

第 41 回 NMR 討論会

講演要旨集

会期 2002 年 11 月 6 日(水)~11 月 8 日(金)

会場 こまばエミナーズ

主催

日本核磁気共鳴学会

共催

高分子学会・日本化学会・日本磁気共鳴医学会・日本生化学会・日本薬学会

日本生物物理学会・日本農芸化学会・日本物理学会・日本分析化学会

第41回NMR討論会 会場案内

こまばエミナーズ

(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12分
渋谷駅(南口)よりタクシー5分

☆連絡先

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 2-24-26
朝倉 哲郎
TEL 042-388-7025 または 042-383-7733
FAX 042-383-7733
E-mail: nmr41asa@cc.tuat.ac.jp
<http://www.tuat.ac.jp/~asakura/nmr41/>

当日連絡先

03-3485-1416(ホール直通)

第41回NMR討論会

会期 11月6日(水)～8日(金)

会場 こまばエミナース(東京都目黒区大橋2-19-5)

第一日 11月6日(水)

(10:00-10:10)

開会の挨拶

(10:10-11:10)

座長 稲垣冬彦

- 1L1 転移交差飽和法による蛋白質間相互作用解析 2
(東大院薬系、産総研BIRC) ○嶋田一夫
- 1L2 プリオンにおける安定構造-活性化構造間のジャンプ-ミリ秒揺らぎの計測- 4
(岐阜大医¹、理研²、近畿大生物理工³) ○桑田一夫¹、鎌足雄司²、赤坂一之³
- 1L3 NMRによる小胞体シャペロンの高次構造と相互作用の解析 6
(名古屋市大薬) 山口芳樹、栗本英治、原田拓志、大竹恵介、中野路子、宮崎千穂、高橋禮子、○加藤晃一

- 休憩 -

(11:30-12:30)

座長 阿久津秀雄

- 1L4 ヒトおよびマウスの構造プロテオミクス 8
(理研GSC¹、かずさDNA研²) ○横山茂之¹、廣田洋¹、木川隆則¹、白水美香子¹、松尾洋¹、山崎俊夫¹、
武藤裕¹、前田秀明¹、田仲昭子¹、Peter Guentert¹、好田真由美¹、林崎良英¹、中山学²、小原收²
- 1L5 立体整列同位体標識(SAIL)タンパク質のNMR解析～高分子量タンパク質の迅速かつ高精度な 10
立体構造決定に向けて
(CREST/JST¹、都立大院理²) ○鳥澤拓也¹、寺内勉¹、小野明¹、甲斐莊正恒^{1,2}
- 1L6 p47^{phos}のタンデムSH3ドメインとp22^{phos}PRRの相互作用 12
(北大院薬¹、CREST/JST²、九大生医研³) ○小椋賢治¹、湯沢聰²、鳥飼真之介¹、住本英樹³、稲垣冬彦^{1,2}

- 昼食 -

(13:30-15:30)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3の倍数+1)

(15:30-16:50)

座長 西村善文

- 1L7 ラベル体を用いた特異なDNA及びRNA構造の研究 -多量体のストイキオメトリー、水素結合スキーム- 14
(横国大院環境情報) 松上明正、大橋肅、池田哲郎、外谷英嗣、上杉晴一、○片平正人
- 1L8 核酸等生体高分子のためのGel-phase NMR法の開発 16
(奈良先端大バイオ¹、都立大院理²、三菱化学生命研³) ○児嶋長次郎¹、小野晶²、河野俊之³、
小林俊達¹、三島正規¹

座長 田之倉優

- 1L9 高分子量蛋白質を対象とした残余双極子効果観測技術の開発 18
(生物分子工学研¹、北陸先端大ナノセンター²) ○楯真一^{1,2}、村瀬八重子²、三井崇裕²、島原秀登²
- 1L10 高分子量蛋白質の解析に向けた新しいNMR測定法の開発 22
(理研生体超分子構造¹、横浜市大院総理²、CREST/JST³、University of Cambridge⁴) ○伊藤隆^{1,2,3}、
Daniel Nietlispach⁴、Ernest Laue⁴、Sundaresan Rajesh^{1,2}、美川務^{1,2,3}、柴田武彦^{1,2,3}

- 休憩 -

(17:05-18:05)

座長 横山茂之

- 1L11 蛋白質のエピキチン化シグナル認識の構造的基盤 26
(横浜市大院総理¹、理研²、愛媛大理²) ○白川昌宏¹、藤原健一朗¹、天野剛志³、池求¹、栴尾豪人¹、廣明秀一¹、菅澤薫²、花岡文雄²
- 1L12 区分標識とTROSYを用いたH⁺-ATPaseサブユニットの構造解析 28
(阪大蛋白研¹、理研GSC²、東工大資源研³) ○八木宏昌¹、山崎俊夫²、吉田賢右³、阿久津秀雄¹
- 1L13 ¹³C-¹³C 距離相関 及び ¹H-¹⁵N/¹³C-¹H双極子相関固体NMR測定によるペプチドの構造決定 30
(京大院理) ○竹腰清乃理、大橋竜太郎、溝上潤、水野敏、寺尾武彦

第二日 11月7日(木)

(9:30-10:50)

特別講演1

座長 小林祐次

- 2SL1 新しい蛋白質構造の世界をひらく高圧NMR 36
(近畿大生物理工) 赤坂一之

座長 朝倉哲郎

- 2SL2 NMR40年：水素結合から膜タンパク質の構造とダイナミクスへ 40
(姫路工大院理) 斉藤肇

- 休憩 -

(11:10-12:30)

特別講演2

座長 甲斐荘正恒

- 2SL3 RNA structures and structure-based drug discovery 42
(University of California San Francisco) ○Thomas L. James, Zhihua Du, Moriz Mayer

座長 神藤平三郎

- 2SL4 Biological NMR studies of membrane and protein recognition in endocytosis and signal transduction 43
(University of Colorado Health Sciences Center) Michael Overduin

- 昼食 -

(14:00-15:40)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3の倍数+2)

(15:40-17:00)

特別講演3

座長 安藤勲

- 2SL5 Structure analysis of antimicrobial and fusogenic peptides in membranes by solid state ¹⁹F-NMR 44
(Friedrich-Schiller-Universitaet Jena) Sergii Afonin, Ralf Glaser, Ulrich Dürr, Parvesh Wadhvani, Marina Berditchevskaia, ○Anne S. Ulrich

座長 寺尾武彦

- 2SL6 Advanced Solid State NMR Techniques for Elucidating Supramolecular Organization 47
(Max-Planck-Institut) Hans. W. Spiess

(17:00-17:40)

NMR学会総会 (若手ポスター賞表彰式を含む)

(18:00-20:00)

懇親会

第三日 11月8日(金)

(9:30-10:50)

座長 山延健

- 3L1 化学シフトに対する相対論的効果の計算 50
(北見工大工) ○福井洋之、馬場雄久、白石泰子
- 3L2 エコー実験における緩和時間及び拡散係数測定における化学交換の影響 52
(東京水産大) ○松川真吾、渡部徳子

座長 平冲敏文

- 3L3 多量子遷移を利用した高分子ガラスの局所構造解析 54
(京大化研¹、Iowa State University²) ○梶弘典¹、堀井文敬¹、Klaus Schmidt-Rohr²
- 3L4 CODEX法によるIsotactic-Poly(4-Methyl-1-Pentene)結晶領域の低速ダイナミクス解析 58
(産総研¹、Martin Luther University²) ○三好利一¹、Ovidiu Pascui²、Detlef Reichert²

- 休憩 -

(11:10-12:30)

座長 堀井文敬

- 3L5 超偏極¹²⁹Xe-NMRによる炭素系材料の細孔解析 60
(新日本製鐵(株)先端研¹、阪大医²)○齋藤公児¹、田所健一¹、飯島孝¹、木村敦臣²、藤原英明²
- 3L6 ¹²⁹Xe NMR法による各種高分子材料の固体構造解析 64
(名工大工) ○吉水広明、鈴木智幸、大田悟史、大野真希、村上隆史、辻田義治

座長 藤原英明

- 3L7 PGSE Diffusion Measurements and Analysis in Complex Systems-Applications to Polymer Electrolytes 68
(Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University¹、National Institute of Advanced Industrial Science and Technology²、Yuasa Corporation³) ○William S. Price¹、Kikuko Hayamizu²、Etsuo Akiba²、Toshinori Bando³、Yuichi Aihara³
- 3L8 ペプチドおよびポリペプチド中のカルボニル酸素の固体¹⁷O NMRパラメータの決定 72
(東工大院理工¹、群大工²、アイオワ州大エイメス研³)
○黒木重樹¹、山内一夫¹、木村英昭¹、安藤勲¹、荘司顯²、尾崎拓男²、M.Pruski³

- 昼食 -

(13:40-15:30)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3の倍数)

(15:30-17:10)

座長 堤耀廣

- 3L9 流動的な脂質膜界面における膜表在性蛋白質; 固体NMRによる構造と膜結合状態の解析 74
(姫路工大院理) ○辻暁、上釜奈緒子、岡田雅司、八木澤仁、斉藤肇
- 3L10 自発磁場配向膜を用いた膜結合生体分子の精密立体構造解析 76
(横国大院工) ○内藤晶、虎谷秀一、西村勝之

座長 渡部徳子

- 3L11 4.7Tesla 人体用MRIにおける多核種多チャンネル同時測定法の構築 80
(国立環境研) ○三森文行、高屋展宏
- 3L12 宇宙飛行士用超軽量コンパクトMRIの開発 82
(筑波大物工¹、(株)エム・アール・テクノロジー²、筑波大臨床医³、住友特殊金属(株)⁴)
○巨瀬勝美¹、松田善正¹、栗本岳明¹、橋本征太郎¹、山崎由香子¹、拝師智之²、宇津澤慎²、吉岡大³、中西昭男⁴、岡田重益⁴、遠藤政治⁴、青木雅昭⁴、津崎剛⁴

- 3L13 T₁緩和時間によるラット脳室周囲器官(脳弓下器官・下垂体後葉)毛細血管の水透過性の測定 86
(京都府立医大一生理¹、奈良女大生活環境²、精神神経センター神経研³、岐阜大医一生理⁴、生理研分子生理⁵)
○瀬尾芳輝¹、鷹股亮²、荻野孝史³、森田啓之⁴、村上政隆⁵

～ポスターセッション 演題～ (★印は“若手ポスター賞”応募ポスター)

【溶液測定法の開発】

- P1★ 根粒菌FixJ蛋白質C末端ドメインの高次構造とDNAとの相互作用の解析 92
(横浜市大院総理¹、理研遺伝生化学²、CREST/JST³、理研生体物理化学⁴) ○倉島かおり¹、伊藤隆^{1,2,3}、
柴田武彦^{1,2,3}、田村浩二⁴、中村寛夫^{1,4}、城宜嗣⁴
- P2 超臨界水実験のための流通型NMR測定装置の開発 94
(京大院理) ○向出政伸、浦崎洋平、網田富士嗣、岡博之、梶本興亜、竹腰清乃理、寺尾武彦
- P3 高分子量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 96
(東大院薬系¹、産総研BIRC²) ○宮沢真由美¹、西田紀貴¹、中西民二¹、坂倉正義¹、寺次宏明¹、
高橋栄夫²、嶋田一夫^{1,2}
- P4★ Gel-phase NMRのタンパク質への応用 98
(奈良先端大バイオ¹、三菱化学生命研²) ○小林俊達¹、河野俊之²、三島正規¹、児嶋長次郎¹
- P5 外部複基準法によるケミカルシフトの温度依存性の測定：体積磁化率の温度依存性の考慮 102
(福井大機セ) 田宮由香、○水野和子

【溶液応用(タンパク質、ペプチド、核酸以外)】

- P6 HMBC法の新しい応用測定--BIRD-J-resolved-HMBC法について 104
(東大院応用生命科学研¹、東農大応用生命化学²) ○降旗一夫¹、瀬戸治男²
- P7★ 遠位の構造情報を利用したタンパク質のNMR解析 108
(理研GSC¹、横浜市大院総理²、理研細胞情報伝達³、東大院理⁴) ○菊地淳^{1,2}、佐藤信二¹、
前田秀明^{1,2}、横山茂之^{1,3,4}
- P8 Congo Redの水溶液中での会合の研究 110
(福井大工) 前田史郎、○飯田貴之、篠原正法、山田幸生、川原美香
- P9 2D selective-TOCSY-HSQC法による糖鎖の構造解析 112
(ブルカーバイオスピ(株)¹、横浜市大院総理²) ○佐藤一¹、梶原康宏²
- P10★ 超臨界二酸化炭素中における回転ダイナミクスの特異性 114
(産総研¹、東北大院理²、CREST/JST³) ○梅木辰也^{1,2,3}、金久保光央^{1,3}、生島豊^{1,3}
- P11 ¹H-NMRによるテレフタル酸系共重合ポリエステルの長距離モノマー連鎖構造解析 118
(農工大工¹、帝人²) ○松田裕生^{1,2}、永阪文愨²、朝倉哲郎¹
- P12 対称・非対称S-Benzylsulfilimins類のgemメチレンプロトンのNMR挙動 120
(東工大資源研¹、関東学院大工²) 中村義之¹、○中山智香子²、龍宮尚史²、卯辰直也²、尾辻雅²、山本保²
- P13★ 金属核NMRによる多座配位錯体の熱力学的安定性と配位構造に関する研究 122
(神戸大院自然¹、神戸大工²) ○横田達夫¹、成相裕之¹、牧秀志²
- P14 植物から得られる薬効成分のNMRによる解析 124
(理研PSC¹、日大薬²、上海薬物研³) ○鶴澤洵¹、夏増華³、労愛娜³、藤本康雄²、吉田茂男¹
- P15 3D DOSYによる混合物の構造解析 128
(シーエーシーズ(株)) ○松原康史

P16★	金属核NMRの温度依存性による多座配位錯体の安定性に関する熱力学的研究 (神戸大工 ¹ 、神戸大院自然 ²) ○牧秀志 ¹ 、横田達夫 ² 、成相裕之 ²	130
P17	二酸化炭素を用いた高圧下での液体制御の試み (産総研 ¹ 、東北大院理 ²) ○金久保光央 ¹ 、梅木辰也 ² 、相澤崇史 ¹ 、生島豊 ¹	132
P18	分岐シクロデキストリンの ¹ H NMRスペクトル (産総研) ○石塚靖子、根本直、金澤健治、中西洋志	134
P19★	糖鎖アレルゲンの分子認識における溶液中立体構造に関する研究 (東和大工 ¹ 、福山大工 ² 、(財)サントリー生有研 ³ 、(株)日本電子データム ⁴) 加藤祐子 ¹ 、○福山貴士 ¹ 、宗像達夫 ¹ 、太田雅也 ² 、岩下孝 ³ 、藤原正子 ⁴ 、松浦史登 ²	136
P20	LC-NMRの有機化合物定量測定への応用 (産総研) ○齋藤剛、岩澤良子、井原俊英、衣笠晋一、野村明	138
P21	推論型構造解析支援システムの応用 (シーエーシーズ(株)) ○櫻井愛子、松原康史	140
P22★	常磁性金属効果を利用したタンパク質の立体構造情報の抽出の試み (奈良先端大バイオ ¹ 、横市大院総理 ²) ○野村誠 ¹ 、三島正規 ¹ 、天野剛志 ² 、藤原健一朗 ² 、白川昌宏 ² 、児嶋長次郎 ¹	142
P23	超臨界水のその場観測を目的とした高温・高圧NMRプローブの試作 (産総研 ¹ 、東北大院理 ² 、日機装R&Dセンター ³ 、CREST/JST ⁴) ○金久保光央 ^{1,4} 、梅木辰也 ^{2,4} 、相澤崇史 ^{1,4} 、生島豊 ^{1,4} 、山崎博実 ^{3,4} 、八名順三 ³	146
P24	CAST/CNMRシステムの応用：立体構造類似性と1次元 ¹³ C-NMRデータに基づく帰属 (理研 ¹ 、国立情報学研 ²) ○越野広雪 ¹ 、佐藤寛子 ²	148
P25★	環状ペプチド- Ascidiacyclamide 誘導体- の溶液中でのコンホメーション解析III - L-Ile を D-Ile に置換した誘導体の溶液中でのコンホメーション平衡 - (神戸薬大 ¹ 、大阪薬大 ² 、阪大院薬 ³) ○加藤貴子 ¹ 、杉浦真喜子 ¹ 、伊藤允好 ¹ 、土井光暢 ² 、浅野晶子 ² 、高木達也 ³	150
P26	低分子リガンドによるA:A mismatchesの認識機構 (奈良先端大バイオ ¹ 、京大工 ²) ○三島正規 ¹ 、野村誠 ¹ 、山中佐和子 ¹ 、中谷和彦 ² 、齋藤烈 ² 、児嶋長次郎 ¹	154
【溶液応用(タンパク質、ペプチド)		
P27	抗菌タンパク質タキサイチンの分子運動性と機能に関する研究 (北大院理 ¹ 、九大理 ² 、富山医薬大薬 ³ 、産総研 ⁴) 末武徹也 ¹ 、○相沢智康 ¹ 、小金沢望 ¹ 、尾崎司 ² 、小橋川敬博 ¹ 、出村誠 ¹ 、川畑俊一郎 ² 、河野敬一 ³ 、津田栄 ⁴ 、新田勝利 ¹	156
P28★	NMRによるCPD photolyaseと損傷DNAの結合様式の解明 (東大院薬系 ¹ 、阪大院理 ² 、生物分子工学研 ³) ○上田卓見 ¹ 、加藤暁 ¹ 、鳥澤拓也 ¹ 、倉光成紀 ² 、岩井成憲 ³ 、寺沢宏明 ¹ 、嶋田一夫 ¹	158
P29	エリシターにより誘導されるEL5蛋白質のRING-H2 finger domainの機能構造解析 (農業生物資源研) 加藤静恵、角田由紀、崔紅、八田智久、高井亮太、南栄一、山崎俊正、○加藤悦子	162
P30	¹³ C NMR緩和測定による水溶性ポリペプチドのダイナミクス (北大院工) ○内野新一、堤耀廣	164
P31★	出芽酵母由来リンカーヒストンホモログHHO1の構造解析 (東薬大 ¹ 、明星大理工 ² 、農業生物資源研 ³) ○小野克輝 ¹ 、草野修 ¹ 、田代桜子 ¹ 、清水光弘 ² 、山崎俊正 ³ 、神藤平三郎 ¹	166

P32	DinIによるssDNA-RecA複合体のcoprotease活性阻害機構に関する研究 (理研生体超分子構造 ¹ 、理研遺伝生化学 ² 、埼玉大院理工 ³ 、横大院総理 ⁴ 、CREST/JST ⁵) ○吉益雅俊 ^{1,2,3,5} 、伊藤隆 ^{1,2,4,5} 、本多賢吉 ^{1,2,4,5} 、石部聡子 ^{1,2,5} 、美川務 ^{1,2,4,5} 、柴田武彦 ^{1,2,4,5}	168
P33	TraR-DNA結合ドメインの立体構造解析 (三菱生命研 ¹ 、信州大工 ²) ○田中剛史 ¹ 、須貝真理子 ¹ 、小林邦子 ¹ 、片岡正和 ² 、河野俊之 ¹	170
P34★	フルオロ基及びパーフルオロメチル基をもつヘムの ¹⁹ F NMR特性 (筑波大化 ¹ 、長岡工専 ²) ○長尾聡 ¹ 、平井佑紀 ¹ 、猪瀬達徳 ¹ 、照井教文 ¹ 、山本泰彦 ¹ 、鈴木秋弘 ²	172
P35	NMRと無細胞タンパク質合成を利用した立体構造解析用試料の効率的なスクリーニング (理研GSC) ○木川隆則、井上真、青木雅昭、松田貴意、関英子、布川絵未、矢吹孝、松尾洋、横山茂之	174
P36	MAP-LC3蛋白質の立体構造解析 (富山医薬大薬 ¹ 、順天堂大医 ²) ○河野隆英 ¹ 、山本行晴 ¹ 、谷田以誠 ² 、上野隆 ² 、木南英紀 ² 、水口峰之 ¹ 、河野敬一 ¹	176
P37★	酸化型シクロムcの磁化率テンソルの決定とヘム近傍の構造の研究 (筑波大化 ¹ 、第一製薬 ² 、広大生物生産 ³ 、阪大院工 ⁴ 、阪大院薬 ⁵ 、東大院農 ⁶) ○立入直紀 ¹ 、長谷川淳 ² 、皆川和久 ¹ 、松尾 瞳 ¹ 、高山真一 ¹ 、照井教文 ¹ 、山本泰彦 ¹ 、三本木至宏 ³ 、内山 進 ⁴ 、小林祐次 ⁵ 、五十嵐泰夫 ⁶	178
P38	クロレラユビキチンの立体構造と局所的構造変化のNMR解析 (CREST/JST ¹ 、都立大院理 ² 、九大院農 ³ 、(株)クロレラ工業 ⁴) ○小神将 ² 、野村薫 ² 、菅向志郎 ^{3,4} 、松林恒夫 ⁴ 、大木進野 ¹ 、甲斐荘正恒 ^{1,2}	180
P39	アルツハイマーペプチドとシクロデキストリンとの分子間相互作用のNMR法による研究 (産総研 ¹ 、東理大基礎工 ²) ○秦旭栄 ¹ 、阿部寛志 ^{1,2} 、中西洋志 ^{1,2}	182
P40★	家族性パーキンソン病原因遺伝子産物Parkinのユビキチン様ドメインの動的な高次構造と分子認識の解析 (名市大院薬 ¹ 、理研GSC ² 、北大院薬 ³ 、順天堂大医 ⁴ 、都臨床研分子腫瘍 ⁵) ○坂田絵理 ¹ 、山口芳樹 ¹ 、栗本英治 ¹ 、菊池淳 ² 、横山茂之 ² 、川原裕之 ³ 、横沢英良 ³ 、服部信孝 ⁴ 、水野美邦 ⁴ 、田中啓二 ⁵ 、加藤晃一 ^{1,2}	184
P41	リン酸化に依存してミオシンフォスファターゼを阻害する蛋白質CPI-17の溶液構造 (1) (JST/都立大 ¹ 、バージニア大 ² 、北大 ³) ○大木進野 ¹ 、江藤真澄 ² 、狩谷英里 ¹ 、早野俊哉 ¹ 、林雄一郎 ³ 、矢沢道生 ³ 、David L. Brautigan ² 、甲斐荘正恒 ¹	186
P42	リン酸化に依存してミオシンフォスファターゼを阻害する蛋白質CPI-17の溶液構造 (2) (JST/都立大 ¹ 、バージニア大 ²) ○高田零 ¹ 、大木進野 ¹ 、江藤真澄 ² 、清水真人 ¹ 、David L. Brautigan ² 、甲斐荘正恒 ¹	188
P43★	Selective protonation of aromatic rings of Phe, Tyr and Trp using shikimic acid, for the improved global fold determination of larger deuterated proteins. (理研遺伝生化学 ¹ 、理研生体超分子構造 ² 、CREST/JST ³) ○Sundaresan Rajesh ^{1,2} 、伊藤隆 ^{1,2,3} 、柴田武彦 ^{1,2,3}	190
P44	小麦胚芽レクチンとGlcNAcβ1,6Gal糖鎖との相互作用の解析 (産総研) ○金澤健治、根本直、中西洋志、村木三智郎	192
P45	交差飽和法における側鎖メチル基の利用 (産総研 ¹ 、東大院薬系 ² 、阪大蛋白研 ³) ○高橋栄夫 ¹ 、宮沢真由美 ² 、伊奈康夫 ¹ 、福西快文 ¹ 、中村春木 ^{3,1} 、嶋田一夫 ^{2,1}	194
P46★	アカザラガイ閉殻筋トロポニンCドメイン-トロポニンIフラグメント複合体の構造解析 (東大院農 ¹ 、東京慈恵医大生理学第二 ² 、東大生物生産工センター ³ 、海洋バイオテクノロジー研 ⁴ 、バリアンテクノロジーズジャパン ⁵ 、北大院水産 ⁶) ○湯本史明 ^{1,2} 、永田宏次 ³ 、足立燕子 ⁴ 、根本暢明 ⁵ 、尾島孝男 ⁶ 、西田清義 ⁶ 、大槻馨男 ² 、田之倉優 ¹	198
P47	天蚕から単離されたParalytic PeptideのNMR構造解析 (北大院理 ¹ 、岩大農 ²) ○川口恭輔 ¹ 、安嬰 ² 、鈴木幸一 ² 、熊木康裕 ¹ 、出村誠 ¹ 、新田勝利 ¹	200

P48	Solution structure of the fibronectin type III domain from <i>Bacillus circulans</i> WL-1,2 chitinase A1 (Yokohama City University ¹ , GSC RIKEN ² , Nara Institute of Science and Technology ³ , Niigata University ⁴) ○Jun-Goo Jee ^{1,2} , Takahisa Ikegami ³ , Masayuki Hashimoto ⁴ , Takeshi Kawabata ³ , Mitsunori Ikeguchi ¹ , Takeshi Watanabe ⁴ , Masahiro Shirakawa ¹	202
P49★	酵素の活性部位に影響するフレキシブル残基のNMR同定—酵素の活性向上法— (味の素(株)) 榎葉信久、○篠原美奈、横山敬一、柏木立己、石川弘紀、江島大輔、鈴木榮一郎	204
P50	大腸菌転写因子PhoBのDNA結合ドメインとDNAの複合体の立体構造解析 (横浜市大院総理) ○岡村英保 ¹ 、牧野耕三 ² 、西村善文 ³	206
P51	基本転写因子TFIIIEのドメイン構造解析 (木原記念横浜生命科学振興財団 ¹ 、横浜市大院総理 ² 、阪大院生命機能 ³) ○奥田昌彦 ^{1,2} 、佐藤真奈美 ² 、田中亜紀 ³ 、花岡文雄 ³ 、大熊芳明 ³ 、西村善文 ²	208
P52★	マウス構造プロテオミクス：マウス由来Fis1p likeドメインの構造解析 (理研GSC) ○大橋若奈、廣田洋、山崎俊夫、小柴生造、武藤裕、小林直宏、林文晶、濱田 季之、好田真由美、白水美香子、寺田貴帆、木川隆則、松尾洋、理研ゲノムセンター 遺伝子グループPhase1&2チーム、林崎良英、横山茂之	210
P53	蛋白質ランダムコイル鎖のNH protonおよび ¹⁵ Nの化学シフトの圧力依存性 (理研細胞情報伝達 ¹ 、神戸大理 ² 、近畿大理工 ³) ○鎌足雄司 ¹ 、Tara N. Niraula ² 、山田博昭 ² 、楠秀樹 ² 、横山茂之 ¹ 、赤坂一之 ^{1,3}	212
P54	putative minimal nucleotidyltransferase の構造解析 (理研GSC ¹ 、阪大院理 ² 、理研播磨 ³ 、横浜市大院総理 ⁴ 、理研遺伝生 ⁵ 、東大院理 ⁶) ○鈴木咲良 ¹ 、畠中秀樹 ¹ 、本藤隆亨 ¹ 、奥村亜子 ¹ 、黒田裕 ¹ 、倉光成紀 ^{2,3} 、柴田武彦 ^{4,5} 、井上頼直 ³ 、横山茂之 ^{1,3,6}	214
P55★	マウス構造プロテオミクス：Bola-likeタンパク質の溶液構造 (東大院理 ¹ 、理研GSC ²) ○葛西卓磨 ^{1,2} 、井上真 ² 、木川隆則 ² 、松尾洋 ² 、矢吹孝 ² 、布川絵未 ² 、関英子 ² 、松田貴意 ² 、青木雅昭 ² 、白水美香子 ² 、寺田貴帆 ² 、小柴生造 ² 、理研ゲノムセンター遺伝子グループPhase1&2チーム ² 、林崎良英 ² 、横山茂之 ^{1,2}	216
P56	ヒト構造プロテオミクス：ARSACS病原遺伝子産物Sacsinより見出された DnaJ様タンパク質J-ドメインの溶液構造 (理研GSC ¹ 、かずさDNA研 ²) ○小林直宏 ¹ 、木川隆則 ¹ 、小柴生造 ¹ 、松尾洋 ¹ 、白水美香子 ¹ 、矢吹孝 ¹ 、布川絵未 ¹ 、関英子 ¹ 、松田貴意 ¹ 、青木雅昭 ¹ 、井上真 ¹ 、寺田貴帆 ¹ 、小原收 ² 、中山学 ² 、田仲昭子 ¹ 、横山茂之 ¹	218
P57	マウス構造プロテオミクス：cullin-3 C末端ドメインの溶液構造 (理研GSC) ○井上真、木川隆則、松尾洋、矢吹孝、布川絵未、関英子、松田貴意、青木雅昭、白水美香子、寺田貴帆、小柴生造、理研ゲノムセンター遺伝子グループPhase1&2チーム、林崎良英、横山茂之	220
P58★	マウス構造プロテオミクス：ヒトMUC16ホモログのSEAドメインの溶液構造 (東大院理 ¹ 、理研GSC ²) ○前田健 ^{1,2} 、井上真 ² 、木川隆則 ² 、松尾洋 ² 、矢吹孝 ² 、布川絵未 ² 、関英子 ² 、松田貴意 ² 、青木雅昭 ² 、白水美香子 ² 、寺田貴帆 ² 、小柴生造 ² 、理研ゲノムセンター遺伝子グループPhase1&2チーム ² 、林崎良英 ² 、横山茂之 ^{1,2}	222
P59	ペプチドを安定同位体ラベルする系の改善 (群大工 ¹ 、三菱化学生命研 ² 、CREST/JST ³) ○稲岡奇彦 ¹ 、飯塚靖子 ¹ 、窪田健二 ¹ 、河野俊之 ² 、若松馨 ^{1,3}	224
P60	NMRによる大腸菌由来DNA修復蛋白質AdaのCys69メチル化による立体構造変化解析 (阪大院薬) ○瀧之脇浩人、松田安弘、吉田卓也、小林祐次、大久保忠恭	226
P61★	¹ H NMRによるゲル化に伴うゼラチン鎖のダイナミクスの変化に関する研究 (東京水産大) ○阿部絹子、松川真吾、渡部徳子	228

- P62 リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の立体構造決定と疎水性低分子結合様式の解析 230
(阪大院薬¹、大阪バイオ研²、CREST/JST³、三重短大生活科学⁴) ○乾正樹¹、乾隆^{2,3,4}、吉田卓也¹、
裏出良博^{2,3}、小林祐次¹、大久保忠恭¹

【液晶、膜、不均一系】

- P63 NMRによる水、シリコン油及び界面活性剤系で生成するバイコンティニューア相の状態分析 232
(株)資生堂 ○木村朋子、渡辺啓、小松一男
- P64★ 高磁場勾配NMR法による高分子ゲル中の物質拡散及びネットワーク構造に関する研究 234
(東工大院国際高分子基礎研究センター) ○山根祐治、松井政徳、木村英昭、黒木重樹、安藤勲
- P65 パルス磁場勾配NMRを用いた植物細胞内制限空間における自己拡散係数測定 238
(分子研) ○大石修
- P66 キラル液晶中での光学活性トリアゾール系化合物の二次元NMR測定と配向パラメーターの決定 240
(神戸薬大¹、阪大医²) ○杉浦眞喜子¹、木村敦臣²、藤原英明²、灰野裕美¹、伊藤允好¹
- P67★ 多核固体NMRによるNa型モンモリロナイトの構造解析 242
(東工大原子炉工学研¹、新日本製鐵(株)先端研²) ○大窪貴洋¹、金橋康二²、齋藤公児²、畠山盛明²、
池田泰久¹
- P68 セクロピンA-マガイニン2ハイブリッド抗菌性ペプチドの膜中でのNMR構造解析 244
(農工大¹、国際基督教大理²、(株)東レリサーチセンター³) ○吹田宏英¹、鈴木悠¹、梅本公子²、
川口謙^{1,3}、朝倉哲郎¹
- P69 Si-Nb-C-O系コーティング溶液のNMRによるキャラクタリゼーション 246
(東工大応用セラミックス研¹、東工大資源研²) ○福島学¹、中村義之²、安田榮一¹、田邊靖博¹
- P70★ メソ多孔体に吸着した*p*-ニトロアニリンの挙動 248
(産総研) ○小森佳彦、林繁信
- P71 エチルメチルイミダゾール(EMI)カチオンと種々のアニオンからなるイオン性液体と 250
リチウム塩をドーブした電解質のイオン拡散とイオン伝導
(産総研¹、エアサコーポレーション²) 早水紀久子¹、○Emmanuelle Raelboom¹、秋葉悦男¹、
中川裕江²、相原雄一²

【固体化学におけるNMR】

- P72 活性基を付与したメソポーラスシリカ層状組織体の固体NMR法による構造解析 252
(神奈川大工) ○高山俊夫、本田航司
- P73★ 固体NMR法による π 共役系高分子の準秩序構造とダイナミクス 254
(東工大院生命理工¹、東工大資源研²) ○浅川直紀¹、守誠一朗¹、松原清彦¹、山本隆一²、
井上義夫¹
- P74 固体NMRによる廃ガラスリサイクルプロセスの解析 256
(産総研¹、科技団さきがけ21²、姫路工大³) ○赤井智子^{1,2}、増井大二²、陳丹平²、矢澤哲夫³
- P75 Refocused CP-INADEQUATE、FSLG-HETCOR法による天然セルロースの結晶構造解析 258
(ブルカーバイオスピン(株)¹、北大院工²) ○甲野裕之¹、恵良田知樹²、高井光男²
- P76★ パルスNMR法によるアクリル酸、アクリル酸エステルの塊重合に関する研究—側鎖の違いが 260
ネットワーク形成に及ぼす影響(3)
(防衛大応化) ○福田敦子、木本博喜、浅野敦志、黒津卓三
- P77 MQ-MAS法による有機ナトリウム塩類の水和状態の解析 262
(シーエーシーズ(株)) ○田畑祥生、坂田育幸、植垣隆浩

P78	固体無機材料の構造解析に対する高磁場NMRの有効性 (新日本製鐵(株)) ○金橋康二、齋藤公児	264
P79★	ヘリックス構造を有する野生種蚕の絹タンパク質に関する固体NMR精密構造解析 ～体内における特異的構造安定化機構の解明～ (農工大工) ○中澤靖元、朝倉哲郎	266
P80	¹³ C固体MAS NMRを用いたジメドン/βシクロデキストリン包接体のケト・エノール互変異性の研究 (京大院理) ○松本聖、中村新治、竹腰清乃理、寺尾武彦	270
P81	固体NMRによる、青色蛍光体ZnS:Ag、Alの付活剤濃度変化に対する発光特性と微細構造との関係 (三菱化学本社(株) ¹ 、化成オプトニクス(株) ² 、東京水産大 ³) ○原園としえ ¹ 、徳永幸男 ² 、渡部徳子 ³	272
P82★	¹²⁹ Xe NMR法によるゴム状高分子の自由体積評価 (名工大工) ○大野真希、鈴木智幸、吉水広明、辻田義治	274
P83	ビスフェノールAの ¹ H HS-MAS NMR (横希大院総理 ¹ 、ブルカーバイオスピン(株) ²) ○本多尚 ¹ 、甲野裕之 ²	276
P84	高圧 ¹²⁹ Xe NMRによるX型ゼオライトのカチオン置換効果の研究 (帝人 ¹ 、阪大院理 ² 、阪大博物館 ³) ○永阪文惣 ¹ 、伊勢本潤 ¹ 、尾身洋典 ² 、江口太郎 ^{2,3}	278
P85★	高圧 ¹²⁹ Xe NMRによる各種ゼオライトの吸着と化学交換の研究 (阪大院理 ¹ 、阪大博物館 ²) ○加藤範子 ¹ 、尾身洋典 ¹ 、宮久保圭祐 ¹ 、上田貴洋 ^{1,2} 、江口太郎 ^{1,2}	280
P86	²⁹ Si-固体高分解能NMR法によるHPLC用逆相充填剤表面の状態分析 (株)資生堂) ○木村朋子、小松一男	282
P87	多孔性金属錯体の固体高分解能NMR—ゲスト分子の吸着挙動 (京大院工) ○堀毛悟史、中西康哲、北浦良、北川進	284
P88★	静的磁場勾配を用いた高分子の拡散と局所磁場勾配の測定 (東工大院生命理工) ○佐藤耕平、浅川直紀、井上義夫	286
P89	臭素化されたカルド型ポリイミドの ¹³ C及び ¹⁵ N-CP/MASによる構造解析 (株)日鐵テクノロジー ¹ 、新日本製鐵(株) ²) ○畠山盛明 ¹ 、齋藤公児 ² 、金橋康二 ²	288
P90	家蚕絹の分子内・分子間構造決定のためのモデル化合物の合成と固体NMR構造解析 (農工大工 ¹ 、バリアンテクノロジーズジャパン ²) ○矢吹一人 ¹ 、中澤靖元 ¹ 、亀田恒徳 ¹ 、 芦田淳 ^{1,2} 、朝倉哲郎 ¹	290
P91★	固体 ¹⁹ F{ ¹ H} CP/MAS NMRを用いたフッ化ビニリデン系高分子の高次構造と分子運動性の解析 (東工大院理工) ○相見敬太郎、小関佑、安藤慎治	292
P92	力学物性と生分解性の最適化—Poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate)の相構造と分子運動— (理研高分子化学 ¹ 、東工大院総合理工 ² 、理研物質基盤 ³) ○桑原和弘 ¹ 、Gan Zhihua ² 、仲村高志 ³ 、阿部英喜 ¹ 、土肥義治 ^{1,2}	294
P93	固体 ¹⁵ N化学シフトテンソルを用いたポリイミドおよびイミドモデル化合物のコンホメーション解析 (東工大院理工 ¹ 、東工大院生命理工 ²) ○小宮山孝 ¹ 、相見敬太郎 ¹ 、浅川直紀 ² 、安藤慎治 ¹	296
P94★	多重 ¹³ Cラベル粉末試料をもちいたDARR法による ¹³ C- ¹³ C距離測定 (京大院理) ○大橋竜太郎、水野敬、加藤悦子、竹腰清乃理、寺尾武彦	298
P95	アイソタクチックポリプロピレン重合パウダーの微細構造 (群大工) ○山延健、河合真由美、植木克典、上原宏樹、甲本忠史	300
P96	at-PMMAのLocal Relaxation Modeの検証とNMR相関時間スペクトル (北大院工) 石井文明	302

P97★	Effective Reduction of rf Power for ¹ H Homonuclear Dipolar Decoupled Cross Polarization in Solid State NMR Spectroscopy (横国大院工 ¹ 、National High Magnetic Field Laboratory ² 、FSU ³) ○西村勝之 ¹ 、Timothy A. Cross ^{2,3} 、内藤晶 ¹	304
P98	棒状高分子のゾルーゲル転移 (北大院工) ○平沖敏文、堤耀廣	308
P99	凍結乾燥製剤中の高分子の ¹ Hについて測定したT ₁ およびT _{1ρ} の帰属と分子運動性の解析 (国立衛研) ○吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄	310
P100★	高速SASSプローブによる同種核広帯域リカップリング法の開発 (京大院理) ○水野敬、竹腰清乃理、寺尾武彦	312
P101	ニフェジピンと水溶性高分子の分散状態に関する固体スピン拡散NMR解析 (国立衛研) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄	314
P102	固体 ² H NMR測定によるSyndiotactic Polystyrene Complex中のゲスト分子の分子運動解析 (名工大工) ○山本裕輔、岸真弘、吉水広明、辻田義治	316
P103★	単結晶[Mg(H ₂ O) ₆][SiF ₆] ₂ における分子運動と変調構造の ² H NMRに及ぼす効果 (物材機構 ¹ 、金沢大理 ²) ○飯島隆広 ¹ 、水野元博 ²	318
P104	固体NMR法による無機-有機分子ハイブリッド材料の溶媒含有結晶状態における構造と分子運動の解析 (京大化研) ○日下康成、増田憲二、梶弘典、堀井文敬	322
P105	TMPC/PSポリマーブレンド系の相溶化に伴う体積変化の ¹²⁹ Xe NMRによる解析 (名工大工) ○村上隆史、鈴木智幸、吉水広明、辻田義治	324
P106★	固体NMRによるメリチンの動的膜結合構造解析 (横国大院工) ○虎谷秀一、西村勝之、内藤晶	326
P107	二次元固体 ¹³ C MAT法による液晶性高分子のダイナミクス解析 (京大化研) ○村上美和、石田宏之、梶弘典、堀井文敬	328
P108	ポリアクリロニトリルの熱処理過程における局所構造変化 (京大化研) ○小野山吾郎、梶弘典、堀井文敬	330
P109	放線菌由来ε-poly-L-Lysineおよびその誘導体の ¹³ Cおよび ¹⁵ N固体高分解能NMRによる分子構造解析 (福井大工 ¹ 、金沢大工 ²) 前田史郎 ¹ 、○森貴志 ¹ 、佐々木千鶴 ² 、国本浩喜 ²	334
P110	¹³ C-NMRによる側鎖にナフチル基を有するポリ(L-グルタミン)の分子運動の研究 (北大院工 ¹ 、奈良先端大 ² 、千葉大工 ³) ○鈴木淳司 ¹ 、尾張洋史 ¹ 、堤耀廣 ¹ 、莊司長三 ² 、中平隆幸 ³	336
P111	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.IV (東工大院国際高分子基盤研究センター ¹ 、ブルカーバイオスピン(株) ²) ○村田勝義 ¹ 、甲野裕之 ² 、黒木重樹 ¹ 、安藤勲 ¹	338
P112	キトサンおよびキトサン-高分子複合体の固体高分解能NMRによる分子構造解析 (福井大工) 前田史郎、○山下伸一郎、武藤勝紀、櫻井謙資	340
P113	¹³ C標識膜蛋白質のNMR：残基依存性 (姫路工大院理) ○山口悟、白石彩、荒川規、辻暁、斉藤肇	342
P114	¹³ C標識膜蛋白質のNMR：オリゴマー化、二次元結晶形成効果 (姫路工大院理) ○斉藤肇、土田隆浩、小川敏二、荒川規、山口悟、辻暁	344
P115	固体2次元交換 ¹³ C NMR法によるPMAA/PVAcブレンドの研究 (防衛大応化) ○浅野敦志	346

P116	機能性を付与した各種絹様物質の遺伝子組換え法による作製と固体NMR構造解析 (農工大工) ○嘉数あや、姚菊明、川村純司、横井恵理子、亀田恒徳、朝倉哲郎	348
P117	Jeener-Broekaert双極子信号を用いた2次モーメントのイメージング (筑波大物工 ¹ 、横浜創英短大 ² 、応用数理解(株) ³) 松井茂 ¹ 、斎藤誠治 ¹ 、○平山裕子 ¹ 、橋本雄幸 ² 、井上多門 ³	350
P118	NMRイメージング法における電場印加下の高分子ゲルのリアルタイム画像化 (東工大院理工) ○堀田芳生、安藤勲	354
P119	NMRイメージング法による高分子ゲル中の金属イオンの空間分布 (東工大院理工) ○佐々木曉嗣、横田里美、堀田芳生、黒木重樹、安藤勲	356

【固体測定法の開発】

P120	¹ H間距離測定のための ¹ H- ¹ H二量子双極子結合固体MAS 2次元 ¹³ C/ ¹³ C化学シフト相関法 (阪大蛋白研) ○松木陽、藤原敏道、阿久津秀雄	358
P121	MAS条件下での ¹ H間ゼロ量子双極子結合による磁化移動の ¹³ C観測を用いた距離解析 (阪大蛋白研) ○高橋大樹、藤原敏道、阿久津秀雄	362
P122	Nuclear Overhauser Polarization (NOP)-MAS experiments for solid state proteins (生物研 ¹ 、京大院理 ²) ○加藤悦子 ¹ 、竹腰清乃理 ² 、寺尾武彦 ²	366
P123	2D H-N/C-H双極子相関固体NMR測定によるペプチド主鎖の構造決定 (京大院理) ○溝上潤、大橋竜太郎、水野敬、竹腰清乃理、寺尾武彦	368
P124	MAS下での非ゼーマン熱浴からの交差分極 (京大院理) ○大橋竜太郎、竹腰清乃理、寺尾武彦	370
P125	固体試料の中速回転下におけるXiX decouplingの適用 (パリアンテクノロジーズジャパン ¹ 、農工大工 ²) ○芦田淳 ^{1,2}	372
P126	高速MASのための基本技術の開発 (理研) ○仲村高志	374
P127	張力印加NMRによる繊維の構造変化に関する研究 (農工大工) ○亀田恒徳、朝倉哲郎	376
P128	高周波振動による高分子の固体NMRの高分解能化についての研究 (東工大院理工) ○留田篤志、安藤勲、黒木重樹、木村英昭	378

【医用/*in vivo* NMRとイメージング】

P129	超偏極Xe-129の化学シフトに基づく多孔質微粒子への吸着特性の研究 (阪大医) ○神谷貴史、若山哲也、木村敦臣、藤原英明	380
P130	スポーツ障害診断用コンパクトMRI装置の開発 (筑波大物工 ¹ 、(株)エム・アール・テクノロジー ² 、筑波大臨床医 ³) ○栗本岳明 ¹ 、白猪亨 ¹ 、松永吉晴 ¹ 、松田善正 ¹ 、拝師智之 ² 、宇津澤慎 ² 、巨瀬勝美 ¹ 、吉岡大 ³	382
P131	超偏極 ¹²⁹ Xe-MRI/Sの生体医用工学への応用 (産総研光技術 ¹ 、産総研人間福祉医工学 ² 、阪大院歯 ³ 、大阪市大工 ⁴ 、産総研ライフエレクトロニクス ⁵ 、先端医療振興財団映像医療 ⁶) ○服部峰之 ¹ 、本間一弘 ² 、斎藤もよこ ³ 、高橋信幸 ² 、竹井直行 ⁴ 、中井敏晴 ⁵ 、村上秀明 ³ 、黒田輝 ⁶ 、平賀隆 ¹	384

P132	浸漬過程における米粒内水分分布のGradient Echo法による解析 (独)食総研 ¹ 、秋田総食研 ² 、(独)農研機構作物研 ³) ○堀金明美 ¹ 、高橋仁 ² 、丸山幸夫 ³ 、大坪研一 ¹ 、吉田充 ¹	386
P133	マイクロMRIによるゆで麵の水分分布の測定 (埼玉工技センター ¹ 、(独)食総研 ² 、筑波大物工 ³ 、埼玉大理 ⁴) ○小島登貴子 ¹ 、堀金明美 ² 、松田善正 ³ 、巨瀬勝美 ³ 、吉田充 ² 、永澤明 ⁴	388
P134	<i>in vivo</i> ³¹ P NMRを使った酵母ポリリン酸蓄積システムの解析 (横浜市大院総理 ¹ 、阪大工 ²) ○枋尾豪人 ¹ 、森田将史 ¹ 、富田節子 ¹ 、Ausunkaree Choowong ² 、本間誠之 ² 、原島俊 ² 、古久保哲郎 ¹ 、白川昌宏 ¹	390
【ハードウェア】		
P135	超並列型MRマイクロスコープの開発 (筑波大物工 ¹ 、筑波大臨床医 ² 、(株)エム・アール・テクノロジー ³ 、(株)城南電子研 ⁴) ○松田善正 ¹ 、宇津澤慎 ³ 、栗本岳明 ¹ 、坪師智之 ³ 、山崎由香子 ¹ 、巨瀬勝美 ¹ 、阿武泉 ² 、丸谷光廣 ⁴	392
P136	ナローポーア一用高磁場固体ダブルチューニングプローブの開発 1 (日本電子(株) ¹ 、新日本製鐵(株) ²) ○長谷川憲一 ¹ 、志野英雄 ¹ 、樋岡克哉 ¹ 、杉沢寿志 ¹ 、齋藤公児 ²	394
P137	ナローポーア一用高磁場固体ダブルチューニングプローブの開発 2 (日本電子(株) ¹ 、新日本製鐵(株) ²) ○志野英雄 ¹ 、長谷川憲一 ¹ 、樋岡克哉 ¹ 、杉沢寿志 ¹ 、齋藤公児 ²	396
P138	光偏極キセノンと偏極分子液体の生成 (姫路工大院理) ○今井宏彦、石川潔、高木芳弘	398
P139	連続フロー型超偏極 ¹²⁹ Xeガス発生装置の開発 (産総研 ¹ 、東横化学(株) ²) ○服部峰之 ¹ 、平賀隆 ¹ 、大竹紀夫 ² 、村山守男 ²	400
P140	遅延線NMRプローブのシミュレーションおよび製作 (分子研) ○久保厚、市川真史	402
P141	InPの光ポンピングNMR (物材機構 ¹ 、科学技術振興事業団 ²) ○端健二郎 ^{1,2} 、後藤敦 ^{1,2} 、清水禎 ^{1,2} 、大木忍 ^{1,2}	406
P142	超高磁場NMR装置を用いたタンパク質構造解析への取り組み (理研GSC ¹ 、横浜市大院総理 ² 、理研細胞情報伝達 ³ 、東大院理 ⁴ 、日本電子(株) ⁵ 、神戸製鋼 ⁶ 、物材機構 ⁷) ○前田秀明 ^{1,2} 、菊地淳 ^{1,2} 、伊藤隆 ^{1,2} 、横山茂之 ^{1,3,4} 、栗原範明 ⁵ 、末松浩人 ⁵ 、伊藤聡 ⁶ 、三木孝史 ⁶ 、吉川正敏 ⁷ 、佐藤明男 ⁷ 、木吉司 ⁷ 、和田仁 ⁷	408
【計算、シミュレーション、データ処理】		
P143	FMO法による蛋白質の電子状態解析 (産総研生物情報解析 ¹ 、国立衛研 ² 、富士総研 ³ 、産総研分子細胞工学 ⁴ 、産総研計算科学 ⁵) ○根本直 ¹ 、中野達也 ² 、福澤薫 ³ 、古明地勇人 ⁴ 、北浦和夫 ⁵ 、金澤健治 ¹ 、石塚靖子 ¹ 、中西洋志 ¹ 、上林正己 ⁴	412
P144	Overtoneパルスをを用いたREDOR信号の計算 (電通大) ○桑原大介	414
P145	プログラムJUBAKOとUNAJUによるNOE不在情報を利用した蛋白質立体構造決定過程の改良 (都臨床研 ¹ 、理研GSC ²) ○畠中秀樹 ^{1,2}	416
P146	帰属支援システム(Olivia)における汎用自動解析アルゴリズムに関する考察 (CREST/JST ¹ 、北大薬 ²) ○横地政志 ¹ 、稲垣冬彦 ^{1,2}	418

【その他】

- P147 タンパク質、核酸のNMRデータベースBMRBミラーサイトの開設 420
(阪大蛋白研) ○中谷英一、中村春木、阿久津秀雄
- P148 PGSE NMR法による粘土ゲル中の水の自己拡散係数の計測：NMR物理探査のための基礎実験 422
(産総研) ○中島善人
- P149 SDBS-NMR-NPシステムの作成—天然物のNMRスペクトルデータベース— 426
(NMRDBTech¹、東大農²、理研³、(株)日本電子データム⁴) ○早水紀久子¹、降旗一夫²、
鶴沢洵³、有福和紀⁴
- P150 固体NMR量子計算機の高ビット化と初期化のための技術開発 428
(物材機構¹、CREST/JST²) ○後藤教^{1,2}、清水禎^{1,2}、端健二郎^{1,2}、北澤英明^{1,2}
- P151 固体NMR量子コンピュータの開発：化合物半導体の同位体超格子 430
(物材機構) ○清水禎、後藤教、端健二郎、北澤英明
- P152 ヒト脳内組織の分画と代謝物の定量 434
(日本女子大理¹、国立精神神経センター²、東大医科学研³) ○高橋征三¹、荻野孝史²、
吉川宏起³、川上綾¹
- P153 Use of residual dipolar couplings without explicit specification of the alignment tensor in 436
NMR structure calculations in torsion angle space with the program CYANA
(RIKEN GSC) ○平田 雄一、Peter Gunttert

第 一 日

11月6日(水)

一 般 講 演 要 旨

Grad. Sch. Pharm. Sci., The University of Tokyo, and Biological Informatics Research Center (BIRC), AIST. Ichio Shimada

In investigating the ligand-recognition mechanism of collagen-binding proteins (CBPs) at an atomic resolution, the nature of the supramolecular complex between fibrillar collagen and CBPs has hindered detailed X-ray and NMR analyses, due to the lack of appropriate approaches in structural biology toward large heterogeneous supramolecular complexes. Recently, we proposed an NMR measurement method, termed transferred cross-saturation (TCS), which enables the identification of the contact residues in a huge protein complex in a rigorous manner. Here we report the interaction mode between the A3 domain of von Willebrand factor (vWF) and fibrillar collagen. The binding site of the A3 domain was located at the hydrophobic 'front' surface, and was totally different from that of the I domain from the $\alpha 2$ subunit of integrin ($\alpha 2$ -I domain), which was previously reported to be the hydrophilic 'top' surface of the molecule, although the A3 domain and the $\alpha 2$ -I domain share a similar fold and possess the identical function of collagen binding.

序：細胞外マトリックスの主要な構成成分であるコラーゲンは、3本のポリペプチド鎖からなる特有のトリプルヘリックス構造を有する。生体内に存在するコラーゲンの多くはトリプルヘリックス構造がさらに会合して線維（フィブリル）構造を形成することが知られている。このようなコラーゲンフィブリルは細胞表面のコラーゲン受容体などと相互作用することにより、細胞接着などのプロセスを媒介し、発生・分化および炎症・腫瘍などの病態の進行など多岐にわたる生命活動に関与している。よって、コラーゲンとコラーゲン受容体との相互作用様式を詳細に解析することにより、これらの生命活動の理解やさらに抗血栓症薬など新規薬物の開発において重要な構造情報がもたらされると期待される。いくつかのコラーゲン受容体は、von Willebrand Factor の A ドメインとアミノ相同性の高い領域を持っており、その領域は VWA (von Willebrand Factor A-type) ドメインスーパーファミリーに分類されている。コラーゲン結合能を有する VWA ドメインのうち、最もよく解析されているのはインテグリンの $\alpha 2$ -I ドメインである。 $\alpha 2$ -I ドメインはコラーゲン模倣ペプチドとの複合体の立体構造が X 線結晶解析により明らかにされている。 $\alpha 2$ -I ドメインは中央の β ストランドの両側を両親媒性の α ヘリックスが取り囲んでいる、いわゆる "dinucleotide-binding" フォールドを持ち、コラーゲンのトリプルヘリックスは分子の上面の MIDAS モチーフと呼ばれる構造に結合している。この MIDAS モチーフは他の VWA ドメインにおいてもリガンド結合部位となることが知られている。

本研究で取り上げる von Willebrand factor (vWF) は、血管損傷部位において露出した内皮構造と血小板膜上受容体を架橋することにより、血小板凝集反応を開始させる蛋白質である。vWF の主要なコラー

転移交差飽和法、コラーゲン、コラーゲン受容体、相互作用

しまだいちお

ゲン結合部位は A3 ドメイン (アミノ酸番号 920-1111) に存在し、A3 ドメインは VWA ドメインに分類される。A3 ドメイン単独の構造は既に明らかにされており、他の VWA と類似した立体構造を形成していることが示された。しかしながら、A3 ドメインでは MIDAS モチーフが立体的に形成されておらず、そこへ変異を導入してもコラーゲン結合活性が損なわれることなかった。したがって、A3 ドメインのコラーゲン結合部位を同定することが望まれていた。

このようなコラーゲンとコラーゲン受容体タンパク質の間の相互作用様式を、従来の NMR 法および X 線結晶構造解析により解析することは困難である。その理由は、前述のようにコラーゲンは生理的条件下において、不溶性のフィブリルを形成してしまうからである。これまでに我々が開発を行ってきた転移交差飽和 (Transferred cross-saturation: TCS) 法は、あるタンパク質の相互作用界面を複合体全体の分子量によらず決定することが可能な手法である。よって、コラーゲンのような不均一な巨大超分子とコラーゲン結合蛋白質との相互作用を TCS 法により解析出来ると考えた。そこで本研究では、A3 ドメインとフィブリル型コラーゲン複合体に対して TCS 法を適用し、A3 ドメインにおけるコラーゲン結合部位を同定することを目的とした。

A3 ドメイン主鎖シグナルの帰属: A3 ドメイン主鎖シグナル帰属を行うため、均一 ^{13}C , ^{15}N 標識サンプルを用いて、HNCA・HN(CO)CA・CBCA(CO)NH の三重共鳴実験を行った。また均一 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識サンプルを用いて、HNCACB 実験を行った。また、アミノ酸選択的に主鎖 ^{15}N 標識したサンプルも幾つか調製した。以上の NMR 測定を行った結果、A3 ドメインの主鎖シグナルをほぼ完全に帰属することに成功した。

TCS 実験: TCS 実験用に、均一 ^2H , ^{15}N 標識された A3 ドメインとフィブリルを形成した非標識のコラーゲンの混合サンプルを準備した。十分な遊離状態の A3 ドメインのシグナルを観測するため、A3 ドメインとコラーゲンのモル比を 1:0.1、pH6.0 (結合定数 6.5×10^4 に対応) に調整した。フィブリル型コラーゲン存在・非存在下の HSQC スペクトルのシグナルパターンはほとんど同一であったことから、遊離の状態の A3 ドメインのみが観測されていることが確認された。溶媒のプロトン密度は 10% に下げることで、A3 ドメイン内の交換可能なアミドプロトンを介したスピン拡散を抑制した。

A3 ドメインにおけるコラーゲン結合部位: フィブリル型コラーゲン存在下における A3 ドメインの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを、ラジオ波照射を行ったときと行わないときのそれぞれについて測定し、ピーク強度の減少率を残基ごとに計算した。照射の影響を受けた残基を A3 ドメインの立体構造上にマッピングしたところ、これらの残基は A3 ドメイン前面のヘリックス 3-ストランド C-ヘリックス 4 を横断するように領域に集中して存在しているが示された。興味深いことに、この領域には、コラーゲンのトリプルヘリックス構造を収容することが可能な溝が形成されていることが観察された。したがって、A3 ドメインはこの溝でコラーゲンを認識していると結論した。

本研究では、A3 ドメインにおけるフィブリル型コラーゲンとの相互作用部位を、TCS 法を利用して決定することに成功した。本手法はコラーゲン結合タンパク質のコラーゲン結合部位を同定する場合のみならず、巨大タンパク質または不溶性の生体物質 (細胞外マトリックス、細胞組織、細胞) と相互作用しているタンパク質の相互作用界面を決定する場合においても、有効な解析法と考える。

プリオンにおける安定構造－活性化構造間のジャンプ－ミリ秒揺らぎの計測－

(岐阜大医¹、理研²、近畿大生物理工³)

○桑田一夫¹、鎌足雄司²、赤坂一之³

Conformational jump between native and activated state occurring in the prion protein – Measurement of the dynamics on the millisecond order –

¹Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine, Gifu University, ²RIKEN, ³Department of Biotechnological Sciences, Faculty of Biology – Oriented Science and Technology,

Kazuo Kuwata¹, Yuji – O Kamatari², Kazuyuki Akasaka³

1. プリオンの活性化構造 (PrP^{*}) の発見

クロイツフェルト・ヤコブ病に代表されるプリオン病は、プリオン蛋白が正常構造 (PrP^C) から感染性を有する異常構造 (PrP^{Sc}) へと構造転換することにより成立する、と考えられている (プリオン仮説) (1)。我々は、この構造転換のメカニズムに関して、主に NMR を用いて研究を行ってきた。

プリオンの活性化構造 (PrP^{*}) は、正常構造 (PrP^C) と変性構造 (PrP^U) との中間に存在する構造を指し、以前より円二色性スペクトルの変性剤濃度依存性からその存在が示唆されていたが (2)、その構造は全く不明であった。わが国で開発された高圧 NMR 法の応用により、初めてその原子レベルでの特徴が明らかとなった (3)。

プリオン蛋白は、3本のヘリックス A, B, C, 及び2本の短いストランド S1, S2 よりなる (4)。高圧 NMR 法を用いて、以下の事が明らかとなった。

まず、HSQC スペクトル強度の圧力依存性から、PrP^C においては、ストランド S1 とヘリックス C との界面が特に不安定であり、また、ヘリックス B, C の安定性がヘリックス A に比べ相対的に低いことが明らかになった。

そこで、ヘリックス B, C が局所的に変性した状態を PrP^{*} と解釈すると、今まで得られている PrP^{*} に関する生物学的及び物理化学的知見と矛盾しないことが分かった。生理的条件下では、このような PrP^{*} は約 1% のポピュレーションで存在している。

また、病気を引き起こすプリオン遺伝子の変異はヘリックス B 及び C に集中していることから、変異によるヘリックス B, C の不安定化が、PrP^{*} のポピュ

レーションの増加につながり、異常構造 (PrP^{Sc}) への転移を促進している可能性がある、と考えられる。すなわち、 PrP^* は、 PrP^{Sc} にいたる経路の中間に位置している可能性がある。

2. プリオン・モノマーの構造揺らぎ

PrP^* はモノマーであり、アミロイドやオリゴマーではないことも重要である。プリオン病においては、病原性を有する異常構造が、モノマー又はダイマーであることが予想されている。また最近、ポリグルタミンリピート病において、アミロイド鎖伸長反応の核が、矢張り、モノマーであることが指摘されている (5)。つまり、他の神経変性疾患においても、関与する蛋白あるいはペプチドのモノマー状態における構造転移がアミロイド形成の律速段階となっている可能性が高い。また、アミロイドよりもむしろモノマー状態の異常構造が病原性と関連している可能性も否定できない。

一方、高圧 NMR により、化学シフトの圧力依存の非線形性がヘリックス間のループ部分に強く観測されることから、これらの部位にヒンジ様運動が存在し、さらに PrP^{C} から PrP^* への遅い揺らぎが存在することが示唆された。

そこで、我々は、T2 緩和時間が CPMG 系列の 180 度パルス間隔 (τ) に依存する性質を利用し、マイクロ秒からミリ秒におけるプリオン蛋白の揺らぎを調べた (6)。

遅い揺らぎは、全アミノ酸に渡って存在し、その周波数は、アミノ酸残基によって異なるが、おおよそ 10~100 Hz の範囲にあった。また、熱力学的に安定性の低いアミノ酸残基領域には、より周波数成分の低い揺らぎが分布しており、これらの揺らぎは、 PrP^{C} から PrP^* への遅い揺らぎに相当する可能性がある、と考えられた。オフ・レゾナンス・スピン・ロック緩和との関連性、或いは、このようにして得られた遅い揺らぎの寄与をあらかじめ取り除いたオーダー・パラメーター計算の結果等、詳細に関しては、本討論会で述べることとする。

このように、生理的条件下で PrP^{C} から PrP^* への遅い揺らぎが観測出来たことは、静的立体構造のみでなく、モノマーレベルにおける構造変換を調べるのに、NMR が極めて有効な手段であることを示している。今後この方向での研究を推進することがより一層重要である、と考えられる。

文献

1. Prusiner, S.B. (1991) *Science* 252, 1515-1522
2. Zhang, H., Stöckel, J., Mehlhorn, I., Groth, D., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., James, T. L., Cohen, F. E. (1997) *Biochemistry*, 36, 3543-3553
3. Kuwata, K., Hua, L., Yamada, H., Legname, G., Prusiner, S. B., Akasaka, K., James, T. L. (2002) *Biochemistry* (accelerated publication), in press
4. James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N.B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D.G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B., Cohen, F.E. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 10086-10091
5. Chen, S., Ferrone, F.A., Wetzel R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11884-11889
6. Luz, Z. & Meiboom, S. (1963) *J. Chem Phys.* 39, 366-370

1 L3

NMRによる小胞体シャペロンの高次構造と相互作用の解析

(名古屋市立大学大学院薬学研究科)

山口芳樹、栗本英治、原田拓志、大竹恵介、中野路子、宮崎千穂、高橋禮子、○加藤晃一

NMR analyses of structure and interactions of ER chaperones

Yoshiki Yamaguchi, Eiji Kurimoto, Takushi Harada, Otake Keisuke, Michiko Nakano, Chiho Miyazaki, Noriko Takahashi, and Koichi Kato

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

Protein disulfide isomerase (PDI) and calreticulin (CRT) are molecular chaperones, which contribute to folding and quality control of nascent glycoproteins in the endoplasmic reticulum (ER). Here, we report stable-isotope-assisted NMR studies of PDI and CRT. Inspection of the NMR data indicates that 1) Notwithstanding a high amino acid sequence similarity between *a* and *a'* domains of PDI, the two cysteine pairs, each of which forms an active site in these domains, exhibit different redox potentials, which results from domain-domain interactions, and 2) CRT is a versatile molecule that binds various ligands with different domains.

【序論】細胞内で新生したタンパク質が固有の立体構造を形成する過程には様々なタンパク質が関与してこれを介助している。特に、真核生物における糖タンパク質の立体構造形成と品質管理は、小胞体中の複数の分子シャペロンの協調的な作用によって保証されていることが明らかとなりつつある。本研究ではこうした小胞体シャペロンのうち、プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) とカルレティキュリン (CRT) の2つをとりあげる。

PDIは *a-b-b'-a'-c* という5つのドメインからなる分子質量 53 kDa のタンパク質で、ジスルフィド結合形成の触媒反応を通じてタンパク質の高次構造形成に寄与するとともに変性タンパク質に対するシャペロン機能を有している。一方、CRTは N、P、C という3つのドメインからなる分子質量 47 kDa のタンパク質で、小胞体内で Ca^{2+} 濃度依存的に新生糖タンパク質と相互作用するシャペロンとして機能していることが知られている。また、CRTは小胞体のみならず単球などの細胞表面においても存在しており、好中球由来の糖タンパク質であるアズロシジンなどと結合することを通じて細胞を活性化する働きがあることが明らかとなりつつある。

本研究では、PDI と CRT の機能発現の分子構造論的基盤を明らかにするために NMR を利用した高次構造と相互作用の解析を行った。

分子シャペロン、品質管理、糖タンパク質、安定同位体利用 NMR

やまぐちよしき、くりもとえいじ、はらだたくし、おたけけいすけ、なかのみちこ、みやざきちほ、たかはしのりこ、かとうこういち

【方法】好熱カビ PDI とヒト CRT について、完全長の組換えタンパク質および種々のドメイン欠失変異体の安定同位体標識を大腸菌大量発現系を利用して行った。PDI については活性部位に存在するシステイン残基対に関する情報を得るために、そのカルボニル炭素を選択的に¹³C 標識して NMR 解析を行った。CRT のリガンドとなるモノグルコシル化高マンノース型糖鎖は鶏卵由来の免疫グロブリン Y よりグリコアミラーゼ A を用いて遊離し、ピリジルアミノ誘導体として単離した。

【結果・考察】PDI および CRT について以下のことが明らかとなった。

I. PDI の 2 つの活性部位の比較

PDI の活性部位は *a* および *a'* ドメインに存在している。これら 2 つのドメインはアミノ酸配列上高い相同性を有しており、特に活性部位近傍の配列は高度に保存されている。しかしながら、これら 2 つの活性部位に存在するジスルフィド結合は還元剤に対して異なる感受性を有していた。特に、ジチオスレイトールを還元剤として用いた場合、*a'* ドメインの活性部位のジスルフィド結合 (Cys365-Cys368) がはじめに優先的に切断されるが、時間の経過とともにこれが再形成され、それにつれて *a* ドメインの活性部位のジスルフィド結合 (Cys30-Cys33) が還元されることが明らかとなった。また、*b'*-*a'*-*c* ドメインと相互作用することによって *a* ドメインの高次構造および酸化還元電位が変化することが明らかとなった。これらの事実は、アミノ酸配列上の相同性が高い PDI の 2 つの活性ドメインにおいて、遠位の部位との相互作用により規定される周辺環境の違いにより、活性部位の構造と機能が変化することを示している。

II. CRT の分子認識の多様性

CRT は N ドメインを用いて糖鎖のモノグルコシル化された分枝を認識していることが明らかとなった。また、P ドメインは分子全体の中でも内部運動の自由度が顕著に高く、この部位にも Ca²⁺ 結合部位が存在することが NMR 解析により示された。更に、CRT の C ドメインは、C 末端側の負電荷に富んだ部位を用いてアズロシジンのヘパリン結合部位と静電相互作用により結合していることが判明した。このように CRT は小胞体中と細胞表面において、それぞれ異なった様式でリガンドと相互作用していることが明らかとなった。

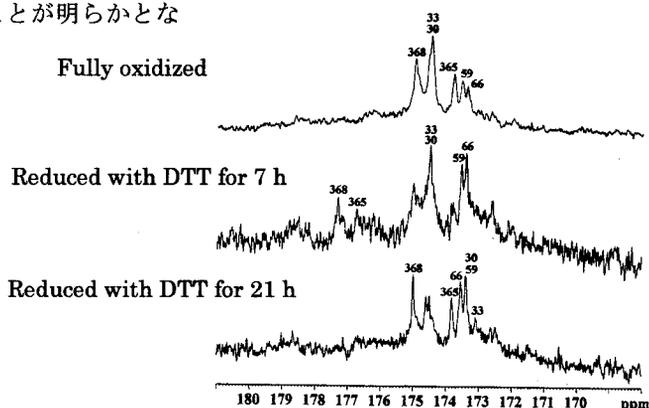


Fig.1 ¹³C NMR spectra of [1-¹³C-Cys] PDI in the presence of 0.2 mM DTT.

1 L4

ヒトおよびマウスの構造プロテオミクス

理研 GSC¹, かずさ DNA 研究所²

○横山茂之¹, 廣田 洋¹, 木川隆則¹, 白水美香子¹, 松尾 洋¹,
山崎俊夫¹, 武藤 裕¹, Peter Güntert¹, 前田秀明¹, 田仲昭子¹, 好
田真由美¹, 林崎良英¹, 中山 学², 小原 收²

Structural proteomics using human and mouse cDNAs

(RIKEN Genomics Sciences Center¹ and Kazusa DNA Institute²) Shigeyuki Yokoyama¹,
Hiroshi Hirota¹, Takanori Kigawa¹, Mikako Shirouzu¹, Yo Matsuo¹, Toshio Yamazaki¹,
Yutaka Muto¹, Hideaki Maeda¹, Akiko Tanaka¹, Mayumi Yoshida¹, Yoshihide Hayashizaki¹,
Manabu Nakayama², Osamu Ohara²

The RIKEN Genomic Sciences Center and Harima Institute at SPring-8 have started a project, RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI) (<http://www.rsgi.riken.go.jp>). RSGI is now integrated into the Japanese national project, National Project on Protein Structural and Functional Analyses, which has started fiscal 2002 to study both structures and functions of proteins in selected biological systems. RSGI has been conducting 1) genome-driven structural genomics to analyze the structures and functions of proteins encoded by the genome of an organism and 2) structural genomics of medically/biologically important proteins from higher eukaryotes. Here we present our efforts in analyzing the targeted proteins from higher eukaryotes, especially mouse and human using NMR spectroscopy. Mouse full-length cDNA clones have been collected and analyzed by H. Hayashizaki. Human cDNAs collected by the Kazusa DNA Institute and others are also used. The target proteins are selected by bioinformatics of both sequence clustering with respect to domains and functional (interaction) proteomes of biological and medical interest. Protein-protein interactions are analyzed mainly by mass spectrometry, while natural and non-natural ligands are screened *in silico* and examined by wet experiments. For protein sample preparation, the cell-free protein synthesis method is routinely used in addition to authentic recombinant methods. After the screening step of feasibility of expression, solubility, and structural stability, large-scale preparation of ¹⁵N/¹³C-labeled protein samples is conducted. Robotic techniques are introduced and large protein preparation facilities are established. The large NMR facility with twenty-two NMR instruments of GSC is used for structural determination. A new facility with another twenty sets is being constructed.

構造プロテオミクス, 無細胞タンパク質合成, マウス cDNA, ヒト cDNA

よこやま しげゆき、ひろた ひろし、きがわ たかのり、しろうず みかこ、まつ
お よう、やまざき としお、むとう ゆたか、まえだ ひであき、たなか あきこ、
よしだ まゆみ、はやしざき よしひで、なかやま まなぶ、おはら おさむ

理化学研究所は、ゲノム科学総合研究センター（GSC）と播磨研究所によって、理化学研究所構造プロテオミクス推進本部（RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative, RSGI）（<http://www.rsgi.riken.go.jp>）を組織し、2002年度より開始された文部科学省の「タンパク 3000 プロジェクト」に参加している。構造プロテオミクスにはいろいろな課題設定があるが、理化学研究所では二つのタイプのプロジェクトを柱としている。一つは、ある生物種のゲノムにコードされているタンパク質の構造と機能を解明するものであり、もう一つは医学・生物学的に重要なヒト、マウス、シロイヌナズナなどの高等動植物を対象とするものである。本講演では、そのうちの理研GSCがNMR法を用いて大きく関わっているヒトおよびマウスの構造プロテオミクス研究の現状を発表する。

マウス cDNA は GSC の林崎グループにて、作製、アノテーションが行われ、ヒト cDNA はかずさ DNA 研究所他にて取得されたものが用いられる。それらをタンパク質の配列ファミリーへの分類を軸に、タンパク質・タンパク質相互作用、生物学的・生化学的・医学的な重要性、他に基づいてプロテオームの体系化を行う。タンパク質の大量試料調製は欠くことの出来ない技術である。われわれは、大腸菌をはじめとした生細胞を用いた発現系とともに、無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質発現法を用いている。生細胞を用いた発現系では、細胞を生存させるための細胞機能の維持と、細胞にとっては異物である外来タンパク質の発現、という本来は相反する事象を同時に行う必要があるため、様々な制約があったが、無細胞タンパク質合成系では、タンパク質を発現するという本来の目的のみに系を特化することができるため、制約を受けにくく、更に、系を人為的に改変することが容易である。現在では、ミリグラムオーダーの試料調製も可能になり、NMR 測定用の安定同位体標識試料調製も容易になっている。ロボットを用いた全過程の機械化・自動化を進めているところである。構造安定性、大量発現の可否、結晶化の可否などに関する高速なスクリーニングを経て、主に無細胞タンパク質合成法を用いた大量・多種のタンパク質試料の発現・調製を行う。安定同位体 (^{13}C , ^{15}N など) で標識した水溶液試料を作製し、大規模 NMR 施設を利用して、立体構造を決定している。それと並行して、*in silico* でのリガンドのスクリーニングや、質量分析計、Yeast Two-hybrid 法、NMR、表面プラズモン共鳴などを用いた実験に基づく分子機能解析(タンパク質・タンパク質相互作用、リガンド結合、転写・翻訳の制御、シグナル伝達など)を進め、構造と機能の情報の体系化を行う。

1 L5

立体整列同位体標識(SAIL)タンパク質の NMR 解析

～高分子量タンパク質の迅速かつ高精度な立体構造に向けて

(¹CREST/JST, ²都立大院理)

○鳥澤 拓也¹, 寺内 勉¹, 小野 明¹, 甲斐荘 正恒^{1,2}

NMR analysis of a stereo-array isotope-labeled (SAILED) protein :

Towards a method for the high-throughput, high-precision structural determination of larger proteins

Takuya Torizawa¹, Tsutomu Terauchi¹, Akira M. Ono¹, and Masatsune Kainosho^{1,2}
(¹CREST/JST, ²Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University)

Recent advances in NMR techniques have made it possible to determine global folds of proteins as large as 40 kDa. However, it remains overwhelmingly difficult to obtain accurate structural information on the amino acid side chains for proteins larger than 30 kDa. The difficulties result from the extensive spectral overlap and, more seriously, from the NMR relaxation properties of slowly tumbling proteins. Because of the high proton density of the hydrophobic core of a globular protein, the ¹H-NMR signals become excessively broadened and consequently most multi-pulse NMR sequences cannot efficiently be applied. Thus, it is imperative to develop innovative NMR approaches that avoid compromises between the upper molecular weight limit, accuracy of the resultant protein structures, and the speed of the structural analysis. This has become more evident in structural genomics, for which it is desirable that the NMR method be high-throughput, high-precision, and applicable to proteins up to 50 kDa. We have been developing a series of new stable-isotope assisted NMR methods for the structural analyses of larger proteins. Most recently we have developed SAILED (synthesis of stereo-array isotope labeled) amino acids. This method has great potential for extending the accessible NMR molecular weight range – but without compromises. Here we present some of our latest NMR data collected for SAILED calmodulin (M.W. 17 kDa; CaM) and contrast it with data obtained using conventional ¹³C, ¹⁵N-double labeled CaM. CaM fully labeled with SAILED amino acids was successfully prepared using cell free protein synthesis. There is only one proton attached to each of the carbons in the SAILED CaM: that is, methyl groups are replaced by ¹³C¹HD₂, and methylene groups with stereoselectively labeled ¹³C¹HD. Further prochiral methyl pairs are stereoselectively replaced with ¹²CD₃ and ¹³C¹HD₂.

キーワード：重水素標識, タンパク質, 立体構造決定, SAIL

とりざわ たくや, てらうち つとむ, おの あきら, かいのしょう まさつね

近年の NMR 法の進歩によって分子量 40kDa までのタンパク質の折りたたみ構造を決定することが出来るようになった。しかしながら 30kDa 以上に及ぶタンパク質の側鎖の正確な構造情報を得ることはシグナルの縮重とその緩和特性から未だ困難である。NMR 法において、分子量の上限、決定される構造の質、構造解析のスピード、これらの中で妥協してしまうことを避けるためにも新規の NMR 技術の開発を行うことが重要である。我々はその目的を達成するために SAIL アミノ酸を開発した。SAIL アミノ酸は主に以下の 3 点のコンセプトに基づいて設計されている。

- (i) メチレン基：2 個の ^1H の内、1 個を立体選択的に ^2H に置換する。
- (ii) メチル基：3 個の ^1H の内、2 個を ^2H に置換する。
- (iii) プロカイラルメチル基 (Val, Leu)：2 個のメチル基に、立体選択的に異なる重水素置換を施す。(一方のメチル基を(ii)に従って重水素化し、他方はすべての ^1H を ^2H に置換する。)

我々は化学合成、酵素合成を併用することにより、これらの SAIL アミノ酸を得ることに成功した。そして無細胞タンパク質合成系を用いることによって、SAIL アミノ酸を取り込ませたカルモジュリン (CaM, M.W. 17 kDa) を調製した。無細胞合成系に添加したアミノ酸量から換算してこの SAIL-CaM を 10% の収率で得ることができた。また、代謝によるアミノ酸の相互変換は見られなかった。通常の ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識 CaM (UL-CaM) に対して、SAIL-CaM の重水素化率は 56% となり、側鎖に由来するシグナルの数は 48% まで減少することになる。次に SAIL-CaM および UL-CaM の各種多次元 NMR スペクトルを比較した。その結果、SAIL-CaM の各スペクトルにおいて大幅にシグナルの縮重が軽減された。また、メチル基とメチレン基の ^1H 、 ^{13}C 共に大幅な緩和時間の延長を獲得していることも確認できた (Fig. 1)。現在、SAIL-CaM のシグナルの帰属、および立体構造決定を進行している。

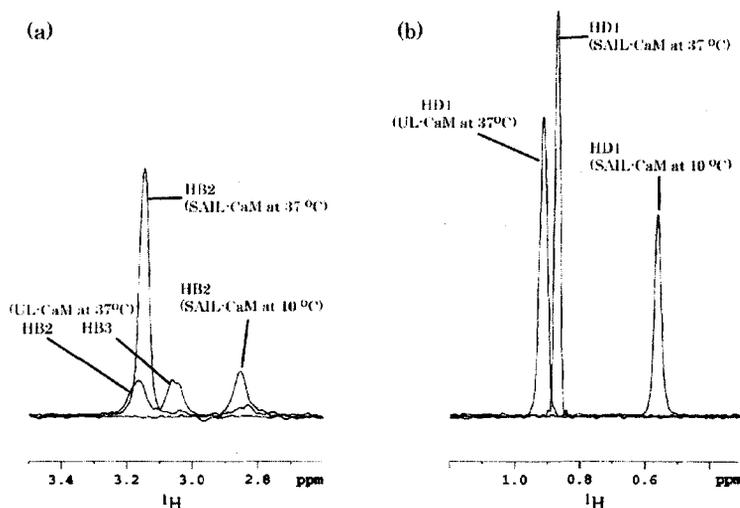


Fig. 1: Cross Sections from ^1H - ^{13}C ct-HSQC Spectra of Calmodulin
(a) Asn53 (β), (b) Ile125 ($\delta 1$)

p47^{phox} のタンデム SH3 ドメインと p22^{phox} PRR の相互作用

(北大院薬¹, CREST/JST², 九大生医研³)

○小椋賢治¹, 湯沢 聡², 鳥飼真之介¹, 住本英樹³, 稲垣冬彦^{1,2}

Interaction between tandem SH3 domain of p47^{phox} and p22^{phox} PRR

Kenji Ogura¹, Satoru Yuzawa², Shinnosuke Torikai¹, Hideki Sumimoto³, and Fuyuhiko Inagaki^{1,2}

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University¹, CREST/JST², and Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University³

Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase of phagocytes is controlled by interaction between p47^{phox} and p22^{phox}. A tandem SH3 domain of p47^{phox} connected with a 17 residues-linker is thought to cooperatively interact with a proline-rich region (PRR) of p22^{phox}. To investigate such a novel inter-molecular recognition, we approached the analysis of solution structure of p47^{phox} tandem SH3 domain complexed with p22^{phox} PRR.

