendering	P66	運動	P116	気体透過性	P97
volume rendering	P72	運動性	2L5	絹フィブロイン	3L3
windows	P72	運動性	P53	絹フィブロイン	P99
Xe 収着測定	P109	エコーフリー変換	P96	逆ラベル	P22
$\text{Y}_2\text{O}_3\text{S}$	P85	永久磁石	P63	極性溶媒	P50
yeast	P41	永久磁石	P68	金属イオン結合モチーフ	3L6
YUH1	P9	液晶	P54	グリシンリッチドメイン	P11
α helix	P15	液晶 NMR	P55	クレイ	P84
β コイル	P4	液晶溶媒	P128	クロモプロテイン	P23
β シート構造	P99	塩化カルシウム	P52	空気軸受	P120

空洞	P75	固体2次元 ^1H - ^{13}C HETCOR 法	P88	受信系	P60
偶奇性	P90	固体2次元スピンドiffusion NMR	3L3	柔粘性結晶	P105
繰り返し β ターン構造	3L3	固体 ^{73}Ge NMR	P122	重合パウダー	P93
ケイ素	3L2	固体 NMR	3L4	重水素化	1L2
結晶	P89	固体 NMR	P76	常磁性シフト	P24
結晶-非晶構造	P87	固体 NMR	P83	常磁性シフト	P85
結晶化	P92	固体 NMR	P84	常磁性効果	P7
原子間距離	2L12	固体 NMR	P89	信号帰属	3L1
原子間距離測定	P104	固体 NMR	P103	神経伝達物質	2L2
コラーゲン	2L6	固体 NMR	P104	スピン-格子緩和時間	P107
コラーゲン線維	P62	固体 NMR	P111	スピン-格子緩和速度	P52
コンパクト	P63	固体 NMR	P115	スピネコー	P54
コンパクト	P69	固体 NMR 法	P124	スピンスピン緩和時間	P102
コンフォメーション	3L4	固体イメージング	P96	スピンドiffusion	P84
コンフォメーション依存化学シフト	P83	固体構造	P100	スピンドiffusion	P102
コンプレックス	P107	固体高分解能 ^{113}Cd NMR	P108	スピンドiffusion	P111
コンホメーション	P86	固体高分解能 ^{13}C NMR	P108	スピン格子緩和時間	P106
コンホメーション	P87	固体高分解能 NMR	P77	スペクトルシミュレーション	P106
コンホメーション	P101	固体高分解能 NMR	P80	水素結合	1L3
交換速度	P74	固体高分解能 NMR	P100	水素結合	3L7
交差緩和	P74	固体重水素 NMR	3L5	水素結合	P77
交差飽和	1L2	固体重水素 NMR	P106	水素結合	P88
光学分割	P111	混合物分析	P48	水素結合	P89
光励起三重項状態	2L11	(さ行)		水素交換反応速度	2L7
勾配磁場	P68	サーフェスレンダリング	P67	水分分布	P75
好熱性古細菌	2L15	サーモトロピック液晶	P90	水溶液構造	2L13
抗体認識	P33	サイズ依存性	2L3	水和	3L5
構造	P95	細胞の水	P65	炊飯米	P75
構造のゆらぎ	2L7	細胞情報伝達	P40	ゼオライト	P115
構造解析	P5	細胞分裂	P31	ゼオライト	P116
構造解析	P125	産業用 MRI	P69	セラミック型プローブ	P98
構造活性相関	P26	酸化還元	P12	生体高分子	P49
構造精密化	2L8	残余双極子カップリング	P7	静電ポテンシャル	P16
鉍物	P124	残余双極子間相互作用	1L3	石炭	P81
高圧	2L14	残余双極子効果	1L4	石炭	P98
高圧 ^{129}Xe NMR	P97	残留双極子結合	P10	石炭	P114
高圧 NMR	P1	シスタチン A 二量体	P30	積分変換	P55
高圧 NMR	P20	システインテトラペプチド	2L13	絶対値表示	P96
高温 NMR プローブ	P119	システム設計	2L4	専用ボード	P71
高次構造	P39	シミュレーター	P59	前置増幅器	P121
高次構造	P104	シュードノット	P42	全芳香族高分子	P101
高速 MAS	P80	シンジオタクチックポリスチレン	P107	双極子結合	2L12
高分子	P82	四極子分裂	2L1	双極子相互作用	2L6
高分子	P97	時間依存型非断熱遷移理論	P56	双極子相互作用	P128
高分子	P114	磁気遮蔽定数計算	P101	層間化合物	P95
高分子量タンパク質	1L2	自己拡散	P48	相互作用	P39
高偏極スピン	2L11	自己拡散係数	2L9	相対性効果	P58
合成雲母	P110	自己拡散係数	P44	造影剤	P66
固体 NMR	3L2	自動解析	P55	(た行)	
固体 ^{13}C CP/MAS NMR	P101	自動帰属	P22	タービン	P80
固体 ^{13}C スペクトル編集	P114	主鎖ダイナミクス	P106	ダイナミクス	2L8

ダイナミクス	P97	転写延長	2L15	光ポンピング	P64
ダイナミクス	3L4	電解液	2L9	非等価性	P50
タンパク質	P16	電子移動速度	P12	人ボランティア	P61
タンパク質	P17	凍結乾燥製剤	P94	琵琶湖湖底堆積物	P124
タンパク質	P22	動的核偏極	2L11	フィブロネクチン	2L6
タンパク質	P28	動的構造解析	P41	フェレドキシン	3L9
タンパク質	P40	動的粘弾性	P62	フェレドキシンNADPH+還元酵素(FNR)	3L9
タンパク質	P53	同位体ラベル	3L10	プローブ	P68
タンパク質	P94	同位体ラベル	P6	プロテアーゼ	P16
タンパク質-RNA 相互作用	3L7	同位体標識	2L12	プロトンポンプ	P83
タンパク質・DNA 相互作用	P7	同位体標識	3L1	プロメラインインヒビター	P16
タンパク質の基本構造	P8	同種核双極子相互作用	P76	フロリジン	P45
タンパク質 NMR シグナルの帰属	P25	(な行)		不活性化ゲート	P14
多核種多次元 NMR	P29	ナイロン 4 6	P92	不斉中心	P50
多核多次元 NMR	2L5	ナイロン6	P84	不凍タンパク質	3L10
多孔質微粒子	P64	ナトリウムチャンネル	P14	部位特異的変異体	P24
多次元 NMR	2L15	ナノコンポジット	P84	物質拡散	P102
多次元 NMR	3L9	ナノ空間	P115	分極移動制御	P56
多次元 NMR	3L10	ナノ空間	P116	分子運動	P6
多次元 NMR	P5	ニトロアニリン	P115	分子運動	P95
多次元 NMR	P8	ニトロアニリン	P116	分子運動	P115
多次元 NMR	P19	二荷金属イオン	3L6	分子運動性	P94
多次元 NMR	P22	二元収着モデル	P109	分子運動性	P108
多次元 NMR	P34	二次元 NMR	P32	分子認識	P111
多次元 NMR	P40	二次構造	2L10	分子配向テンソル	P128
多次元固体 NMR	3L1	二面角	P101	ベスベル型プローブ	P98
多糖	P49	二量子フィルタ-NMR	2L1	ペプチド	P17
耐熱性ポリマー	3L2	二量体	2L15	ペプチド	P77
代謝物	P74	ヌクレオチド結合蛋白質	1L3	ペプチド	P78
断熱高速遷移	P56	熱架橋構造	3L2	ペプチド化合物	P99
チトクロム c3	P12	熱硬化性樹脂	3L2	ヘマグルチニン	P18
超並列	P70	熱変性	P32	ヘムの電子構造	P24
超偏極	P64	粘性率	P44	平面型コイル	P69
超偏極希ガスNMR	2L3	粘土鉱物	P95	壁による緩和効果	2L3
超臨界水	P119	脳	P74	変異体	P31
超臨界二酸化炭素	P1	脳機能	2L2	変性状態構造	P20
超臨界流体	P119	脳内代謝	P73	ポリゴン	P67
長鎖脂肪酸	P102	(は行)		ポリビニルアルコール	P88
直鎖シラン	P86	バイセル	2L6	ポリペプチド	P100
直接結合定数	P55	ハイドロゲル	P53	ポリペプチド	P106
直流電場	P118	バクテリオロドプシン	3L4	ポリマーゲル電解質	P118
データベース	P126	バクテリオロドプシン	P83	包接	P45
データベース	P127	バクテリオロドプシン	P103	放出速度	P53
データマイニング	P126	バックグラウンドサブプレッション法	P98	芳香環化クロモフォア	P23
テロメア	P13	パルスパワー	P2	(ま行)	
デンプンの糊化	P75	パルス磁場勾配	P105	マーチングキューブ	P67
低温耐性	P11	ハルパッハ	P63	マイクロスコープ	P63
定量性	P98	ハルパッハ	P68	マジックエコー	P96
鉄錯体	2L13	パン	P66	マジック角回転	P122
天然有機化合物	P127	ハンマーヘッド型リボザイム	3L6	マジック角高速試料回転	1L4
転写因子	P5	ヒトカルシトニン	P104	マジック角試料回転	3L1

マジック角試料回転	P76
マストパランX	3L1
マンガン	2L2
膜蛋白質	3L4
膜蛋白質	P83
膜蛋白質	P103
ミオグロビン	P24
マイクロボイド	P109
マイクロ細孔	P112
水分子	2L1
水分子	P52
ムスカリン性アセチルコリン受容体	P51
無細胞タンパク質合成系	P8
メタコリン	P51
メチオニン側鎖	3L5
メチル化DNA (や行)	P5
ゆらぎ	3L5
有機ゲルマニウム化学	P122
有機物質	P124
溶液構造	3L9
溶液構造	P23
溶液構造	P34
溶質-溶媒相互作用	P1
溶媒シフト	P47
溶媒和 (ら行)	2L9
ラクトース	P10
リアルタイム回転・表示	P71
リカップリング	P76
リゾチーム	2L7
リゾチーム	P6
リチウムイオン	2L9
リボソーム再生因子	2L5
リボヌクレアーゼ T1	P32
リン物質	P124
立体化学	P127
立体構造	2L5
立体構造	3L7
立体構造	P30
立体構造	P33
立体構造	P40
立体構造解析	P19
立体構造解析	P26
立体構造決定	P29
立体障害	P47
立体選択的重水素化	P28
立体配座	P51
レギュレータ	P34

著者索引

(数字・アルファベット)

Andy P. Pickford	2L6	S. Ohki	P26	生駒和也	2L1
Angela M. Gronenborn	P21	S. Tate	P26	生駒和也	P62
Anthony Watts	1SL1	Sareth Sina	2L14	石田信昭	P65
Arnaud A. Bocquier	2L6	Seung-Wook Chi	P3	石田信昭	P66
Arthur Pardi	P43	Steven P. Smith	2L6	石塚みどり	P23
Brian Hare	2L8	Subramanian Ganapathy	P117	石塚靖子	P45
Chang Dae Han	P90	Sundaresan Rajesh	P41	石野哲也	2L5
Cheryl H. Arrowsmith	1SL2	Sundaresan Rajesh	P9	石丸臣一	P95
D.L.VanderHart	P84	Yao Juming	P99	石村巽	P24
David Cowburn	1SL4	(あ行)		五十部誠一郎	P66
G. Navon	2L1	相澤崇史	P1	磯辺俊明	P29
Gerhard Wagner	2L8	相原秀樹	P39	市川さおり	P33
H. J. Vogell	3L5	相原雄一	2L9	一谷基邦	3L2
H. Leffer	P10	相見敬太郎	P101	逸見光	P75
H. Shinar	2L1	相本三郎	P13	伊藤拓宏	P3
Heinrich Roder	1L1	赤坂一之	2L14	伊藤拓宏	P27
Iain D. Campbell	2L6	赤坂一之	P20	伊藤紀之	1L3
J. Godward	P82	赤坂一之	P21	伊藤泰男	P97
J. H. Prestegard	P10	秋田裕介	P69	伊藤隆	1L3
J. W. Gilman	P84	阿久津秀雄	3L1	伊藤隆	P9
Janos K. Lanyi	P103	阿久津秀雄	P12	伊藤隆	P19
Janos K. Lanyi	P83	阿久津秀雄	P76	伊藤隆	P37
Jee Jun-Goo	P5	浅川直紀	P102	伊藤隆	P38
Joern M. Werner	2L6	朝倉哲郎	3L3	伊藤隆	P39
John L. Markley	1SL3	朝倉哲郎	P99	伊藤隆	P41
Jun-Goo Jee	1L3	浅野敦志	P84	稲垣冬彦	P33
K. Hiraga	P26	芦田淳	3L3	稲垣冬彦	3L11
K. Oda	P26	阿曾幸男	P53	井上仁	P73
K. Tamura	P26	阿曾幸男	P94	井上香織	P55
M. Feliciano	P26	安達隆二	P85	井上真	P3
M. Kainosho	P26	天谷哲康	1L4	井上義夫	P102
M. Tashiro	P26	安藤勲	P77	井ノ岡博	P4
M. Waelchli	1L3	安藤勲	P100	井ノ口馨	P19
Mark D. Allen	2L15	安藤慎治	P101	今城文雄	P111
Michael.R.Green	P27	安藤夕太	P55	岩原淳二	P7
N. Gonzalez	P26	飯島隆広	P91	梅田匡朗	P61
P. J.MacDonald	P82	飯田秀博	2L3	梅本公子	P10
Paul Hanson	P43	飯塚舜介	P73	植垣隆浩	P110
Penmetcha Kumar	3L7	生島豊	P1	植木克典	P93
Ramachandra Shastry	1L1	池上貴久	1L3	上杉晴一	3L7
Richard Needleman	P103	池上貴久	P4	上田貴洋	P112
Richard Needleman	P83	池上貴久	P5	上田貴洋	P123
S. Aimoto	P26	池田勝也	P50	植田佳樹	P46
		池田武義	P118	上原宏樹	P92
		池田武義	P119	上原宏樹	P93
		池田龍一	P95	植松孝明	P71

植松孝明	P72	小田正記	P61	木川隆則	P7
植村邦彦	P66	落合研次	P17	木川隆則	P8
鷗澤洵	P127	尾辻雅	P50	木川隆則	P40
卯辰直也	P50	音田治夫	P4	菊池章	P40
内山進	2L5	尾身洋典	P97	菊地淳	P7
宇津沢慎	P63	(か行)		木島広如	2L5
宇津澤慎	P60	甲斐荘正恒	P25	北尾彰朗	2L8
宇津澤慎	P72	甲斐荘正恒	P28	北澤英明	P59
内海博明	P45	甲斐荘正恒	P29	北田千恵子	P4
梅田匡朗	P61	甲斐荘正恒	P30	北原治	P4
江口太郎	P97	甲斐荘正恒	P128	北原亮	2L14
江口太郎	P112	蔭山博之	P118	北村彩	P3
江口剛史	P119	梶川達朗	P102	衣笠晋一	P126
江奈武一郎	P25	梶弘典	P86	木下隆利	P107
海老澤計慶	2L12	梶弘典	P87	木下隆利	P108
遠藤一央	P90	梶弘典	P88	木下隆利	P109
遠藤聡史	P4	梶裕之	P30	金仁実	P27
大石修	P105	檜森啓真	2L5	金仁実	P3
大木出	P5	片岡弘	P118	木村敦臣	2L3
大儀和宏	P4	片桐元	P98	木村敦臣	P64
大木進野	P28	片平正人	3L7	木村一雄	P48
大木進野	P29	加藤悦子	3L9	木村英昭	3L2
大久保忠恭	2L5	加藤悦子	P31	京極好正	P11
扇谷悟	3L10	加藤悦子	P34	吉良敦史	3L4
大郷耕輔	3L3	金久保光央	P1	日下義章	2L1
大嶋民子	2L5	金澤健治	P45	日下義章	P62
大瀧哲也	P4	金松知幸	P61	楠英樹	P17
大谷敏夫	P23	金折賢二	P14	楠木正巳	3L9
大塚讓	P73	金橋康二	P113	久保厚	P54
大槻泰介	P61	兼松隆	P35	窪田健二	P17
大野綾子	P30	上平美弥	P104	熊谷恵	2L2
大橋肅	3L7	神村耕二	P20	久米田博之	P36
大前英司	2L14	亀田恒徳	3L3	久米田博之	P6
岡崎恒子	P7	亀田恒徳	P99	栗栖源嗣	3L9
岡伸一郎	2L5	鴨修	P45	栗田順一	1L4
岡田和廣	3L2	狩野広美	P65	栗原良仁	P92
岡田重益	P63	狩野広美	P66	黒木重樹	P77
岡千寿	P6	狩谷英里	P29	黒木重樹	P100
岡村敦史	P50	河合剛太	P3	黒田義弘	P14
岡本和也	P61	河合剛太	P42	黒田義弘	P15
小川芳弘	P89	河合剛太	P43	桑田一夫	1L1
沖田晃一	3L2	川口謙	P48	桑原愛	P24
奥村康	P33	河瀬靖治	3L4	桑原和弘	P89
小椋賢治	P33	河野敬一	P35	桑原大介	P57
小椋賢治	3L11	河南るり子	P103	月向邦彦	2L14
小田耕平	P29	川崎政人	3L11	小泉美香	P65

小泉美香	P66	齊藤誠治	P96	須貝真理子	P17
神田大輔	P22	齋藤剛	2L9	須貝真理子	P19
河野隆英	P35	齋藤剛	P126	須貝真理子	P41
河野俊之	3L1	齊藤肇	2L12	須貝真理子	P9
河野俊之	P9	齊藤肇	3L4	杉浦寿史	P108
河野俊之	P17	齊藤肇	P103	杉沢寿志	P113
河野俊之	P19	齊藤肇	P104	杉沢寿志	P114
河野俊之	P41	齊藤肇	P83	杉沢寿志	P119
甲本忠史	P92	齋藤雅子	P37	杉本恭子	2L9
甲本忠史	P93	齋藤唯理亜	P118	杉本俊哉	3L2
越野広雪	P127	祭原ゆかり	2L5	鈴木栄一郎	2L12
小柴生造	P40	境哲男	P118	鈴木崇洋	P71
小柴琢己	P36	坂田育幸	P110	鈴木智幸	P109
児嶋長次郎	P30	坂本泰一	P43	鈴木理	2L15
小島功	P126	坂本泰一	P9	鈴木冲	P47
小嶋茂雄	P53	坂本博	P3	須田真輔	P30
小嶋茂雄	P94	佐久間千勢子	P32	須原正彦	P90
小島正樹	P16	櫻井智司	P119	須原正彦	P91
小島正樹	P32	櫻井実	P102	瀬尾芳輝	P62
巨瀬勝美	2L4	笹川拡明	P20	瀬尾芳輝	2L1
巨瀬勝美	P60	佐々木英典	P67	瀬川新一	2L7
巨瀬勝美	P63	佐々健太郎	3L1	関英子	P8
巨瀬勝美	P66	佐藤耕平	P102	染谷龍彦	P43
巨瀬勝美	P67	佐藤直樹	P11	(た行)	
巨瀬勝美	P68	佐藤寛子	P127	多比良和誠	3L6
巨瀬勝美	P69	佐藤祐一	P124	多比良和誠	3L7
巨瀬勝美	P70	篠原絵美	P95	高井敏朗	P33
巨瀬勝美	P71	柴田武彦	P9	高杉憲司	P38
巨瀬勝美	P72	柴田武彦	P37	高杉憲司	P41
小寺義男	P9	柴田武彦	P39	高野博幸	P66
後藤敦	P59	柴田武彦	P41	高橋健治	P16
後藤祐児	1L1	嶋田一夫	1L2	高橋健治	P32
小中重弘	P55	島田秀夫	P24	高橋征三	P74
小橋川敬博	P36	島原秀登	1L4	高橋信幸	P123
小橋川敬博	P6	島原秀登	2L5	高橋豊	P125
小林伸一郎	3L7	清水禎	P59	高宮尚武	P62
小林祐次	2L5	清水真人	P22	高山俊夫	P122
古牧育男	P81	志村令朗	P3	高山俊夫	P124
小森佳彦	P115	下竹敦哉	P5	竹内浩	P55
小森佳彦	P116	下村康夫	P85	竹内敬人	P122
近藤英昌	3L10	白川昌宏	1L3	竹腰清乃理	P111
(さ行)		白川昌宏	P4	竹腰清乃理	P78
齋藤公児	P81	白川昌宏	P5	竹腰清乃理	2L11
齋藤公児	P82	白倉裕美	P42	竹腰清乃里	P79
齋藤公児	P113	神藤平三郎	P31	武田和行	2L11
齋藤公児	P114	末松浩人	P121	武田佳宏	P3

田代桜子	P31	寺尾武彦	P78	西山千春	P33
田代充	P30	寺尾武彦	P79	西山裕介	P54
橘秀樹	2L7	寺尾武彦	P111	仁木國雄	P47
楯真一	1L4	戸所泰人	3L1	新田勝利	P6
楯真一	P30	土肥輝美	P104	新田勝利	P35
田中克己	P122	泊輝久	P31	新田勝利	P36
田中剛史	P9	富永剛史	2L7	根本直	P45
田中剛史	P19	富永里香	P73	根本暢明	P6
田中俊之	3L6	豊島英親	P75	根本暢明	P18
田中俊之	P23	(な行)		根本暢明	P36
田中好幸	3L6	内藤晶	2L12	野口真路	P17
谷生道一	3L4	内藤晶	3L4	野坂篤子	P104
谷生道一	P83	内藤晶	P83	野田明宏	P44
谷口吉弘	P52	内藤晶	P103	野田康夫	2L7
谷阪喜昭	2L7	内藤晶	P104	野村薫	P128
田之倉優	P16	中尾光善	P5	(は行)	
田畑祥生	P110	中川照眞	P14	拝師智之	2L4
田村厚夫	P20	中川照眞	P15	拝師智之	P60
俵山みどり	3L1	永阪文惣	P97	拝師智之	P63
千葉かおり	P18	中澤靖元	3L3	拝師智之	P66
沈新春	P8	中澤靖元	P99	拝師智之	P67
塚田裕三	P61	中島進	P124	拝師智之	P68
塚本啓一	P126	中田忠	P127	拝師智之	P69
津崎剛	P63	永田忠博	P75	拝師智之	P70
辻暁	3L4	長土居有隆	P13	拝師智之	P71
辻暁	P83	中西昭男	P63	拝師智之	P72
辻暁	P103	中西洋志	P18	芳賀達也	P51
辻暁	P104	中西洋志	P45	荻野孝史	P74
辻田義治	P107	中野治朗	P100	端健二郎	P59
辻田義治	P108	中野博明	2L5	橋本征太郎	P67
辻田義治	P109	中村新治	P111	橋本征太郎	P71
辻戸正彦	3L8	仲村高志	P80	橋本康博	2L6
津田栄	3L10	中村亘男	P97	長谷川憲一	P81
津田栄	P36	中村亘男	P112	長谷川潤	P103
津田栄	P6	中村亘男	P123	長谷俊治	3L9
土屋征司	P28	中村宏樹	P56	畠山盛明	P114
堤耀広	3L5	中村義之	P50	畠中秀樹	P33
堤耀広	P106	行木信一	P42	畠中秀樹	3L11
堤耀広	P2	成相裕之	3L8	畑中稔	1L3
出来成人	P118	成相裕之	P46	畑中稔	P38
出口健三	P114	難波栄二	P73	秦野賢一	P16
手島圭三	3L9	西川諭	3L7	八田知久	P34
出村誠	P36	西川実希	P122	八森由貴子	P37
寺内勉	P28	西田元彦	3L11	服部峰之	P64
寺尾武彦	2L11	西村勝之	2L12	服部峰之	2L3
寺尾武彦	P54	西村善文	P13	花岡慎悟	P13