We prepared ¹³C/¹⁵N-labeled tandem SH3 domain of p47^{phox} (138 residues) by E. coli. To determine the essential sequence of p22^{phox}-PRR, several p22^{phox}-derived PRR peptides were synthesized. The essential sequence of p22^{phox}-PRR was determined by ¹H-¹⁵N HSQC titration experiments of several peptides to labeled p47^{phox}. The titration experiment of the optimized p22^{phox}-PRR peptide showed that many signals of p47^{phox} were perturbed by the peptide binding. This result suggests that two SH3 domains cooperatively bind to p22^{phox}-PRR.

A set of triple resonance and isotope-filtered experiments were carried out on a Varian UNITY INOVA 600 spectrometer for the NMR sample of tandem SH3 domain of p47^{phox} complexed with the optimized p22^{phox}-PRR peptide. The spectral analysis, solution structure of the molecular complex and interaction mechanism will be discussed.

【序論】好中球の活性酸素発生系にて活性酸素発生を触媒する NADPH オキシダーゼは細胞質因子と膜タンパクの複合体である。その複合体形成の中心的役割を担う分子間相互作用は、細胞質因子のひとつ p47^{phox} と膜タンパク質サブユニット p22^{phox} の結合である。活性酸素発生系の休止状態においては、p47^{phox} のふたつの SH3 ドメイン領域(タンデムSH3)は、分子内マスクされていて p22^{phox} と結合できないが、p47^{phox} の C 末端側領域のリン酸化により、分子内マスクが解除され、p47^{phox} のタンデム SH3 が p22^{phox} と結合し、活性酸素発生系がオンになる(図1)。その結合様式は、p47^{phox} のタンデム SH3 が、p22^{phox} の1ヶ所のプロリンに富む領域 (PRR) を共有して結合

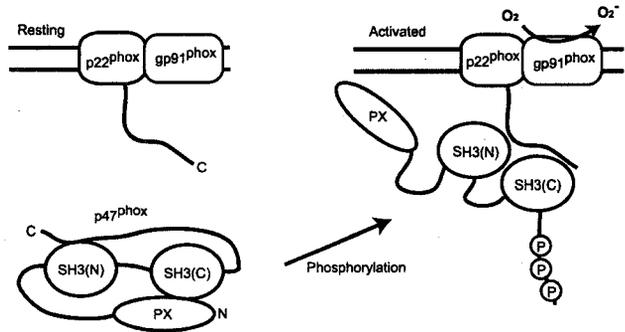


Fig.1 Interaction mechanism of p47^{phox} and p22^{phox}

p47^{phox}, p22^{phox}, SH3

おぐらけんじ, ゆざわさとる, とりかいしんのすけ, すみもとひでき, いながきふゆひこ

するとされており、SH3 ドメインによるリガンド認識機構として他に例のないユニークな相互作用様式である。本研究の目的は、p47^{phox} のタンDEM SH3 ドメインと p22^{phox} の PRR の相互作用を NMR を用いて解析することである。

【実験】¹³C/¹⁵N ラベル p47^{phox} タンDEM SH3 (138 アミノ酸) は、GST 融合タンパク質として大腸菌により発現し、アフィニティー、イオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。滴定スクリーニング実験のための各種 p22^{phox} 由来ペプチドはシグマジェノシス社のペプチド合成サービスにより入手した。¹³C/¹⁵N ラベル p22^{phox} 由来ペプチド (25 アミノ酸) は GST 融合タンパク質として大腸菌により発現し、アフィニティーおよび逆相クロマトグラフィーにより精製した。NMR 測定は、Varian Unity Inova 600 および Unity Plus 600 分光計を用いて 25°C にておこなった。滴定実験は、試料濃度 0.3mM, 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) の溶液条件にておこなった。p47^{phox} タンDEM SH3 と p22^{phox} ペプチド複合体試料は、両者を混合させたのちゲルろ過クロマトグラフィーによりモル比 1:1 の複合体として得た。複合体試料の NMR 測定は、試料濃度 1.5mM, 20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5), 150mM NaCl の溶液条件にておこなった。

【結果】¹⁵N ラベル p47^{phox} タンDEM SH3 に対して数種類の合成 p22^{phox} PRR ペプチドを滴定し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した。HSQC スペクトルの化学シフト変化および信号数の充足を目安にペプチドのスクリーニングをおこない、両者の結合に必須の p22^{phox} の領域を決定した。p47^{phox} タンDEM SH3 のペプチドフリー状態および p22^{phox} PRR ペプチド結合状態にて三重共鳴多次元 NMR スペクトルを測定し、主鎖連鎖帰属をおこなった。その結果、ペプチド結合にともない p47^{phox} タンDEM SH3 は分子全体にわたって化学シフト値が大きく変化することがわかった。さらに、ペプチドフリーおよび複合体状態における p47^{phox} タンDEM SH3 の [¹H]-¹⁵N NOE を測定したところ、複合体では SH3 ドメインを連結するリンカー一部 (17 残基) の運動性が抑えられることがわかった (図2)。これらの結果は、ふたつの SH3 ドメインが協同的に p22^{phox} ペプチドを認識して結合することを強く示唆する。

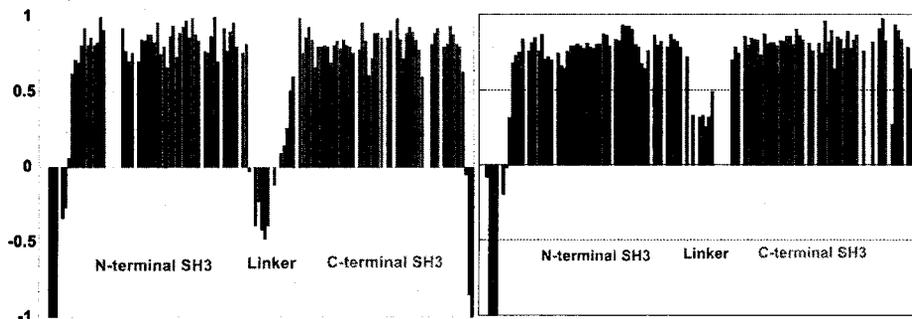


Fig.2 ¹H-¹⁵N NOE of p47^{phox} tandem SH3 domain. (Left) peptide-free. (Right) p22^{phox}-peptide complex.

¹³C/¹⁵N ラベル p47^{phox} タンDEM SH3 + ノンラベル p22^{phox} ペプチド複合体試料を用いて、三重共鳴多次元 NMR 測定をおこない、複合体形成時における p47^{phox} タンDEM SH3 ドメインの信号帰属を完了した。また、ノンラベル p47^{phox} タンDEM SH3 + ¹³C/¹⁵N ラベル p22^{phox} ペプチド複合体試料を用いて、複合体形成時における p22^{phox} ペプチドの信号帰属を完了した。現在、両者複合体の立体構造を決定するため、NMR スペクトルを解析中である。

1 L7

ラベル体を用いた特異な DNA 及び RNA 構造の研究
—多量体のストイキオメトリー、水素結合スキーム—
(横浜国大院・環境情報) 松上明正、大橋肅、池田哲郎、外谷英嗣、
上杉晴一、○片平正人

Studies of novel DNA and RNA structures with stable isotope labeling

(Grad. Sch. of Env. & Info. Sci., Yokohama Natl. Univ.) Akimasa Matsugami, Kiyoshi Ouhashi, Tetsuro Ikeda, Hidetsugu Sotoya, Seiichi Uesugi & Masato Katahira

We demonstrate the way to distinguish intramolecular hydrogen bonds from intermolecular ones in a symmetric multimer utilizing the HNN-COSY experiment with the 1:1 mixture of labeled and non-labeled materials. The unique structures of the triplet repeat DNA, d(GGA)₈, and the related RNA, r(GGAGGUUUUGGAGG), are also presented. The stability of the U:A:U base triple in the RNA aptamer for the HIV Tat protein in complex with a Tat analogue is also addressed on the basis of the J values across the hydrogen bonds.

(序) 我々は、GGA のトリプレットが 4 回リピートした DNA (GGA 12-mer) が特異な新規構造を形成する事を明らかにした (1)。GGA 12-mer は、G:G:G:G テトラッドと G(:A):G(:A):G(:A):G ヘプタッドを有する分子内平行型 4 重鎖を形成する。テロメア DNA が結晶中において分子内平行型 4 重鎖構造をとるという驚くべき結果が最近報告されたが、GGA 12-mer に関する我々の研究は、分子内で平行型 4 重鎖が形成できる事を示した最初の例である。GGA 12-mer が形成する 4 重鎖は 2 つ会合して、強固な 2 量体として存在する。GGA 12-mer が 2 量体を形成する事は、単量体と多量体の各共鳴線の強度が DNA の濃度を変えたときにどの様に変化するのかを調べる事で、結論づけられた。しかし G:G 及び G:A 塩基間の水素結合で形成されるテトラッド及びヘプタッドという構造体が、分子内で形成されたものなのか、それとも分子間で形成されたものなのかについては、曖昧さが残っていた。水素結合をまたがった J カップリングに由来する HNN-COSY 中の交差ピークの強度を、標識体だけの時と標識体：非標識体 = 1 : 1 の時とで比較する事で、対称性を有する多量体におけるこの種の問題を解決できる事が分かったので報告する。また、GGA が 8 回リピートした DNA (GGA 24-mer) の構造 (2) 及び GGA を含む RNA r(GGAGGUUUUGGAGG) (RNA 14-mer) の構造 (3) についても、報告する。さらに RNA アプタマー (4)、リボザイム (5, 6)、テロメア DNA (7) に関して、標識体を用いて行った研究結果についても報告する。

(結果と考察)

① ヘプタッドにおける水素結合スキームの直接的同定

¹³C, ¹⁵N 標識した GGA 12-mer を、Klenow 断片を用いた酵素合成法によって調製した。標識

トリプレットリピート、アプタマー、水素結合、4 重鎖、立体構造

まつがみあきまさ、おおはしきよし、いけだてつろう、そとやひでつぐ、うえすぎせいいち、かたひらまさと

体を用いて HNN-COSY の測定を行い、アミノ基が関与した ${}^{2h}J_{NN}$ に起因する交差ピークを数多く観測できた。これにより水素結合のスキームが同定され、ヘプタッド構造の正しさが直接的に証明された。

② 分子内水素結合と分子間水素結合の区別

標識体:非標識体=1:1 の試料について HNN-COSY の測定を行い、先の標識体:非標識体=2:0 の試料の時と、交差ピークの強度を比較した。水素結合が分子内で形成されたものならば強度は 1/2 になり、一方分子間で形成されたものならば 1/4 になるはずである。実際の結果は 1/2 となったので、ヘプタッドは分子内で形成されたものである事が分かった。

③ GGA 24-mer の立体構造

GGA 24-mer の立体構造を決定した(2)。GGA 12-mer が 2 分子で形成していたのと同様な構造を、GGA 24-mer は 1 分子で形成できる事が分かった。これより GGA トリプレットのリピート数を 8 に伸ばす事で、この DNA が形成する特異な構造の最小単位が完結する事が分かった。

④ GGA 配列を有する RNA の立体構造

RNA 14-mer の立体構造を決定した(3)。RNA 14-mer は、G:G:G:G テトラッドと G:(A):G:G:(A):G ヘキサッドを含む分子内平行型 4 重鎖を形成し、さらにそれが 2 量化した構造をとる。RNA において分子内平行型 4 重鎖を見出したのも、これが初めてである。FMRP (fragile X mental retardation protein)の標的が、G:G:G:G テトラッドからなる反平行 4 重鎖構造を形成する mRNA であるとする報告が最近なされた。当該 mRNA の配列を調べてみると、GGA や GGAGG 配列があり、今回の様な平行型の 4 重鎖の形成が予想される個所がある。mRNA の変異が FMRP との相互作用に及ぼす影響に関して発表されているデータと併せて考えると、今回見出した平行型 4 重鎖構造が FMRP との相互作用に関与している可能性が示唆された。

⑤ RNA アプタマー中の U:A:U ベーストリプルの安定性

HIV の Tat タンパク質を高い結合能で捕捉する RNA アプタマーに関し、Tat アナログとの複合体の立体構造を決定した(4)。Tat アナログとの結合に伴い RNA アプタマー中には U:A:U ベーストリプルが形成される。ワトソン=クリック型 A:U 塩基対及びフーグスティン型 A:U 塩基対の双方について、イミノ基が関与した ${}^{2h}J_{NN}$ の値を求めた。これより RNA アプタマー中のベーストリプルの安定性に関する情報が得られた。他に、リボザイムにおける塩基対パターンの同定(5,6)や、タンパク質によるテロメア DNA の構造遷移の同定(7)に標識核酸を利用した結果を報告する。

- (1) Matsugami *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **313**, 255-269 (2001).
- (2) Matsugami *et al.*, in preparation (2002).
- (3) Liu *et al.*, *J. Mol. Biol.*, in press (2002).
- (4) Matsugami *et al.*, *EMBO J.*, submitted (2002).
- (5) Tanaka *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 766-774 (2002).
- (6) Tanaka *et al.*, *Genes to Cells*, **7**, 567-579 (2002).
- (7) Fukuda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press (2002).

(奈良先端大バイオ¹、都立大理²、三菱化学生命研³)○児嶋長次郎¹、小野晶²、河野俊之³、小林俊達¹、三島正規¹**Gel-Phase NMR for Biological Macromolecules**¹Graduate School of Biological Science, Nara Institute for Science and Technology,²Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, and ³Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)Ochojiro Kojima,¹ Akira Ono,² Toshiyuki Kohno,³ Toshitatsu Kobayashi,¹ and Masaki Mishima¹

Gel-phase NMR is one of the most powerful techniques of solution NMR, and used for the immobilized samples. Organic compounds and peptides immobilized to the solid support, such as column resin, are observed in the combinatorial chemistry approach. The gel-phase NMR does not require a special hardware. In general, ¹³C, ¹⁹F, and ³¹P signals recorded by the gel-phase NMR are sharp, however, ¹H signal is very broad (≥ 100 -300Hz). Thus, the gel-phase NMR has not been used for the biological macromolecules, such as proteins and nucleic acids. Here, ¹H-¹⁵N HSQC spectra were measured for ¹⁵N-enriched and immobilized proteins and DNA. Sharp signals were detected for some GST-tagged proteins, but not for His-tagged proteins and DNA. ³¹P signals were detected for DNA, thus the immobilization procedure could be a critical point to detect the ¹H signal of proteins and nucleic acids. These results demonstrate the gel-phase NMR is applicable to the biological macromolecules.

コンビナトリアルケミストリーなどに用いられてきた Gel-Phase NMR 法は Gel 担体上に固定化されたサンプルの測定を可能とする溶液 NMR の有力な測定法である。ポリアクリルアミド Gel を用いて弱い磁場配向を実現する溶液 NMR 技術とは異なり、サンプルが Gel に固定化されている。このため、通常の溶液 NMR と比較すると線幅は広く、¹³C や ¹⁹F、³¹P などの核種での測定が中心である。¹H 核は特に線幅が広く、その観測を必要とする核酸やタンパク質などの生体高分子への応用は成功していない。そこで我々は Gel-Phase NMR を生体高分子へ適用することをこころみた。様々な条件検討を行った結果、DNA に関しては PentaGel を用いることで ³¹P 核の観測に成功し、タンパク質に関しても GST タグを用いて良好な ¹H-¹⁵N HSQC の測定に成功した。本発表では生体高分子の Gel-Phase NMR 法とその応用を報告する。

Gel-Phase NMR、Gel 担体への固定化、核酸、タンパク質、HSQC

こじまちょうじろう、おのあきら、こうのとしゆき、こばやしとしたつ、みしままさき

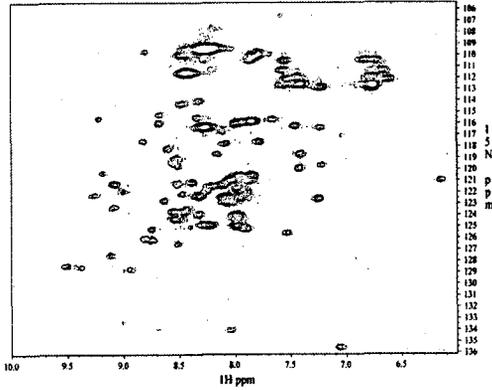


Fig. 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the immobilized protein (ubiquitin).

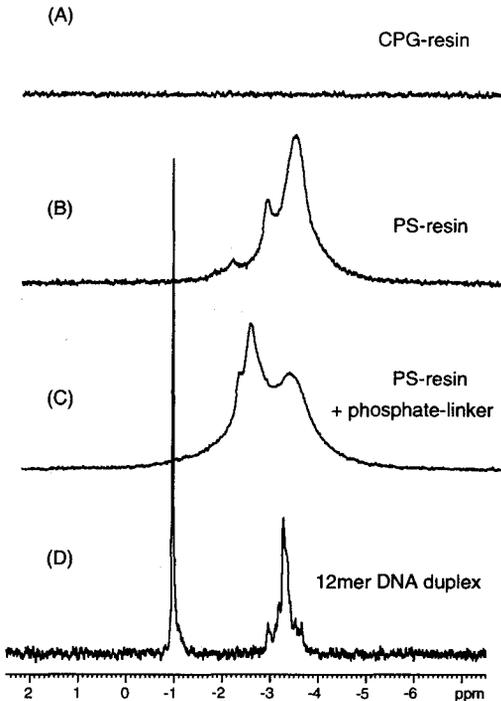


Fig. 2. ^{31}P spectra of DNA oligomers under the immobilized (A, B, C) and the solution (D) condition. CPG: controlled pore glass. PS: pentagel. DNA 9mer was attached to the CPG-resin (A), the PS-resin without a linker (B), and with a phosphate linker (C). A DNA 12mer duplex spectrum in solution (D).

タンパク質

タンパク質を活性を維持した状態で固相に固定化する方法は数多く存在する。我々は、生化学実験において最も頻繁に用いられる His-tag 法および GST-tag 法を検討した。それぞれの方法で ^{15}N 標識タンパク質をカラムに固定化し、 ^1H - ^{15}N HSQC を測定した。His-tag 法ではタンパク質の運動性の高い部分のみが観測された。GST-tag 法ではほぼ全ての信号が観測された (Fig.1)。GST-tag 法を用いた実験の詳細は小林らの発表 (本要旨集ポスター番号 P4) を参考にされたい。

DNA

DNA を固相に固定化する方法も数多く存在する。固相合成法で用いられる CPG レジンとコンビナトリアルケミストリーで用いられる PS レジン (Argonaut) を用いたところ、PS レジンに固定化した DNA に関して ^{31}P の信号が観測された (Fig.2)。5つのリン酸からなるリンカーを導入したが、顕著な効果はなかった。

Gel-Phase NMR 法は、溶液 NMR の溶媒条件を Gel に変更したものにすぎない。しかし、生体高分子の Gel-Phase NMR 法を用いれば、単純な溶液状態で追試できないプルダウンアッセイによるタンパク質間相互作用の詳細を NMR によって解析する事が可能になる。Gel-Phase NMR 法には数多くの応用方法が考えられ、今後有力な基礎実験技術として発展してゆくと思われる。

高分子量タンパク質を対象とした残余双極子効果観測技術の開発

(1 生物分子工学研究所、2 北陸先端大・ナノマテリアルセンター)

○楯 真一^{1,2}、村瀬八重子²、三井崇裕²、島原秀登²

An approach for measuring the residual dipolar couplings of huge proteins

Shin-ichi Tate^{†1}, Yaeko Murase[‡], Takahiro Mitsui[‡], and Hideto Shimahara[‡]Biomolecular Engineering Research Institute (BERI)[‡]

and

Center for New Materials

Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)[‡]**Abstract**

The residual dipolar couplings observed on the proteins dissolved in the anisotropic solution condition, which is generated by the diluted bicelles and compressed or stretched acrylamide gel and so on, paved novel applications of solution NMR. However, the application of the residual dipolar coupling is severely limited by the molecular weight. As a counter effect of the TROSY, the high field component of the ¹⁵NH IPAP-HSQC signal relaxation is enhanced by the additional contribution of the ¹⁵N-¹H DD/CSA cross correlation effect, and the signal is easy to be lost in the spectrum for the high molecular weight proteins. In this presentation, we will describe an experimental approach for overcoming this limitation in the residual dipolar coupling measurement. In our approach, the only low field component of the IPAP-HSQC signal, the TROSY component, is used for the observation of the residual dipolar couplings. Thus, principally, this enables the experiment for the huge protein over 100kDa.

Introduction

The residual dipolar couplings give valuable novel structure parameters for protein structure works. In the case of structure refinement, these values can compensate for the intrinsically low number of distance restraints in the less folded part of the structure by adding the NH and/or CH bond orientations against the magnetic field. When working with the protein with known local structure coordinates, the residual dipolar couplings will be used to define the relative orientation of the local structure in a molecular. This kind of application would be very valuable for the structure analysis of the proteins consisting of several well defined domain structures. We are quite interested in the latter type application of the residual dipolar couplings to analyze the global structure alteration dependent on its functional state, often called as "remodeling" process. However, to gain the bio-chemically relevant structural information, we have

¹ *Keywords* : NMR, residual dipolar coupling, chemical shift anisotropy, bicelle

たて しんいち、むらせ やえこ、みつい たかひろ、しまはら ひでと

to overcome the basic spectroscopic problems in measuring the residual dipolar couplings. Because, the intending target proteins consisting of some domains or subunits tend to be huge molecule and the conventional residual dipolar couplings are not readily applied to the large protein or protein complex over 30kDa. In a pair of split ^{15}N - ^1H IPAP-HSQC correlation signals, the low field component has longer transverse relaxation time as used in the TROSY experiment but the high field component has, as a counter effect, shorter relaxation than that of the corresponding ordinal HSQC signal. The transverse relaxation of the low field component is enhanced by the additive contribution from the ^{15}N - ^1H DD/CSA cross correlation. As a remedy for this intrinsic limitation of the residual dipolar couplings measurement, in this presentation, we will describe an approach for measuring the residual dipolar couplings only based on the use of TROSY signals, the low field component having the longer spin transverse relaxation especially in the high field. This approach, principally, enables the measurement of the residual dipolar couplings in huge proteins over 100kDa and may pave the analysis of the "remodeling" process of the protein complexes.

Theory

The orientation dependent TROSY ^{15}N chemical shift change, $\Delta\delta^{15}\text{N}(\text{troSY})$, includes two different types of anisotropic spin interactions; the residual dipolar coupling, D_{nh} , and the orientation induced ^{15}N chemical shift change from the isotropic chemical shift or called as the residual chemical shift anisotropy, $\delta^{15}\text{N}(\text{csa})$. Assuming the uniform ^{15}N CSA tensor values (amplitudes and relative orientation angles) to all ^{15}N nuclei in a protein (Figure 1), we can calculate the $\delta^{15}\text{N}(\text{csa})$ from the fixed protein coordinate. By properly scaling the contribution from D_{nh} and $\delta^{15}\text{N}(\text{csa})$, the $\Delta\delta^{15}\text{N}(\text{troSY})$ can be formulated as follow with the direction cosine of each NH bond vector and chemical shift tensor elements expressed in an molecular frame:

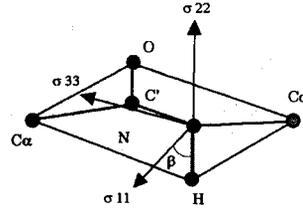


Figure 1: Definition of the ^{15}N CSA tensor in a peptide plane

$$\begin{aligned}
 \Delta\delta^{15}N_{(\text{troSY})} &= \frac{1}{2}D_{nh} + \Delta\delta^{15}N_{(\text{csa})} \\
 &= \frac{1}{2}D_{nh}^{max} \sum_{ij=x,y,z} S_{ij} \cos\phi_i^{nh} \cos\phi_j^{nh} + \frac{2}{3} \sum_{ij=x,y,z} S_{ij}\delta_{ij} \\
 &= \sum_{ij=x,y,z} S_{ij} \left\{ \frac{1}{2}D_{nh}^{max} \cos\phi_i^{nh} \cos\phi_j^{nh} + \frac{2}{3}\delta_{ij} \right\} \quad (1)
 \end{aligned}$$

where ϕ_i^{nh} is the angle of the NH bond vectro relative to the i th molecular axis and δ_{ij} are the elements of the chemical shift tensor expressed in an arbitrary molecular frame of the nucleus. And S_{ij} is the Saupe order matrix elements to define the molecular alingment relative to the magnetic field.

The above equation can relate the experimentally obtained $\Delta\delta^{15}N_{(\text{troSY})}$ and the values obtained from the fixed coordinate and assumed ^{15}N CSA tensor values via the Saupe order matrix elements. By the singular value decomposition (SVD) of this matrix consisting of the values from the coordinate, we can determine the all elements of the Saupe order matrix, finally giving us the alignment tensor of

the molecule or the local structure unit in a molecule. Therefore, solely from the orientation induced TROSY signal change along ^{15}N axis, we can obtain the same alignment information as that from the conventional IPAP-HSQC base experiment.

Result

In the above analysis, there is one point to be carefully considered. In the 2nd term of the right hand side are calculated with pre-defined ^{15}N CSA values. Although it is well known that the ^{15}N CSA value of each amide ^{15}N nucleus in a protein varies residue by residue dependent on the local structural environment, i.e. hydrogen bonding, metal binding, ring current effect, and so forth, but these ^{15}N CSA values are not known a priori. Therefore, in evaluation of the value of this approach, we have to see how the variation in the ^{15}N CSA tensor values affects the resultant alignment tensors. For this purpose, we compared the alignment tensors calculated with using different sets of ^{15}N CSA values reported in literature. In the present calculation, the $\Delta\delta^{15}\text{N}_{(tro\text{sy})}$ collected for 0.5mM ^{15}N labeled ubiquitin in 7.5% DMPC/DHPC/CTAB at 30°C was used. The data were measured on a *UnityInova500* equipped with the NanoProbe enabling the magic angle sample spinning for the liquid state sample. The results are listed in Table 1.

Table 1: Alignment tensor magnitude and orientation in ubiquitin determined based on the $\Delta\delta^{15}\text{N}_{tro\text{sy}}$ values with different ^{15}N CSA values^a

$\Delta\sigma/\text{ppm}$	η	$\beta/\text{deg.}$	$A_{xx}/10^{-4}$	$A_{yy}/10^{-4}$	$A_{zz}/10^{-4}$	$\alpha/\text{deg.}$	$\beta/\text{deg.}$	$\gamma/\text{deg.}$	r.m.s.d. / Hz
-158.7	0.14	18.8 ^b	-10.4	8.44	1.93	70.2	69.4	79.0	1.16
-162.5	0.19	20.0 ^c	-10.3	8.27	1.98	70.4	69.2	78.8	1.16
-174.4	0.15	18.7 ^d	-10.8	8.65	2.18	70.9	69.2	78.8	1.18
-168.8	0.22	24.5 ^e	-9.54	7.62	1.93	70.9	69.0	78.9	1.14
-151.5	0.02	18.6 ^e	-10.2	8.40	1.78	70.2	69.8	79.4	1.18
-164.4	0.06	22.0 ^f	-9.96	8.07	1.89	70.9	69.4	79.3	1.15
IPAP ^g			-12.9	10.6	2.32	72.9	70.3	79.0	2.34

^a The alignment tensors were evaluated through the Saupe order matrices determination. In each case of Saupe order matrix calculation, the matrix composed of the elements of the chemical shift tensor in the molecular frame calculated from the different ^{15}N CSA tensor magnitude and orientation reported in the literatures and the presently observed $\Delta\delta_N$ data were used.

^b $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -ubiquitin: J.Am.Chem.Soc. (2000) 122,10143-10154.

^c ^{15}N Lysozyme: J.Am.Chem.Soc. (1999) 121, 7441-7442.

^d [^{15}N -Gly] collagen powder: J.Am.Chem.Soc. (1998) 120, 8868-8874.

^e GlyGlyHCl: J.Am.Chem.Soc. (1987) 109, 5966-5969.

^f Boc-(Gly)₂[^{15}N -Gly]-OBz: J.Am.Chem.Soc. (1988) 110, 2378-2383.

^g Measured from the $^1\text{J}_{nh}$ splittings in the [^1H - ^{15}N]IPAP-HSQC spectra.

As seen in Table 1, in spite of the subtle variations in the reported ^{15}N CSA tensors coming from different experimental methods, the determined alignment angles of the tensor frame relative to the molecular coordinate axis were close to each other. And these values were also close to the values determined from the conventional IPAP-HSQC experiments. From the results in Table 1, the variations in the CSA seem to sensitively affect on the differences in the magnitudes of the alignment tensor rather than the angles to define the relative orientation of the alignment tensor in the molecular coordinate. Thus, the present method can be practically applied to the alignment tensor analysis without serious errors, especially for the purpose of determining the alignment angles. In Figure 2 depicts an example of the resultant correlation obtained after the alignment tensor analysis; showing the calculated $\Delta\delta^{15}\text{N}_{(\text{trosty})}$ and the experimentally observed $\Delta\delta^{15}\text{N}_{(\text{trosty})}$. This analysis was done with the use of ^{15}N CSA tensor we determined previously with the MAS application and the 1.8Å X-ray coordinate of ubiquitin.

From the above results obtained on the model small protein, ubiquitin, it is confident that our approach can pave the NMR approach for the analysis of "remodeling" process of the huge protein consisting of multiple domains or subunits. We are now working on the actual application to a large molecular weight protein. Some of the progress will be mentioned in the presentation.

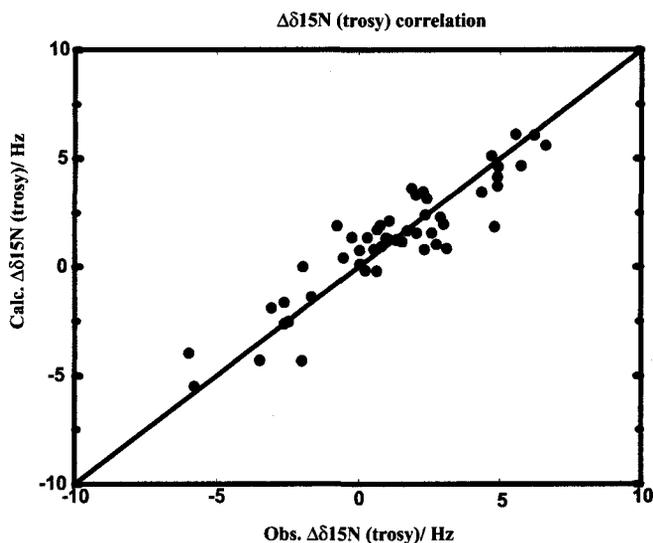


Figure 2: Correlation of the calculated and observed values of the orientation dependent TROSY ^{15}N chemical shift change.

高分子量蛋白質の解析に向けた新しいNMR測定法の開発

(理化学研究所 生体超分子構造・機能研究協力グループ¹, 横浜市立大学 総合理学研究科², CREST/JST³, University of Cambridge⁴)

○伊藤 隆^{1,2,3}, Daniel Nietlispach⁴, Ernest Laue⁴,
Sundaresan Rajesh^{1,2}, 美川 務^{1,2,3}, 柴田武彦^{1,2,3}

Novel approaches for the NMR analysis of larger proteins

Yutaka Ito^{1,2,3}, Daniel Nietlispach⁴, Ernest Laue⁴, Sundaresan Rajesh^{1,2}, Tsutomu Mikawa^{1,2,3}
and Takehiko Shibata^{1,2,3}

¹Research Group for Bio-supramolecular Structure-Function, RIKEN, Japan; ²Molecular and Cellular Physiology Laboratory, Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, Japan; ³CREST/JST; ⁴Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK

Novel approaches for backbone resonance assignment and global fold determination of larger proteins are presented.

A 3D intra-HNCA experiment provides uniquely the intraresidue connection, whilst a 3D DQ-HNCA experiment, which detects a $^{13}\text{C}_i^{13}\text{C}_{i-1}$ double quantum (DQ) coherence, contains the sequential information. Simulations and demonstration on a couple of larger proteins at high magnetic fields suggest that the approach works for proteins with correlation times > 50 ns.

A new bio-synthetic procedure for highly specific protonation at aromatic side-chains is proposed, in which shikimate is used as a precursor for Phe, Tyr and Trp labelling. This aromatic-selective protonation, in combination with the methyl- ^1H selective labelling, provides a more complete set of long-range distance restraints sufficient for global fold determination of larger proteins with increased accuracy.

1. Selective Intra-HNCA / DQ-HNCA

【序】 蛋白質主鎖の NMR シグナルの帰属は、通常は相補的な化学シフト情報(残基内の化学シフト情報と、1 残基前の化学シフト情報)を得る triple-resonance NMR 測定法のペア[HNCA/HN(CO)CA etc.]を用いて解析する。TROSY 法によって、100kDa に達するような蛋白質複合体においても主鎖シグナルの帰属が可能であることが示されたが、一方 TROSY 法が有効な高磁場においては ^{13}C 核の T_2 緩和時間が短くなり、HN(CO)CA のような実験の感度が低下するという問題が生じてくる。したがって、 ^{13}C が横磁化になっている時間を最小にして、 $^{13}\text{C}^\alpha$ の化学シフトについて相補的な情報を観測する手法が必要になる。私たちは新たな相補的な実験法として Intra-HNCA と DQ-HNCA を開発したので報告する。

【実験・結果】 Figure 1 に Intra-HNCA (1a) と DQ-HNCA (1b) のパルス・シーケンスを示した。Intra-HNCA では、図中 a の時点で $8N_y\text{C}^\alpha(i-1)_z\text{C}^\alpha(i)_z\text{C}'_z$ という磁化が生じる。この磁化は $8N_z\text{C}^\alpha(i-1)_z\text{C}^\alpha(i)_z\text{C}'_y$ になり、 $^1J_{\text{C}\alpha\text{C}}$ によって図中 b の時点で $4N_z\text{C}^\alpha(i)_z\text{C}'_x$ に変化し、 t_1 時間では $4N_z\text{C}^\alpha(i)_y\text{C}'_z$ となって $^{13}\text{C}^\alpha(i)$ の化学シフトでエンコードされる。 t_1 展開後は $2T_N$ 時間の間に、 $^1J_{\text{N}\alpha\text{C}}$ と $^1J_{\text{N}\text{C}'}$ の 2 つのカップリングで同時にリフォーカスされ、以降は通常の TROSY 法にしたがう。DQ-HNCA では、図中 a の時点で $4N_x\text{C}^\alpha(i-1)_z\text{C}^\alpha(i)_z$ という磁化が生じる。図中 a の時点の $^{13}\text{C}^\alpha$ に対する 90° パルスによって、multiple-quantum 項が生じ、 t_1 時間では $^{13}\text{C}^\alpha(i-1)$ と $^{13}\text{C}^\alpha(i)$ の和の化学シフトでエンコードされる。

キーワード: 高分子量蛋白質, 3 重共鳴 NMR, TROSY, 重水素化

いとう ゆたか, だにえる にーとりすばは, あーねすと らうえ, すんだれさん らじえしゅ,
みかわ つとむ, しばた たけひこ

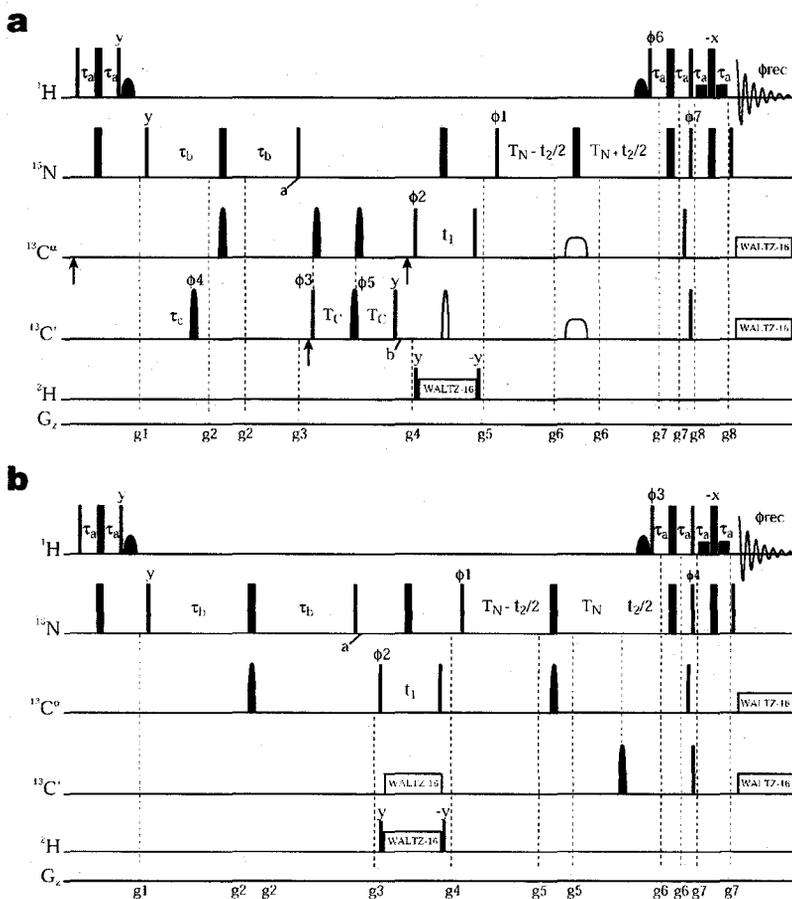


Figure 1. Experimental schemes for the intra-HNCA (a) and DQ-HNCA (b). Rectangular 90° and 180° pulses are indicated by thin and thick black vertical lines, respectively. Unless indicated, pulses are applied along x. Pulse phases are indicated for Bruker spectrometers in order to constructively add ^1H and ^{15}N contributions to the ST2-PT coherence pathway. E-SNOB-shaped 90° pulses (2.1 ms) and low-power rectangular 90° pulses (1.4 ms) are applied for "water-flip-back". All rectangular 90° $^{13}\text{C}^\alpha$ and ^{13}C pulses are adjusted to provide an excitation minimum at the corresponding ^{13}C and $^{13}\text{C}^\alpha$ frequencies, respectively. Decoupling of $^{13}\text{C}^\alpha$ and ^{13}C spins during the acquisition time is achieved using a cosine modulated WALTZ-16 field, employing pulses that have the SEDUCE-1 profile. (a) The ^{13}C carrier is set to 56 ppm and moved to 176 ppm before the pulse with phase ϕ_3 and switched back to 56 ppm immediately before the $^{13}\text{C}^\alpha$ pulse with phase ϕ_2 . Arrows indicate the positions where the carrier is jumped. The black shaped 180° $^{13}\text{C}^\alpha$ and ^{13}C pulses are applied with a G3 profile. The position of the Bloch-Siegert compensation pulse is indicated by an arrowhead. The phase ϕ_5 of the G3 pulse in the center of $2T_c$ is carefully adjusted so as to compensate for the phase changes which accompany the different power levels. The grey shaded ^{13}C 180° pulse is applied with a sin^2/x shape profile. The two open shapes in the middle of $2T_N$ indicate a 180° pulse, applied as a single adiabatic Chirp sweep, centered at 100 ppm. The delays used are $\tau_a = 2.7$ ms, $\tau_b = 26$ ms, $\tau_c = 16.5$ ms, $T_c = 4.2$ ms, $T_N = 15.8$ ms. The phase cycling is as follows: $\phi_1 = (y, -y, -x, x)$, $\phi_2 = 4(x), 4(-x)$, $\phi_3 = 8(x), 8(-x)$, $\phi_4 = 8(x), 8(-x)$, $\phi_5 = x$, $\phi_6 = y$, $\phi_7 = y$, $\phi_{\text{rec}} = (x, -x, y, -y), 2(-x, x, -y, y), (x, -x, y, -y)$. Frequency discrimination in the t_1 ($^{13}\text{C}^\alpha$) dimension is achieved using States-TPPI of ϕ_3 and ϕ_4 , while in the t_2 (^{15}N) dimension a phase-sensitive spectrum is obtained by recording a second FID for each increment of t_2 , with $\phi_1 = (y, -y, x, -x)$, and the phases of ϕ_6 and ϕ_7 inverted. For each successive t_2 value, ϕ_1 and the phase of the receiver are incremented by 180° , and the data is processed as described by Kay et al. The durations and strengths of the sine shaped gradients are: $g_1 = (1.1$ ms, 11 G/cm); $g_2 = (0.7$ ms, 4 G/cm); $g_3 = (1.0$ ms, 5.5 G/cm); $g_4 = (0.6$ ms, 4 G/cm); $g_5 = (1.3$ ms, 12 G/cm); $g_6 = (1.5$ ms, -17 G/cm); $g_7 = (0.5$ ms, 11 G/cm); $g_8 = (0.9$ ms, 17 G/cm); $g_9 = (1.0$ ms, 19 G/cm). (b) Many features are similar to the sequence above and only differences are discussed. The carbon carrier is set to 55.3 ppm. The solid shaped 180° pulses are applied with a G3 profile. Carbonyl decoupling during t_1 is achieved with WALTZ-16 using a cosine modulated SEDUCE-1 profile. The delays are: $\tau_a = 2.7$ ms, $\tau_b = 25.5$ ms, $T_N = 25.5$ ms. The phase cycling used is as follows: $\phi_1 = (x, -x, y, -y)$, $\phi_2 = 4(x), 4(y), 4(-x), 4(-y)$, $\phi_{\text{rec}} = (x, -x, y, -y), -x, x, -y, y)$. Quadrature in F_1 is achieved by States-TPPI of ϕ_2 . For each value of t_2 a separate FID is recorded with the phase $\phi_1 = (x, -x, -y, y)$, and the phases ϕ_3 and ϕ_4 are changed by 180° . For every successive t_2 increment ϕ_1 and ϕ_{rec} are inverted. Durations and strengths of the gradients (sine-bell) are: $g_1 = (1.1$ ms, 11 G/cm); $g_2 = (0.95$ ms, 5 G/cm); $g_3 = (1.3$ ms, 13 G/cm); $g_4 = (1.5$ ms, -17 G/cm); $g_5 = (0.6$ ms, -13 G/cm); $g_6 = (0.6$ ms, 9 G/cm); $g_7 = (0.6$ ms, 15 G/cm).

Figure 2a には、TROSY-HNCA タイプの実験において ^{15}N 核 \rightarrow $^{13}\text{C}^\alpha$ 核の $^1J_{\text{NC}\alpha}$ による展開時間の間に生成される $\text{N}_x\text{C}^\alpha(i)_z$, $\text{N}_x\text{C}^\alpha(i-1)_z$, $\text{N}_x\text{C}^\alpha(i)_z\text{C}^\alpha(i-1)_z$ の各磁化への伝達効率のシミュレーションを示した。Intra-HNCA と DQ-HNCA で用いられる $\text{N}_x\text{C}^\alpha(i)_z\text{C}^\alpha(i-1)_z$ の磁化がより高い伝達効率で生成されることが示され、TROSY タイプの実験において従来の HNCA 実験と同程度の感度が期待されることが判明した。

Figure 2b には、Intra-HNCA, DQ-HNCA, HNCA, HN(CO)CA, sequential-HNCA [Meissner A. & Sorensen, O.W., 2001] のそれぞれの実験 (800MHz の装置を使用した場合) における磁化の相対的な伝達効率と相関時間との関係のシミュレーションを示した。相関時間の増大に伴い HN(CO)CA 実験の感度が著しく低下することがわかる。これに対して Intra-HNCA 実験は高分子量蛋白質においては HN(CO)CA や sequential-HNCA の 2 倍以上の感度で測定できる。また DQ-HNCA 実験は HNCA ($i-1$) に比べて常に 2 倍以上の感度を持っていることが判明した。したがって、高分子量蛋白質の高磁場での測定においては、Intra-HNCA と DQ-HNCA の組み合わせが有用であることが示された。

Figure 3 には、 $u\text{-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -YUHI と unlabelled-Ubiquitin の複合体試料 (35kDa) についての HNCA, Intra-HNCA, HN(CO)CA スペクトルを示した。Intra-HNCA において HNCA における一方のクロスピークのみが選択的に観測されている。

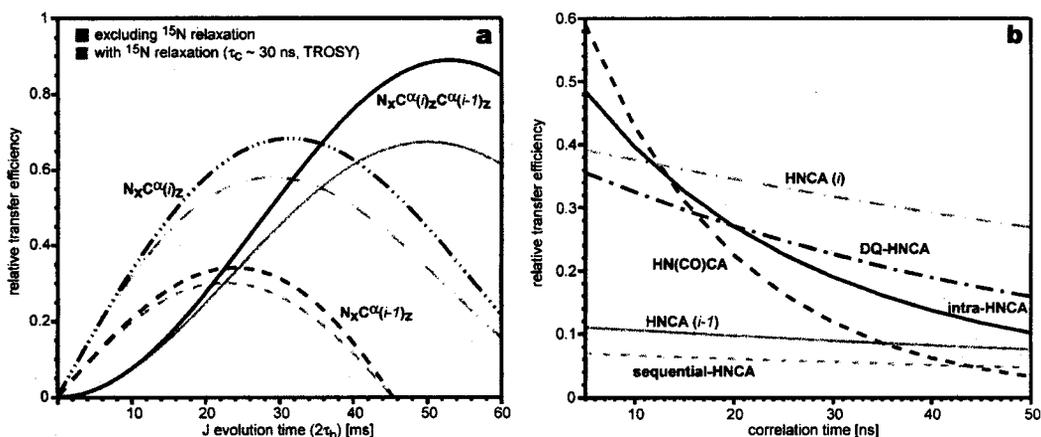


Figure 2. (a) Generation of ^{15}N coherence antiphase to $^{13}\text{C}^\alpha$, and/or $^{13}\text{C}^\alpha_{i-1}$ through evolution of the $^1J_{\text{NC}\alpha}$ and $^2J_{\text{NC}\alpha}$ couplings. Buildup as a function of the evolution time, using average values for the $^1J_{\text{NC}\alpha}$ (11 Hz) and $^2J_{\text{NC}\alpha}$ (7 Hz) couplings, both in the absence of relaxation (black lines), and including attenuation by relaxation (grey lines), assuming the ^{15}N -TROSY transition of a 30 ns tumbling protein at 800 MHz ($R_2 = 8$ Hz). The double antiphase term is used in the new intra-HNCA and DQ-HNCA (solid lines), while the single antiphase terms lead to the intrasidial (dashed-dotted lines) connections in an HNCA spectrum, and the sequential connections (dashed lines) in the HN(CO)CA or the HNCA spectra, respectively. (b) Calculated transfer efficiencies of triple resonance TROSY NMR experiments as a function of the correlation time for a side-chain deuterated protein. Comparison at 800 MHz of the HNCA (intrasidial i peak) (grey dashed-dotted line), DQ-HNCA (black dashed-dotted line), intra-HNCA (black solid line), HN(CO)CA (black dashed line), HNCA (interresidial $i-1$ crosspeak) (grey solid line) and sequential-HNCA (grey dashed line) experiments.

Intra-HNCA と DQ-HNCA では $^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}^\alpha$ の磁化伝達時間 (~52 ms) が、通常の HNCA (~23 ms) より長い。そのため、蛋白質の高レベルの重水素化が必要である。また DQ-HNCA の解析にあたっては、解析ソフトウェアにおいて $^{13}\text{C}^\alpha(i-1)$ と $^{13}\text{C}^\alpha(i)$ の和の化学シフトから Intra-HNCA で観測された $^{13}\text{C}^\alpha(i)$ の化学シフトを引いて $^{13}\text{C}^\alpha(i-1)$ の化学シフトを算出することが必要になる。

現在、より高分子量 (大きな相関時間) の蛋白質試料についてこの方法の有用性の実証を行っている。また Intra-HNCA で用いた手法を HNCACB 等に適用した実験も検討している。

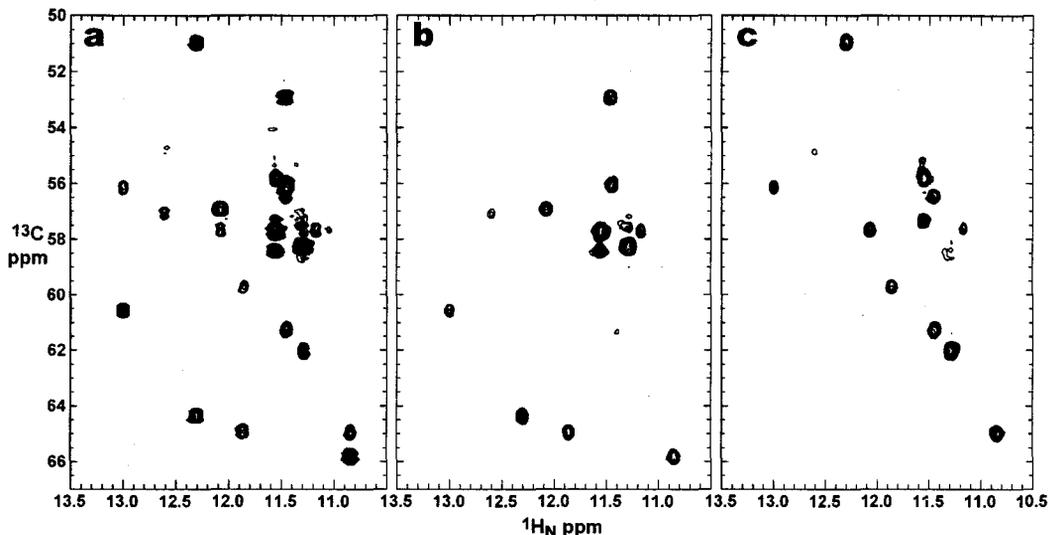


Figure 3. Contour plots of the $^1\text{H}_\text{N}/^{13}\text{C}^\alpha$ planes (^{15}N chemical shift: 118.4 – 118.9 ppm) of HNCA (a), Intra-HNCA (b) and HN(CO)CA (c) of 35kDa $u\text{-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -YUH1 + unlabelled ubiquitin complex (1 mM).

2. シキミ酸を用いた芳香族アミノ酸側鎖選択的プロトン標識と、高分子量蛋白質のグローバル・フォールド決定への応用

【序】高分子量蛋白質試料において顕著になる NMR シグナルのオーバーラップの問題を回避して、効率よくグローバル・フォールドを決定するためのアプローチとして、メチル基選択的なプロトン標識法がしばしば用いられるようになってきている。しかしメチル基のみのプロトン標識では正しいグローバル・フォールドを決定できない可能性も指摘され、メチル基と同様に蛋白質のコアを形成する芳香族アミノ酸のプロトン標識の有用性が示唆されている。今回私たちは、Phe, Tyr, Trp の共通の生合成前駆体であるシキミ酸を用いることで効率よく芳香族アミノ酸側鎖のみをプロトン標識する方法を確立した。さらにメチル基および芳香族アミノ酸側鎖プロトン標識 YUH1 試料 (27kDa) を用いてグローバル・フォールドの決定を行ったので報告する。

【実験・結果】 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -{Ile- δ 1, Leu- δ 1/ δ 2, Val- γ 1/ γ 2}, ^1H -{Phe- δ / ϵ / ζ , Tyr- δ / ϵ , Trp- ϵ / ζ / η }, $u\text{-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -bg-YUH1 試料を作成し、メチル基の帰属のためには H(CCCO)NNH, (H)CC(CO)NNH を、芳香族側鎖の帰属のためには 2D ^1H - ^1H TOCSY, 3D ^{15}N -HSQC-NOESY を測定し解析した。NOE 情報の取得のためには、 ^{13}C -separated (t_1, t_2) NOESY (methyl-methyl NOEs), ^{13}C -separated (t_1), ^{15}N -separated (t_2) NOESY (methyl- H_N NOEs), $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -rejected (t_1), ^{13}C -separated (t_2) NOESY (aromatic-methyl NOEs), $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -rejected (t_1), ^{15}N -separated (t_2) NOESY (aromatic- H_N NOEs), ^{15}N -separated (t_1, t_2) NOESY (H_N - H_N NOEs) の計 5 種の 3D NOESY 測定を行った。その結果合計 1940 個 (337 intraregion, 685 sequential, 414 middle range, 504 long range) の unambiguous NOE を得ることができた。この NOE 情報と、水素結合の情報、2 面角の情報を用いて高次構造計算を行ったところ、全領域の主鎖 RMSD で 2.6Å、構造がよく決まっている β -シート領域で 1.1Å の精度のグローバル・フォールドが得られた。また、芳香族側鎖からの NOE を導入することによって構造の正確性が高まることも確認された。

蛋白質のユビキチン化シグナル認識の構造的基盤

横浜市大・院総合理¹、理化学研究所²、愛媛大学大学院理工学研究科³、木原生物科学研⁴

○白川昌宏¹、藤原健一朗¹、天野剛志³、大野綾子^{1,4}、Jee JunGoo²、朽尾豪人¹、廣明秀一¹、菅澤薫²、花岡文雄²

Ubiquitin, a 76-residues long protein, is well conserved from yeast to mammal, and serves as a protein tag by conjugating to its target proteins through an isopeptide bond formed between lysine sidechain of the target proteins and the C-terminus glycine of ubiquitin. Either Lys 48-linked or Lys63-linked poly-ubiquitin chains or mono-ubiquitin can be attached to the target proteins. Lys 48-linked poly-ubiquitination and mono-ubiquitination are thought to mediate different biological signals, by binding to distinct protein factors. The former is involved in 26S proteasome-mediated proteolysis, while the latter is in endocytosis. To understand the mechanism of ubiquitination signals, we have analyzed the solution structures of the di- and tetra-ubiquitin chains by NMR. By constructing unit-selectively isotope labeled ubiquitin chains, we obtained the information about the unit arrangement.

ユビキチンは76残基からなる真核生物に高度に保存されたたんぱく質で、他のたんぱく質のリジン残基側鎖にisopeptide結合により付加し、たんぱく質タグとして働く。この現象はユビキチン化と呼ばれる。ユビキチン化は、たんぱく質への結合状態や結合位置により、様々な細胞内現象を調節するシグナルとして機能している。

現在のところ、細胞内でのたんぱく質へのユビキチン化には、Lys48でリンクしたポリユビキチン化、Lys63でリンクしたポリユビキチン化と、モノユビキチン化の3種類の結合状態が見ついている。最も研究が進んでいるのは、プロテアソームによるたんぱく質分解に関与するLys48リンクのポリユビキチン化である。これはユビキチンのLys48の側鎖アミノ基に、別のユビキチンのGly76のC末端カルボキシル基が共有結合したポリユビキチン鎖が4分子以上連なったもので、プロテアソームへのターゲティングを導くことで、被ユビキチン化たんぱく質の分解を招く。一方、モノユビキチン化はポリユビキチン化とまったく異なるシグナルとして機能する。これはエンドサイトーシスのinternalizationや初期エンドソームにおけるソーティングの目印となっていることが最近の研究から判っている。

こういったユビキチン化シグナルを認識するたんぱく質ドメインとしてユビキチン認識モチーフ(ubiquitin interacting-motif; UIM)が提唱されている。これは最初にポリユビキチンへの結合活性を持つプロテアソーム19S複合体のS5aサブユニットに見つかり、さらに多くのエンドサイトーシスに関与するたんぱく質群に見ついている。ここで興味深いのはS5aのUIMの結合には4ユニット以上のポリユビキチン鎖が必要であるのに対して、エンドサイトーシス因子のUIMの結合にはモノユビキチ

キーワード: たんぱく質-たんぱく質相互作用、4次構造変化、たんぱく質複合体、ユニット選択ラベル
しらかわまさひろ、ふじわらけんいちろう、てんのたけし、おおのあやこ、じーじゅんぐ、とちおひでひと、ひろあきひでかず、すがさわかおる、はなおかふみお

ンで充分だとされる点である。これはポリユビキチン鎖におけるユニット間の相対位置、すなわち4次構造が制御的な役割を果たしていることを示唆する。

ポリユビキチン鎖の構造については、すでにX線結晶構造解析により二量体と四量体が決定されている。しかしながら、四量体の構造は2種類報告されており、溶液中ではこれらの平衡状態か、異なるユニット配置(4次構造)で存在することが示唆される。

本研究はUIMなどのたんぱく質によるユビキチン及びポリユビキチン鎖の認識機構の解明を目的とする。特にモノユビキチン化、ポリユビキチン化が発するシグナルの差異を、認識たんぱく質との相互作用の特異性から明らかにしたいと考えた。そのため以下の一連の解析を行った。

溶液中でのポリユビキチン鎖の構造

溶液中でのポリユビキチン鎖の4次構造を調べるため特定のユビキチンユニットのみを安定同位体ラベルした二量体、あるいは四量体のポリユビキチン鎖を合成した。合成には、ユビキチン(K48C変異体)、ユビキチン(C末にAspを付加したもの)、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン共役酵素(E2-25K)、creatine phosphokinase、inorganic pyrophosphatase、phosphocreatine、ユビキチン加水分解酵素、などを使って、C. Pickertらによって開発された方法に従った。

特異的に安定同位体ラベルされているので、フィルター等により特定のユニットの信号を選択的に観測することができる。化学シフト値などの情報をもとに、ユニット間相互作用の部位を解析しつつある。この情報を基にポリユビキチン鎖の伸長に伴うユニット間配置の変化を議論する。

ポリユビキチン鎖とUIMの相互作用

ユニット特異的に安定同位体ラベルした二量体、四量体ユビキチンとUIMの相互作用解析を行った。また単量体ユビキチンとの結合実験を行った。この実験結果の解析により、各ユニットのUIM結合に対する寄与と、UIM結合に伴うポリユビキチン鎖の高次構造変化についての知見が得られると期待される。

ユビキチンとエンドサイトーシス因子のUIMとの相互作用

最近、エンドサイトーシスに関与する多くの因子がUIMによって、モノユビキチンと結合することが報告されている。そこでEPSIN、STAM、HBP、HRSの持つUIMとユビキチンの相互作用をchemical shift perturbationにより解析した。その結果、ユビキチンの β シートを中心に形成されるLeu8、Ile44、Val70を含む疎水性パッチが、結合に重要であることが判った。これは、これまで報告のあった変異体を用いた実験から同定されたたんぱく質分解を招くのに必須とされる残基と、ほぼ一致する。

これらの結果に加えて、ユビキチン相同ドメインとUIMの相互作用や、構造情報を基にデザインしたユビキチン変異体の活性についても議論する。

1 L12

区分標識と TROSY を用いた H⁺-ATPase β サブユニットの構造解析

(阪大・蛋白研¹、理研 GSC²、東工大・資源研³)

○八木宏昌¹、泉 顕也¹、山崎俊夫²、吉田賢右³、阿久津秀雄¹

Structural analysis of H⁺-ATPase β subunit using segmental labeling and TROSY

¹Institute for Protein Reserch, Osaka University, ²Genomic Sciences Center RIKEN, ³Reserch Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology

Hiromasa Yagi¹, Kenya Izumi¹, Toshio Yamazaki², Masasuke Yoshida³ and Hideo Akutsu¹

H⁺-ATPase is known to be a motor protein. The β subunit, which is the catalytic region for this enzyme, is consisting of 473 amino acids. We completed more than 90% assignments of the backbone NMR signals by the segmental isotope labeling method and TROSY. On adding MgADP, signals located only in the nucleotide binding domain shifted, suggesting that the β subunit's conformation changes even as a monomer on nucleotide binding. The segmental isotope labeling is a powerful method for the analysis of large proteins.

【序】

溶液 NMR において分子量の増加はスペクトル解析を困難にする主な要因の一つである。近年、緩和によるシグナルの広幅化は試料の重水素化や TROSY、CRIPT-TROSY といったパルス系列を用いることで改善されつつある。ところが、残基数の増加によるシグナルの重なりはよりシビアな問題である。インテインを用いた区分選択標識はこの問題の解決に非常に有意義な手法である。我々は 473 アミノ酸残基からなる分子量 5 万の H⁺-ATPase β サブユニットにこの手法を適用した。このタンパク質は F₁ 複合体中では基質結合によって Open から Closed へ構造が変化することが知られている。この構造変化のメカニズムを解明するため、単体の β サブユニットの主鎖の帰属を区分標識と重水素化、TROSY を組み合わせることによって行った。

【実験】

¹³C、¹⁵N の標識区分が異なる 4 種の β サブユニット（それぞれ A; 1-124、B; 1-270、C; 271-473、D; 391-473 が標識されたもの）を作製した。インテインは *Pyrococcus furiosus* 由来の PI-PfuI を用いた。インテインと β サブユニットをシークエンスの途中で切断し、それぞれの N 末端側と C 末端側を融合させた発現プラスミドを別々に調製した。各々を大腸菌で発現させ、変性剤によって一端変性させた後リフォールディングすることでインテイン反応を起こさせて目的タンパク質を得た。主鎖の帰属には TROSY タイプの 3D HNCA、3D HN(CO)CA、3D HNCACB、3D HN(CO)CACB スペクトルを用いた。また標識する側のフラグメントは 80% の重水素化を行った。全ての測定は pH 8.0、40℃で Bruker DRX800 を用いて行った。

【結果と考察】

インテイン反応はそれぞれ 60%以上の反応効率で行われた。またそれぞれのスペクトルは Fig. 1 に示すようにシグナルの減少がみられた。帰属は A、D のスペクトルについては 100%、B は 88%、C

区分安定同位体標識、インテイン、TROSY、H⁺-ATPase β サブユニット

やぎひろまさ、いずみけんや、やまざきとしお、よしだまさすけ、あくつひでお

は 92%で、全体としては 90%以上完了した。B、C において帰属が完全でない理由は、観測されるべきシグナルの一部が見えていないことによる。これは交換によるシグナルの広幅化が原因であると考えられる。観測出来なかった領域を結晶構造上にマッピングすると、それらはヌクレオチド結合ドメインの Hinge 部分とその周辺に位置していることが分かった (Fig. 2)。Tyr や His の $^1\text{H-NMR}$ の結果を考慮にいと、この付近ではモノマーは二つの構造をとっており、その間での交換が起きていると考えられる。従って、モノマーと複合体で構造の自由度に違いがあると推測される。

基質結合による構造変化を解析するため MgADP を加えて測定を行った。その結果、スペクトル B、C において特定の領域で化学シフト値の変化が見られた。再度これらの領域を結晶構造上にマッピングすると、ADP のアデニン結合ポケット周辺と Hinge 領域周辺に位置する (Fig. 3)。この変化は複合体における Open から Closed の変化に対応するものと考えられる。

また構造変化を起こす上で重要な残基と考えられる Lys-164 を Ala に置換した変異体 (K164A) の 2D HSQC 測定を行った。この変異体は Tyr の $^1\text{H-NMR}$ の結果から、基質結合能力が低下し、構造変化が起きなくなるといことが知られている。HSQC スペクトルの結果、Open 型でも野生型と比べると Hinge 領域、アデニン結合ポケット、さらには比較的遠く離れた領域までシグナルが変化してた。つまり Lys を Ala に置換することによって Open 型の構造が保てなくなり基質結合能力の低下を引き起こし、さらには基質が結合したとしても構造変化が起きなくなったと考えられる。このように、シグナルの個数を減らすことによって各アミノ酸情報を獲得することが可能となり、変異体の解析にも応用出来るようになった。

区分標識と TROSY の組み合わせは、分子量が大きなタンパク質の解析に有効な手段であることが示された。

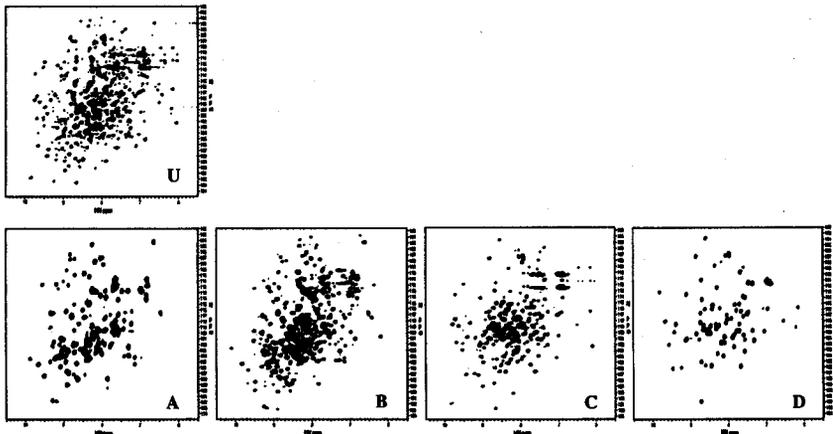


Fig. 1 The ^{15}N -labeled β subunits (U: Uniformly, A: 1-124, B: 1-270, C: 271-473, D: 391-473)



Fig. 2 The residues, the signals of which were not observed. (Black)



Fig. 3 Chemical shift perturbed regions on ADP binding. (Black)

1 L13

^{13}C - ^{13}C 距離相関 及び ^1H - $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ - ^1H 双極子相関固体 NMR 測定 によるペプチドの構造決定

(京大理) ○竹腰清乃理、大橋竜太郎、溝上潤、水野敬、寺尾武彦

Structural Determination of a peptide by ^{13}C - ^{13}C distance measurement and ^1H - $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ - ^1H dipolar correlation experiments in solids

○ K. Takegoshi, Ryu Ohashi, Jun Mizokami, Takashi Mizuno, and Takehiko Terao

While selective polarization-transfer experiments provide quantitative structural information and thus is useful for obtaining local geometrical structures, broadband polarization-transfer experiments that would provide global structural information have not been established yet for NMR in solids. This may be mostly ascribed to a so-called dipolar truncation effect, that is, a strong dipolar coupling tends to suppress a weaker coupling. Recently we presented a novel ^{13}C - ^{13}C recoupling under magic-angle spinning (^{13}C - ^1H dipolar-assisted rotational resonance (DARR)). In this lecture, we show that DARR is a broadband recoupling and it avoids the dipolar truncation due to its unique nature of orientation-selective recoupling. These features would make DARR as a possible tool of determining internuclear distances roughly by the polarization transfer experiment.

固体 NMR 法は X 線回折法や溶液の NMR 法の適用が難しい長距離秩序を持たない粉末試料や繊維状の試料でも構造決定が可能な手法として有力な分光法である。また、得られる局所的な構造の精度が高いために、生体分子の機能と構造の関係を究明する上で重要な活性部位や反応部位の精密な構造の決定法としても期待されている。これまでに、核スピン間の双極子相互作用の大きさを測定することにより核間距離や二面角を決定する具体的な方法論が多数提示されてきており、タンパク質などへの応用研究も行われている。しかし、ほとんどの測定法は、一般性に欠ける嫌いがあるうえ、原理的には 2 個の孤立したスピン系にのみ適用可能な手法であるために、複数の距離を得るにはその数だけの同位体ラベルした試料が必要であるという欠点があった。

Key Words : solid NMR, MAS, Peptide structure, dihedral angles in a peptide mainchain, 2D correlation NMR

たけごし きよのり、おおはし りゅうたろう、みぞかみ じゅん、みずの たかし、てらお たけひこ

Strategy

固体NMR法では主に双極子相互作用を用いて、核間距離などの構造情報を得る。ところが、多くの距離を測定するために多数のスピンの(N個)を導入すると、 N^2 組みの双極子のペアが存在し、NMR信号が複雑になってしまう。従って、多スピン系においては、いったん全ての双極子相互作用を消去して、そのうち

- 1) 選択的な双極子相互作用の測定を行い、構造決定に重要な距離を決定する。
- 2) 多次元測定を適用し、ある時間区間のみにも全双極子を非選択的に復活し、他の時間区間で多次元的に双極子ペアを展開して区別して観測する。

という2つのアプローチが考えられる(図1)。双極子相互作用の消去には、マジック角度試料回転(Magic Angle Spinning: MAS)法を用いる。完全な消去には少なくとも15 kHz以上の速い回転が必要である。したがって、相互作用の復活法は、このような速いMAS回転下で適用できるものでなければならない。1)の選択的な手法については、すでに、R2TR(Rotational Resonance in the Tilted Rotating frame)法という手法を開発し、¹炭素、窒素核を全て¹³C、¹⁵Nで置き換えたグリシルイソロイシン(GlyIle)の三次元分子構造の決定を行い検証した。^{2,3}本講演では、多スピン系での距離関連実験を行う測定法として最近開発したDARR(¹³C-¹H dipolar-assisted rotational resonance)法⁴を用いた構造決定について主に検討する。この方法は、簡単にいうと、溶液NMR法で構造決定に広く用いられている核Overhauser効果(NOE)を用いた¹H-¹Hの距離関連NMR法に対応した固体NMR法で、¹³Cをラベルした粉末試料を用いて¹³C-¹³Cのスピンの拡散(磁化交換、分極移動)を用いた距離測定を実現するものである。

Broadband recoupling by DARR

図2に、10%に薄めたGlyIleの¹³C-¹³C 2D DARR磁化交換NMRスペクトルを示す。交換時間に¹HにDARR照射を行っている。交換時間10ms(a)では残基内に、200ms(b)では全ての炭素間に磁化交換が起きていることが判る。これは、DARRによる磁化交換が広帯域に非選択的に起きていることを示している。

For a multiply/uniformly ¹³C-labeled sample

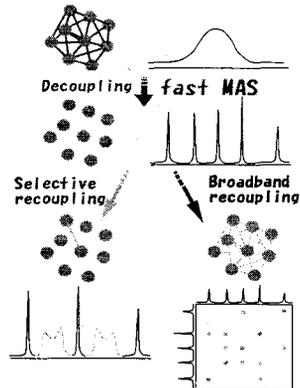


Fig1. Strategy of structural determination by solid NMR using a multiply/uniformly ¹³C labeled sample

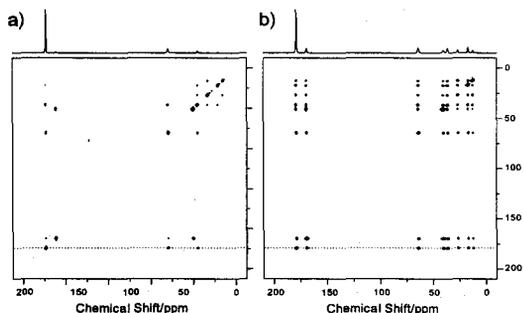


Fig2. 2D ¹³C-¹³C polarization transfer spectra of 10% uniformly ¹³C-labeled Glycylisoleucine with the polarization transfer time of 10ms (a) and 200ms (b). The top spectrum is the cross section at C=O of the isoleucine residue, whose position is designated by the dotted line.

^{13}C - ^{13}C Distance by DARR

図3に、図2(b)から求めた Ile の C=O (C1) と各炭素の交差ピーク強度と対応する C-C 距離の相関を示した。交差ピーク強度が距離と良い相関を示していることが判る。このように、DARR を使った2次元磁化交換実験を行うことで、C-Cのおおまかな距離を求めることが出来ることが示された。

DARRによる距離測定法を Eledoisin Related Peptide の構造を決定することに適用する。両端の2残基以外の4残基の炭素、窒素を全て ^{13}C , ^{15}N で置換した試料 (Lys-Phe*-Ile*-Gly*-Leu*-Met: *はラベルした残基) を合成し、まず、交換時間が 10ms と 1s で ^{13}C - ^{13}C 2D DARR 磁化交換スペクトルを測定した(図4)。交換時間 10ms では、交差ピークのほとんどは残基内の炭素間に現れているのに対して、1秒間の交換時間では、1次構造では遠く離れたアミノ酸残基の炭素間にもピークが現れていることが示された。そのような例として、図5に、交換時間 100ms と 1s での Phe 基の C_α のスライススペクトルを比較している。注目すべきは、交換時間 100ms では、1次構造で Phe の C_α により近い Gly の C_α の交差ピークのほうが、より遠い Leu の C_β の交差ピークよりも明らかに小さいことである。これは、明らかに Phe 基の C_α と Leu の C_β が Phe 基の C_α と Gly の C_α よりも近接していることを示している。

二次構造の中から、このような「間に2残基おいた残基間の C_α - C_β 間の距離が近くなる構造」を考えると、この6残基は α ヘリックス構造をとっているのではないかと考えられた (Table 1)。

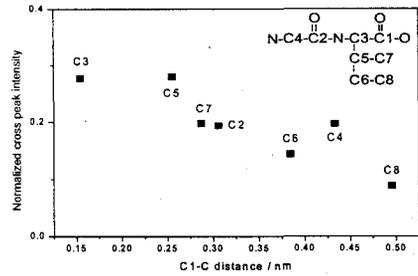


Fig. 3. Correlation between the normalized cross-peak intensity obtained from the cross-section spectrum shown in Fig. 2(b) and the C-C distance.

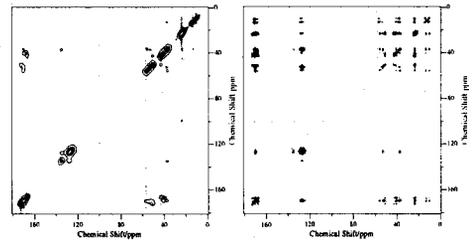


Fig. 4 2D ^{13}C - ^{13}C DARR exchange NMR spectra of Eledoisin related peptide at a mixing time of 10ms (Left) and 1s (Right)

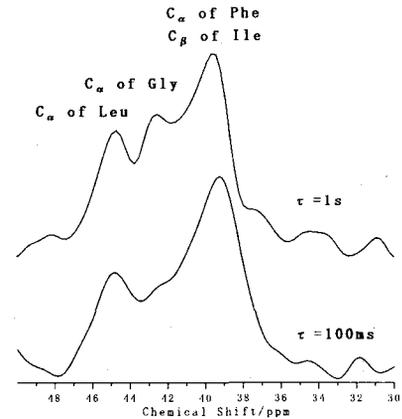


Fig. 5 2D DARR cross sections at C_α of Phe

Table 1. Average C-C distances (\AA) from C_α^i for α helix

C_α^{i+1}	C_β^{i+1}	C_α^{i+2}	C_β^{i+2}	C_α^{i+3}	C_β^{i+3}
3.82	4.83	5.43	5.83	5.15	4.65

H-N/C-H 双極子相互作用の多次元相関NMR測定法

距離情報と相補的な情報として、ペプチド結合に含まれる二面角がある。ここでは、H-N/C-H 双極子相互作用の多次元相関NMR測定法により、二面角 ϕ を決定し、主鎖の構造決定に用いる。具体的には、まず速いMAS下でH-Nの双極子相互作用を復活させて、N \rightarrow Cの分極移動によりCに移し、H-Cを復活させて相関を測定する(図6, 7)。途中のN \rightarrow Cを選択的に行うことにより、 ϕ または ϕ の測定が可能になる。

この実験の困難な点は、 ^1H - ^1H 双極子相互作用を消去しつつ ^{15}N - ^1H や ^{13}C - ^1H などの双極子相互作用を速いMAS下で復活させなければならない点にあったが、我々は、FSLG- $m\overline{2mm}$ 法⁵という方法を開発して、その困難を克服し、実際に、H-N/C-Hの相関測定を行って、決定できる精度などを確認した。⁶講演では、先ほどの Eleodoisin Related Peptide に適用して、主鎖の複数の ϕ 角を一回の二次元測定実験で決めた結果について検討する。

構造を決める

講演では、DARR法により得られた多数のおおまかな距離情報とH-N/C-H相関による角度情報を、X-PLORなどの構造計算プログラムに入れて構造をある程度絞り込んだ結果についても発表する。絞り込まれた構造からわかるここが肝心という距離をR2TRにより選択的に求めて、より正確な構造を決定していくことを考えている。このように、これまでに開発された手法により、固体NMRである程度まとまった大きさの構造を決定することがようやく可能になってきた。

参考文献

1. K. Takegoshi, K. Nomura, and T. Terao, *Chem. Phys. Lett.*, **232**, 424 (1995).
2. K. Nomura, K. Takegoshi, T. Terao, K. Uchida, and M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4064 (1999).
3. K. Nomura, K. Takegoshi, T. Terao, K. Uchida, and M. Kainosho, *J. Biol. NMR*, **17**, 111 (2000).
4. K. Takegoshi, S. Nakamura, and T. Terao, *Chem. Phys. Lett.*, **307**, 295 (1999).
5. K. Takegoshi and T. Terao, *Solid State NMR*, **13**, 203 (1999).
6. K. Takegoshi, T. Imaizumi, and T. Terao, *Solid State NMR*, **16**, 271 (2000).

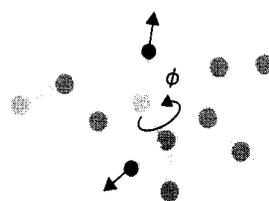


Fig. 6 H-N/C-H dipolar correlation and a peptide dihedral angle ϕ

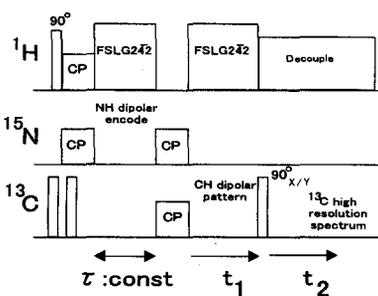


Fig. 8 Pulse sequence for H-N/C-H dipolar correlation experiment

第 二 日

11月7日(木)

特 別 講 演 要 旨

2 SL1

新しい蛋白質構造の世界をひらく高圧NMR

(近畿大学生物理工学部・理研播磨研究所) 赤坂一之

High Pressure NMR Expands the Protein Structure World.

K. Akasaka, Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University

I describe here a new experimental method, a combination of multi-dimensional NMR spectroscopy with pressure, that is capable of detecting and analyzing structures and thermodynamic stability of these higher energy conformers. The idea is based on the finding that under physiological conditions the conformational order of a globular protein normally decreases in parallel with its partial molar volume (negative ΔV), so that under equilibrium conditions, the population is shifted to a less and less ordered conformer with increasing pressure. In principle, with the high space resolution of the multi-dimensional NMR, the method enables one to explore protein structure and stability in atomic detail in the entire conformational space from N to U with pressure and temperature as variables. The method will provide us with a strong basis for understanding the basic phenomena of proteins; function, folding and aggregation.

1. 蛋白質は広い構造空間で揺らいでいる

蛋白質は機能する分子である。一般に、蛋白質機能は天然構造へのフォールディングによって達成されると信じられている(Anfinsen)。一方で、1960年代以来唱えられているのは、蛋白質には異なる構造間の熱力学的平衡があり、外部環境や他の分子との相互作用によって機能上重要な立体構造へと移行する、という考えである(Jacob-Monod; Koshland)。実際、温度軸(エネルギー軸)での実験(カロリメトリー)では、蛋白質の天然構造 \leftrightarrow 変性構造の2状態モデルが多くの場合に適用するように見える(Privalov)。変性剤濃度を変える実験でも、通常はせいぜい途中にモルテングロビュール構造が検出されるだけである(Kuwajima)。一方NMRの世界では、緩和測定によって部位毎の揺らぎを検出

蛋白質構造、圧力、部分モル体積、構造間平衡、構造解析

あかさか・かずゆき

することができる。その時間域はピコ秒、ナノ秒から、最近ではマイクロ秒、ミリ秒の遅い時間域に伸びている。また NMR を重水素交換と組み合わせた実験でも、部位毎の交換速度から部位毎の“揺らぎ”が検出されるとされ、揺らぎをアミノ酸単位で考えられるようになった。しかし揺らぎの構造的な中身はあいまいである。しかしながらキネティックフォールディングと組み合わせた重水素交換実験では、天然構造⇄変性構造の間に位置する、フォールディング途中の構造が検出されると考えられている。

これとは別に、最近社会問題化している狂牛病、アルツハイマーなど一連の蛋白質疾患は、蛋白質の天然構造から“逸脱した構造”が引き起こす現象であることは疑う余地がなく、この面からも蛋白質構造を広い構造空間で考える必要性が生じている。蛋白質の天然構造への知見が次々と蓄積されていく中で、それ以外の構造に対するわれわれの知見を増やしてゆくこともやらなければ、これらの問題はおろか、機能そのものに迫ることさえできない。蛋白質には基底天然構造と完全変性構造との間にどのような構造が存在するのか、われわれの知見は現在極めて限られている。

2. 広い構造空間での NMR 構造解析は可能か？

基底天然構造と完全変性構造までのすべての構造を含む広い構造空間で、蛋白質立体構造を、できれば系統的に解析することは果たして可能か？この夢に、これまでの温度軸、溶媒軸の実験でなく、圧力軸の実験でアプローチする。これは 1980 年代に森島, Wagner が始め、近年 Jonas, Markley, Wand, Ernst が挑戦したものの延長上にあるものともいえるが、進歩した実験技術¹⁾とより統一的な概念^{2,3)}によって支えられて、夢は近づいた。

圧力軸 NMR 実験の新しい意味

実験の骨子は、圧力の熱力学的共役量である体積（部分モル体積）が蛋白質では立体構造に大きく依存することを利用するものである。加圧により、蛋白質構造間の平衡は、より小さな構造をもつ立体構造へと移行する。加圧によって系に与える仕事はわずか（蛋白質 1 モル当たり数キロカロリー）であるが、その大半が熱力学平衡をずらせる（マイナーな構造を選びだす）ために有効に使われ、熱転移の場合のように“無駄”な内部エネルギーの増大には使われない。これに二次元（多次元）NMR を組み合わせることによって、選び出した構造を高い空間分解能で解析する。それは、平衡を支配する自由エネルギーと構造（～部分モル体積）との直截的な関係 (Volume theorem) に注目する、一般化した実験である。実験的には、これは最近演者らが山田の耐圧セル方式の採用により開発に成功した、蛋白質に適用可能な“オンラインセル方式高圧 NMR”¹⁾によって可能となった。これにより、すでに多くの蛋白質において、低い励起構造の存在⁴⁾、基底状態とは異なるフォールド構造の存在^{5,6)}、また、部分的

にフォールドした中間体構造⁷⁻¹¹⁾が、部位特異的に示された。一部ではキネティックなフォールディング中間体との同一性が証明されたことは注目される¹⁰⁾。また、コンフォーメーション病と蛋白質集合体への有効な展開が期待される¹¹⁻¹³⁾。今後は、それぞれの構造について、座標を含む構造解析を可能にするための S/N 比の改善が一つの目標となる。

図 1. 広い構造空間での高圧 NMR 実験の概念図

桑田らによって行われた β -lactoglobulin の場合⁸⁾を例として、検出された構造(N, N', I1, I2, U) を概念的なフォールディングファネル上に示す。N, N', I1, I2, U の順に Conformational Order が減少するに従い部分モル体積が減少するため、1~2000 気圧の加圧に従い、平衡ポピュレーションがほぼ N, N', I1, I2, U の順に増し、順次 NMR で観測可能となる。この程度の加圧によって起こる各構造の“歪み”は比較的わずかであると考えられる。天然構造について、この“歪み”は詳しく見積もられている^{14, 15)}。

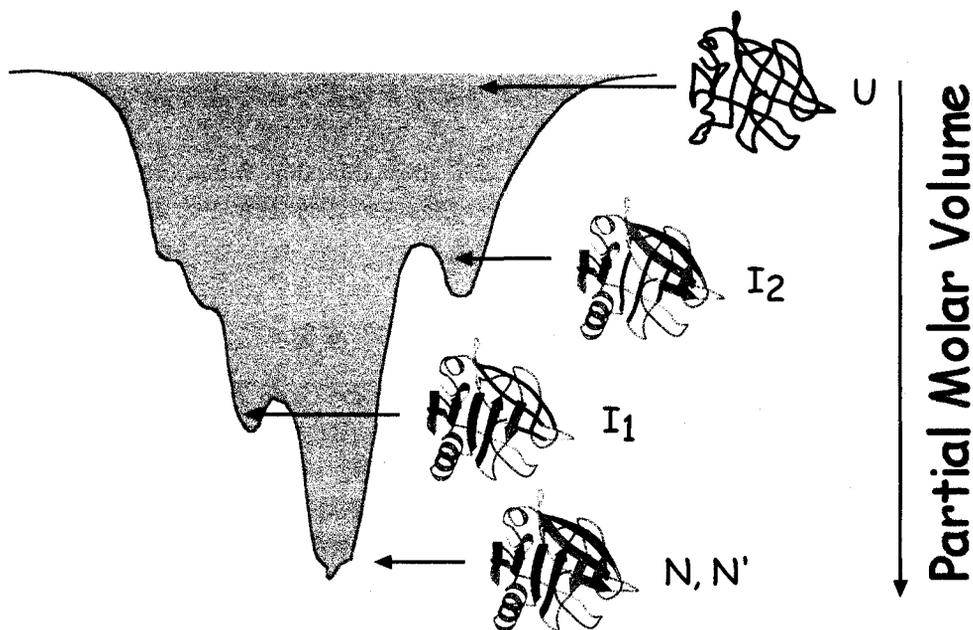


Figure 1. Concept of high pressure NMR experiment

1. The On-line Cell High Pressure NMR Technique and Its Application to Protein Studies. K. Akasaka and H. Yamada, in *METHODS IN ENZYMOLOGY 338: NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES* (T. L. James, V. Doetsch and U. Schitz, eds.), Academic Press, 134-158(2001).
2. K. Akasaka, Exploring the entire conformational space of proteins by high pressure NMR. *Pure and Applied Chemistry* (2002) in press.
3. 新しい蛋白質構造の世界をひらく高圧NMR、生物物理 10月号 (2002)
4. Akasaka, K. and Li, H., Low-lying excited states of proteins revealed from nonlinear pressure shifts in ^1H and ^{15}N NMR. *Biochemistry* 40, 8665-8671(2001).
5. R. Kitahara, S. Sareth, H. Yamada, F. Ohmae, K. Gekko and K. Akasaka, High pressure NMR reveals active-site hinge motion of folate-bound *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 39, No.40 (2000).
6. R. Kitahara, H. Yamada and K. Akasaka, Two folded conformers of ubiquitin revealed by high pressure NMR. *Biochemistry* 40, 13556-13563 (2001),
7. K. Inoue, H. Yamada, K. Akasaka, C. Herrmann, W. Kremer, T. Maurer, R. Doeker and H. R. Kalbitzer, Pressure-induced local unfolding of the Ras-binding domain of RalGEF, *Nature Structural Biology* 7,547-550 (2000).
8. K. Kuwata, H. Li, H. Yamada, C. A. Batt, Y. Goto and K. Akasaka, High pressure NMR reveals a variety of fluctuating conformers in β -lactoglobulin. *J. Mol. Biol.* 305, 1073-1083 (2001).
9. R. Kitahara, H. Yamada, K. Akasaka and P. E. Wright, High pressure NMR reveals that apomyoglobin is an equilibrium mixture from the native to the unfolded. *J. Mol. Biol.* 320, 311-319(2002).
10. R. Kitahara, C. Royer, H. Yamada, M. Boyer, J. L. Saldana, K. Akasaka and C. Roumestand, Equilibrium and pressure-jump relaxation studies of the conformational transitions of $\text{P13}^{\text{MTCPI}}$. *J. Mol. Biol.* 329, 609-628(2002).
11. K. Kuwata, H. Li, H. Yamada, G. Legname, S. B. Prusiner, K. Akasaka and T. L. James, Locally disordered conformer of Hamster prion: A crucial intermediate to PrP^{Sc} ? *Biochemistry* (2002) in press.
12. T. N. Niraula, K. Haraoka, Y. Ando, H. Li, H. Yamada and K. Akasaka, Decreased thermodynamic stability as a crucial factor for familial amyloidotic polyneuropathy, *J. Mol. Biol.* 320, 333-342(2002).
13. Tara N. Niraula¹, Takashi Konno, Hua Li, Hiroaki Yamada, Kazuyuki Akasaka and Hideki Tachibana, Pressure-dissociation of amyloid-fibrillogenesis assembly of naturally denatured lysozyme variant. submitted.
14. M. Iwadate, T. Asakura, P. V. Dubovskii, H. Yamada, K. Akasaka and M. P. Williamson, Pressure-dependent changes in the structure of the melittin α -helix determined by NMR, *J. Biomol. NMR* 19 (2):115-124 (2001).
15. 赤坂一之・李華、高圧 NMR が描く新しい蛋白質像 その1。天然構造はどれだけ柔らかいか？蛋白質・核酸・酵素 3月号 46, 208-219(2001).

2 SL2 NMR 40年：水素結合から膜タンパク質の構造とダイナミクスへ (姫路工業大・院理) 斉藤 肇

40 Years with NMR: Studies on Hydrogen Bond through Conformation and Dynamics of Membrane Proteins,
(Dept of Life Science, Himeji Institute of Technology) Hazime Saitô

大げさな表題で恐縮ではあるが、演者の研究のルーツとその後の遍歴を通して、後進の諸子に何らかの参考になればと思っている。はじめてNMRの存在を知ったのは学部3回生の1960年、米澤先生が学内の講演会でNMRの原理と化学シフトの理論について話された時である。翌年の卒業研究に先生がおられた福井研究室に入れていただき、「ジオール類の反応溶媒としての特異的な性質を水素結合生成能としてNMRで調べる」というテーマで実験を開始した。研究対象の性質を分子の電子状態を反映するNMR化学シフト変化を通じて調べる手法が、その後所属と研究テーマを変えながらも、一貫して演者の研究と教育に対する姿勢に反映されることになる。

I ^{14}N 水素結合シフト

ジオール類の水素結合の成果は、第一回NMR討論会に発表した。 ^1H NMRによる研究には限界があり、東レ基礎研時代にN-H...XやO-H...N水素結合研究に ^{14}N シフトが有用で、プロトン供与体、受容体でそれぞれ10-20 ppmのシフト変化が低磁場、高磁場に起こることを明らかにした¹⁻³。この考えは後に、コラーゲンが三本鎖を束ねて三重ヘリックス構造を形成する時に重要な寄与をする(Gly)N-H...C=O水素結合の直接観測に使うことができた⁴。

II ^2H NMRとその応用

カナダ National Research Council には1972-1973年に滞在したが、ポリペプチドのヘリックスコイル転移を ^{13}C NMRで調べるかたわら、 ^2H NMRの生体膜研究のプロープとしての手段の可能性を検討した。 ^2H NMRの応用性については総説⁵にもまとめた。

III コンホメーション依存 ^{13}C シフト：多糖の高次構造とゲル化機構

国立がんセンター研究所に移り、抗腫瘍性多糖とくに $\beta(1\rightarrow3)$ グルカンの活性が、高次構造と密接な関係があるとのデータに興味を持った。ゲル化をともない溶液NMRでの取り扱いには限界があり、固体高分解能NMRへの移行のきっかけにもなった。溶液NMRでは揺らぎによる平均化のために識別が困難な、コンホメーション依存シフト⁶が固体高分解能NMR測定ではより明確になり、ダイナミクスに関する知見をふくめて、多形構造の識別、ゲル化機構その他に強力な手段であることをしめすことができた⁷⁻¹⁰。

水素結合、膜タンパク質、構造とダイナミクス

さいとう はじめ

IV コンホメーション依存¹³Cシフト: ポリペプチド、線維タンパク質の高次構造

多糖の場合の高次構造を規定する因子はグルコシド結合であると同様に、ポリペプチド、タンパク質の場合はペプチド単位の高次構造である。 α ヘリックス、 β シート、3/1ヘリックス、コラーゲン型三重ヘリックス、シルクIなどの多形構造を持つポリペプチドの $C\alpha$, $C\beta$, $C=O$ の¹³C化学シフトが8 ppm程度におよぶシフト変化を示すことをシステマチックなデータ解析から知ることができると同時に、アミノ酸組成がより単純なコラーゲン、フィブリンなどの線維タンパク質系への応用の可能性を示すことができた^{6, 11, 12}。

V 部位特異的固体高分解能¹³C NMR: 膜タンパク質の構造とダイナミクス

膜タンパク質は結晶化、タンパク質のオリゴマー化、脂質との相互作用による巨大分子化の問題により、標準手法としてのX線回折、多次元NMRの応用が困難な系である。姫路工業大学では、大量発現およびその後の取り扱いが容易で、Gタンパク質共役型受容体のモデルとしての意義をもつ、バクテリオロドプシン (bR) に焦点をしばり研究を進めた^{13, 14}。感度ならびに選択性の向上のために、[3-¹³C]Ala, [1-¹³C]Val による標識と、keyとなる残基の信号を部位特異変異体のスペクトルと対比して帰属を進める。この方法では水相が十分な intact タンパク質を研究対象として、生理的条件である室温での研究が可能である。その結果、現実にはbRは、X線回折からの描像と異なり、 10^2 - 10^8 Hzの種々の時間尺度で揺らぐ柔らかい系であることがわかった。このような系では、固体におけるシフト相関その他で問題を生じ、REDORなどの原子間距離測定¹⁵では大きな誤差に導き、十分に注意する必要がある。

本研究はいうまでもなく多数の共同研究者の努力の成果である。文献5以降の引用は総説にとどめたため、お名前の明記ができなかった多数の共同研究者に厚くお礼を申しあげたい。

- 1 H. Saitô and K. Nukada, *Tetrahedron Letters*, 1965, 111-117.
- 2 H. Saitô, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 1072-1076, 1077-1081 (1971)
- 3 H. Saitô, Y. Tanaka and S. Nagata, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 324-328 (1973)
- 4 A. Naito, S. Tuzi and H. Saitô, *Eur. J. Biochem.*, 224, 729-734 (1994)
- 5 H. H. Mantsch, H. Saitô and I. C. P. Smith, *Prog. NMR Spectrosc.*, 11, 211-272 (1978)
- 6 H. Saitô, *Magn. Reson. Chem.*, 24, 835-852 (1986)
- 7 H. Saitô, *ACS Symp. Ser.*, 150, 125-147 (1981)
- 8 H. Saitô, *ACS Symp. Ser.*, 489, 296-310 (1992)
- 9 H. Saitô, R. Tabeta, and K. Ogawa, in "Industrial Polysaccharides", ed. by M. Yalpani, Elsevier, pp.267-280, 1987
- 10 H. Saitô, in "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance", Wiley, pp. 3740-3745 (1996)
- 11 H. Saitô and I. Ando, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 21, 209-290 (1989)
- 12 H. Saitô, S. Tuzi and A. Naito, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 36, 79-121 (1998)
- 13 H. Saitô, S. Tuzi, M. Tanio, and A. Naito, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 47, 39-108 (2002)
- 14 H. Saitô, S. Tuzi, S. Yamaguchi, M. Tanio, and A. Naito, *B. B. A.* 1460, 39-48 (2000)
- 15 A. Naito and H. Saitô, in "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance, vol. 9, Advance in NMR", Wiley, pp. 283-291 (2002)

Thomas L. James, Zhihua Du, and Moriz Mayer, Department of Pharmaceutical Chemistry,
University of California, San Francisco, CA 94143-0446 USA

Efforts to design therapeutic agents that bind to protein receptors based on their three-dimensional structure have resulted in clinically useful drugs. In contrast, there has been little effort to design drugs rationally on the basis of the three-dimensional structure of DNA or RNA. The reason for this is undoubtedly due to the paucity of three-dimensional structures of possible targets available. However, structure determination methods, especially via NMR, have advanced to the state that structures of potential DNA or RNA targets are increasingly available. Consequently, we can now entertain the concept of designing agents to bind to gene targets based on the detailed three-dimensional structure of the target. We have developed a strategy to discover ligands for RNA targets based on three-dimensional RNA-structure-based computational screening of 10^5 - 10^6 available compounds for binding, followed by experimental assays and NMR studies of complexes [1-3]. For example, we have now identified novel compounds that, at 100 nM concentration, inhibit binding of the Tat protein to TAR RNA. Indeed, some of these compounds inhibit Tat transactivation in cells. NMR experiments with the target RNA in the presence of promising ligands reveal binding to the target region of the RNA rather than to regions of the RNA not targeted. The structure of a complex formed by one tightly binding compound with its target TAR RNA has recently been determined by NMR [4].

We have also developed a method for low-throughput screening of focused libraries in the drug discovery and optimization process that target RNA that not only monitors binding affinity, but also identifies the binding site. This complements the computational screening, since experimental assessment of binding must eventually be carried out. By using virtual screening, we can reduce the time and cost of finding lead compounds to test. Hundreds of derivatives of the most promising lead compounds can be made and screened in optimizing leads.

1. Identification of Ligands for RNA Targets via Structure-Based Virtual Screening: HIV-1 TAR. A.V. Filikov, V. Mohan, T.A. Vickers, R.H. Griffey, P.D. Cook, R.A. Abagyan and T.L. James. *J. Comp.-Aided Molecular Design* **14**, 593-610 (2000).
2. Three-Dimensional RNA Structure-Based Drug Discovery. T.L. James, K.E. Lind, A.V. Filikov, and A. Mujeeb. In *Structure, Motion, Interaction and Expression of Biological Macromolecules*. Proc. Eleventh Conversation in Biomolecular Structure & Dynamics. Edited by R.H. Sarma and M.H. Sarma. New York: Adenine Press, **11**,201-205 (2000).
3. Structure-Based Computational Database Screening, In vitro Assay, and NMR Assessment of Compounds that Target TAR RNA. K.E. Lind, Z. Du, K. Fujinaga, B.M. Peterlin and T.L. James. *Chemistry & Biology* **9**, 185-193 (2002).
4. Structure of TAR RNA Complexed with a Nanomolar Inhibitor of the Tat-TAR Interaction Identified by Computational Screening. Z. Du, K.E. Lind, and T.L. James, *Chemistry & Biology* **9**, 707-12 (2002).

2 SL4

Biological NMR studies of membrane and protein recognition in endocytosis and signal transduction

Michael Overduin

University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado, USA

Little is known about the physical and chemical properties of proteins that insert into membranes. Roughly a quarter of all proteins are transmembrane, and structures of several have been unraveled in recent times. It is now the peripheral membrane proteins that remain an uncharted piece of the post-genomic pie. These multifaceted proteins are capable of folding in solution, flitting with membrane surfaces, and digging deep into bilayers. NMR is used to characterize the mechanisms of membrane recognition by signalling domains including the DIX, FYVE, and PX domains. The DIX domain is a eukaryotic signaling module that consists of 85 residues and has no known structure or function. We have used NMR to show that the DIX domain targets Wnt signalling proteins to actin stress fibers and cytoplasmic vesicles *in vitro* and *in vivo*. Proximal sites of actin and phospholipid interaction are identified in the helical DIX domain by NMR titration experiments. Based on the NMR data, mutations are designed that redirect Dishevelled's subcellular localization, and perturb Wnt signaling and axis induction.

The FYVE domain specifically binds membranes that contain phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P). The solution structures of the PI3P-bound and free domains have been characterized, and a hydrophobic loop that inserts into the bilayer has been identified by NMR. Novel spin-label probes are attached to PI3P and buried in the micelle, illuminating a swath of FYVE residues that contact lipid. Protein docking to either PI3P or micelle alone involves affinities of 135 μM or 1.1 mM , respectively. Dual ligation of PI3P and micelle benefits from a cooperativity factor of five, ensuring stable and specific membrane insertion. These NMR studies reveal the depth, angle and affinities of multi-step micelle penetration by this peripheral membrane module.

2 SL5 Structure analysis of antimicrobial and fusogenic peptides in membranes by solid state ^{19}F -NMR

*Sergii Afonin, Ralf Glaser, Ulrich Dürr, Parvesh Wadhvani,
Marina Berdichevskaia, and Anne S. Ulrich**

University of Jena, Institute of Molecular Biology, 07745 Jena, Germany,
e-mail: ulrich@molebio.uni-jena.de

^{19}F -labelling of peptides for solid state NMR

Fluorine labeling of membrane-associated peptides provides a highly sensitive approach to characterize their interactions with lipid bilayers by ^{19}F -NMR. The side chain of the non-natural amino acid 4-fluoro-phenylglycine (4F-Phg) has the advantage of being rigidly attached to the peptide backbone. This stiff connection of the L-4F-Phg side chain makes it ideal for distance measurements, and the broad anisotropic chemical shift tensor can be used as a probe for peptide orientation and dynamics, both in solution and solid state NMR experiments. We have studied various analogues of the fusogenic peptide "B18", the antimicrobial cyclic β -sheet peptide "gramicidin S", and the α -helical antimicrobial peptide "PGLa". By solid phase synthesis, in each labeled peptide analogue one or two hydrophobic amino acids were replaced by 4F-Phg. 4F-Phg is prone to racemization at the alpha carbon, thus giving a mixture of peptides containing both D-4F-Phg and L-4F-Phg. Chromatographic separation of these peptides was achieved by HPLC using TFA-free solvents. We carried out various functional assays: to test the fusogenic and antimicrobial activities. For B18 fusion activity was tested in a fluorescence dequenching assay, which quantifies the peptide-induced fusion of large unilamellar lipid vesicles. Antimicrobial tests on the gramicidin S and PGLa analogues included minimum inhibitory concentration (MIC) and agar diffusion test. Our results indicate that the incorporation of L-4F-Phg does not significantly affect the functional activity of the peptides, whereas D-4F-Phg tends to be conformationally obstructive.

Structure analysis of a fusogenic peptide

Biomembrane fusion is an essential step in numerous intra- and intercellular processes, involving the interaction of a fusion protein with lipid bilayers. A short amphiphilic motif of the fusor protein - the "fusogenic peptide" - is believed to play a key role in triggering the fusion event. The alignment and structure of such fusogenic peptide in the membrane-bound state is difficult to access experimentally. An oblique insertion of a continuous α -helical conformation has been proposed based on indirect evidence and theoretical calculations. Here, we have used solid state ^{19}F -NMR on uniaxially oriented samples, to determine the alignment, structure and dynamics of "B18", a fusogenic peptide from the sea urchin fertilization protein "Bindin". From ^1H -NMR in detergent micelles or 30% TFE we know that the peptide tends to assume an α -helical conformation, consisting of two terminal helices bridged by a non-structured hinge. For solid state ^{19}F -NMR analysis we synthesized 11 peptide analogues carrying single or double 4F-Phenylglycine labels in place of other hydrophobic amino acids. The orientations of

consecutive ^{19}F -CSA tensors in different parts of the B18 molecule were used to determine the alignment of the two α -helical segments with respect to the membrane normal. Three parameters (the helix tilt angle τ the azimuthal rotation angle ρ , and the order parameter S_{mol}) were systematically varied to calculate the expected chemical shifts, and the χ^2 -deviation between the simulated and experimental spectra was minimized. We have examined the length (number of amino acids) and the secondary structure (probing different idealized conformations) for each of the helices independently. The resulting model structure is consistent with the ^1H -NMR and CD data, and it shows that the amphiphilic peptide is inserted like a "boomerang" into the lipid bilayer. We expect that this helix-loop-helix model for B18 represents a general insertion mode for fusogenic peptides in flat lipid bilayers.

Lipid-peptide interactions of an antimicrobial peptide

Antimicrobial peptides are used by many organisms as a first-line defence, as they can selectively permeabilize the membranes of invading bacteria. Their selectivity against different types of cells is attributed to the distinctly different lipid compositions of bacterial and eucaryotic membranes. To elucidate the mechanism of action, it is important to find out how an amphiphilic peptide is aligned in these different kinds of membranes, and what oligomeric state it assumes. We used solid state ^{19}F -NMR to study the orientation and mobility of the cyclic decapeptide gramicidin S (GS), which possesses a well-defined symmetric β -sheet conformation.

To monitor the behaviour of GS in a lipid bilayer, ^{19}F labels were selectively introduced by substituting one symmetry-related pair of aliphatic amino acids by 4F-Phg. CPMG measurements of the homonuclear dipolar coupling revealed the distance between two such ^{19}F spins, thereby verifying the molecular structure of GS in the membrane-bound state. By analyzing the orientation-dependent ^{19}F -NMR lineshapes, we obtained partial orientational constraints for each labeled position. Depending on the lipid composition and the experimental conditions, the chemical shifts were found to interconvert between two distinct populations representing different peptide alignments and oligomeric states. Analysis of the orientation-dependent spectral lineshapes yielded a peripheral mode of binding for the cyclic β -sheet at low peptide concentration. Upon increasing peptide-to-lipid ratio, gramicidin S was found to switch into an upright alignment. The occurrence of this putative oligomeric assembly varies with temperature, pH, and membrane hydration level. It was particularly affected by the lipid composition of the model membrane, namely acyl chain length, cholesterol content and headgroup type. The observed re-alignment between two different states could provide a structural basis for the different GS activities, namely the desired bactericidal action and the unwanted hemolytic and cytotoxic side effects.

Chemical shift referencing in macroscopically oriented samples

In our NMR studies with macroscopically oriented membranes samples, we realized the need to exact chemical shift referencing. This is necessary to distinguish subtle structural rearrangements of the peptides from the bulk magnetic susceptibility effects of the non-spherical sample. The susceptibility difference between sample and environment and between different

parts of the sample is not only a major source of line broadening, but it also shifts the frequency of the NMR signal. The shift is in the order of several ppm, which is greater than the intrinsic accuracy and reproducibility of sensitive ^{19}F solid state measurements in macroscopically oriented samples. Two referencing schemes are proposed to compensate for these differences in macroscopically aligned membrane samples on glass plates: A reference sample with a thin liquid film containing the reference molecule is stacked as a surface layer on top of the oriented test sample, with the film parallel to the membrane layers. Alternatively, the intrinsic proton signal of the hydrated membrane sample can be used for chemical shift referencing.

We measured the orientation-dependent anisotropic chemical shift of a ^{19}F -labeled analogue of the antimicrobial peptide PGLa in phospholipid membranes. Layers of hydrated lipid containing the peptide in molar ratios between 1:10 and 1:3000 are macroscopically oriented between glass plates. An approximately constant amount of peptide in the sample leads to thin samples at high, and thick samples at low peptide/lipid ratio. The accurate referencing procedure is indispensable to distinguish between undesired frequency shifts resulting from geometry-dependent changes in the magnetic field, and those small but significant changes in the ^{19}F anisotropic chemical shift at different peptide/lipid ratios, which reflect the orientation and/or dynamics of the peptide.

Further strategies of ^{19}F -labelling with CF_3 -groups

To enlarge the set of viable fluorine labels beyond the above mentioned applications of 4F-Phg and to circumvent the difficulties with linebroadening in macroscopically oriented samples, we have incorporated CF_3 -alanine and CF_3 -phenylglycine into several membrane-active peptides. We hope to further increase sensitivity by using these labels, and to analyze the anisotropy of the intragroup dipolar coupling by CPMG, which refocusses B_0 inhomogeneities. The rotational motion of the CF_3 -group makes the effective CSA tensor axially symmetric, which further simplifies the geometric analysis. On the other hand, the NMR-properties of the CF_3 -group pose increased demands on spectral data evaluation, since the ^{19}F nuclei experience broad anisotropic chemical shielding as well as strong dipolar couplings on the same order of magnitude of ca. 10kHz. Therefore, the spectral lineshapes show a complex convolution of both interactions, prohibiting a direct extraction of the relevant parameters from the spectra. It is not possible to refocus both interactions perfectly by one of the conventional echo experiments: The Hahn-echo sequence (90° - 180°) will not refocus the dipolar interaction, while a quadrupolar echo sequence (90° - 90°) will give imperfect refocussing of the CSA.

To address this situation in a heuristical fashion, we have generated SIMPSON-simulations of the echo sequences described above. The behaviour of pure dipolar 3-spin powder patterns as well as pure CSA-spectra were simulated under the appropriate, as well as under the 'wrong' echo sequences, varying the echo delay times, the transmitter offset, and pulse imperfections. Comparison of the resulting spectra gives insight into the spectral distortions that are to be expected, and which have been observed experimentally. In a further step, we fitted model spectra containing both dipolar and CSA interactions to the experimental lineshapes obtained on CF_3 -labelled crystalline amino acids. It turns out that not only the imperfect refocussing in the echo sequences, but also pulse imperfections and transmitter position have a striking impact on their appearance. Considering all these influences, it is possible to extract the fundamental CSA and dipolar parameters from the distorted spectra, which can now be used in the analysis of CF_3 -labelled peptides in a membrane environment.

Hans Wolfgang Spiess

Max-Planck-Institut für Polymerforschung, P O. Box 3148, 55021 Mainz, Germany

Introduction

In advanced synthetic as well as in biological systems self-assembly of carefully chosen building blocks is of central importance. Their organization is crucial for their ability to perform certain physical/chemical functions such as selective adsorption of material, molecular recognition, acting as mechanical nano devices etc. Such systems are, therefore, central in the development of nanotechnology. Key features of supramolecular chemistry exploited here are, e.g., hydrogen bonding and aromatic π - π interactions, Fig. 1. Despite being highly ordered on a local scale, the systems generated often do not crystallize. Therefore, their structures cannot be determined by conventional X-ray crystallography or neutron scattering. Alternatives are needed which should provide structural and dynamic information, preferably requiring only small amounts of as-synthesized samples. High resolution solid state $^1\text{H-NMR}$ can meet these requirements¹, provided that sufficiently selective information can be extracted from the corresponding spectra.

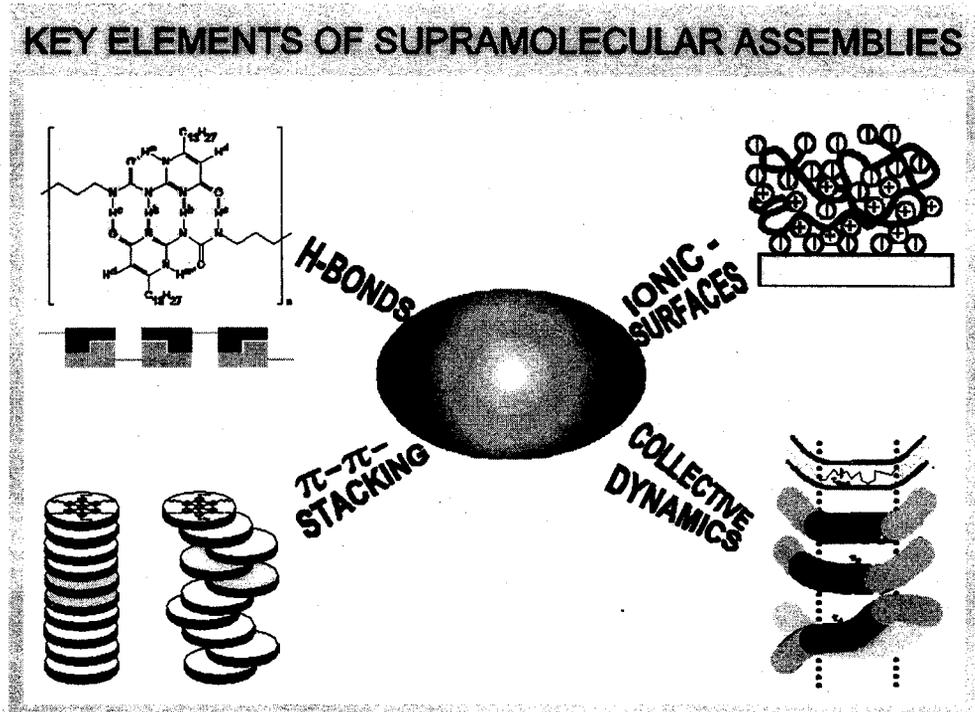


Fig. 1 Key elements of supramolecular assemblies known from biological systems

Over the last years we have systematically pursued the development of solid state ^1H NMR for that purpose by combining fast Magic Angle Spinning (MAS) and Double-Quantum (DQ) NMR spectroscopy, which makes use of the homonuclear dipole-dipole coupling between protons. The new approach is presented in detail in a recent review². The spectral resolution can be increased by use of similar methods exploiting heteronuclear ^1H - ^{13}C dipole-dipole couplings³ and the sensitivity boosted by inverse detection⁴. These techniques have provided new insight in

- hydrogen bonded structures in the solid state⁵ and their relation to proton conductivity⁶
- columnar stacking of discotics⁷ and their relation to photoconductivity⁸
- chain order and translational motion in polymer melts⁹
- chain organization on surfaces¹⁰.

The techniques will be introduced and illustrated in a number of recent examples, see also our recent review¹¹.

References

- 1 Mehring, M. *Principles of High Resolution NMR in Solids*, Springer: Berlin, 1983.
- 2 Schnell, I.; Spiess, H.W. *J. Magn. Reson.* **2001**, *151*, 153
- 3 Saalwächter, K., Spiess, H.W. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 5707.
- 4 Schnell, I.; Langer, B. Söntjens, S.H.M., van Genderen, M.H.P., Sijbesma, R.P., Spiess, H.W. *J. Magn. Reson.* **2001**, *150*, 57
- 5 Schnell, I.; Brown, S.P., Low, H.Y., Ishida, H.; Spiess, H.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11784.
- 6 Goward, G. G., Schuster, M.F. H., Sebastiani, D., Schnell, I., Spiess, H.W. *J. Phys. Chem. B* **2002**, in press.
- 7 Brown, S.P., Schnell, I., Brand, J.D., Müllen, K., Spiess, H.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6712.
- 8 Fischbach, I., Pakula, T., Minkin, P.Fechtenkötter, A., Müllen, K., Spiess, H. W., Saalwächter, K. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 6408
- 9 Dollase, T., Graf, R., Heuer, A., Spiess, H.W. *Macromolecules* **2001**, *34*, 298
- 10 Rodriguez, L.N.J., De Paul, S., Barrett, C.J., Reven, L.; Spiess, H.W. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1934.
- 11 Brown, S.P., Spiess, H.W. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 4125

第三日

11月8日(金)

一般講演要旨

Relativistic effects on nuclear magnetic shieldings

(Kitami Institute of Technology) H. Fukui, T. Baba, and Y. Shiraishi

The fully relativistic treatments,^{1,2} which are based on the four-component spinor form of the one-electron wave functions, appears to be still very costly, primarily due to the cost for a proper description of the small two-component spinor. In most relativistic quantum chemistry problems, however, the explicit consideration of the negative energy states or the electron-positron pair creation processes is unnecessary. Namely, the four-component Dirac equation³ includes too much and unnecessary information for the majority of problems encountered in relativistic quantum chemistry. This makes the investigation and development of the two-component methods particularly important and attractive. Many methods have been proposed to reduce the four-component Dirac formalism to computationally much simpler two-component schemes. There are two successful groups of approximate two-component methods available. The first group is the so-called Douglas-Kroll-Hess (DKH) approach.⁴⁻⁷ The other group of two-component methods is called the regular Hamiltonian approximation.⁸⁻¹²

One of the powerful approaches to decouple the positive energy states (electronic states) and the negative energy states (positronic states) is the Foldy-Wouthuysen (FW) unitary transformation method.^{13,14} That is,

$$H^{FW} = U^\dagger H U = \begin{bmatrix} h_+ & 0 \\ 0 & h_- \end{bmatrix}. \quad (1)$$

However, except for a free particle, the exactly decoupled Hamiltonian H^{FW} is not known in closed form. Unfortunately, if one replace H^{FW} by a truncated expansion in c^{-1} (c is the velocity of light), the electronic Hamiltonian h_+ is not bounded from below and variationally unstable.¹⁴ The exact and closed form expressions of the h_+ Hamiltonian have not appeared so far for 50 years. Recently, however, a breakthrough for this problem has

相対論的効果、化学シフト

ふくいひろゆき、ばばたけひさ、しらいしやすこ

been made by Barysz and Sadlej.¹⁵ They showed that a numerical but exact Hamiltonian matrix of h_+ can be obtained by the matrix multiplication technique.

In the present paper, we extend the method of Barysz and Sadlej to include a vector potential, and compute the nuclear magnetic shielding tensors of hydrogen halides.

References

- 1 I. P. Grant and H. M. Quiney, *Adv. At. Mol. Phys.* **23**, 37 (1988).
- 2 H. M. Quiney, H. Skaane, and I. P. Grant, *Adv. Quantum Chem.* **32**, 1 (1999).
- 3 L. I. Schiff, in *Quantum Mechanics*, 3rd ed. (McGraw-Hill, New York, 1968).
- 4 M. Douglas and N. M. Kroll, *Ann. Phys. (N. Y.)* **82**, 89 (1974).
- 5 B. A. Hess, *Phys. Rev. A* **32**, 756 (1985).
- 6 B. A. Hess, *Phys. Rev. A* **33**, 3742 (1986).
- 7 T. Nakajima and K. Hirao, *J. Chem. Phys.* **113**, 7786 (2000).
- 8 E. van Lenthe, E. J. Baerends, and J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **99**, 4597 (1993).
- 9 E. van Lenthe, E. J. Baerends, and J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **101**, 9783 (1994).
- 10 E. van Lenthe, R. van Leeuwen, E. J. Baerends, and J. G. Snijders, *Int. J. Quantum Chem.* **57**, 281 (1996).
- 11 K. G. Dyall and E. van Lenthe, *J. Chem. Phys.* **111**, 1366 (1999).
- 12 S. Faas, J. H. van Lenthe, A. C. Henny, and J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **113**, 4052 (2000).
- 13 L. L. Foldy and S. A. Wouthuysen, *Phys. Rev.* **78**, 29 (1950).
- 14 W. Kutzelnigg, *Chem. Phys.* **225**, 203 (1997).
- 15 M. Barysz and A. J. Sadlej, *J. Chem. Phys.* **116**, 2696 (2002).

Effect of Chemical Exchange to Relaxation Times and Diffusion Coefficient by Spin Echo Experiment

Shingo Matsukawa and Tokuko Watanabe
Department of Food Sciences and Technology, Tokyo University of Fisheries

The effect of chemical exchange on NMR relaxation times measured by Carr-Purcell-Maiboom-Gill method is calculated. The echo decay is expressed by the sum of exponential functions of complex variables and the imaginary part of the echo becomes large when the pulse separation time becomes larger than the inverse of frequency difference. The effect of exchange between states with different mobility on diffusion coefficients measured by Pulsed-Field Gradient Spin Echo method is also calculated and the echo intensity is expressed by the sum of exponential functions of the separation time of two gradient pulses, i.e. diffusion time.

1. 緒言

化学交換のある系において観測される緩和時間や拡散係数 (D) は化学交換の無い場合の値から大きく変化する。本研究では、Carr-Purcell-Maiboom-Gill (CPMG) 法及び Pulsed-Field Gradient Spin Echo (PGSE) 法によって観測される見かけの T₂ 及び D を計算する。

2. 化学交換の緩和時間測定への影響

AとBの間に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)、緩和速度(R_A, R_B)、交換速度(k_A, k_B)を用いて(1)式となり、これより(2)式が得られる。

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} M_A \\ M_B \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -R_A + i\omega_A - k_A & k_B \\ k_A & -R_B + i\omega_B - k_B \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} M_A \\ M_B \end{bmatrix} \dots(1)$$

$$e^{-\lambda t} = \begin{bmatrix} \exp\left(-\frac{1}{2}(R_A + R_B + k_A + k_B) - \frac{1}{2}q\right) & 0 \\ 0 & \exp\left(-\frac{1}{2}(R_A + R_B + k_A + k_B) + \frac{1}{2}q\right) \end{bmatrix}$$

$$U = U^{-1} = \left\{ (q + \Delta)^2 + 4R_A R_B \right\}^{-\frac{1}{2}} \begin{bmatrix} -(q + \Delta) & 2k_B \\ 2k_A & (q + \Delta) \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} M_{A,t} \\ M_{B,t} \end{bmatrix} = U e^{-\lambda t} U \begin{bmatrix} M_{A,0} \\ M_{B,0} \end{bmatrix} \dots\dots(2)$$

$$q = \left\{ \Delta^2 + 4R_A R_B \right\}^{\frac{1}{2}}, \Delta = -R_A - R_B - i(\omega_A - \omega_B) + k_A - k_B$$

CPMG法においては、間隔2 t_{cp}毎のπパルスによる位相の反転を考慮すると4nt_{cp}における(M_A, M_B)は(3)式となる。

$$\begin{bmatrix} M_{A,4nr} \\ M_{B,4nr} \end{bmatrix} = (E^2)^n \begin{bmatrix} M_{A,0} \\ M_{B,0} \end{bmatrix} \dots\dots(3), \text{ここで、} E^2 = (U e^{-\lambda 2t_{cp}} U^{-1})(U e^{-2\lambda t_{cp}} U^{-1})^* (U e^{-\lambda 2t_{cp}} U^{-1})$$

ここで、E² = $\begin{bmatrix} a & b \\ c & d \end{bmatrix}$ とするとエコー信号強度 M_{A+B,t} は(4)式となる。

$$M_{A+B,t} = f_1 \exp\left(-\frac{\ln \lambda_{11}}{4\tau} t\right) + f_2 \exp\left(-\frac{\ln \lambda_{22}}{4\tau} t\right) \dots\dots(4)$$

$$f_{1,2} = \frac{1}{2} \left[\frac{\pm 1}{\sqrt{1 - (a-d+2c)+1}} \right] m_1 + \frac{1}{2} \left[\frac{1 \mp 1}{\sqrt{1 - (a+d-2b)+1}} \right] m_2, \lambda_{11,22} = \frac{1}{2} (a + d \pm \sqrt{\dots})$$

ここで、√ = $\sqrt{(a-d)^2 + 4bc}$ 、m₁, m₂ は t=0 での磁化強度。

すなわち、エコー信号強度は複素指数関数の和として表され、実部についてみる

緩和時間 拡散係数 化学交換 磁場勾配 スピンエコー
まつかわしんご、わたなべとくこ

と振動しながら減衰する2つの指数関数の和である。この指数部分の係数が見掛けの観測緩和速度 ($1/T_{2,1}$, $1/T_{2,2}$) となる。(4)式によって見かけの成分比と T_2 の t_{cp} 依存性を計算したところ、 t_{cp} が小さい領域では f_1 , f_2 の虚部 f_{1I} , f_{2I} は小さく、この時、 $1/k_A$, $1/k_B > T_{2,A}$, $T_{2,B}$ の時には $f_{1R} \sim f_A$, $f_{2R} \sim f_B$ であり、 $1/k_A$, $1/k_B < T_{2,A}$, $T_{2,B}$ の時には $f_{1R} \equiv 1$, $f_{2R} \equiv 0$ であった。Fig.1 には $k_B/k_A=10$, $T_{2,A}$ 及び $T_{2,B}$ がそれぞれ 1 及び 0.1 s での結果を示した。 t_{cp} が大きくなると f_{1I} , f_{2I} が現れ、 $T_{2,1}$ が大きく変化する。 $\log(t_{cp})$ に対する $T_{2,1}$ の変化の変曲点における t_{cp} , $T_{2,1}$, $dT_{2,1}/d\log(t_{cp})$ を $1/k_A$ に対してプロットした (Fig. 2)。 $k_A, k_B > \omega_A - \omega_B$ の時には、 $t_{cp} \sim 2/(k_A + k_B)$ が変曲点となり、 $k_A, k_B < \omega_A - \omega_B$ の時には $t_{cp} \sim \omega_A - \omega_B$ が変曲点となる。

3. 状態間交換の拡散係数測定への影響
観測核が状態 A と B の間 ($\omega_A = \omega_B$) を交換している場合、PGSE法において $\pi/2$ パルスから磁場勾配パルスまでの間(期間 1)を t_1 、2つの磁場勾配パルスの間(期間 2)を t_2 、第2の磁場勾配パルスからエコーまでの時間(期間 3)を t_3 とすると、エコー時間 t での磁化ベクトルの大きさは、(1)式及び(2)式の結果を用いて(5)式となる。

$$\begin{bmatrix} M_{A,t} \\ M_{B,t} \end{bmatrix} = U_3 e^{-\Lambda_3 t} U_3 U_2 e^{-\Lambda_2 t} U_2 U_1 e^{-\Lambda_1 t} U_1 \begin{bmatrix} M_{A,0} \\ M_{B,0} \end{bmatrix} \quad \dots\dots(5)$$

期間1と3では $R_{A/B} = 1/T_{2,A/B}$ 、期間2では $R_{A/B} = 1/T_{2,A/B} + \gamma^2 g^2 \delta^2 D_{A/B}$ である。また、 $\omega_A - \omega_B = 0$ なので虚数部を含まない。(5)式を用いて磁場勾配による減衰を計算し、整理すると(6)式となる。

$$\begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} M_{A,t} \\ M_{B,t} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} M_{A,0} \\ M_{B,0} \end{bmatrix} = f_1 e^{-\Lambda_{2,11} t} + f_2 e^{-\Lambda_{2,22} t} \dots(6)$$

f_1, f_2 は見かけの成分比であるが $T_{2,A/B}$, $k_{A/B}$, g, δ, t_1, t_3 を変数として含む。 $\Lambda_{2,11}$ と $\Lambda_{2,22}$ は(2)式中の Λ_2 の対角成分であるが、 $T_{2,A/B}$, $k_{A/B}$, g, δ を変数として含む。したがって、(6)式は t_2 を変数とする指数関数の和となっている。(6)式を用いて種々の条件下でのエコー強度の減衰を計算した。

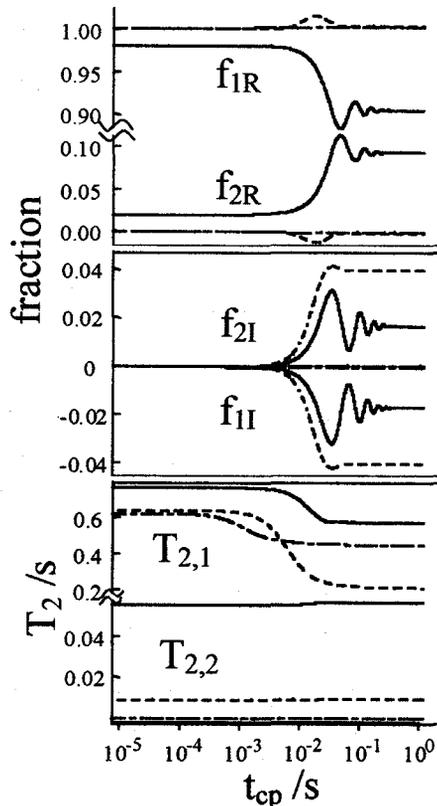


Fig.1 The t_{cp} dependence of apparent fractions and T_2 for $k_A/s^{-1} = 1$ (solid line), 10 (dashed line) and 100 (dash-dotted line). $T_{2,A} = 1$ s, $T_{2,B} = 0.1$ s, $\omega_A - \omega_B = 16$ Hz and $k_B/k_A = 10$.

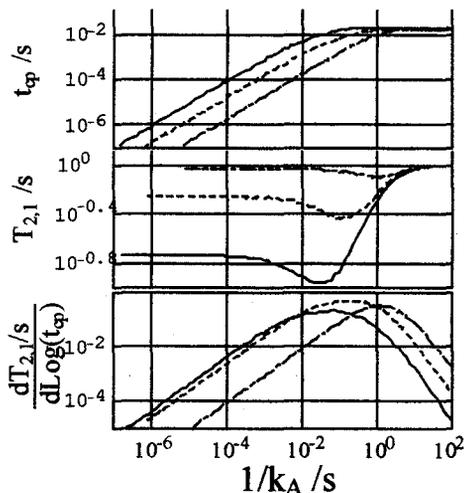


Fig.2 The k_A dependence of parameters at the inflection point of the t_{cp} dependence curve for $T_{2,1}$. $k_B/k_A = 1$ (solid line), 10 (dashed line) and 100 (dash-dotted line). $T_{2,A} = 1$ s, $T_{2,B} = 0.1$ s and $\omega_A - \omega_B = 16$ Hz.

京大化研¹・Iowa State University²
 ○梶 弘典¹・堀井文敬¹・Klaus Schmidt-Rohr²

Analyses of Local Structures in Glassy Polymers by Multiple-Quantum NMR Methods

Hironori Kaji¹, Fumitaka Horii¹, and Klaus Schmidt-Rohr²

¹Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, JAPAN and

²Dept. of Chemistry, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA

We present a new method for identifying and quantifying conformations of ¹³C-labeled materials in NMR spectra under MAS, termed zero-quantum chemical-shift-anisotropy dephasing (ZQ-CSA-dephasing) method. The observed magnetization is dephased by the difference of the recoupled CSA, reflecting relative orientation, of two relevant sites. This permits the determination of the ratio of different conformers and torsion angles of respective conformers. The experiment also yields selective MAS spectra in different conformations, which is useful for conformational assignments. We apply this technique to doubly ¹³CH₂-labeled poly(ethylene terephthalate) (PET). This experiment enables selective observation of the amorphous trans component, which cannot be detected by CP/MAS experiments. The ratio of amorphous trans : gauche is 12 : 88 in amorphous PET and the torsion angle of amorphous trans is found to be distributed with a standard deviation σ of 16° centered at 180°. In semicrystalline PET, the ratio of crystalline trans : amorphous trans : gauche is determined to be 23 : 20 : 57. The amorphous trans fraction in the amorphous regions of semicrystalline PET, 26 %, is significantly higher than that of amorphous PET, 12 %. The two-dimensional double quantum experiment is also carried out to reveal local π -stacking in the amorphous PET.

1. 緒言

材料の局所構造、特に、コンホメーションや分子間パッキングは、その機能発現と密接に関連していると考えられ、その解明は重要である。しかし、非晶性材料の場合、有用な解析手法がないため、その局所構造はいまだ明確にはなっていない。我々は最近、非晶性高分子の局所構造を詳細に解明することを目的として、化学シフト異方性(CSA)を利用したゼロ量子 dephasing (ZQ-CSA-dephasing) NMR 法を開発した¹。この方法では、結晶性・非晶性を問わず固体材料中の特定部位に対する各コンホメーション(あるいは配向)の存在比およびそれらのねじれ角(あるいは相対配向の角度)を定量的に決定することができる。本研究では、ポリエチレンテレフタレート(PET)の ¹³CH₂-¹³CH₂ 部分の trans/gauche 比およびそれらのねじれ角を、ZQ-CSA-dephasing 法により決定した結果について報告する¹。この手法により、非晶状態においてもコンホメーションの定量化ができたことに加え、これまで観測することができなかった非晶中における trans 成分(amorphous trans)を選択的に観測することができた。この ZQ-CSA-dephasing 法は、MAS 下で測定を行うため、CP/MAS スペクトルにおけるコンホメーションの帰属にも用いることができる。

キーワード: 多量子遷移、コンホメーション、パッキング、ポリエチレンテレフタレート、アモルファストランス

かじ ひろのり、ほりい ふみたか、くろうす しゅみつとろー

また、我々は、以前 C=O 炭素を ^{13}C ラベルした PET を用いて、その分子間パッキングをスピン拡散を利用した二次元 CSA 交換測定により解析した²。しかし、 $^{13}\text{C}=\text{O}$ 炭素の CSA では σ_{22} 、 σ_{33} の分解能が良くないことに加え、このスピン拡散を利用した測定では、対角線上に自分自身のシグナルによる artifact を与えるため、詳細な解析が困難であった。本研究では、PET の分子間パッキング (π -stacking) を、artifact-free な二次元二量子遷移 (2D DOQSY) 固体 NMR 法³により調べた。

2. 実験

ZQ-CSA-dephasing 測定は Bruker DSX-400 分光計により行った。MAS 回転速度は 12 kHz である。試料には $^{13}\text{CH}_2$ 炭素をダブルラベルした試料 ($^{13}\text{CH}_2$ -PET) を用いた。熔融状態から 0°C に急冷した後、減圧乾燥することによりガラス状試料を得た ($^{13}\text{CH}_2$ -aPET)。また、結晶化試料 (結晶化度 $26 \pm 5\%$; $^{13}\text{CH}_2$ -cPET) の測定も行った。

2D DOQSY 測定は Chemagnetics CMX-400 分光計により、静止状態で行った。試料にはフェニレン環の四級炭素をシングルラベルした試料 (^{13}CQ -PET) を用いた。熔融状態から 0°C に急冷した後、減圧乾燥することによりガラス状試料を得た (^{13}CQ -aPET)。また、結晶化試料 (結晶化度約 50%; ^{13}CQ -cPET) の測定も行った。

測定は、すべて室温で行った。また、測定に用いたパルスを図 1 に示してある。

3. 結果と考察

3.1. ZQ-CSA-dephasing 法によるコンホメーション解析

図 2 に $^{13}\text{CH}_2$ -aPET の実測スペクトルを示す。上段がリファレンス、下段が ZQ-CSA-dephased スペクトルである。下段のスペクトルにおいて、図 1(a) に示した ZQ-evolution により gauche 成分が選択的に dephase していることがわかる。特に、 $n=2$ においては高磁場 (62 ppm) の共鳴線は、正のシグナルであるのに対し、低磁場 (64 ppm) の共鳴線は、負のシ

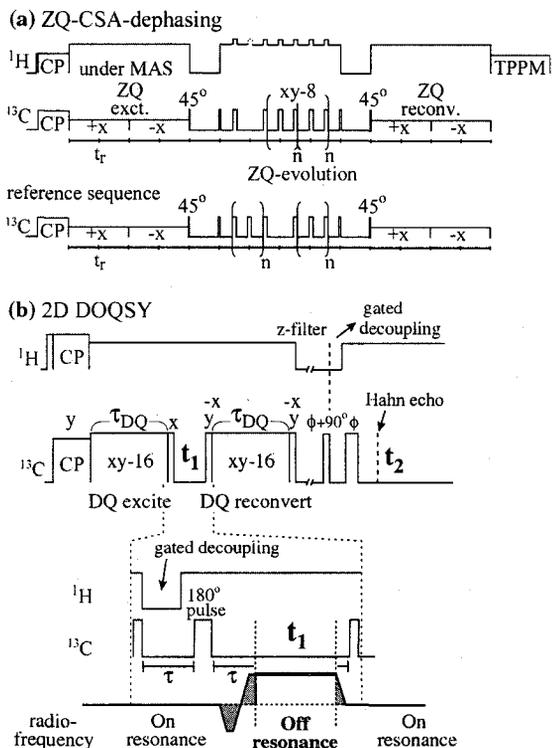


Fig. 1. (a) ZQ-CSA-dephasing pulse sequence. The reference pulse sequences, with the same total duration and number of pulses, are also shown. (b) 2D DOQSY pulse sequence.

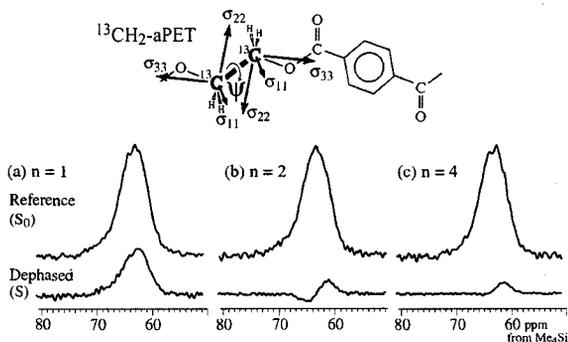


Fig. 2. ZQ-CSA-dephased spectra of amorphous doubly $^{13}\text{CH}_2$ -labeled PET ($^{13}\text{CH}_2$ -aPET) at (a) $n=1$, (b) $n=2$, and (c) $n=4$. Top: reference spectra. Bottom: ZQ-CSA-dephased spectra.

グナルを示している。このことから、CP/MAS スペクトルおよびリファレンススペクトルでは区別できない幅広い一本の共鳴線の中に、コンホメーションの異なる成分(ここでは、*gauche* と *trans*)が含まれていることがわかる。また、 $n = 4$ では、*gauche* 成分のシグナルが 0 になり、amorphous *trans* 成分を選択的に観測することができた。図 3 には、その decay 曲線を $2nt_r$ の関数として示す。ここで、 t_r は MAS 一回転に要する時間(1/12 ms)であり、 $2nt_r$ は ZQ-evolution 時間である(図 1(a)参照)。図 3(a)に示した曲線は、様々なねじれ角に対するシミュレーション曲線である。ここでは *trans* を $\pm 180^\circ$ と定義してある。このシミュレーション曲線から、PET の $^{13}\text{CH}_2$ - $^{13}\text{CH}_2$ ねじれ角を定量的に決定することが、特に *trans* に近い状態(*transoid*)の解析が精密にできることがわかる。図 3(b)には、 $^{13}\text{CH}_2$ -aPET に対する *gauche* および *trans* の実測データ ($n = 0 - 4$) を示す。これらのデータの最小二乗フィットにより、amorphous *trans* : amorphous *gauche* = 12 : 88 (± 3)、amorphous *trans* のねじれ角が 180° を中心として標準偏差 $\sigma = 16^\circ$ の分布をもっていることが明らかとなった。一方、amorphous *gauche* 成分のねじれ角は、*trans* 成分のように正確には求められないが、2D DOQSY 測定から得られた結果 (70°)^{3b} により矛盾なくフィットできた。

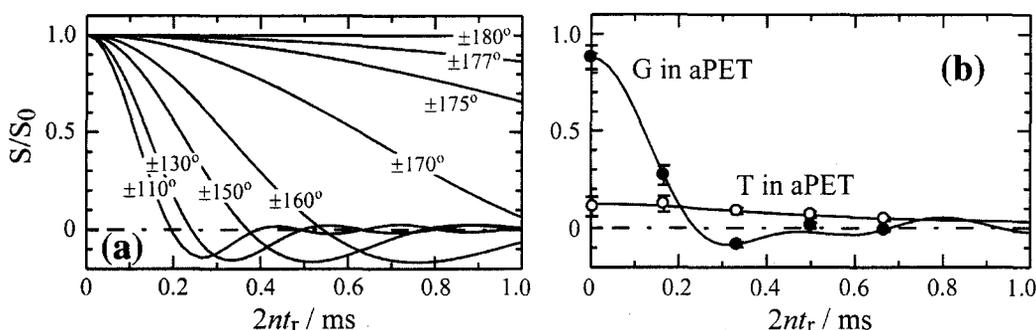


Fig. 3. ZQ-CSA-dephasing curves as a function of $2nt_r$ for amorphous doubly $^{13}\text{CH}_2$ -labeled PET ($^{13}\text{CH}_2$ -aPET). (a) The torsion angle dependence of dephasing curves (simulation). (b) Experimental dephasing curves for $^{13}\text{CH}_2$ -aPET. *Gauche* conformers: filled circles; *trans* conformers: open circles. Best-fit curves are also shown as solid curves.

結晶化試料($^{13}\text{CH}_2$ -cPET)に対しても ZQ-CSA-dephasing 測定を行った。その結果、crystalline *trans* : amorphous *trans* : amorphous *gauche* = 23 : 20 : 57 (± 5)であることが明らかになった。結晶化試料においては、非晶成分中の amorphous *trans* 量は $20 / (20+57) \times 100 = 26\%$ であり、非晶試料中の amorphous *trans* 量(12%)よりはるかに多い。このことから、結晶化に伴い、非晶成分が秩序化していくことが明らかとなった。

3.2. 2D DOQSY 法による π -stacking の解析 図 4 に、 ^{13}CQ -PET の実測およびシミュレーション 2D DOQSY スペクトルを示す。ここでは、shearing をおこなうことにより、二次元 CSA 交換スペクトルと同等の形として示してある。図 4(a)に示した ^{13}CQ -cPET の実測スペクトルにおいては、対角線方向にのみシグナルが現れている(非晶成分のシグナルは、最も低い等高線より下にあり、このスペクトルには現れていない)。したがって、テレフタル残基はすべて同じ方向を向いていることがわかる。一方、図 4(b)に示した ^{13}CQ -aPET の実測 2D DOQSY スペクトルは、そのシグナルが二次元平面に広がっている。図 4(c)には、完全にランダムな分子鎖のパッキングを考えた場合のシミュレーションスペクトルを示す。図 4(b)と(c)は明確に異なり、非晶状態においても、局所的にはその分子間配向相関は完全にランダムではな

いことがわかる。図 4(b)のスペクトルは、図 4(c)と比べ、 $(\sigma_{33}, \sigma_{33})$ 部分の強度が大きい。したがって、テレフタル残基は、face-to-face パッキング、すなわち、 π -stacking 構造が dominant であることがわかる。また、 $(\sigma_{11}, \sigma_{33})$ にシグナルが観測されないことから edge-to-edge パッキングがほとんど存在していないことが明確である。

図 4(g)には、preliminary な best-fit スペクトルを示した。図 4(b)の実測スペクトルの大雑把な特徴をほぼ再現できていることがわかるが、スペクトルの詳細は実測と異なっており、今後、面内の配向相関等を詳細に検討していく必要がある。

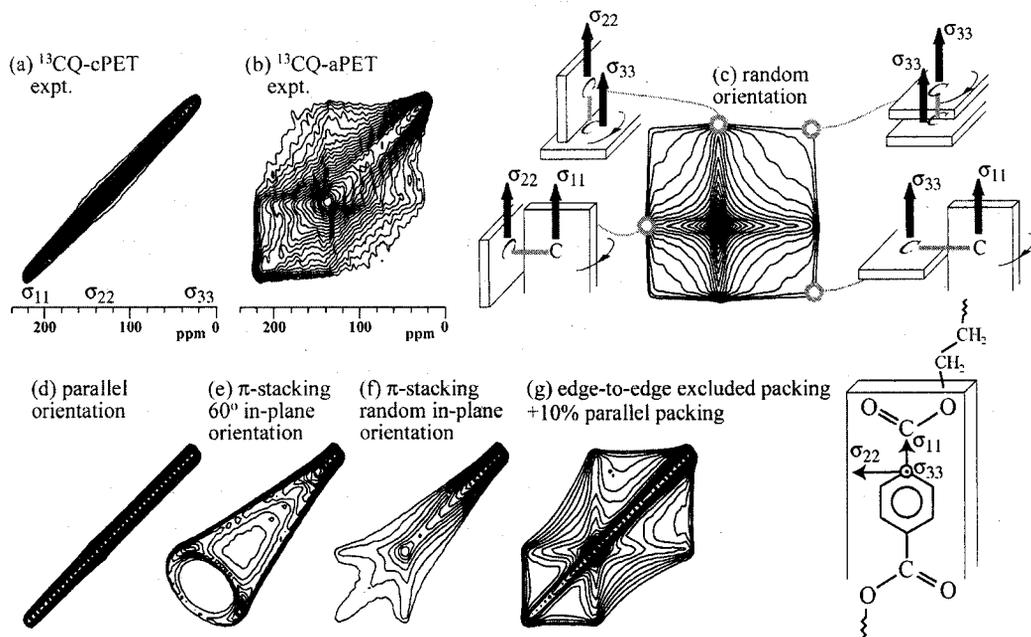


Fig. 4. Experimental sheared 2D DOQSY spectra of (a) crystalline and (b) amorphous ^{13}CQ -PET. Simulated sheared spectra for (c) random orientation, (d) parallel packing, (e) π -stacking with 60° in-plane orientation, and (f) π -stacking with random in-plane orientation are also shown. Preliminary best-fit simulation is shown in (g). 25 contour lines are plotted between 10 and 100 % of the maximum intensity. The signal of amorphous component in ^{13}CQ -cPET in (a) is below the lowest contour line.

4. 文献

- (1) Kaji, H.; Schmidt-Rohr, K. *Macromolecules*, in press.
- (2) Kaji, H.; Horii, F. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 4651.
- (3) (a) Schmidt-Rohr, K. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3975. (b) Schmidt-Rohr, K.; Hu, W.; Zumbulyadis, N. *Science* **1998**, *280*, 714. (c) Kaji, H.; Schmidt-Rohr, K. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5169. (d) Kaji, H.; Schmidt-Rohr, K. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7368. (e) Kaji, H.; Schmidt-Rohr, K. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7382.

3 L4

CODEX 法による Isotactic-Poly(4-Methyl-1-Pentene)

結晶領域の低速ダイナミクス解析

(産総研¹、Martin-Luther-University²) ○三好利一¹、Ovidiu Pascui²、Detlef Reichert²

Slow Dynamics of Isotactic -Poly(4-methyl-1-pentene)

Crystallites Revealed by CODEX NMR Spectroscopy

Research Center of Macromolecular Technology, National Institute of Advanced Technology and

Industrial Science (AIST), Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan¹, and Martin-Luther-University

Halle-Wittenberg, 06108 Halle, Germany²

Toshikazu Miyoshi¹, Ovidiu Pascui², and D. Reichert²

[Abstract] Slow main- and side-chain dynamics of isotactic-poly(4-methyl-1-pentene) (*i*-P4M1P) crystallites are investigated by center-band-only detection exchange (CODEX) NMR spectroscopy. It is found that *i*-P4M1P crystallites perform the large amplitude motions at temperatures close to glass transition temperature. Presence of such motions can reasonably explain thermal properties such as mechanical behavior, large thermal expansion coefficient, and small elastic modulus of *i*-P4M1P crystallites.

Much attention has been paid to the understanding of chain dynamics in the crystalline phase of semi-crystalline polymers, because it plays an important role in the macroscopic properties, such as mechanical creep, drawability and crystallization. Solid-State NMR, in particular the application of advanced 2D exchange NMR spectroscopy provides exact information about the motional process in the crystallites. Such experiments utilize the orientation dependent ¹³C chemical shift anisotropy (CSA), ¹³C-¹³C dipole-dipole, or ²H quadrupolar interaction: molecular reorientations are directly related to changes in the resonance frequencies which can be observed by the 2D exchange methods. Most of these investigations, however, require ¹³C or ²H isotope labeling to overcome low sensitivity and provide spectral resolution. Also, the 2D exchange methods consume long time, and are thus not feasible for the extraction of time kinetic parameters. In addition, if polymer has many functional groups, determination of motional process for all the functional groups requires skill for isotope labeling. The applications of these methods, therefore, were limited only to the crystalline polymers having simple chemical structures. In recent years, several 1D exchange NMR methods have been developed to satisfy above demands. Among them, center-band-only detection exchange (CODEX)¹

Keywords/ CODEX/ solid-state NMR/ Isotactic-poly(4-methyl-1-pentene)/ semicrystalline polymer

発表者 みよし としかず、おびでゆお ばすくい、でとれふ らいへると

NMR is particularly suitable for investigation of molecular motions of polymers with complicated chemical structures (i.e. many different resonances in the NMR spectrum) and carbons with relatively small CSA (i.e. aliphatic groups). CODEX NMR relies on the signal decay due to dephasing of the magnetization, owing to changes in orientation-dependent CSA. The change is due to molecular reorientation of CSA tensor of the carbon under investigation during mixing time t_m . When no molecular motion occurs during t_m , the magnetization evolves after a readout pulse and another $Nt_r/2$ period and is refocused at the beginning of the detection period. In this case, there is no decay in the signal intensity. If, however, molecular motion does occur during t_m , the orientation dependent frequency before and after t_m is different and thus, the magnetization is not completely refocused. The resulting dephasing is observed as the signal-intensity decay. In order to remove the T_1 and T_2 effects during Nt_r , a reference spectrum S_0 is obtained.

Fig 1 shows the CODEX NMR spectra of *i*-P4M1P crystallites at 71 °C.² It is noted that two CH₃ signals show different chemical shifts due to γ gauche effect, though one CH₃ signal overlaps with the side-chain CH signal, indicating that side-chain motion around the side-chain CH₂-CH bond is relatively slow compared to the frequency difference. The exchange spectrum, S, in Fig 1 shows an apparent decay of all the signals compared to those of S_0 , indicating that overall chain dynamics significantly occurs in *i*-P4M1P crystallites within $t_m = 107$ ms. Previous X-ray diffraction results indicate that there is no significant change up to 180 °C except for a small wave-number side shift due to thermal expansion. The possible overall motions, therefore, are suggested to be the large amplitude motions around the chain axes in the crystallites. The presence of such motions can reasonably explain thermal properties, such as mechanical behavior, small elastic modulus, and large thermal expansion coefficient, and previous ¹H NMR results of *i*-P4M1P crystallites.

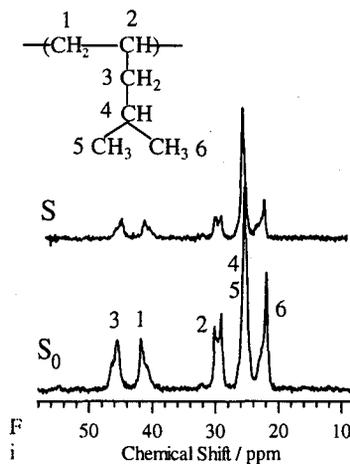


Figure 1. ¹³C CODEX NMR spectra of *i*-P4M1P crystallites, with $t_m = 107$ ms, and MAS frequency of 3 kHz and a recoupling value of $Nt_r = 2$ ms at 71°C.

References

- 1) deAzevedo, R. E.; Hu, W. G.; Bonagamba, J. T.; Schmidt-Rohr, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8411-8412.
- 2) Miyoshi, T.; Pascui, O.; Reichert, D. *Macromolecules* **2002**, *35*, 7178-7181.

3 L5 超偏極 ^{129}Xe -NMR による炭素系材料の細孔解析

(新日本製鐵(株)先端研1)・大阪大学医学部2))

○齋藤公兎¹⁾、田所健一¹⁾、飯島孝¹⁾、木村敦臣²⁾、藤原英明²⁾

The Study of Xe Adsorption Behavior in Meso-size Pores of Carbon Black Materials using Laser-Polarized ^{129}Xe NMR Spectroscopy

1) Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Lab.

2) Faculty of Medicine, Osaka University

○ Koji Saito¹⁾, Ken-ich Tadore¹⁾, Takashi Iijima¹⁾, Atsuomi Kimura²⁾ and Hideaki Fujiwara²⁾

The meso size pores of carbon black materials with Pt are very critical and sensitive to the activity of catalysis which are important factor for the fuel cells of electric vehicles. To decide the physisorption enthalpy as important factor of the activity of catalysis, conventional BET methods which are very time-consuming have been used. In contrast, ^{129}Xe NMR spectroscopy has been adapted to determine the pore size of catalysis, but again it takes long time to determine the physisorption enthalpy because of the low sensitivity. Laser polarized method enhances ^{129}Xe polarization by 4 orders of magnitude, overcoming a low sensitivity, making this measurement technique faster than conventional experiments. In this paper, we are at first demonstrating Laser-Polarized ^{129}Xe NMR Spectroscopy which has been shown to be successful for studying carbon black materials with Pt of the fuel cells of electric vehicles in order to decide the physisorption enthalpy. At the same time, T_1 experiments using Laser-Polarized ^{129}Xe are presented in order to clarify the surface condition and adsorption behavior.

1. はじめに

活性炭に代表される炭素系材料には細孔が多く存在していることは良く知られており、この細孔が工業的利用価値でもある。また燃料電池等に利用されているカーボンブラックもこの細孔が重要な役割を果たしている。そのためにも正確な細孔構造情報は非常に重要であるが、従来の吸着法¹⁾や小角X線散乱法²⁾等の様々なアプローチでも不明点が多い。各手法で多くの情報が得られるが、正確に10 Å以下の細孔サイズを見積れるのは ^{129}Xe -NMR法で、外部からXeガスを導入しそれをプローブにする方法で、Xeが炭素系材料に対して不活性であり、且つゼオライト等の広範なデータが利用できること等で正確な細孔の平均サイズを推定できる。しかし感度が低いために測定時間が掛かり且つその情報量も細孔径のみと限られているので、工業的な応用はあまり行われていない。そこで我々はXeをレーザーで偏極させたスピン偏極Xeが非常に高感度であること³⁾及びその高感度のために緩和時間が測定でき、その結果新たな情報が得られる可能性に着目し、スピン偏極Xeを炭素系材料に導入し炭素系材料の細孔構造に関する新たな知見を得たので報告する⁴⁾。

2. 実験

NMRの測定は、VARIAN製INOVA-400WB型分光計に自作のレーザー超偏極システムを付帯した装置で行った。測定周波数は、110.648MHzで測定温度は室温～100℃で実施した。超偏極Xeの場合には高感度のため、積算回数は1回であった。レーザー偏極実験は、半導体レーザーとして、Opto Power社製OPC-A20-795-CSPS(波長795nm)を用い、(1/4)入板を通して円偏光とした。磁石はNMR装置の漏洩磁場(約120gauss)を利用し、その位置に偏極セルを設置した。偏極セルは120℃の恒温槽に置いた。セルの形状はシリンダー状で、外形6cm、長さ20cmであった。Rbは0.2gを高真空(10^{-6} Torr)で封入した。平均偏極率は約0.5%で、用いたXeガスは天然で、Wilmad製の10φテフロンバルブ付きガラス管に1気圧で封入した。緩和時間の測定は先に藤原らが提唱した方法⁵⁾を利用し、緩和時間測定時のパルスのフリップ角は約8°であった。

超偏極Xe、炭素系材料、細孔

○さいとうこうじ、たどころけんいち、いじまたかし、きむらあつおみ、ふじわらひであき

測定の対象である炭素系材料は市販のもので、適時加熱処理や酸処理を実施したものを、粉の状態ですのまま試料管に入れた。また Pt を混入させた試料も供試した。

3. 結果と議論

(1) 炭素材料系

典型的な測定結果を Fig.1 に示す。波形分離等を利用し、化学シフト値から平均気孔径を従来の関係から簡単に推定することができる。活性炭の場合には強固な気孔が存在していることが知られているが、カーボンブラックでは気孔というよりは、吸着サイトの大きさを示していると考えられている⁹⁾。非常に高感度であるため、従来せいぜい2試料/日であったが、数10試料/日以上処理が可能であり、工業的な利用が可能である。

カーボンブラックを酸で処理することで、表面を化学修飾したりその表面構造が変化することが知られている。そこでこのような材料系に、高感度な本手法で、1秒毎の連続測定を試みた。

その結果を Fig.2 に示す。明らかに、時間が経過する毎に、Xe の化学シフトが低磁場へ移動し、20秒以降に一定値に収束していることがわかる。酸処理をしていない試料や強固な気孔を持つ活性炭等ではこのような過渡的な化学シフトの変化現象は全く観測されない。つまり、高感度な超偏極法によって、新たに形成された表面・界面の情報を観測していると推定でき、非常に興味深い。試料によっては、20 ppm 以上も低磁場へ移動している。これは、Xe のゆっくりした拡散の一種と思われ、原因としては表面側にある準安定吸着サイトから、より安定な吸着サイトへの拡散現象と推定している。熱平衡の Xe で実用材料での緩和時間は非常に困難であるが、超偏極 Xe では簡単に測定できる。平衡状態での緩和時間を測定したところ、Fig.3 に示すように化学シフトの移動が大きかった吸収での緩和時間の逆数は大きい（緩和時間が短い）ことがわかった。Xe の緩和時間は周囲の金属系材料の存在の影響を受けやすいが、カーボンブラック等は不純物も少ないことから、この結果は吸着状態の差異を反映していると考えられる。藤原ら⁹⁾は緩和時間とガラス径の関係を議論しており、径が小さい場合は緩和時間が短いとしており、今回の結果は化学シフトが低磁場へ移動しているため、矛盾しない。

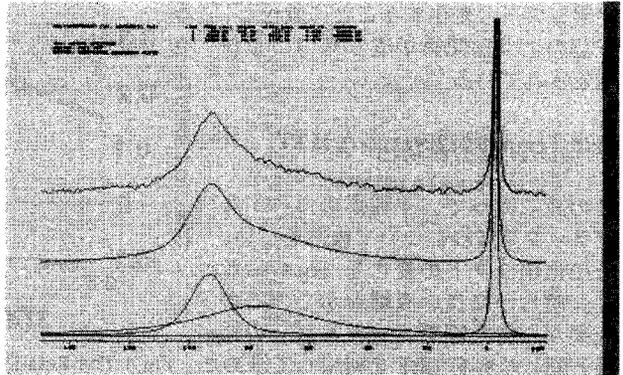


Fig.1 Typical Xe-NMR spectra for carbon materials

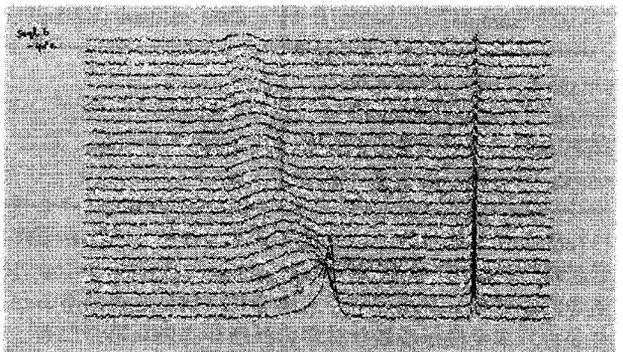


Fig.2 Continuous Measurements of treated carbon materials using Hp-Xe by every 1 sec.