馬場雄久	P58	藤原敏道	P76	三浦和紀	P35
濱田季之	P51	藤原英明	2L3	美川務	P37
林和彦	P17	藤原英明	P64	美川務	P39
林秀則	P11	船津公人	P127	右田たい子	2L13
林繁信	P115	文野浩一	P52	三嶋謙二	P56
林繁信	P116	古川浩康	P51	三島正規	1L3
林秀則	3L6	星野保	3L10	水口峰之	P36
早野俊哉	P28	細田和男	P34	水野猛	P31
早水紀久子	2L9	堀田凱樹	P22	水野猛	P34
早水紀久子	P44	堀井文敬	P86	水野元博	P90
早水紀久子	P126	堀井文敬	P87	水野元博	P91
原園としえ	P85	堀井分敬	P88	溝上潤	P79
原田英里砂	P12	堀井文敬	P89	三森文行	2L2
原田道昭	P98	堀金明美	P75	宮本和英	P14
坂東寿則	2L9	(ま行)		三輪優子	P98
樋岡克哉	P120	前田真悟	P47	武藤あきら	P42
疋田純	P73	前田正洋	P32	武藤隆則	P22
樋口哲夫	P125	前田能崇	P15	武藤裕	P27
姫野俵太	P42	牧秀志	3L8	武藤裕	P3
平井篤樹	P90	牧秀志	P46	武藤裕	P51
平沖敏文	3L5	増井大二	P123	村井亮平	3L5
平沖敏文	P106	増田憲二	P88	村上智英	P11
平沖敏文	P2	松井茂	P96	村上洋太	P7
平賀和三	P29	松浦久恵	P32	村田勝義	P100
平賀隆	2L3	松上明正	3L7	元田容子	P8
平賀隆	P64	松川真吾	P49	森川耿右	P22
平澤泰介	P62	松木陽	3L1	森川友仁	P17
平田雅人	P35	松木陽	P76	森越信之	P106
平間正博	P23	松倉順一	P121	森田徹一郎	P125
廣明秀一	P22	松澤英和	P90	森田勇人	3L6
廣田洋	P51	松田貴意	P8	森田勇人	P11
福井洋之	P58	松田夏子	P8	森村香織	P43
福岡由記	P12	松田善正	2L4	(や行)	
福島徑	3L1	松田善正	P63	柳川康洋	2L3
福田純子	P23	松田善正	P68	柳下元	3L1
福見俊夫	2L10	松田善正	P69	矢野友海	P78
藤井直之	P125	松田善正	P70	矢吹孝	P8
藤井倫子	P42	松田善正	P71	矢部篤子	P126
藤田直之	P5	松原正	2L5	山内美穂	P95
藤谷直樹	P35	丸中良典	P62	山口絵未	P8
藤戸輝明	P119	丸森俊男	P47	山口悟	3L4
藤野政彦	P4	丸山勝也	P47	山崎隆仁	P62
藤本孝子	P125	三浦愛	3L10	山崎和彦	2L15
富士原和也	P43	三浦愛	P6	山崎俊夫	P11
藤原敏道	3L1	三浦和紀	3L10	山崎俊正	3L9
藤原敏道	P12	三浦和紀	P6	山崎俊正	P31

山崎俊正	P34	渡邊正義	P44
山崎由香子	P63		
山崎由香子	P68		
山内一夫	P77		
山田周作	P86		
山田周作	P87		
山田博昭	2L14		
山田博昭	P20		
山田博昭	P21		
山根努	3L3		
山根努	P99		
山延健	P92		
山延健	P93		
山本保	P50		
山本泰彦	P24		
山本裕輔	P107		
山本利香	3L7		
結城敏文	P33		
湯澤聡	3L11		
横瀬一輝	2L5		
横田篤	2L7		
横山茂之	1L3		
横山茂之	P3		
横山茂之	P7		
横山茂之	P8		
横山茂之	P27		
横山茂之	P38		
横山茂之	P39		
横山茂之	P40		
横山茂之	P51		
吉岡澄江	P53		
吉岡澄江	P94		
吉田卓也	2L5		
吉田稔夫	2L5		
吉田充	P75		
吉水広明	P107		
吉水広明	P108		
吉水広明	P109		
李華	P21		
劉子敬	P1		
(わ行)			
若松馨	3L1		
若松馨	P17		
渡部徳子	P49		
渡部徳子	P85		
渡邊英宏	P61		

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
Anthony Watts Anthony Watts	Department of Biochemistry Oxford University South Parks Road, Oxford OX1 3QU, UK	44-1865-275268 awatts@bioch.ox.ac.uk	44-1865-275234 /275259
Cheryl H. Arrowsmith Cheryl H. Arrowsmith	Ontario Cancer Institute and Department of Medical Biophysics University of Toronto 610 Univ. Avenue, Toronto Ontario, Canada M5G 2M9	1-416-946-2017 carrow@oci.utoronto.ca	1-416-946-6529
David Cowburn David Cowburn	The Rockefeller University 1230 York Avenue NY, NY 10021-6399, USA	1-212-327-8270 cowburn@mriris.rockefeller.edu	1-646-349-2840
John L. Markley John L. Markley	Department of Biochemistry University of Wisconsin-Madison 420 Henry Mall, Madison Wisconsin, WI 53706, USA	1-608-263-9349 markley@nmrfam.wisc.edu	1-608-262-3453
Markus Waelchli Markus Waelchli	日本ブルカー株式会社 アプリケーション部 305-0051 茨城県 つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 mrw@bruker.co.jp	0298-58-0322
Rajesh Sundaresan Rajesh Sundaresan	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	048-467-9538 rajesh@louise.riken.go.jp	048-467-5692
Timothy A. Cross Timothy A. Cross	NMR Spectroscopy and Imaging Program Director National High Magnetic Field Laboratory 1800 E. Paul Dirac Drive, Tallahassee, FL 32310, USA	cross@magnet.fsu.edu	
相見敬太郎 あいみけいたろう	東京工業大学 理工学研究科有機・高分子物質専攻 安藤慎治研究室 152-8552 東京都 目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2880 kaimi@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
赤坂 一之 あかさかかずゆき	神戸大学 大学院自然科学研究科 分子集合科学専攻 657-8501 兵庫県 神戸市灘区六甲台町1-1	078-803-5687 akasaka@kobe-u.ac.jp	078-803-5688
秋田 裕介 あきたゆうすけ	筑波大学 物理工学系 NMRイメージングラボ 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5335 akita@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
秋田 裕介 あきたゆうすけ	筑波大学 物理工学系 NMRイメージングラボ 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5335 akita@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
阿久津秀雄 あくつひでお	大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質物性研究部門 565-0871 大阪府 吹田市山田丘3-2	06-6879-8597 akutsu@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
浅川 直紀 あさかわ なおき	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻 226-8501 神奈川県 横浜市緑区長津田町4259	045-924-5796 nasakawa@bio.titech.ac.jp	045-924-5827
朝倉 哲郎 あさくらてつお	東京農工大学 工学部・生命工学科 184-8588 東京都 小金井市中町2-24-16	042-388-7025 asakura@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733
浅野 敦志 あさの あつし	防衛大学校 応用化学科 239-8686 神奈川県 横須賀市走水1-10-20	0468-41-3810 asanoa@nda.ac.jp	0468-44-5960

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
芦田 淳 あしだじゅん	バリアンテクノロジーズジャパン NMR応用部 108-0023 東京都 港区芝浦4-16-36	03-5232-1238 jun.ashida@varianinc.com	03-5232-1264
阿曾 幸男 あそゆきお	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	03-3700-1141 aso@nihs.go.jp	03-3707-6950
安達 清治 あだちせいじ	大阪大学 理学部 分析機器測定室 560-0031 大阪府 豊中市待兼山町1番1号	06-6850-5470 sadachi@chem.sci.osaka-u.ac.jp	06-6850-5470
穴井 孝弘 あないたかひろ	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 anai@jeol.co.jp	042-546-8068
阿部 絹子 あべきぬこ	東京水産大学 食品生産学科 生物資源化学講座 108-8477 東京都 港区港南4-5-7	03-5463-0643 f975004@cc.tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0643
新井 亮一 あらいりょういち	東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学薬機研究室 113-8656 東京都 東京都文京区本郷7-3-1	03-5841-7356 arai@bio.t.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8657
荒田 洋治 あらたようじ	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 5F	045-503-9294 arata@postman.riken.go.jp	045-503-9155
飯島 隆広 いじまたかひろ	金沢大学 理学部・化学科 理論化学研究室 920-1192 石川県 金沢市角間町	076-264-5686 ijijima@wrron1.s.kanazawa-u.ac.jp	076-264-5742
池田 武藏 いけだたけよし	日本電子株式会社 分析機器技術本部 NMグループ 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 tikeda@jeol.co.jp	042-546-8068
池田 龍一 いけだりゅういち	筑波大学 化学系 無機物理化学 300-85 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-4250 ikedata@chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-4250
生駒 和也 いこまかずや	京都府立医科大学 第1生理 602-0941 京都府 京都市上京区河原町広小路上の梶井町465	075-251-5311 k-ikoma@mva.biglobe.ne.jp	075-251-0295
石田 信昭 いしだのぶあき	食品総合研究所 分析評価部 305-8642 茨城県 つくば市観音台2-1-2	0298-38-8057 nobu@nfri.affrc.go.jp	0298-38-7996
石塚 靖子 いしづかやすこ	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	0298-61-6125 ishizuka@nibh.go.jp	0298-61-6135
市川さおり いちかわさおり	日本女子大学 理学部 物質生物科学科 112-8681 東京都 文京区目白台2-8-1	03-3943-3131 ichikawa@jwu.ac.jp	03-3942-6116
射手園 佳子 いてそのよしこ	日本ロシュ(株)研究所 化学部 機器分析グループ 247-8530 神奈川県 鎌倉市梶原200	0467-47-2209 yoshiko.itezono@roche.com	0467-45-6815