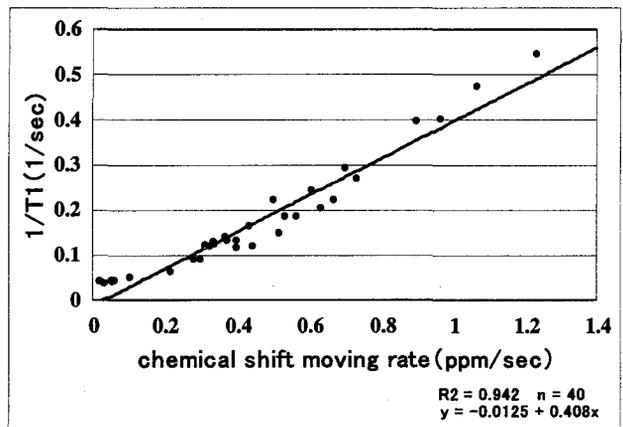


Fig.3 The Relationship between chemical shift moving rate (ppm/sec) and $1/T_1$ (1/sec)

超偏極 Xe を利用することで、緩和時間以外にも新たな情報が取得可能である。温度可変実験によって、化学シフトの変化することに着目し、下記のような関係が成り立つことが報告されている⁷⁾。

$$\text{Shift/Temp} = 0.0229 \cdot \exp(-\Delta H/kT)$$

この式に従って、4種類のカーボンブラック系試料について検討を行い、その化学シフトの変化を Fig.4 に示す。明らかに良い直線を示し、この結果から得た吸着エンタルピーの結果と同じ試料を BET を利用して求めた吸着エンタルピー結果を Table 1 に示す。

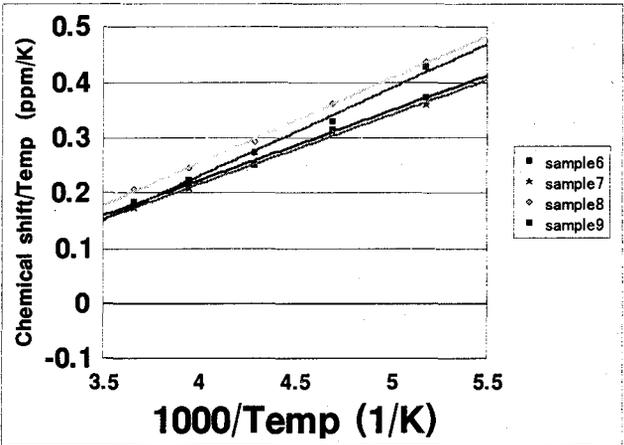


Fig.4 The Relationship between 1/Temperature (1/K) and chemicalshift /Temperature (ppm/K)

Table 1 Enthalpy of Adsorption of Xenon

sample	NMR method (KJ/mol)	BET (KJ/mol)
sample 6 raw carbon black	4.81	4.95
sample 7 acid treatment	4.65	4.84
sample 8 acid treat and 400 °C	4.24	4.41
sample 9 acid treat and 700 °C	4.42	4.60

Table 1 からわかるように、基本となる sample6 で両手法の結果は良く一致している。また同じ試料に酸処理や加熱処理した sample7-9 でもエンタルピーの変化の傾向は合致している。BET 法では吸着エンタルピーを求めるには数日必要であるが、超偏極法では約2時間程度で可能なことから、本手法が多量な試料の評価が必要な場合にも、有効であると考えられる。

(2) Pt 混在型炭素材料系

燃料電池に利用されている炭素材料系は、主にカーボンブラックを処理した材料に Pt を添加している。Pt の添加量によって、触媒活性が異なるが、そのメカニズムは明確でない部分が多い。本手法でこのような実用材料への適用を試みた。Pt の有無は測定には影響が出なかった。その結果を Fig.5 に示す。非常に興味深いことに、Pt 添加によって化学シフトが変化し、線形もシャープになり、吸着した Xe の強度も大きくなっている。これは Pt 添加によって新たな吸着サイトが形成された結果と考えられる。同じ材料系で、Pt の添加量を変えた場合の化学シフトと緩和時間の関係を Fig.6 に示す。

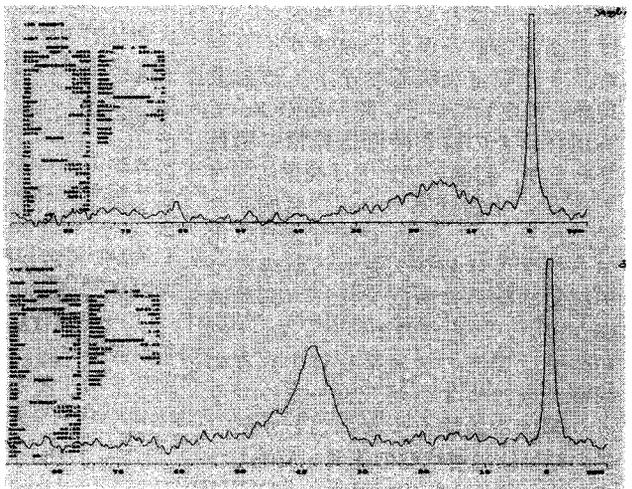


Fig.5 Xe-NMR spectra of carbon black B (upper) and carbon black b with Pt 24% (lower)

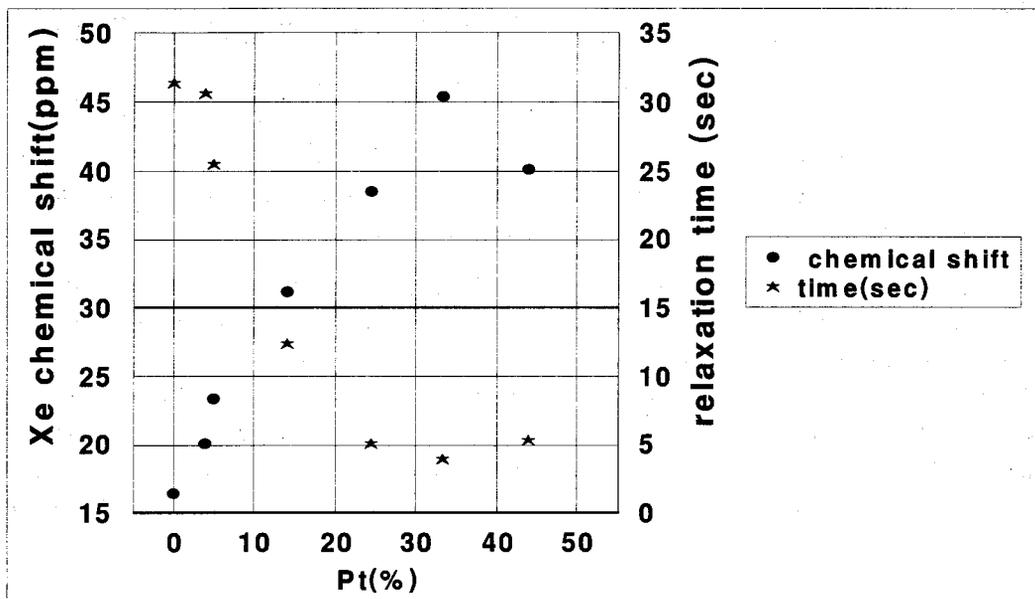


Fig.6 The Relationship between Pt concentration(%) and Xe chemical-shift (ppm) or relaxation-time (sec)

Pt の添加に従い、化学シフトが低磁場シフトし、緩和時間が低下している傾向が、本カーボンブラックでは観測された。化学シフトの低下は、Pt の添加によって、またその添加量の増加によって、新たな細孔形成等の Xe の吸着サイトの出現を考えられる。また Pt 添加量が 2.5% 以降では緩和時間が急激に減少していることから、この吸着サイトは主に Pt 同士で形成したものと推定できる。対して Pt 添加量の少ない領域はカーボンブラックの持つ吸着サイト周辺で、Pt と共存して吸着サイトを形成しているのではないかと考えられる。燃料電池での触媒活性と Pt の添加量の相関は直線ではないことから、このような Pt とカーボンとの共存によって形成された細孔が重要な役割を果たしていると考えられる。実際、基本となるカーボンブラックを異なる種類の材料に変えた場合、Pt の添加量による化学シフトの変化は一様ではない結果もこの推定を支持している。

4. まとめ

スピン偏極した Xe-NMR 法は非常に有効で、産業に広く応用されている炭素系材料での細孔の平均サイズ簡便の求められるだけでなく、高感度のため緩和時間や吸着エンタルピー等、細孔に関して新たな情報が得られる。また情報量が増えると同時に、高感度による測定の容易さ・時間効率の大幅向上等によって、超偏極 Xe 法は臨床ばかりでなく、産業的にも様々な実用材料の評価に今後広く活用できると考える。そのためには、超偏極 Xe の材料への応用例提示の更なる拡大と安価・安定供給体制の構築が急務であろう。

参考文献

- 1) J.W.Larsen, et.al., ACS Symposium Series, 71, (1978), 34
- 2) J.S.Gethner, J.Appl.Phys, 59,(1986), 1069
- 3) 藤原英明 「技術予測シリーズ」日本ビジネスレポート社 (2000) 69.
B.Godddson, J.Magn.Reson., 155(2002),157.
- 4) K.Saito et al. submitted to Magn.Reson.Imaging.
- 5) H.Fujiwara et.al. J.Magn.Reson. 150,(2001),156.
- 6) K.J.McGrath, Carbon, 37, (1999), 1443
- 7) V.Pasquier et al., Mag.Reson.Imaging, 14, (1996), 971

名工大工 ○吉水広明, 鈴木智幸, 大田悟史, 大野真希, 村上隆史, 辻田義治

The structural analysis of Polymeric Materials by means of ^{129}Xe NMR Spectroscopy

Hiroaki YOSHIMIZU, Tomoyuki SUZUKI, Satoshi OHTA, Maki OHNO, Takafumi MURAKAMI, Yoshiharu TSUJITA, Nagoya Institute of Technology, Nagoya 466-8555

Recently, it has been reported that the ^{129}Xe NMR spectroscopy is one of the powerful techniques for characterization of solid materials. In the case of glassy polymers, the mean size of a microvoid which are corresponding to the unrelaxed volume, could be determined by ^{129}Xe NMR chemical shifts, and this was confirmed from the results of crystalline part of poly(4-methyl-1-pentene). The contraction in volume of the miscible polymer blend was also confirmed from the estimation of mean size of the microvoid in blend sample. On the other hands, ^{129}Xe NMR chemical shifts of the Xe in rubbery polymers showed good correlation to the fractional free volume of the sample.

【はじめに】

^{129}Xe 核はスピン数 1/2 で, その NMR 化学シフト値は広く, 周囲の環境を反映して大きくシフトする. 一般に, ^{129}Xe NMR 化学シフト値は, $\delta = \delta(\text{S}) + \delta(\text{E}) + \delta(\text{Xe})$ と表現できる. $\delta(\text{S})$ は Xe 原子とそれが存在する空孔内壁との相互作用による項であり空孔サイズが小さいほど大きくなる. $\delta(\text{Xe})$ は Xe 原子同士の相互作用による項で, Xe 密度とともに直線的に増加する (Fig.1). また, $\delta(\text{E})$ は電場による分極あるいは Xe 原子からの電荷移動によって引き起こされる項であるが, 通常の有機高分子では二価カチオンなど強い電場を与える因子が存在しないので, 無視してよい.

Xe が吸・収着した試料中の Xe 密度(存在量)に対する NMR 化学シフト値の関係を調べれば $\delta(\text{S})$ 値が特定でき, これから試料内に存在している微小空間或いは微小空孔のサイズを評価する解析手法が考案できる. 実際に種々の高分子材料を対象に, Xe ガスの収着特性と ^{129}Xe NMR 化学シフト値の関係を調べ, この手法の精度や特長を検討した.

キーワード: ^{129}Xe NMR, 化学シフト値, 気体収着特性, ミクロボイド, 自由体積

○よしみず ひろあき, すずき ともゆき, おおた さとし, おおの まき, むらかみ たかふみ, つじた よしはる

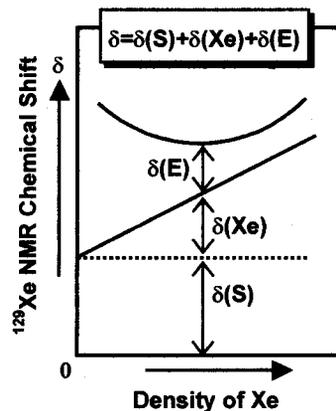


Fig.1 Schematically represented of the relationship between ^{129}Xe NMR chemical shift and density of Xe.

NMR 測定は試料を細かく裁断し, テフロン製バルブの付いた NMR 管(Wilmad 社製)に約 1g 充填した後, 十分乾燥してから所定圧力に相当する Xe を導入して十分収着平衡させてからシングルパルス法で行った. ^{129}Xe NMR 化学シフト値は同時に観測される気体 ^{129}Xe のピークを内部基準として補正した.

[ガラス状高分子]

高分子における気体吸着機構は、ゴム状高分子では液体と同様 Henry 則に従うのに対し、ガラス状高分子では吸着した気体の一部がマイクロボイドと呼ばれる微小孔に収納されるとする二元吸着モデルで説明される。即ち Henry 則に従う吸着サイトと Langmuir 型吸着サイトの共存モデルである。Langmuir 吸着サイトの飽和定数(C_H)は、マイクロボイドの量を示す尺度と解釈され、マイクロボイドは非平衡状態であるガラス状高分子の未緩和体積に対応付けられる。多くの実験事実がこのモデルを支持しているが、マイクロボイドのサイズやその分布に関する知見は C_H からでは汲み取れない。近年、陽電子消滅法による微小孔サイズやその分布の評価方法が提案されている。しかし、未だ完成の域に達したとは言い難く、 ^{129}Xe NMR 法による相補的議論が必要不可欠であると改めて強調したい。

ガラス状高分子 (ポリスチレン(PS), ポリフェニレンオキシド(PPO), ポリカーボネート(PC), テトラメチルポリカーボネート(TMPC)) の Xe 吸着等温線は二元吸着モデルに従った。即ち、吸着した Xe は試料の Henry 及び Langmuir の両吸着サイトに存在する。しかし、 ^{129}Xe NMR スペクトルには、常に対称性の良い単一ピークが観測されたので、両サイトにある Xe は互いに速い交換をしている。

一方、高圧、すなわち吸着量が増加するとともに ^{129}Xe NMR 化学シフト値は低磁場シフトした。この低磁場シフトは試料中の Xe 密度の増加に帰

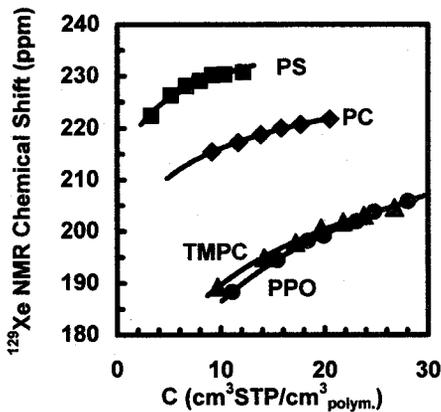


Fig.2 The plots of ^{129}Xe NMR chemical shift against total sorption amounts of Xe into glassy polymer membranes.

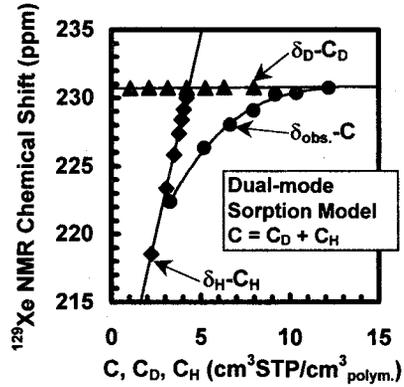


Fig.3 The plots of the observed and calculated ^{129}Xe NMR chemical shifts against total, Henry-site and Langmuir-site sorption amounts into PS membrane, respectively.

せられる。先述したが高分子では、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値は、 $\delta = \delta(\text{S}) + \delta(\text{Xe})$ と表現でき、Xe 密度に比例する (Fig.1 参照)。実際、気体 Xe やゴム状高分子の場合、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値は圧力とともに直線的に低磁場シフトする。これは Xe 密度(吸着量)と圧力が線形関係(Henry 則)にあるからである。これに対し、ガラス状高分子では圧力とともに線形には低磁場シフトしなかった (Fig.2)。これは両サイトにおける吸着量の増加に対応した Xe 密度の増加の度合いが、互いに著しく異なるためである (Fig.3 参照)。事実、ゴム状高分子では吸着量(または圧力)に対するシフト量は、ガラス状高分子におけるそれよりかなり小さい。これについては後に詳しく述べる。

Henry, Langmuir 両サイトにおいてそれぞれ $\delta = \delta(\text{S}) + \delta(\text{Xe})$ の関係が成り立つとし、速い交換のため両サイトの Xe 吸着量分率に従った位置に実測ピークが現れるという仮定に基づき、各サイトの化学シフト値の圧力依存性を求めた (Fig.3)。次に Langmuir サイトの化学シフト値 δ_H を同サ

Table I The values of glass-transition temperature T_g , Langmuir sorption capacities C_H , ^{129}Xe NMR chemical shifts $\delta(\text{S})_H$ and mean pore size of glassy polymer membranes

Sample	T_g	C_H	$\delta(\text{S})_H$	mean pore size ^{129}Xe NMR PALS	
PS	98	4.9	205.4	5.14	5.76
PC	160	13.3	199.7	5.28	5.88
TMPC	196	17.4	169.7	6.18	6.40
PPO	216	19.1	165.4	6.34	6.56

T_g : in $^{\circ}\text{C}$, C_H : in $\text{cm}^3\text{STP} / \text{cm}^3\text{polym.}$
 $\delta(\text{S})_H$: in ppm., mean pore size: in \AA .

イトの収着量 C_H に対してプロットし、 $C_H = 0$ に外挿した。この外挿値はマイクロポイド内壁と Xe の相互作用のみによる化学シフト値、 $\delta(S)_H$ であり、マイクロポイドの平均サイズに対応づけられる (Table I)。結果は陽電子消滅法 (PALS) による報告値と概ね一致しており、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値からマイクロポイドの平均サイズを評価し得ることがわかった。

また、PPO について温度を下げて同種の検討を行ったところ、マイクロポイドは温度の低下とともに直線的に増大し、ある温度以下ではほぼ一定となる事実が確認された。

[ポリ(4-メチル-1-ペンテン)]

^{129}Xe NMR 法による高分子膜中の微空隙サイズ評価法の精度を確認するために、気体を収着可能な結晶構造をもち、その結晶構造から収着サイトのサイズが見積もれる高分子、ポリ(4-メチル-1-ペンテン) (PMP) を用いて検討した。種々の結晶化度を有する PMP 膜を調製し、Xe を収着させて NMR 測定を行った。実測の化学シフト値から $\delta(S)$ 値を外挿法により求め、これを試料の結晶化度に対してプロットしたところ、結晶化度とともに線形に低磁場シフトした (Fig. 4) ので、結晶化度 100% に補外して PMP の結晶相の $\delta(S)$ 値、約 227 ppm を得た。この値から球状を仮定して平均空隙サイズを見積もると、およそ 4.7 Å となり、これは PMP の結晶構造と矛盾しない値である。

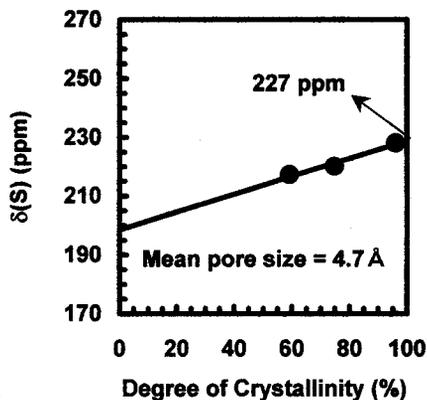


Fig. 4 The plot of $\delta(S)$ for PMP membrane vs. degree of crystallinity.

[ポリマーブレンド]

ポリマーブレンドにおける相溶化に伴う体積収縮とマイクロポイドのサイズとの関係を、室温でガラス状態にある PPO/PS 及び TMPC/PS 系ポリマーブレンドを対象に ^{129}Xe NMR 法で検討した。Xe 収着等温線から算出された C_H をブレンド組成に対してプロットすると、各ブレンド試料膜の値は単純な加成則で予想されるものよりも小さかった (一例として Fig. 5 に TMPC/PS 系の結果を示す)。密度測定の結果はこれと対応し、両ブレンド系の相溶化に伴う体積の収縮が確認された。 ^{129}Xe NMR 化学シフト値の圧力依存性から、

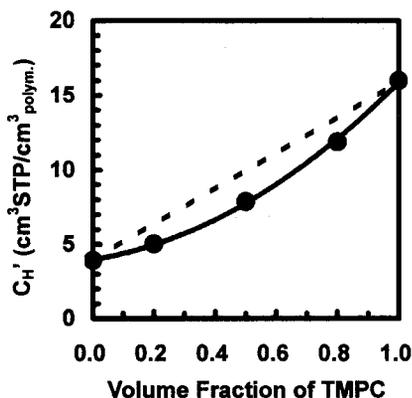


Fig. 5 The plot of C_H' of TMPC/PS blend membrane vs. volume fraction of TMPC. The dotted line shows the simple additive rule.

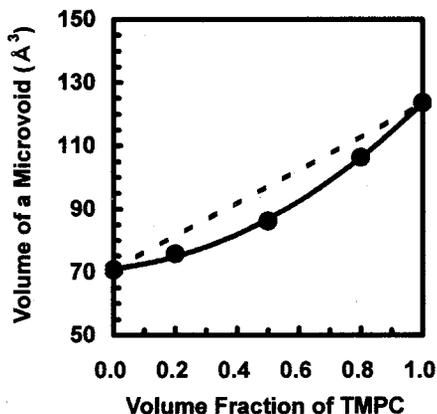


Fig. 6 The plot of volume of a microvoid in TMPC/PS blend membrane vs. volume fraction of TMPC. The dotted line shows the simple additive rule.

上述と同様に $\delta(S)_H$ 値を決定した。 $\delta(S)_H$ 値を平均サイズに換算して一個のマイクロボイドの体積を算出し、ブレンド組成に対してプロットしたところ、これも単純な加成則から減少の方向へずれていた(一例として Fig.6 に TMPC/PS 系の結果を示す)。即ち、相溶化に伴う体積収縮の原因は、個々のマイクロボイドの収縮で説明される。

[ゴム状高分子]

ゴム状高分子は、マイクロボイドがない、即ち時間及び空間的に固定された微細孔がありえない系であるから、ここに存在する ^{129}Xe 核が示す NMR 信号はガラス状高分子の場合とは異なると予想される。アクリロニトリル-ブタジエン共重合体ゴム(NBR)を用いて検討した。NBR の Xe 収着等温線は原点を通る直線であり、Henry 則に従っている。Xe 溶解度係数はアクリルニトリル(AN)含率の増加とともに低下し、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値は収着量の増加とともに僅かに且つ線形に低磁場シフトした。従って、ゴム状高分子における $\delta(S)$ 値は、収着量 0(=圧力 0)へ直線外挿した値とした。溶解度係数並びに $\delta(S)$ 値は各試料膜の自由体積分率(FFV)と非常に良好な相関関係にあった(Fig.7)。ゴム状高分子では、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値はその系の自由体積もしくは密度を知る良いパラメーターの一つと結論付けられた。

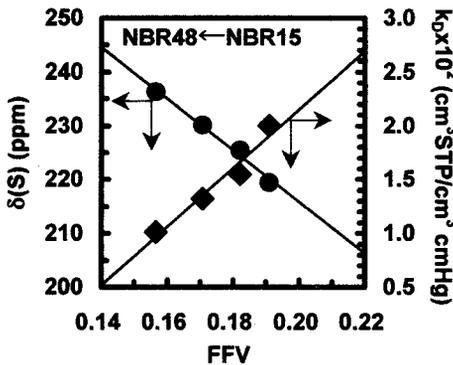


Fig.7 The relationships between ^{129}Xe NMR chemical shift, $\delta(S)$ (●) or Xe solubility coefficient, k_0 (◆) for NBR membranes and fractional free volume, FFV.

なお、NBR で得られた $\delta(S)$ 値はガラス状高分子における $\delta(S)_H$ 値よりも低磁場であったので、仮に空孔サイズに換算すれば、これはガラス状高分子のそれよりも小さいことになる。温度上昇によりガラス状態からゴム状態に変化するのであるから、一般論としてゴム状高分子の方が自由体積は大きい。にもかかわらず個々の空孔サイズは小さいとするなら、必然的にその個数が多いことになる。これは、言い換えればゴム状態での活発なセグメント運動が ^{129}Xe NMR 化学シフト値に反映されていると解釈できる。つまり、活発なセグメント運動の故に高分子鎖との衝突頻度が上がり、高分子-Xe 相互作用($\delta(S)$)の寄与が Xe-Xe 相互作用($\delta(\text{Xe})$)の寄与を相対的に上回った結果として、Xe 同士が衝突する確率が低下し、収着量の増加に対する低磁場シフトの割合がガラス状高分子の場合に比べて概ね一桁小さくなったと考えられる。

以上、 ^{129}Xe NMR 法は、高分子膜の微細構造、とりわけ系内に存在する微細孔や自由体積に関する情報を引き出せる手法であることが確認できた。

[参考文献]

1. T. Suzuki, M. Miyauchi, H. Yoshimizu, Y. Tsujita, T. Kinoshita; Characterization of microvoids in glassy polymers by means of ^{129}Xe NMR spectroscopy, *Polymer J.*, 33, 934-938 (2001).
2. T. Suzuki, M. Miyauchi, M. Takekawa, H. Yoshimizu, Y. Tsujita, T. Kinoshita; The characterization of the microvoids in poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide) by means of ^{129}Xe NMR spectroscopy, *Macromolecules*, 34, 3805-3807 (2001).
3. T. Suzuki, H. Yoshimizu, Y. Tsujita; Characterization of Microvoids in PPO/PS Polymer Blend by means of ^{129}Xe NMR Spectroscopy, *Desalination*, 148, 359-361 (2002).
4. T. Suzuki, T. Tanaka, M. Nakajima, H. Yoshimizu, Y. Tsujita; Characterization of the Cavity in Poly(4-methyl-1-pentene) Crystal by Gas Permeation and ^{129}Xe NMR Measurements, *Polymer J.*, submitted.

3 L7 複雑系の PGSE 拡散測定と解析—高分子電解質への応用—

(都立大) ○W. S. Price (産総研) 早水紀久子、秋葉悦男
(エフエフエフ) 坂東寿則、相原雄一

PGSE Diffusion Measurements and Analysis in Complex Systems – Applications to Polymer Electrolytes–

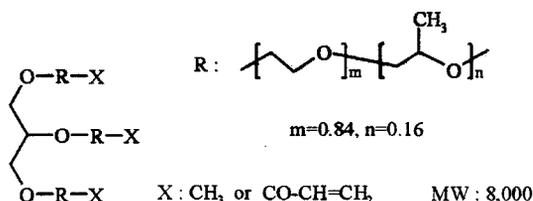
W. S. Price (Tokyo Metropolitan University), K. Hayamizu and E. Akiba (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), T. Bando and Y. Aihara (Yuasa Corp)

There is growing evidence that many apparently simple isotropic chemical systems are neither solids nor homogeneous liquids as they possess some degree of structure and give rise to non-Fickian diffusion. Consequently, depending on the time scale of the diffusion measurement, the systems can appear to be undergoing free diffusion or give evidence of restricted or even fractal-like behaviour. Such behaviour has enormous implications for many practical applications in systems such as polymer electrolytes.

INTRODUCTION

In polymer-lithium salt systems the ionic transport (and thus conductivity) is decoupled from the macroscopic viscosity and is closely correlated with its local environment and in particular with the segmental motion of the polymer chains.^{1,2} Cation and anion diffusion is fundamentally different with the cation hopping between various coordination sites along the polymer being modulated by the polymer segmental motion, whereas the anion hops from an occupied site to void in the polymer matrix sufficiently large to accept it. Such systems exhibit microheterogeneity which must form the pathway for the transition from the amorphous to the crystalline state and has significant effects on the conduction process. If the microheterogeneities have characteristic distances on the order of diffusive path lengths, the microheterogeneities will impart characteristic signatures onto the diffusive behaviour. Indeed, anomalous or fractal diffusion behaviour of species has been widely observed in microheterogeneous systems over certain length scales.³⁻⁵

In the present study, two precursor macromonomers, based on a derivative of glycerol bonded to ethyleneoxide-co-propyleneoxide ($m(\text{EO-PO})$) with a molecular weight of about 8,000 and differing only in their degree of methylation were used: $m(\text{EO-PO})\text{-M2}$ (20% methylation) $m(\text{EO-PO})\text{-M5}$ (50% methylation) as shown below in order to prepare cross-linked polymers (i.e., $\text{poly}(\text{EO-PO})\text{-M2}$ and $\text{poly}(\text{EO-PO})\text{-M5}$) of differing flexibility.



The resulting cross-linked polymers were doped with two different concentrations of $\text{LiN}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ (i.e., $\text{Li/O} = 0.1$ and 0.05) and the reorientational and translational motions of all of the species were measured using multinuclear NMR relaxation and pulsed gradient spin-echo (PGSE) diffusion measurements, respectively.

PGSE 拡散測定、時間に依存する自己拡散係数、制限拡散、高分子電解質

W.S. Price, はやみずきくこ、あきばえつお、ばんどうとしのり、あいはらゆういち

THEORY

In the short gradient pulse (SGP) approximation, where motion during the gradient pulse is ignored the PGSE attenuation is given by

$$E(\mathbf{q}, \Delta) = \iint d\mathbf{r}_0 \, d\mathbf{r} \, \rho(\mathbf{r}_0) G(\mathbf{r}_0 | \mathbf{r}; \Delta) e^{i2\pi\mathbf{q}(\mathbf{r}-\mathbf{r}_0)} \quad (1)$$

where $\rho(\mathbf{r}_0)$ is the equilibrium spin density and $G(\mathbf{r}_0 | \mathbf{r}; \Delta)$ is the diffusion propagator. $q = (2\pi)^{-1} \gamma g \delta$ (m⁻¹), γ is the gyromagnetic ratio and Δ defines the timescale of the measurement. For free isotropic diffusion of a single species the attenuation is given by

$$E(\mathbf{q}, \Delta) = \exp(-4\pi^2 q^2 D \Delta) \quad (2)$$

Whilst for diffusion within a reflecting sphere of radius a , the attenuation is given by

$$E(\mathbf{q}, \Delta) = \frac{9 [2\pi q a \cos(2\pi q a) - \sin(2\pi q a)]^2}{(2\pi q a)^6} + 6(2\pi q a)^2 \sum_{\kappa=0}^{\infty} \frac{(2n+1) \beta_{\kappa}^2 j'_n(2\pi q a)^2 e^{-D \frac{\beta_{\kappa}^2}{a^2} \Delta}}{(\beta_{\kappa}^2 - n^2 - n) (\beta_{\kappa}^2 - (2\pi q a)^2)^2} \quad (3)$$

where $j_n(x)$ is a spherical Bessel function and the values of α_{κ} are determined from

$$\frac{n}{\beta_{n,m}} J_{n+\frac{1}{2}}(\beta_{n,m}) = J_{n+\frac{3}{2}}(\beta_{n,m}). \quad (4)$$

and the roots, $\beta_{n,m} = \alpha_{\kappa} a$, are placed in ascending order and indexed by κ .

Even when the form of $G(\mathbf{r}_0 | \mathbf{r}; \Delta)$ is unknown, expansion of Eq. (1) reveals that

$$E(\mathbf{q} \square a^{-1}, \Delta) \approx 1 - \frac{(2\pi q)^2 \langle z^2(\Delta) \rangle}{2} \quad (5)$$

where $\langle z^2(\Delta) \rangle$ is the mean squared displacement. Thus, the PGSE data can be analysed on the basis of an effective diffusivity

$$D_{\text{eff}}(\Delta) = \frac{\langle z^2(\Delta) \rangle}{2\Delta}. \quad (6)$$

Thus, we have

$$D_{\text{eff}}(\Delta) \propto \Delta^{\kappa-1}. \quad (7)$$

In the case of normal diffusion $\kappa = 1$, but in the case of anomalous diffusion $\kappa \leq 1$.

RESULTS AND DISCUSSION

Polymer Molecular Dynamics

¹H NMR longitudinal relaxation measurements of the polymers indicated a decrease in the segmental motions of the polymer with increasing salt concentration and (salt concentration insensitive) activation energies between 18 to 24 kJ/mol.

Since the PGSE sequence is echo-based, the measured diffusion coefficients are weighted in favour of the more flexible parts of the polymers (the spin-echo decays were biexponential). At long Δ (and τ), the two components of the transverse relaxation were spectroscopically resolved and the PGSE attenuation profiles were single-exponential with the

smaller component having the faster diffusion coefficient. Interestingly, the coefficients determined from the larger component were independent of both temperature and degree of methylation. The Δ -dependence of the diffusion coefficients is likely due to relaxation weighting of the contributions. Nevertheless, the data could be well described by Eq. (7) with values of κ ranging between 0.44 and 0.46 (see Fig. 1)

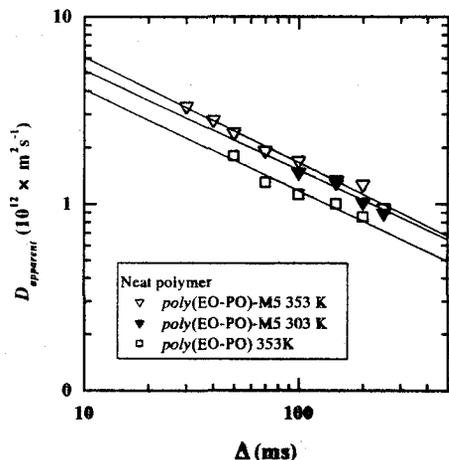


Figure 1. The apparent diffusion coefficients of the neat polymers versus Δ for *poly(EO-PO)-M5* at 353 K (open down-triangle) and 303 K (solid down-triangle) and *poly(EO-PO)* at 353 K (open square). The solid lines are the result of regressing Eq. (7) onto the data.

The PGSE profiles of the doped polymers were non-exponential and thus indicative of restricted diffusion. At shorter Δ there was clear evidence of diffractive minima (see Fig. 2). For the sphere model, the first diffractive minima occurs at $q \approx 0.71/a$ which gives $a = 1 \mu\text{m}$. The profiles only approached exponential at $\Delta = 200 \text{ ms}$ giving an apparent free diffusion coefficient of $8 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, which is similar to the coefficients of the neat samples.

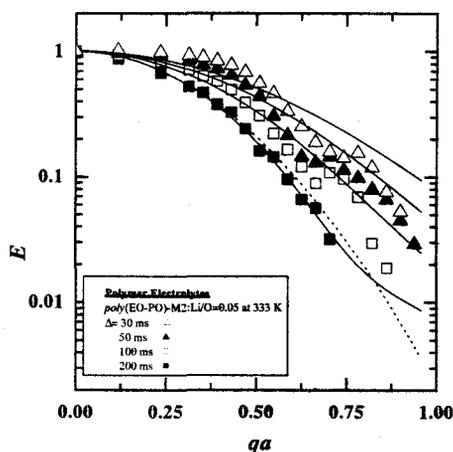


Figure 2. ^1H PGSE attenuation profiles for *poly(EO-PO)-M2:LiI/O=0.05* at 333 K for various Δ values (Δ 30 ms, \blacktriangle 50 ms, \square 100 ms, and \blacksquare 200 ms). The solid and dashed lines denote simulations of the data using the free diffusion and SGP sphere models (Eq. (3) with $a = 1.0 \mu\text{m}$), respectively.

There are several points of interest, first the apparent diffusion coefficient decreased with Δ - as for the neat polymers. Second, the mean-square displacements were considerably less than $1 \mu\text{m}$. Consequently, theoretical profiles calculated with these diffusion coefficients, although non-exponential, do not give diffraction minima. Finally the experimental diffractive minima are rather shallow - a signature of polydispersity of the size of the restricting geometry. However, even the inclusion of significant polydispersity has almost negligible effect on the calculated profiles since the mean-square displacements are considerably less than the apparent radius of the restricting geometries.

2 Lithium Ion Molecular Dynamics

The activation energies for the hopping motions of the Li ions ranged from 23 to 25 kJ mol⁻¹. The ⁷Li PGSE attenuation profiles of the polymers only became single exponential at high temperatures/long Δ . Similar to the polymer, analysis of the diffractive minima gave $a = 1.79 - 1.95 \mu\text{m}$ in the temperature range 323 - 353 K (see Fig. 3).

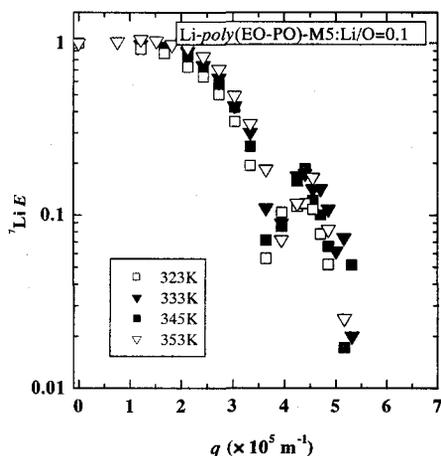


Figure 3. ⁷Li PGSE attenuation for *poly(EO-PO)-M5:Li/O=0.1* at $\Delta = 50$ ms at four different temperatures.

3 Anion Molecular Dynamics

Analysis of ¹⁹F longitudinal relaxation measurements of the anion gave nearly identical reorientational activation energies of 10 kJ mol⁻¹ for the Li/O = 0.1 samples. However, these values increased significantly with decreasing salt concentration and became sensitive to the degree of methylation (i.e., 12.4 and 16.9 kJ mol⁻¹ for the M2 and M5 samples, respectively).

Although apparently undergoing free diffusion, the measured anion diffusion coefficients were Δ -dependent and reached a stable 'long-time' values by $\Delta \sim 70$ ms. The activation energies obtained from the long-time values ranged from 36 - 48 kJ mol⁻¹.

CONCLUSIONS

The above results indicate that the polymer matrix moves towards crystallinity with increasing salt concentration. During this process hyperstructures are formed with characteristic sizes far greater than the component monomers. These hyperstructures impart restricted diffusion effects onto the polymer and lithium translational dynamics. Further the lithium ions undergo (non-Fickian) curvilinear diffusion along the polymer chains. The anions, on the other hand, undergo anomalous diffusion through the hyperstructure network. The anion diffusion becomes Fickian when Δ is such that the mean squared displacement exceeds the length scale of the hyperstructure network.

REFERENCES

- (1) Hayamizu, K.; Aihara, Y.; Price, W. S. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 4785-4793.
- (2) Golodnitsky, D.; Livshits, E.; Ulus, A.; Barkay, Z.; Lapides, I.; Peled, E.; Chung, S. H.; Greenbaum, S. *J. Phys. Chem.* **2001**, *A105*, 10098-10106.
- (3) Scheller, H.; Fleischer, G.; Kärger, J. *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 730-735.
- (4) Ben-Avraham, D.; Havlin, S. *Diffusion and Reactions in Fractals and Disordered Systems*; Cambridge: Cambridge, 2000.
- (5) Malcai, O.; Lidar, D. A.; Biham, O.; Avnir, D. *Phys. Rev.* **2002**, *E 56*, 2817-2828.

3 L8

ペプチドおよびポリペプチド中のカルボニル酸素の固体 ^{17}O NMR パラメータの決定

(東京工業大大学院理工¹、群馬大工²、アイオワ州大エイメス研³)
○黒木重樹¹、山内一夫¹、木村英昭¹、安藤勲¹、莊司顯²、尾崎拓
男²、Marek Pruski³

Determination of ^{17}O NMR parameters for carbonyl oxygen in peptides and polypeptides

Shigeki Kuroki¹, Kazuo Yamauchi¹, Hideaki Kimura¹, Isao Ando¹, Akira Shoji², Takuo Ozaki², and Marek Pruski³

¹Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, 152-8552 Japan

²Department of Biological Sciences, University of Gunma, Tenjin-cho, Kiryu, Gunma, 376-8515 Japan

³Ames Laboratory, Iowa State University, Ames, Iowa, 50011 USA

We have been studied the relationship between the hydrogen-bonding structure and NMR chemical shifts of carbonyl carbons, amide nitrogens, hydrogens in peptides and polypeptides. On the other hand, the oxygen atom is one of the important atoms constituting hydrogen-bonding structure in peptides and polypeptides, so recently high field and high speed MAS method was used for obtain the MAS spectra of ^{17}O labeled peptides. Now we can exactly determine the NMR parameters concerned with chemical shift interaction, quadrupolar coupling interaction, and the direction between these two interaction (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33} , e^2qQ/h , η , α , β , γ) from the static spectra. For example, these parameter are (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33})=(544.7, 399.6, -57.1) ppm, e^2qQ/h =8.785MHz, η =0.289, and (α , β , γ)=(88.7, 70.2, -2.6) degree for ^{17}O -GlyGly.

私どもはペプチドおよびポリペプチドの水素結合距離と水素結合を構成するカルボニル基の ^{13}C 、アミド基の ^{15}N 、 ^1H の NMR 化学シフトとの関係を調べ、それらの化学シフトから水素結合距離に関する情報を得ることができることを実験、量子化学計算の両面から示してきた。さらに、アミド基の ^2H 粉末スペクトルから得られる核四極子結合定数と水素結合距離の関係を調べ、核四極子結合定数から水素結合距離に関する情報が得られることを報告した。一方、もう1つの水素結合に関連する核 ^{17}O に関して、スピン $I=5/2$ の四極子核であること、および天然存在比が 0.037% とかなり小さいため、固体 NMR 測定は困難であり、また理論スペクトルとの比較なしには NMR パラメータに関する情報を得ることができない。しかし、私どもは ^{17}O ラベルペプチドを合成しその MAS スペクトルを高磁場高速 MAS 法を用いて測定することに成功し等方平均化学シフト (δ_{iso})、核四極子結合定数 (e^2qQ/h)、電場勾配非対称パラメータ (η) を得て、そこから水素結合情報に関する情報が得られること示した。今回はさらに静止スペクトルを注意深くスペクトルシミュレーションすることにより、化学シフトテンソルの主値 (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33}) および電場勾配相互作用 (EFG) と化学シフト相互作用 (CSA) のオイラー角 (α, β, γ) を正確に決定し、水素結合情報との関係を明らかにした。試料としてカルボニル酸素を ^{17}O ラベルした GlyGly、GlyGlyHNO₃、PolyGlyI (β シート型)、PolyGlyII (3₁ ヘリックス型) を用いた。NMR 測定には Bruker 社 Avance800 および Avance500 を用いた。Fig.1 に観測周波数 108.6MHz における ^{17}O -GlyGly の MAS、

キーワード：固体 ^{17}O NMR、カルボニル酸素、ペプチド、水素結合

くろきしげき、やまうちかずお、きむらひであき、あんどういさお、しょうじあきら、おざきたくお、まーくぶるすき

静止スペクトルおよび観測周波数 67.8MHz における静止スペクトルをその理論スペクトルとともに示す。これらのスペクトルから $\delta_{iso}=295.7\text{ppm}$ 、 $(\delta_{11}, \delta_{22}, \delta_{33})=(544.7, 399.6, -57.1)\text{ppm}$ 、 $e^2qQ/h=8.785\text{MHz}$ 、 $\eta=0.289$ 、 $(\alpha, \beta, \gamma)=(88.7, 70.2, -2.6)^\circ$ が得られた。このように異なる共鳴周波数における粉末スペクトルを組み合わせることにより ^{17}O NMR パラメータを正確に求めることができる。他の試料についても同様にNMR パラメータを得た。得られた核四極子結合定数(e^2qQ/h)を水素結合距離($R_{N \dots O}$)に対してプロットした結果を Fig.2 に示す。水素結合距離が短くなると核四極子結合定数(e^2qQ/h)が直線的に小さくなり、これは先に得られた ^2H 核四極子結合定数と水素結合距離の関係と一致する。量子化学計算によって得られた核四極子結合定数(e^2qQ/h)および酸素の遮蔽定数と水素結合構造情報との関係は講演にて示す。

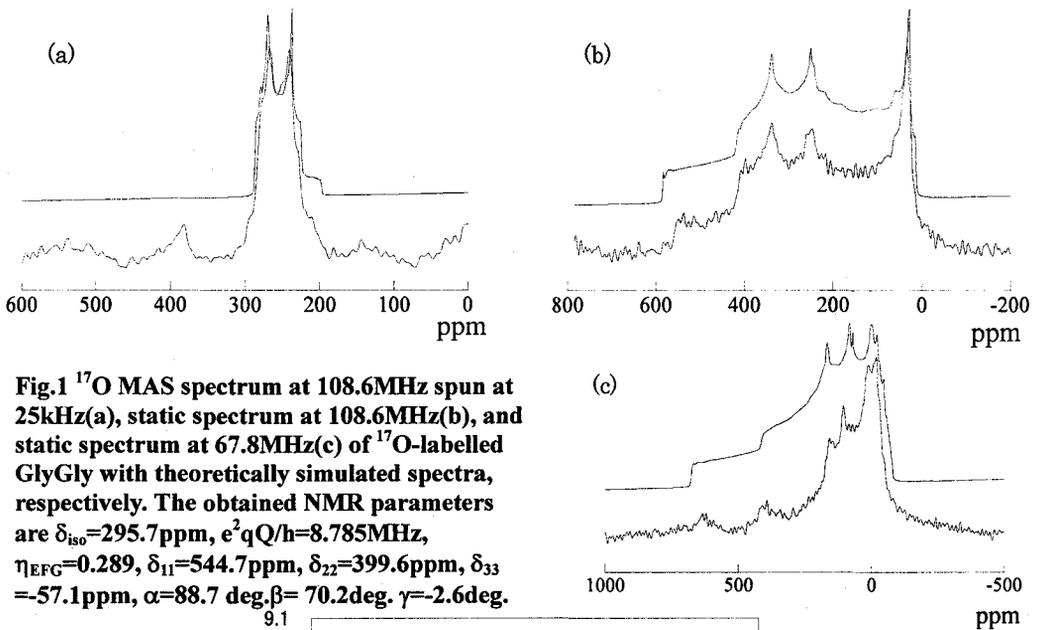


Fig.1 ^{17}O MAS spectrum at 108.6MHz spun at 25kHz(a), static spectrum at 108.6MHz(b), and static spectrum at 67.8MHz(c) of ^{17}O -labelled GlyGly with theoretically simulated spectra, respectively. The obtained NMR parameters are $\delta_{iso}=295.7\text{ppm}$, $e^2qQ/h=8.785\text{MHz}$, $\eta_{\text{EFG}}=0.289$, $\delta_{11}=544.7\text{ppm}$, $\delta_{22}=399.6\text{ppm}$, $\delta_{33}=-57.1\text{ppm}$, $\alpha=88.7\text{ deg}$, $\beta=70.2\text{ deg}$, $\gamma=-2.6\text{ deg}$.

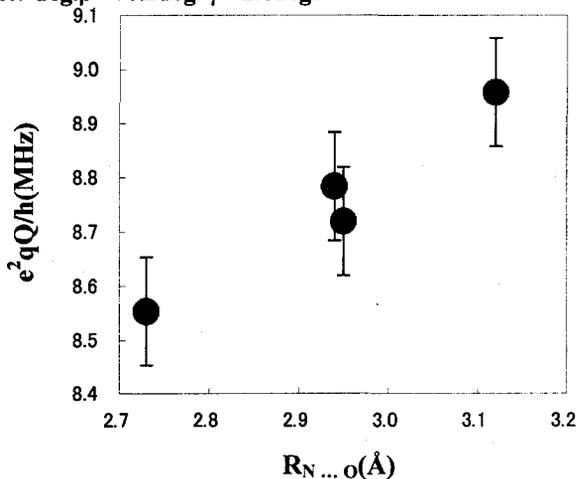


Fig.2 Plots of the determined e^2qQ/h values of hydrogen-bonded Gly carbonyl oxygen against hydrogen bond length($R_{N \dots O}$ (Å)).

3 L9

流動的な脂質膜界面における膜表在性蛋白質；固体 NMR による構造と膜結合状態の解析

(姫路工大・院理)

○辻 暁、上釜奈緒子、岡田雅司、八木澤 仁、斉藤 肇

Conformation and dynamics of phospholipase C- δ 1 PH domain at lipid bilayer surfaces as studied by ^{13}C solid state nmr

(Department of Life Science, Himeji Institute of Technology)

○Satoru Tuzi, Naoko Uekama, Masashi Okada, Hitoshi Yagisawa, and Hazime Saito

Although intermolecular interactions between peripheral membrane proteins at lipid bilayer surfaces are important processes of the signal transduction pathways in biological systems, molecular mechanisms of those processes are still unclear due to lack of means to investigate structure of peripheral membrane proteins at membrane surfaces under the physiological condition. Solid state NMR would be the most suitable mean for this purpose since it can provide structural information at atomic level for proteins located at surfaces of phospholipid vesicles suspended in buffer solution at ambient temperature. Here, we compared ^{13}C NMR spectra of [^{13}C]Ala labeled phospholipase C- δ 1 PH domain at a water-soluble state with those at a vesicle binding state, and analyzed changes of local conformation and dynamics of the PH domain induced at the membrane surfaces.

生体において細胞膜などの脂質二重膜表面は細胞内外の情報の処理、中継の機能を担う重要な反応の場であり、これらの情報伝達の機構は膜内在性蛋白質とともに、継続的、または一時的に膜表面に局在する膜表在性蛋白質群により構成されている。このような脂質膜上における情報伝達のメカニズムを理解するために、伝達機構を構成する蛋白質-蛋白質、蛋白質-脂質、蛋白質-低分子などの分子間相互作用と、その基礎となる脂質膜上における蛋白質の構造を知ることが必要と考えられる。生理的条件における脂質二重膜表面は、周囲の水相と不連続な界面をなす電荷を帯びた脂質極性頭部の層および極性頭部と脂質膜内部の疎水領域の界面からなっており、pH、イオン強度、誘電率が表面近傍で急激に変化する特異な環境を形成している。脂質-蛋白質間の直接の相互作用に加え、これらのパラメーターの変化は、膜表在性蛋白質の構造、配向、運動状態などに、均一溶液中あるいは固体中で観測されない特徴を与える可能性がある。生理的条件の脂質膜上における蛋白質の構造を得ることが難しいために、現在、生化学的手法で得られる膜表在性蛋白質の機能情報は、結晶構造または溶液中における構造をもとに解析されているが、固体NMRを用いることで、生理的条件に近い常温の緩衝

固体高分解能NMR、膜表在性蛋白質、PHドメイン、脂質二重膜、ホスホリパーゼC

つじ さとる、うえかま なおこ、おかだ まさし、やぎさわ ひとし、さいとう はじめ

溶液中の脂質二重膜上に局在した蛋白質の詳細な構造情報を得、膜表在性蛋白質の機能を直接機能に関係する構造の情報を元に解析することができると考えられる。

ここでは、細胞内情報伝達系に含まれる膜表在性蛋白質Phospholipase C- δ 1 (PLC- δ 1)の脂質膜への局在を制御するドメインであるPHドメイン (18 kDa)を対象とし、ドメイン中の5個のアラニン残基の側鎖メチル炭素を生成的に ^{13}C 標識した試料を使用した。PLC- δ 1 PHドメインは高等生物の細胞膜中に含まれるPhosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5) P_2)の極性頭部を特異的に認識し、高い親和性で結合するとともに、PtdIns(4,5) P_2 の極性頭部に対応する低分子Inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5) P_3)とも同程度の親和性で結合することが知られている。生体中においては、PLC- δ 1の基質であるPtdIns(4,5) P_2 と生成物であるIns(1,4,5) P_3 の存在量によりPHドメインの膜への局在が制御されると考えられている。[^{13}C]Ala標識PHドメイン-Ins(1,4,5) P_3 複合体 (10 mM MES pH6.5, 25 mM NaCl, 10 % glycerol, 0.025% NaN_3)の ^{13}C NMRスペクトル (Fig. 1bottom)と緩衝液 (20 mM KPi pH6.5, 1 mM DTT, 0.025% NaN_3)中にけん濁したPhosphatidylcholine (PtdCho) /PtdIns(4,5) P_2 ベシクルに結合した[^{13}C]Ala標識PHドメインの固体高分解能 ^{13}C NMRスペクトル (Fig. 1 top, middle)を比較した。PtdIns(4,5) P_2 結合部位から空間的に離れたC-末端およびN-末端 α -ヘリックスに含まれるAla21, Ala116およびAla118由来と考えられる14.5-15.8 ppmの信号の化学シフトはベシクルへの結合によりほとんど変化せず、これらの部位の構造は膜表面の環境により影響されていないことがわかる。これに対し、 β ストランド間のループ (β 5/ β 6ループ)に位置するAla88に帰属される信号は17.49 ppmから16.99 ppmへ高磁場シフトを示し、PtdIns(4,5) P_2 結合サイトに含まれないこのループが脂質膜表面との相互作用により構造変化していることを示す。また、 β 5/ β 6ループに接触する β 7ストランドに位置するAla112は化学シフトの不均一な分布とCP-MASスペクトルに見られる運動性の低下による信号強度の増加を示し、Ala88とは異なる相互作用による構造と運動性への影響を示している。これらの結果は膜表在性蛋白質が膜表面において実際に特異な構造をとっており、固体NMRにより残基レベルでその構造変化を解析できることを示している。脂質膜表面で観測されたPLC- δ 1 PHドメインの構造変化の特徴を基に、脂質膜表面におけるPHドメインの状態について考えられるモデルを提案する。

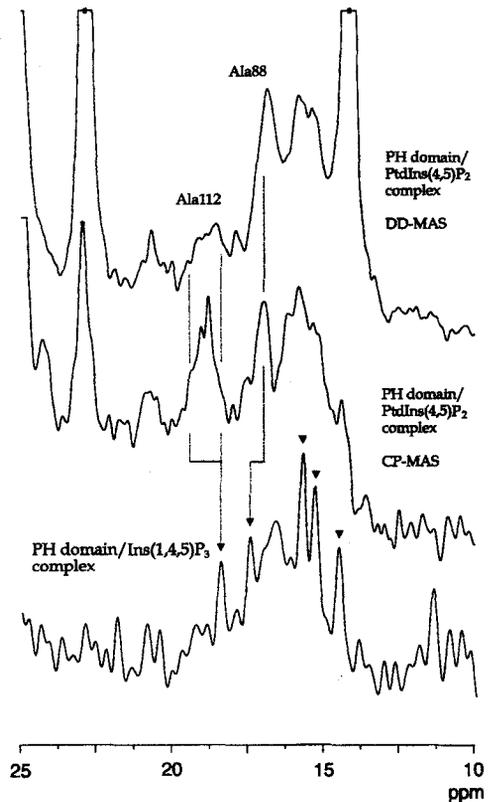


Fig. 1 ^{13}C NMR spectra of [^{13}C]Ala labeled PH domain / Ins(1,4,5) P_3 complex and [^{13}C]Ala labeled PH domain / PtdCho/PtdIns(4,5) P_2 vesicle complex.

3 L10

自発磁場配向膜を用いた膜結合生体分子の精密立体構造解析
(横浜国大院・工) ○内藤 晶、虎谷秀一、西村勝之

Determination of three dimensional structure of biomolecules bound to
magnetically oriented membrane

Graduate School of Engineering, Yokohama National University

Akira Naito, Shuichi Toraya, and Katsuyuki Nishimura

A couple of membrane systems that are spontaneously magnetically oriented were examined. It is demonstrated that a disk type and elongated vesicles can be spontaneously aligned to the magnetic field. These kinds of magnetic orientations are attributed to the magnetic anisotropy of lipid molecules. It is noticed that biomolecules strongly bound to the magnetically oriented membrane can also be aligned to the magnetic field. Using these magnetically oriented membrane systems, we have further demonstrated that melittin forms two helices and they rotate rapidly about the bilayer normal. We found that the chemical shift values oscillate in the case where the helical axes are rotating about the axis parallel to the bilayer normal. These chemical shift oscillations were turned out to provide detailed information on the dynamic structure of biomolecules bound to membrane.

1. はじめに

生体膜に強く結合している生体分子の詳細な構造、運動性、さらに膜に対する配向情報を得ることは膜結合生体分子が示す生理活性を理解する上で重要である。これまで膜に結合した生体分子の構造や配向はガラス膜に機械的に配向させた脂質二分子膜を用いて決定されてきた。最近、リン脂質と界面活性剤の混合脂質膜を強い磁場の中に入れると自発的に磁場に配向することが見つかっている。この自発磁場配向膜に強く結合する生体分子も磁場に配向すると考えられるので、この自発磁場配向脂質二分子膜を用いると膜に対する生体分子の配向情報を得ることができる。また、自発磁場配向膜はガラス配向膜に比べて十分に水和した条件で測定できる点に特徴がある。我々は脂質二分子膜にメリチン¹⁾やダイノルフィン²⁾等の生理活性ペプチドを混合することで、非常に配向能の高い自発磁場配向膜を形成することを見いだした。今回はこれらの膜を用いたより詳細な膜結合生体分子の精密立体構造決定の方法を中心に報告する。

2. 自発磁場配向膜の種類とその配向原理

通常分子は、完全な球状でない限り帯磁率の異方性を示す。すなわち、強い磁場の存在下で分子磁化の大きさは磁場の方向によって異なる値をもつ。この結果、分子磁化と静磁場

自発磁場配向膜、脂質二分子膜、ヘリックス構造、化学シフト振動、立体構造

ないとうあきら、とらやしゅういち、にしむらかつゆき

との相互作用により、磁場中の分子はエネルギー的に安定な方向が存在する。単独の分子の配向エネルギーは非常に小さいので、熱エネルギーによって配向は容易に乱されてしまい、配向状態を観測することは難しい。しかしリン脂質が液晶を形成する場合にみられるように、多数の分子が方向をそろえて集合体を形成する場合、集合体全体として配向することが可能となる。この場合、十分な磁場配向のエネルギーを確保するために集合体は球対称からずれた形をもつ必要がある。このような形態をもつ、バイセル、長楕円形小胞や赤血球に見られる扁平小胞を脂質が形成したとき通常脂質膜面を磁場に平行に向けて自発的に配向することが分かった。

3. 自発磁場配向膜に結合した生体分子の配向、構造、ダイナミックス

自発磁場配向膜に結合した生体分子の配向、構造、ダイナミックス情報が得られることを、酸性膜 DMPG に結合したメリチンについて詳しく研究した。メリチンは膜に結合したとき

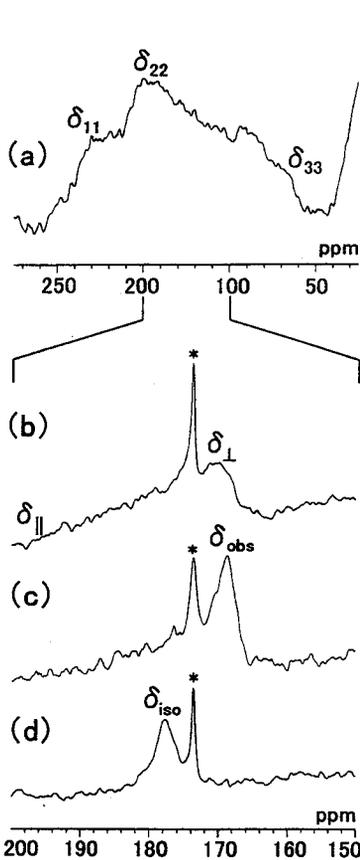


Fig. 1: ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -melittin bound to DMPG bilayers in the static at -60°C (a), and slow MAS (b), oriented (c), and fast MAS (d) conditions at 40°C .

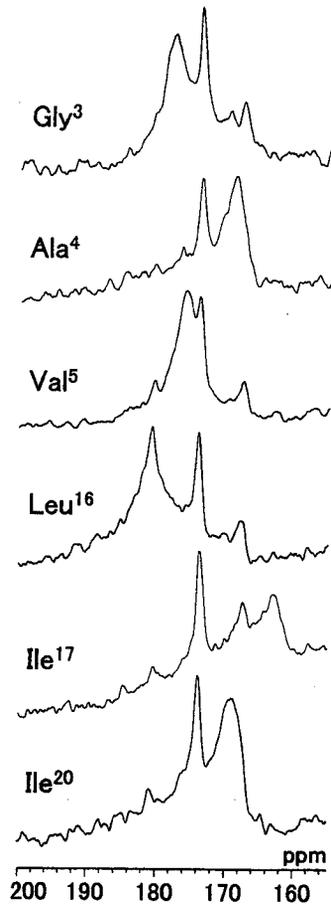


Fig. 2: ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^3$, Ala^4 , Val^5 , Leu^{16} , Ile^{17} , Ile^{20} -melittin bound to DMPG bilayers at 40°C .

2本の α -ヘリックスを形成して、このヘリックスが中央で折れ曲がった構造をとることが報告されている。今回、DMPG 膜に結合したメリチンも全体に渡ってヘリックス構造をとることが ^{13}C 標識したカルボニル炭素の等方化学シフト値と二次構造相関から明らかになった。標識したカルボニル炭素の ^{13}C NMR は静止状態の場合、図 1 (a)に示すように δ_{11} , δ_{22} , δ_{33} の主値で特徴づけられる広幅のスペクトルを示した。膜中の生体分子は液晶状態ではかなり自由に二次元拡散をしていると考えられる。生体分子が膜の対して一定の配向を保ちながら、二次元拡散をする場合、分子がある軸のまわりで回転する状態に等しくなり、広幅の線形は線幅の狭い軸対称線形に変化すると考えられる。実際 DMPG-メリチンの系において、図 1(b)に示すように液晶温度では軸対称線形を示した。このような線形は自発磁場配向膜の場合、100 Hz 程度の低速 MAS の実験によって配向を乱した結果、観測することが可能になった。次に回転を停止して自発磁場配向をした状態で信号を観測した結果、軸対称信号の δ_{\perp} エッジに信号が現れた(図 1(c))。このことは先に述べた分子の回転軸が磁場に垂直であることを意味している。また高速 MAS で求められた等方化学シフト値からペプチドの二次構造情報が得られる(図 1(d))。さらに、標識位置を変化させた試料で測定した結果、いずれの標識位置でも、配向状態では δ_{\perp} の位置に信号が現れた。加えて図 2 に示すように、各標識位置によって、信号の位置、すなわち δ_{\perp} の位置が大きく移動することが分かった。このような規則的な信号の位置の変化はメリチンの規則的な構造を反映していると考えられる。すなわち、メリチンは α -ヘリックス構造を形成しているので、この規則的な信号の変化はヘリックス構造を反映しているものと考えられる。そこで、図 3 に示すように隣り合うペプチド面は、 α -ヘリックスを形成しているとき 100° 角度がずれていることに注目し、さらにヘリックス軸とC=O軸が平行であり、加えて δ_{22} 軸とC=O軸が平行であると仮定した。すなわちヘリックス軸が一定の傾き角を保ちながら歳差運動する状態を考える。これらの条件の下に $\Delta\delta = \delta_{\perp} - \delta_{\parallel}$ を計算して $\Delta\delta$ とペプチド面のねじれ角 γ をプロットした結果、ヘリックス軸の分子の回転軸からの傾き角 ϵ が大きくなるにつれて大きな振幅の振動パターンを示すことが分かった。この振動パターンを化学シフト振動と名付けることにする。すなわちこの化学シフト振動パターンは以下に述べるようにヘリックスの特性を示す重要な情報を含んでいる。

- 1) 振動の振幅はヘリックス軸と回転軸の角度を決定する。
- 2) 振動の周期はヘリックスの性質を表している、周期が 100° の場合は α -ヘリックスを形成し、周期が 120° の場合は 3_{10} -ヘリックスを形成していると判断できる。
- 3) 振動の位相はヘリックス中での個々のペプチド面の位置を表している。

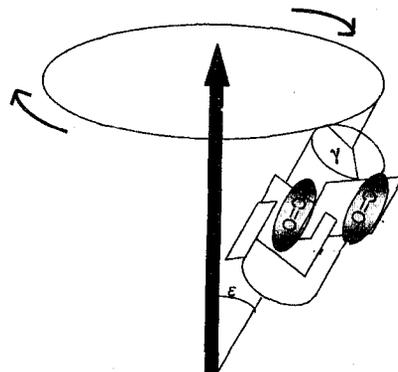


Fig. 3 : Precession of the helical rod of melittin

以上の情報からDMPG-メリチン膜系におけるメリチンの N 末端と C 末端のヘリックスは α -ヘリックスを形成しており、そのヘリックス軸は脂質膜法線と 30° の角度を保って二次元拡散する様子が明らかになった(図 5(a,b))。

4. メリチンによる膜分断の分子機構

これまで、メリチンは膜面に平行に結合するという説と膜に垂直に膜貫通状態であるとする説が提案されているが、今回の実験結果からメリチンが膜貫通状態であることが明らかになった。この結果から、メリチンによる膜分断機構を考察することが可能になる(図 5(c))。メリチンは相転移点以上ではモノマーとして存在し、膜内で速い二次元拡散をしている。しかし、メリチンは両親媒性ヘリックスを形成することから、膜中の疎水的な環境では必ずしも安定ではない。このため、温度が下がって、脂質の運動が束縛されると、親水面を内側にしてメリチンヘリックス同士で会合が起こり、疎水面を脂質に向けた構造を形成する。この会合が進むとメリチンに囲まれた脂質断片が円盤状断片になり可溶化して膜分断が起こると考えられる。

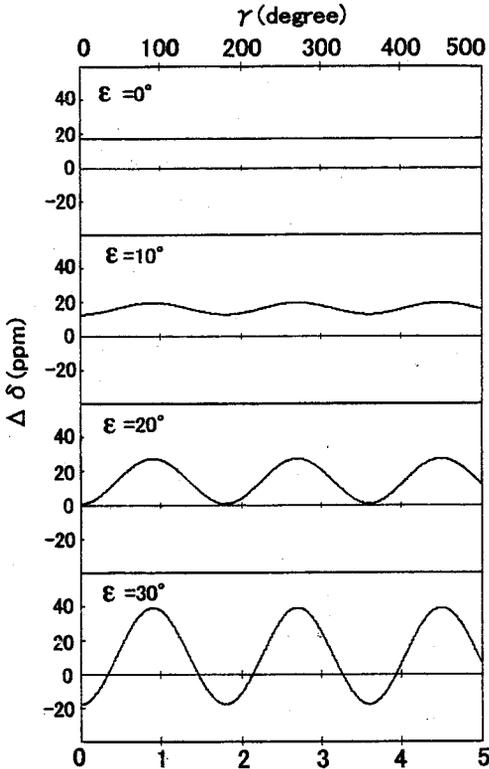


Fig.4: Plot of $\Delta\delta$ against phase angle γ of the peptide plane.

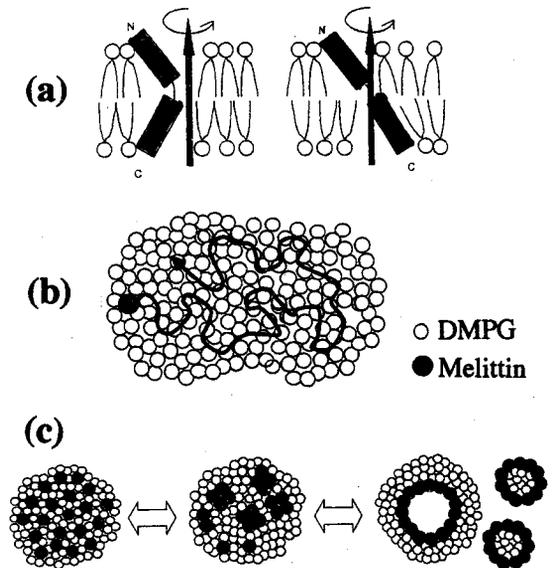


Fig. 5: Dynamic structure of melittin in the DMPG bilayers (a) and the process of lysis (b).

- 1) A. Naito et al., *Biophys. J.*, 78, 2405-2417 (2000).
- 2) A. Naito et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1558, 34-44 (2002).

3 L11

4.7Tesla 人体用 MRI における多核種多チャンネル同時測定法の構築
(国立環境研) ○三森文行、高屋展宏

Multinuclear/multichannel localized spectroscopy system using 4.7Tesla wholebody spectrometer

(National Institute for Environmental Studies) F.Mitsumori, N.Takaya

We are constructing a multinuclear/multichannel localized spectroscopy system on a 4.7 Tesla wholebody MRI. As the first stage, we built a method for $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ interleave measurements on the same localized volume in the same duration as a single nucleus measurement. A dual loop quadrature surface coil (8cm in diameter) was made for ^{31}P and successfully combined with a TEM head coil for ^1H . A STEAM sequence for ^1H and an ISIS sequence for ^{31}P were combined into one sequence in order to allow a quick interleave measurements using respective transmission/receive channel. The combined $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ localized spectroscopy sequence enabled us to obtain a ^1H spectrum with 4ms echo time and a ^{31}P spectrum from the same localized voxel in the human brain without extending the measurement time.

【はじめに】高磁場 MRI の最大の利点は検出感度の向上にある。これは化学シフト域の拡大と相まって、生体内代謝物の測定・解析 (MRS) に多大な恩恵をもたらすと思われる。一方、高磁場においてみられる T_1 の延長、 T_2 の短縮は単位時間当たりの検出感度の向上を逡減する。この T_1 延長による検出感度の逡減を回避し、高磁場の恩恵を十分に生かす一つの方法は、延長したパルス繰り返し時間 (TR) 内に単一核種の測定を行うのではなく、同時多核種の測定を実行することである。我々は、4.7Tesla 人体用 MRI 分光計に3つの送受信系を装備し、1TR 内において同一の局在領域から3核種測定を同時に実現する測定法の開発を進めている。今回は ^1H 、 ^{31}P の同時測定を行うため、2核種同調検出器の作製、 ^1H 測定のための極短エコー時間 STEAM 法と ^{31}P 測定のための ISIS 法を組み合わせたパルスシーケンスの開発、2台の送受信系を同時に駆動するためのシステムの構築を試みた。

【方法】Oxford Magnet Technology (OMT)社の4.7Tesla 磁石 (ボア径 925mm) を接続した Varian Inova 分光計に3個の送信系、4個の受信系を装備し、これをベースにしてシステム構築を行った。信号検出器は頭部測定用の transverse electromagnetic (TEM)型3核同調コイルを制作中であるが、2核同時測定のためには、頭部用 ^1H TEM 信号検出コイルと、自作の直径 3cm のリニア表面コイルまたは直径 8cm のデュアルループ quadrature 表面コイルを組み合わせ測定を行った。 ^1H 、 ^{31}P 両コイル間には重大なカップリングはみられなかった。

同一の局在化領域から2核の同時測定を行うにはいくつかの方法が考えられる。

- (1) コンピュータの異なるワークスペース上に ^1H 、 ^{31}P のそれぞれの測定条件を設定し、両スペースを交互に飛び移りながら2核測定を行う。
- (2) ^1H 、 ^{31}P に最適な局在化シーケンスを融合して2核の interleave 測定を行う。
- (3) 同一の局在化測定シーケンス (たとえば STEAM) を用い、 ^1H 、 ^{31}P の rf パルスと同時に送信し、同時に信号検出を行う。

Keywords: 高磁場 MRI, 多核種 NMR, 多チャンネル測定, ^1H スペクトル, ^{31}P スペクトル

みつもり ふみゆき、たかや のぶひろ

(1)は最も簡易な方法であるが、両スペース間の交互移動に時間を要し、パルス繰り返しを10秒以下に短縮できなかった。(2)は履歴の異なるパルスシーケンスを組み合わせるため、フェイズサイクリングの調整や重複するパラメータの排除等の注意を要するが、パルス繰り返し時間は十分短くできる。(3)は同時測定を実現できるが、両核で同じ空間領域を選択するためには rf パルスのバンド幅を γ 比に応じて調整するという難題が残り、2核の同時励起により両核の間で望ましくない相互作用が生じるおそれもある。本研究では(2)の方法を採用した。

^1H の局在化法としては、昨年動物機での報告を行った極短エコー時間を実現できるSTEAM法、 ^{31}P 局在化法としては T_2 による信号減衰を回避できるISIS法を選択し、両シーケンスの融合を試みた。

【結果と考察】単独のSTEAM法、ISIS法で測定パラメータの調整を行った後、融合した2核局在化法で測定を行った。ヒト脳の後頭葉領域で測定した ^1H スペクトルを図1(a)に、同時に測定した ^{31}P スペクトルを図1(b)に示す。 ^1H スペクトルでは水信号、頭部外皮からの脂質信号の抑圧とともに良好で、N-アセチルアスパラギン酸(NAA)、クレアチン(Cre)、コリン類(Cho)、グルタミン酸、タウリン、イノシトール等の代謝物が識別できる。 ^{31}P スペクトルではPCr、ATP、Pi、GPE、GPC等が観測された。これによって、測定時間を延長することなく、同一領域より ^1H 及び ^{31}P スペクトルを同時に測定できることを実証した。

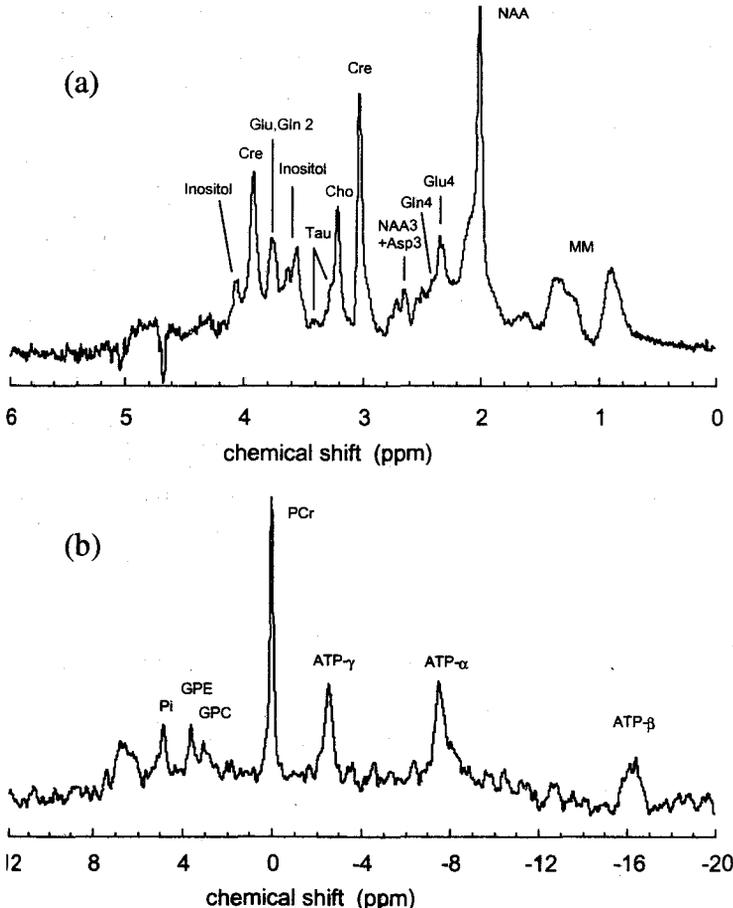


Fig.1. (a) ^1H , and (b) ^{31}P localized spectra obtained from $3\times 3\times 3\text{cm}^3$ voxel in the occipital lobe of human brain in the interleave manner.

Spectral width was 4000 Hz and the data points were 4K in each nucleus.

^1H spectrum was localized by STEAM with TR/TE/TM = 5000/4/33 ms. 128 transients were accumulated.

^{31}P spectrum was localized by ISIS with TR = 5000 ms. 128 transients were accumulated.

3 L12 宇宙飛行士用超軽量コンパクト MRI の開発

巨瀬勝美¹, 松田善正¹, 栗本岳明¹, 橋本征太郎¹, 山崎由香子¹, 拝師智之², 宇津澤慎²

吉岡大³, 中西昭男⁴, 岡田重益⁴, 遠藤政治⁴, 青木雅昭⁴, 津崎剛⁴

1 筑波大学理工学系, 2 (株) エム・アール・テクノロジー

3 筑波大学臨床医学系, 4 住友特殊金属 (株)

Development of a Light-weight and Compact MRI for Astronauts

K. Kose¹, Y. Matsuda¹, T. Kurimoto¹, S. Hashimoto¹, Y. Yamazaki¹, T. Haishi², S. Utsuzawa²

H. Yoshioka³, A. Nakanishi⁴, S. Okada⁴, S. Endou⁴, M. Aoki⁴, T. Tsuzaki⁴

1. Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 2. MR Technology Inc., 3. Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, 4. Sumitomo Special Metals Company Ltd.

Prototype MRI systems for bone density measurements of astronauts were developed by using permanent magnets and a portable MRI console. The MRI systems were specially designed to measure trabecular bone volume fraction at calcaneus using image intensity of 2D spin-echo MR images. Human studies with a small number (n=22) of female volunteers demonstrated a close correlation between trabecular bone volume fraction and bone stiffness measured by ultrasound. The results have shown a promise of the MRI system as a tool for bone density measurements in space.

1. はじめに

宇宙飛行などの微小重力環境下におかれると、宇宙飛行士の骨密度は、急速に減少することが知られている。このため、宇宙飛行士には激しい運動負荷が必要とされ、地上に帰還した後は、骨密度が計測される。ところが、国際宇宙ステーション計画では、宇宙飛行士の宇宙滞在は数ヶ月にも及ぶため、滞在中に定期的に精度の高い骨量計測を行うことが、宇宙飛行士の健康の点、そして宇宙医学の観点からも、大いに望まれている。

さて、骨密度計測には、現在、二重エネルギーX線吸収計測法(DXA法)や、定量的超音波法(QUS法)が広く使われているが、これらの手法では、面積骨密度や骨の硬さに関する情報は得られるものの、骨量の定量的評価に不可欠の海綿骨体積密度(Trabecular Bone Volume Fraction: TBVF)の計測は不可能である。そこで、TBVFの高精度の計測が可能と言われるMRIは、宇宙飛行士の骨量計測装置として、非常に有望である。

さて、MRIによってTBVFを計測する方法としては、次の3種類の手法が提案されている。第一は、高磁場(1.5T以上)において、海綿骨の部位における骨髄の T_2^* を計測する手法(1)、第二は、MR microimagingにより海綿骨構造を骨髄の信号を用いて描出し、海綿骨の体積を画素数より求める手法(2)、第三は、骨髄中のプロトン密度を画素強度により定量化して、骨髄の体積を求め、この相補的な量としてTBVFを求める手法(3)である。宇宙ステーションにおいては、小型・軽量化が最優先されるため、高磁場磁石を必要としない第三の方法が有効である。そこで、本研究は、小型・軽量化を目指した骨密度計測用MRIを構築することを目的として実施した。

2. システム開発

開発の方針として、まず、標準的手法で開発した永久磁石(磁石A)を用いてシステムを構築し、性能評価等を行った後、同様の磁石仕様で、磁石がどの程度軽量化できるかを検討した。Fig.1に、磁石Aを用いて構築したシステムの全体像と、軽量化した磁石(磁石B)を示す。いずれの磁石も、ギャップは

キーワード: MRI, 宇宙用MRI, 骨粗鬆症, 骨密度, 踵骨

こせかつみ, まつだよしまさ, くりもとたけあき, はしもとせいたろう, やまざきゆかこ, はいしともゆき, うつざわしん, よしおかひろし, なかにしあきお, おかだしげます, えんどうまさはる, あおきまさあき, つざきつよし

16cmであるが、磁石A、Bで、均一領域はそれぞれ13cm球、10cm球、磁石重量はそれぞれ約500kg、約200kgである。RFプローブとしては、両方の磁石に共通に、長円形の口径(長径21cm、短径8.4cm)を有するものを使用した。なお、磁石Bを使用した場合のシステムの総重量は、約280kgであった。

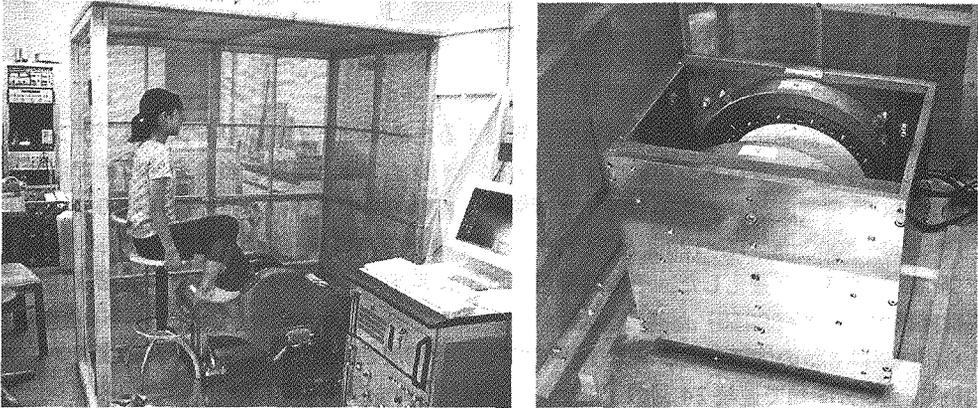


Fig.1 Overview of the compact MRI system for bone density measurements (left). Light-weight permanent magnet (right).

3. 骨密度定量化の方法

定量化に関しては、緩和時間と、静磁場・勾配磁場・高周波磁場の不均一性に関する項を、複数の画像で補正するという、前回の発表の通りであるが(4)、今回は、異なる被験者間のチューニング変化の影響を補正するために、以下のような考察の下に実験を行って補正法を開発した。

最初に標準的な被験者でチューニングを合わせ、その後、他の被験者の踵をプローブに挿入した時にチューニング条件が変化すると、受信と送信に関して次の現象が起こる。受信に関しては、同調回路の特性が変わることにより、NMR信号の強度・位相が変化する。この変化は、画像全体では一様な画素強度変化となるので、同時撮像したファントムによって補正が可能である。ところが、送信に関しては、チューニングが外れたことにより変化する送信パワーに対して、画素強度は、それぞれの場所における高周波磁場強度に応じて、非線形に変化するため、信号強度の補正には、複雑なプロセスが必要とされる。そこで、送信RFパワーを変化させたときの断層画像を取得し、「送信パワーの変化に対して、踵骨の計測領域と同様に強度変化するファントム領域を感度補正に使用する」という手法を考案した。これにより、被験者毎にチューニング条件が変化し、それによって送信RFパワーが変化しても、精度の高い補正が可能である。

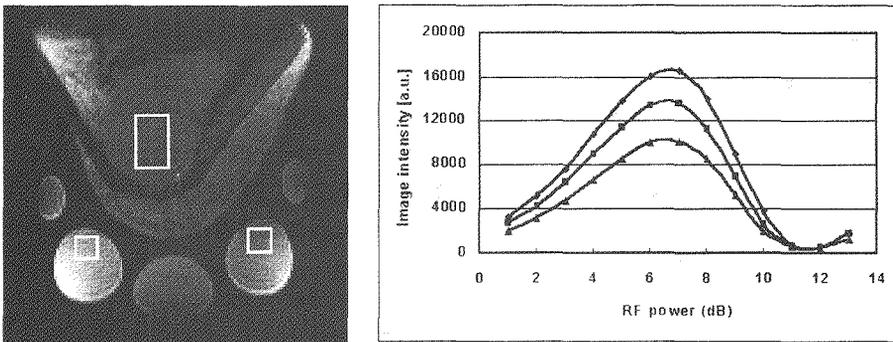


Fig.2 2D images acquired with a spin-echo sequence (TR=1200 ms, TE=12 ms). The square regions were used for the intensity correction. The right figure shows RF power dependence of the image intensity measured and averaged over the squares.

Fig.2の左の画像は、踵骨の垂直な断面であり、図中のファントムと踵骨の矩形領域の画素強度を、送信 RF パワーに対してプロットしたものが、右のグラフである。このように、適切な領域を指定することにより、送信パワーが変化しても、それに比例して画素強度が変化する領域を確保し、画素強度補正を行うことが可能である。

4. プロトン密度ファントムによる評価

前の節に述べた計測法の線形性と再現性を評価するために、まず、プロトン密度ファントムを用いた計測を行った。プロトン密度ファントムは、オレイン酸と四塩化炭素を体積比で混合することにより、体積密度が0.2~1.0まで0.1間隔で9種類のものを作成した。これらのファントムを、TR=800~4000ms、TE=12msとTE=96msの2種類のスピン・エコー法で計測し、上記の手法でプロトン密度を定量化した。その結果を Fig.3 に示す。このように、プロトン密度に対する良好な直線性 ($R^2=0.99958$) が得られた。

さらに、プロトンの体積密度が0.7(踵骨のプロトン密度と同程度)のプロトン密度ファントムを用いて、10分間隔で連続24回の密度計測(TR=1200ms、TE=12msと96msのスピン・エコー撮像)を行い、密度計測の再現性を検証した。その結果を Fig.4 に示す。このように、変動係数(Coefficient of Variance: CV値、標準偏差/平均値)として、0.53%を得た。

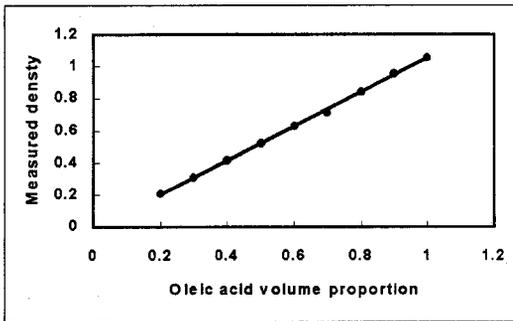


Fig.3 Linearity of the measurements

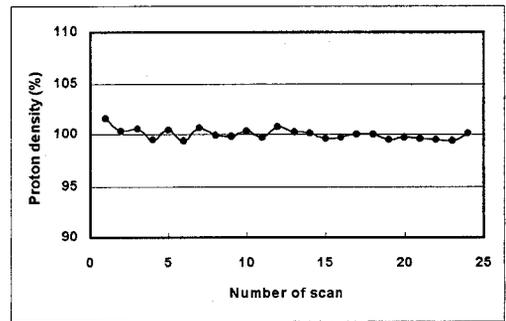


Fig.4 Reproducibility of the measurement

5. 健康人ボランティアによる評価

本システムの有効性を検証するために、比較的均一な被験者集団を用いた、定量的超音波計測法との比較計測、および長期的再現性のための計測を行った。

<定量的超音波計測との比較>

年齢18~23歳の女性健康人ボランティア22名に対し、実験の内容を詳細に説明し、同意を得た上で、MRIによる計測と、定量的超音波計測(QUS)を実施した。QUSは、米国Lunar社のAchilles1000+であり、MRI、QUSともに右足を計測した。なお、MRIではスライス厚は10.5mmとした。Fig.5に、QUSで得られたstiffness(超音波の音速と、透過超音波の減衰度の周波数依存性から得られる骨の硬さの指標)に対する、MRIで得られた海綿骨骨密度を示す。このように、 $R^2=0.4107$ と、有意な相関を示した。

<長期的再現性の計測>

上記の22人の被験者に対して、週2回、連続5週間(合計10回)のMRI計測を行い、そのうち、計測プロトコルが安定化した後期の8回の計測に対して、CV値を算出した。Fig.6は、4回目と7回目の計測値の相関を示す。CV値は、個人によってかなり異なり、2.2~5.3%であった。

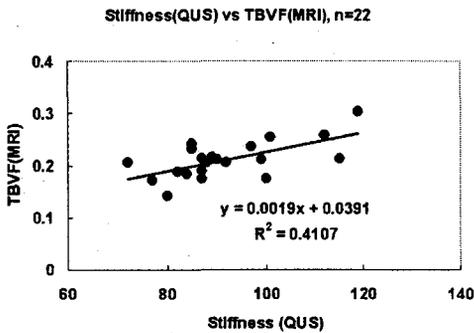


Fig.5 Trabecular bone volume fraction in the calcaneus plotted against "stiffness" measured using Quantitative Ultrasound.

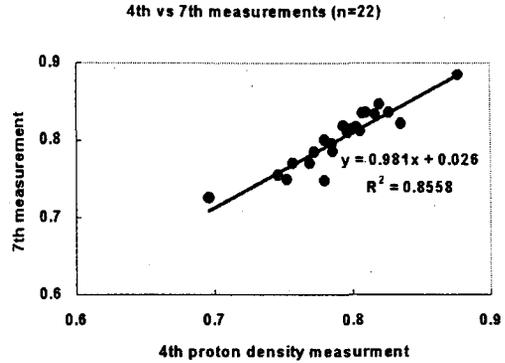


Fig.6 Correlation between two measurements performed at about two weeks interval.

6. 考察

超音波により得られた stiffness と、MRI で計測された海綿骨骨体積率は、有意な相関を示したが、物理量そのものが異なるため、相関が高いことに積極的意味があるわけではない。しかしながら、踵骨を対象とした、DXA と QUS の相関係数 (R^2) は、0.2~0.4 と報告されており、もし、DXA と MRI による TBVF が高い相関を持つものであるとすれば、今回得られた相関係数は、合理的なものと思われる。MRI に比肩する定量計測法が存在しないことと、破壊的計測がほとんど不可能なために、計測の信頼性を直接的に実証することは困難であるが、さまざまな傍証などによって信頼性を高めていきたい。なお、被験者の長期的計測においては、ファントムにおいて得られた CV 値に比べて4倍程度の値が得られ、また、個人的には大きなばらつきが見られた。これに関しては、植物油ファントムの緩和時間の温度変化、電気系の安定性など、検討すべき項目は非常に多く、これらを一一つ検討していく必要がある。

7. むすび

宇宙飛行士が、宇宙ステーションなどで使用するための骨密度計測用 MRI のプロトタイプを開発した。現在、総重量は約 280kg、設置面積は約 4m²、長期的なヒトの計測に対する CV 値は最良のケースで 2.2% であるが、今後、このシステムを出発点として、1. 軽量化 (総重量数 10kg 以下)、2. コンパクト化 (設置面積 1m² 以下)、3. 計測の再現性の向上 (CV 値 0.5% 以下) をめざしたい。このためには、磁石のギャップを狭くし、静磁場強度も 0.1T 程度まで低くする必要があり、計測系の全面的見直しも必要である。なお、この技術開発で得られる成果は、MRI のコンパクト化、軽量化に対して、大きな寄与となることが期待され、地上における多様な MRI の実現にも貢献することになると思われる。

References

1. Wehrli FW, Hopkins JA, Hwang SN, Song HK, Snyder PJ, Haddad JG. Cross-sectional study of osteopenia by quantitative magnetic resonance and bone densitometry. *Radiology* 217, 527-538, 2000.
2. Wehrli FW, Hwang SN, Ma J, Song HK, Ford JC, Haddad JG. Cancellous bone volume and structure in the forearm: noninvasive assessment with MR microimaging and image processing. *Radiology* 206, 347-357, 1998.
3. Fernandez-Seara MA, Song HK, Wehrli FW. Trabecular bone volume fraction mapping by low-resolution MRI. *Magn. Reson. Med.* 46: 103-113, 2001.
4. 第40回NMR討論会講演要旨集34-37.

3 L13

T₁緩和時間によるラット脳室周囲器官（脳弓下器官・下垂体後葉）毛細血管の水透過性の測定

(京都府立医大・一生理¹、奈良女子大・生活環境学部・生活健康²、精神神経センター神経研³、岐阜大・医学部・一生理⁴、生理学研・分子生理⁵)

○瀬尾芳輝¹、鷹股 亮²、荻野 孝史³、森田 啓之⁴、村上 政隆⁵

Water permeability of capillaries in the subfornical organ of rats determined by T₁ relaxation time measured by ¹H magnetic resonance imaging.

(¹ Dept. of Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, ² Dept. of Environmental Health, Nara Women's University, ³ Dept. of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, ⁴ Dept. of Physiology, School of Medicine, Gifu University, ⁵ Dept. of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Yoshiteru Seo¹, Akira Takamata², Takashi Ogino³, Hironobu Morita⁴, Masataka Murakami⁵

The water permeability of capillaries in the subfornical organ (SFO) of rat was measured by a ¹H NMR imaging method in combination with a venous injection of a relaxation reagent: gadolinium-diethylene triamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid (Gd-DTPA²⁻). Judging from results of Gd-DTPA²⁻ dose dependency in the intact brain and the the blood-brain barrier (BBB) permeabilized brain, Gd-DTPA²⁻ could not have leaked out from the capillaries in the cortex, thalamus or SFO, but it could have been extravasated in the posterior lobe of the pituitary gland. The longitudinal (T₁) relaxation time of water in the SFO region was measured by inversion-recovery MRI at 4.7 T. The 1/T₁ before and after Gd-DTPA²⁻ infusion were $0.70 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ (mean \pm SEM, n=9) and $1.53 \pm 0.11 \text{ s}^{-1}$ (n=9), respectively. The rate constant for water influx to the capillaries was estimated to be $0.84 \pm 0.11 \text{ s}^{-1}$ (n=9) which corresponds with a diffusive membrane permeability (P_d) of $3.7 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$. Compared with values found in the literature, this P_d value of the capillaries in SFO was the same order as that of transmembrane permeability of water of the vasa recta, and it may be 10 - 100 times larger than that of the BBB in the cortex. From these results, we conclude that the capillaries in SFO have one of the highest water permeability values among all of the capillaries in the brain.

【はじめに】 脳組織は血液脳関門(BBB)と呼ばれる堅固な血管内皮構造により、体液の電解質や浸透圧の変動による影響から守られている。第3脳室・第4脳室周辺には、脳室周囲器官(CVOs)と呼ばれる特殊な領域があり、BBBの透過性が高い。CVOsは、脳の体液調節中枢が体液で生じた変化を見る「窓」の役目をしていると考えられている。種々のマーカーを用いた測定が行われているが、水についての透過性を測定した例はない。今回、T₁緩和試薬 gadolinium-diethylene triamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid (Gd-DTPA²⁻) と T₁緩和時間測定法を用い、ラット脳弓下器官と下垂体後葉部位の組織毛細血管のGd-DTPA²⁻と水の透過性を検討したので、報告する。

キーワード： 水分子、脳血液関門、脳弓下器官、T₁緩和時間、緩和試薬

せおよして、たかまたあきら、おぎのたかし、もりたひろのぶ、むらかみまさたか

【方法】Wistar 系ラットをガス麻酔下に、左大腿静脈内にカテーテルを留置した。頭頂部に直径 23mm の表面コイルを設置し、Biospec4.7/40 (4.7 T)内に固定した。測定には ParaVision2.1.1 を用いた。500 mM Gd-DTPA²溶液を注入し、細胞外液濃度が 10 mM 程度(7 - 15 mM)になるように調整した。脳組織の信号強度の変化を 30-60 分間にわたり T₁ 強調 MR 画像で測定した。高速磁場反転エコー法(GEFI) を用い、FOV 2.5 x 2.5 cm、データサイズ 128 x 128、スライス 1 mm、パルス繰り返し時間(TR) 100 msec、エコー時間(TE) 4.2 msec、9 スライス、2 回積算、積算時間 30 sec で測定した。その前後に、高速磁場反転 T₁ 画像法(Fast-T1MRI)で、T₁ 緩和時間を測定した。FOV 2.5 x 2.5 cm、データサイズ 128 x 128、スライス 1 mm、RARE factor 16、積算 2 回、磁場反転パルスおよびサンプリングパルスには adiabatic pulse と Gauss pulse を用い、10 個の recovery delay を測定した。

【結果および考察】

T₁ 強調画像の強度変化による水透過性の定性的評価 ラットに Gd-DTPA²を注入しても、視索上核や室傍核などを含め、脳実質のほとんどの部位の信号強度は変化しなかった。矢状断面像では、脳弓下器官(SFO)と下垂体部に顕著な信号強度の増加が見られた。T₁ 緩和時間を測定すると、SFO 部位の T₁ 緩和時間の短縮が認められたが、皮質・視床部位では変化しなかった(表 1)。また、三次元血管造影法(3D-MRA)により、血管構築との関係を確認し、この部位に巨視的な血管あるいは大きな体積を占める血管の無いことを確認した。解剖学的にも、血管体積は 2-4%程度であり、T₁ 強調画像強度への寄与は無視できる。以上より、T₁ 強調画像法により、Gd-DTPA²により T₁ 緩和時間が短縮した部位を高信号領域として検出できることが示された。

高張溶液(25% マンニトール)を内頸動脈から注入し BBB を破壊することにより、Gd-DTPA²が BBB を透過するか否かを確かめた。図 1 に示すように、堅固な BBB を持つ皮質や視床などは、Gd-DTPA²注入によっても信号強度は変化しないが、BBB を破壊すると、即座に Gd-DTPA²が間質に流れ込み T₁ が短縮し、信号強度の増加が認められた。本来、BBB の存在しない下垂体前葉や皮膚などは、Gd-DTPA²が最初から血管内から間質に流れ出ているので、BBB の破壊操作に影響されない。一方、SFO では、Gd-DTPA²注入後増加した信号強度は安定したレベルを示したが、BBB の破壊により、さらに大きく上昇した。また、下垂体後葉では、Gd-DTPA²注入後増加した信号強度は BBB の破壊によっても変化しなかった。よって、SFO 部位の毛細血管は Gd-DTPA²を透過せず、一方、下垂体後葉では、Gd-DTPA²を透過すると結論した。以上の結果から、血管内外の 2 コンパートメントでの水交換モデルを考え、SFO 部位の毛細血管の水透過性を求めることにした。

毛細血管水透過性の推定 T₁ 測定値から SFO 毛細血管の拡散水透過係数を、Farby & Eisenstadt(1975, 1978)の方法により、以下の条件の下に求めた(図 2)。

- 1) 血管内に注入した Gd-DTPA²により緩和速度の大きくなった水分子が毛細血管を介して交換することにより、組織の緩和速度は 2 成分(R_s, R_f)になる。
- 2) 遅い緩和速度 R_s は、血管外組織の緩和速度 R_e と水の交換速度 k により、 $R_s = R_e + k$ と表される。
- 3) 拡散水透過係数(P₀)は、 $P_{dB} = k_e \cdot V_e / A_v$ と求められる。ここで、V_e、A_v は、血管外組織の体積と毛細血管の表面積である。解剖学的知見から A_v/V_e は、227 cm とした。

Table 1. T_1 relaxation rate constants (sec^{-1}) of SFO, cortex and thalamus, and differences (ΔR) due to Gd-DTPA^{2-} injection.

	Control	After Gd-DTPA^{2-}	ΔR
SFO*	0.695 ± 0.016 (n=9)	1.532 ± 0.114 (n=9)	0.836 ± 0.109 (n=9)
Cortex	0.663 ± 0.013 (n=9)	0.749 ± 0.017 (n=9)	0.086 ± 0.023 (n=9)
Thalamus	0.699 ± 0.027 (n=4)	0.792 ± 0.060 (n=4)	0.093 ± 0.040 (n=4)

Note: n is number of animals. * indicates statistically significant difference between the control value and values after the Gd-DTPA^{2-} injection. ($p < 0.05$).

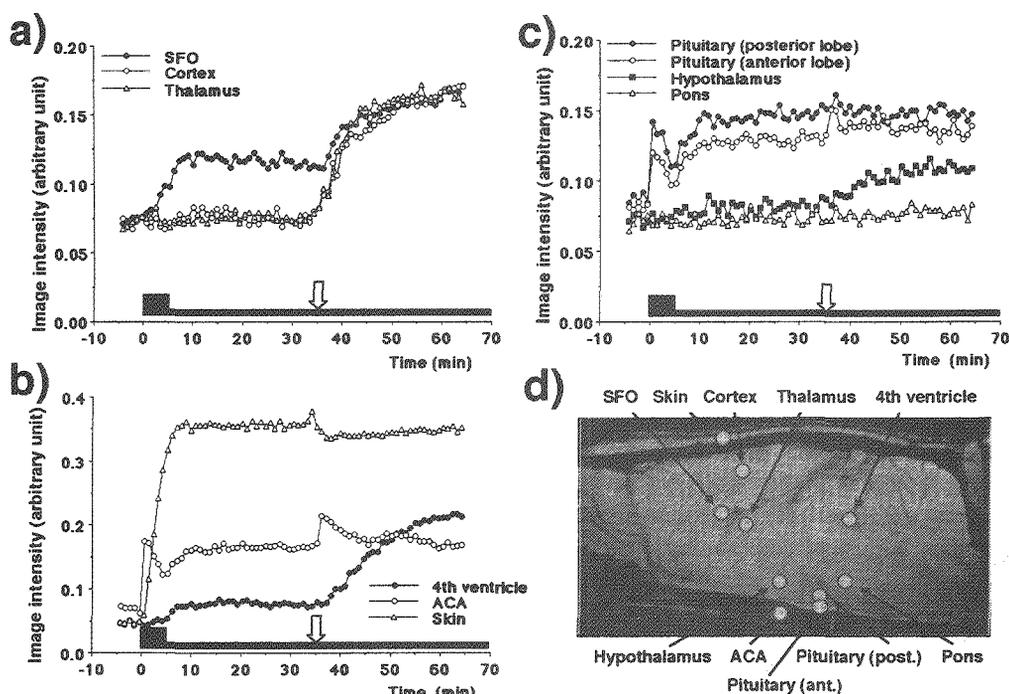


Fig. 1 Transient changes in the signal intensity of the T_1 -weighted images and the T_1 relaxation rates of rat brain when the BBB was permeabilized due to hyperosmotic stress. After 5-min under control conditions, Gd-DTPA^{2-} was injected for 4 min at a rate of 0.57 mmol/min/kg body weight (black box), then maintained at a constant infusion rate of 0.14 mmol/hr/kg body weight (bold line). After 35 min of the Gd-DTPA^{2-} infusion, 25% mannitol solution (5 ml/kg body weight) was injected from the internal carotid artery (open arrow), which made capillaries in the right hemisphere permeable, including the mid-sagittal part of the thalamus, hypothalamus, and the midbrain. a) - c) Changes in T_1 -weighted image intensity of a single voxel ($195 \times 195 \times 1000 \mu\text{m}$) were plotted every 56 sec. (d) The positions of the 10 ROIs are shown superimposed on a sagittal image of the brain.

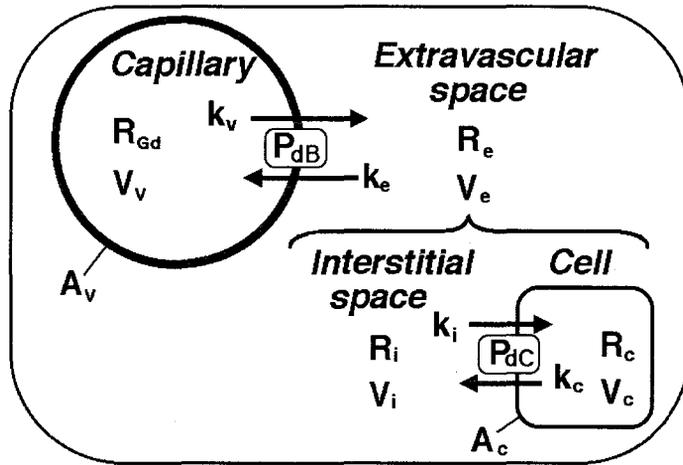


Fig. 2. A kinetic model for water exchange in the subforminal organ based on Gd-DTPA impermeable capillaries.

Table 2. Transepithelial diffusive and hydraulic water permeability

Tissues	P_d ($\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}$)
Subforminal organ (rat)	3.7×10^{-3}
Vasa recta (rat)	2×10^{-3}
Muscle capillary (dog)	2.8×10^{-4}
Outer medullary collecting tubule (rabbit, 37°C)	5.8×10^{-4}
MDCK monolayer (type I, 20°C)	2.6×10^{-4}
Bladder epithelium (guinea pig, 37°C)	$4.6 - 8.6 \times 10^{-5}$
	L_p ($\text{cm s}^{-1} \text{atom}^{-1}$)
Blood-brain barrier (rabbit)	3×10^{-7}
Vasa recta (rat)	3.1×10^{-5}

SFO部位の T_i 緩和速度の変化量 ($0.84 \pm 0.11 \text{ s}^{-1}$, $n=9$) と A_v/V_e 比から、毛細血管を介しての拡散水透過係数(P_d)は、 $3.7 \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ と求めることが出来た。表2に代表的な上皮膜での水透過係数のデータを示す。SFOにおける水透過性は、水透過性の高い腎臓直血管とほぼ同程度の値である。水透過性の低い腎臓皮質ネフロンの集合管や、ほとんど水透過性がない膀胱上皮細胞に比べ、10 - 100倍の値を示している。脳毛細血管については、水力学的水透過係数(L_p)での報告がなされている。両透過係数は、直接に比較することは出来ないが、腎臓直血管のデータを対照とすると、正常なBBBを形成する毛細血管に比べ、SFOの毛細血管は100倍程度高い水透過性を持っていると考えられる。よって、SFOの神経細胞は、体液で生じた浸透圧やpHの変化、おそらく電解質組成の変化も容易に検出する事ができるであろう。また、室傍核や視索上核の部位が正常なBBBと同様な低い水透過性を示したことから、体液調節機構に於いて、SFOがセンサーとしての役割を果たしているという仮説を支持できる。以上のように、本方法を用いれば、従来では測定できなかったin situでの脳組織毛細血管の水透過性を測定でき、生理学的病学的応用に適用できる。

ポスター発表要旨

根粒菌 FixJ 蛋白質 C 末端ドメインの高次構造と DNA との相互作用の解析
 (横浜市立大学大学院・総合理学研究科¹, 理化学研究所・遺伝生化学研究室²,
 CREST・JST³, 理化学研究所・生体物理化学研究室⁴)

○倉島かおり^{1,2}, 伊藤 隆^{1,2,3}, 柴田武彦^{1,2,3}, 田村浩二⁴, 中村寛夫^{1,4}, 城 宜嗣⁴

Solution structure of the FixJ C-terminal domain and its interaction with DNA

Kaori Kurashima^{1,2}, Yutaka Ito^{1,2,3}, Takehiko Shibata^{1,2,3}, Koji Tamura⁴, Hiro Nakamura^{1,4},
 Yoshitsugu Shiro⁴

¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, ²Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN, ³CREST/JST, ⁴Biophysical Chemistry Laboratory, RIKEN Harima Institute

The FixL/FixJ system is a primary regulator of expression of nitrogen fixation related genes in Rhizobia. FixL is a paradigm for heme-based oxygen sensor protein, whilst FixJ is a response regulator protein. The C-terminal of FixJ(FixJC) remains yet to be analyzed at atomic resolution. Therefore we have initiated the NMR analysis of the C-terminal domain of FixJ in order to determine its solution structure and to understand the structural basis for specific recognition of the promoter regions of *nifA* and *fixK*.

Complete backbone and side-chain assignment has been performed using triple-resonance NMR spectroscopy. The solution structure of FixJC determined from NOE-derived distance restraints consists of five α -helices, exhibiting structural similarity with the C-terminal transcription activator domains of other response regulator proteins, such as NarL. Toward understanding the recognition mechanism of FixJC for DNA, NMR titration experiments wrently with the target DNA sequence extracted from *fixK* promoter region are in progress.

【序】根粒菌の窒素固定反応は、FixL/FixJ 二成分情報伝達系によって制御されている。細胞内が低酸素状態になると、FixL のセンサードメインにあるヘム鉄から酸素が遊離し、この結果 FixL のキナーゼドメインが活性化され、FixJ がリン酸化される。リン酸化された FixJ は *fixK* 及び *nifA* プロモーターと結合し、窒素固定に必要な FixK・NifA 蛋白質の合成を誘導する。我々は、FixJ の DNA 結合ドメインである C 末端ドメインを単離し (FixJC)、NMR による立体構造決定を行った。さらに FixJC と *fixK* プロモーター配列との相互作用の解析を進めているのでこれらを報告する。

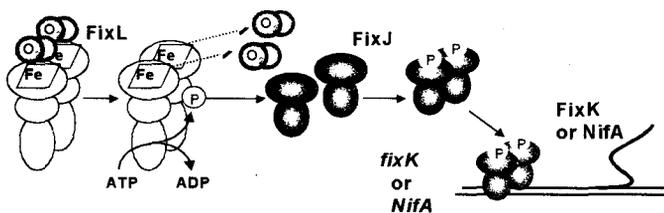


Fig1. Schematic representation of FixL/FixJ two component signal transduction system.

At low oxygen concentration, FixL dissociates O₂ from the heme in the sensor domain and enhances autophosphorylation activity in the kinase domain to phosphorylate FixJ. FixJ consists of the N-terminal phosphoryl receiver domain and C-terminal transcriptional activator domain. Upon phosphorylation, the receiver domain dimerizes, leading to enhancement of the DNA binding affinity.

Key Words :

The C-terminal domain of FixJ, Structure Determination, Protein-DNA Interaction, Titration

くらしまかおり, いたうゆたか, しばたけひこ, たむらこうじ, なかむらひろお, しろよしつぐ

【実験】 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル標識をされた FixJC を用い、主鎖 $^1\text{H}_\text{N}$ 、 ^{13}C 、 ^{15}N 核の帰属のためには $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC、CBCA(CO)NNH、CBCANNH、HNCO、HN(CA)CO を、側鎖 ^{13}C 、 $^1\text{H}_\text{C}$ 核の帰属のためには $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC、HBHA(CO)NNH、H(CCCO)NNH、(H)CC(CO)NNH、HCCH-TOCSY を測定した。原子間の距離情報を得るために、3D ^{15}N separated-NOESY、3D ^{13}C separated-NOESY を測定した。全ての測定は Bruker 社 DRX600 を用い、298K で行った。データ処理及び解析は、それぞれ Azara、Ansig ソフトウェアを用いて行った。高次構造計算は CNS ソフト上で Ambiguous NOE を用いて行った。

【結果・考察】NMR 実験より、主鎖と側鎖の NMR シグナルの帰属を完了した。合計 2990 個の Unambiguous NOE と 698 個の Ambiguous NOE 距離情報に Chemical Shift Index からの二面角情報及び水素結合情報を加えて高次構造計算を行った結果、主鎖原子の RMSD で 0.715 Å の高次構造を計算することができた (Fig2)。FixJC は 5 つの α -helix で構成されており、他の Response Regulator の転写活性ドメインと同様に DNA と相互作用するとされている helix-turn-helix モチーフを保持していることが分かった。現在では、fixK プロモーター領域である DNA との相互作用を見ることを目標に DNA 結合領域の特定を行っている。

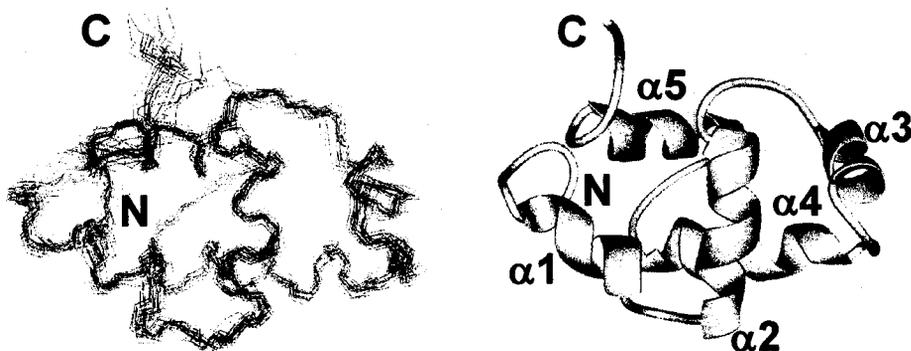


Fig2. Solution structure of FixJC.

Backbone overlays of an ensemble of 20 selected structures on basis of having lowest energies in 80 calculated structures (left) and ribbon representation of structure closest to that of the mean of ensemble (right).

Starting from picked, normalised and partially assigned NOE cross-peaks, two separate lists, one of unambiguous NOE restraints, the other of ambiguous restraints, were thus produced by "connect" program in Azara software to normalize peak intensities into four categories, and obtain two separated lists, one of unambiguous restraints, the other of ambiguous restraints. The distance restraint files, along with the hydrogen bond and dihedral angle information, were input into CNS-based protocols and subjected to a simulated annealing protocol. The RMSD of backbone atoms and all heavy atoms are 0.715 Å and 1.093 Å, respectively.

Development of an NMR Apparatus for Supercritical Water Experiments

(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University)

○M. Mukaide, Y. Urasaki, F. Amita, H. Oka, O. Kajimoto, K. Takegoshi, and T. Terao

We have developed an NMR apparatus for studying organic reactions under the supercritical water (SCW) condition. The apparatus utilized the flow method to instantly generate the SCW condition and directly follow the reaction rate by changing the reactant flow rate. A sample tube durable at the SCW condition as well as a high-pressure high-temperature seal connecting the Si_3N_4 sample tube to a nonmagnetic metal flow tube had to be developed to realize the flow system. With this apparatus, the proton chemical shift of SCW was measured. In addition, we will discuss the merits and problems of flowing method in NMR measurements in terms of integrated intensity of NMR spectra.

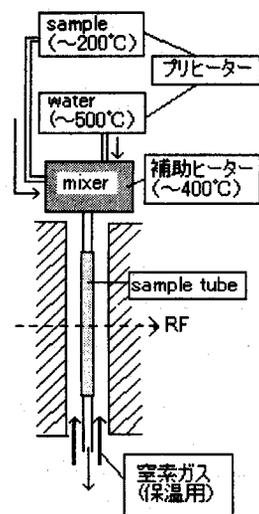
1. 序

これまで超臨界水中での有機反応は、バッチ法あるいは流通法を用いて行い、化学種の同定には UV、IR が用いられてきた。しかし、より確実な同定法としては NMR が最も有効な分光学的手法である。我々は超臨界水の急速混合による流通法と NMR を組み合わせるために加熱装置と高温高压用 NMR プロブを開発した。この装置を用いて 40MPa、400℃の超臨界状態が実現され、さらに、超臨界水の ^1H -NMR スペクトルの化学シフトの温度、密度変化が再現された。また、 ^{13}C 核との比較を含めて流速に伴うスペクトルの強度の変化についても調べた。

2. 流通型 NMR 装置 (図 1 参照)

HPLC ポンプで水および試料(ここでは水)をプレヒーターに送り込み、それぞれ 500℃および 200℃に加熱し、ミキサーを介して急速混合させ、瞬間的に臨界温度以上を実現した。さらに混合後の放熱による

温度低下を防ぐため、ミキサーの周囲に補助ヒーターを取り付けて冷却を抑えた。サンプルチューブには非磁性のセラミック Si_3N_4 (内径: 3mm)を用い、熱電対をチューブの上下から挿入してコイル中心の温度評価を行った。さらに加熱した窒素ガスをチューブ下部より吹き込み、保温を行うことにより、40MPa、400℃の超臨界水の ^1H -NMR スペクトルの測定に成功した。 ^1H の共鳴周波数は 300MHz、ピークの半値全幅は 8~15Hz であった。



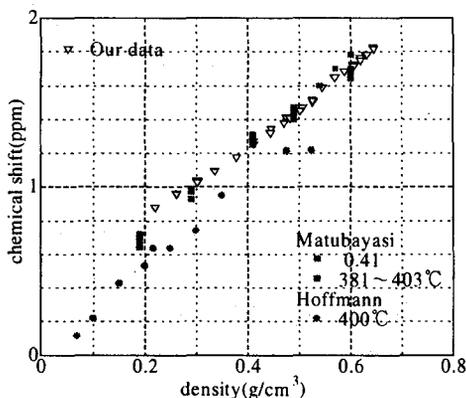
(図 1. 装置の概略)

キーワード: 超臨界水、流通型 NMR、高温高压

むかいでまさのぶ、うらさきようへい、あみたふじつぐ、おかひろゆき、かじもとおきつぐ、たけごしきよりの、てらおたけひこ

3. 超臨界水の ^1H -NMR スペクトルの温度、密度変化 (化学シフトに関する議論)

流速 5ml/min、圧力 18~40MPa、360~400℃の範囲で水の NMR スペクトルの化学シフトを測定した。密度変化に伴う磁化率補正を適用し、標準を Matubayasi のデータにおける密度 0.41g/cm^3 、 403°C 、 1.25ppm として密度と化学シフトの関係をプロットした(図2)。Matubayasi、Hoffmann のデータと比較した結果、化学シフトの温度、密度変化がほぼ再現された。



(図2. 超臨界水の NMR スペクトルの化学シフトの温度、密度変化)

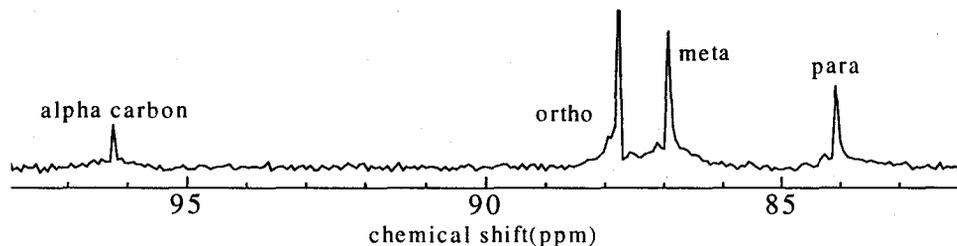
4. 流通法による ^1H 、 ^{13}C 核の測定結果の比較と検討 (積分強度に関する議論)

流通法では、測定位置での試料の成分構成が一定であるので、積算回数は任意に増やすことができる。また、緩和を待つ必要がないので、緩和時間が非常に長い核に対しても、短時間に積算を重ねることができることが解った。さらに、積分強度に関する流速の影響を調べるために、パイレックスガラス管(内径: 2.6mm)をプローブに貫通させ、HPLC ポンプで試料を送液して、流速によるスペクトルの積分強度の変化を調べた。試料にはジオキサン、トルエンを用い、 ^1H 、 ^{13}C -NMR スペクトルをそれぞれ流速が 2~10ml/min の場合において比較したところ、流速の増加に伴う積分強度の減少が観測された。これに対し、単純な理論によれば FID は次式のように表され (l : 検出部の幅 (20mm))、

$$f(t) = \begin{cases} (1-vt/l)f_0(t) & (0 \leq t \leq l/v) \\ 0 & (l/v \leq t) \end{cases} \quad f_0(t): \text{流速 } 0 \text{ における FID}$$

「スペクトルは広幅化するが、積分強度は流速によらず不変」になる。本実験においては ^1H よりも ^{13}C 核の場合に積分強度が減少し、特にトルエンの α 炭素の積分強度が著しく減少することが確認された(図3)。この傾向から、縦緩和時間 T_1 が比較的長い場合には、観測パルスを照射する段階までに磁化が十分に進まず Boltzmann 平衡に達していないことが原因と考えられた。

なお、この現象は前述した超臨界水と常温の水の ^1H -NMR スペクトルの比較からも確認された。



(図3. トルエン(100%)の ^{13}C -NMR スペクトル(流速: 2ml/min))

・reference

N. Matubayasi, C. Wakai, M. Nakahara, *J.Chem.Phys.* 107, 21, 1997

M. M. Hoffmann, M. S. Conradi, *J.Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 3811-3817

P3

高分子量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
(東大院薬系¹、産総研・BIRC²) ○宮沢真由美¹、西田紀貴¹、中西民二¹、
坂倉正義¹、寺沢宏明¹、高橋栄夫²、嶋田一夫^{1,2}

Development of NMR methods for determining the interfaces of a large protein complex.

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, ² Biological Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Mayumi Miyazawa¹, Noritaka Nishida¹, Tamiji Nakanishi¹, Masayoshi Sakakura¹, Hiroaki Terasawa¹, Hideo Takahashi², Ichio Shimada¹

The cross-saturation method enables us to identify the contact residues of large protein complexes in a more rigorous manner than is possible using conventional NMR methods. In the present work, we examined the elements that affect the result of the cross-saturation experiments by comparison of the result obtained from NMR experiment with that calculated from a computational simulation method. The cross-saturation method is difficult to apply to protein complexes with a molecular weight over 150 K and/or with a weak binding affinity. To overcome these limitations, we carried out the cross-saturation measurements under conditions of a fast exchange between free and bound states on the NMR time-scale, and determined the contact residues of the complex of the B domain of protein A and intact IgG, which has a molecular mass of 164kDa and shows weak binding.

[序] 交差飽和法はタンパク質複合体界面残基を同定する NMR 測定法である。例えば、タンパク質 I-II 複合体の系において交差飽和法を適用する場合、タンパク質 I の非交換性プロトンを ²H で、主鎖アミド基を ¹⁵N 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。この複合体に脂肪族プロトンの周波数を持つラジオ波を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。タンパク質 I のシグナル飽和は、交差飽和と呼ばれる磁氣的相互作用により、タンパク質 II の界面近傍のプロトンにも伝播する。したがって、ラジオ波照射を行った複合体の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルにおいて、照射を行っていない場合のスペクトルと比較して顕著なシグナル強度減少を示す残基を、界面残基として同定できる。

本研究では、①交差飽和法の測定精度に及ばず要因をシミュレーションに基づいて検討した。また、②現測定法において測定対象とならない、分子量 150 K を超えるタンパク質複合体および結合親和性の低い複合体に対して交差飽和法の適用を行い、高分子量タンパク質複合体の相互作用解析法の確立を目指した。

転移交差飽和法、タンパク質-タンパク質相互作用、HR-MAS

みやざわまゆみ、にしだのりたか、なかにしたみじ、さかくらまさよし、てらさわひろあき、たかはしひでお、しまだいちお

①交差飽和法の測定精度に影響する要因の検討

[方法] 黄色ブドウ球菌細胞壁タンパク質であるプロテイン A の B ドメイン(FB)と免疫グロブリン Fc フラグメントとの複合体を用いて行った交差飽和実験の結果を、FB/Fc 複合体の結晶構造に基づいて行った交差飽和実験のシミュレーション結果と比較した。

[結果・考察] シミュレーション結果と測定結果との比較から、交差飽和法から得られる界面残基の同定精度には、検出するタンパク質の重水素化率およびそのタンパク質を構成するアミノ酸残基の運動性が影響することが明らかになった。

②高分子量タンパク質複合体界面同定に向けた交差飽和法の展開

[方法] FB と免疫グロブリン G(mouse IgG1)は分子量 164K の高分子量タンパク質複合体を形成し、比較的弱い結合 ($K_A=3.81 \times 10^4[M^{-1}]$ 、 $k_a=2.59 \times 10^4[M^{-1}s^{-1}]$ 、 $k_d=0.68[s^{-1}]$)を示す。この複合体を対象として、IgG に対して過剰量存在する FB の非結合状態に由来する NMR シグナルを観測して界面を同定する、転移交差飽和法の開発を行った(Fig. 1)。その際、FB と IgG の量比、ラジオ波照射時間について検討を加えた。

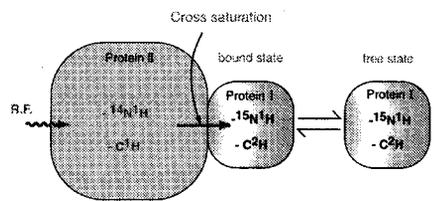


Fig. 1 Principle of the transferred cross-saturation method.

[結果・考察] 2H および ^{15}N で均一標識した FB を非標識 IgG に対し 5 倍量加えた FB - IgG 複合体溶液を調製し、ラジオ波照射時間 2 秒の条件で交差飽和法を適用した。その結果、界面残基に由来したシグナルに交差飽和による強度減少が顕著にみられた(Fig. 2)。以上の結果より、弱い相互作用の系を利用した転移交差飽和法を確立するとともに、本手法を利用して、分子量 150 K を超えるタンパク質複合体の界面残基を同定することを可能とした。

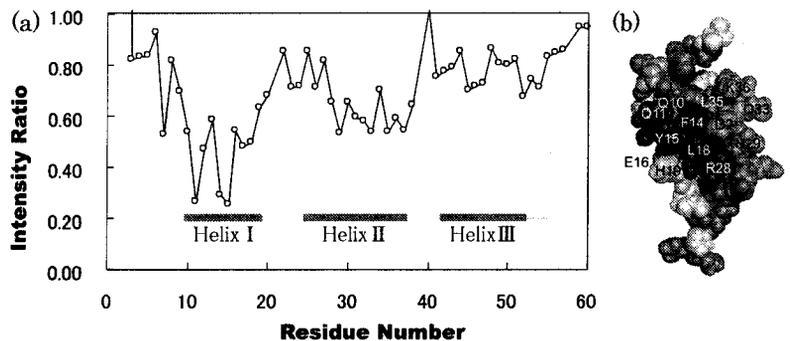


Fig. 2 The result of the transferred cross-saturation experiment (a)Plots of the intensity ratios of the cross-peaks originating from the backbone amide groups with/without irradiation. (b)The IgG-binding site of the FB. Residue numbers with intensity ratios less than 0.6 are shown.

また本手法は、極めて弱い相互作用系

($K_A=1.28 \times 10^3 [M^{-1}]$)に対しても適用可能であることが確認された。さらに、HR-MAS プローブを用いて試料をマジック角で高速回転さ

せることにより、交差飽和実験における飽和移動の効率を減弱させることが見出されたことから、MASを行うことにより高分子複合体に対する交差飽和実験において問題となるスピン拡散現象を抑制する効果が期待できる。

今後、転移交差飽和法は様々な生体物質間の相互作用解析において、非常に強力なツールとなることが期待される。

Gel-Phase NMR のタンパク質への応用(奈良先端大バイオ¹、三菱化学生命研²)○小林俊達¹、河野俊之²、三島正規¹、児嶋長次郎¹**Application of the Gel-Phase NMR to the Protein***¹Graduate School of Biological Science, Nara Institute for Science and Technology, and ²Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)*O Toshitatsu Kobayashi¹, Toshiyuki Kohno², Masaki Mishima¹ and Chojiro Kojima¹

Gel-phase NMR has been used to monitor the product of the solid-phase synthesis in the combinatorial chemistry approach. It does require a conventional NMR tube filled in the solid support, but does not require a special hardware. For the rare nuclei, such as ¹³C, ¹⁹F, and ³¹P, the gel-phase NMR can give a good spectrum. For ¹H, however, the signal is very broad (≥ 100 -300Hz). Thus, it has been believed that the gel-phase NMR cannot be applicable for the proteins. Here, the ¹⁵N-enriched GST-fusion human ubiquitin was attached to the glutathione sepharose resin. The ¹H-¹⁵N HSQC spectrum under the gel-phase showed that all the ubiquitin signals were detectable with similar chemical shifts as those of ubiquitin itself, and that the interaction between the GST-ubiquitin and the yeast ubiquitin hydrolase 1 were also detectable. These results demonstrate the gel-phase NMR is applicable to the protein and the protein - protein interactions.

[緒言]

レジン上に固定した化合物をNMRによって解析するGel-phase NMR法は、固相合成において反応生成物がレジンからの開裂により不安定を増大する系での構造決定や、反応生成物をレジンから開裂させ解析する'cleave and analyze'法で多く利用される¹⁾。このGel-phase NMR法は、溶液NMRの溶媒条件を適切なバッファーで膨潤させたgelに変更したものであり、それ以外は溶液NMRの測定と何ら変わるところが無い。Gel-phase NMRでは¹³C、¹⁹F、³¹P等が観測されてきた。しかし固体/溶液という不均一系では、個々の分子が受ける静磁場の影響に均一性を求めることは難しく、特に¹Hに関してはNMRシグナルの線幅の顕著な増大(¹H; ≥ 100 ~300Hz)という重大な問題が生じる。この問題のために、Gel-phase NMR法をタンパク質等の生体高分子へ応用する事は難しいものと考えられてきた。しかし、Gel-phase NMR法をタンパク質等の生体高分子に応用できれば、単純な溶液状態で追試できないプルダウンアッセイによるタンパク質間相互作用の結果をNMRによる詳細な解析が可能になる。今回、我々はGel-phase NMRによって相互作用部位等の検出をプルダウン的に解析を行う系の確立を目指し、レジン吸着条件下でのタンパク質¹H-¹⁵N HSQCの観測について検討した結果、良好な結果が得られたのでここに報告する。

プロテオミクス研究、相互作用解析、Gel-Phase NMR、HSQC、GST-fusion protein

こばやしとしつ、こうのとしゆき、みしまさき、こじまちょうじろう

[試料]

本研究では、GST 融合ヒト由来 Ubiquitin (GST-Ub) を用いた。GST および Ub 間のリンカー長はアミノ酸残基数10、15、20、25および30とした。これらリンカー長の異なる5種類の GST 融合 Ub を15N 均一標識化タンパクとして大腸菌内で発現させ、精製し、溶液条件およびレジン固定条件で、 ^1H - ^{15}N HSQC を測定した。Buffer 条件は 10mM Phosphate (pH6.5)、50mM KCl である。溶液条件においてそのサンプル濃度は 1.3mM であり、レジン固定化条件では 0.8mM である。レジンには Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) を使用した。また、レジン上でのタンパク質・リガンド相互作用検出の可否を検討するため、Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 (YUH1) を大腸菌内で発現させ、精製した。

[結果]

1. レジン上での ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの測定 リンカー長の異なる 5 種の GST-Ub をバッチ法によりレジンに吸着させ、Bruker 社製 DRX800 を用いて ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。シムはサンプルと同量の 10% D_2O を含む純水を用いて調整した。Fig.1 にリンカー長 15a.a. GST-Ub の、溶液条件及びレジン吸着条件での ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示す。これらスペクトルの比較から、レジン吸着条件下でもタンパク質のシグナルが観測可能であることが確認された。また、GST-Ub の HSQC スペクトルにおいて、GST 由来のシグナルはほとんど観測されなかった。

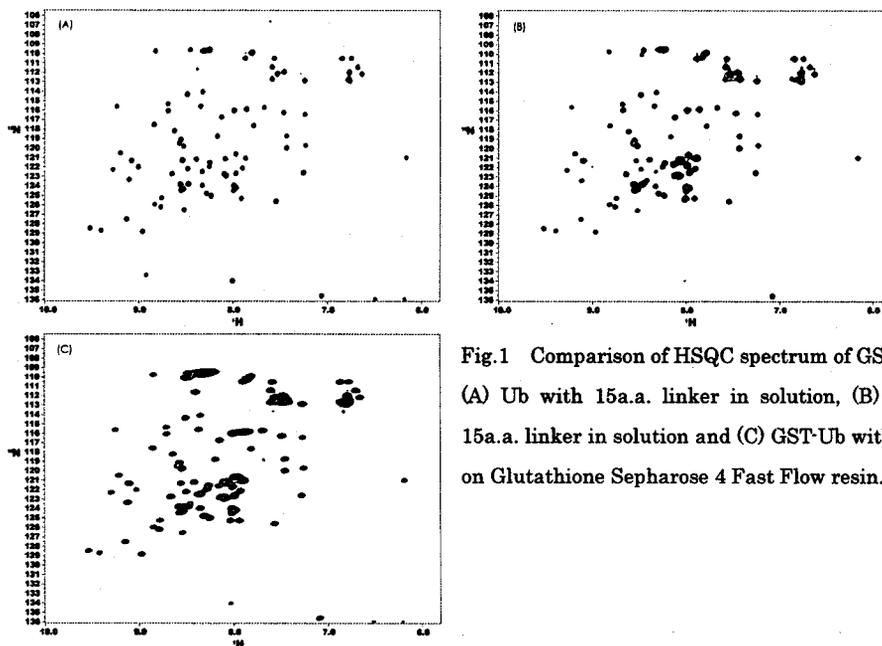


Fig.1 Comparison of HSQC spectrum of GST-Ub.

(A) Ub with 15a.a. linker in solution, (B) GST-Ub with 15a.a. linker in solution and (C) GST-Ub with 15a.a. linker on Glutathione Sepharose 4 Fast Flow resin.

2. リンカー長とユビキチン運動性の相関 レジン吸着条件下での GST-Ub のより良好なスペクトルを得るため、最適リンカー長の決定を試みた。リンカー長と Ub の運動性の相関を調べることを目的として、リンカー長 10、20 および 30a.a. の GST 融合 Ub における Ub の T1、T2 を測定し、回転相関時間 τ_c を求めた。Table1 に結果を示す。GST-Ub が示す τ_c 値から算出した Ub の見かけの分子量は、2量体を形成する GST-Ub の実際の分子量とは異なり、1/2 以下の値を示した。また、リンカー長は τ_c に影

響を与えず、リンカーを構成するアミノ酸残基数が 10 から 30 の間においてリンカーの長さ と Ub の運動性には相関が無いことが示唆された。

Table 1 Correlation of Linker length and τ_c .

Linker length (a.a.)	Mw.	τ_c (ns)	Mw. ^{app}
Ubiquitin only	9028	5.63 ± 0.06	16630 ± 192
10	70218	9.56 ± 0.29	29221 ± 957
20	71478	9.86 ± 0.44	30211 ± 1454
30	72738	9.61 ± 0.49	29386 ± 1618

Molecular weight of GST-Ub (Mw.) was calculated as a dimer form. The apparent molecular weight (Mw.^{app}) was calculated from $\tau_c = 4/3 \pi \eta_w k_B^{-1} T^{-1} [(3/4 V M_r \tau^{-1} N_A^{-1})^{1/3} + r_w]^3$. η_w is the viscosity of the solvent, k_B is Boltzmann's constant, T is the temperature, V is the specific volume of protein ($V = 0.73 \text{ cm}^3/\text{g}$), N_A is Avogadro's constant, and r_w is hydration layer surrounds the protein ($= 1.6 \text{ \AA}$)².

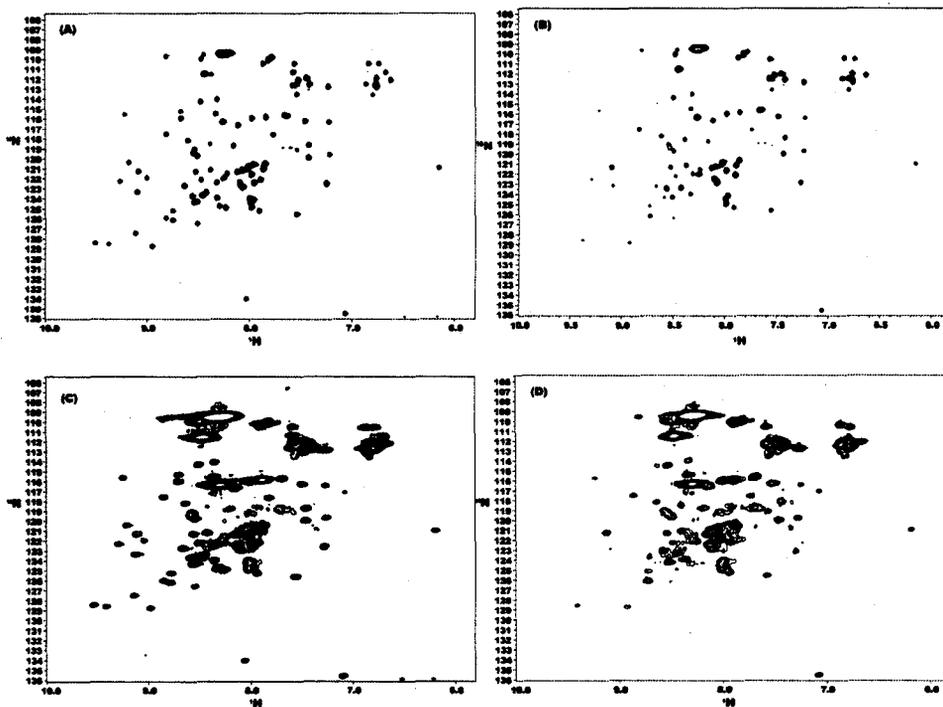


Fig. 2 ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of GST-Ub involved 30a.a. linker with or without YUH1 obtained solution condition and absorbed on resin condition. (A) GST-Ub in solution, (B) GST-Ub with YUH1 in solution, (C) GST-Ub on resin and (D) GST-Ub on resin with YUH1.

3. レジン上での Ub-YUH1 相互作用の検出 レジン吸着条件下におけるタンパク質-リガンド相互作用の検出の可能性を検討するため、レジン吸着条件下のリンカー長 30a.a. GST-Ub に対し、10:1 となるよ

うYUH1を加えて ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを観測し、溶液条件下で同様にして測定した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルと比較した。Fig.2にレジン吸着条件下および溶液条件下での HSQC スペクトルの変化を示す。溶液条件下における GST-Ub、YUH1間の相互作用によって生じるシグナルの変化のパターンが、レジン吸着条件下で再現された。

[考察]

結果 1 において、溶液条件下での GST-Ub の ^1H - ^{15}N HSQC で、GST 由来のシグナルはほとんど観察されなかった。これは、(1) GST は2量体を形成するため、2量体形成に由来する運動性の減少によって GST 由来のシグナルの線幅が広がり、かつ(2)リンカーの存在によって Ub の運動性が GST より増加し(結果 2: 見かけの分子量が実際の分子量と比較して低下)Ub 由来シグナルの線幅が減少したためと考えられる。またこの結果から、小さなタンパク質やペプチドは GST 融合条件下においてもそのまま立体構造解析が行えると考えられる。

結果 2 においてリンカー長 10, 20 および 30a.a. の GST-Ub に関して τ_c を解析したところ、リンカー長と τ_c との間に相関は見られなかった。この結果から、GST-Ub 間のリンカー長は 10 残基で十分な運動性を与えると考えられる。

結果3において、溶液条件下における GST-Ub と YUH1 との相互作用によって生じるシグナルの変化のパターンが、レジン吸着条件下で再現された。この結果はレジン吸着条件下においてタンパク質-リガンド相互作用の検出が可能であることを示す。また Ub-YUH1 複合体が約 35kD であることを考慮すると、より大きなタンパク質でもこの系で HSQC 等のスペクトルの観測が可能かもしれない。

[まとめ]

今回、我々はリンカーの存在およびシム調整の工夫によって ^1H の線幅を抑え($\leq 50\text{Hz}$)、レジン吸着条件下タンパク質のシグナルの観測を行うことに成功した。またレジン吸着条件下でのタンパク質-リガンド間相互作用の検出に成功した。これらの結果を通して、当初目的としていた Gel-phase NMR によって相互作用部位等の検出をプルダウン的に解析を行う系を確立することが出来た。

MAS-NMR のように特別な装置を必要としない Gel-phase NMR は、その構造的制限が無いことから容易に HPLC と接続することが可能となる。これは取りも直さず Gel 上に吸着させた物質の相互作用の検出を、サンプルの消費を最低限に抑制しつつ高効率で行う事が可能であることを意味する。このような理由から、今回研究を行った Gel-phase NMR のタンパク質へ応用は、NMR を用いた相互作用のプルダウンアッセイに用いるだけでなく、タンパク質間ネットワークの解析を網羅的・体系的に行うプロテオミクス研究を推進する上で重要な意味を持つと考えられる。

- 1) Keifer, P.A. , Drug Discovery Today, (1996), 2, 468-478.
- 2) Cavanagh, J. et al., Protein NMR Spectroscopy, (1996), 16-19.

外部複基準法によるケミカルシフトの温度依存性の
測定：体積磁化率の温度依存性の考慮
(福井大・機セ) 田宮 由香, ○水野 和子

Temperature Dependence of Chemical Shifts Determined by the External Double Reference Method: Consideration of Temperature Dependence of Volume Magnetic Susceptibility

Yuka Tamiya and Kazuko Mizuno, Center for Instrumental Analysis, Fukui University

By the external double reference method, observed chemical shifts are corrected in terms of in situ difference in the bulk volume magnetic susceptibilities between sample and reference solutions. In the present paper, temperature dependence of chemical shifts are obtained by taking into consideration of temperature dependence of bulk magnetic susceptibility of the reference solution and correcting observed data in terms of the temperature-dependent term, in addition to the bulk susceptibility terms.

[はじめに] 昨年度、濃度や溶媒が異なる試料溶液のケミカルシフトを比較するための測定方法として、1)補正に必要なバルクの体積磁化率の差を in situ に得られる Momoki and Fukazawa による方法が有効であること、2)我々はこの方法に加えて、基純物質のピークのケミカルシフトの温度依存性を考慮することで、試料のケミカルシフトの温度依存性を求めることができる(外部複基準法)ことを報告した¹。しかしながら、これまでの方法では、試料と基準物質溶液の体積磁化率の温度依存性までも考慮してこなかったため、本研究ではこの項を考慮して、ケミカルシフトの厳密な補正のための式を提出する。

[実験] 先端を球状にした内管にヘキサメチルジシロキサン($(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ (HMDO)を封入して、試料として水とメタノールを1℃からそれぞれ沸点付近までの温度領域でケミカルシフトを測定した。得られたデータを25℃のHMDOのピークを基準として Unified scale 上で表す。 ^1H と ^{13}C -NMRをJEOL EX-400で測定した。EX-400の表示する試料の温度を、あらかじめ試料管内に熱電対を入れて検定した。

[結果] Fig. 1は基準の温度 T_r と測定温度 T で、Lock をかけないで、温度だけを変化させて測定した場合の共鳴位置と外部磁場の遮蔽の関係を表している。先端が球状の細管に基準物質を封入すると、シリンダー(cy)と球(sp)部分が異なる大きさの遮蔽を受けて2本の共鳴ピークが現れ、それらの間隔はバルクの体積磁化率の差と球の形状因子に比例する。球の形状が理想的な時、spの共鳴が0ppmに相当する。Fig.1では遮蔽が全く無い状態を H_0 とし、右へいくほど、遮蔽のために余分に必要な磁場がプラスされて共鳴が起きることを表している。重要なことは、試料溶液と基準物質溶液の両方について、溶媒のバルクの遮蔽効果を、それぞれの温度について考慮しなければならないことである。

外部複基準法・ケミカルシフトの温度依存性・体積磁化率の温度依存性

たみやゆか・みずのかずこ

Fig.1 で、Tでのケミカルシフトは、Tでの 0ppm を基準として

$$\delta_{\text{cor}(T)}^T = mS_{\text{cy}}^T - mS_{\text{sa}}^T = \delta_{\text{obs}}^T + \Delta\delta^T$$

で表されるのに対して、Trでの 0ppm を基準とする unified scale では、

$$\delta_{\text{cor}(Tr)}^T = mS_{\text{cy}}^{Tr} - mS_{\text{sa}}^T$$

で表さなければならない。式の誘導の結果のみを示すと、

$$\delta_{\text{cor}(Tr)}^T = \delta_{\text{obs}}^T + \Delta\delta^T + 4\pi(\chi_r^T - \chi_r^{Tr})/3 + \Delta\delta_{\text{cy}}(T)$$

となる。χ_rは基純物質の体積磁化率、Δδ_{cy}(T)はFig.1に示すように、δ_{cy}のTrの時の値からの温度変化によるずれである。当日は水とメタノールについての実験結果を示す。

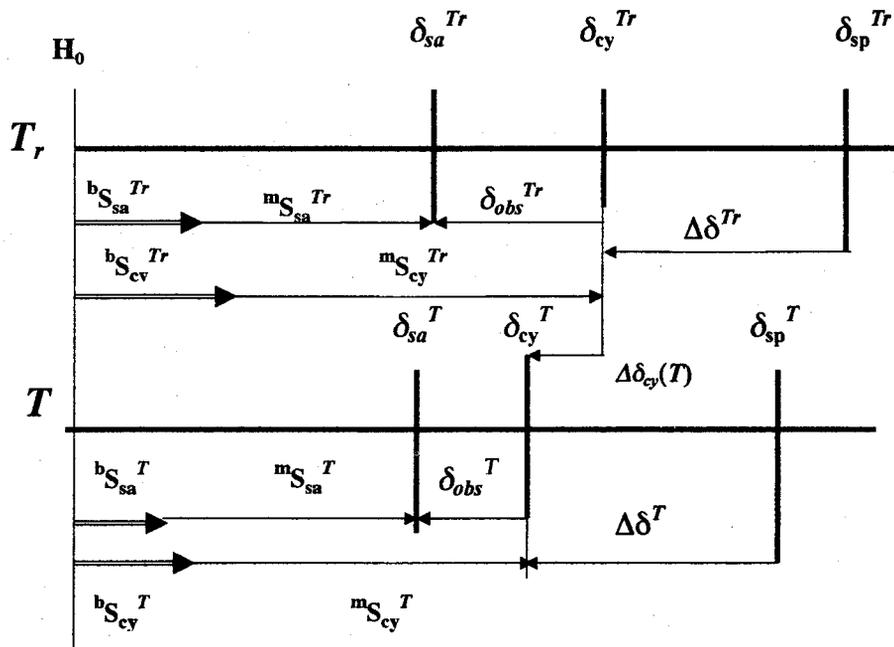


Fig.1 Shielding of external magnetic field by a sample and a reference substance at T_r and T . The superscripts b and m refer to "bulk" and "molecular", respectively.

1.水野和子 第40回NMR討論会講演要旨集, P87, P90, 298, 304(2001)

BIRD-J-resolved HMBC and BIRD-HR-HMBC,
New Method for Measuring Proton-Proton Coupling Constants

K. Furihata and H. Seto*

Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo

* Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture

In study of stereochemistry of organic compounds by NMR, It is important to analyze proton-proton spin coupling constants. In polyketide antibiotics, the spin system which included methyl group ($-\text{CH}_A-\text{CH}_B(\text{CH}_3)-\text{CH}_C-$) exists a lot. In such a spin system, proton H_B splits complicatedly. It becomes difficult to observe spin coupling constants from the multiplet signal of H_B . In stereochemistry study, it becomes important to analyze proton spin couplings of such H_B which splits complicatedly. We present two new NMR techniques BIRD-J-resolved HMBC¹⁾ and BIRD-HR-HMBC in order to overcome this problem.

NMRによる有機化合物の立体化学の研究は、プロトン-プロトンのスピン結合定数の解析から始まる。ポリケタイド抗生物質にはメチル基を含んだスピン系 ($-\text{CH}_A-\text{CH}_B(\text{CH}_3)-\text{CH}_C-$) が多く存在する。このようなスピン系において、メチンプロトン H_B は複雑に分裂し、ビシナルプロトンとのスピン結合定数を読みとることが困難になる場合がしばしばある。このような複雑に分裂した H_B のプロトンにおいて、スピン結合を解析することが立体化学研究のうえで重要になる場合がある。

このような複雑なスピン系でのプロトン-プロトンのスピン結合定数を観測する目的で新しく BIRD-J-resolved HMBC、BIRD-HR-HMBC法を検討し良好な結果を得ることが出来たので報告する。

パルス系列

図1にBIRD-J-resolved HMBC、BIRD-HR-HMBC-2,3、BIRD-HR-HMBC-1のパルス系列を示す。HMBC法の磁化は、炭素の化学シフトと、プロトン-プロトンのスピン結合で展開している。しかし、 Δt_1 は短く設定されるため、小さなスピン結合が検出できるほどには $t_{1,max}$ を展開していない。例えば $F_1=30000\text{Hz}$ で512点測定しても $t_{1,max}$ は17msecに過ぎない。そのために、 F_1 方向では、スピン-スピンカップリングを検出するのは不可能である。HMBC法において、long range C-Hスピン結合定数を検出するためには、磁化を J_{CH} で展開し、 $t_{1,max}$ を300msから500ms

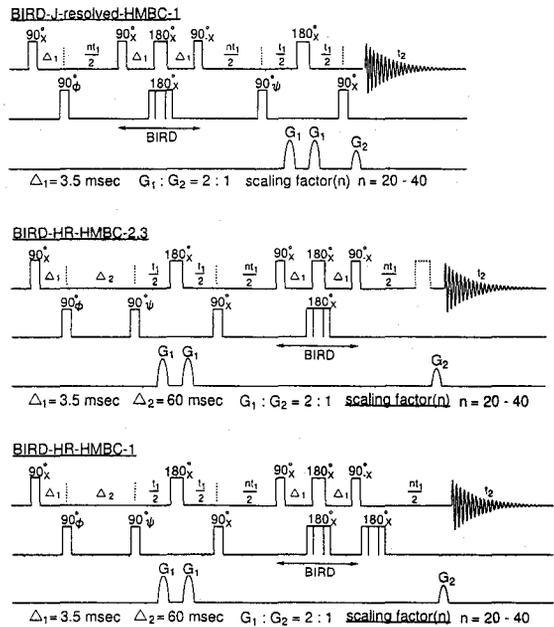


図1. BIRD-J-resolved HMBCとBIRD-HR-HMBC

BIRD-J-resolved HMBC, BIRD-HR-HMBC
ふりはた かずお、せと はるお

位まで展開することが必要である。そのために、HMBCのスピンの展開の前後にJ-scalingパルス($-nt_1/2-180(H,C)-nt_1/2-$)を導入する⁽²⁾⁽³⁾ (図1)。その結果、HMBC磁化は化学シフトに対しては t_1 、プロトン-プロトンのスピンの結合は $(n+1)t_1$ 、炭素とのスピンの結合に対しては nt_1 で時間展開する。例えば、 nt_1, \max がスピンの結合定数 $1/J$ のオーダー(300msから500ms)を越えるようにscaling factor (n)を設定する。その結果、スピンの結合定数は実際の値に対してn倍、あるいは、n+1倍の値として観測される。

BIRDパルスについて

J-resolved HMBC, HR-HMBC法において使用されているJ-scaling-pulseにおける180度パルスをBIRD-pulse $90_x(H)-180_x(H,C)-90-x(H)$ あるいは $90_x(H)-180_x(H,C)-90-x(H)180_x(C)$ に変える⁽⁴⁾。このBIRDパルス $90_x(H)-180_x(H,C)-90-x(H)$ では、 ^{13}C に直結したプロトンには、0度パルスとして機能し、 ^{12}C に直結したプロトン及び ^{13}C 核には180度パルスとして作用する。更に、BIRDパルス、 $90_x(H)-180_x(H,C)-90-x(H)180_x(C)$ では ^{13}C 核に対して0度パルスとして機能する。その結果、J-resolved HMBC, HR-HMBC法でのスピンの展開において、 ^{13}C に直結したプロトンと隣接した ^{12}C に結合したプロトン間でJ-modulationが消滅する。そのため、2D展開した場合、 ^{13}C に直結したプロトンと隣接したプロトン間でdecoupleされる(図2)。(例えばスピンの系 $-CH_A-CH_B(CH_3)-CH_C-$ のメチル基をdecoupleする)。その結果、メチルプロトン H_B は H_A と H_C とのスピンの分裂だけになり、 H_B のプロトンの解析は容易となる。

クロスピークパターン

図2はエチルベンゼンのメチル基プロトンからの2結合と3結合のクロスピーク拡大図である。F1、F2軸のdigital resolutionは27.5Hzと2.2Hz、scaling factor(n)=25のスペク

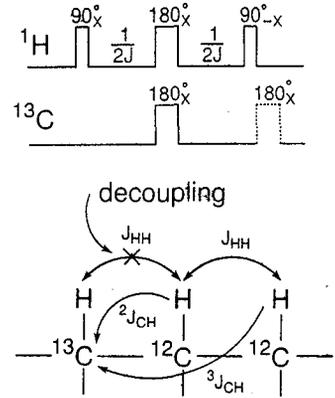


図2. BIRDパルスとdecoupling

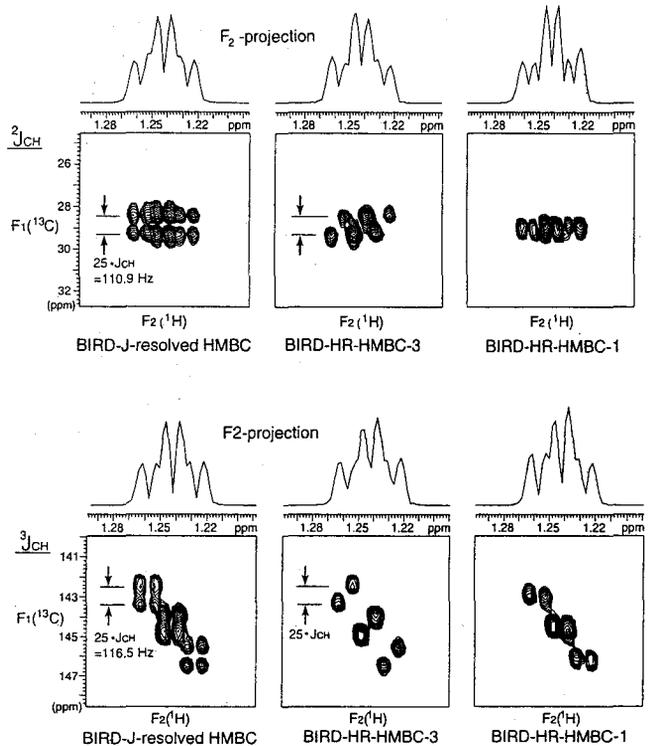
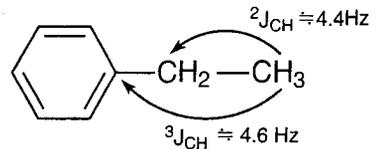


図3. Ethyl benzeneのBIRD-J-resolvedHMBCとBIRD-HR-HMBCスペクトル
long range $^2J_{CH}$ cross peak(up), long range $^3J_{CH}$ crosspeak(down) F_1/n resolution = 1.1 Hz, F_2 resolution = 2.2 Hz, scaling factor(n) = 25

トルである。long range $^2J_{CH}$ 、 $^3J_{CH}$ は4.4Hzと4.6Hzである。これらのスペクトルは、BIRD-J-resolved HMBC、BIRD-HR-HMBC-3、BIRD-HR-HMBC-1 スペクトルの特徴的なクロスピークパターンを示す。BIRD-J-resolved-HMBC、BIRD-HR-HMBC-3、BIRD-HR-HMBC-1のそれぞれの $^3J_{CH}$ のクロスピークはBIRDパルスの影響を受けず、それぞれ F_1 軸方向にscalingされたクロスピークを与える。

一方、 $^2J_{CH}$ のクロスピークでは、三つの方法ともBIRDパルスによりそれぞれメチレンプロトンはdecouplingされる。BIRD-HR-HMBC-1スペクトルでは F_1 軸にはlong range J_{CH} は観測されないために一重線として観測される。BIRD-J-resolved HMBC及びBIRD-HR-HMBC-3スペクトルでは、long range $^2J_{CH}$ が観測され、BIRD-J-resolved HMBC法では f_2 軸に平行な2重線に、そして、BIRD-HR-HMBC-3法では、long range J_{CH} によりシフトした2重線として観測される。このように、BRDパルスのdecoupling効果により、2結合の炭素と3結合の炭素シグナルにおいて、クロスピークパターンは大きく変化し、2結合の炭素のクロスピークと3結合の炭素のクロスピークの判別は容易になる。また、2結合のクロスピークパターンは単純化され、プロトン-プロトンのスピン結合定数の解析が容易になる。

ポートミシンへの応用

モデル化合物として、ポリケタイド抗生物質ポートミシンを用いてBIRD-HR-HMBC-1、およびBIRD-J-resolved HMBCの測定をした。図4と図5は2位のプロトン領域の拡大スペクトルである。

図4のBIRD-HR-HMBC-1のスペクトルにおいて、2位のプロトンは多重線に分裂しており、通常、HMBC、あるいはJ-resolved HMBC、HR-HMBCスペクトルからプロトン-プロトンのスピン結合定数を検出することは困難である。BIRD-HR-HMBC-1のスペクトルにおいては、2位のプロトンに隣接したメチル基および3位のプロトンはdecouplingされて、それぞれ特長ある2本線として観測されている。これら二つのクロスピークは、4級炭素である1位の炭素、3結合の4位の炭素のシグナルとはクロスピークのパターンから容易に判別できる。また、そのクロスピークの分裂から、プロトン-プロトンのスピン結合は10Hzおよび7Hzを観測する。このスピン結合から、2位のプロトンと3位のプロトンの関係はantiの配座にあることが判明する。

BIRD-J-resolved HMBCのスペクトルでは、long range J_{CH} も同時に観測される。しかも、スペクトルに示されるように、long range J_{CH} とプロトン-プロトンの J_{HH} は容易に判別が出来る(図5)。2位のプロトンに隣接した3位のプロトン及びメチル基とのスピン結合は、それぞれ10Hzと7Hzを観測し、また、2位のプロトンと3位の炭素とのlong range $^2J_{CH}$ は5.5Hz、また、4位の炭素とのlong range $^3J_{CH}$ は3Hz以下の小さなスピン結合であることが判明する。これらのスピン結合から、2位のプロトンと3位のプロトンはantiの関係にあり、4位のプロトンはgaucheの配座であることが判明する。このように、BIRD-J-resolved HMBC、BIRD-HR-HMBCスペクトルにおいては、複雑に分裂したプロトンからのクロスピークにおいて、隣接したプロトンがdecouplingされるために、プロトン-プロトンのスピン結合の解析が容易になることが示された。

まとめ

HMBC法による J_{HH} とlong range J_{CH} の測定法として、J-resolved HMBC、HR-HMBC法を報告してきた。これらの方法はlong-range $^2J_{CH}$ 、 $^3J_{CH}$ の測定ばかりでなく、プロトン-プロトンのスピン結合定数をも検出できる方法であるが、複雑に分裂したプロトンシグナルにおいてはプロトン-プロトンの J_{HH} の解析は困難であった。この間を解決する一つの方法として、BIRDパルスの導入し、隣接プロトンのdecouplingを試みた。その結果、複雑に分裂したプロトンにおいて、long range J_{CH} ばかりでなくブ

ロトーンプロトンの J_{HH} の観測をも可能にすることが判明した。

また、従来型HMBC法では2結合の炭素と3結合の炭素のクロスピークを判別することは困難であったが、この方法によると、プロトン-プロトンの連結したスピン系という限定ではあるが、2結合と3結合のクロスピークの区別を可能にすることができた。しかも、既に報告されている $^2J, ^3J$ -HMBC法⁵⁾よりも感度の点で優れていることが判明した。

BIRD-J-resolved HMBC、**BIRD-HR-HMBC**法は、J-scaling法を用いて nt_1, \max を250msec(4Hz)から500msec(2Hz)位と長い値をとるように設定しているために、通常のHMBC法に比べて、かなりスペクトルのS/Nが低下する。実際の測定に当たっては、このS/Nの低下を考慮して積算時間を設定することが重要である。

- 1) K. Furihata, and H. Seto, *Tetrahedron Lett.*, 40, 6271, (1999).
- 2) R. V. Hosur, M. Ravikumar, and A. Sheth, *J. Magn. Reson.* 65, 375(1985).
- 3) V. V. Krishnamurthy, *J. Magn. Reson. B* 113, 46(1996).
- 4) A. Bax, *J. Magn. Reson.* 53, 517(1983).
- 5) V. V. Krishnamurthy, D. J. Russel, C. E. Hadden, and G. E. Martin, *J. Magn. Reson.* 146, 232 (2000).

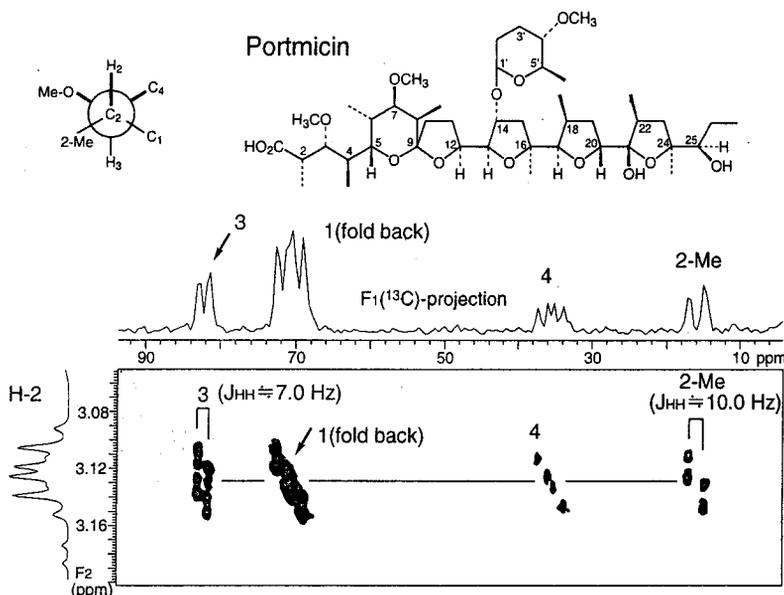


図4. ポートミシンのBIRD-HR-HMBC-1スペクトル
scaling factor(n) = 25、 $t_1 \times t_2 = 256 \times 4096$ (point)、 $F_1 \times F_2 = 14000 \times 2250$ (Hz)、 $nt_1, \max = 467$ msec、scans = 64、 $\Delta = 60$ msec

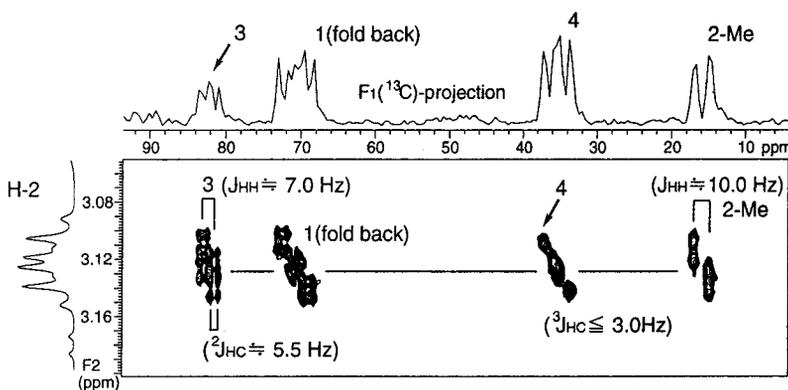


図5. ポートミシンのBIRD-J-resolved-HMBCスペクトル
scaling factor(n) = 25、 $t_1 \times t_2 = 256 \times 4096$ (point)、 $F_1 \times F_2 = 14000 \times 2250$ (Hz)、 $nt_1, \max = 467$ msec、scans = 64

○菊地淳^{1,2}, 佐藤信二¹, 前田秀明^{1,2}, 横山茂之^{1,3,4}(¹理研GSC,²横浜市大院総理,³理研細胞情報,⁴東大院理)

Use of long-range order information in the structure analysis of proteins : Our experiences & perspective

○Jun Kikuchi^{1,2}, Shinji Sato¹, Hideaki Maeda^{1,2}, Shigeyuki Yokoyama^{1,3,4} (GSC, RIKEN¹, Yokohama City Univ.², Cell.Sig. Lab., RIKEN³, Univ. Tokyo⁴)

Conventional high-resolution NMR method for determination of biomacromolecular structure strongly relies on interproton distances derived from nOe. However, the “distance” geometry calculation is undoubtedly difficult in cases of deuterated macromolecules or flexible regions such as sugar moieties. We have focused use of long-range order information in the structure analysis of biomacromolecules for several years. First, we reviewed our experiences of the structure determination of three different targets (DFF-C, Abp1·DNA and hParkin). Furthermore, we refer potentiality of tackling to membrane-bound proteins by a combination of our lipid-bilayer system and long-range order information.