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
伊藤 拓宏 いとうたくひろ	東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻 113-0033 東京都 文京区本郷7-3-1	03-5841-4394 t_ito@biochem.s.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8057
伊藤 隆 いとうゆたか	理化学研究所 遺伝生化学研究室 351-0098 埼玉県 和光市広沢2-1	048-467-9540 ito@louise.riken.go.jp	048-467-5692
稲垣 冬彦 いながきふゆひこ	北海道大学 大学院薬学研究科 構造生物学 060-0812 北海道 札幌市北区北12条西3丁目	011-706-3975 finagaki@pharm.hokudai.ac.jp	011-706-4979
井上 真 いのうえまこと	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 2F W219	045-503-9203 inoue@jota.riken.go.jp	045-503-9201
井ノ岡 博 いのおかひろし	武田薬品工業(株) 開拓第5研究所 532-8686 大阪府 大阪市淀川区十三本町2-17-85	06-6300-6401 Inooka_Hiroshi@takeda.co.jp	06-6300-6086
井町美佐子 いまちみさこ	日本ブルカー株式会社 アプリケーション部 305-0051 茨城県 つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 mi@bruker.co.jp	0298-58-0322
今成 司 いまなりまもる	日本電子データム_ CSグループ 190-0012 東京都 立川市曙町2-8-3	042-526-5065 imanari@jeol.co.jp	042-526-5265
岩下 孝 いわしたたかし	(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	075-962-3742 iwashita@sunbor.or.jp	075-962-2115
岩瀬由紀子 いわせゆきこ	福岡大学 薬学部 中央機器室 814-0180 福岡県 福岡市城南区七隈8-19-1	092-871-6631 wase@fukuoka-u.ac.jp	092-863-0389
植木 定雄 うえきさだお	日本ブルカー株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県 つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 su@bruker.co.jp	0298-58-0322
上田 貴洋 うえだたかひろ	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1-16	06-6850-5779 ueda@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5785
植松 孝明 うえまつたかあき	筑波大学 物理工学系 巨瀬研究室 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 uematsu@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
宇津澤 慎 うつざわしん	(株) エム・アール・テクノロジー 第一技術開発室 300-2642 茨城県 つくば市高野169-1	0298-47-8220 utsuzawa@mrtechnology.co.jp	0298-47-5205
内海 博明 うつみひろあき	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 utumi@jeol.co.jp	042-546-8068
梅本 公子 うめもときみこ	国際基督教大学 教養学部理学科 化学教室 181-8585 東京都 三鷹市大沢3-10-2	0422-33-3256 umemoto@icu.ac.jp	0422-33-1449

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
江奈武一郎 えなぶいちろう	東京都立大学大学院 理学研究科 有機化学第一研究室 192-0397 東京都 八王子市南大沢1-1	0426-77-1111内線 3551 ena@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2544
大石 修 おおいしおさむ	岡崎国立共同研究機構分子科学研究所 分子集団動力学 444-8585 愛知県 岡崎市明大寺町字西郷中38番地	0564-55-7427 oishi@ims.ac.jp	0564-54-2254
大木 出 おおきいずる	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 生体高分子構造学講座 630-0101 奈良県 生駒市高山町 8916-5	0743-72-5576 i-ooki@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5579
大木 進野 おおきしんや	東京都立大学 理学部化学科 甲斐荘研究室 192-0397 東京都 八王子市南大沢1-1	0426-77-1111-35 52 ohki@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-3539
大久保 征治 おおくぼせいじ	東京薬科大学 薬学部 第一分析 192-0392 東京都 八王子市堀之内1432-1	0426-76-4542 y961045@educ.ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4542
大島 (坂本) 曜子 おおしま (さかもと) ようこ	東邦大学 薬学部 中央機器室・NMR 274-8510 千葉県 船橋市 三山 2-2-1	047-472-1282 sakamoto@phar.toho-u.ac.jp	047-472-1282
大竹 亮子 おおたけりょうこ	味の素 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	044-210-5923(73 66) ryoko_ohtake@ajinomoto.com	044-211-7609
大塚 久男 おおつか ひさお	田辺製薬(株) 創薬研究所 335-8505 埼玉県 戸田市川岸2-2-50	048-433-2602 h-otsuka@tanabe.co.jp	048-433-2610
大津 直子 おおつなおこ	味の素株式会社 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	044-244-7249 naoko_ohtsu@ajinomoto.com	044-210-5872
大野 綾子 おおのあやこ	東京都立大学院大学 理学研究科 有機第一研究室 192-0397 東京都 東京都八王子市南大沢1-1	0426-77-1111 ayako@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-4873
大野 靖 おおのやすし	日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 569-1125 大阪府 高槻市紫町1-1	0726-81-9700 yasushi.ono@ims.jti.co.jp	0726-81-9725
大山 真 おおやままこと	明治製菓株式会社 薬品総合研究所 創薬研究所 222-8567 神奈川県 横浜市港北区師岡町760	045-545-3125 makoto_oyama@meiji.co.jp	045-545-3199
岡田 輝政 おかだてるまさ	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 teokada@jeol.co.jp	042-546-8068
岡田 潔 おかだきよし	千葉工業大学 工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 kiyoshi@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
岡田 亮 おくだりょう	東京水産大学 食品生産学科 生物資源化学講座 108-8477 東京都 港区港南4-5-7	03-5463-0643 f d 00506@cc.tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0643

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
岡本 和也 おかもとかずや	(株)東芝 医用システム社 医用機器・シミュレーション開発センター 324-8550 栃木県 大田原市下石上1385	0287-26-6488 kazuya.okamoto@toshiba.co.jp	0287-26-6066
小川 潔 おがわきよし	旭化成工業(株) 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	0558-76-7085 ogawa.kg@om.asahi-kasei.co.jp	0558-76-2947
荻野 孝史 おぎのたかし	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	042-341-2711 ogino@ncnp.go.jp	042-342-7521
小野 克輝 おのかつき	東京薬科大学 生命学部 第一分析 192-0392 東京都 八王子市堀之内1432-1	0426-76-4542 s957028@educ.ls.toyaku.ac.jp	0426-76-4542
海藤美岐子 かいどうみきこ	千葉工業大学 工学部・工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 mikiko@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
垣田 信吾 かきたしんご	協和醗酵工業株式会社 東京研究所 分析G 194-8533 東京都 町田市旭町3-6-6	042-725-2555 skakita@kyowa.co.jp	042-726-8330
梶 弘典 かじひろのり	京都大学 化学研究所 材料物性基礎研究部門 611-0011 京都府 宇治市五ヶ庄	0774-38-3149 kaji@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
片岡 弘 かたおかひろし	大阪工業技術研究所 材料物理部 界面物性研究室 563-8577 大阪府 大阪府池田市緑丘1-8-31	0727-51-9618 Hiroshi.Kataoka@onri.go.jp	0727-51-9714
片平 正人 かたひらまさと	横浜国立大学 工学部物質工学科 240-8501 神奈川県 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4264 masakata@ynu.ac.jp	045-339-4264
片平 律子 かたひらりつこ	協和醗酵工業株式会社 東京研究所 分析G 194-8533 東京都 町田市旭町3-6-6	042-725-2555 rkatahira@kyowa.co.jp	042-726-8330
加藤 悦子 かとうえつこ	農水省 農業生物資源研究所 生物工学部 糖鎖工学研究室 305-8603 茨城県 つくば市観音台2-1-2	0298-38-7072 ekatoh@abr.affrc.go.jp	0298-38-8399
加藤 晃一 かとうこういち	名古屋市立大学 薬学部 薬品製造工学教室 467-8603 愛知県 名古屋市瑞穂区田辺通3-1	052-836-3447 kkato@phar.nagoya-cu.ac.jp	052-836-3447
加藤 祐子 かとうゆうこ	東和大学 東洋学研究所 828-0082 福岡県 福岡県豊前市大河内312番地	0979-84-5005 yukato@bronze.ocn.ne.jp	0979-84-5004
門 良一 かどりょういち	京都産業大学 理学部 物理学科 603-8555 京都府 京都市北区上賀茂本山	075-705-1634 kador@cc.kyoto-su.ac.jp	075-705-1640
金川真由美 かながわまゆみ	千葉工業大学 工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	0474-78-0425 kanagawa@ic.it-chiba.ac.jp	0474-78-0425

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
金久保光央 かなくぼみつひろ	東北工業技術研究所 機能化学部 反応化学研究室 983-8551 宮城県 仙台市宮城野区苦竹4-2-1	022-237-5211 kanakubo@tniri.go.jp	022-237-5224
金坂将 かねさかしょう	東京水産大学 食品生産学科 生物資源化学講座 108-8477 東京都 港区港南4-5-7	03-5463-0643 fm00519@cc.tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0643
金橋 康二 かねはしこうじ	新日本製鐵(株)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	0439-80-2264 kanehasi@re.nsc.co.jp	0439-80-2746
狩野 広美 かのひろみ	農業生物資源研究所 生理機能部 光合成研究室 305-8602 茨城県 つくば市観音台2-1-2	0298-38-8378 mkoizumi@nfri.affrc.go.jp	0298-38-7408
上平 美弥 かみひらみや	姫路工業大学 理学部生命科学科 生物物質構造II 678-1297 兵庫県 赤穂郡上郡町光都3-2-1	0791-58-0182 kamihira@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182
亀田 恒徳 かめだつねのり	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	042-388-7025 tkameda@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733
狩谷 英里 かりやえり	東京都立大学 理学研究科 有機化学第一研究室 192-0397 東京都 八王子市南大沢1-1	0426-77-1111 内線(355) kariya@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2544
河合 剛太 かわいごうた	千葉工業大学 工業化学科 275-8588 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 gkawai@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
川口 謙 かわぐちけん	(株)東レリサーチセンター 構造解析研究室 248-8555 神奈川県 鎌倉市手広1111	0467-32-9974 Ken_Kawaguchi@trc.toray.co.jp	0467-32-0414
川口 信治 かわぐちしんじ	武田薬品工業(株) 開発品質管理部 532-8686 大阪府 大阪市淀川区十三本町2-17-85	06-6300-6093 Kawaguchi_Shinzi@takeda.co.jp	06-6300-6251
川島 裕之 かわしまひろゆき	資源環境技術総合研究所 エネルギー資源部 石炭物性研究室 305-8569 茨城県 つくば市小野川16-3	hk@nire.go.jp	
河野 敬一 かわのけいいち	富山医科薬科大学 薬学部 構造生物学研究室 930-0194 富山県 富山市杉谷2630	076-434-5061 kawano@ms.toyama-mpu.ac.jp	076-434-5061
木川 隆則 きくわたかのり	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 2F W213	045-503-9203 kigawa@jota.riken.go.jp	045-503-9201
菊地 淳 きくちじゅん	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 2F W213	045-503-9203 kikuchi@jota.riken.go.jp	045-503-9201
木田 博 きだ じゅん	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 kida@jeol.co.jp	042-546-8068

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
氣田 佳喜 きだ よしき	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 ykida@jeol.co.jp	042-546-8068
北尾彰朗 きたおあきお	京都大学 大学院理学研究科 化学専攻・量子化学分科 606-8502 京都府 京都市左京区北白川追分町	075-753-3670 kitao@qchem.kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-3669
北原亮 きたはらりょう	神戸大学 自然科学研究科 分子集合科学専攻 657-8501 兵庫県 神戸市灘区六甲台1-1	078-803-6529 r-kitahara@grad701e.scitec.kobe-u.ac.jp	078-803-6529
金仁実 きむいんしる	東京大学 大学院理学系研究科 生物化学山研究室 113-0033 東京都 文京区本郷7-3-1	03-5841-4393 kim@biochem.s.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8057
木村 英昭 きむらひであき	化学技術戦略推進機構 先進材料研究所 つくばケイ素研究室 305-0047 茨城県 つくば市千現2-1-6	0298-58-6107 jciikimura@ma3.justnet.ne.jp	0298-58-6232
木村 雅晴 きむらまさはる	住友化学工業株式会社 生物環境科学研究所 分析物性グループ 554-8558 大阪府 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号	06-6466-5171 kimuram@sumitomo-chem.co.jp	06-6466-5459
木村由美子 きむらゆみこ	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	047-465-7362 kimura@pha.nihon-u.ac.jp	047-465-7362
串田 克彦 くしだかつひこ	バリアンテクノロジーズジャパン NMR応用部 108-0023 東京都 港区芝浦4-16-36	03-5232-1238 katsuhiko.kushida@varianinc.com	03-5232-1264
熊澤 茂則 くまざわしげのり	静岡県立大学 食品栄養科学部 食品製造工学研究室 422-8526 静岡県 静岡市谷田52-1	054-264-5525 kumazawa@smail.u-shizuoka-ken.ac.jp	054-264-5551
久米田博之 くめたひろゆき	工技院北海道工業技術研究所 低温生物化学部 機能物質化学研究室 062-8517 北海道 札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1	011-857-8912 kumeta@hniri.go.jp	011-857-8983
倉島 かおり くらしまかおり	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	048-467-9540 kurasima@louise.riken.go.jp	048-462-4671
栗原 範明 くりはらのりあき	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 kurihara@jeol.co.jp	042-546-8068
栗原 良仁 くりはらよしひと	群馬大学 工学部材料工学科 機能物質化学第三研究室 376-8515 群馬県 桐生市天神町1-5-1	0277-30-1330 kurihara@polymer.chem.gunma-u.ac.jp	0277-30-1333
栗本 智充 くりもとともみつ	日本電子(株) システム技術本部 第1システムグループ 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2235 kurimoto@jeol.co.jp	042-546-7225
黒子 弘道 くろすひろみち	奈良女子大学 大学院人間文化研究科 人間環境基礎講座 630-8506 奈良県 奈良市北魚屋西町	0742-20-3461 kurosu@cc.nara-wu.ac.jp	0742-20-3461