<緒言> タンパク質をはじめとする生体系NMRは、方法論と対象という一見相反する要請をバランス良く満たす必要がある。本発表での中心課題である、弱配向系からのRDC情報の抽出という基本概念は1995~1997年に報告されたものの、未知のタンパク質立体構造決定に本格的に利用され始めたのはつい最近のことである。生体系という対象が地球史をかけて獲得してきた多様性故に、実験系では多くの難関が待ち構えており、方法論の流布に5年以上もの歳月を要している。演者は3種の水溶性球状タンパク質の立体構造決定を手掛けながら、生体分子の多様性に対応した解析法の重要性を認識してきた。本発表の前半では、これらの立体構造決定から学んできた重要な知見について再考する¹⁻³。さらに、脂質系の改良を進めてきた結果、幾つかの膜結合型タンパク質・脂質二重膜間相互作用の高分解能NMR解析が可能となった。その潜在力も展望する。

<1 水溶性球状タンパク質>

1-1) α -helixのみの球状タンパク質, DFF-Cの場合⁴⁾

α -helix のみの場合、環電流効果が疎水性コアに存在しないと側鎖間のnOeを確定するのが難しい。しかし¹ D_{NH} のNMR遠位情報を補うと、ヘリックス間の相対配置が絞りこみはじめ、nOe情報の収集が進んで立体構造決定につながった。

1-2) 2ドメイン系のタンパク質・DNA複合体, Abp1·DNAの場合⁵⁾

2ドメイン間にnOe情報が存在しない場合、配向軸を2軸に増やすかC結合周辺のRDCを観測する必要があった。しかし30kDaという分子量故に50%の重水素化を施した事が災いし、¹ D_{CH} 等は複雑なカップリングのため利用できなかった。従って次々に示す緩和異方性ももう1軸のNHの遠位情報として含めた。

$$R(\alpha) = R(0)(1 + \epsilon \sin^2 \alpha)$$

ここで、 $\epsilon = (D_{||} / D_{\perp} - 1)$ であり、 $D_{||} / D_{\perp}$ は平行/垂直方向の拡散定数比を示している。NMR法から得られた拡散定数比 $D_{||} / D_{\perp}$ は2.1と極めて高く、異方的な複合体の分子形状が予想できた。タンパク質・DNA間に観測された常磁性効果を用い、緩い遠距離制限情報として得られた複合体モデルから流体力学計算を施すと $D_{||} / D_{\perp}$ は2.0となり、NMR実験値との良い一致が得られた。

キーワード: 磁場配向, 残余双極子カップリング, 残余化学シフト異方性, 常磁性効果, 脂質膜

○きくちじゅん, さとうしんじ, まえだひであき, よこやましげゆき

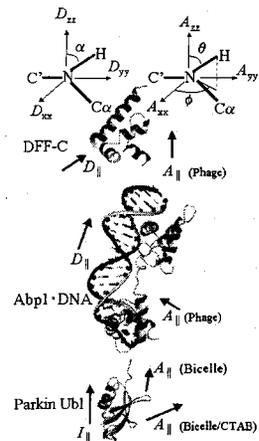


Fig.1 Comparison of the diffusion tensor and the alignment tensor for the three different proteins determined by our group. Definition of the tensors is highlighted in top, respectively.

1-3) 希薄タンパク質の場合, hParkin⁶⁾

前述のように nOe 情報が不足すればするほど、2軸以上の配向情報の効果が増す。坂田らの発表で示すように溶解度の低い hParkin では 800MHz の NMR 装置を利用して nOe 情報の収集が難しく、2軸の $^1D_{NH}$ 遠位情報により格段に効果的な立体構造決定を行うことができた。あくまでも一般論にすぎないが、nOe 情報が十分に観測できるような性質の良い細菌由来のタンパク質の場合、高分解能の単結晶も良く育つ傾向にある。しかしながら変性状態のタンパク質についても RDC や常磁性効果といった遠位情報を駆使した解析が報告されはじめたことを考慮すると、結晶化の難しい対象を見据えて、NMR の方法論を整備していく必要があろう。

<2 配向媒体の開発と膜結合型タンパク質への応用>

これらの知見から、生体系の特徴である多様性に対応した配向媒体を開発してきた。特に演者は膜タンパク質の NMR 解析の経験を有する事から、界面化学の重要性を認識し脂質系に注力した。その結果、膜結合型タンパク質・脂質二重膜間相互作用の観測も可能となった(図2)。脂質膜単体では脂肪鎖は極めて分離の良い 2H -RQC を与えるが、Cytochrome C と結合すると C^2H_3 基以外(特に C_2 - C_6 位の 2H 核)の運動性が著しく減少する。脂質頭部の ^{31}P 異方性シフトにも同様にシグナル変化が観測できる。現在、性質の異なる脂質をドーピングしながら異方性情報を駆使した、膜結合型タンパク質・脂質間相互作用解析を進行中で、NMR は機能解析法としても有用である。

さらに、DOSY 法により測定した脂質膜結合した Cytochrome C の自己拡散定数は $6.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ と、分子量 30kDa の Abp1-DNA ($7.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) よりも早い拡散が起こっているため、高分解能 NMR スペクトルの解析が可能と考えた。実際に重水素化を施した Cytochrome C₂ について脂質膜結合状態で SEA-TROSY スペクトルを測定すると、単体時に比べて著しい選択的シグナル消去が観測された(図3)。脂質界面では水の運動性が極端に低くなる事実を考慮すると、交換性プロトンは脂質埋没度の良い indicator と成り得る。現在、常磁性効果についても同様のアプローチを検討している。遠位情報を利用した方法論を流布させることによって、固体 NMR も含めた構造・機能解析法はより多様性を増していくと期待できる。

<謝辞>

本研究のうちの一部は、奨励研究費により遂行された。水溶性タンパク質のうち、DFF-C は福島氏ら(理研, 黒田 R.U.)が、hParkin は坂田氏ら(名古屋市大, 加藤研), Abp1-DNA の初期段階は岩原氏ら(UCLA)との共同研究である(参考文献参照)。

<参考文献>

- 1) 菊地淳: 分光研究 51, p182 (2002)
- 2) 菊地淳: パリティ (2002) 印刷中
- 3) 畠中秀樹, 小柴生造, 菊地淳, 木川隆則, 横山茂之: 蛋白質核酸酵素. 47, p1038 (2002)
- 4) K. Fukushima, J. Kikuchi, S. Koshiba, T. Kigawa, Y. Kuroda & S. Yokoyama: *J.Mol.Biol.* 321, p317 (2002)
- 5) J. Kikuchi, J. Iwahara, T. Kigawa, Y. Murakami, T. Okazaki, & S. Yokoyama: *J.Biomol.NMR.* 22, p333 (2002)
- 6) E. Sakata, Y. Yamaguchi, E. Kurimoto, J. Kikuchi, S. Yokoyama, H. Kawahara, H. Yokosawa, N. Hattori, Y. Mizuno, K. Tanaka & K. Kato: (submitted)

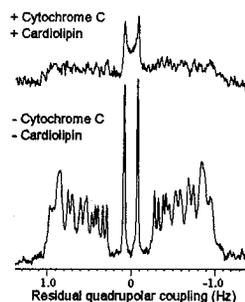


Fig.2 Comparison of solution 2H -NMR spectra of the aligned lipid bilayer system in its free state (bottom) and cytochrome C bound state (top).

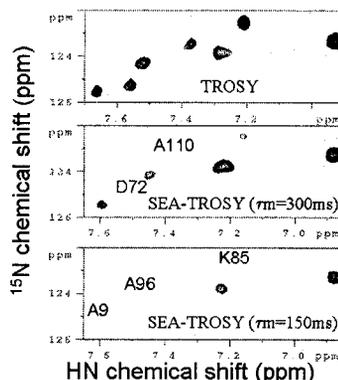


Fig.3 Expansion of the [1H - ^{15}N] TROSY spectra of the membrane-bound 2H , ^{15}N labeled cytochrome C₂. Residues disappeared in the SEA-TROSY spectra are highlighted, respectively.

Congo Red の水溶液中での会合の研究
 (福井大・工) 前田史郎, ○飯田貴之, 篠原正法,
 山田幸生, 川原美香

Aggregation of Congo Red in Aqueous Solution
 Shiro Maeda, Takayuki Iida, Masanori Shinohara,
 Yukio Yamada, and Mika Kawahara

Faculty of Engineering, Fukui University, Fukui, 910-8507, Japan

The aggregation of Congo Red in aqueous solution was investigated by using ^1H NMR. We had reported that Congo Red (CR) - methyl cellulose (MC) complex in aqueous solution shows induced circular dichroism, which indicates MC has a spiral structure. ^1H chemical shift of CR showed the dependence on its concentration. It suggests that CR self-aggregates in dilute aqueous solution.

【はじめに】コンゴレッド(CR)をはじめとする染料は一般に水溶液中で会合を起こすことが知られている。われわれは fig.1 に示すように、CR-メチルセルロース(MC)複合体が水溶液中で誘起円二色性(誘起 CD)が現れることを見出し、MC がらせん構造をとっていると考えている。しかし、誘起 CD スペクトルからでは、遊離の CR と MC に結合している CR とを区別することは不可能である。CR が MC と、どのような相互作用で結合しているかを解明するために ^1H 溶液 NMR 測定を行った。

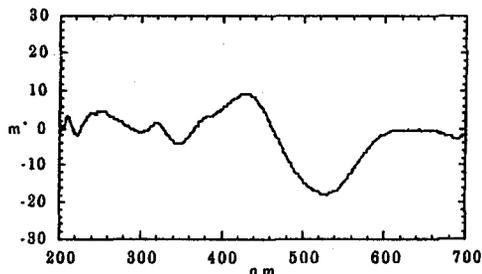


Fig.1 Induced CD spectrum of CR-MC complex in aqueous solution.

【実験】CR(和光純薬, 試薬特級)は 40w%酢酸ナトリウム水溶液を用い、塩析を 5 回行った。得られた試料をエタノール中に溶解し、沸騰、吸引ろ過を 6 回繰り返した後、乾燥させた。精製した CR に重水(MERCK, 99.8%D)を加え、濃度 2.0×10^{-2} , 1.0×10^{-2} , 5.0×10^{-3} , 3.0×10^{-3} , 1.0×10^{-3} , 5.0×10^{-4} , 1.0×10^{-4} , 2.0×10^{-6} mol/l の試料を作成した。JEOL LA-500 を使用し、 80°C で測定を行った。

【結果・考察】CR の構造式および ^1H NMR のスペクトルを fig.2, fig.3 にそれぞれ示す。帰属は COSY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC を用いて行った。

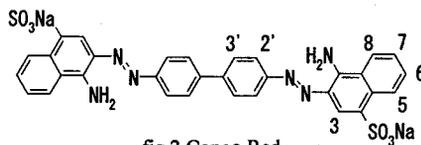


fig.2 Congo Red

コンゴレッド, 複合体, 凝集状態, 自己会合, 誘起円二色性

まえだ しょう, いだ たかゆき, しのはら まさのり, やまだ ゆきお, かかわら みか

^1H NMR スペクトルの各ピークの化学シフト値を縦軸、濃度の対数を横軸としたグラフを fig.4 に示す¹⁾。全体的に見て、濃度が高くなるにつれて各ピークの化学シフト値は高磁場側にシフトし、2',3',5のピークが特に大きく動いている。CR は溶液中ではアゾ基とアミノ基の水素結合により集合体を形成することが知られている²⁾。集合体を形成した場合には各プロトンに空間的に近い官能基の影響による局所的な磁場の変化が起こるために、濃度による化学シフト変化が生じる。

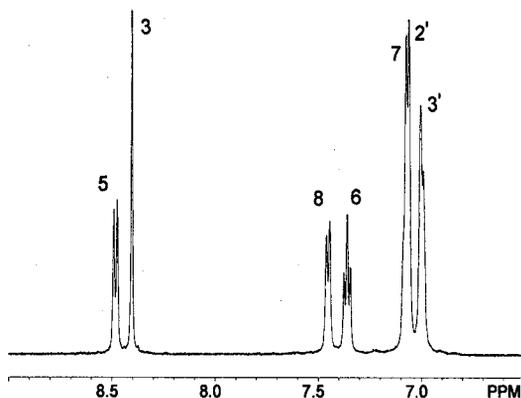


fig.3 ^1H NMR spectrum of CR in aqueous solution

CR の集合体の図を fig.5 に示す。濃度によって化学シフト変化が起きているという事実から、実際には図のように規則正しく並んでいるのではなく、ある程度ランダムになっているのではないかと思われる。これは、ナフタレン環やピフェニルの部分が傾いていること、もしくは会合した CR 同士の距離の差が影響していると考えられる。溶液中の CR 濃度が高くなるにつれて周囲の分子との距離が近づき、環電流効果により高磁場シフトしたと考えられる。アクリジンオレンジにおいても、濃度が高くなるにつれて、メチル基を除くすべてのプロトンのピークが高磁場側にシフトすることが見出されている³⁾。CR が完全に単量体となれば化学シフトの変化は起こらなくなると予測される。今回の実験で測定した試料において、もっとも低濃度($2.0 \times 10^{-5}\text{M}$)の段階で化学シフト変化が見られる。

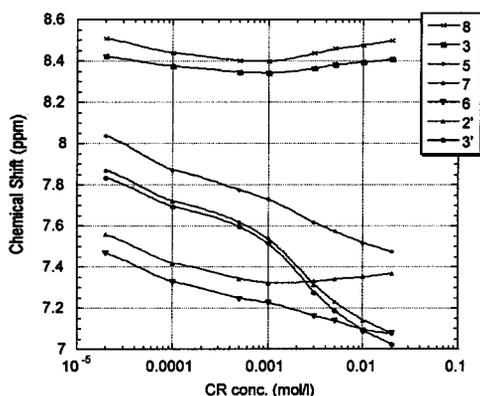


fig.4 Chemical shift dependence on concentration of CR

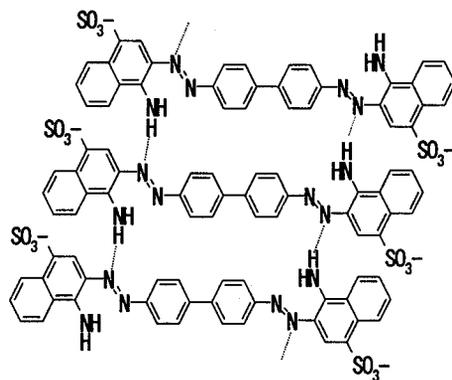


fig.5 Self-aggregation of CR

【引用文献】

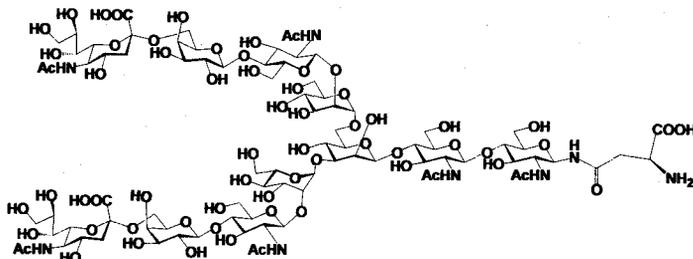
- 1) 前田史郎, 山田幸生, 神藤洋爾 日本化学会第 77 秋季年会 講演予稿集, 1999, 293.
- 2) M. Shibayama, F. Ikkai, R. Moriwaki, and S. Nomura *Macromolecules*, 1994, 27, 1738-1743.
- 3) D. J. Blears and S. S. Danyluk *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 21-26.

Structure analysis of oligosaccharide by 2D selective-TOCSY-HSQC○Hajime SATO¹, Yasuhiro KAJIHARA²*(¹Bruker Biospin, ²Graduate School of Integrated Science, Yokohama City Univ.)*

We present a newly established 2D selective-TOCSY-HSQC experiment for a strict assignment of proton and carbon signals in oligosaccharides. This technique is to generate a 2D ¹H-¹³C correlation spectrum of a desired sugar residue in an oligosaccharide by combined selective-TOCSY pulse sequence and subsequent second HSQC pulse sequence. In this experiment, all signals of 11-residue oligosaccharide were strictly assigned except for H-5 and H-6 in galactose and side chain in sialic acid residues. Those assignments were reconfirmed by a 2D TOCSY-DQFCOSY experiment, which was presented at the last conference. These signals, which did not observed in the 2D selective-TOCSY-HSQC, were assigned by a conventional 2D TOCSY-HSQC and NOESY-HSQC spectra.

[序論] 本研究では糖鎖の複雑な ¹H-¹³C 相関スペクトル (HSQC) から, 任意の単糖に相当する HSQC スペクトルだけを抽出することでシグナルを単純化し, ¹H および ¹³C を誤りなく帰属するための 2D selective-TOCSY-HSQC 法を検討することにした. この実験では, まず選択励起法を用いた selective-TOCSY によって, ¹H 間 J カップリングにより結合している単糖内の全ての ¹H に磁化を伝達することで, 糖鎖の中から任意の単糖のシグナルを抽出する. 続いて HSQC 法によりそれぞれ ¹H に結合した ¹³C に磁化を伝達し単糖分の ¹H-¹³C 相関スペクトルを得ることができる.

本研究では 11 残基からなる糖鎖のガラクトース残基の 5, 6 位およびシアル酸残基の側鎖を除く全ての ¹H および ¹³C シグナルを非経験的に帰属した. これらの帰属は 2D selective-TOCSY-DQFCOSY (前年度 NMR 討論会 P-85) により再確認した. またこの測定法で観測されないシグナルの帰属は通常の 2D TOCSY-HSQC および NOESY-HSQC 法により行なった.



キーワード: 2D selective-TOCSY-HSQC, 糖鎖

さとう はじめ, かじはら やすひろ

【実験 1】 11 残基からなる糖鎖(約 20 mg)を重水(0.3 mL)に溶かして NMR 測定試料とした(33 mM). 2D selective-TOCSY-HSQC スペクトルの測定は BRUKER 社製 5mmBBI-Z プローブを装着した AVANCE-400 を用いて行なった. 測定温度は 293K に設定した. 単糖由来の分離した ^1H シグナルを選択励起するための波形として RE-BURP パルス(70 ms または 150 ms)を用いた. 全ての単糖分に相当する ^1H - ^{13}C 相関シグナルを平均的に高感度で観測するために, selective-TOCSY の H-1 から H-6 への磁化伝達の最適条件を求めた(スピンロック時間 150 ms). 積算回数 128 回から 2048 回, 展開側を 128 ポイント取り込んだ. この条件を用いて各単糖残基由来の分離したシグナルを選択励起した 2D selective-TOCSY-HSQC 測定を残基数分行なった (Fig. 1).

【実験 2】 実験 1 と同じ 11 残基からなる糖鎖(約 1.5 mg)を重水(0.3 mL)に溶かして NMR 測定試料とした(2.5 mM). 測定は BRUKER 社製 5mmTXI-XYZ プローブを装着した AVANCE-800 を用いて行なった. RE-BURP パルス幅を 20 ms または 40ms を用いた. selective-TOCSY のスピンロック時間は 120 ms に設定した (Fig. 2).

【結果と考察】 実験 1 の結果から, 11 残基からなる糖鎖のガラクトース残基の 5, 6 位およびシアル酸の側鎖を除く全ての ^1H および ^{13}C シグナルを非経験的に帰属することができた. これらの帰属は 2D selective-TOCSY-DQFCOSY 法(前年度 NMR 討論会 P-85)の結果を再確認した. この実験において帰属されないシグナルは selective-TOCSY によって磁化が伝達されないからである. ここで上記の帰属をもとに, 通常の 2D TOCSY-HSQC および NOESY-HSQC スペクトルから, 残りのシグナルの帰属を行なった. 実験 2 では低濃度試料(2.5 mM)を用いて 800MHz 機で測定した. 一般に高磁場の装置を用いることにより感度および分解能が向上する. 特にこの測定法では選択励起様式が感度に影響する. ここでは 20 ms から 40 ms で単糖を選択励起した. これにより感度低下を極力抑えることができたと考えられ, その結果, 11 時間あまりで良好なスペクトルを測定することができた.

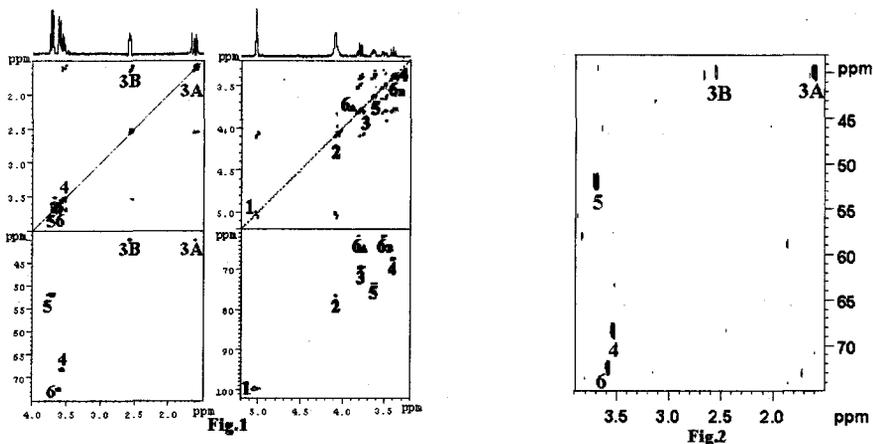


Fig.1 400 MHz 2D selective-TOCSY-HSQC (lower), 2D selective-TOCSY-DQFCOSY (middle) and 1D selective-TOCSY spectra (upper) of a sialic acid (left) and a mannose (right) in the oligosaccharide (20 mg, 33 mM).

Fig.2 800 MHz 2D selective-TOCSY-HSQC Spectrum of a sialic acid in the oligosaccharide (1.5 mg, 2.5 mM).

Peculiarity of Rotational Dynamics in Supercritical Carbon Dioxide*(Supercritical Fluid Research Center, AIST¹; Graduate School of Science, Tohoku University²; JST, CREST³)*○Tatsuya Umecky^{1,2,3}, Mitsuhiro Kanakubo^{1,3}, Yutaka Ikushima^{1,3}

The quadrupolar relaxation times (T_1) of ^{17}O of neat carbon dioxide, and ^9Be of bis(acetylacetonato)beryllium and ^{27}Al of tris(acetylacetonato)aluminium in CO_2 were measured over a wide range of density (ρ) and temperature (T) by high-pressure NMR spectroscopy. The rotational correlation times (τ_r) of the molecules were determined from the measured T_1 values. It was demonstrated that τ_r of CO_2 has the minimum near the critical density; τ_r drastically decreased with increasing ρ at lower ρ , whereas τ_r gently increased at higher ρ . On the other hand, τ_r of the complex molecules in CO_2 solutions increased with increasing ρ except for the near-critical densities. The unique behavior of τ_r was analyzed and discussed in terms of solute-solvent interactions.

【緒言】近年、超臨界二酸化炭素(臨界点, 温度 = 304.2 K, 圧力 = 7.38 MPa, 密度 = 0.466 g cm^{-3})は環境調和型プロセスの媒体として注目を集めているが、温度および圧力操作によりその諸性質を気体から液体類似へと連続的かつ広範囲に制御可能であるという特徴を有する。よって、工学的な見地からは、用途に応じて条件の最適化が行える溶媒として、分離・抽出や反応など多岐にわたる分野で研究が盛んに行われている。一方、学術的な見地からは、分子運動などの諸性質を気体から液体類似まで中間的な状態を含めて統一的に議論できるという利点を有する。

本研究では、高圧 NMR 法により、①溶媒である二酸化炭素(CO_2)の回転ダイナミクスが温度、密度によりどのように変化するかを広範囲の条件で調べた。さらに、② CO_2 中に溶解した数種の β -ジケトナト錯体を金属触媒のモデル分子として注目し、その溶質分子の回転ダイナミクスに対する溶質-溶媒分子間相互作用の効果を検討した。

【実験および解析方法】 CO_2 は昭和炭酸製(99.99 vol-%以上)をそのまま用い、 β -ジケトナト錯体にはアセチルアセトン(acacH)がそれぞれ2つと3つ二座配位したベリリウム錯体($[\text{Be}^{\text{II}}(\text{acac})_2]$)とアルミニウム錯体($[\text{Al}^{\text{III}}(\text{acac})_3]$)を用いた。NMR分光器にはVarian Inova 500を用い、通常の10 mm多核用プローブに、ポリマー製高圧セル¹⁾を設置してスペクトルを得た。 CO_2 の ^{17}O (天然存在比)および β -ジケトナト錯体の中心金属核(^9Be , ^{27}Al)の縦緩和時間(T_1)を反転回復法(PD- π -t- $\pi/2$ -detect,

キーワード: 超臨界流体, 二酸化炭素, 回転相関時間, 緩和時間, 高圧 NMR 法

うめき たつや, かなくぼ みつひろ, いくしま ゆたか

PD > 5T₁)により測定した。T₁は各温度および圧力条件下で5回以上繰り返した平均値とした。なお、β-ジケトナト錯体の試料濃度は無限希釈と見なせる 10 mmol dm⁻³ 以下に調製した。

¹⁷O, ⁹Be, ²⁷Alは核スピン量子数(I)がそれぞれ5/2, 3/2, 5/2の四極子であり、観測したT₁は電場勾配の主軸の回転の相関時間(τ_r)と次式で関係付けられる。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3\pi^2}{10} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left(1 + \frac{\kappa^2}{3}\right) \left(\frac{eQq}{h}\right)^2 \tau_r \quad (1)$$

ここで、κは非対称パラメータであり、本研究ではどの場合もほぼゼロと近似できる。また、eQq/hは四極子結合定数であり、¹⁷Oおよび⁹Beでは温度、圧力によらずそれぞれ3.92 MHz^{2,3}、348 kHz⁴であることが報告されている。一方、²⁷AlのeQq/hは、等方回転の仮定のもと、配位子のγ-¹³CのT₁および核オーバーハウザー効果の測定から、温度によらず3.11 MHzであることを明らかとした。本研究では、これらのeQq/hの値が溶媒などの諸条件に依存しないと仮定して、T₁からτ_rを求めた。

【結果と考察】

① 溶媒 CO₂ の回転ダイナミクス

CO₂の¹⁷Oの緩和速度(1/T₁)およびτ_rの密度依存性をFigure 1に示す。CO₂のτ_rは臨界密度付近に極小をもち、ρ < 0.1 g cm⁻³の低密度では密度増加に伴い急激な減少を、ρ > 0.5 g cm⁻³の高密度では緩やかな増加を示した。観測されたτ_rの挙動は、CO₂の回転ダイナミクスが気体から液体類似まで変化したことを顕著に反映したものである。すなわち、低密度では気体分子運動論で記述されるような慣性支配の状態にあり、中間的な密度を経て、高密度ではより液体類似の粘性支配の状態に転じたものと考えられる。我々が知る限り、τ_rの密度依存性をこのように広範囲で実験的に検証した例はこれまでにない。

さらに、Figure 1を細かく見ると、低密度におけるτ_rの変化は温度に依存しない(1/τ_r = aρ, aは一定)のに対し、高密度では温度が上がるに連れτ_rは僅かに減少する傾向を示した(拡大図参照)。通常の液体溶媒ではτ_rは数psであるが、超臨界二酸化炭素では0.25 - 0.35 psと一桁近く短くなっており、溶媒和の配向ダイナミクスもかなり速いことが予想される。

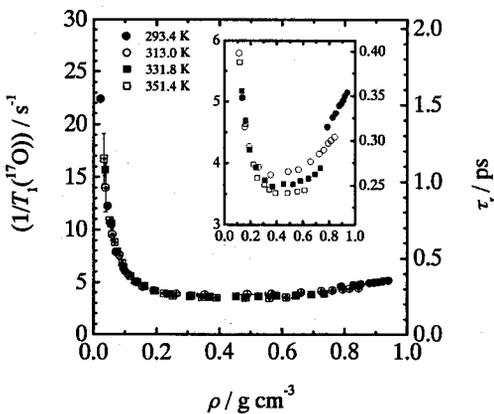


Figure 1. Density dependence of 1/T₁ (left-hand) and τ_r (right-hand) of CO₂ at four different temperatures.

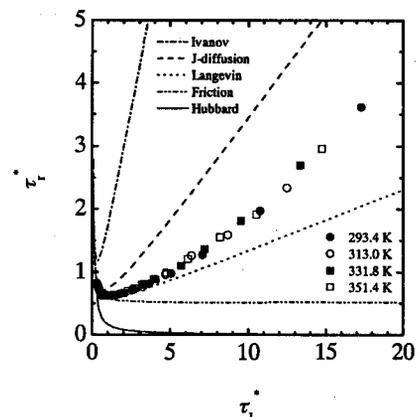


Figure 2. Relation between τ_r^{*} and τ_j^{*} of CO₂ at four different temperatures.

ところで、核種を選択することにより、NMR の T_1 から角運動量の相関時間 (τ_j) を求めることも可能である。CO₂ の ¹³C の T_1 はスピナー回転緩和機構が支配的である。⁵⁾

$$\frac{1}{T_1} = \frac{4C_1^2 I k_B T}{3\hbar^2} \tau_j \quad (2)$$

ここで、 C_1 はスピナー回転結合定数、 I は慣性モーメントである。CO₂ の ¹³C の T_1 ⁵⁾ から τ_j を計算し、 τ_j との関係を図 2 にプロットした。ただし、相関時間は慣性モーメント (I) を用いて次式により無次元化した。また、数種の既存のモデル⁶⁾ により τ_i^* と τ_j^* との関係も図示した。

$$\tau_i^* = \sqrt{\frac{I}{k_B T}} \times \tau_j \quad (3)$$

Figure 2 から、 τ_i^* は $\tau_j^* = 1$ で極小となることが確認された。液体類似の高密度の状態 (極小の左側) でも、Hubbard の関係 ($\tau_j \ll \tau_i$ の条件で、 $\tau_i^* = 1/(6\tau_j^*)$) からは外れた。一方、低密度 (極小の右側) では、傾向こそ似ているものの、既存のモデルでは定量的に実験結果を説明できないことが明らかとなった。

② CO₂ 中の β -ジケトナト錯体の回転ダイナミクス

CO₂ 中における [Be(acac)₂] および [Al(acac)₃] の ⁹Be, ²⁷Al の緩和速度 ($1/T_1$) および τ_r の溶媒密度依存性を Figure 3 に示す。なお、低密度では溶解度が急激に小さくなるため、 T_1 を決定することはできなかった。観測された範囲では、どちらの錯体分子でも、 τ_r は CO₂ の密度増加に伴い顕著に増加した。しかし、臨界点近傍の温度 (⁹Be では 313.2 および 331.8 K, ²⁷Al では 313.0 K) では、 τ_r の変化は密度に対して単調ではなく、臨界密度付近 (0.3~0.6 g cm⁻³) においてほとんど変化しない傾向を示した。

アセトニトリル中におけるこれら錯体の τ_r は、溶液の粘性率 (η) を温度 (T) で割った値に比例し、Stokes-Einstein-Debye の流体力学モデルによりほぼ定量的に表される (V は回転体の体積)。

$$\tau_r = \frac{V \eta}{k_B T} \quad (4)$$

CO₂ 中の [Be(acac)₂] および [Al(acac)₃] の τ_r 、ならびに①で求めた CO₂ そのものの τ_r を η/T に対してプロットした (Figure 4)。なお、図中の実線はアセトニトリル中で温度変化の実験から得られた τ_r の η/T 依存性を示したものである。臨界点近傍を除いて、CO₂ 中でも [Be(acac)₂] および [Al(acac)₃] の τ_r は、各温度で η/T の増加に伴い直線的に大きくな

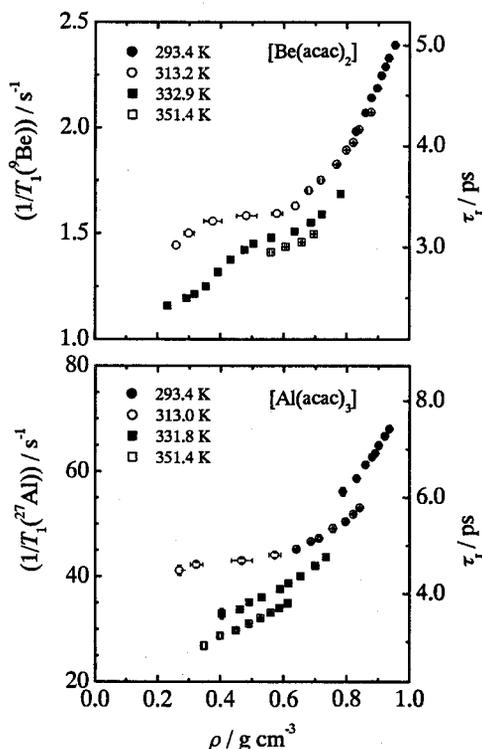


Figure 3. Density dependence of $1/T_1$ (left-hand) and τ_r (right-hand) of [Be(acac)₂] and [Al(acac)₃] in CO₂ at four different temperatures.

ることが確認された(CO_2 の τ_r も高密度では直線的に増加)。それら直線の傾きは、溶媒である CO_2 ではかなり小さいが、 $[\text{Be}(\text{acac})_2]$ 、 $[\text{Al}(\text{acac})_3]$ と分子の体積が増加するに従い、大きくなることから。これらのことは、超臨界二酸化炭素中でも巨視的な粘性率が分子の回転ダイナミクスに強く影響を及ぼすことを意味している。

臨界点近傍($\eta/T \approx 1 \times 10^{-7} \text{ Pa s K}^{-1}$)では、どちらの錯体の τ_r も直線から外れ、上に凸となる特異的な挙動を示した。この臨界点近傍の τ_r の増大は、主に溶質である錯体分子周りに溶媒である CO_2 分子が過剰に集合したためと考えられる。そこで、臨界点近傍の τ_r の過剰量を τ_r^{ex} と表し、高密度の直線関係から予想される値(τ_r^{bulk} と表記)と観測された τ_r^{obs} との差で定義した。

$$\tau_r^{\text{ex}} = \tau_r^{\text{obs}} - \tau_r^{\text{bulk}} \quad (5)$$

Figure 5に、 $\tau_r^{\text{ex}}/\tau_r^{\text{bulk}}$ を η/T に対してプロットした。 $\tau_r^{\text{ex}}/\tau_r^{\text{bulk}}$ は臨界点近傍に0.1前後の極大値をもつことが明らかとなった。また、 $[\text{Be}(\text{acac})_2]$ では、313 Kから333 Kへと温度が高くなるに従い、極大の位置が高 η/T 側へ顕著にシフトした。一方、 $[\text{Be}(\text{acac})_2]$ の $\tau_r^{\text{ex}}/\tau_r^{\text{bulk}}$ は $[\text{Al}(\text{acac})_3]$ のそれよりも大きく、四面体型の $[\text{Be}(\text{acac})_2]$ の方が八面体型の $[\text{Al}(\text{acac})_3]$ より CO_2 分子との相互作用が大きいことが示唆された。このことは、 τ_r と η/T が直線関係を示す領域において、 τ_r の比が CO_2 中では $\text{Al/Be} = -1.4$ とアセトニトリル中の ~ 1.7 に比べ小さくなっていることから支持される。以上の結果は、臨界点近傍で回転ダイナミクスがより顕著に溶質-溶媒相互作用の影響を反映したためと考えられる。

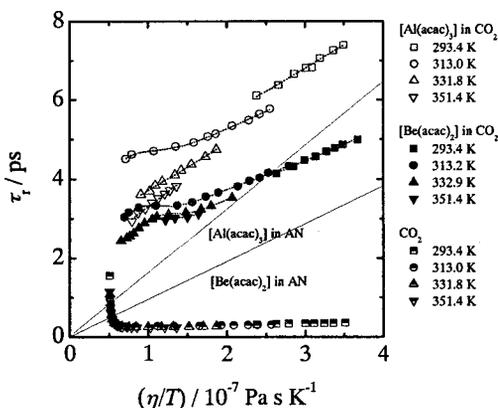


Figure 4. Relation between τ_r and η/T for $[\text{Be}(\text{acac})_2]$, $[\text{Al}(\text{acac})_3]$, and CO_2 in CO_2 .

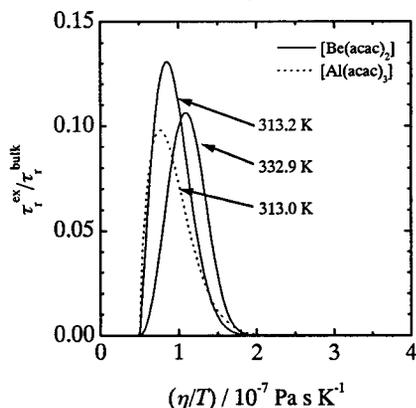


Figure 5. Plots of $\tau_r^{\text{ex}}/\tau_r^{\text{bulk}}$ vs. η/T for $[\text{Be}(\text{acac})_2]$ and $[\text{Al}(\text{acac})_3]$ in CO_2 .

【参考文献】

- 1) T. Umecky et al., *Chem. Lett.*, 2002, 118.
- 2) M. Holz et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, **2**, 1717.
- 3) J. Gripp et al., *J. Mol. Spectrosc.*, 1995, **172**, 430.
- 4) M. Kanakubo et al., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1998, **94**, 3237.
- 5) S. Bai et al., *Magn. Reson. Chem.*, 1996, **34**, 479.
- 6) J. G. Powles and G. Rickayzen, *Mol. Phys.*, 1977, **33**, 1207.

¹H NMR によるテレフタル酸系共重合ポリエステル の長距離モノマー連鎖構造解析

(東京農工大¹、帝人²)

○松田裕生^{1,2}、永阪文惣²、朝倉哲郎¹

¹H NMR Analysis of Long Range Sequences of Copolyesters containing Terephthalic Units

Hironori Matsuda^{1,2}, Bunsow Nagasaka², and Tetsuo Asakura¹

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, 184-8588; ²Material Analysis Research Laboratories, Teijin Ltd., Hino, Tokyo, 191-8512

In the sequence analysis of condensation polymers with NMR, only the limited range of the sequence such as dyad level in the chain has been reported. Recent NMR development makes possible to obtain longer range sequence information. In this report, we observed ¹H NMR spectra of several kinds of polyesters containing terephthalic units. The selection of suitable solvent for the detailed NMR analysis was important. The ¹H NMR peaks which were splitted into longer sequences were assigned by combination of comparison of the spectra of several copolyesters with different composition, specific-¹³C labeling experiment and 2D experiments such as HMBC. The triad or pentad sequence analyses were performed on the basis of the assignments.

【緒言】

一般に合成高分子材料の一次構造の特徴は、その固体物性に反映されるので、一次構造の詳細な解析は重要である。今日、NMR 装置の高磁場化、高性能化に伴い、ピークのより長距離にわたる、より厳密な帰属が可能となり、それを基礎とした詳細な連鎖分布解析が可能となってきた。

本研究は、3種類のポリエステル共重合体、すなわち、ポリ(エチレン/ブチレン テレフタレート)共重合体、ポリ(エチレン/トリメチレン テレフタレート/ナフタレート)共重合体ならびにポリ(エチレン/1,4-シクロヘキサジメチレン テレフタレート)共重合体を取りあげ、詳細な長距離連鎖に基づく帰属を行うとともに、その連鎖分布解析を行った。

【実験】

3種類のテレフタル酸(TA)系共重合ポリエステルは、帝人にて合成を行った。600MHz-NMR(日本電子製 JNM-α600)を用いて、¹H NMR および ¹³C NMR、さらに HMBC 測定を行った。溶媒は、オルトクロロフェノール/重クロロホルムの 75/25 (v/v) または 50/50 (v/v) 混合溶媒を用いた。

【結果と考察】

① ポリ(エチレン/ブチレン テレフタレート) : PET/PBT 共重合体

これまでこの共重合体のモノマー連鎖構造解析は、¹³C-NMR によって dyad レベルで行なわれてきた¹⁾。NMR 溶媒ならびに測定温度を検討した結果、オルトクロロフェノール/重クロロホルムの 75/25 (v/v)

Key words: ¹H NMR、高分子、ポリエステル、連鎖分布、triad、pentad

まつだひろのり、ながさかぶんそう、あさくらてつお

の混合溶媒, 80℃の時に、共重合体のグリコール部分の $^1\text{H-NMR}$ ピークは、細かく分離して観測されることが判った。溶媒からの環電流効果はその原因である。

一例として、ブチレン (B を略として使用) グリコールユニットのピークの帰属を示した (Fig. 1)。帰属のために、TA ユニットのカルボニル炭素を ^{13}C ラベルした PET とラベルしていない PBT とのエステル交換反応物について $^1\text{H-NMR}$ 解析を行った。その結果、 ^{13}C ラベルカルボニル炭素とのスピン結合によって一部が 3Hz の二重線として分離したピーク 5' が、エチレングリコールユニットに近接するブチレングリコールユニットのメチレンプロトンと判定され、非対称連鎖構造由来の信号を個別に帰属できた。この帰属は HMBC 測定によっても確認した²⁾。

② ポリ(エチレン/トリメチレン テレフタレート/ナフタレート) : PET/PPN 共重合体

より複雑な共重合体系として、酸成分 2 種/グリコール成分 2 種からなる、PET と PPN の溶融ブレンド体について、 $^1\text{H-NMR}$ 測定によるモノマー連鎖構造解析を行った。グリコールユニットピークは、長距離の連鎖構造を反映して多数に分離観測されたが、最終的に、グリコールに関して triad レベル、酸成分を含めると pentad レベルで帰属され、詳細な連鎖分布解析を行うことができた。

③ ポリ(エチレン/1,4-シクロヘキサジメチレン テレフタレート) : PET/PCT 共重合体

シクロヘキサジメチレングリコールユニットにはシス、トランス幾何異性が存在するため、このポリマーは 3 種のグリコールユニットからなる共重合体と捉えることができる。この共重合体について、上と同様の溶媒系で、 $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。Fig. 2 に○で囲んだシクロヘキサジメチレングリコールユニットのメチレンプロトンピークは、各々、シス型、トランス型について、triad 連鎖構造を反映して、それぞれ 4 本に分離観測された。これにより、幾何異性に着目した連鎖解析を行うことができた。

【まとめ】

本研究の結果、高磁場 NMR および溶媒として用いたオルトクロロフェノールの環電流効果を利用することによって、これまで困難であった TA 系ポリエステル $^1\text{H-NMR}$ による長距離連鎖構造解析が可能となった。

- 1) S. C. E. Backson, A. M. Kenwright, R. W. Richards, *Polymer*, **36**, 1991 (1995).
- 2) H. Matsuda, T. Miki, T. Asakura, *Macromolecules*, **35**, 4664 (2002).

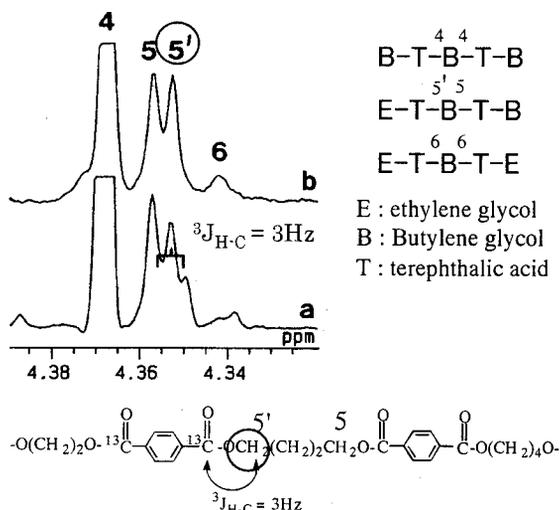


Fig.1 Expanded 600MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra showing the alcoholic methylene proton region of poly(ethylene/butylene terephthalate) copolymer.

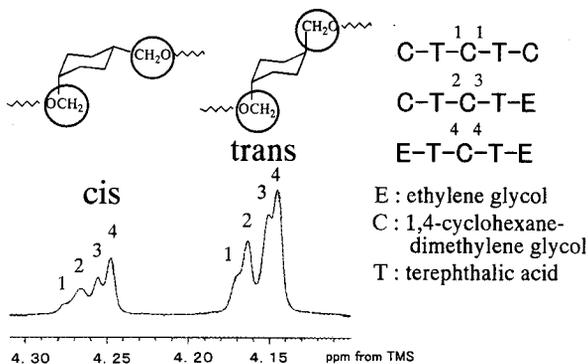


Fig.2 Expanded 600MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum showing the alcoholic methylene proton region of poly(ethylene/cyclohexanedimethylene terephthalate).

対称・非対称 *S*-Benzylsulfilimins の *gem*-メチレン
プロトンの NMR 挙動

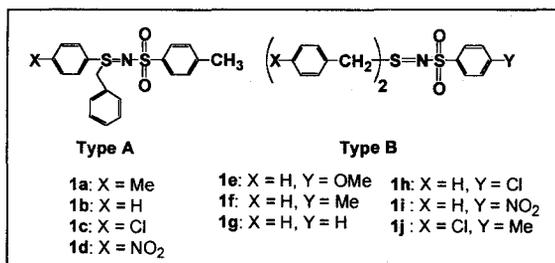
(東工大資源研¹, 関東学院大工²) 中村義之¹, ○中山智香子²,
龍宮尚史², 卯辰直也², 尾辻 雅², 山本 保²

NMR Behavior of the *gem*-Methylene Protons of Symmetrical and Unsymmetrical *S*-
Benzylsulfilimins

(Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology,¹ Industrial Chemistry, Kanto Gakuin
University²) Yoshiyuki Nakamura,¹ Chikako Nakayama,² Takashi Tatumiya,² Naoya Utatsu,² Miya
Otsuji,² and Tamotsu Yamamoto²

NMR behaviors of α -GMPs in the title sulfilimines (**1**) were studied. In all spectra of ten **1** obtained at room temperature, the chemical shifts of two α -GMPs were non-equivalent without dependency of used solvent polarity. The chemical shifts of two α -GMPs of unsymmetrical sulfilimines in CDCl₃, however, showed a tendency to equivalency in lowering temperature, while those in the other solvents did the different tendency. These special behaviors of two α -GMPs are caused by the structures (ylide and ylene) of **1** in their solutions.

〔はじめに〕 不斉中心隣接のメチレンプロトンが NMR 化学シフト的に非等価であることが知られており¹⁾, 今まで明確な例がなかったスルフィリイミンの場合にも, 種々の非対称スルフィリイミンの検討から明らかになってきた²⁾。この一連の研究で, 対称な *S*-Benzyl を有する *S,S*-Dibenzyl-*N*-tosylsulfilimine の *gem*-メチレンプロトン (H_{gem}) が化学シフト的非等価性を示し, それが低温において等価になることを問題として提起した。これが何に起因するのか, 本研究では, *S*-Benzyl (p-置換体を含む) を有する一連の置換基の異なる対称・非対称スルフィリイミン (**1**) を合成し, これらの H_{gem} の NMR 挙動を, 温度の影響, 溶媒極性の影響から追究した。



〔実験〕 *Sulfilimines* (**1**) の合成: Type A の **1** は, 既報の方法に従い, 非対称 Sulfide に Chloramine T を反応させ, Type B の **1** は対称 Sulfide に Chloramine (Y = Me, H, OMe, Cl, NO₂) を反応させ, それぞれ高収率が得られた。測定: **1** の H_{gem} の NMR 挙動追究には日本電子製 JNM-LA-500 を用いた。

キーワード: 化学シフト的非等価性, 化学シフト的等価性, ylene 構造, ylide 構造

なかむらよしゆき, なかやまちかこ, たつみやたかし, うたつなおや, おつじみや, やまもとたもつ

【結果と考察】 *Sulfilimines 1 Type A* の H_{gem} の NMR 挙動: S 側ベンゼン環上置換基 X の異なる 4 種の **1** (**1a**, **1b**, **1c**, **1d**) の 2 個の H_{gem} の NMR シグナルはいずれも室温において AB パターンの分裂を示し, 温度, 溶媒 ($CDCl_3$, CD_3CN , CD_3OD) を変えても殆んど分裂パターンの変化は認められず, 不斉中心の影響を示唆した。

Sulfilimines 1 Type B の H_{gem} の NMR 挙動: N 側ベンゼン環上置換基 Y が異なる 5 種の **1** (**1e**, **1f**, **1g**, **1h**, **1i**) の 2 個の H_{gem} の NMR シグナルはいずれも室温において AB パターンの分裂を示すが, 温度, 溶媒 ($CDCl_3$, CD_3CN , CD_3OD) を変えて測定した結果, いずれの **1** も $CDCl_3$ 中では Fig. 1 に一例を示すように低温において化学シフト的等価に向かう傾向を示した。この傾向は Fig. 2 に観られるように, N 側ベンゼン環上置換基 Y の電子吸引性の増大に伴って強くなり, Y が NO_2 のとき等価になる温度が最も低い。この現象は, 一般の回転異性体 (配座異性体) 中のものとは異なっており, Fig. 2 の傾向をも考慮に入れると **1** の溶液内構造の変化によるものと推察される。即ち, 低温では *Sulfilimine* が *ylene* 構造に移行し, 対称構造状態になることで 2 つの H_{gem} が等価になり, 逆に高温では *Ylide* 構造に移行し, 非対称構造状態になることで 2 つの H_{gem} が不等価になりことを示唆している。さらにこの傾向は溶媒の極性によっても左右されることを確認した。

一方, 対称スルフィリミン Type B の内 X が異なる場合の H_{gem} の NMR については, **1e** と **1j** の 2 個のみであり, 明確な傾向を掴むまでには至っていないが, **1j** の場合は $0^\circ C$ において化学シフト的に等価になり, **1e** の場合とは著しく異なった挙動を示した。この一連の **1** の明確な傾向を掴むには, X が電子吸引性基 MeO, 電子供与性基 NO_2 のものの検討が必要であるが, この点に関しては, 本学会発表において言及の予定である。

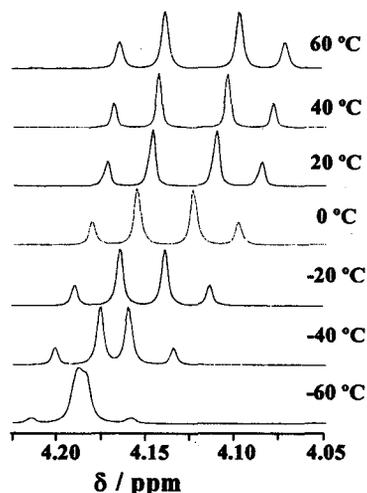


Fig. 1. 1H NMR Spectra of GMPs of **1i** at Various Temps. in $CDCl_3$.

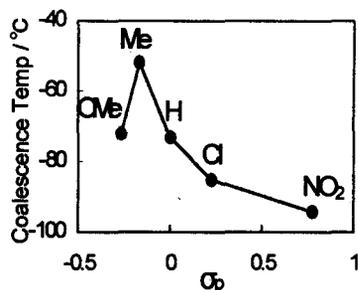


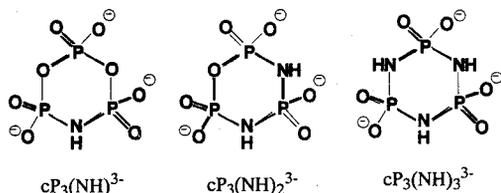
Fig. 2. Relation between Substituent Y and Coalescence Temperature on GMPs of Type B *Sulfilimines* in $CDCl_3$.

1) 例えば, R.M. Silverstein et als, "Spect. Identn. of Org. Compds." 2) 中村・池田・岡村・卯辰・山本, 日化第 77 秋季年会 ('99). (b) 中村・卯辰・尾辻・山本, 日化第 78 春季年会 ('00).

(神戸大学・院自然¹、神戸大学・工²)○横田 達夫¹、成相 裕之¹、牧 秀志²**Metal Nuclear NMR Study on the Thermodynamic Stability and Coordination Structure of Multidentate Complex**Tatsuo Yokota¹, Hiroyuki Nariai¹, and Hideshi Maki²¹Department of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan²Department of Chemical Science and Engineering, Faculty of Engineering, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

A great deal of effort has been made on the complexation behaviors and coordination structures of the cyclic poly aza ligands, i.e., azacrown ethers and cryptands, as cyclic ligands which has oxygen and nitrogen donors. Considerable attention has been given on the effect of the variations of macrocyclic ring size and pendant donor groups, however, the influence of the number of the bridging donor has not so far been investigated. The bridging imino nitrogen atoms in a cyclic iminotriphosphate anions is easily substituted with an oxygen atom by rapid hydrolysis right after decyclization of the ligand, so the $cP_3(NH)_n^{3-}$ ($n=1-3$, Fig.1) ligands can provide opportunity to study the influence of the increasing number of bridging donors on the stability and coordination structures of metal complexes. In this study, the coordination structure and complexation equilibria of $Al^{3+} - cP_3(NH)_n^{3-}$ ($n=1-3$) systems are investigated quantitatively by ^{27}Al NMR peak deconvolution techniques.

【緒言】アザクラウンエーテルやクリプタンド等の酸素原子および窒素原子を配位原子として持つ環状アザ配位子の錯生成挙動および配位構造に対する側鎖のイオン基および環サイズの影響についてはよく知られているが、架橋配位原子数の影響についての研究はほとんど行われていない。本研究では異なる2種類の配位原子、すなわち非架橋酸素原子および架橋窒素原子を持つ環状イミド三リン酸イオン群、 $cP_3(NH)_n^{3-}$ ($n=1-3$)、(Fig. 1)を用い錯生成挙動および配位構造に対する架橋窒素原子数の影響を考察した。環状イミド三リン酸イオンは加水分解によって環骨格中の架橋窒素原子を酸素原子へ容易に置換できる。 $Be^{2+} - cP_3(NH)_n^{3-}$ ($n=1-3$)系においては Be^{2+} イオンが架橋窒素原子に直接配位して単座錯体および二座錯体を生成する。このようなHSAB理論による単純な予測反するBe-N直接配位構造は金属イオン-配位子間の高い立体適合性により実現すると考えられる。そこで本研究では錯体安定度に対する立体的適合性の効果を検討するため、 Be^{2+} の約1.5倍のイオン半径を持つ Al^{3+} 錯体について、 ^{27}Al NMRのピーク分離解析から錯体安定度定数を決定し、配位子中の架橋窒素原子数の違いによる多座配位錯生成挙動への影響を詳細に考察した。

Fig. 1 Structural formulas of $cP_3(NH)_n^{3-}$ ($n=0-3$) anions.

【実験】本研究ではVarian Inova 400MHzNMR (Ref. 0.1 mol dm^{-3} $Al(NO_3)_3$)を用いて測定を行った。試料溶液は $C_{Al}^0 = 0.01-0.10$ mol dm^{-3} の $Al(NO_3)_3$ 水溶液に順次 $cP_3(NH)_n$ ($n=1-3$)水溶液を添加することで調製し

MULTINUCLEAR NMR, ALUMINIUM, DECOMVOLUTION, COMPLEX, PHOSPHATE

よこた たつお・なりあい ひろゆき・まき ひでし

た。またHNO₃またはNaOHによりpHを調整し、Al³⁺イオンの加水分解およびプロトネーションの影響を無視した。

【結果】 Al³⁺ - cP₃(NH)_n³⁻ (n=1~3) 錯生成系の代表的なスペクトルをFig. 2に示す。化学シフトと配位数の間に成立する加成則に基づき低磁場側から遊離のAl³⁺イオンおよび単座配位、二座配位、三座配位錯体のシグナルと同定した。Al³⁺ - cP₃(NH)₃³⁻錯生成系においてのみ三座錯体が生成しており、他のBe²⁺ - cP₃(NH)_n³⁻ (n=1~3) およびAl³⁺ - cP₃(NH)_n³⁻ (n=1, 2) 錯生成系では三座錯体の生成はみられなかった。このことから三座錯体生成には金属イオン-配位子間の立体的適合性および配位子内の高い架橋窒素原子数密度が影響していると考えられる。各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。全ての²⁷Al NMRスペクトルで計算曲線と実測値が良く一致した。各多座配位錯体のピーク面積比、S_{n+1}/S_n (n=0~2)、と配位子およびAl³⁺イオンの総濃度比、C_L/C_{Al}、の関係を調べると二座錯体と単座錯体のピーク面積比、S₂/S₁、は常にC_L/C_{Al}に依存しているが、cP₃(NH)₃³⁻系での三座錯体と二座錯体のピーク面積比、S₃/S₂、は常に一定となった。すなわち二座錯体生成は分子間反応で、また三座錯体生成は分子内反応で進行することを示している。一連の逐次錯生成系において分子間および分子内反応が同時に進行していることは興味深い。この結果から以下の平衡式により定義される各多座配位錯体の安定度定数の決定を行った。

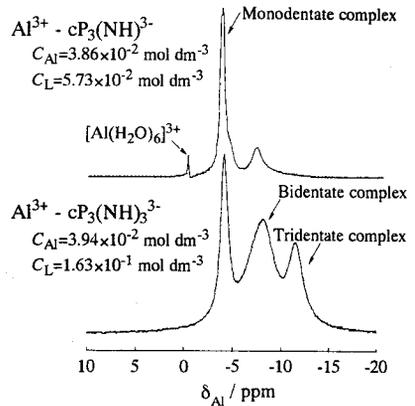
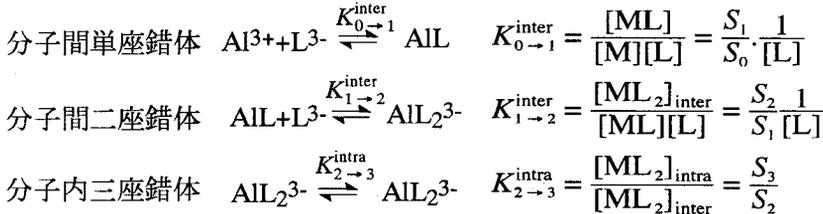


Fig. 2 Representative ²⁷Al NMR spectra of Al³⁺ - cP₃(NH)_n³⁻ (n=1, 3) mixture solutions (295.15K).



各錯体安定度定数はS_{n+1}/S_n vs. [L³⁻]プロットの直線の傾き(Fig. 3)から決定でき、二座錯体の安定度定数、K_{1→2}^{inter}、についてTable 1に示した。アルカリ土類金属や二価遷移金属とcP₃(NH)_n (n=1~3)との錯生成系ではイミノ基の増加に伴う非架橋酸素原子の塩基性の増大のため単座錯体の安定度定数は増加するが二座錯体の錯体安定度定数はcP₃(NH)₂³⁻とcP₃(NH)₃³⁻で大小関係が逆転した。これはcP₃(NH)₃³⁻が分子内三座錯体を形成するためであると思われる。またBe²⁺系と比較すると錯体安定度定数はAl³⁺系の方が大きい値になった。以上の結果からcP₃(NH)_n³⁻ (n=1~3)との錯生成系においてAl³⁺イオンはBe²⁺イオンと同様にHSAB理論に反し、非架橋酸素原子よりも環骨格上の架橋窒素原子に優勢に配位し、さらにAl³⁺イオンはBe²⁺イオンよりcP₃(NH)_n³⁻ (n=1~3)に対する立体適合性が高いということが推察される。

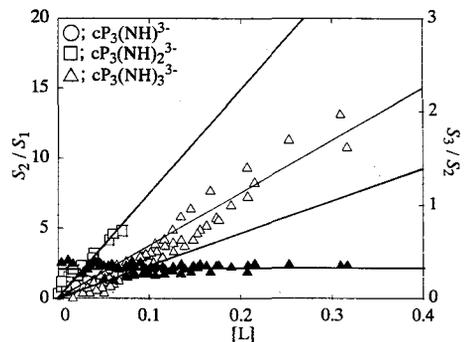


Fig. 3 Plots of S_{n+1}/S_n vs. [L]

Table 1 Logarithmic stability constants, K_{1→2}^{inter}, for the interaction of cP₃(NH)_n (n=1~3) anions.

Metal ion	cP ₃ (NH)	cP ₃ (NH) ₂	cP ₃ (NH) ₃
Al ³⁺	1.3	1.9	1.6
Be ²⁺	—	1.1	1.2

植物から得られる薬効成分のNMRによる解析

(理研 植物科学研究センター) ○鶴澤 洵、吉田 茂男

(上海薬物薬物研究所) 夏 増華、労 愛娜

(日本大学薬学部) 藤本 康雄

The NMR analysis of bioactive compound from the plant resourcesJun UZAWA¹, Zeng-hua XIA², Ai-na LAO², Yasuo FUJIMOTO³, Shigeo YOSHIDA¹(¹RIKEN PSC, ²Shanghai Insit. of Materia Medica, ³College of Pharmacy; Nihon Univ.)

A merit of NMR analysis for the natural products is that the structural elucidation can be achieved, even if the sample contains inseparable impurities such as structurally similar compounds. In the present report, we describe the usefulness of ¹H selective HMBC for the discrimination between cymarose and oleandrose and for the structure elucidation of a new steroidal saponin (MT-16) isolated from *Marsdenia tenacissima*. From these results, it was proven that the rectangular pulse sequence was more usable than the shaped pulse one for the present purpose in general spectrometer. Structure elucidation of some saponins by the application of the present method are now in progress.

1. 序論

近年、NMRの分野では様々な測定法が開発・提唱され、これを試料に合わせて適宜使えば迅速に構造決定ができるようになった。我々は植物から得られるステロイド配糖体の構造決定を行っているが¹⁾、X線結晶解析に適した良質の結晶は得られず、単離の難しさから若干の異性体や同族体を含んだまま構造を決めることが多いので、質量分析法は不確定要素が大き。そこでNMRがもっとも信頼できることになる。しかし、近年ますます少量の試料によって構造を決めなければならない場合が多くなり、確実な構造決定は依然として困難を伴っている。Ad Baxらは、近接する複数の¹Hとのスピン結合により複雑に分裂した¹Hからのクロスピーク強度を増大させる目的で¹H選択HMBC法²⁾を提唱しているが、今回これを応用して有益な測定法であることを確認したので報告する。

2. 実験

NMR装置はJNM-α600型を用い、プローブはNalorac社製磁場勾配コイル付き3mmHXを用い、試料管は(株)シゲミ製の3mm管を使用した。溶媒はすべて重ピリジンを用いてTMSを内部基準とした。¹H選択HMBCパルスシーケンスは第1図(a)を使用し、選択パルスの条件設定用に(b)を用いた。本報では関数パルスを使わずに矩形波を使い、パルス幅(選択励起範囲)を決めてから中心信号が最も大きく出る強

植物の薬効成分、ステロイド配糖体、oleandrose、cymarose、¹H選択HMBC

うざわ じゅん、Xia Zeng-hua、Lao Ai-na、ふじもと やすお、よしだ しげお

度に調節し、そこで得た条件を(a)の選択パルスの条件とした。

3. ステロイド配糖体の解析

我々は、上海において *Marsdenia tenacissima* より抽出したいくつかの活性物質を得て、NMRによる構造決定を行っている。この中からMT-16(14mg)と仮称する化合物について述べる。

アグリコン部分は既報^{3,4,5)}のデータを参考に、磁場勾配パルスを用いたHMBC、DQF-COSY、TOCSY、HMQC、HSQC、HMQC-TOCSY、HMBC-RELAYにより平面構造を決定した。これにGROESYの情報を加えて相対立体構造を決めた。

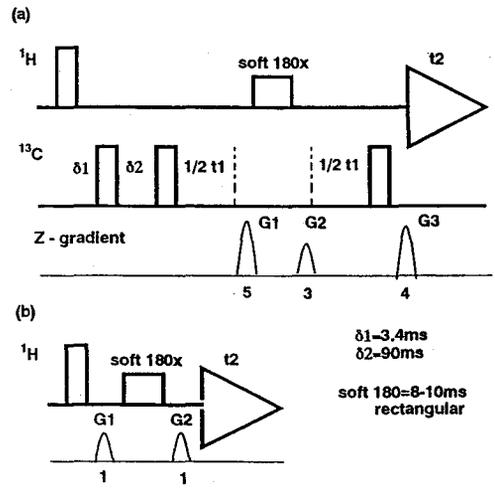


Fig.1 (a) ^1H selective pulse sequence. (b) Calibration sequence of the soft pulse.

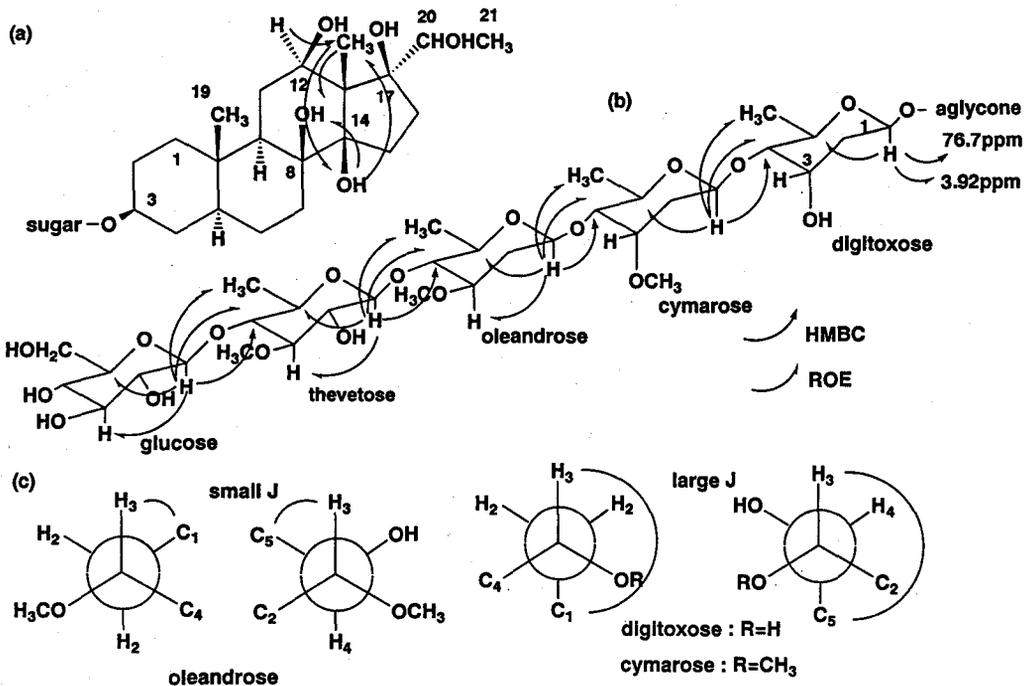


Fig.2 (a) Aglycone part of MT-16. (b) Sugar chain part of MT-16. (c) HMBC correlation and torsion angle of digitoxose, cymarose and oleandrose.

糖鎖部分は、上記測定法のデータからそれぞれの糖を決めて、HMBCとGROESYの結果から結合位置を決定した。一般に、加水分解によって得られた糖ユニットのシフト値 (^1H 、 ^{13}C) と糖鎖を構成した場合のシフト値はかなり異なっている。同じ糖でも糖鎖のどこにあるかで異なっている。cymaroseとoleandroseの場合は分子量が同じであり、3位のメトキシ基の配位だけが異なる。一般的には、1位から

3位へのNOEまたはROEによって決められている。PFG-1DTOCSYなどにより3位または4位のスピン結合定数が読みとれば大きな情報であるが、糖が増える程信号の重なりにより困難も増える。そこでより多くの情報を得る目的で3位からのHMBCについて検討した。3位¹Hから1位および5位のカーボンへの投影図は図に示す通りであり、3位¹Hの配位を反映してクロスピーク強度が違いがでるはずである。しかし通常のHMBCでは δ 2など少し条件を変えてもcymaroseやdigitoxoseでさえ、第3図(a)の→で示すようにクロスピークは小さいか出ない。

Table 1

MT-16 Chemical shifts(aglycone part)

Carbon(Proton)	Carbon(Proton)
1 38.3(0.97,1.75)	12 71.5(3.88)
2 29.6(1.73,2.04)	13 59.0
3 76.7(3.92)	14 88.7(5.87;OH)
4 34.5(1.44,1.75)	15 34.0(2.06)
5 45.4(0.99)	16 34.2(1.95,2.06)
6 25.3(1.11,1.80)	17 89.0
7 34.8(1.43,2.19)	18 11.9(1.93)
8 76.0(3.80;OH)	19 13.1(1.20)
9 47.4(1.29)	20 73.0(4.44)
10 36.5	21 17.7(1.50)
11 28.1(1.96,2.39)	

Table 2

MT-16 Chemical shifts(Sugar part)

Carbon(Proton)	Carbon(Proton)
digitoxose	thevetose
1 95.8(5.53)	104.0(4.89)
2 39.1(2.07,2.42)	75.0(3.91)
3 67.5(4.65)	86.3(3.70)
4 83.4(3.52)	83.1(3.88)
5 68.6(4.35)	72.0(3.74)
6 18.7(1.49)	18.7(1.76)
3' - -	60.7(3.95)
cymarose	glucose
1 99.8(5.19)	104.8(5.13)
2 36.7(1.79,2.32)	75.8(4.03)
3 77.7(4.02)	78.6(4.24)
4 83.1(3.40)	71.9(4.19)
5 69.0(4.19)	78.2(3.98)
6 18.7(1.32)	63.1(4.38,4.53)
3' 58.9(3.58)	
oleandrose	
1 101.9(4.69)	
2 37.6(1.74,2.44)	
3 79.3(3.58)	
4 83.2(3.60)	
5 71.9(3.55)	
6 18.7(1.67)	
3' 57.4(3.51)	

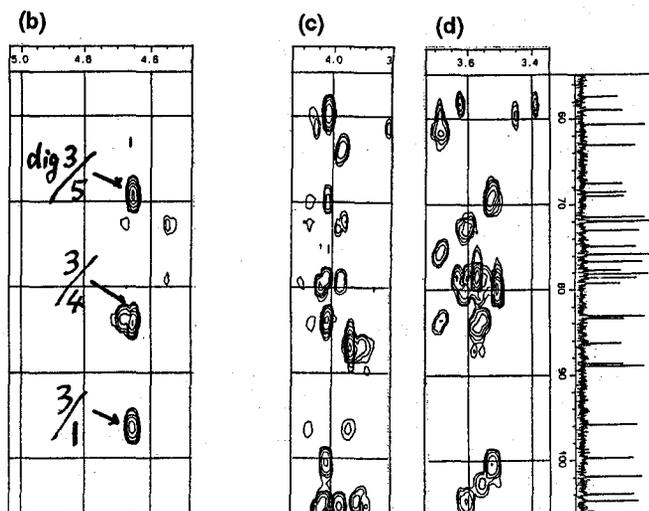
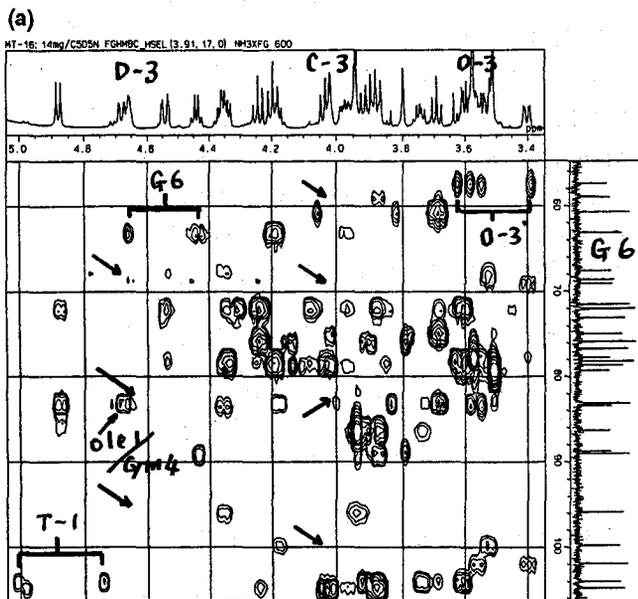


Fig. 3 (a) PFG-HMBC spectra of MT-16. (b)-(d) PFG-¹H selective HMBC spectra. (b) digitoxose, (c) cymarose, (d) oleandrose.

4. ^1H 選択HMBCによるcymarose、oleandrose、digitoxoseの判別

糖鎖の解析におけるHMBC法は、1位 ^1H からのクロスピークは糖間の結合情報を与えるのでよく利用されるが、他は信号の分裂と重なりが多くなり難しくなる。cymarose、oleandrose、digitoxoseはいずれも2,6デオキシ体であり、6位メチルにより4位までの結合が明らかとなるが、3位の分裂は複雑になる。したがってHMBCのクロスピークは弱くなるのである。一方、2位の ^1H は高磁場に出る。この点に着目し、第2図(c)の関係を明らかにするため、それぞれの糖の3位に着目して ^1H 選択HMBCを測定した。この測定法は ^1H の選択パルスを使うことにより、これから大きく外れたスピン結合の相手をデカップリングする効果があり、その分だけ信号強度は増加する。今回の目的には絶好の測定法と考え、パルス系列の作成と測定条件の検討を行った上で、いくつかの試料について測定した。その一例を第3図(b)、(c)、(d)に示す。通常のHMBCにくらべてみると、cymaroseとdigitoxoseの場合は明らかにクロスピークの強度は飛躍的に増大し、1位および5位にもはっきり出ている。これにくらべoleandroseの場合は弱い。励起範囲から少し外れたところにスピン結合の相手がある場合、かえって信号強度が減っているようである。

5. むすび

天然物の解析は各種測定法の登場で易しくなったと言われている。しかし、それぞれの測定法は万能ではなく、長所と短所を持っている。やはりそれぞれの測定法の特徴や欠点を見極めながら利用していかざるを得ない。そのような観点で見れば、 ^1H 選択HMBC法もBaxらも指摘の通り、カーボン側の分解能に制限があり、これを承知の上で使えばかなり有益な測定法であることがわかった。本法は発表されてから5年を経過しているが、一部を除きあまり使われていないようである(演者の共著2報も含め13報)。その理由の一つに、 ^1H 選択パルスの条件設定がストレートに感度に結びつくことがある。この点も磁場勾配法の発展により楽になった。演者の検討によれば、Baxも矩形波パルスでも良いと書いているが、矩形波の方が励起範囲とパルス幅を容易に結びつけることができる。この点、関数パルスはそれぞれの計算式・定義の仕方・パワーアンプの直線性などによって変わってしまうので、融通性に欠けるように思えた。タンパク質のように、励起範囲と照射周波数がほぼ決まっている場合と異なり、天然物は応用すべき局面が多様なのである。

ステロイド配糖体の構造解析では、 ^1H 選択HMBCとPFG-1D TOCSY、GROESYを併用するとさらに有益な構造情報が得られることがわかった。我々は以上の検討結果を基に、関連するいくつかの試料について構造決定を行っている。

文献

- 1) S.Sang, A.Lao, Y.Leng, Z.Gu, Z.Chen, J.Uzawa and Y.Fujimoto, Tetra.Lett., 41, 9205 (2000).
- 2) Ad Bax, K.A.Farley and G.S.Walker, J.Magn.Resonan., A119, 134 (1996).
- 3) S.Tsakamoto, K.Hayashi and K.Kaneko, J.Chem.Soc.Perkin Trans.1., 2625 (1988).
- 4) B.Ma, T.Fang, K.Ma, J.Ni, H.Wu, W.P.Ding and C. Jiang, J.Nat.Prod., 60, 134 (1997).
- 5) F.Abe, H.Okabe, T.Yamauchi, K.Honda and N.Hayashi, Chem.Pharm.Bull., 47, 869 (1999).

(シーエーシーズ 横浜分析センター) ○松原康史

Mixture Analysis Using 3D DOSY

Yokohama Laboratory, Center for Analytical Chemistry and Science, Inc.

Koshi Matsubara

A three-dimensional DOSY-HMBC spectrum was measured for a model mixture of 1,3,5-O-methylidene-*myo*-inositol, methyl- α -D-glucopyranoside, and sucrose in D₂O. Two-dimensional projections along the diffusion axis of the 3D DOSY-HMBC spectrum were comparable with the ¹H-¹³C HMBC spectra of each compound, although a few signals of the compounds with a similar diffusion coefficient were not fully resolved. This method seems useful for the mixture analysis, the mixture consisting of molecules with a variety of sizes, especially when the HMBC spectrum of the mixture can not be analyzed owing to the overlapped ¹H or ¹³C signals.

はじめに 分子のサイズが異なれば溶液中での拡散速度に差が生じるため、2次元DOSY(Diffusion Ordered Spectroscopy)により、混合物試料からHPLCなどで成分を分離・精製することなく、個々の成分の¹H-NMRスペクトルを得ることができる。しかし、その¹H-NMRだけでは十分に分子構造が解析できない場合も多い。NMRの周波数軸をひとつ増した3次元DOSYでは、拡散速度により分子を分離するとともに各成分の2次元スペクトルを得ることができる。¹H-NMRより情報量の多い2次元スペクトルを解析することにより、混合物中の各成分の分子構造を決定できる確率は上がる。

DOSY-COSY, DOSY-HMQC スペクトルなどがすでに報告されているが¹⁾, DOSY-HMBC に関しては測定例がほとんどない。孤立した部分構造をつなぐという意味で最も重要な DOSY-HMBC の測定条件を検討した。

感度の概算 3次元 DOSY のパルスシーケンスを前半の DOSY 部分と後半の 2次元 NMR 部分に分けて考える。後半は通常の 2次元 NMR の感度, $S_{2\text{DNMR}}$, と考えればよい。DOSY 部分では最小磁場勾配強度の時のシグナル強度の $1/m$ ($1 < m$)までシグナルを減少させ、磁場勾配強度を変えて n 個の 2次元 NMR を, 1 スペクトルあたり $1/n$ の時間で測定するとすると, 3次元 DOSY の感度は以下の式で計算できる。

$$S_{3\text{DDOSY}} = (1/m)(1/\sqrt{n})S_{2\text{DNMR}}$$

たとえば、ある成分の ¹H-¹³C HMBC の測定に 200 μ g 必要で, $m = 4$, $n = 5$ とすれば, DOSY-HMBC の測定には混合物中にその成分を 2mg は含んでいる必要がある。

実験と結果 m が大きいほど, また n が大きいほど 3次元 DOSY で得られる 2次元 NMR スペクトルの S/N 比は低下する。 m が小さすぎたり, 大きすぎると拡散係数の正確度が下がり, 成分間の分離が悪くなる。 m を振ってスペクトルの S/N 比と成分の分離の程度を検討するなど, 条件の最適化を試みた。

Fig.1 にモデル化合物の DOSY-HMBC スペクトルを示す。ある拡散係数の範囲で 2次元の投影図をとると, 各成分の ¹H-¹³C HMBC に近いスペクトルが得られる。シグナルごとに計算される拡散係数とその誤差にはかなり幅があるので成分間の分離は完全ではないが, 解析は可能である。シグナルの重なりにより混合物の HMBC スペクトルが解析できないときなどには, DOSY-HMBC が有効であろう。

DOSY, 拡散, HMBC, 混合物

まつばらこうし

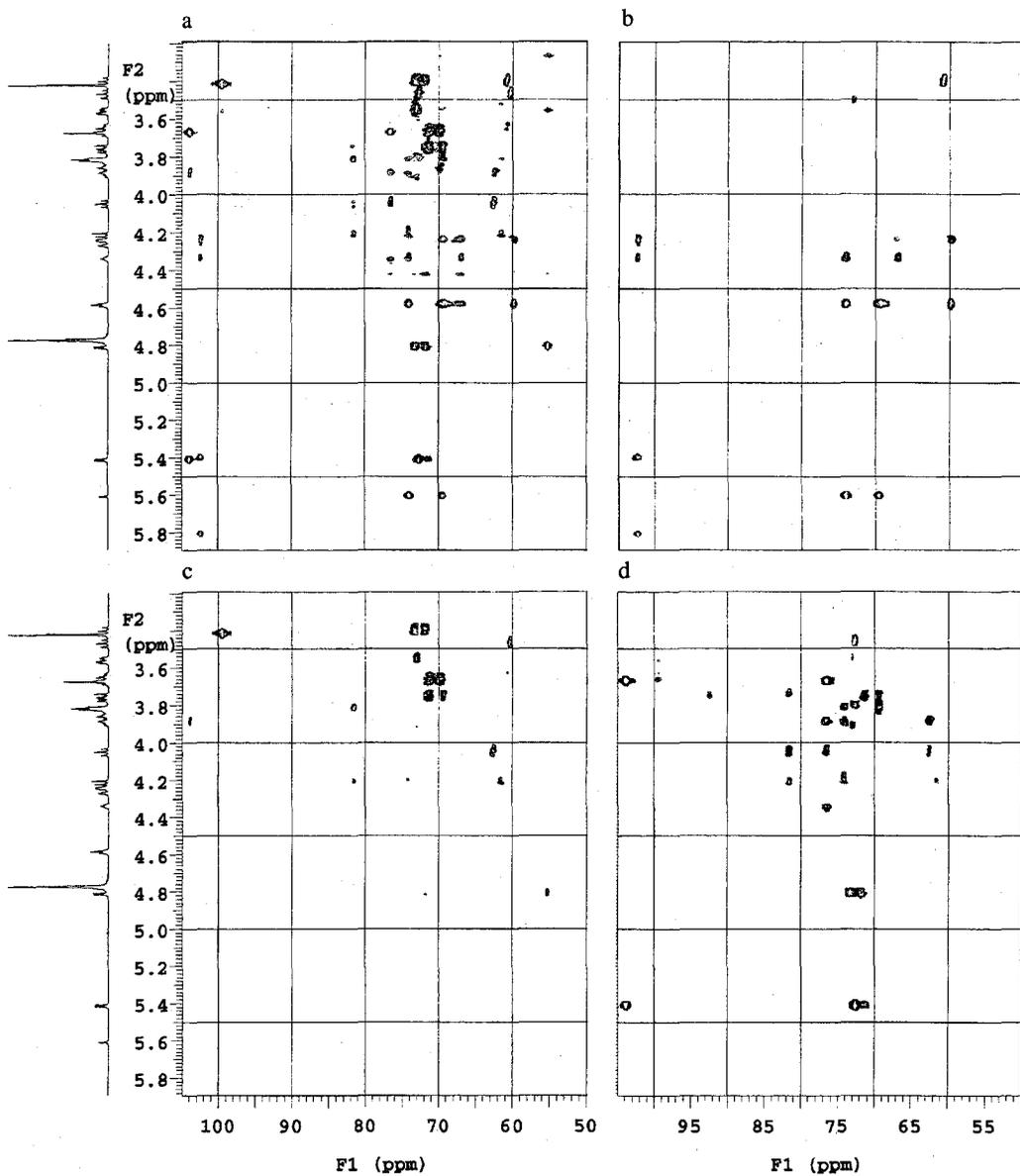


Figure 1. (a) First ^1H - ^{13}C HMBC spectrum (measured with the lowest gradient strength in the DOSY part) of the 3D DOSY-HMBC spectrum of a mixture of 1,3,5-*O*-methylidene-*myo*-inositol, methyl- α -D-glucopyranoside, and sucrose in D_2O with ^1H spectrum on the left. (b) – (d) 2D projections of the 3D DOSY-HMBC spectrum, showing the roughly resolved HMBC spectra of each compound.

文献

- 1) C. S. Johnson Jr., *Prog. NMR Spectrosc.* **1999**, *34*, 203-256.

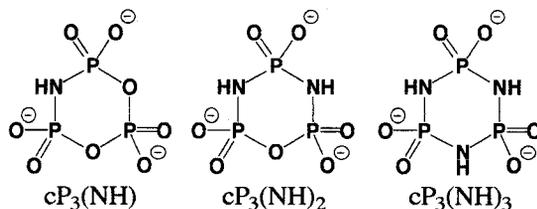
(神戸大学工学部、神戸大学大学院自然科学研究科*)

○牧 秀志、横田 達夫*、成相 裕之*

Metal Nuclear NMR Study of the Thermodynamic Stabilities on the Multidentate Complex of cyclo- μ -Imidotriphosphate Anions*a*Hideshi Maki, *b*Tatsuo Yokota, and *b*Hiroyuki Nariai*a*Department of Chemical Science and Engineering, Faculty of Engineering, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan*b*Department of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan

The change in the standard Gibbs energy, the standard entropy and the standard enthalpy of the multidentate complexation reaction for $cP_3(NH)_n$ ($n=1-3$, Fig. 1) ligands have been elucidated from the temperature dependence of ^{27}Al and 9Be NMR spectra. Separate ^{27}Al and 9Be NMR signals corresponding to free, and successive multidentate species have been observed in both spectra because of slow chemical exchange of Al^{3+} and Be^{2+} ions. In our previous study, it has been clarified that $cP_3(NH)_n$ ($n=1-3$) ligand forms ML complexes with not only oxygen-coordination but also nitrogen-coordination. It can be estimated that the ML complex is more stabilized by an entropic origin, i.e., the diversity of these coordinate structure, because Al^{3+} and Be^{2+} ions can be *selective* about the non-bridging oxygen atoms or the bridging nitrogen atoms as coordinating atoms.

【緒言】本研究で用いた環状トリイミド三リン酸イオン、 $cP_3(NH)_3^{3-}$ (Fig. 1) は3個のリン酸基が全てイミノ基によって架橋された環状ポリリン酸イオンである。それに対し、環状モノイミド三リン酸イオン、 $cP_3(NH)_2^{2-}$ 、環状ジイミド三リン酸イオン、 $cP_3(NH)^{1-}$ (Fig. 1) は架橋イミノ基の一部が酸素原子に置換した稀な構造を有する。これら一連の配位子の錯生成挙動を明らかにすることは、架橋イミノ基を有する配位子の錯生成能のモデル化に有用である。これらは分子内に2種類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。特に $cP_3(NH)_3^{3-}$ および $cP_3(NH)_2^{2-}$ においては分子中央部に窒素原子が密集してelectron richになるため、HSAB則による単純な予想に反して Be^{2+} 、 Al^{3+} 等のハードな金属イオンが架橋窒素原子に配位する。このような多様な微視的配位構造は錯体安定度をエントロピー的に優勢にしていると考えられる。本研究では 9Be および ^{27}Al NMR スペクトルの温度依存性から錯生成反応前後のエンタルピー変化およびエントロピー変化を決定し、多座配位錯生成挙動の詳細を熱力学的側面から考察した。

Fig.1 Structure of cyclo- μ -imidotriphosphate anions

MULTINUCLEAR NMR · ENTROPY · ENTHALPY · DECONVOLUTION · PHOSPHATE

まき ひでし · よこた たつお · なりあい ひろゆき

【実験】 ^{27}Al および ^9Be NMR測定に用いた試料溶液は、NMRサンプル管中の $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ および BeCl_2 溶液に、 $0.1 \text{ moldm}^{-3} \text{ cP}_3(\text{NH})_n^{3-}$ ($n=1\sim 3$) 各水溶液をマイクロシリンジで順次添加することにより調製した。試料溶液は金属イオンの加水分解を防ぎ、かつ配位子のプロトンーションが無視できるpHに調整した。 ^{27}Al NMR測定は、Varian Inova 400、 ^9Be NMR測定はBruker DPX-250を用い、1サンプルに対し271.15~318.15Kの範囲で順次温度を変えて測定を行った。温度校正は80% 1,2-ethanediol in $[\text{d}_6]$ DMSOの ^1H NMR測定により行った。

【結果と考察】 $\text{Al}^{3+}\text{-cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ 錯生成系の代表的な ^{27}Al NMRスペクトルの温度依存性を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、低磁場側から単座、二座、三座錯体のピークと同定した。二座錯体と三座錯体のピーク面積比は濃度に全く依存せず、三座錯体は二座錯体と同様に ML_2 型錯体であることが分かった。非線形最小二乗法による波形分離解析により得られる各多座配位錯体のピーク面積の比から、各錯体安定度定数値が決定できる(本要旨集P13参照)が、さらに

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

なる関係式を適用すると各多座配位錯生成反応前後の ΔS° および ΔH° は各多座配位錯体のピーク面積比と以下のように関連づけられる。

$$\text{単座}(\text{ML型})\text{錯体 } \ln K_{0\rightarrow 1}^{\text{inter}} = \ln \frac{S_1}{S_0} \cdot \frac{1}{[\text{L}]} = -\frac{\Delta H_{0\rightarrow 1}^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_{0\rightarrow 1}^\circ}{R}$$

$$\text{二座}(\text{ML}_2\text{型})\text{錯体 } \ln K_{1\rightarrow 2}^{\text{inter}} = \ln \frac{S_2}{S_1} \cdot \frac{1}{[\text{L}]} = -\frac{\Delta H_{1\rightarrow 2}^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_{1\rightarrow 2}^\circ}{R}$$

$$\text{三座}(\text{ML}_2\text{型})\text{錯体 } \ln K_{2\rightarrow 3}^{\text{intra}} = \ln \frac{S_3}{S_2} = -\frac{\Delta H_{2\rightarrow 3}^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_{2\rightarrow 3}^\circ}{R}$$

すなわち、 $S_1/(S_0[\text{L}])$, $S_2/(S_1[\text{L}])$, S_3/S_2 の対数値を温度の逆数に対してプロットすると各多座配位錯生成反応前後の ΔS° および ΔH° を決定できる。Fig. 3に $\ln S_2/(S_1[\text{L}])$ および $\ln S_3/S_2$ vs. $1/T$ プロットを示した。本研究において、配位子中に多くのイミノ基を持つ $\text{Al}^{3+}\text{-cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ 錯生成系の場合、 $\text{Al}^{3+}\text{-cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ 錯生成系よりも $T\Delta S^\circ$ が相対的に大きいことが分かった。これは非架橋酸素原子だけでなく架橋窒素原子も配位に関与するため、単座O配位および単座N配位錯体といった多様な錯種が形成することを示唆している。

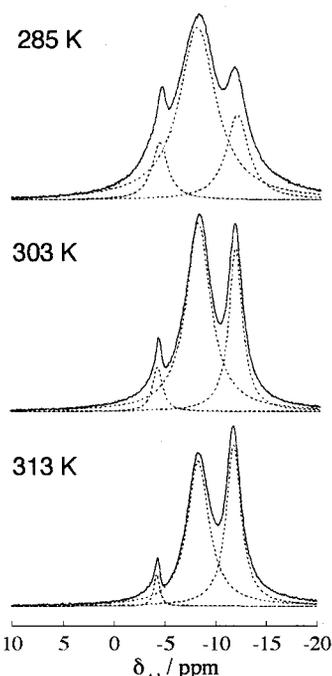


Fig. 2 Temperature dependence of ^{27}Al NMR spectrum of $\text{Al}^{3+}\text{-cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ mixture solution. $C_L=1.40 \times 10^{-1} \text{ moldm}^{-3}$, $C_M=3.05 \times 10^{-2} \text{ moldm}^{-3}$.

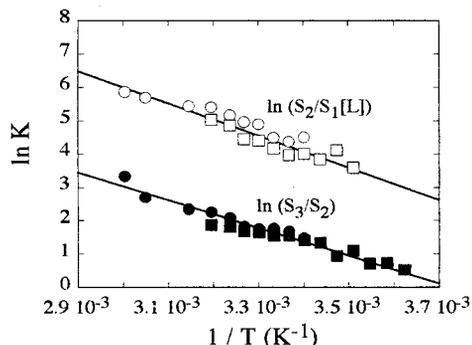


Fig. 3 Plots of $\ln K$ vs. $1/T$ for $\text{Al}^{3+}\text{-cP}_3(\text{NH})_3^{3-}$ mixture solution.

open: $C_L=1.40 \times 10^{-1} \text{ moldm}^{-3}$, $C_M=3.05 \times 10^{-2} \text{ moldm}^{-3}$.
closed: $C_L=1.52 \times 10^{-1} \text{ moldm}^{-3}$, $C_M=2.32 \times 10^{-2} \text{ moldm}^{-3}$.

Attempt to Control Properties of Liquid Solvents in Contact with High-Pressure Carbon Dioxide

(Supercritical Fluid Research Center, AIST¹; Graduate School of Science, Tohoku University²)○Mitsuhiko Kanakubo,¹ Tatsuya Umecky,² Takafumi Aizawa,¹ and Yutaka Ikushima¹

We have attempted to control the properties of some liquid solvents (C_6D_6 , $CDCl_3$, CD_3OD , D_2O) by bringing them into contact with high-pressure carbon dioxide. In such a binary phase, the self-diffusion coefficient (D_i) and the longitudinal relaxation time (T_1) of the constituent molecule in the liquid phase were examined as a function of carbon dioxide pressure at a fixed temperature of 313.4 K by means of high-pressure 2D NMR spectroscopy. It was clearly found that both D_i and T_1 increased remarkably with increasing carbon dioxide pressure except for the case of D_2O . The present results indicate that the molecular motions in the liquid phase can become very fast due to the addition of carbon dioxide pressure.

【緒言】我々は、水や二酸化炭素を主成分とした超臨界流体を環境調和型プロセスの媒体として注目してきた。従来の液体溶媒と比較して、超臨界流体は低粘性、高拡散性という利点を有するほか、温度・圧力などの外部操作により密度などの諸性質を連続的に制御可能であるという特徴をもつ。このことは、単一成分からなる純粋な液体では、気液飽和曲線を超えて、その諸性質を変化させることが不可能であることと対照的である。本研究では、高圧の二酸化炭素を液体に作用させた --- 二酸化炭素を液体に飽和、膨潤させた --- 場合の効果に関して、高圧 NMR 法を用いて液相中の分子の並進拡散係数(D_i)ならびに回転相関時間(τ_c)に着目し調べ、二酸化炭素の加圧により液体の性質が "gas-like" へと変更可能であるか否か検討を試みた。

【実験】外径 5 mm、内径 1.7 mm のポリマー製高圧セル¹⁾に重水素化溶媒(C_6D_6 、 $CDCl_3$ 、 CD_3OD 、 D_2O)を適量セットし、溶媒そのものもしくは二酸化炭素により溶媒を加圧した。一定温度 313.4 ± 0.2 K で平衡に到達した後、溶媒の 2D 核を観測して、その緩和時間(T_1)ならびに並進拡散係数(D_i)を測定した。分光器には Varian Inova 300(2D の共鳴周波数は、46.0 MHz)を用い、 T_1 は inversion recovery 法、 D_i は pulsed field gradient spin-echo 法によりそれぞれ決定した。ここで、 2D は核スピン量子数が 1 の四極子であるため、その T_1 は四極子緩和時間とみなせる。よって、 T_1 は主軸に相当する結合軸の回転相関時間に逆比例($T_1 \propto 1/\tau_c$)するとして解析を行なった。

【結果と考察】重水素化溶媒を溶媒そのもので加圧した場合の D_i ならびに T_1 の圧力依存性を Figure 1 および 2 にそれぞれ示す。ただし、 D_i および T_1 は常圧の値(D_i^0 および T_1^0)で規格化した量をプロットした。 D_i および T_1 ともに、 D_2O の場合には僅かながら増加する傾向が観測されたが、その他の溶媒では圧力増加にともない減少することが確認された。この結果は、液体溶媒で一般的に観測される現象で、圧力

キーワード: 二酸化炭素、液体、拡散係数、回転相関時間、超臨界流体

かなくほ みつひろ、うめき たつや、あいざわ たかふみ、いくしま ゆたか

増加にともない分子の運動性が低下することを示している。

一方、重水素化溶媒に二酸化炭素を加圧した場合には、正反対の挙動を示すことが確認された (Figure 3 および 4)。 D_1 および T_1 とともに、 D_2O の場合の僅かな減少をのぞき、その他の溶媒では ~ 10 MPa 以下の圧力でも顕著な増加が観察された。この結果は、二酸化炭素を作用させることにより、容易に液相中の分子の運動性を "gas-like" へと高めることが可能なことを示している。さらに、各種溶媒への二酸化炭素の加圧効果は、 D_1 および T_1 において、それぞれ以下の順序であることが明らかとなった。

$$D_1: D_2O \ll CD_3OD < CDCl_3 < C_6D_6 \quad T_1: D_2O \ll CD_3OD < CD_3OD < C_6D_6 < CDCl_3$$

この二酸化炭素の加圧効果は、主に液体溶媒への二酸化炭素の溶解に起因するものと解釈される。溶媒によりその効果が著しく異なるのは、本来存在した液体溶媒-溶媒分子間の相互作用を断ち切って二酸化炭素が溶解し、そこに二酸化炭素-溶媒分子間の相互作用が新たに生成する過程を反映したためと考えられる。さらに、二酸化炭素の加圧による変化は、傾向こそ非常に似ているものの、 D_1 の方が T_1 よりかなり大きいことが明らかとなった。このことは、二酸化炭素の溶解量のみならず、並進 (D_1) と回転 (T_1) の二つの運動モードにおいて、二酸化炭素の溶解が "friction" へ与える効果が本質的に異なる--- T_1 はより近傍の環境を反映---ことを示唆している。

本研究では、二酸化炭素を加圧、溶解させることにより、液体の性質を "gas-like" 側へと移行、制御することを試みたが、高圧 NMR 法による分子の運動性の結果より十分に可能なことが確認された。

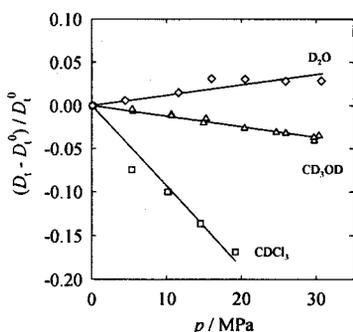


Figure 1. Pressure dependence of D_1 of some liquid solvents at 313.4 K.

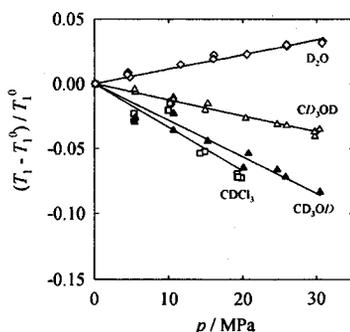


Figure 2. Pressure dependence of T_1 of some liquid solvents at 313.4 K.

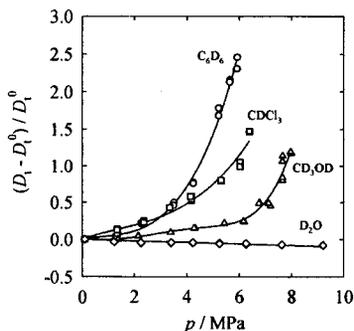


Figure 3. Pressure effect of CO_2 on D_1 of some liquid solvents at 313.4 K.

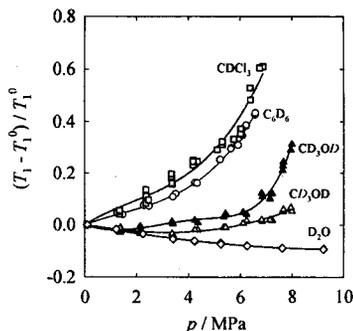


Figure 4. Pressure effect of CO_2 on T_1 of some liquid solvents at 313.4 K.

(産総研・生物情報解析研究センター)

○石塚靖子、根本直、金澤健治、中西洋志

 ^1H NMR spectra of branched cyclodextrins

(AIST, BIRC) Yasuko Ishizuka, Tadashi Nemoto, Kenji Kanazawa, and Hiroshi Nakanishi

^1H NMR spectra of branched α -cyclodextrins (α -CD) were observed with a high resolution NMR spectrometer and compared with spectra of α -CD and amylose. Seven branched α -CDs were used as the samples. Although these samples have only one kind of pyranose, α -D-glucose, dispersion of chemical shift was considerably large. Especially dispersion in the chemical shift in anomeric protons and H-4 protons was large. As these protons are located at the binding position, glucosyl binding influences directly on the chemical shift of these protons.

序 細胞の器官膜表面には蛋白質や脂質に結合した糖鎖が存在し、器官機能に応じた認識応答に関与している。これらの糖鎖は水素結合あるいは、 $\text{CH}-\phi$ 結合等の弱い結合を形成し、認識応答の役目を担っていると考えられる。認識応答の機構を解明するために複雑な糖鎖の NMR 信号の解析は重要である。 α -D-グルコースという全く同じ糖で構成された直鎖の分岐部を持つ α -シクロデキストリン(分岐- α -CD)では ^1H NMR スペクトルの信号の化学シフトはどのくらい異なるのであろうか。既に 500MHz の分光計を用いた分岐部の信号解析については、報告した[1]。ここでは更に高い磁場の SCM を用いた分光計で測定を行ない、CD 環部分の信号解析も行なったので報告する。

実験 7個の分岐- α -CD (G1- α -CD, G2- α -CD,..., G7- α -CD) は日研化学及び、塩水港製糖より入手したものを精製せず、そのまま用いた。NMR スペクトルの測定はおよそ 10 mM の重水溶液を用い、25°Cで行なった。用いた分光計は ECA800 (日本電子製、 ^1H 核について 800.14 MHz)である。信号の帰属のために TOCSY, HMQC, NOESY の解析と既に報告した ^{13}C 信号の縦緩和時間の結果を用いた。

結果 7個の分岐- α -CD の ^1H NMR スペクトルと分岐のない α -CD およびアミロースの ^1H NMR スペクトルとの比較を図に示した。図 a にある分岐のない α -CD のスペクトルは α -D-グルコースと全く同じ化学シフトをもち、信号の幅がわずかに広くなっただけである。分岐としてグリコシル基が1個入ったものでは図 b のようになり、分岐のグリコシル基の信号ははっきりと区別ができる。分岐としてマルトシル基が入ると、分岐部のアノメリックプロトンは骨格のアノメリックプロトンの反

 α -シクロデキストリン 分岐シクロデキストリン ^1H NMR

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

対側に信号が出て、分岐部の2つの信号の化学シフトの差は0.3 ppmを超える。分岐が大きくなるに従って、低磁場の分岐部の信号強度が増し、それはアミロースの1位の信号と同じになる。分岐部の4位の化学シフトも同様に低磁場に移動し、やがてはアミロースの信号に近くなる。一方、骨格部分の信号もわずかではあるが、 α -CDを構成する6個の α -D-グルコースに違いがでてくる。その違いは図 b-h の1位に明らかに見られるが、分岐部で見られる違いに比べてかなり小さいものであった。 [1] Y. Ishizuka, et al., *J. Carbohydrate Chem.*, 10(4), 583-592, (1991).

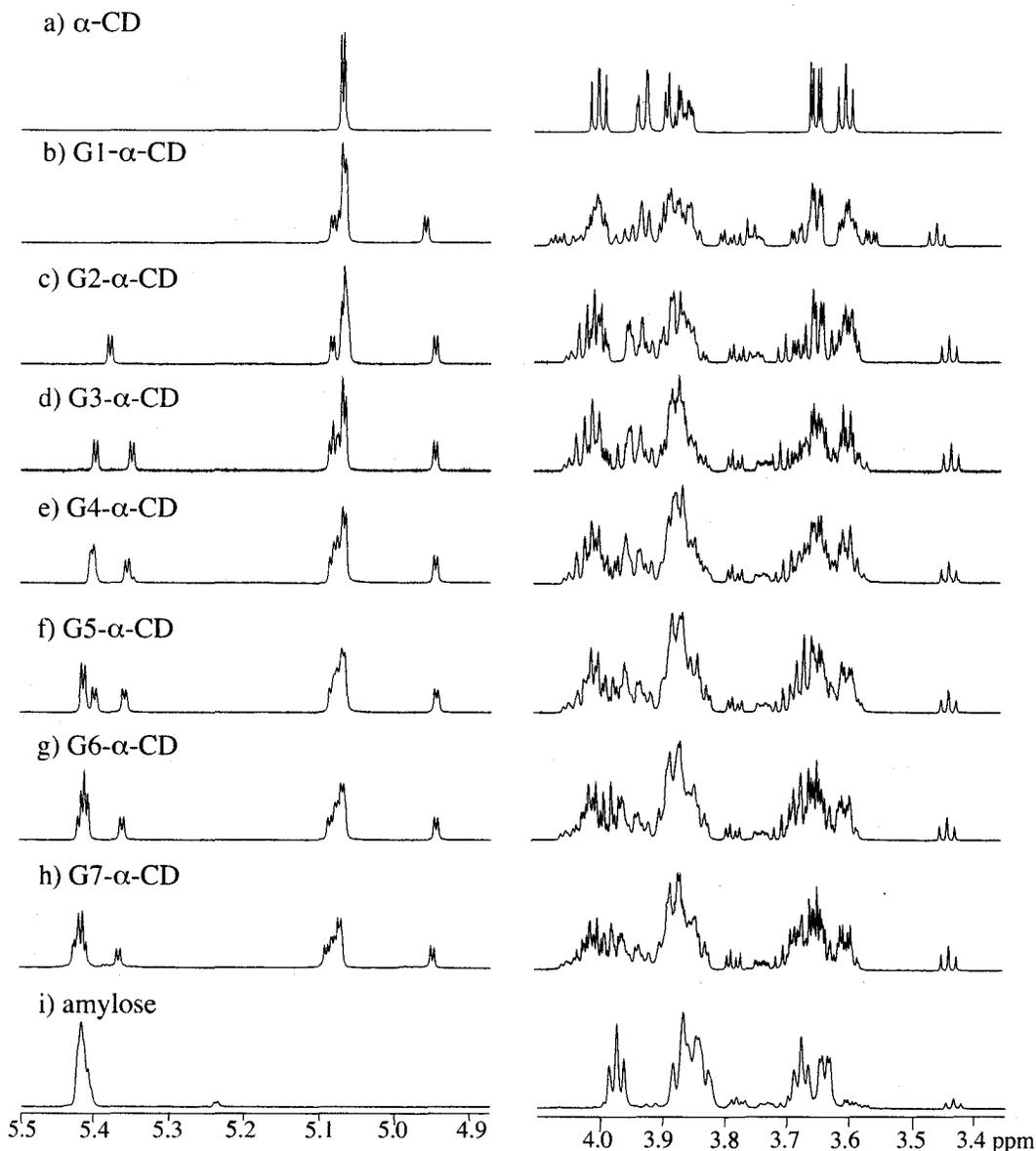


Fig. ^1H NMR spectra of branched α -CD compared with α -CD and amylose

P 19

糖鎖アレルギーの分子認識における溶液中立体構造に関する研究

東和大工 1、福山大工 2、サントリー生物有機研 3、(株)日本電子データム 4

○加藤祐子 1、福山貴士 1、宗像達夫 1、太田雅也 2、岩下孝 3、藤原正子 4、松浦史登 2

Conformational Studies of Allergenicity of Pentasaccharitol by NMR

(1Tohwa University, 2Fukuyama University, 3Suntory Institute for Bioorganic, 4JEOL Datum Ltd.)

○ 1Yuko Kato; 1Takashi Hukuyama, 1Tatsuo, Munakata, 2Masaya, Ohta; 3Takashi Iwashita, 4Masako Fujiwara; 2Fumito Matsuura Pentasaccharitol, HPG- β 2-N6 is an allergenic active O-linked oligosaccharitol derived from a sea squirt H-antigen. Concerning the interaction between the allergen and specific IgE, an analysis of the solution structure of the saccharitol was carried out. ¹H- and ¹³C-NMR assignments for the pentasaccharitol were obtained using 1D-HOHAHA, TOCSY, DEPT135, HSQC and HSQC-TOCSY techniques. The solution structure was determined using a combination of ROESY data and distance geometry (DG) calculations in dihedral angle space with DADAS 90 program⁴⁾.

[背景と目的]

養殖牡蠣殻に付着する白ホヤの体液中の糖タンパク質の糖鎖が、喘息アレルギーのアレルゲンであることが、太田らによって生化学的、免疫化学的にわかった¹⁻²⁾。この五糖鎖アレルギー HPG- β 2-N6 (Fig. 1) が生体中の Ig E と結合してアレルギー症状を発症するが、糖鎖が分子認識をおこなうときの立体構造をしらべるために、まず溶液中の糖鎖のみの立体構造を研究した。我々は前回もう一つの糖鎖アレルギーである HPG- β 2-N5a の立体構造を明らかにしたが、³⁾この N5a と N6 五糖鎖アレルギーはその構成糖や、配列がちがう。2種の五糖鎖アレルギーの立体構造から、Ig E と結合する際の情報を得ることが目的である。

[実験]

NMR 測定 : JEOL ECP-500, ECP-600, Inverse Probe, を用いて ¹H, DEPT-135, pfg-1D HOHAHA(homonuclear Hartman Hahn), HSQC-TOCSY, を行い、Bruker DMX-750 で ¹H, ROESY (Fig. 2) (mixing time 250 ms), TOCSY (locking power B = 8.3 KHz) の測定をした。これらのデータは、NMR Pipe(2001 版)でプロセスを行い、その NOE 情報を解析して、DADAS90 プログラムにより Distance Geometry calculation (DG) を行った。

五糖鎖アレルギー、HSQC-TOCSY、ROESY、五糖鎖の立体構造、DADAS90

かとうゆうこ、ふくやまたかし、むなかたたつお、おおたまさや、いわしたたかし、ふじわらまさこ、まつうらふみと

[結果]

各種 NMR 測定データから、HPG- β 2-N6 (Fig 1) の ^1H , ^{13}C の assignment を行った。

糖鎖構造は GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3 側鎖と GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-6 側鎖の 2 本からなっており、ROESY の解析から NOE は 36 個あり、その中、分子間 NOE は 13 個あった。これらの結果からこの 2 本の側鎖はある距離を保っており、末端の 2 つの GalNAc β がエピトープの活性部位であることを示唆している。

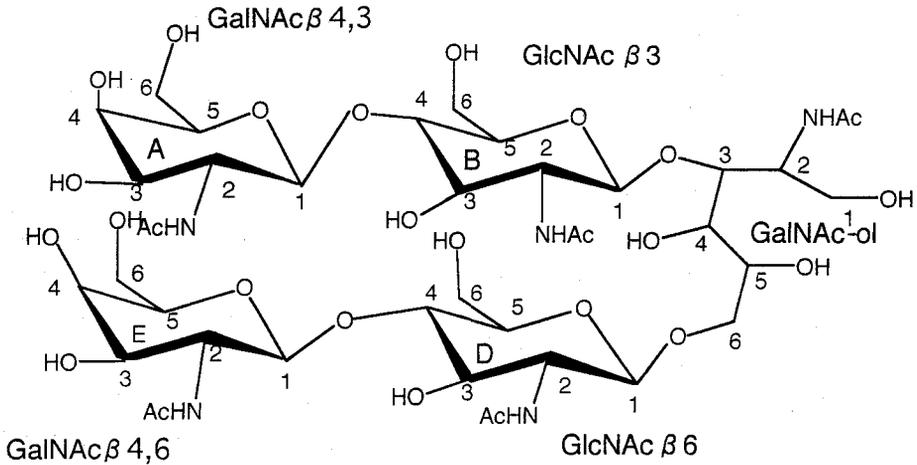


Fig. 1. The antigen pentasaccharitol HPG- β 2-N6 with the O-glycosidic linkages

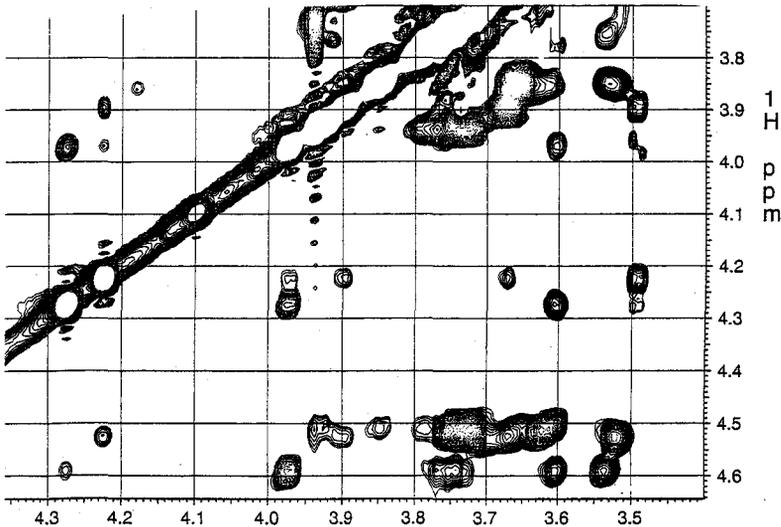


Fig. 2 ROESY spectrum of HPG- β 2-N6 (D $_2$ O, 303 K, 750 MHz, mixing time 250 ms)

[謝辞] 日本電子の藤井直之氏には ECP-600 MHz の測定でお世話になりました。

- 1) M. Ohta, S. Shigeta, K. Ono, S. Oka, et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 275,151 (1989)
- 2) S. Shigeta, K. Ono, M. Ohta, F. Matsuura et al. *J. Biochem* 1990, 108, 47
- 3) Y. Kato, M. Ohta, T. Munakata, M. Fujiwara, N. Fujii, S. Shigeta, F. Matsuura, *Mag. Res. Chem*, 39, 259 (2001)
- 4) S. Endo, H. Wako, K. Nagayama, N. Go, *NATO ASI series*, 233 (1991).

産総研 計測標準研究部門

○齋藤剛、岩澤良子、井原俊英、衣笠晋一、野村明

Application of LC-NMR to Quantitative Measurement of Organic Compounds

National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Takeshi Saito, Ryoko Iwasawa, Toshihide Ihara, Shinichi Kinugasa, Akira Nomura

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is one of the unique analytical instruments because it does not need the calibration standards. The ratio of the areas gives the number of nuclei weighted mole ratio of compounds creating the signals. Comparison among signals originating from nuclei in the similar moiety is expected to give better quality of the ratio because these nuclei should have similar properties, such as relaxation time, compared to the nuclei in different moiety. One of the problems for the comparison among the nuclei in the similar moiety is signal overlap in the NMR spectrum. One such way to solve the problem is to combine NMR with liquid chromatography (LC), which is a technique that separates mixtures of compounds in solution state. When LC separates the mixtures, the problem of overlapping signals can be resolved. Here we present the application of LC-NMR to International System of Units (SI) traceable quantitative analysis.

はじめに

NMR は化学構造など情報を明確に与える、最も重要な分析機器であると言って過言でないであろう。化学構造、運動性などに関する研究は数多く行われているが、NMR の定量性の不確かさを評価した研究はまださほど多くない。NMR 信号の積分強度はその信号に寄与する核の数に比例することは知られており、すなわちモルの単位系を直接比較する事が可能な方法である。ピーク積分値を比較する上では、似た環境にある核同士を比較した方が、緩和時間などが類似している事が多く、したがって精度の高い定量性が得られることが期待できる。一方で、定量しようとするピークが分離している必要があるが、似た環境にある核同士ではピークが重なってしまうことが多く、このため類似化合物の同士での

キーワード: 定量 NMR、LC-NMR、不確かさ、SI 単位系、CCQM

さいとうたけし、いわさわりょうこ、いはらとしひで、きぬがさしんいち、のむらあきら

NMR での定量性検討は困難になる。本研究では、液体クロマトグラフィー(LC)を NMR と連結することで、混合物を分離した上で NMR を利用して定量測定を行った。この方法は、不純物や混合物を LC の時間軸方向に分離することが可能なためピークのオーバーラップ無しに測定可能な SI 単位系に直結した定量方法として期待ができる。LC-NMR を利用した実験の、再現性などについて検討をしたので、ここで報告する。

実験

NMR 装置は Varian ^{UNITY} INOVA600 で、Interchangeable Flow Cell(IFC)マイクロフロープローブ(60 μ L アクティブボリューム)を利用した。LC 装置は Agilent 1100 シリーズを用い、カラムは化学物質評価研究機構の L-column ODS (250 x 4.6 mm i.d.) を用いた。LC と NMR は、LC のオートサンプラーの信号を受けて NMR の実験が開始するよう設定した。市販品の o-Xylene は、通常 m-Xylene と p-Xylene を不純物として含むため、純度を NMR で高精度に測定することは困難である(Fig1)。本実験ではオンフローLC-NMR 法を利用して、LC で不純物を分離しながら o-Xylene の純度を高純度 o-xylene を利用しての決定を試みた。2 種類の o-xylene は同一条件のもとで順番に LC-NMR 測定を行い、それぞれの o-xylene の NMR のピーク積分値を比較検討した。LC 移動層は 1 mL 毎分で 40%CD₃CN、60%D₂O の組成を 40 分間で 100%CD₃CN になるようリニアグラジエントをかけた。NMR は 1.8 秒間に 1 回積分するよう設定した。

結果

LC-NMR を利用した際に得られるピーク積分値の再現性は、ピークの面積強度のばらつきが 3%以下であったが、LC の実験を繰り返すことで積分値が増加する傾向が見られた。一方で、高純度試料と市販試料とのピークの相対面積強度のばらつきは約2%で、絶対積分強度に見られたような時間に対する依存性は無く、LC-NMR を利用した定量測定が有用であることがわかった。現在実験精度や不確かさなど、高精度化について検討を行っている。

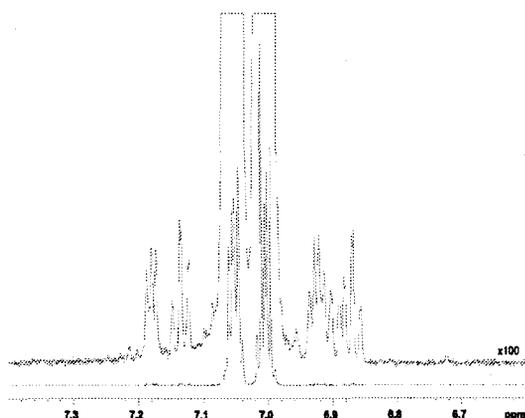


Figure 1 ¹H NMR spectrum of aromatic region of o-xylene.

謝辞

LC のオートサンプラーと NMR を連動するための設定を行っていただいた、バリアンテクノロジー ジャパン リミテッドの稲葉 好美氏、串田 克彦氏、関 充男氏に深く感謝致します。

(シーエーシーズ 横浜分析センター) ○櫻井愛子, 松原康史

Determination of Molecular Structures with ^{13}C NMR and
Computer-Assisted Structure Elucidation

Yokohama Laboratory, Center for Analytical Chemistry and Science, Inc.

Aiko Sakurai and Koshi Matsubara

We propose the combined use of ^{13}C NMR and computer-assisted structure elucidation as one of the solutions to the case when the ^1H - ^{13}C HMBC method is not so effective in structure determination. HMBC method is a powerful tool for identification of organic compounds, but sometimes we cannot obtain enough information from the HMBC spectrum, especially when the cross peaks are so scarce due to limited sample amounts. All the ^{13}C NMR signals including the quaternary carbons could be observed in 12 hours for 90 μg of dihydrocholestanol, while HMBC spectrum obtained in the same experimental time showed only few cross peaks, mainly from methyl signals. Thus, ^{13}C NMR combined with structure elucidation program could be a help to enhance the total speed for determination of molecular structures.

はじめに 低分子量の有機化合物の分子構造を決定する場合、 ^1H , COSY, ^1H - ^{13}C HSQC および HMBC スペクトルが測定できればかなりの程度まで構造が決まる。特に HMBC で部分構造をつなぎ分子構造を構築する方法は極めて有効である。しかし、例えば多くの水素とのスピン結合によりシグナルの高さが低くなる場合や、代謝物や天然物など試料が微量である場合には、HMBC で解析に十分な相関シグナルが検出されないことがある。また、 ^1H NMR でシグナルが複雑に重なる、あるいはもともと水素の少ない化合物などでは、HMBC を測定しても解析が困難な場合がある。そのような場合に、 ^{13}C NMR と DEPT を測定し構造解析支援システムを利用すると有効である可能性がある。

実験・結果 本研究では Advanced Chemistry Development 社の構造解析システム Structure Elucidator V5.0 を使用した。炭素数 10-20 の化合物データを用いて、このシステムを効果的に使用するための入力条件を検討した。また、12 時間の測定で得られる ^{13}C NMR データを用いてステロイド系化合物の同定を検討した。このシステムでは、1) 15 万件の ^{13}C NMR 化合物データベースを検索し、2) 57 万件の部分構造の ^{13}C NMR データをもとに実験データに合致する部分構造を検索し、それらをつなぎ合わせ (Standard Generator)、それでも構造を導出できない場合には、3) 分子式の候補 (複数でも可) が入力されていれば構造発生アルゴリズム (Classic Generator) が起動して分子の生成を試みる。

1. 入力条件の検討 炭素数 10 から 20 の化合物について ^{13}C NMR 化学シフトと多重度を入力し、正解構造を導出するための入力条件を検討した。例えば Fig.1 に示すピロール誘導体の場合、狭い化学シフト範囲にシグナルが密集しているが、化合物 1-4 は化学シフトと多重度の入力

分子構造解析システム

さくらいあいこ, まつばらこうし

で5分以内に正解構造を得ることができた。DEPTあるいはedited HSQCによる多重度の情報は重要であり、この情報が欠けると適切な部分構造が上位候補として得られず、例えば構造4では計算時間が1分から33分へと大幅に増えた。また、通常NMRによる構造解析ではすでに分子量がわかっている場合もあるので、分子式の候補を与えると正解が得られやすい。その他、ユーザー作成の部分構造データベースを使用する入力条件も検討した。

2. 100 μg 以下の化合物の構造決定 ステロイド系化合物 90 μg の ^{13}C NMR および HMBC をそれぞれ 12 時間で測定した。 ^{13}C NMR では四級炭素を含む全てのシグナルを検出できたのに対し (Fig.2), HMBC ではメチル基水素以外からの相関シグナルがほとんど得られなかった。 ^{13}C NMR と DEPT データを用いて Structure Elucidator への入力条件を検討した。化学シフトの実験値だけではステロイド骨格を構築することすらできないが、多重度の情報を加えることにより側鎖が異なるだけの正解にかなり近い構造を導出でき、さらにイソプロピル基を認識させるためにメチル基の入力データを変更したところ正解構造が得られた。微量試料の構造解析など HMBC があまり有効でない場合においては、 ^{13}C NMR データを活用した本手法により構造決定までの時間を短縮できると期待される。

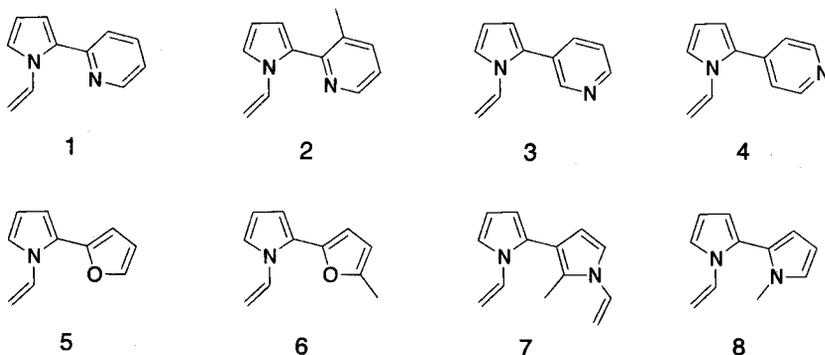


Figure 1. Example of the compounds tested for the structure elucidation.

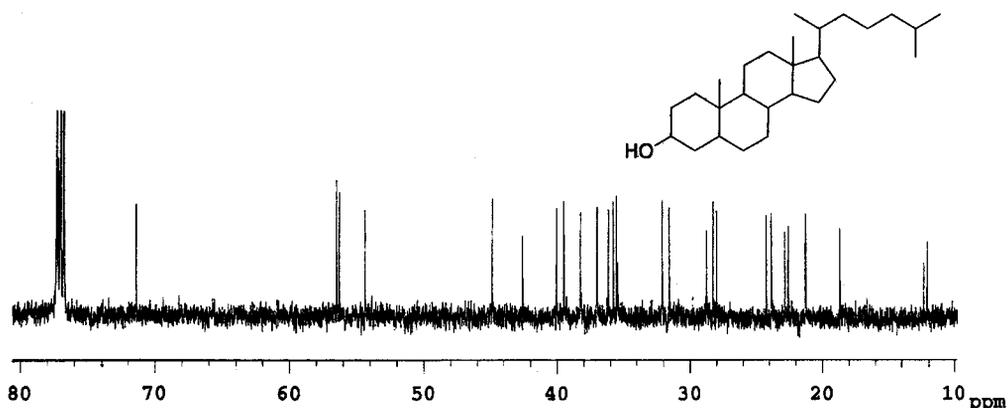


Figure 2. ^{13}C NMR spectrum of 90 μg of dihydrocholesterol obtained in 12 h using a Varian nanoprobe.

常磁性金属効果を利用したタンパク質の立体構造情報の抽出の試み

(奈良先端大バイオサイエンス研究科¹、横浜市立大学総合理学研究科²)

○ 野村誠¹、三島正規¹、天野剛志²、藤原健一朗²、白川昌宏²、児嶋長次郎¹

A trial to obtain structural information of the protein using paramagnetic effects

Makoto Nomura¹, Masaki Mishima¹, Takeshi Tenno², Ken-ichiro Fujiwara², Masahiro Shirakawa², and Chojiro Kojima¹

¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology,

²Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University

Abstract

The High-throughput method of the NMR structure determination is required in the proteomics era. We are developing such method using the paramagnetic effect. Gd was localized to the 6xHisTag of the target protein. EDTA was needed to cover the other chelating sites of Gd and to prevent non-specific binding. For 3 samples, strong but suitable relaxations was detected on ¹H-¹⁵N HSQC spectra. The relaxation effect of Gd-EDTA was somewhat shielded on the secondary structure region. However, no distance information was obtained so far.

序論

今日、構造ゲノムやプロテオミクスに代表される網羅的研究の進展が著しい。このような背景のもと、NMRにおいても、構造決定のハイスループット化の必要が生じており、様々なアプローチから方法論の開発が行われている。一方、ヘムタンパク質などに代表される金属タンパク質において、反磁性金属を常磁性金属に置換し、常磁性金属のシフト効果や緩和効果からの距離制限を用いて、構造決定の高速化、精密化を行う方法がある。本研究では、この常磁性金属を用いた構造決定方法論の一般化を目的としている。

タンパク質、立体構造、常磁性金属、ヒスチジンタグ、遠距離情報

のむらまこと、みしままさき、てんのたけし、ふじわらけんいちろう、しらかわまさひろ、こじまちょうじろう

実験材料および方法

一般にタンパク質に対する影響が少ないと考えられているヒスチジntagを用いて常磁性金属をタグに局在させ、また、タンパク質の表面への非特異的結合を遮断するために金属の余剰配位子座をキレーターで保護した。実際には、タンパク質に数残基のアミノ酸によってリンクされたヒスチジntag (x 6) を付加し、リン酸バッファーを含む 0.1 mM タンパク質溶液にあらかじめ調製した 0.3 mM 常磁性金属、0.6 mM キレーター混合溶液を加え、過剰金属およびキレーターを透析にて除去した。キレートの有無は、解離状態の金属 (2 価および 3 価) がリン酸と不可溶沈殿を形成することにより検出した。

常磁性核種として Ni, Co, Gd, Eu, コントロールとして反磁性金属 Zn を用いた。キレーターとして分子形状がリニア状である NTA, EDDA, EDTA, DTPA, GEDTA および、マクロリング状である Hemato Phorphyrin IV, OmniScan(Gd)を用いた。使用したタンパク質は、約 7 kDa の 1 つの α ヘリックスをもつモデルペプチド、約 11 kDa のユビキチンフォールドを持つタンパク質、および約 14 kDa の DNA 結合ドメインである。上記のサンプルを Bruker DRX 800 NMR 装置で ^1H - ^{15}N HSQC 実験を行った。定量化は解析ソフトウェア NMRDraw のピーク同定機能から得た半値幅と化学シフトを用いて行った。

Gdによる緩和効果

約 7 kDa タンパク質を用いて主にシフト効果を及ぼすと考えられる Eu-EDTA, Ni-NTA および主に緩和効果を及ぼすと考えられる Gd-EDTA, Mn-NTA の系を検討した。シフト系金属では、Eu-EDTA で約 7 個、Ni-NTA で約 2 個のシグナルに 0.01 ppm のシフトが観測された。緩和系金属においては、Gd-EDTA において全シグナルで、Mn-NTA においても多数のシグナルに対して緩和効果が確認され、かつ、消失したシグナルは 0 または 1 個であった。コントロールの Zn-NTA に対する平均半値幅が 21.3 ± 2.8 Hz、Mn-NTA においては 21.9 ± 2.8 Hz、Gd-EDTA において、 30.7 ± 3.8 kHz であった。(Fig1)。

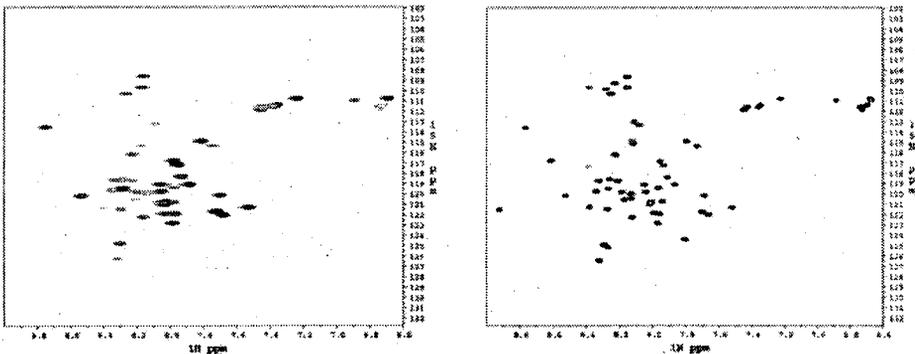


Fig 1 The ^1H - ^{15}N HSQC spectra of 7kDa model peptide with Gd-EDTA (left) and Zn-NTA(right).

次に Gd においてキレーターを選択を行った。Gd-NTA においては、不可溶沈殿の存在が確認された。他のキレーターの平均半値幅は Gd-EDDA で 49.4 ± 47.6 Hz、Gd-EDTA で 30.7 ± 3.8 Hz、Gd-DTPA で 27.6 ± 7.3 Hz、Gd-GEDTA で 21.6 ± 2.2 Hz であった。Gd-EDDA においては約 8 個のシグナルが消失した。Hemato phophyrin IV および OmniScan(Gd)においては、シグナルに有意な差は検出されなかった。

Gd-EDTA の高次構造に対する影響

Gd-EDTA システムを用いて、モデルペプチドおよび約 11 kDa ユビキチン様タンパク質における高次構造への影響を解析した。Zn-NTA での半値幅からの差を表す差半値幅をアミノ酸に対してプロットした結果を、その 2 次構造と共に示す (Fig2)。

モデルペプチドおよび約 11 kDa ユビキチン様タンパク質の 3 次元立体構造における Gd からの距離と差半値幅の相関を解析したが、モデルペプチドでは相関係数 0.01、約 11 kDa ユビキチン様タンパク質では -0.12 であり、有意な相関関係は確認されなかった。

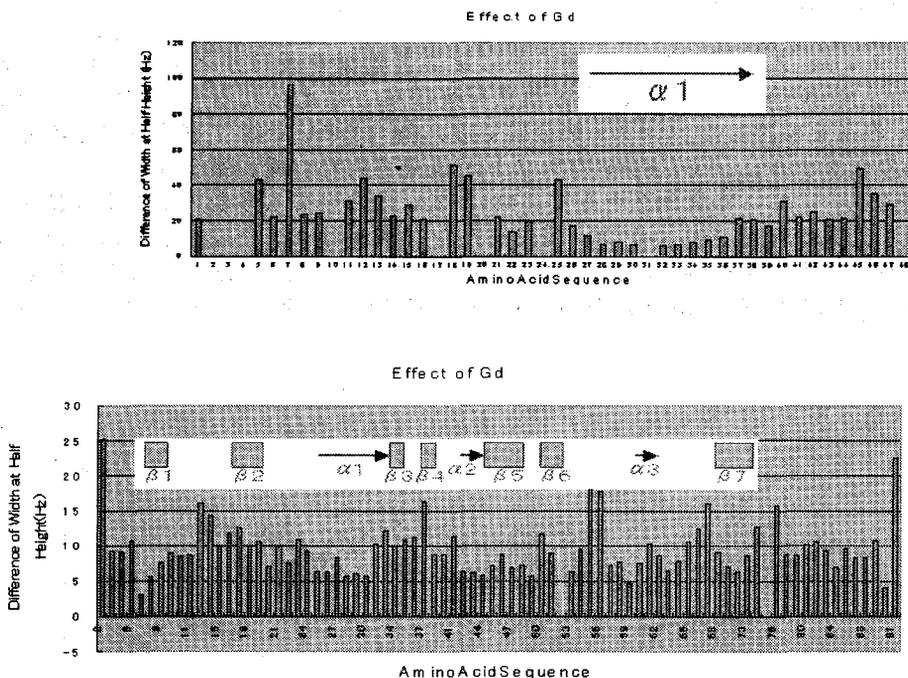


Fig 2 The relaxation effect plots of model peptide with Gd-EDTA(top) and 11kDa ubiquitin like protein with Gd-EDTA(bottom) to the amino acid sequences and the secondary structures.

Fig2 のプロットの結果より、モデルペプチドにおいては α ヘリックス形成部位で Gd の緩和効果が遮断されていることがわかる。立体構造上の距離と緩和効果に相関がない点、および Gd-EDTA において 1 配位子座が水により占められている点から、Gd と観測核の空間を介した直接の緩和機構以外に水を介した交換緩和機構が存在すると考えられる。

ヒスチジntagが要求する 2 配位子座より少なくなっている Gd-GEDTA および OmniScan(Gd)において、透析の段階での脱離に起因すると思われる緩和効果の消滅、Gd-EDTA において 5 mM から 755 mM まで塩濃度を滴定した実験においてすべてのサンプルポイント間でシグナルの半値幅に高い相関が見られた。したがってヒスチジntag以外のタンパク質表面に対するイオン性非特異的結合の可能性は低いと考えられる。

約 14 kDa DNA 結合タンパク質における研究

Gd-EDTA を約 14 kDa DNA 結合タンパク質に導入し、緩和効果を検討した。Gd-EDTA で多数のシグナルで緩和効果がみられた(Fig3)。平均半値幅は、Gd-EDTA で、 41.9 ± 34.9 Hz、Zn-NTA で 26.1 ± 4.3 Hz であった。現在、主鎖の帰属を行っており、約 80 パーセントの帰属を終えている。発表当日は、主鎖の帰属および Gd-EDTA の効果とタンパク質構造の関連についても議論する予定である。

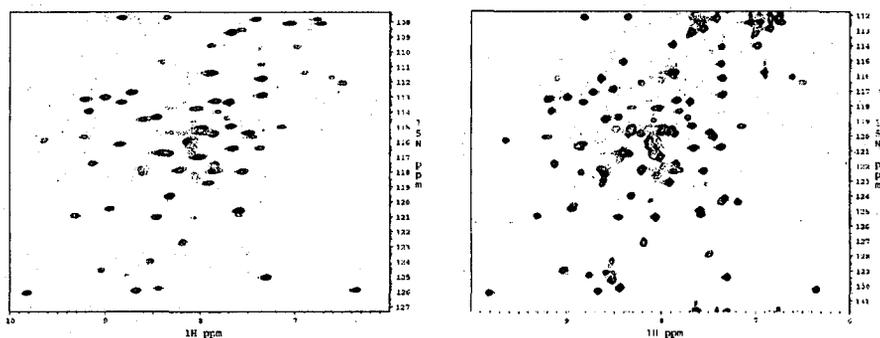


Fig 3 The ^1H - ^{15}N HSQC spectra of 14kDa DNA binding protein with Gd-EDTA (left) and Zn-NTA(right).

超臨界水のその場観測を目的とした高温・高圧 NMR プローブの試作

(産総研¹・超臨界セ¹、東北大院理²、日機装 R&D³、CREST⁴)○金久保光央^{1,4}・梅木辰也^{2,4}・相澤崇史^{1,4}・生島豊^{1,4}・山崎博実^{3,4}・八名純三^{3,4}

A Trial to Develop High-Temperature and High-Pressure NMR Probe for In-Situ Observations of Supercritical Water Solutions

(Supercritical Fluid Research Center, AIST¹; Graduate School of Science, Tohoku University²; Nikkiso R&D Center³; JST, CREST⁴) ○Mitsuhiro Kanakubo,^{1,4} Tatsuya Umecky,^{2,4} Takafumi Aizawa,^{1,4} Yutaka Ikushima,^{1,4} Hiromi Yamazaki,^{3,4} and Junzo Yana^{3,4}

We have attempted to construct a new type of high-temperature and high-pressure NMR apparatus for in-situ observations of supercritical water solutions. The developed apparatus can be easily separated into the two main parts of the high-temperature probe and the high-pressure cell. In this presentation, the design and structure of the apparatus were given and discussed in detail.

【緒言】水や二酸化炭素をはじめとした超臨界流体は、従来の液体溶媒にない多くの特徴を有し、環境調和型プロセスの媒体として注目を集めている。我々は、それらの利点を活かした各種反応プロセスの構築を目的として、その溶媒機能の解明、ならびに、その場測定装置の開発を行なってきた。超臨界状態などの高温・高圧条件下での NMR 測定は、その困難さにも拘らず、1979 年の Jonas ら¹を初めとして、近年では Hoffman ら²や Matubayasi ら³による報告がある。本研究では、臨界点が温度 374 °C、圧力 22.1 MPa と比較的過酷な条件の水を対象とした高温・高圧 NMR 装置の開発を新たに試みた。

【高温・高圧 NMR 装置の構造と特徴】開発した高温・高圧 NMR 装置の概略を Figure 1 に示す。操作上の利便性を高めるために、装置は高温プローブ(I)と高圧セル(II)とに容易に分割可能な構造とし、プローブや rf コイルは常圧下(さらに、コイルは可能な限り常温)に設置した。以下に、それぞれについて詳細の説明を与える。

(I) 高温プローブ・・・超臨界流体は、温度ならびに圧力を敏感に反映し、その流体密度が大きく変化して対流などが起こるため、しばしば測定が困難となる。そこで、観測部における試料温度の均一性を高めるため、高温プローブは出来る限り簡潔で対称的な構造とし、上下に二つのヒーター(d)を設置した。ヒーターは外径 0.5 mm φ の Pt 線を無誘導巻きにし、加熱には約 100 kHz の交流電源を使用した。ヒーターの外周を断熱材(e)で遮蔽するとともに、rf コイル(c)の設置された観測領域は石英ガラス製の真空二重管(b)で断熱を施した。温度の調整は、上下ヒーターの内側にそれぞれ設置した熱電対(図示せず)の指示で PID 制御し、温度勾配を減少させるとともに、観測部直下の Pt 温度計で試料温度を見積もった。サドル型の rf コイル(c)は、熱雑音を抑えるため、冷却ガスにより常温雰囲気に近い状態に保つ

キーワード: 超臨界水、高温・高圧、NMR プローブ

かなくぼ みつひろ、うめき たつや、あいざわ たかふみ、いくしま ゆたか、やまざき ひろみ、やな じゅんぞう

よう心掛けた。rf コイルは常圧下に設置されているため、電気的な信号ケーブルの取り出しも比較的容易である。また、安全対策として、高温プローブから超伝導磁石への熱伝導を避けるため、水冷ジャケット(a)を設け、さらにプローブと室温シムとの間に Ti 製の保護管(図示せず)を設置した。

(II) 高圧セル・・・高圧セルは比較的耐食性に優れたアルミナ製(99.95%)のチューブ(i, k)を用いた。内管のサイズは、内径 8.0 mm φ、外径 13.5 mm φ、外管のサイズは内径 14.5 mm φ、外径 22.0 mm φである。室温での静水圧の試験では、どちらのチューブも約 70 MPa 程度まで破壊せず、耐圧強度が高いことが確認された。さらに、二重管とすることで試料のコイル内充填率の低下を防ぎ、かつ、耐圧性(理論上は~140 MPa)を高めることが可能である。低圧下での測定では、外管のみを使用して試料体積の増加を図ることで感度の向上が望める。高圧セルを二重管とすることで、試料温度の均一性を高めることもでき、さらに、スパーサー(h)の使用で対流を防止することが可能である。高圧セルのフランジ部は、耐食性に優れた Hastelloy を使用し、金属製の O-リング(j) でシールを行った。圧力制御は試料管に通じたポートを利用して行い、外管にはノイズとならない流体(例えば、N₂ や Ar などの不活性ガス)を加圧してバランスをとり、内管には試料流体をポンプで外部から送液して加圧した。フランジ上部に設置したフリー・ピストン(g)を用いても試料の圧力コントロールを行うことは可能である。

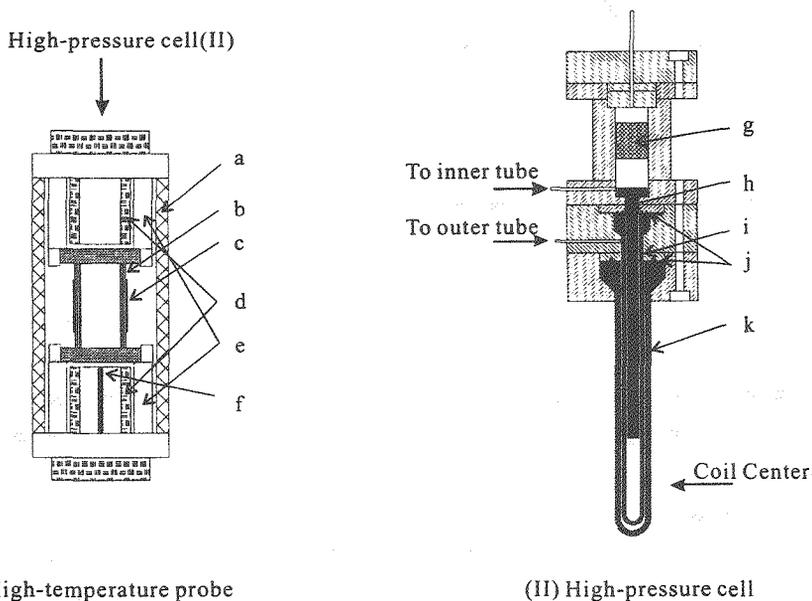


Figure 1. A schematic drawing of high-temperature probe (I) and high-pressure cell (II): (a) water jacket, (b) vacuum double tube, (c) rf coil, (d) heater, (e) insulation jacket, (f) Pt thermometer, (g) free piston, (h) spacer, (i) inner tube, (j) metal O-ring, and (k) outer tube.

【参考文献】

1. T. H. DeFries and J. Jonas, *J. Magn. Reson.*, **35**, 111 (1979).
2. M. M. Hoffmann and M. S. Conradi, *Rev. Sci. Instrum.*, **68**, 159 (1997).
3. N. Matubayasi, C. Wakai, and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.*, **107**, 9133 (1997).

(理研¹, 国立情報学研²)
○越野広雪¹, 佐藤寛子²

Applicaton of CAST/CNMR System to ^{13}C -NMR Assignments Based on
Similarity of Stereochemical Structures and 1D ^{13}C -NMR Data

(RIKEN¹, NII²)
H. Koshino¹ and H. Satoh²

We have developed a new computer system CAST/CNMR for accurate ^{13}C -NMR chemical shift prediction using a database considering stereochemistry. For practical use of CAST/CNMR system to assignments of ^{13}C -NMR signals and stereochemistry of complicated natural products and synthetic compounds, high quality and large quantity of contents of the database are very important. CAST/CNMR has been applied to generate useful contents of the database from synthetic compounds including diastereoisomeric compounds of which stereochemistry were synthetically confirmed but 1D ^{13}C -NMR data have not been assigned.

CAST/CNMRは立体化学を考慮し、データベースに基づいて化学シフトを予測するシステムである。¹⁻⁵ 正確に予測を行うためには立体化学が明確に決定され、確実な方法で帰属の行われたデータを用いることが必須である。天然有機化合物には、立体化学も含めて構造決定され、2次元NMRデータにより ^{13}C -NMRの帰属がなされた化合物のデータも多いことから、CAST/CNMRシステムのデータベースの主要なデータとして登録されている。しかし、天然有機化合物の一連の同族体では同じ平面構造をもつ部分が似た立体化学構造をもつ場合が多く、一つの平面部分構造に対し全ての立体異性体のデータは存在しない場合が多い。一方、化学合成された化合物では立体化学が決定され、一つの平面構造に対し全ての立体異性体の ^{13}C -NMRデータが報告されている例は少なくないが、2D-NMRなどの明確な方法で帰属の行われた報告例は少ないのが現状である。もしこれらの合成有機化合物に対して信頼できる帰属を行うことができれば、CAST/CNMRシステムにおける有効なデータとなりうる。CAST/CNMRシステムでは、同じ化学シフト値を与えるべき部分構造を

CAST/CNMR、立体化学、データベース、化学シフト予測、帰属

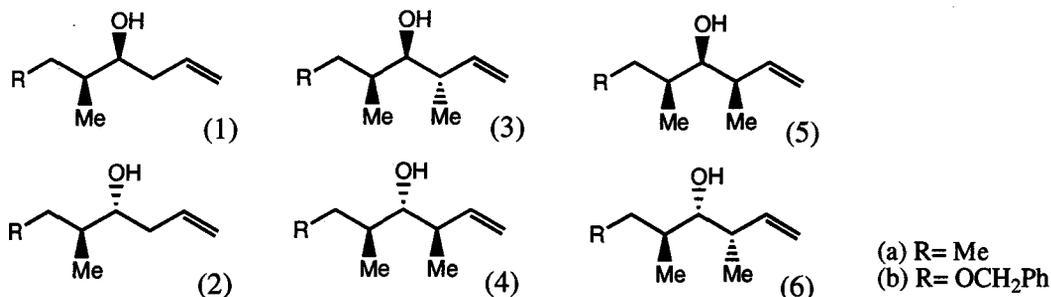
こしのひろゆき、さとうひろこ

有する化合物をデータベースから効率的に検索できるため、大量のデータに対しても比較すべきデータを的確に見出すことができる。そこでCAST/CNMRシステムのこの機能を活用し、立体化学は決定されているものの¹³C-NMRの帰属の行なわれていない化合物の文献値について帰属を行うことで、有効なデータを増やし、データベースを拡充する方法について検討した。その結果、化学シフト差が小さい場合を除き、ほぼ全ての炭素原子について帰属を行うことができたので報告する。

立体化学は決定されているが¹³C-NMRの帰属が行われていない化合物の帰属をCAST/CNMRを用いて行うためには、はじめに、帰属したい有機化合物をCAST/CNMRのデータベースに登録しておく。帰属を行うための手順は以下の通りである。(1) CAST/CNMRで化学シフト値の予測された部分について帰属する。

(2) データベースに該当する部分構造が存在しなくても、カルボニル、酸素官能基の付け根、メチル基などの特徴的な官能基が一つしか存在しない部位については帰属を行う。(3) CAST/CNMRの部分構造検索機能でマッチしたが、帰属情報のない複数の化合物データについて、共通する化学シフト値を見い出す。(4) 見い出された共通するシフト値と値の近い化学シフトが存在しない場合は帰属を行い、値の近い化学シフトが存在する場合には交換可能として帰属する。(5) メチル基など複数の類似の官能基や部分構造が存在する場合で、上記の手続きの後、未帰属の部位が一箇所の場合には帰属を行う。以上の作業を繰り返す。

今回はポリケタイド系化合物のモデル化合物を中心に¹³C-NMRが帰属されていない化合物100件程度を含む化合物データ約千件からなるデータベースを用い、種々の鎖状の有機合成化合物について帰属を行った。結果として、同族体の数が十分に存在する場合には、化学シフト値の差が小さい場合を除きかなりの¹³C-NMRの帰属が可能であった。帰属した12種の化合物の構造を一例として以下に示す。⁶ なお発表では、本手法の基本的な考え方と問題点に関しても発表する。



参考文献

- 1) H. Satoh, H. Koshino, K. Funatsu, and T. Nakata, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **40**, 622-630 (2000).
- 2) H. Satoh, H. Koshino, K. Funatsu, and T. Nakata, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **41**, 1106-1112 (2001).
- 3) H. Satoh, H. Koshino, and T. Nakata, *J. Comput. Aid. Chem.*, **3**, 48-55 (2002).
- 4) 佐藤寛子, 越野広雪, 中田 忠, 第43回天然有機化合物討論会講演要旨集, pp199-204 (2001).
- 5) 越野広雪, 佐藤寛子, 中田 忠, 第40回NMR討論会講演要旨集, pp242-243 (2001).
- 6) H. C. Brown, K. S. Bhat, and R. S. Randad., *J. Org. Chem.*, **54**, 1570-1576 (1989).

溶液中でのコンホメーション解析 III

-L-Ile を D-Ile に置換した誘導体の溶液中でのコンホメーション平衡 -

(神戸薬科大学¹, 大阪薬科大学², 大阪大学大学院薬学研究科³)○加藤貴子¹, 杉浦眞喜子¹, 伊藤允好¹, 土井光暢², 浅野晶子², 高木達也³

Conformational Analysis of Cyclic Peptide – Ascidacyclamide Derivative – in Solution III.

- Conformational Equilibrium of the Derivative Substituted L-Ile by D-Ile. -

(Kobe Pharmaceutical University, ²Osaka Pharmaceutical University, ³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)Takako Kato¹, Makiko Sugiura¹, Masayoshi Ito¹, Mitsunobu doi², Akiko Asano², Tatsuya Takagi³

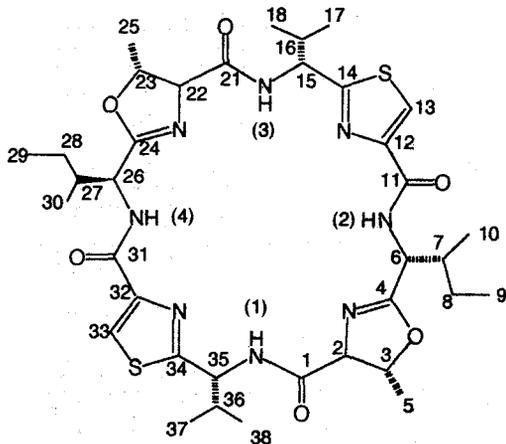
Conformational equilibrium of Ascidacyclamide derivative substituted L-Ile by D-Ile (I) has been examined. At the low temperature (-60°C), several pairs of signals are observed corresponding two conformers in ¹H NMR of I. The major component has been assigned to TypeIII conformation using by ROESY spectrum and the TypeI conformation for the minor one has been estimated from chemical shifts. The activation energy of equilibrium ($E_a=51.3$ kJ/mol) and the existence ratio of TypeI /TypeIII (-60°C: 15/85, 50°C: 63/37) are determined based on the variable temperature experiments of ¹H NMR and signal simulations. The results of MD calculations also support these observations.

【はじめに】 Ascidacyclamide 及びその類縁環状ペプチドは、強い抗腫瘍活性・殺細胞活性を有するものが多く、その立体構造と活性の相関については興味が持たれている。一方これらは、構造の C2 対称性と関連して、そのコンホメーションが TypeI あるいは TypeIII (Fig.1) をとることが知られている。

演者らは、対称性からのずれとコンホメーションの関係を調べることを目的として、Ascidacyclamide のアミノ酸を一つ置換したいくつかの誘導体についてその溶液中でのコンホメーション解析を行っているが、L-Ile の一つを D-Ile に置換した誘導体 (I) は、そ

環状ペプチド, Ascidacyclamide 誘導体, コンホメーション平衡, DNMR, 温度可変

かとうたかこ, すぎうらまきこ, いたうまさよし, どいみつのぶ, あさのあきこ, たかぎたつや



I

の NMR スペクトルより、常温で比較的遅いコンホメーション平衡にあることが示唆された。このコンホメーション平衡を検討することで、これら誘導体のコンホメーション変換の実際を知ることが出来ると考え、温度可変実験により平衡の活性化エネルギーを求めると共に平衡の詳細を検討した。

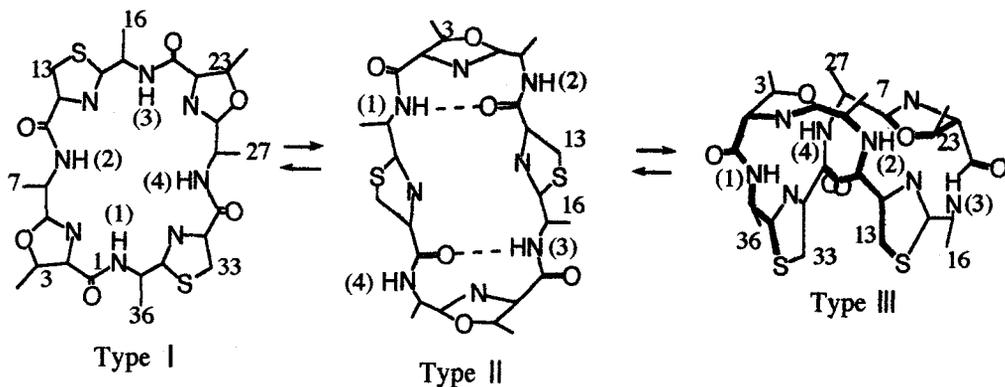


Fig. 1 Conformational Equilibria for Asidiacyclamide Derivatives

【実験】 I は CDCl_3 に溶解し ($1.7 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 測定サンプルとした。

NMR の測定は、Varian INOVA-500 (^1H :500MHz) を用いた。温度可変実験は、あらかじめ標準サンプルで温度の校正を行った後、 $-60 \sim 50^\circ\text{C}$ の間ではほぼ 10°C 刻みで測定を行った。それぞれの温度間は、十分に温度が一定になるまで待ってから測定を行った。得られたシグナルのシミュレーションには Win DNMR[®] を用いた。

MD 計算は、Insight II discover を用い、cvff 力場、溶媒の誘電率 (4.8) を加味して行った。

【結果と考察】 I の -60°C での ^1H NMR には、2 種類のコンホメーションを示唆する大小のシグナルが観測された。これら大小のシグナルは EXSY (2D exchange spectroscopy) によって遅い平衡にある 2 種類のコンホマーに相当することが確かめられた。また、 -50°C での ROESY の測定により、多量に存在するコンホマーは Type III であることが示唆

Table 1 ¹H Chemical Shifts of I at the High and Low Temperatures.

H-1	NH1	NH2	NH3	NH4	H-2	H-3	5Me	H-6	H-7	H-8L	
50°C	6.990	7.876	7.251	7.990	4.234	4.875	1.459	4.698	1.969	1.262	
-60°C	Type III	7.196	7.637	7.520	8.164	4.436	4.848	1.486	4.591	1.548	
	Type I	7.743	8.135	7.713	7.971	4.226	4.966	— ^{a)}	4.750	1.747	
H-1	H-8H	9Me	10Me	H-13	H-15	H-16	17Me	18Me	H-22	H-23	25Me
50°C	1.065	0.786	0.643	7.759	5.194	2.350	1.104	1.165	4.317	4.736	1.523
-60°C	1.298	0.806	0.983	7.365	5.229	2.322	— ^{a)}	— ^{a)}	5.040	4.906	1.443
	— ^{a)}	0.646	0.260	8.014	5.098	2.503	— ^{a)}	— ^{a)}	4.299	4.675	— ^{a)}
H-1	H-26	H-27	H-28L	H-28H	29Me	30Me	H-33	H-35	H-36	37Me	38Me
50°C	4.295	2.481	1.568	1.205	0.935	0.933	7.737	5.120	2.481	1.109	1.165
-60°C	3.456	2.982	~1.48	0.878	0.806	1.024	7.278	5.184	2.322	— ^{a)}	— ^{a)}
	4.675	2.103	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}	7.971	5.025	2.728	— ^{a)}	— ^{a)}

a) undetectable due to the signal overlappings,

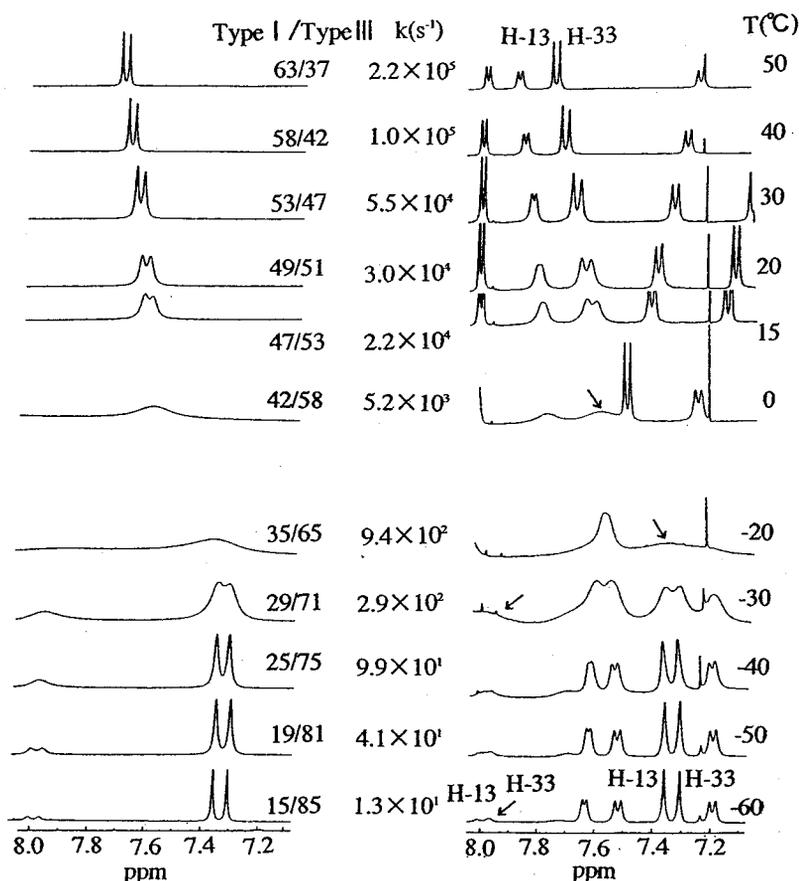


Fig.2 Experimental (right) and Calculated (left) Spectra of H-13 and H-33 of I as a Function of Temperature

され、ケミカルシフトなどから少量に存在するコンホーマーが TypeI であることが予想された。これらのシグナルは、温度上昇と共にブロードになり、さらに融合し、50°C ではほぼシャープな 1 種類ずつのシグナルとして観測された。TableI に -60°C (2 種類のコンホーマー) 及び 50°C でのケミカルシフトをまとめた。これらのケミカルシフト変化のうち、NH シグナルは全て温度上昇と共に高磁場シフトしており、後述のように水素結合の存在を示唆する。一方、他のシグナルからは温度上昇に伴って交換の速度が速くなると共に 2 つのコンホーマーの存在比が変化していくことが示唆された。

H-13 と H-33 のシグナルを用いて、シミュレーションを行い、各温度での平衡速度定数と TypeI と TypeIII に相当するコンホーマーの存在比を求めた (Fig.2)。その結果、平衡の活性化エネルギー (E_a) は 51.3kJ/mol(12.3kcal/mol)、-60°C では TypeI /TypeIII=15/85、50°C では 63/37 であった (Fig.3)。

一方、MD 計算の結果、50°C での最安定構造の配座エネルギーは、TypeI:823.8kJ/mol (196.9kcal/mol)、TypeIII:824.2kJ/mol (197.0kcal/mol) と殆ど差がなく、上記の実験結果と大

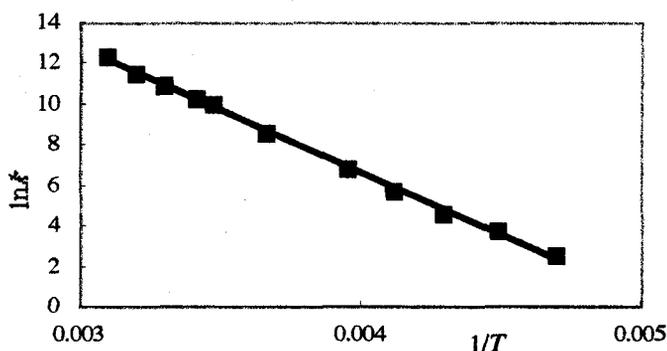


Fig.3 Arrhenius' Plot for the Equilibrium of I, Yielding $E_a = 51.3\text{kJ/mol}$.

きく矛盾しない。

低温で TypeIII が安定化されているのは、水素結合によるものと思われ、温度上昇と共に水素結合が切れ、平衡が少しずつ TypeI の方へ寄っていくと思われる。

1) H. J. Reich, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2001, **123**, 8067-8079.