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
黒田 義弘 くろだよしひろ	京都大学 薬学研究科 製剤機能解析学 606-8501 京都府 京都市左京区吉田下阿達町46-29	075-753-4530 yokuroda@pharm.kyoto-u.ac.jp	075-753-4578
桑田 一夫 くわたかずお	岐阜大学 医学部 生理学第二 500-8705 岐阜県 岐阜市司町40	058-267-2227 kuwata@cc.gifu-u.ac.jp	058-267-2962
桑野 晴光 くわのはるみつ	無所属 194-0043 東京都 町田市成台1-17-9	042-725-4693 qa@nmr39.riken.go.jp	
桑原 和弘 くわばら かずひろ	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	0774-38-3152 kuwabara@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
桑原 愛 くわはらあい	筑波大学大学院 化学研究科 山本研究室 305-8571 茨城県 つくば市天王台1丁目1番1号	0298-53-7369 ai29@first.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369
桑原 大介 くわはらだいすけ	分子科学研究所 分子物質開発研究センター 444-8585 愛知県 岡崎市明大寺町字西郷中38	0564-55-7471 kuwahara@ims.ac.jp	0564-55-7448
小泉 美香 こいずみみか	食品総合研究所 分析評価部 品質情報解析研究室 305-8642 茨城県 つくば市観音台2-1-2	0298-38-8057 mkoizumi@nfri.affrc.go.jp	0298-38-7996
国府田 明 こうだ あきら	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 kohda@jeol.co.jp	042-546-8068
河野 隆英 こうのたかひで	富山医科薬科大学 薬学部 構造生物学研究室 930-0194 富山県 富山市杉谷2630	076-434-7571 pm009007@st.toyama-mpu.ac.jp	076-434-5061
河野 俊之 こうのとしゆき	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	042-724-6285 tkohno@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
古布村 亮次 こうむらりょうじ	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	075-753-4015 ryojik@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
越野 広雪 こしのひろゆき	理化学研究所 物質基盤研究部 分子構造解析室 351-0198 埼玉県 和光市広沢2-1	048-462-1111 koshino@postman.riken.go.jp	048-462-4627
小柴 生造 こしばせいぞう	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 2F W213	045-503-9203 koshiba@postman.riken.go.jp	045-503-9201
小島 正樹 こじま まさき	東京薬科大学 生命科学部 分子生化学研究室 192-0392 東京都 東京都八王子市堀之内1432-1	0426-76-7153 mkojima@ls.toyaku.ac.jp	0426-76-7157
小島 登貴子 こじまときこ	埼玉県工業技術センター北部研究所 生物工学部 360-0031 埼玉県 熊谷市末広2-133	048-521-0614 tkojima@tech-lab.pref.saitama.jp	048-525-6052

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
巨瀬 勝美 こせかつみ	筑波大学 物理工学系 NMRイメージングラボ 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5335 kose@bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
小橋川 敬博 こばしがわ よしひろ	北海道大学 理学部 生物科学専攻 生体高分子解析学第3講座 060-0810 北海道 札幌市北区北10条西8丁目	011-706-2771 koba@hniri.go.jp	011-706-2771
小林 邦子 こばやしくにこ	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	042-724-6285 kuniko@libra.lis.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
小森 佳彦 こもりよしひこ	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	0298-61-4515 komori@nimc.go.jp	0298-61-4515
齋藤 公児 さいとうこうじ	新日本製鐵(株) 先端技術研究所 解析科学研究部 293-8511 千葉県 富津市新富20-1	0439-80-2270 saito@re.nsc.co.jp	0439-80-2746
斉藤 誠治 さいとうせいじ	筑波大学 物理工学系 松井研究室 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5021 seiji@ctlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
齋藤 剛 さいとうたけし	物質工学工業技術研究所 計測化学部 高分子分子特性解析グループ 305-8565 茨城県 つくば市東1-1	0298-61-4525 saito@nimc.go.jp	0298-61-4525
斉藤 肇 さいとうはじめ	姫路工業大学 理学部生命科学科 生体物質構造学II講座 678-1297 兵庫県 赤穂郡上郡町光都3-2-1	0791-58-0181 saito@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182
酒井 晴彦 さかいはるひこ	田辺製薬株式会社 製品技術研究所 分析化学研究部 532-8505 大阪府 大阪市淀川区加島3丁目16番89号	06-6300-2903 haru-sk@tanabe.co.jp	06-6300-2629
坂本 泰一 さかもとたいいち	千葉工業大学 工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 taichi@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
佐久間千勢子 さくまちせこ	東京薬科大学 薬学部 中央分析センター 192-0392 東京都 八王子市堀之内1432-1	0426-76-4041 sakumac@ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4041
櫻井 智司 さくらいさとし	日本電子株式会社 応用研究センター 第2応用研究センター 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2241 sasakura@jeol.co.jp	042-542-3132
笹川 拡明 ささかわひろあき	神戸大学 自然科学研究科・分子集合科学 657-8501 兵庫県 神戸市六甲台町1-1	078-803-5692 sasakawa@kobe-u.ac.jp	078-803-5692
佐々木英典 ささきひでのり	筑波大学 物理工学系 NMRイメージングラボ 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 sasaki@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
佐々木啓孝 ささきひろたか	東京大学 理学部化学科 天然物化学研究室 113-0033 東京都 文京区本郷7-3-1	03-5841-8059 hsasaki@chem.s.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8059

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
佐藤 滋夫 さとうしげお	中外製薬株式会社 富士御殿場研究所 化学研究所 412-8513 静岡県 御殿場市駒門1-135	0550-87-6728 satosgo@gt.chugai-pharm.co.jp	0550-87-5326
佐藤 一 さとうはじめ	日本ブルカー株式会社 アプリケーション部 305-0051 茨城県 つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 one@bruker.co.jp	0298-58-0322
沢辺 紀子 さわべのりこ	東京理科大学 162-0826 東京都 新宿区千ヶ谷船河原町12	bunkouns@ps.kagu.sut.ac.jp	
七野 藤美 しちのふじよし	_アズウェル 研究開発部 化学研究室 567-0806 大阪府 茨木市庄2-24-3	0726-22-4941 nskrd-12@mbd.sphere.ne.jp	0726-24-7004
志野 英雄 しの ひでお	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 shino@jeol.co.jp	042-546-8068
篠原 絵美 しのはらえみ	筑波大学 化学研究科 無機物理化学研究室 305-8571 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-4487 shinohara@ipchemgw.chem.tsukuba.ac.jp	無し
篠原 美奈 しのはらみな	味の素株式会社 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	044-244-7249 mina_shinohara@ajinomoto.com	044-210-5872
嶋田 一夫 しまだいちお	東京大学 大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 113-0033 東京都 文京区本郷7-3-1	03-5841-4810 shimada@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp	03-3815-6540
島田 智子 しまだともこ	旭化成工業株式会社 基盤技術センター 解析技術室 416-8501 静岡県 富士市鮫島2-1	0545-62-3161 shimada.td@om.asahi-kasei.co.jp	0545-62-3159
下池田 勇一 しもいけだゆういち	日本電子株式会社 応用研究センター 第2応用研究センター1G 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2241 yshimoik@jeol.co.jp	042-542-3132
白川 昌宏 しらかわまさひろ	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 生体高分子構造学講座 630-0101 生駒市高山町8916-5	0743-72-5571 shira@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5579
榛葉 信久 しんばのぶひさ	味の素_ 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	044-244-7145 nobuhisa_shimba@ajinomoto.com	044-210-5872
末継 淳 すえつぐあつし	東京大学 農学部 164-0011 東京都 中野区中央3-11-3-5	03-3369-5049 suetsugu@par.odn.ne.jp	
末松 浩人 すえまつひろと	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 suematsu@jeol.co.jp	042-546-8068
杉浦 寿史 すぎうらひさし	名古屋工業大学 工学部・材料工学科 有機材料コース・辻田研究室 466-8555 愛知県 名古屋市昭和区御器所町	052-735-5272 sugiura@mse.nitech.ac.jp	052-735-5272

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
鈴木 栄一郎 すずきえいいちろう	味の素 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	044-210-5832 eiichiro_suzuki@ajinomoto.com	044-210-5872
鈴木 崇洋 すずきたかひろ	筑波大学 理工学研究科 巨瀬研究室 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5335 suzuki@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
鈴木 智幸 すずきともゆき	名古屋工業大学 工学部・材料工学科 有機材料コース・辻田研究室 466-8555 愛知県 名古屋市昭和区御器所町	052-735-5272 suzuki@mse.nitech.ac.jp	052-735-5272
瀬尾 芳輝 せおよしてる	京都府立医科大学 医学部 第一生理学教室 602-0841 京都府 京都市上京区河原町広小路上がる梶井町	075-251-5311 yseo@rj8.so-net.ne.jp	075-251-0295
関 宏子 せきひろこ	千葉大学 分析センター 263-8522 千葉県 千葉市稲毛区弥生町1-33	043-290-3810 seki@cac.chiba-u.ac.jp	043-290-3813
染谷 龍彦 そめや たつひこ	千葉工業大学 工学部 工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 someya@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
高杉 憲司 たかすぎけんじ	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	048-467-9538 takasugi@louise.riken.go.jp	048-467-5692
高瀬 茂弘 たかせしげひろ	藤沢薬品工業株式会社 探索研究所 300-2698 茨城県 つくば市東光台5-2-3	0298-47-8611 shigehiro_takase@po.fujisawa.co.jp	0298-47-8313
高橋 征三 たかはしせいぞう	日本女子大学 理学部・物質生物科学科 生物物理化学研究室 112-8681 東京都 文京区目白台2-8-1	03-3943-3131 t_seizo@jwu.ac.jp	03-3942-6116
高橋 信幸 たかはしのぶゆき	大阪大学大学院 理学研究科 構造物理化学研究室 560-0043 大阪府 豊中市待兼山町1-16共通教育化学棟	06-6850-5779 nobu@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5785
高山 俊夫 たかやまとしお	神奈川大学 工学部 応用化学科 2221-8686神奈川県 横浜市神奈川区六角橋3-27-1	045-481-5661,32 06 takayt01@kanagawa-u.ac.jp	045-413-9770
高山 陽子 たかやまようこ	塩野義製薬株式会社 創薬研究所物理化学部門 553-0002 大阪府 大阪市福島区鷺洲5-12-4	06-6458-5861 yohko.takayama@shionogi.co.jp	06-6458-0987
竹内 浩 たけうちひろし	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 北海道 札幌市北区北10条西8丁目	011-706-3506 takehi@sci.hokudai.ac.jp	011-706-4924
竹内 敬人 たけうちよしと	神奈川大学 理学部・化学科 259-1293 神奈川県 平塚市土屋2946	0463-59-4111 yoshito@chem.kanagawa-u.ac.jp	0462-58-9684
竹腰清乃理 たけこし きよのり	京都大学 大学院理学研究科 化学教室 606-8502 京都府 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
武貞 啓子 たけさだひろこ	なし なし 161-0033 東京都 新宿区下落合2-18-15	03-3951-4551 ZVP01037@nifty.ne.jp	03-3951-4551
武田 和行 たけだかずゆき	CREST(戦略的基礎研究推進事業) 電子・光子等の機能制御 606-8502 京都府 京都市左京区北白川追分町	075-753-4014 takeda@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
田代 櫻子 たしろさくらこ	東京薬科大学 薬学部 192-0392 東京都 八王子市堀之内1432-1	0426-76-4542 tashiro@ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4542
田代 充 たしろみつる	東京都立大学 理学部化学科 192-0359 東京都 八王子市南大沢1-1	0426-77-1111 (x3552) tashiro@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2525
楯 真一 たてしんいち	北陸先端科学技術大学院大学 新素材センター 923-1292 石川県 能美郡辰口町旭台1-1	0761-51-1461 tate@jaist.ac.jp	0761-51-1455
田中 良二 たなかりょうじ	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 rtanaka@jeol.co.jp	042-546-8068
田中 剛史 たなかたけし	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	042-724-6285 takeshi@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
田中 俊之 たなかとしゆき	筑波大学 応用生物化学系 305-8572 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-6065 ttanaka@tara.tsukuba.ac.jp	0298-53-6065
田中 彬嗣 たなかよしつぐ	九州大学大学院 薬学研究院 812-8582 福岡県 福岡市東区馬出3-1-1	092-642-6551 kurihide@pch.phar.kyushu-u.ac.jp	092-642-6551
谷生 道一 たにおみちかず	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	0791-58-0182 tanio@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182
田端 一敏 たばたかずとし	千葉工業大学 工学部工業化学科 274-0805 千葉県 船橋市二和東6丁目15番地4棟402号室	047-449-1504 kazu@ic.it-chiba.ac.jp	047-449-1504
田畑 祥生 たばたさちお	シーエーシーズ(株) 四日市分析センター 510-8530 三重県 四日市市東邦町1番地	0593-45-7363 2100502@cc.m-kagaku.co.jp	0593-45-7419
田村 友美 たむらともみ	日本ブルカー株式会社 マーケティング部 532-0004 大阪府 大阪市淀川区西宮原1-8-29	06-6339-7008 tot@bruker.co.jp	06-6339-9559
千葉かおり ちばかおり	工業技術院 生命工学工業技術研究所 生物物質部 305-8566 茨城県 つくば市東1-1	0298-61-6136 kchiba@neutrons.tokai.jaeri.go.jp	0298-61-6135
辻 暁 つじさとる	姫路工業大学 理学部 678-1297 兵庫県 赤穂郡上郡町光都3-2-1 姫路工業大学理	0791-58-0182 tuzi@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
津田 栄 つださかえ	工技院北海道工業技術研究所 低温生物化学部 機能物質化学研究室 062-8517 北海道 札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1	011-857-8912 tsuda@hniri.go.jp	011-857-8983
堤 耀広 つみあきひろ	北海道大学大学院 工学研究科・量子物理工学専攻物質物理学講座 060-8628 北海道 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6638 atsutsu@eng.hokudai.ac.jp	011-716-6175
津野 久幸 つのひさゆき	日本電子株式会社 応用研究センター 第2応用研究センター 196-855 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2241 htsuno@jeol.co.jp	042-542-3132
出村 誠 でむらまこと	北海道大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 060-0810 北海道 札幌市北区北10条西8丁目	011-706-2771 demura@sci.hokudai.ac.jp	011-706-2771
寺尾 武彦 てらおたけひこ	京都大学 大学院理学研究科 化学教室 606-8502 京都府 京都市左京区北白川追分町	075-753-4011 terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
土居 幹嗣 どいもとつぐ	大阪大学理学部 理学研究科、化学科 NMR測定室 560-0043 大阪府 豊中市待兼山町1-1	06-6850-5470 mdoi@chem.sci.osaka-u.ac.jp	06-6850-5469
堂本 竹雄 どうもとたけお	日本ブルカー株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県 つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 td@bruker.co.jp	0298-58-0322
土江松美 どえまつみ	大阪市立大学 理学部理学研究科 化学科専攻 558-8585 大阪府 大阪市住吉区杉本3-3-138	06-6605-2597 matsumi@sci.osaka-cu.ac.jp	06-6605-2522
泊 輝久 とまりてるひさ	東京薬科大学 薬学部 第一薬品分析化学教室 192-0392 東京都 八王子市堀之内1432-1	0426-76-4544 y951164@educ.ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4542
内藤 晶 ないとうあきら	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3-2-1	0791-58-0180 naito@sci.himeji-tech.ac.jp	0791-58-0182
中井 利仁 なかいとしひと	バリアンテクノロジーズジャパン NMR応用部 108-0023 東京都 港区芝浦4-16-36	03-5232-1238 toshihito.nakai@varianinc.com	03-5232-1264
中井 正徳 なかいまさのり	千葉工業大学 工学部工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 masa@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
永阪 文惣 ながさかぶんそう	帝人(株) 構造解析研究所 191-8512 東京都 日野市旭ヶ丘4-3-2	042-586-8121 bunsow@hino.teijin.co.jp	042-586-8123
長縄 博 ながなわひろし	微生物化学研究所 化学部 141-0021 東京都 品川区上大崎3丁目14-23	03-3441-4173 naganawah@bikaken.or.jp	03-3441-7589
中野 茂 なかのしげる	東京薬科大学 薬学部 第一分析 192-0392 東京都 八王子市堀之内1432-1	0426-76-4542 y961163@educ.ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4542

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
中村 新治 なかむら しんじ	京都大学 大学院理学研究科化学教室 分子構造研究室 606-8224 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 nakashin@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
中村 亘男 なかむら のぶお	大阪大学 大学院理学研究科・化学専攻 物理化学講座・構造物理化学研究室 560-0043 大阪府 豊中市待兼山町1番16号	06-6850-5791 nobuo@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5785
仲村 高志 なかむらたかし	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	048-467-9362 nakamura@rikenmr.riken.go.jp	048-462-4627
中村 義之 なかむらよしゆき	東京工業大学 資源化学研究所 226-8503 神奈川県 横浜市緑区長津田町4259	045-924-5110 ynakamur@res.titech.ac.jp	045-924-5109
中山 登 なかやま のぼる	日本ロシュ(株) 研究所 化学部 機器分析グループ 247-8530 神奈川県 鎌倉市梶原200	0467-47-2209 noboru.nakayama@roche.com	0467-45-6815
行木 信一 なめきのぶかず	千葉工業大学 工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 千葉県習志野市津田沼2-17-1	0474-78-0425 nameki@ic.it-chiba.ac.jp	0474-78-0425
西川 実希 にしかわみき	神奈川大学 理学部化学科 竹内敬人研究室 259-1293 神奈川県 平塚市土屋2946	0463-59-4111 s956746@educ.info.kanagawa-u.ac.jp	0463-58-9684
西崎 知子 にしざきともこ	三共株式会社 バイオメディカル研究所 研究第1グループ 140-8710 東京都 品川区広町1-2-58	03-3492-3131 tomonz@shina.sankyo.co.jp	03-5436-8567
西山 裕介 にしやまゆうすけ	分子科学研究所 相関領域研究系 分子クラスター部門 444-8585 愛知県 岡崎市明大寺町字西郷中38番地	0564-55-7459 nisiyama@ims.ac.jp	0564-54-2254
根本 暢明 ねもとのぶあき	バリアンテクノロジーズジャパン NMR応用部 108-0023 東京都 港区芝浦4-16-36	03-5232-1238 nobuaki.nemoto@varianinc.com	03-5232-1264
野口 聡子 のぐちさとこ	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター たんぱく質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 CRT室	045-503-9229 sn@jota.riken.go.jp	045-503-9228
野口 滋 のぐちしげる	第一製薬株式会社 製薬技術研究所 134-8630 東京都 江戸川区北葛西1-16-13	03-3680-0151 noguczow@daiichipharm.co.jp	03-5696-8339
野田 康夫 のだやすお	関西学院大学 理学部 662-8501 兵庫県 西宮市上ヶ原一番町1-155	0798-54-6230 yasuonoda@kwansei.ac.jp	0798-51-0914
野田 明宏 のだあきひろ	横浜国立大学 工学部 物質工学科 渡邊・今林研究室 240-8501 神奈川県 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-3955 d99jb016@cms.ynu.ac.jp	045-339-3955
野村 薫 のむらかおる	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	0426-77-1111 nomura@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-4873

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
野村 祐介 のむらゆうすけ	千葉工業大学 工学部工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 yusuke@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
拝師 智之 はいしともゆき	筑波大学 物理工学系 巨瀬研究室 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 haishi@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
端健 二郎 はしけんじろう	理化学研究所 ミュオン科学研究室 351-0198 埼玉県 和光市広沢2-1	048-467-9588 k-hashimoto@postman.riken.go.jp	048-462-4648
橋爪 貴宏 はしづめよしひろ	筑波大学 理工学研究科 山本研究室 305-0006 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-7370 s003405@ipe.tsukuba.ac.jp	0298-53-7370
橋本征太郎 はしもとせいたろう	筑波大学 物理工学系 巨瀬研究室 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 seitarou@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
橋本 康博 はしもとやすひろ	旭化成工業 基盤技術センター 416-8501 静岡県 富士市数島2-1	0545-62-3161 a9311611@ut.asahi-kasei.co.jp	0545-62-3159
長谷川 淳 はせがわじゅん	第一製薬株式会社 創薬開発研究所 134-8630 東京都 江戸川区北葛西1-16-13	03-3680-0151 haseg7li@daiichipharm.co.jp	03-5696-4266
畠山 盛明 はたけやまもりあき	日鐵テクノロジー 解析部 構造解析2 293-0011 千葉県 富津市新富20-1	0439-80-2691 moriaki@re.nsc.co.jp	0439-80-2767
畠中 秀樹 はたなかひでき	東京都臨床医学総合研究所 生理活性物質研究部門 113-8613 東京都 文京区本駒込3-18-22	03-3823-2101 ex.5264 hatanaka@rinshoken.or.jp	03-3823-1247
畑中 稔 はたなかみのる	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センタータンパク質構造・機能研究グループ 351-0198 埼玉県 和光市広沢2-1	048-462-1111 -5421 hatanaka@louise.riken.go.jp	048-462-4675
秦野 賢一 はたのけんいち	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	0277-30-1437 hatano@bce.gunma-u.ac.jp	0277-30-1437
服部 峰之 はっとりみねゆき	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	0298-61-5537 mhattori@etl.go.jp	0298-61-3364
花岡 慎悟 はなおかしんご	横浜市立大学大学院 総合理学研究科 西村研究室 236-0027 神奈川県 横浜市金沢区瀬戸22-2	045-787-2188 shana@yokohama-cu.ac.jp	045-787-2188
馬場 清喜 ばばせいき	千葉工業大学 工業化学科 河合研究室 275-8588 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 baba@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
馬場 雄久 ばばたけひさ	北見工業大学 化学システム工学科 環境物理化学研究室 090-8507 北海道 北見市公園町165	0157-26-9414 take@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-24-7719

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
浜島 斉 はまじまひとし	三和化学研究所 創薬研究グループ 511-0406 三重県 員弁郡北勢町塩崎363	0594-72-6221 h_hamajima@mb4.skk-net.com	0594-82-0072
濱田 季之 はまたしゆき	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 1F W103	045-503-9212 thamada@jota.riken.go.jp	045-503-9210
林 文晶 はやし ふみあき	塩野義製薬 中央研究所 物理化学 553-0002 大阪府 大阪市福島区鷺洲5-12-4	06-6458-5861 fumiaki.hayashi@shionogi.co.jp	06-6458-0987
林 繁信 はやししげのぶ	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	0298-61-4515 hayashi@nimc.go.jp	0298-61-4515
林 裕希 はやしゆき	北里大学 理学部化学科 分子構造学講座 108-8477 東京都 港区港南4-5-7	03-5463-0643 rin@xg7.so-net.ne.jp	03-5463-0643
早水紀久子 はやみずきこ	物質工学工業技術研究所 305-8565 茨城県 つくば市東1-1	0298-61-4525 hayamizu@nimc.go.jp	0298-61-4525
原園 としえ はらぞのとしえ	シーエーシーズ(株) 横浜分析センター 有機分析G r 227-0033 神奈川県 横浜市青葉区鶴志田町1000	045-963-3166 harazono@rc.m-kagaku.co.jp	045-963-4261
原田 治幸 はらだはるゆき	京都大学 大学院工学研究科 分子工学専攻分子設計学講座 6068501 京都府 京都市左京区吉田本町	075-753-5937 haruyuki@mds.moleng.kyoto-u.ac.jp	075-751-7611
原 雄一 はらゆういち	中外製薬株式会社 製剤技術研究所 171-8545 東京都 豊島区高田3-41-8	03-3987-1178 harayui@chugai-pharm.co.jp	03-3987-5169
樋岡 克哉 ひおかかつや	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 hioka@jeol.co.jp	042-546-8068
百名 一男 ひゃくな かずお	日本電子株式会社 システム技術本部 1グループ 196-8558 東京都 昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2235 hyakuna@jeol.co.jp	042-546-7225
平井 佑紀 ひらいゆうき	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	0298-53-7369 hexagram@first.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369
平沖 敏文 ひらおきとしふみ	北海道大学大学院 工学研究科・量子物理学専攻量子物理分野 060-8628 北海道 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6640 hiraoki@eng.hokudai.ac.jp	011-716-6175
廣明 秀一 ひろあきひでかず	(株)生物分子工学研究所 構造解析研究部門 565-0874 大阪府 吹田市吉江台6-2-3	06-6872-8218 hiroakih@beri.co.jp	06-6872-8219
廣田 洋 ひろたひろし	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 1F W103	045-503-9211 hirota@jota.riken.go.jp	045-503-9210

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
福井 洋之 ふくいひろゆき	北見工業大学 化学システム工学科 090-8507 北海道 北見市公園町165	0157-26-9402 fukui@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-24-7719
福岡 由記 ふくおかゆき	横浜国立大学 工学研究科 阿久津・藤原研究室 240-8501 神奈川県 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4224 m99db118@ynu.ac.jp	045-339-4251
福島 径 ふくしまけい	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センタータンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 2F W219	045-503-9205 keifuku@jota.riken.go.jp	045-503-9201
福見 俊夫 ふくみとしお	大阪工業技術研究所 首席研究官 563-8577 大阪府 池田市緑丘1-8-31	0727-51-9670 fuku@onri.go.jp	0727-51-9633
藤井 直之 ふじいなおゆき	日本電子株式会社 第2応用研究センター 1グループ 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2241 nfujii@jeol.co.jp	042-542-3132
藤井 倫子 ふじいみちこ	千葉工業大学 工学部工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 rinko@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
藤倉 一繁 ふじくらかずしげ	バリアンテクノロジーズジャパン NMR 応用部 108-0023 東京都 港区芝浦4-16-36	03-5232-1238 kazushige.fujikura@varianinc.com	03-5232-1264
藤本 孝子 ふじもとたかこ	日本電子(株) 応用研究センター 第2応用研究センター 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2241 tfujimot@jeol.co.jp	042-542-3132
藤原 正子 ふじわらまさこ	日本電子データム株式会社 共通技術部 AI第一グループ 196-0022 東京都 昭島市中神町1156	042-542-1182 masako@jeol.co.jp	0420542-4059
富士原和也 ふじわらかずや	千葉工業大学 工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 fuji@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
藤原 敏道 ふじわらしみち	横浜国立大学 工学部物質工学科 化学生命工学 240-8501 神奈川県 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4224 tfjwr@ynu.ac.jp	045-339-4251
藤原 久徳 ふじわらひさのり	三共株式会社 薬物動態研究所 研究第5グループ 140-8710 東京都 品川区広町1-2-58	03-3492-3131 fujijst@shina.sankyo.co.jp	03-5436-8574
藤原 英明 ふじわらひであき	大阪大学 医学部保健学科 医用工学講座 565-0871 大阪府 吹田市山田丘1-7	06-6879-2573 fujiwara@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-6879-2573
藤原 靖弘 ふじわらやすひろ	京都薬科大学 構造有機化学教室 607-8414 京都府 京都市山科区御陵中内町5	075-595-4637 fujiwara@mb.kyoto-phu.ac.jp	075-595-4766
文野 浩一 ふみのこういち	立命館大学 理工学部化学科 分子物性化学研究室 525-8577 滋賀県 草津市野路東1-1-1	077-566-1111 k-fumi@mail.se.ritsumei.ac.jp	077-561-2659

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
降旗 一夫 ふりはたかずお	東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 113-0032 東京都 文京区弥生1-1-1	03-5841-5460 furihata@iam.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8485
古田 浩祐 ふるたひろすけ	杏林製薬_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	0280-56-2201 hirosuke.furuta@mb2.kyorin-pharm.co.jp	0280-57-1293
星野 鉄哉 ほしのてつや	日立化成工業(株) 総合研究所 601U 300-4247 茨城県 つくば市和台48	0298-64-7164 QYM03533@nifty.ne.jp	0298-64-4346
細井 晴子 ほそいはるこ	お茶の水女子大学 理学部化学科 益田研究室 112-8610 文京区大塚2-1-1	03-5978-5731 haru@cc.ocha.ac.jp	03-5978-5731
細田 和男 ほそだかずお	農水省 農業生物資源研究所 生物工学部 染色体操作研究室 305-8602 茨城県 つくば市観音台2-1-2	0298-38-7072 khos@abr.affrc.go.jp	
堀井 文敬 ほりい ふみたか	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	0774-38-3150 horii@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
堀金 明美 ほりがねあけみ	農林水産省食品総合研究所 分析評価部 状態分析研究室 305-8642 tz食v つくば市観音台2-1-2	0298-38-8033 akhorii@nfri.affrc.go.jp	0298-38-8033
本多 賢吉 ほんだまさよし	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	048-467-9540 honda@louise.riken.go.jp	048-462-4671
前田 史郎 まえだしろう	福井大学 工学部生物応用化学科 910-8507 福井県 福井市文京3-9-1	0776-27-8635 maeda@acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8747
前田 真悟 まえだしんご	電気通信大学大学院 電気通信学研究科 電子物性材料研究室 182-0036 東京都 調布市飛田給1-25-4	0424-89-2882 maeda@dust.pc.uec.ac.jp	
前田 秀明 まえだひであき	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 CRT室	045-503-9229 maeda@jota.riken.go.jp	045-503-9228
前田 美帆 まえだみほ	千葉工業大学 工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 maeda@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
前田 能崇 まえだよしたか	京都大学 薬学研究科 薬品機能解析学 606-8501 京都府 京都市左京区吉田下阿達町46-29	075-753-4531 f30w0164@ip.media.kyoto-u.ac.jp	075-753-4578
牧 秀志 まきひでし	神戸大学 工学部応用化学科 第5講座 657-8501 兵庫県 神戸市灘区六甲台町1-1	078-803-6187 maki@cx.kobe-u.ac.jp	078-803-7643
増田 勝彦 ますだかつひこ	三菱東京製薬(株) 製薬技術開発センター 物性分析研究室 314-0255 茨城県 鹿島郡波崎町砂山14	0479-46-4621 2505186@mitsubishi-pharm.co.jp	0479-46-6113

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
増田 憲二 ますだけんじ	京都大学 化学研究所 材料物性III 611-0011 京都府 宇治市五ヶ庄	0774-38-3149 masuda@molmat.kuicr.kyoto-u.c.jp	0774-38-3148
松浦 久恵 まつうらひさえ	東京薬科大学 生命科学部 分子生化学研究室 192-0392 東京都 東京都八王子市堀之内1432-1	0426-76-7153 s977098@educ.ls.toyaku.ac.jp	0426-76-7157
松尾 瞳 まつおひとみ	筑波大学 第一学群自然科学類 山本研究室 305-8571 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-7369 matsu@first.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369
松川 真吾 まつかわしんご	東京水産大学 食品生産学科 生物資源化学 108-8477 東京都 港区港南4-5-7	03-5463-0403 matsukaw@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0403
松木 陽 まつきよう	横浜国立大学 工学部物質工学科 阿久津 藤原研究室 240-8501 神奈川県 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4224 d00jb016@ynu.ac.jp	045-339-4251
松倉 順一 まつくら じゅんいち	日本電子株式会社 第2設計技術本部 第2グループ 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2240 matukura@jeol.co.jp	042-546-8760
松澤 英和 まつざわひでかず	金沢大学 理学部・化学科 理論化学 920-1192 石川県 金沢市角間町金沢大学理学部	076-264-5686 matsu@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp	
松田 善正 まつたよしまさ	筑波大学 物理工学系 巨瀬研究室 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 matsuda@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
松原 康史 まつばらこうし	シーエーシーズ株式会社 横浜分析センター 有機分析グループ 227-0033 神奈川県 横浜市青葉区鶴志田町1000番地	045-963-3166 3709437@cc.m-kagaku.co.jp	045-963-4261
美川 務 みかわつとむ	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	048-467-9538 mikawa@louise.riken.go.jp	048-467-5692
右田たい子 みぎたたいこ	山口大学 医療技術短期大学部・一般教養学 755-8554 山口県 宇部市南小串1-1-1	0836-22-2805 ctmigita@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp	0835-22-2130
右田たい子 みぎたたいこ	山口大学 農学部 応用生物化学 753-8515 山口県 山口市吉田1677-1	083-933-5800 ctmigita@ml.cc.yamaguchi-u.ac.jp	083-933-5820
三嶋 謙二 みしまけんじ	分子科学研究所 分子基礎理論第2 中村研究室 444-8585 愛知県 岡崎市明大寺西郷38	0564-55-7315 mishima@ims.ac.jp	0564-53-4660
三森 文行 みつもりふみゆき	国立環境研究所 環境健康部 保健指標研究室 305-0053 茨城県 つくば市小野川16-2	0298-50-2352 mitumori@nies.go.jp	0298-50-2574
皆川 和久 みなかわかずひさ	筑波大学 第一学群自然科学類化学専攻 山本研究室 305-8571 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-7369 s970452@ipe.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
三嶋謙二 みしまけんじ	分子科学研究所 分子基礎理論第2 中村研究室 444-8585 愛知県 岡崎市明大寺西郷3 8	0564-55-7315 mishima@ims.ac.jp	0564-53-4660
三森文行 みつもりふみゆき	国立環境研究所 環境健康部 保健指標研究室 305-0053 茨城県 つくば市小野川1 6-2	0298-50-2352 mitumori@nies.go.jp	0298-50-2574
皆川和久 みなかわかずひさ	筑波大学 第一学群自然科学類化学専攻 山本研究室 305-8571 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-7369 s970452@ipe.tsukuba.ac.jp	0298-53-7369
宮ノ入洋平 みやのいりようへい	横浜国立大学大学院 工学研究科 上杉・片平研究室 240-8501 神奈川県 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4271 m00db143@ynu.ac.jp	045-339-4264
宮本和英 みやもとかずひで	京都大学 薬学研究科 薬品機能解析学 606-8501 京都府 京都市左京区吉田下阿達町46-29	075-753-4531 f60w0263@ip.media.kyoto-u.ac.jp	075-753-4578
三輪優子 みわゆうこ	(株) 東レリサーチセンター 構造化学研究部 構造化学第3研究室 520-8567 滋賀県 大津市園山3-3-7	077-533-8617 yuuko_miwa@trc.toray.co.jp	077-533-2208
宗像弓子 むなかたゆみこ	大蔵省印刷局研究所 分析室 256-0816 神奈川県 小田原市酒匂6-4-20	0465-49-4240	0465-49-4244
村井孝弘 むらいたかひろ	三共株式会社 薬物動態研究所 研究四グループ 140-8710 東京都 品川区広町1-2-58	03-3492-3131 tmurai@shina.sankyo.co.jp	03-5436-8574
村井亮平 むらいりょうへい	北海道大学大学院 工学研究科量子物理工学専攻 分子物理工学分野 060-8628 北海道 札幌市北区北1 3条西8 丁目	011-706-6642 ryohei@eng.hokudai.ac.jp	011-716-6175
村田勝義 むらたかつよし	東京工業大学 理工学研究科 物質科学 安藤勲研究室 512-8552 東京都 目黒区大岡山2-1-2-1	03-5734-2139 kmurata@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
村林秀樹 むらばやしひでき	株式会社 武田分析研究所 試験第2部 物性・構造解析グループ 532-8686 大阪府 大阪市淀川区十三本町2-17-85	06-6300-6540 Murabayashi_Hideki@takeda.co.jp	06-6300-6047
村林美香 むらばやしみか	武田薬品工業株式会社 医薬開拓研究本部 開拓第五研究所 532-8686 大阪府 大阪市淀川区十三本町2-17-85	06-6300-6618 Murabayashi_Mika@takeda.co.jp	06-6300-6086
飯塚舜介 めしつかしゆんすけ	鳥取大学 医学部医学科 医療環境学 683-8503 米子市西町8 6	0859-34-8286 mesh@grape.med.tottori-u.ac.jp	0859-34-8068
茂木和彦 もてぎかずひこ	中央大学大学院 理工学研究科応用化学専攻 千喜良研究室 112-8551 東京都 文京区春日1-1-3-2 7	03-3817-1897 mote@kc.chuo-u.ac.jp	03-3817-1895
森田鋭 もりたさとし	千葉工業大学 工学部工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 mori@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
宮ノ入洋平 みやのいりようへい	横浜国立大学大学院 工学研究科 上杉・片平研究室 240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4271 m00db143@ynu.ac.jp	045-339-4264
宮本 和英 みやもとかずひで	京都大学 薬学研究科 薬品機能解析学 606-8501 京都府 京都市左京区吉田下阿達町46-29	075-753-4531 f60w0263@ip.media.kyoto-u.ac.jp	075-753-4578
三輪 優子 みわゆうこ	(株) 東レリサーチセンター 構造化学研究部 構造化学第3研究室 520-8567 滋賀県 大津市園山3-3-7	077-533-8617 yuuko_miwa@trc.toray.co.jp	077-533-2208
宗像 弓子 むなかたゆみこ	大蔵省印刷局研究所 分析室 256-0816 神奈川県 小田原市酒匂6-4-20	0465-49-4240	0465-49-4244
村井 孝弘 むらいたかひろ	三共株式会社 薬物動態研究所 研究四グループ 140-8710 東京都 品川区広町1-2-58	03-3492-3131 tmurai@shina.sankyo.co.jp	03-5436-8574
村井 亮平 むらいりょうへい	北海道大学大学院 工学研究科量子物理工学専攻 分子物理工学分野 060-8628 北海道 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6642 ryohei@eng.hokudai.ac.jp	011-716-6175
村田 勝義 むらたかつよし	東京工業大学 理工学研究科 物質科学 安藤勲研究室 512-8552 東京都 目黒区大岡山2-1-2-1	03-5734-2139 kmurata@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
村林 秀樹 むらばやしひでき	株式会社 武田分析研究所 試験第2部 物性・構造解析グループ 532-8686 大阪府 大阪市淀川区十三本町2-17-85	06-6300-6540 Murabayashi_Hideki@takeda.co.jp	06-6300-6047
村林 美香 むらばやしみか	武田薬品工業株式会社 医薬開発研究本部 開拓第五研究所 532-8686 大阪府 大阪市淀川区十三本町2-17-85	06-6300-6618 Murabayashi_Mika@takeda.co.jp	06-6300-6086
飯塚 舜介 めしつかしゆんすけ	鳥取大学 医学部医学科 医療環境学 683-8503 米子市西町86	0859-34-8286 mesh@grape.med.tottori-u.ac.jp	0859-34-8068
茂木 和彦 もてぎかずひこ	中央大学大学院 理工学研究科応用化学専攻 千喜良研究室 112-8551 東京都 文京区春日1-1-3-27	03-3817-1897 mote@kc.chuo-u.ac.jp	03-3817-1895
森田 鋭 もりたさとし	千葉工業大学 工学部工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 mori@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
森田 勇人 もりたはやと	愛媛大学 理学部 物質理学科 790-8577 愛媛県 松山市文京町2-5	089-927-9616 ehmorita@dpc.ehime-u.ac.jp	089-927-9611
八島 秀仁 やししまひでと	日本ブルカー株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県 つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 yas@bruker.co.jp	0298-58-0322
矢野 友海 やのともみ	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	075-753-4014 yano@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
山内 一夫 やまうちかずお	日本ブルカー株式会社 アプリケーション部 305-0051 茨城県 つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 yam@bruker.co.jp	0298-58-0322
山口 秀幸 やまぐちひでゆき	味の素株式会社 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	044-244-7142 hideyuki_yamaguchi@ajinomoto.com	044-210-5872
山腰 良晃 やまこし よしあき	日本電子株式会社 分析機器技術本部 196-8558 東京都 昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 yamakosi@jeol.co.jp	042-546-8068
山崎由香子 やまざき ゆかこ	筑波大学 物理工学系 NMRイメージングラボ 305-8573 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5335 yamazaki@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	0298-53-5205
山崎 和彦 やまさきかずひこ	生命工学工業技術研究所 分子生物部 DNA情報研究室 305-8566 茨城県 つくば市東1-1	0298-61-6536 kyamasak@nibh.go.jp	0298-61-6534
山崎 悟 やまざきさとる	旭化成工業(株) 基盤技術センター 解析技術室 416-8501 静岡県 富士市鮫島2-1	0545-62-3151 yamazaki.sf@om.asahi-kasei.co.jp	0545-62-3189
山田 周作 やまだしゅうさく	京都大学化学研究所 材料物性基礎3研究室 611-0011 京都府 宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 shusaku@molmat.kuicr.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
山延 健 やまのべたけし	群馬大学 工学部・材料工学科 機能物質化学第3研究室 376-8515 群馬県 桐生市天神町1-5-1	0277-30-1331 yamanobe@cc.gunma-u.ac.jp	0277-30-1333
山本 泰彦 やまもとやすひこ	筑波大学 化学系 305-8571 茨城県 つくば市天王台1-1-1	0298-53-6521 yamamoto@staff.chem.tsukuba.ac.jp	0298-53-6521
山本 裕輔 やまもとゆうすけ	名古屋工業大学 工学部・材料工学科 有機材料コース・辻田研究室 466-8555 愛知県 名古屋市昭和区御器所町	052-735-5272 yusukey@mse.nitech.ac.jp	052-735-5272
横井 貴子 よこいたかこ	山之内製薬 分析代謝研究所 分析研究室 305-8585 茨城県 つくば市御幸が丘21	0298-52-9585 yokoit@yamanouchi.co.jp	0298-54-1624
横山 茂之 よこやましげゆき	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 2F W209	045-503-9196 yokoyama@biochem.s.u-tokyo.ac.jp	045-503-9195
横山 茂之 よこやましげゆき	東京大学 大学院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	03-5841-4392 yokoyama@biochem.s.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8057
吉岡 澄江 よしおかすみえ	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 158-8501 東京都 世田谷区上用賀1-18-1	03-3700-8547 yoshioka@nihs.go.jp	03-3707-6950
吉田 卓也 よしだたくや	大阪大学大学院 薬学研究科 高分子化学分野 565-0871 大阪府 吹田市山田丘1-6	06-6879-8222 yo@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8221

参加者名簿

名前	所属 〒 住所	TEL E-mail	Fax
好田真由美 よしだまゆみ	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 230-0045 神奈川県 横浜市鶴見区末広町1-7-22 CRT室	045-503-9229 myoshida@jota.riken.go.jp	045-503-9228
吉田 充 よしだみつる	食品総合研究所 分析評価部 状態分析研究室 305-8642 茨城県 つくば市観音台2-1-2	0298-38-8033 mitsuru@nfri.affrc.go.jp	0298-38-7996
吉益 雅俊 よしまさまさとし	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	048-467-9540 yosimasu@postman.riken.go.jp	048-462-4671
吉水 広明 よしみずひろあき	名古屋工業大学 工学部・材料工学科 有機材料コース・辻田研究室 466-8555 愛知県 名古屋市昭和区御器所町	052-735-5272 yosimizu@mse.nitech.ac.jp	052-735-5272
李華 りか	神戸大学大学院 自然科学研究科 657-8501 兵庫県 神戸市灘区六甲台町1-1	078-803-6529 li@kobe-u.ac.jp	078-803-6529
若井 幹雄 わかいみきお	千葉工業大学 工学部・工業化学科 河合研究室 275-0016 千葉県 習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 mikio@ic.it-chiba.ac.jp	047-478-0425
若松 馨 わかまつかおり	群馬大学 工学部・生物化学工学科 若松研究室 376-8515 群馬県 桐生市天神町1-5-1	0277-30-1439 wakamats@bce.gunma-u.ac.jp	0277-30-1439
和田 武 わただけし	日本ブルカー株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県 つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 wad@bruker.co.jp	0298-58-0322
渡辺てるみ わたなべてるみ	三共(株) 薬物動態研究所 薬物動態第4グループ 140-8710 東京都 品川区広町1-2-58	03-3492-3131 terumi@shina.sankyo.co.jp	
渡部 徳子 わたなべとくこ	東京水産大学 食品生産学科 生物資源化学講座 108-8477 東京都 港区港南4-5-7	03-5463-0643 tokuko@tokyo-u-fish.ac.jp	03-5463-0643
渡辺 裕之 わたなべひろゆき	バリアンテクノロジーズジャパン NMR応用部 108-0023 東京都 港区芝浦4-16-36	03-5232-1238 hiroyuki.watanabe@varianinc.com	03-5232-1264
渡邊 真人 わたなべまさとし	東京薬科大学 薬学部 第一分析 192-0392 東京都 八王子市堀之内1432-1	0426-76-4542 y961255@educ.ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4542