低分子リガンドによる A:A ミスマッチの認識機構

(奈良先端大バイオサイエンス研究科¹、京大工学研究科²)○三島正規¹、野村誠¹、山中佐和子¹、中谷和彦²、萩原伸也²、齋藤烈²、児嶋長次郎¹**A:A mismatch recognition mechanism by a small ligand**○Masaki Mishima[†], Makoto Nomura[†], Sawako Yamanaka[†], Kazuhiko Nakatani^{||}, Shinya Hagihara^{||}, Isao Saito^{||}, and Chojiro Kojima[†] [†]Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, ^{||}Faculty of Engineering, Kyoto University^{||}

High throughput detection of SNPs is one of the most important issues in post genome era. Small ligands specifically bind to mismatched base pairs caused by SNPs will be useful for efficient SNP screening. To open an avenue to the rational and logical development of the ligands, we intend to acquire the knowledge about the mismatch recognition mechanisms. In this study, we analyzed DNA (including an A:A mismatch) complexed with the naphthyridine-naphthyridone by NMR. Resonance assignments were made by means of DQF-COSY, TOCSY, and NOESY experiments. A low resolution structure of the DNA:naphthyridine-naphthyridone complex was obtained. The refinement of the determined structure is in progress. The naphthyridone part of the ligand recognized the mismatched adenine and the naphthyridine part recognized the guanine adjacent to the mismatched adenine. We also made a ¹³C,¹⁵N labeled DNA to complete the assignments.

【序論】

遺伝情報の個人差である遺伝子一塩基多形(SNPs)は、罹病しやすさや、薬理作用の個人差の原因となる。現在、各個人に最適化された医療の実現へ向け、SNPsの研究がポストゲノムの重要な位置を占めており、効率的なSNPsの検出法の開発が期待されている。SNPsを含むDNAは、変異を含まない相補的なDNAと混合しアニールさせるとミスマッチ塩基対を形成するので、ミスマッチ塩基対に選択的に結合する低分子リガンドを開発すれば、SNPsの効率的な検出が可能になると考えられる。我々は、ミスマッチDNAに関する分子認識機構の基礎的な知見を収集することによって、低分子リガンドの合理的、論理的な開発を目指している。本研究ではA:Aミスマッチに特異的に結合する低分子リガンドであるナフチリジン-ナフチリドンとA:Aミスマッチを含むDNA複合体の構造をNMRを用いて解析し、分子認識機構を考察した。

SNPs A:Aミスマッチ 分子認識 ドラッグデザイン

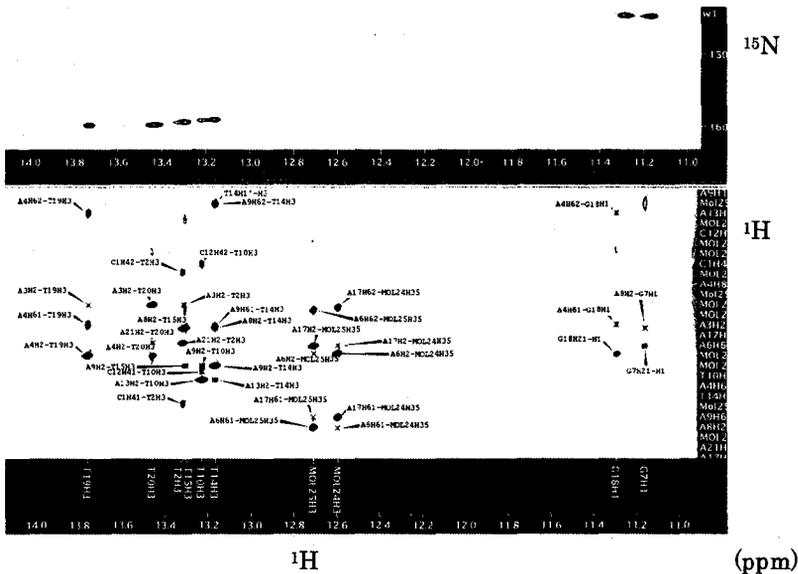
みしまさき のむらまこと やまなかさわこ なかたにかずひこ はぎはらしんや さいとういさお こじまちょうじろう

【方法】

0.8 mM DNA: naphthyridine-naphthyridone, 50 mM リン酸バッファー(pH 6.5)、100 mM NaCl、0.1 mM EDTA を調製し、800 MHz NMR を用いて 4~20℃ で各種 NMR 測定を行った。DNA は A:A ミスマッチを含む 11 mer の CTAACAGAATG である。DQF-COSY, 2D NOESY(mixing time: 150, 200 msec), 2D TOCSY(mixing time: 20, 70 msec) 実験を行い、Sparky ver. 3.106 を用いて信号の帰属と NOE の収集を行った。構造計算には CNS ver. 1.1 を使用した。 ^{13}C , ^{15}N ラベル DNA は、クレノーフラグメントを用いたプライマー伸長法によって合成し、0.2 mM DNA: naphthyridine-naphthyridone のサンプルを調製し、NMR 測定を行った。

【結果】

イミノ領域を指標にしたタイトレーション実験を行ったところ、A:A ミスマッチを含む DNA とナフチリジン-ナフチリドンは slow-exchange 条件での結合を示し、結合比はおおよそ 1:2 であった。現在までに、394 個の NOE を収集し、おおまかな全体構造を決定した。ナフチリジン-ナフチリドン分子の、ナフチリドン部分がミスマッチ塩基対のアデニンと、ナフチリジン部分がミスマッチ塩基対のアデニンと隣接するグアニンと水素結合を形成し、対称に 2 分子が DNA に挿入しており、DNA の塩基対とスタッキングすることによって安定化した構造を形成していた。さらに、曖昧な帰属を確定し構造を精密化するため、DNA の ^{13}C , ^{15}N ラベル体を作成し、解析を行っている(図)。



Upper: Imino-region of ^1H - ^{15}N HSQC spectrum. All imino signals were observed for ^{13}C , ^{15}N DNA and no signals for naphthyridine-naphthyridone (depicted as MOL24,25).

Lower: Selected part of 2D NOESY spectrum (F2: 11-14 ppm, F1: 5.5-8.2ppm).

P 27 抗菌タンパク質タキサイチンの分子運動性と機能に関する研究

(北大・院理¹、九大・理²、富山医薬大・薬³、産総研・生物遺伝子資源⁴)

末武徹也¹、○相沢智康¹、小金沢望¹、尾崎司²、小橋川敬博¹、出村誠¹、川畑俊一郎²、河野敬一³、津田栄⁴、新田勝利¹

Study on Backbone Dynamics and Antimicrobial Function of Tachycitin

Tetsuya Suetake¹, Tomoyasu Aizawa¹, Nozomi Koganesawa¹, Tsukasa Osaki², Yoshihiro Kobashigawa¹, Makoto Demura¹, Shun-ichiro Kawabata², Keiichi Kawano³, Sakae Tsuda⁴ and Katsutoshi Nitta¹

(¹Grad. Sch. of Sci., Hokkaido Univ., ²Dept. Biol., Kyushu Univ., ³Fac. Pharm. Sci., Toyama Med. Pharm. Univ., and ⁴National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Abstract: Tachycitin is an invertebrate chitin-binding protein with amidated C-terminus, and possesses antimicrobial activity against both fungi and bacteria. The ¹H-NMR-based tertiary structure of tachycitin was recently determined [1]. In order to examine the structural and functional features of tachycitin more closely, we performed for the first time, gene expression, refolding, ¹⁵N-NMR-based characterizations, and antimicrobial activity measurements of a recombinant tachycitin (denoted as rTcn) that does not have the amide group at the C-terminus. The NMR analysis indicated that rTcn possesses the same structural construction as the native tachycitin. The backbone ¹⁵N relaxation measurements showed that molecular motional correlation time of rTcn increases as its concentration increases, indicating that tachycitin has a tendency to aggregate with each other. rTcn exhibits antimicrobial activity against only fungi but does not against bacteria. The cell surface of fungi contains chitin as an essential constituent, but that of bacteria does not. These results suggest that not only the chitin-binding region but also the C-terminal amide group of tachycitin plays a significant role for its antimicrobial properties.

【緒言】タキサイチンは、カプトガニ体液に存在するシステインに富む抗菌タンパク質（73 残基）で、C 末端のスレオニン残基は翻訳後修飾によってアミド化されていることが知られている。タキサイチンは、①グラム陽性菌、陰性菌および真菌の成長を阻害する機能（抗菌活性）、②グラム陰性菌を凝集する機能（細菌凝集活性）、③キチンに特異的に結合する機能を有することが知られている。我々は近年、¹H-NMR 法を用いてタキサイチンの立体構造を決定し、タキサイチンの Cys40-Gly60 までの領域がキチン結合モチーフを形成していることを報告した[1]。本研究ではタキサイチンの構造と機能に関してさらに研究を進めるため、大腸菌を宿主とした組換え型タキサイチンの大量発現系を構築し、同タンパク質の ¹⁵N 磁気緩和時間測定および抗菌活性測定を行った。組換え型タキサイチンがカプトガニ体液から精製された天然型タキサイチンと異なる点は、C 末端のスレオニン残基がアミド化されていない点である。

【実験】タキサイチンは大腸菌内で発現させると不溶性顆粒に蓄積された。タキサイチンを不溶性顆粒から活性再生させるため、尿素による可溶性化、rapid dilution 法による巻き戻しを行った。活性再生後のタキサイチンの精製にはキチンアフィニティーカラムを用いた。NMR 装置は Varian UNITY Inova 500 分光計を用いた。¹⁵N NMR シグナルを帰属するため、多次元 NMR 測定（HSQC、¹⁵N-edited TOCSY、¹⁵N-edited NOESY）を行った。タキサイチンの ¹⁵N 磁気緩和時間測定は、タンパク質濃度 0.26、0.34、0.52、1.00mM において行った。アグリゲーションの影響を避けるため、model-free 解析はタンパク質

キーワード：ジスルフィド結合、抗菌活性、キチン結合、緩和時間、アグリゲーション

すえたけてつや、あいざわともやす、こがねさわのぞみ、おさきつかさ、こばしがわよしひろ、でむらまこと、かわばたしゅんいちろう、かわのけいいち、つださかえ、にったかつとし

濃度 0.26mM のサンプルで行った。

【結果および考察】組換え型タキサイチンの ^1H -NMR スペクトルは天然型タキサイチンのものとほぼ同一の化学シフト値を示した。疎水性コアの形成に特徴的な 0~0.5ppm 付近に高磁場シフトした NMR シグナル (Leu37、Leu44、Val44 のメチルプロトン) も両者で観測された。ジスルフィド結合周辺の NOE のパターンも両者で一致していた。これらは組換え型タキサイチンが正しいフォールドとジスルフィド結合を有する立体構造に巻き戻されたことを支持している。既に帰属が終了している天然型タキサイチンの ^1H の化学シフト[1]を参照しながら、

組換え型タキサイチンの主鎖アミドの ^{15}N -NMR シグナルを全て帰属することができた。

タキサイチンの分子運動性を解析するために ^{15}N 核の磁気緩和測定を行い、68 個の主鎖アミドシグナルのうち 66 個についての緩和時間パラメーター (T_1 、 T_2 、NOE) を得た (図 1)。Lys32 と Cys33 についてはシグナルのプロード化の影響のため緩和時間を見積もることができなかった。タンパク質濃度の増加に伴って各残基の T_1 の値は減少し一方、 T_2 値は増加した。タキサイチンの分子全体の相関時間はタンパク質濃度の増加に伴って著しく増加することが示された。これらの結果はタキサイチンが 0.2mM 以上の濃度になると、非特異的なアグリゲーションを起こす傾向があることを示している。

組換え型タキサイチンと天然型タキサイチンの抗菌活性を測定した結果、組換え型タキサイチンは、真菌 (*Pichia pastoris* GS115) に対する抗菌活性は保持しているが、グラム陽性菌 (*Staphylococcus aureus* 209P) とグラム陰性菌 (*Escherichia coli* B) に対しては抗菌活性を失った。組換え型および天然型タキサイチンの NMR 測定結果で両者はほぼ同一の立体構造を形成していることが示されたことから、この抗菌活性の違いは組換え型タキサイチンの C 末端にアミド基がないことに起因して生じたものと考えられた。model-free 解析の結果では C 末端側 5 残基はフレキシブルな領域であることを示している。以上の結果から、細菌に対する抗菌活性にはフレキシブルな領域に位置する C 末端のアミド基が不可欠であり、細胞壁にキチンを含む真菌に対する抗菌活性にはキチン結合部位が重要な役割を果たしていることが示唆された。

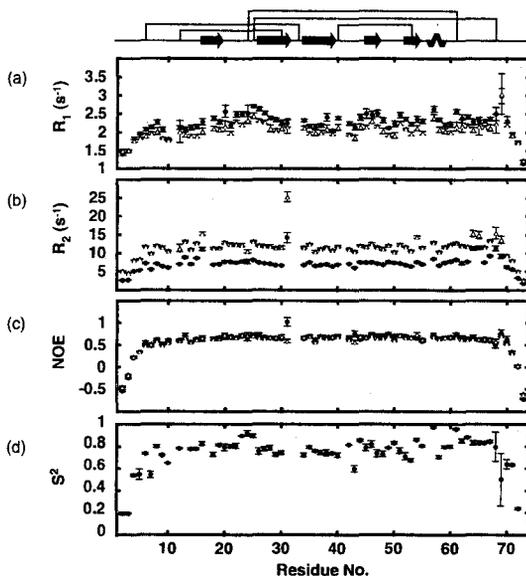


Figure 1. The backbone amide ^{15}N NMR relaxation data of recombinant tachycitin. The ^{15}N -NMR relaxation parameters, (a) R_1 ($= 1/T_1$), (b) R_2 ($= 1/T_2$), and (c) the steady-state $\{^{15}\text{N}\text{-}^1\text{H}\}$ NOE were measured at the ^1H Lamour frequency of 500 MHz and were shown with error bars. The data (a) - (c) were measured for two different concentrations of ^{15}N -labeled rTcn; 0.26 mM (filled circles) and 1.00 mM (open triangles). The apparent order parameter (S^2) in 0.26 mM sample was calculated for each residue as shown in (d). The locations of the secondary structure and disulfide bonds are also indicated at the top.

NMR による CPD photolyase と損傷 DNA の結合様式の解明

○上田卓見¹、加藤暁¹、鳥澤拓也¹、倉光成紀²、岩井成憲³、寺沢宏明¹、嶋田一夫¹ (東京大学大学院薬学系研究科¹、大阪大学大学院理学研究科²、生物分子工学研究所³)

NMR analyses of the enzyme-substrate complex of CPD photolyase and photodamaged DNA

Takumi Ueda¹, Akira Kato¹, Takuya Torizawa¹, Seiki Kuramitsu², Shigenori Iwai³, Hiroaki Terasawa¹, Ichio Shimada¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

²Graduate School of Science, Osaka University, Osaka, Japan

³Biomolecular Engineering Research Institute, Osaka, Japan

Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) is the major DNA lesion induced by UV light. CPD photolyase, which contains FAD as a cofactor, repairs CPD using visible or near-UV light. We aimed to clarify the relative orientation of FAD and CPD in DNA/photolyase complex by using the distance-dependent line broadening of NMR resonances induced by FAD radical. We measured HSQC spectra of DNA/photolyase complex for both reduced and radical forms and found that the resonances of W246, W350 and W352 were absent and that the resonances of the bases and 1' position in CPD decreased in the spectra of radical form. These results indicate that in the CPD photolyase-DNA complex, CPD is 10-15Å away from FAD. This conclusion supports the hypothesis that electron transfer from CPD to FAD occurs not directly but via W246 or W382.

【序】遺伝情報の担い手である DNA に生じた損傷は、細胞死や突然変異の原因となる。紫外線照射によって生じる主な損傷 DNA として、cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) が挙げられる (Fig.1)。生物にはこのような損傷 DNA を修復する酵素群が備わっている。CPD photolyase は、光を利用して CPD を修復する酵素であり、補酵素として FAD を持っている。photolyase は修復反応における量子収率が 0.5~1.0 と非常に高く、非常に効率良く光エネルギーを利用することが知られている。この高いエネルギー効率を達成するメカニズムを解明するためには、photolyase-DNA 複合体における反応部位の構造を詳細に知る必要がある。現在、*E.coli*, *A.nidulans*, さらに *T.thermophilus* HB8 由来の CPD photolyase について基質非存在下の結晶構造が決定されている。しかし、photolyase-DNA 複合体の構造は明らかにされておらず、FAD

Photolyase, DNA repair, Protein-DNA interaction, Flavoproteins, Paramagnetic Proteins

うえだたくみ、かとうあきら、とりざわたくや、くらみつせいき、いわいしげのり、てらさわひろあき、しまだいちお

と CPD の相対配置に関する知見は少ない。そこで本研究では、photolyase-DNA 複合体における FAD と CPD の相対配置を明らかにし、基質認識および修復のメカニズムをより詳細に解明することを目的とした。

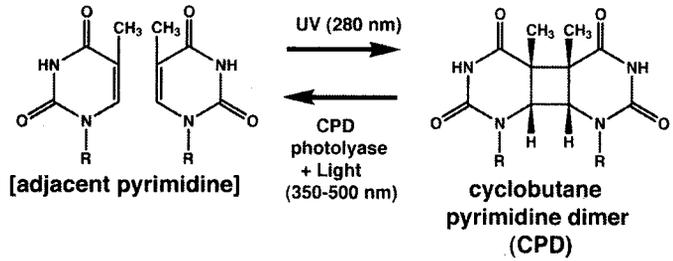


Fig.1 CPD and CPD photolyase

CPD photolyase の補酵素 FAD は、還元型、ラジカル型、酸化型の 3 状態をとりうることが知られている (Fig.2)。また、空間的にラジカル分子の近傍に位置する原子の NMR シグナルは、ラジカル分子との相互作用によって広幅化し、それに伴い強度が減少することが知られている。そこで、photolyase の補酵素 FAD がラジカル型になることにより基質である DNA のシグナルが広幅化することを指標として photolyase-DNA 複合体における反応部位の構造を解析することとした。

【方法】 *T. Thermophilus* HB27 由来 CPD photolyase を大腸菌により大量発現させた。Polyethyleneimine, P11 column, DNA-cellulose column, DEAE Sephadex A-25 column によって SDS-PAGE で単一のバンドとして観測されるまで精製した。得られた photolyase と CPD を含む一本鎖 DNA ヘプタマー (ss7mer CPD) を混合し、370 nm の光を照射することにより、CPD が修復されることを確認した。バッファー中の還元剤 (sodium dithionite, Na₂S₂O₄) の量を調節することにより、photolyase の酸化還元状態を還元型およびラジカル型に均一化した。基質 DNA としては、紫外線照射により CPD を生じた DNA オリゴマーを、逆相 HPLC で精製して用いた。以上の photolyase と損傷 DNA を NMR 解析に供した。

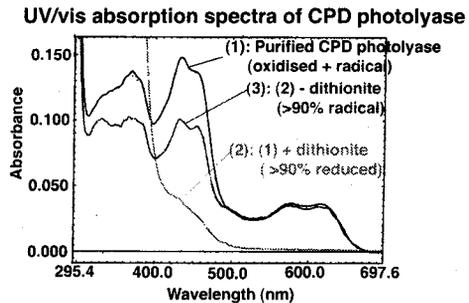
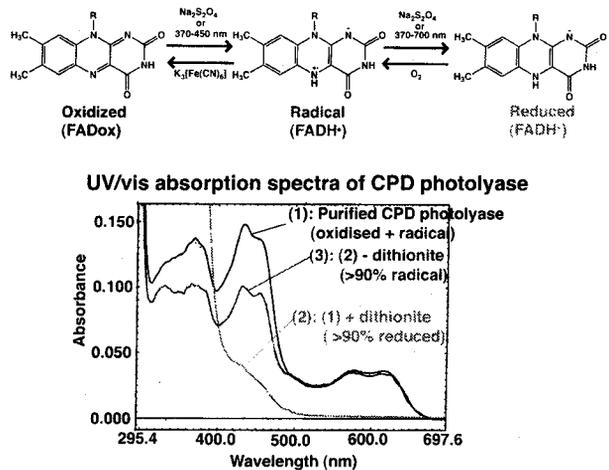


Fig.2 Oxidation state of the cofactor FAD

【結果】まず、photolyase の補酵素 FAD の酸化還元状態の変化に伴う、photolyase に由来するシグナルの強度変化を調べた。トリプトファン残基の主鎖を選択的に ^{15}N 標識した還元型 photolyase の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。その結果、全 15 残基中 14 残基に由来するシグナルが観測された

(Fig.3)。さらに、変異体を用いて FAD のイソアロキサジン環近傍 (10Å 以内) に存在する Trp246, Trp350, Trp352 に由来するシグナルを帰属した。そして、FAD をラジカル型に変えて測定したところ、ラジカル型では Trp246, Trp350, Trp352 に由来するシグナルが消失した。

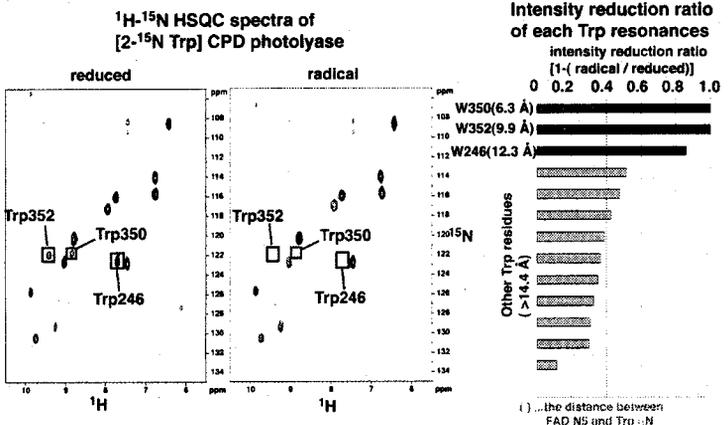
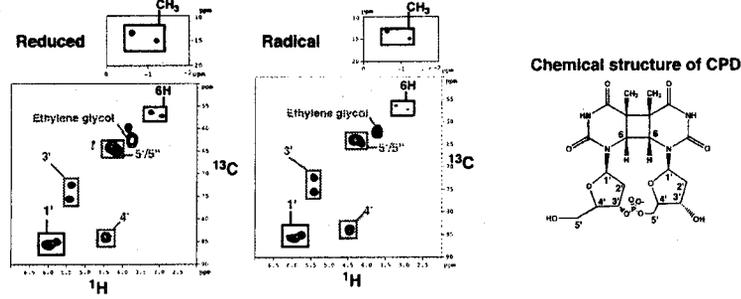


Fig.3 Line-broadening of NMR resonances of CPD photolyase induced by FAD radical

この結果から、FAD から 10Å 以内に存在する水素原子に由来するシグナルは FAD ラジカルとの相互作用により消失することが示された。

次に、FAD ラジカルによるシグナルの変化を利用して、photolyase-DNA 複合体における CPD と FAD の相対配置を調べた。CPD を ^{13}C で標識した ss5mer CPD と photolyase の複合体の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定した (Fig.4)。その結果、還元型 photolyase 複合体に比べてラジカル型複合体では、CPD の塩基およびデオキシリボースの 1' に由来するシグナルの強度が他のデオキシリボースのシグナルと比較して 20~30 %程度減少した。

^1H - ^{13}C HSQC spectra of d(AT[CPD]TAC), in which CPD was labelled with ^{13}C and complexed with CPD photolyase



Signal reduction ratio of each DNA resonances

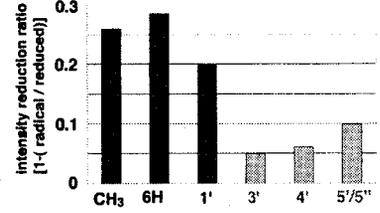


Fig.4 Line-broadening of NMR resonances of DNA induced by FAD radical

【考察】上記の結果から、photolyase-DNA 複合体における FAD と CPD の相対配置を見積もった。まず、損傷塩基のシグナルがデオキシリボースのシグナルより大きく強度減少した結果は (Fig.4)、photolyase-DNA 複合体において、損傷塩基がデオキシリボースよりも FAD に近接していることを示している。次に、損傷塩基および 1' のシグナルが、FAD から 10Å 以内に位置する残基のシグナルよりも強度減少しなかった結果は (Fig.3, 4)、photolyase-DNA 複合体において、損傷塩基, 1' のプロトンが FAD から 10~20Å 離れていることを示している。これらの条件を満たすように、photolyase の結晶構造と CPD を Fig.5 のように重ね合わせた。このモデルは、photolyase-DNA 複合体において、FAD と CPD は 10~15Å 程度離れていることを示している。

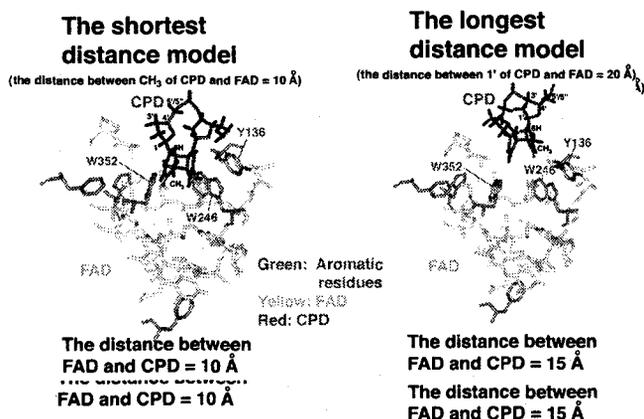
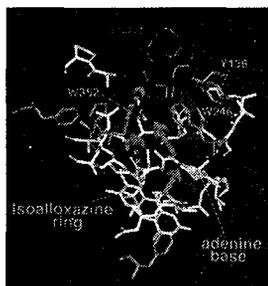


Fig.5 Models of CPD photolyase-DNA complex based on the results of NMR analyses

このモデルを用いて、修復反応における FAD から CPD への電子移動について考察した (Fig.7)。これまでに行われたシミュレーションの結果、FAD と CPD が 7 Å 程度まで近接していれば FAD から CPD への電子移動はアミノ酸残基を介さず直接起こるが、10Å 程度まで離れていると、FAD から CPD への電子移動は Trp246 もしくは Trp352 を介して起こると考えられている。FAD と CPD が 10~15Å 程度離れているという本研究の結果は、Trp246 もしくは Trp352 を介した電子移動を支持している。

Fig.6 Putative electron transfer pathway from FAD to CPD



- ⇒ Pathway (1)
Electrons directly transfer from FAD to CPD, no amino acid mediates the electron transfer.
- ⇨ Pathway (2)
Electrons transfer from FAD to CPD via W246
- **⇨ Pathway (3)
Electrons transfer from FAD to CPD via W352

エリシターにより誘導される EL5 蛋白質の RING-H2 finger domain の機能構造解析

加藤静恵、角田由紀、崔紅、高井亮太、南栄一、山崎俊正、○加藤悦子
(生物研)

High precision NMR structure and function of the RING-H2 finger domain of EL5, a rice protein responsive to N-acetylchitooligosaccharide elicitor

Shizue Katoh, Yuki Tsunoda, Cui Hon, Ryota Takai, Eiichi Minami, Toshimasa Yamazaki
and Etsuko Katoh

National Institute of Agrobiological Sciences

EL5, a RING-H2 finger protein, is rapidly induced by *N*-acetylchitooligosaccharides in rice cell. We expressed the RING-H2 finger domain in *E. coli*, and determined its structure in solution by NMR spectroscopy. The EL5 RING-H2 finger domain consists of two stranded β -sheets (β_1 , Ala147-Phe149; β_2 , Gly156-His158), one α -helix (Cys161-Leu166), and two large N- and C-terminal loops; it is stabilized by two tetrahedrally coordinated zinc ions. This structure is similar to that of other RING finger domains of function known proteins. From structural analogies we inferred that the EL5 RING finger acts as a binding domain for ubiquitin-conjugating enzymes (E2). The binding site is probably formed by solvent exposed hydrophobic residues of the N-, and C-terminal loops and the α -helix. We then demonstrated that the fusion protein of EL5 (96-181) and maltose binding protein (MBP) was polyubiquitinated by incubation with ubiquitin, ubiquitin-activating enzyme (E1), and *Os*UBC5b as E2. Thus, the EL5 RING finger domain catalyzed the transfer of ubiquitin to MBP. By NMR titration experiments, we identified residues that are critical for the interaction between the RING-H2 finger and the E2 protein, *Os*UBC5b. We conclude that the RING-H2 finger domain of EL5 is the E2 binding site of EL5, and that EL5 represents a ubiquitin ligase (E3).

[緒言]

植物には細菌感染に対する防御反応が存在する。このような防御反応は培養液中にエリシターを加えることで再現することができる。EL5 はエリシターとして *N*-acetylchitooligosaccharide を添加することにより誘導されるイネタンパク質の一つである。塩基配列解析の結果、EL5 には RING-H2 finger Domain と予想される domain が存在する。RING finger domain は酵母や動物細胞において存在が明らかとなっているモチーフであり、転写調節、DNA 修復や再構築、情報伝達等のさまざまな機能に関与していることが明らかになりつつある。EL5 中の RING-H2 finger domain (EL5RFD) の分子機能を解明することはエリシターシグナル伝達機構を解明する有力な情報となり得る。本研究では、EL5RFD の立体構造と分子機能との相関を解明するために、EL5RFD の大量発現系を構築し、その溶液構造を NMR により解明した。得られた立体構造からその機能を予測し、*in vitro* assay や NMR 滴定実験により確認を行った。

[実験]

NMR解析に用いた¹⁵N及び¹³C/¹⁵N標識EL5RFDおよび滴定実験に用いたE2は大腸菌を用いた系により大量合成した。NMR測定は約1.0mMのEL5RFD、20 μ M ZnSO₄、1mM DTTを溶解した

キーワード：RING-H2 finger protein、エリシター、ユビキチン結合酵素、ユビキチン転位酵素

かとう しずえ、つのだ ゆき、つい ほん、たかい りょうた、みなみ えいいち、やまざき としまさ、かとうえつこ

20mM トリス緩衝液(pH 7.0)について、Bruker DMX750を用いて35°Cで行った。NMRシグナルの帰属は多核種多次元NMR法を用いて定法により行った。ディスタンスジオメトリー(DG)法と分子シミュレーション(SA)法を併用した立体構造計算はX-PLOR3.1プログラムを用いて行った。

[結果と考察]

NMR解析から得られた913個のNMR構造情報(NOE距離情報755個、水素結合情報18個、内部回転角度情報140個)に基づきRING finger domain蛋白質の立体構造を決定した。その結果、Fig.1に示すように、EL5RFDは $\beta\beta\alpha$ fold (β 1:Ala21-Phe23, β 2:Gly30-His32, α 1:Cys35-Leu40) からのRING finger motifであることが確認できた。RING fingerの立体構造は、蛋白質の2量体に関与するものや、RING finger型ユビキチンリガーゼ(E3)中のRING finger domainなどが報告されている。これら機能および構造が報告されているRING finger domainと本研究により明らかとなったEL5RFDの立体構造を比較した。X線結晶構造解析から解明されたcCbl-UbcH7複合体野結果から、複合体形成には、cCblのRING finger domainが重要な役割を果たしており、RING finger N末部分のループ1 (Loop1)とC末のループ(Loop2)により構成される溝(shallow groove)がE2の認識ドメインであることが報告されている。cCblにおいてE2の認識に重要なアミノ酸残基が、EL5RFDにおいて良く保存されていること。さらに、shallow grooveに対応する溝が存在することから、EL5RFDはE3に存在するRING finger domainと同様な機能を有することが推定された。これらの結果を実験的に検証するため、in vitroのユビキチンアッセイを行った。その結果、EL5RFDは明らかにE3活性を有することが証明された。次に認識残基の特定を行うためNMR滴定実験を行った。その結果、我々が立体構造から予想していた結合サイトが、大きな化学シフトの変化を示しており、立体構造から予測した機能が正しいことが証明された (Fig.2)。

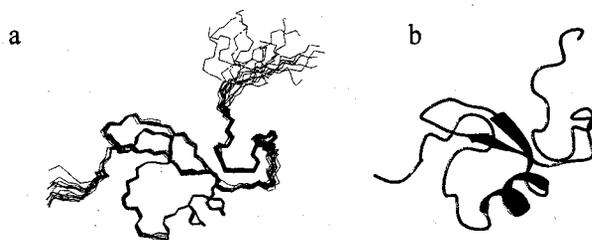


Fig.1 a, The best-fit superposition of the backbone (N, C α and C') atoms of the final 15 structures of the RING-H2 finger domain of EL5. b, Ribbon diagram of the energy-minimized average structure of the RING-H2 finger domain of EL5.

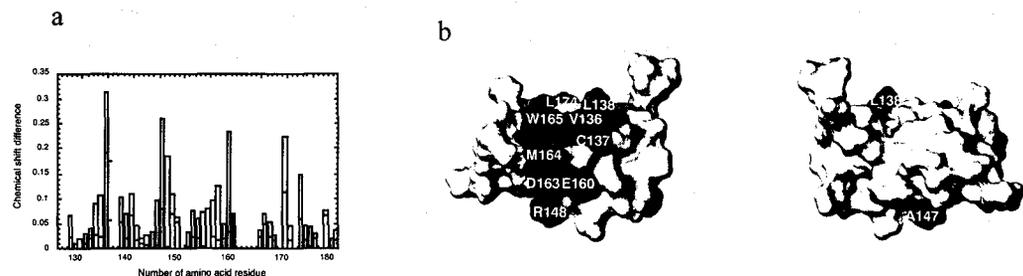


Fig. 2, NMR chemical shift perturbation of the EL5 RING-H2 finger domain upon binding to *Os*UBC5b a, Changes in the NMR chemical shifts of RING-H2 finger domain ($\Delta\delta$), induced by complex formation with *Os*UBC5b, were calculated by the function $\Delta\delta = \Delta\delta_{\text{HN}}$ (light gray) + 0.10 $\Delta\delta_{15\text{N}}$ (gray). b, Two views of the surface of the EL5 RING-H2 finger domain, grey to indicate residues with highly sensitive backbone amide chemical shift ($\Delta\delta > 0.15$ ppm) and disappeared after binding with *Os*UBC5b, respectively.

Molecular Dynamics of Polypeptides in Aqueous Solution by ¹³C NMR Relaxation Technique

S. Uchino and A. Tsutsumi

*Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Hokkaido University,
Sapporo 060-8628*

In order to clarify the relation of structure and function for biopolymers, we investigated molecular motion of aqueous polypeptide by ¹³C NMR relaxation technique. To estimate for molecular motion, we adopted three models, i.e. Dejean-Laupretre-Monnerie (DLM) model, multiple internal rotation model and model free approach. Since these models have well consistent with experimental data, we have discussed among these approaches.

α -ヘリックス構造をとるポリペプチドは、側鎖同士の相互作用が物性に大きな影響を与えると考えられるため、分子運動に関する研究は側鎖運動に焦点を当てた研究が数多くなされている。以前我々は、poly(Nε-hydroxyethyl L-glutamine)(PHEG)、Poly(Nε-hydroxypropyl L-glutamine)(PHPG)、poly(L-histidine)(PLH)を用い、ポリペプチド側鎖の化学構造の違いによるポリペプチド主鎖の分子運動に与える影響を、¹³C-NMR 緩和測定の技法を用いて調べた。その結果、側鎖の分子運動に関しては、多重内部回転モデルを仮定することで、実験値を良く再現できることがわかった。一方、主鎖の分子運動に関しては、周波数-温度換算則が良く成り立ち、DLM (Dejean-Lauprêtre-Monnerie) モデルを仮定すると、実験結果を非常に良く再現できることがわかった。

そこで本研究においては、主鎖の分子運動に関して、実験から求められたスピン-格子緩和時間 (T_1) から、Jスペクトルおよび相関スペクトルの計算を行い、分子運動モードを分布関数との関係を用いて再整理した。その結果、主鎖の分子運動の相関スペクトルは、Cole-Cole型よりも、むしろ Davidson-Cole型に近いことがわかった。これらの結果を踏まえ、ポリペプチドの特殊性・一般性を他の炭化水素系ポリマーとの比較を行ったので報告する。

キーワード：高分子、ポリペプチド、NMR 緩和、DLM モデル、相関スペクトル

うちのしんいち、つつみあきひろ

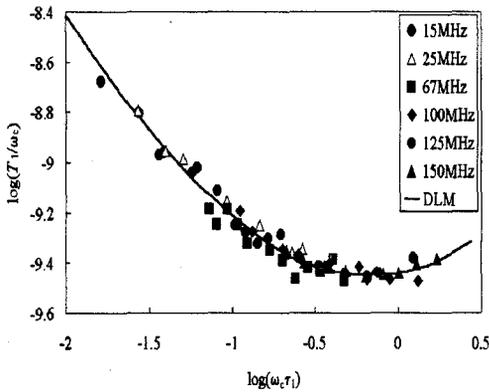


Fig.1 Normalized spin-lattice relaxation time of ^{13}C NMR for PHEG. Observed frequencies are 15MHz(\circ), 25 MHz(\triangle), 67 MHz(\square), 100 MHz(\diamond), 125 MHz(\bullet) and 150MHz(\blacktriangle). The continuous curve represents the simulation data making use of DLM model. T_1 , ω_c , τ_1 represents spin-lattice relaxation time, Larmor frequency of ^{13}C , correlation time for correlated pair transitions, respectively.

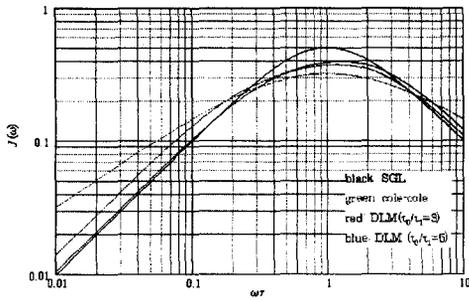


Fig.2 J spectra for single correlate, Cole-Cole and Hall-Helfand ($\tau_0/\tau_1 = 3$ and $\tau_0/\tau_1 = 5$).

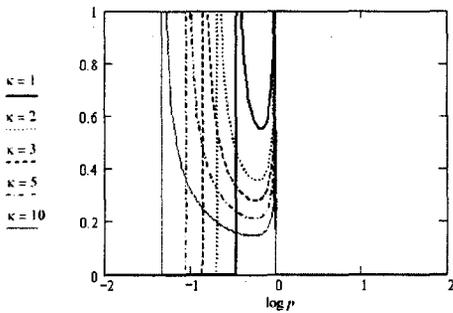


Fig.3 Spectrums of correlation time for Hall-Helfand. κ represents τ_0/τ_1 and p represents τ/τ_0 .

(東薬大・生命¹、薬²、明星大・理工³、農水省資源研⁴)○小野 克輝¹、草野 修²、田代 桜子²、清水 光弘³、山崎 俊正⁴、神藤 平三郎^{1,2}**Solution Structure of the Linker Histone Homolog Hho1p
in *Saccharomyces cerevisiae***(School of ¹Life Science and ²Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,
³Meisei University, and ⁴National Institute of Agrobiological Resources)○Katsuki Ono¹, Osamu Kusano², Sakurako Tashiro², Mitsuhiro Shimizu³,
Toshimasa Yamazaki⁴, Heisaburo Shindo^{1,2}

Almost of all eukaryotic organisms possess a small, ubiquitous protein, so-called linker histone which binds to the linker region between nucleosome cores. In *Saccharomyces cerevisiae*, a gene *HHO1* encodes a putative linker histone Hho1p which is highly homologous to histone H1. The protein is localized in the nucleus, but it is known that its deletion mutant strain reveals no detectable phenotype. *In vitro* chromatin assembly experiments with recombinant Hho1p have demonstrated that it is capable of forming a complex with dinucleosomes in a similar manner to that of histone H1. Hho1p is composed of a lysine-rich segment of 40 residues in the N-terminus followed by a well-conserved globular domain (HHO1d1), and another globular domain (HHO1d2) in the C-terminus. In this study, we have determined the solution structure of HHO1d1 by NMR spectroscopy. The structure of the globular domain was found to be strikingly similar to that of histone H5, belonging to the winged helix-turn-helix family of eukaryotic transcription factors.

近年まで酵母にはリンカーヒストン H1 が存在しないと考えられていた。しかし、出芽酵母ゲノムデータベースの解析から 258 残基からなるリンカーヒストンホモログ *HHO1* (Histone H One 1) の存在が明らかとなった。Hho1p は、N末端に 40 残基以上のリシンリッチの領域があり、中央に約 90 残基からなるヒト H1 の globular domain と 36% の相同性をもつドメイン (HHO1d1) と、C 末端にこのドメインと 43% の相同性をもつもう 1 つのドメイン (HHO1d2) がある。このように、リンカーヒストンタンパク質で 2 つの globular domain を持つことは非常にまれである。近年の研究によれば、出芽酵母において Hho1p の存在比は 40 ヌクレオソームに対して約 1 と低く、また Hho1p はテロメアのサイレンシングや接合、転写の抑制などに影響を与えていないことが示された。しかし、*in vitro* での実験では、Hho1p はヌクレオソームと安定な三成分複合体を形成し、リンカーヒストンとして機能していることが示された。このように、Hho1p は通常のリンカーヒストンとは一次構造ならびにその存在様式において異なっており、その詳細な機能を明らかにするために構造からのアプローチが期待されてきた。そこで我々は、Hho1p の構造を NMR を用いて解析することを試みた。

Keywords : 酵母ヒストン HHO1、NMR による構造解析、ヒストン H5、DNA 結合ドメイン

ふりがな：おのかつき、くさのおさむ、たしろさくらこ、しみずみつひろ、やまざきとしまさ、
しんどうへいさぶろう

^{15}N 標識および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した任意の欠失変異体 (HHO1d1:41-119aa; HHO1d2:166-252aa) は、大腸菌を用いた大量発現系によって調製し、それぞれを NMR 測定に供した (HHO1d1 : 10 mM NaPi, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH6.2; HHO1d2 : 10 mM NaPi, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH6.2). 構造計算のための NMR 測定は、Bruker 製 DMX750 を用いて 25°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。構造計算は、XPLORv3.1 にてディスタンスジオメトリー法とシミュレイテッドアニーリング法を併用した。

NMR スペクトルからの解析から得られた 1,328 の拘束条件を用いて HHO1d1 の高次構造を決定した。Figure 1a に示した 20 個の構造の主鎖の RMSD は 0.59 Å であった。そして、その平均構造 (Figure 1b) は、4 つの α -helix (Tyr8-Leu19; Arg27-Lys35; Ile41-Ser43; Asn46-Glu60) と 3 つの β -strand (β 1:Ser25-Ser26; β 2:Phe64-Glu65; β 3:Ala73-Leu76) を有していた。この構造は winged helix-turn-helix モチーフであり、H5 などのリンカーヒストンの globular domain に特徴的な構造であるが、真核生物における転写因子 HNF-3/fork head や Rap30 などの DNA 結合ドメインにもみられる。しかし、この globular domain だけでは DNA に対する結合能は低かった。また、HHO1 に特徴的なもう 1 つのドメインである HHO1d2 は現在の測定条件下では特定の構造をもたないことが判明した。

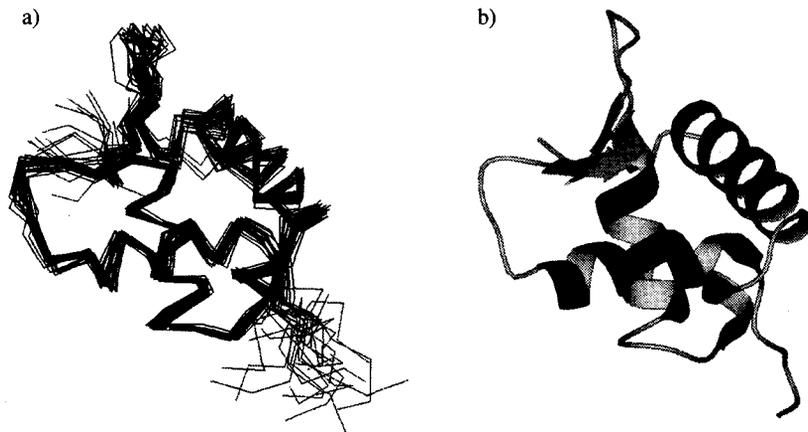


Figure 1 Three-dimensional structure of HHO1d1

- a) Superposition of the backbone atoms (N, Ca, C') of 20 NMR structures.
- b) A ribbon diagram of the energy-minimized average structure.

DinI 蛋白質による RecA 蛋白質活性の制御機構に関する研究

(¹理研・遺伝生化学, ²埼玉大学大学院理工学研究科, ³横浜市大・院総合理、
⁴CREST/JST)

○吉益雅俊^{1,2,3,4}, 伊藤隆^{1,3,4}, 本多賢吉^{1,3,4}, 石部聡子^{1,3,4}, 美川務^{1,3,4}
 柴田武彦^{1,3,4}

NMR analysis of the regulation of RecA activity by DinI protein.

○Masatoshi Yoshimasu^{1,2,3,4}, Yutaka Ito^{1,3,4}, Masayoshi Honda^{1,3,4}, Satoko Ishibe^{1,3,4}
 Tsutomu Mikawa^{1,3,4} and Takehiko Shibata^{1,3,4}.

¹Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN; ²Grad. Schl. Sci. Eng., Saitama Univ.;

³Graduate School of Integrated Science, Yokohama City Univ.;

⁴CREST, JST (Japan Science and Technology)

DinI protein negatively regulates the SOS response in *Escherichia coli* by inhibiting activities of RecA. NMR experiments suggested that DinI tightly binds to intact RecA. We performed NMR titration experiments on ¹⁵N-DinI in the presence of either N-terminal, N terminal truncated ($\Delta 33$), or C-terminal domains of RecA. The titration results suggested that DinI binds tightly to the central domain of RecA or intermolecular clefts in RecA filaments. Further, TRNOE experiments showed that DinI partially inhibited the interaction between RecA and longer DNA (>8base), in which case, cooperative effect of RecA molecules assembled on the DNA plays an important role. On the contrary, DinI failed to inhibit RecA binding to 4mer DNA. On the basis of these results, we hypothesize that DinI binds to the intermolecular clefts of ssDNA-RecA nucleofilaments and inhibits the coprotease activity of RecA.

<序>

バクテリアで見られる SOS 応答は環境ストレスによる DNA 損傷からバクテリアを守り、ときには変異を導入することで環境への適応にも働く。応答反応は、外的要因による DNA 損傷により露出した単鎖 DNA 部位と RecA が結合し、その coprotease 活性により LexA リプレッサーの自己消化反応が促進され誘導されることが既に知られている。DinI は LexA の自己消化反応を抑えることにより SOS 応答を抑制的に制御する働きを持つと考えられている。

本研究では DinI による活性抑制の詳細を明らかにするため、DinI-RecA 間の相互作用および ssDNA-RecA 複合体に対する DinI の影響について NMR を用いて解析を試みた。

Key Words :

Protein-Protein Interaction, Protein-DNA Interaction, Titration, TRNOE

よします まさとし, いたう ゆたか, ほんだ まさよし, いしべ さとこ,
 みかわ つとむ, しばた たけひこ

<材料と手法>

RecA と DinI との相互作用部位を同定するため、RecA の既知のドメイン (N 端、C 端、N 端欠失) をそれぞれ調製し、 ^{15}N で標識された DinI と未標識の RecA 各ドメインをそれぞれ数段階の濃度比で混合して ^1H - ^{15}N HSQC を測定した。

短い ssDNA は RecA 存在下で、RecA 結合 ssDNA に由来する TRNOE を示すため、これを指標として DinI が ssDNA-RecA 結合活性に影響を与えるか否かを調べた。この実験では未標識の RecA と大過剰の 4, 8, 12mer の ssDNA それぞれを混合した試料および、その複合体に DinI を加えた試料について ^1H - ^1H NOESY を測定し、その比較から DinI の ssDNA-RecA 結合阻害活性について調べた。

<結果および考察>

RecA の N 端および C 端ドメインを加えながら DinI の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの測定を行ったところ、intact の RecA とのタイトレーション実験で見られたような強い結合を示すシグナル変化は見られなかった。N 端欠失ドメインにおいては intact RecA の結果と同様のシグナルの変化が見られ、且つその変化はこのドメインが filament を形成する 0.1mM 以上の濃度でより顕著に見られることがわかった (fig. 1)。また TRNOESY の実験から、DinI は 4mer ssDNA と RecA との結合には影響を及ぼさないが、それより長い ssDNA (8mer, 12mer) と RecA との結合に対しては弱い阻害効果を示すことがわかった。RecA は ssDNA の 3 残基に対して 1 分子結合することは既にわかっているので、8mer 以上の ssDNA との相互作用に関しては、DNA 上の隣り合う RecA 分子間の協同性が重要となってくる。従って、DinI は ssDNA に結合した RecA 分子間のクレフトに結合し、DNA 上での協同性に影響を与えることにより、coprotease 活性を阻害しているのではないかと推測される。

現在 RecA と DinI の相互作用を弱める高塩濃度条件下でのタイトレーション実験や、より性質の良い RecA 中央ドメインの発現系の構築を行ない、更に詳細な相互作用の解析を進めている。

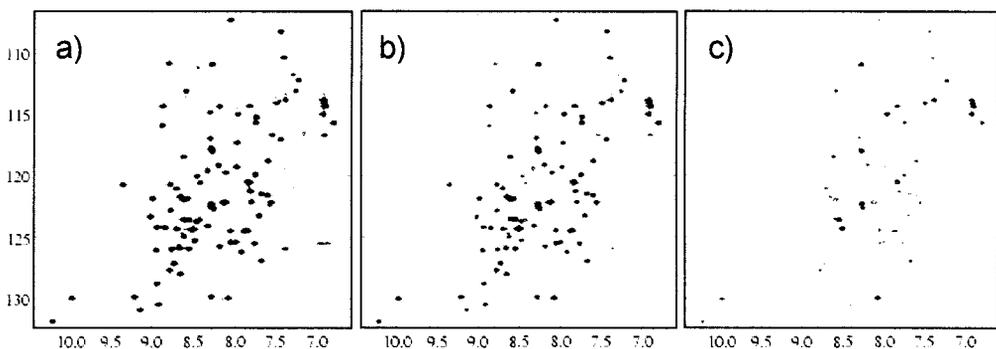


Figure 1:

^1H - ^{15}N HSQC spectrum of ^{15}N -DinI alone (a), ^{15}N -DinI with 0.1mM $\Delta 33\text{RecA}$ (b) and ^{15}N -DinI with 0.2 mM $\Delta 33\text{RecA}$ (c). The concentration of ^{15}N -DinI was 0.1 mM. Samples were dissolved in a 10% $^2\text{H}_2\text{O}$ buffer containing 20 mM sodium phosphate (pH 6.5) and 50 mM NaCl. All of these spectra were acquired at 298K on a Bruker DRX600 spectrometer.

P 33 TraR DNA結合ドメインの立体構造解析

(¹三菱化学生命研・構造生物学研究ユニット、²信州大学・工学部)

○田中剛史¹、須貝真理子¹、小林邦子¹、片岡正和²、河野俊之¹

Structural Analysis of DNA Binding Domain of TraR

Takeshi Tanaka¹, Mariko Sugai¹, Kuniko Kobayashi¹, Masakazu Kataoka², Toshiyuki Kohno¹
¹Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, ²Department of Environmental Science and Technology, Faculty of Engineering, Shinshu University

The *traR* gene product, TraR, that regulates the pSN22 conjugation system in *Streptomyces*, is a 27 kDa protein that function as a transcriptional repressor for the *tra* operon (*traA-traB-spdBs*) and *traR* itself. TraR protein has a helix-turn-helix (HTH) motif and binds to a 12 bp consensus DNA sequence, TRE box. This is located within the divergent promoter region for the *tra* operon and *traR*, and regulates their expression negatively.

Although all of these regulators for the *Streptomyces* conjugation systems have HTH motifs, their primary structures exhibit little similarity. From the viewpoint of the structure-function relationships, it is significant work to determine and to compare 3D structures of such regulators. As a first step, we determined the sequence specific NMR resonance assignment and predicted the secondary structure of TraR DNA binding domain (TraR1-100).

*traR*遺伝子産物TraRは放線菌においてpSN22プラスミドの接合機構を制御している27kDaのリプレッサータンパク質であり、*tra*オペロンおよび*traR*遺伝子自身の転写調節因子として機能している。TraRタンパク質はヘリックス・ターン・ヘリックス (HTH) モチーフを持ち、12bpの特異的DNA配列 (TRE box) を結合する。TRE boxは*tra*オペロンおよび*traR*遺伝子のプロモーター領域に存在しこれらの遺伝子発現を調節している。

放線菌の遺伝子接合機構を制御する全ての転写調節因子はHTHモチーフを持つが、一次構造上の相同性は低い。このためこれらの制御因子の立体構造を解析・比較することは立体構造-機能相関を議論する上で重要である。そこで我々はその第一歩としてTraRのDNA結合ドメイン (TraR1-100) のNMRシグナルの配列選択的帰属および2次構造の解析を行った。

キーワード：TraR、多次元NMR、立体構造解析、DNA結合ドメイン

たなか たけし、すがい まりこ、こばやし くにこ、かたおか まさかず、
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TraR(1-100)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。

配列特異的な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TraR(1-100)を用いHNCA、HN(CO)CA、HNCACB、CBCA(CO)NNH、HNCO、HN(CA)CO、CC(CO)NNH、H(CCCO)NNH、HCCH-TOCSYを測定した。 $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ 値は2D intensity modulated $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQCより得た。

<結果および考察>

$^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC上で7個のPro残基を除く95残基のうち92残基 (97%) の主鎖 ^1H 核および ^{15}N 核シグナルの帰属を完了した。Gly1、Ala70、Glu92は帰属できなかった。また、99%の $^{13}\text{C}\alpha$ 、100%の $^{13}\text{C}\beta$ 、99%の $^1\text{H}\alpha$ 、100%の $^1\text{H}\beta$ 、99%の $^{13}\text{C}\text{O}$ 核のシグナルを帰属した。

帰属された $^{13}\text{C}\alpha$ 、 $^{13}\text{C}\beta$ 核のChemical Shift Indexおよび $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ 値からTraR(1-100)には3本の α ヘリックスと1もしくは2本の β ストランドがあることが分かった。

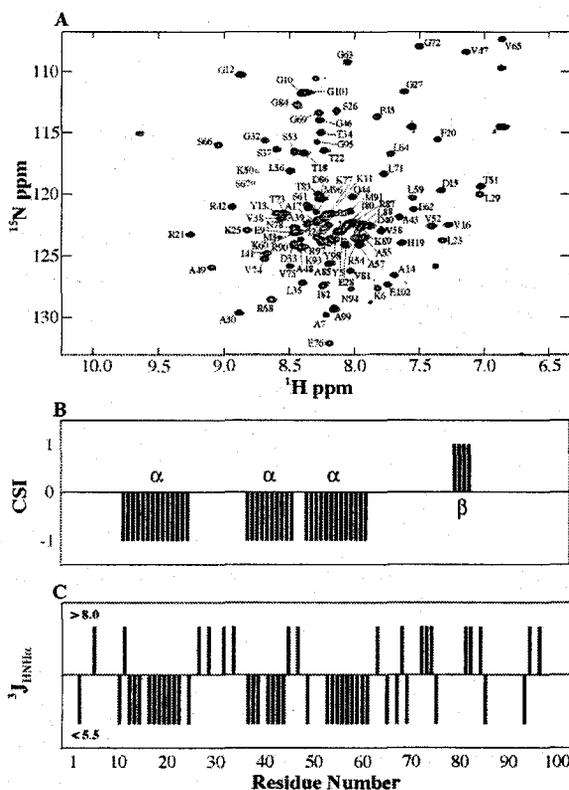


Figure 1. (A) $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC spectrum of TraR(1-100) at a ^1H resonance frequency of 500 MHz (pH 6.5, 303 K). The resonance assignments are indicated with the one-letter amino acid code and residue number. (B) CSI consensus plot for TraR(1-100). Generated using $^1\text{H}\alpha$, $^1\text{H}\beta$, $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, and $^{13}\text{C}\text{O}$ chemical shifts. (C) The $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ values for TraR(1-100) obtained from the 2D intensity modulated $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC.

(筑波大化学¹、長岡高専物質工²)○長尾 聡¹、平井佑紀¹、猪瀬達徳¹、照井教文¹、山本泰彦¹、鈴木秋弘² ^{19}F NMR Spectral Properties of Hemes Possessing Fluoro or Perfluoromethyl Group as Side-chains○S. Nagao¹, Y. Hirai¹, T. Inose¹, N. Terui¹, Y. Yamamoto¹, and A. Suzuki²¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba, ²Dept. of Materials Eng., Nagaoka Natl. Coll. of Tech.

The ^{19}F NMR spectral properties of myoglobin reconstituted with hemin possessing either fluoro (2-MF and 3,7-DF) or perfluoromethyl (7-PF) group as side-chains were studied. The ^{19}F signals observed for 2-MF and 3,7-DF were more significantly affected by the oxidation, spin, and ligation states of heme iron than those for 7-PF. The insensitivity of chemical shift of 7-PF to heme electronic structure is attributed to weak orbital interaction between porphyrin-ring and fluorine atom in perfluoromethyl group. The observed ^{19}F signals for Mb reconstituted with 7-PF exhibited narrower linewidth than those for 2-MF and 3,7-DF, in all the states of heme iron examined. Since diamagnetic and paramagnetic T2 relaxation are largely affected by chemical shift anisotropy and Curie spin relaxation, respectively, both relaxation mechanisms are expected to be considerably reduced by fast internal rotation of perfluoromethyl group around its C3 axis in 7-PF.

序論

ミオグロビン(Mb)に代表される b 型ヘムタンパク質では活性部位であるヘムとタンパク質との間に共有結合が存在しない。そのため、Mb の本来のヘムであるプロトヘムを除去し、代わりにヘム側鎖にフッ素をもつフッ素化ヘム(Fig. 1)を Mb のタンパク質部分に組み込んだ再構成 Mb を調製することができる。再構成 Mb では、 ^{19}F NMR シグナルの解析を通じて活性中心であるヘム鉄の電子状態の情報を得ることができ、さらにヘム及び活性部位近傍のアミノ酸側鎖プロトンの情報を ^{19}F - ^1H 異核間 NOE の観測から得ることができる。

フッ素をヘム側鎖に導入する際には、その導入様式としてポルフィリン環に直接結合したフルオロ基(2-MF, 3,7-DF など)とパーフルオロメチル基(7-PF など)が考えられる。本研究では、これらフルオロ基及びパーフルオロメチル基をもつヘムの分光学的特徴を比較し、フッ素化ヘムをヘムタンパク質の構造解析に利用する方法について検討する。

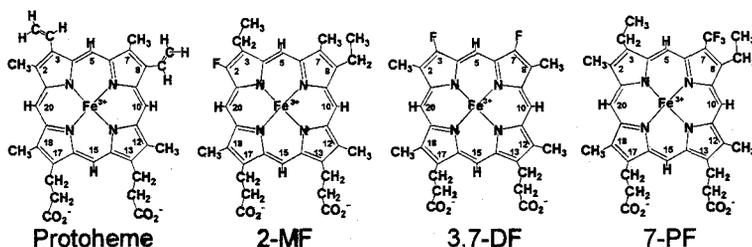


Fig. 1 Molecular structure of ring-fluorinated hemes

実験

^{19}F NMR 測定は Bruker AVANCE-500 を用いて行った。Fig. 1 のフッ素化ヘムをそれぞれマッコウクジラミオグロビンのタンパク質部分に組み込み、一般的な方法で CO、O₂、Deoxy など種々の配位状態にした後 ^{19}F NMR 測定を行った。また、 ^{19}F - ^1H 間 NOE の観測は 3,7-DF 及び 7-PF 再構成 MbCO 体において行った。フッ素の化学シフト値はトリフルオロ酢酸(CF₃COOH)を基準として定めた。

Keyword : ^{19}F NMR、常磁性 NMR、フッ素化ヘム、ヘムタンパク質、緩和時間

ながおさとし、ひらいゆうき、いのせたつり、てるいのりふみ、やまもとやすひこ、すずきあきひろ

結果・考察

3,7-DF と 7-PF ポルフィリン、それぞれのヘムとの再構成 Mb の CO、CN⁻、Deoxy 体において観測された ¹⁹F NMR スペクトルを Figs. 2, 3 にそれぞれ示す。MbCN⁻、DeoxyMb の鉄イオンには不対電子が存在するため、それらの化学シフトは常磁性シフトにより大きな影響を受ける。3,7-DF 再構成 Mb では 7-PF 再構成 Mb と比較して常磁性シフトがより大きく、また反磁性である CO 体と O₂ 体においても約

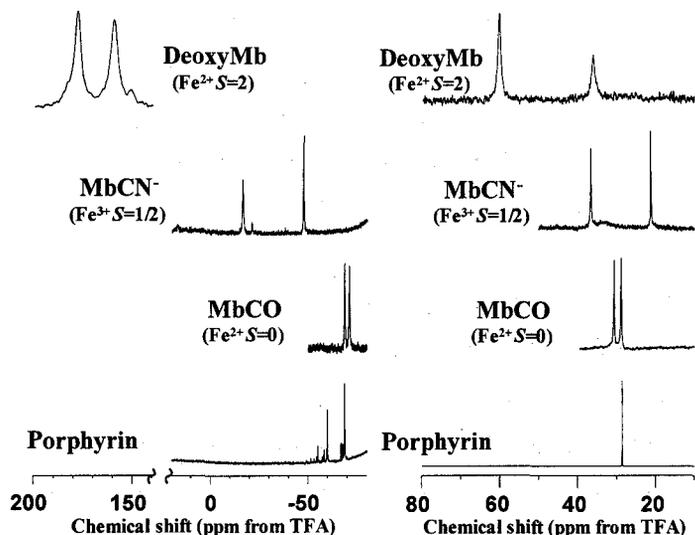


Fig. 2 ¹⁹F NMR spectra of reconstituted Mb with 3,7-DF at 298K

Fig. 3 ¹⁹F NMR spectra of reconstituted Mb with 7-PF at 298K

2.5ppmのシフト差が検出された。これらの結果は、パーフルオロメチル基をもつ7-PFよりフッ素がポルフィリン環に直接結合している3,7-DFに由来する¹⁹F NMRシグナルの方がヘム鉄の配位子の違いをより鋭敏に反映する事を示している。

一方、¹⁹F NMRシグナルの線幅を比較すると、3,7-DFでは109.9Hz(Porphyrin, S=0)、130.6、120.9Hz(CO, S=0)、195.3、97.7Hz(CN⁻, S=1/2)、946.0、909.4Hz(Deoxy, S=2)であるのに対し、7-PFでは12.2Hz(Porphyrin)、92.8、91.6Hz(CO)、80.6、58.6Hz(CN⁻)、427.25、457.76Hz(Deoxy)と小さい値であった。7-PF再構成MbではMbの遅い等方回転運動の他にパーフルオロメチル基の速い回転運動があるためにフッ素の横緩和時間が長くなると考えられることや、フッ素核と常磁性鉄イオンの距離が2-MF及び3,7-DFと比べて離れている事から¹⁹F NMRシグナルの線幅が小さくなったと思われる。したがって、分子量が大きい場合や鉄イオンが常磁性をもつ場合など、観測されるシグナルの線幅が極めて広がると予想されるヘムタンパク質の研究には7-PFが有利であることを示唆している。

また、フッ素化ヘムをもつMbの¹⁹F NMRシグナルをラジオ波照射により飽和させることで発生する近傍の¹H核へのNOEを観測することで、フッ素近傍の局所的な構造情報を得ることが可能である。2-MFと7-PFは非対称なヘムであるため、Normal型とReverse型という2種類の配向でヘムタンパク質に取り込まれ、その結果2種類のヘムの配向に対応する¹⁹F NMRシグナルが観測される。したがって、これらのシグナルをそれぞれ選択的にラジオ波パルス照射したときの¹HへのNOEを観測することでNormal及びReverse型ヘムタンパク質それぞれの情報が得られる。一方、対称な分子構造をもつ3,7-DFでは2つのフッ素は等価であるが、ヘムがタンパク質に組み込まれると周囲のタンパク質部分に由来する非対称な摂動によりヘムの電子構造の対称性が崩れ、2つのフッ素シグナルが観測される。そこで、3-Fと7-Fに由来するフッ素シグナルを選択的にラジオ波照射することにより、それぞれのフッ素近傍の構造情報を得ることができる。また、3,7-DFと7-PFそれぞれの再構成Mbにおいて観測されるNOEの強度を比較したところ、7-PFでは3,7-DFの約1.5倍のNOEが発生することが分かった。

以上の結果より、フルオロ基をもつ2-MF及び3,7-DFを組み込んだ再構成ヘムタンパク質の¹⁹F NMRシグナルはヘムタンパク質の活性部位の電子構造に非常に鋭敏であり、一方パーフルオロメチル基をもつ7-PFを組み込んだ場合は高分子量のヘムタンパク質や大きな常磁性を示すヘムタンパク質の観測に対して有用であると考えられる。

P 35

無細胞タンパク質合成と NMR を利用した立体構造解析用試料のハイスループットなスクリーニング

(理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター)

○木川隆則, 井上真, 青木雅昭, 松田貴意, 関英子, 布川絵未, 矢吹孝, 松尾洋, 横山茂之

High-throughput screening of proteins suitable for structure determination by the cell-free synthesis and NMR spectroscopy

RIKEN Genomics Sciences Center

Takanori Kigawa, Makoto Inoue, Masaaki Aoki, Takayoshi Matsuda, Eiko Seki, Emi Nunokawa, Takashi Yabuki, Yo Matsuo, and Shigeyuki Yokoyama

RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI) aims to study both structures and molecular functions of protein families. In this framework, RIKEN Genomic Sciences Center is mainly targeting mouse, human, and *Arabidopsis thaliana*, from the viewpoint of domain families involved in particular biological systems such as cell signaling, nucleic acid binding, and human diseases. Domain(s) belonging to selected families are further screened in terms of the suitability for the structure determination. The screening features the cell-free protein synthesis system, which is more suitable for efficient expression of a large number of construct. The winners in the screening stage are subjected to larger-scale cell-free production of the uniformly [¹³C, ¹⁵N]-labeled samples for the NMR spectroscopy or the seleno-methionine incorporated samples for the X-ray crystallography.

理化学研究所・構造プロテオミクス研究 (RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI); <http://www.rsgi.riken.go.jp>) では, タンパク質ファミリーの立体構造と分子機能の解明を目指して研究を進めている. RSGI の主要研究組織として, 我々のグループでは, 細胞情報伝達, 核酸結合, 病気などの特定の生物学的機能に関係するドメインファミリーの観点から, マウス, ヒト, シロイヌナズナのタンパ

構造ゲノム科学, 構造プロテオミクス, NMR, 無細胞タンパク質合成, 安定同位体標識

きがわたかのり, いのうえまこと, あおきまさあき, まつだたかよし, せきえいこ, ぬのかわえみ, やぶきたかし, まつおよう, よこやましげゆき

ク質ドメインを主な研究対象としている。これらのターゲットに対して、まずバイオインフォマティクス的手法を用いて、選択・優先順位付け（スクリーニング）を行い、さらに、構造解析適合性の観点から実験的なスクリーニングを行っている。この実験的なスクリーニングの過程においては、従来とは桁違いな数の試料を取り扱う必要があり、迅速で効率の良いタンパク質発現系が必要となるため、我々は、無細胞タンパク質合成系を活用している。

スクリーニングの第一段階では、PCRにより増幅したDNA断片を、クローニング操作を一切おこなわずにそのまま鋳型として利用する、小スケールの無細胞タンパク質合成系を用いる。この系を用いて、多くのコンストラクトを発現し、発現量と可溶性の観点から最適のものを選択する。この過程は、すべての作業を96穴ないしは384穴マイクロプレートフォーマットで行うため、多検体処理が容易で、機械化・自動化にも適している。第二段階では、mgスケールの ^{15}N 標識タンパク質を、透析無細胞系を用いて同時に多数合成して、さらに、アフィニティ・クロマトグラフィーを用いて、自動的に粗精製を行う。現状で我々は、24時間で、24試料を調製することが可能である。第三段階では、前段階で調製した試料のHSQCスペクトルを測定し、選択したドメインが正しくフォールドし、構造解析に適しているかどうかを調べる (Figure 1)。

このスクリーニング過程を通過したドメインに関しては、NMR法を用いた立体構造解析に必要な安定同位体標識試料や、X線結晶解析法を用いたハイスループットな解析に必要なセレノメチオン導入試料を、大容量の透析無細胞系を用いて合成して精製し、構造解析を進めることになる。すでに、数十種類の構造解析用タンパク質試料を調製し、NMR法およびX線結晶解析法による立体構造解析を進めており、本討論会においていくつかの成果を報告する (1L4, P52, P55, P56, P57, P58)。

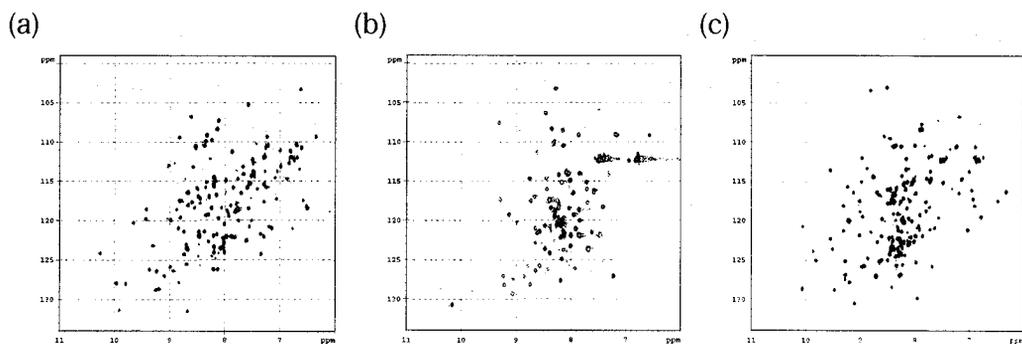


Figure 1. HSQC spectra of protein domains from (a) mouse, (b) human, and (c) *Arabidopsis thaliana*

○ 河野隆英¹、山本行晴¹、谷田以誠²、上野隆²、木南英紀²、水口峰之¹、河野敬一¹

Structural analysis of the microtubule-associated protein light chain 3, MAP-LC3

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-0194, Japan

² Department of Biochemistry, Juntendo University of Medicine, Tokyo 113-8421, Japan

Microtubule-associated protein light chain 3 (MAP-LC3) is a human homologue of a member of yeast Apg (autophagy) family. Apg family is involved in autophagy induced under nutrient-starvation condition in yeast and is composed of a number of Apg mutants. One of these members, Apg8p corresponds to three human proteins, GABA_A receptor associated protein (GABARAP), Goldi associated ATPase enhancer of 16 kDa (GATE-16) and MAP-LC3. Some studies indicate that only MAP-LC3 is regulated by proteolysis of its C-terminal sequence, thereby is capable to associate with vesicle membrane. In the present study, we have started the structural analysis of MAP-LC3 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】

Autophagy は細胞内消化に不可欠な過程であり、細胞内分画を取り込んだベシクルのリソソームへの輸送として観察される。酵母を用いた変異体実験により、この過程には数多くの蛋白質が必要であることが明らかになり、Apg (autophagy) ファミリーと呼ばれている (1)。microtubule-associated protein light chain 3 (MAP-LC3) はこのファミリーに属する Apg8p のヒト類似体であり、他のヒト類似体として GABA_A receptor associated protein (GABARAP) や Goldi associated ATPase enhancer of 16 kDa (GATE-16) が同定されている。これら3つのヒト類似体は高い配列同一性を有するが、細胞内局在性はそれぞれ異なり (2, 3)、また MAP-

MAP-LC3、貪食、結合活性、蛋白質立体構造解析

こうのたかひで、やまもとゆきはる、たにだいせい、うえのたかし、こみなみえいき、みずぐちみねゆき、かわのけいいち

LC3 ではベシクル相互作用においてC末端プロセッシングによる制御を受けている (4)。GABARAP、GATE-16 については既に構造解析が行われているものの、それらの機能の全容は未だ明らかになっていない。

本研究では MAP-LC3 のプロセッシング前後の配列を持つ、それぞれの蛋白質の発現系を構築し、NMR 法による構造解析を試みた。これにより未だ不明な Apg8p ヒト類似体の立体構造を明らかにするとともに、MAP-LC3 のベシクル相互作用が如何に制御されているのかを分子レベルで説明する。更に MAP-LC3、GABARAP、GATE-16 の生理的役割やそれぞれの細胞内局在性を決める因子の特定を目標とする。

【実験】

大腸菌 BL21 株を用いて MAP-LC3 を GST 融合タンパク質として発現し、破砕して可溶性画分を回収した。GST 親和性カラムを用いて GST 融合蛋白質を精製し、プロテアーゼ処理により MAP-LC3 のみを得た。更にイオン交換クロマトグラフィーによる最終精製を行った。また最小培地を用いて、¹⁵N-、¹³C/¹⁵N-ラベル体を調製した。NMR サンプル溶液の組成は次のように設定した；25 mM sodium phosphate (pH 7.0)、100 mM NaCl、0.1 mM EDTA。NMR 測定は Bruker DMX-500 を用いて 25°C の条件で行った。これまでに ¹H, ¹⁵N-HSQC、HNCA、HNCOCA、HNCACB、HNCOCACB、HCCONH、¹⁵N-edited NOESY、¹⁵N-edited TOCSY などの測定を行った。

【結果と考察】

MAP-LC3 の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルは個々の信号がよく分離した良好なものであった。これまでに 125 残基の MAP-LC3 のうち、主鎖の帰属は HNCA、HNCOCA、HNCACB、HNCOCACB によりほぼ終了した。主鎖 H^α、C^α、C^β の化学シフトを基にした chemical shift index は GABARAP のものと類似しており、立体構造が似ていることを示唆している。側鎖プロトンの帰属を進めており、X-PLOR による構造計算の結果についてポスター発表する。

【参考文献】

- 1) M. Tsukada & Y. Ohsumi, *FEBS Lett.* 333, 169-174 (1993).
- 2) H. Wang, F. K. Bedford, N. J. Brandon, S. J. Moss & R. W. Olsen, *Nature* 397, 69-72 (1999).
- 3) Y. Sagiv, A. Legesse-Miller, A. Porat & Z. Elazar, *EMBO J.* 19, 1494-1504 (2000).
- 4) Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi & T. Yoshimori, *EMBO J.* 19, 5720-5728 (2000).

酸化型シトクロム *c* の磁化率テンソルの決定とヘム近傍の構造の研究

(筑波大化学¹、第一製薬²、広大院生物圏³、阪大院工⁴、阪大院薬⁵、東大院農⁶)
 ○立入直紀¹、照井教文¹、松尾 瞳¹、皆川和久¹、山本泰彦¹、長谷川 淳²、
 三本木至宏³、内山 進⁴、小林祐次⁵、五十嵐泰夫⁶

Determination of Paramagnetic Susceptibility Tensor in Thermostable Cytochromes *c*

○N. Tachiiri¹, N. Terui¹, H. Matsuo¹, K. Minakawa¹, Y. Yamamoto¹, J. Hasegawa², Y. Sambongi³, S. Uchiyama⁴,
 Y. Kobayashi⁵, and Y. Igarashi⁶

¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba, ²Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., ³Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ., ⁴Graduate School of Eng., Osaka Univ., ⁵Graduate School of Pharm. Sci., Osaka Univ., and ⁶Dept. of Biotech., Univ. of Tokyo⁶

Cytochrome *c*₅₅₂ from *Hydrogenobacter thermophilus*, Cytochrome *c*₅₅₁ from *Pseudomonas aeruginosa* are highly homologous and belong to a family of the so-called Class I cytochrome *c* (cyt *c*). Despite their structural similarity, their thermostabilities are considerably different with each other. We have been trying to identify structural features responsible for regulating the thermostability of these proteins through paramagnetic NMR study. Paramagnetic susceptibility tensors in the oxidized forms of the proteins have been evaluated from the analysis of the pseudo-contact shifts observed for signals arising from amino acid residues located close to heme. The orientation of the tensor with respect to heme was found to be essentially similar between them. These results, together with the tensor orientations reported for other Class I cyt *c*, indicated that the *z* axis of the tensor is primarily determined by the coordination of axial His to heme iron in the framework of the Class I cyt *c*.

序 論

好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*) 由来のシトクロム *c*₅₅₂ (HT) は、アミノ酸 80 残基からなる *c* 型ヘムタンパク質であり、生理的条件下では 100°C でも変性しない。一方、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のシトクロム *c*₅₅₁ (PA) は、HT との一次配列の相同性が 56% と高いにもかかわらず、熱変性温度は HT よりも約 40°C 低い。HT と PA の熱安定性にこのような大きな違いが生じる構造化学的因子を特定するために、立体構造およびその温度依存性を両者で比較することは有用である。酸化型シトクロム *c* では、ヘム近傍のプロトンに由来する NMR シグナルが、ヘム鉄の対電子により常磁性シフトして観測される。常磁性シフトは分子の立体構造変化を鋭敏に反映することから、酸化型シトクロム *c* の立体構造を常磁性シフトの解析から精度良く決定することが可能となる。本研究では、常磁性シフトの解析により、HT と PA のヘム活性部位の立体構造を比較した。

結果および考察

対電子との相互作用により NMR シグナルに生じる常磁性シフトは、化学結合を介した対電子の非局在化によるコンタクトシフトと対電子と核との双極子-双極子相互作用による擬コンタクトシフトの寄与を含んでいる。酸化型シトクロム *c* のスペクトルで観測されるシグナルのうち、ヘム側鎖、ヘム鉄の軸配位子およびヘムとチオエーテル結合している 2 つの Cys に由来するシグナルの常磁性シフトにはコンタクトシフトの寄与が含まれているが、それら以外のシグナルの常磁性シフトは本質的に擬コンタクトシフトのみで決まる。分子の立体構造と擬コンタクトシフトとの関係は、Fig. 1 にあるように定式化されることから、常磁性磁化率テンソルを決定すれば、ヘム近傍の詳細な立体構造を擬コンタクトシフトの解析を通して調べることが可能となる。

酸化型 PA で Timkovich ら (1993) が決定した磁化率テンソルを Fig. 2 に示す。PA の Ile48 の各プロトンで観測される擬コンタクトシフトを HT に対応するアミノ酸残基 (Ile46) のプロトンのものと比較して Table 1 に

Keyword : 磁化率テンソル、常磁性シフト、シトクロム *c*、タンパク質の高次構造、ヘムの配位構造

たちいりなおき、てるいのりふみ、まつおひとみ、みなかわかずひさ、やまもとやすひこ、はせがわじゅん、さんばんぎよしひろ、うちやますすむ、こばやしゆうじ、いがらしやすお

$$\delta_{pc} = \frac{\beta^2 S(S+1)}{9kTr^3} \left\{ \left[g_z^2 - \frac{1}{2}(g_x^2 + g_y^2) \right] (3\cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2}(g_y^2 - g_x^2) \sin^2\theta \cos 2\phi \right\}$$

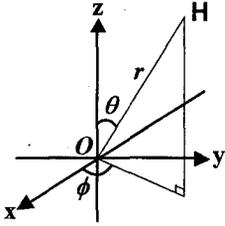


Fig. 1 Pseudo-contact shift (δ_{pc}) is expressed in terms of the paramagnetic susceptibility tensor. (r, θ, ϕ) represents the polar coordinates for H . g_i ($i = x, y, z$) is the principal value of the g -factor. Other parameters represents usual meanings.

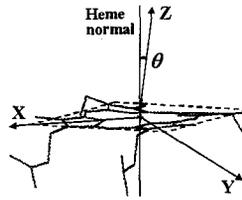


Fig. 2 Orientation of the principal magnetic axes with respect to heme. θ is defined as the angle between z axis and normal to heme plane. The value of $\sim 10^\circ$ was reported for θ of PA (Timkovich and Cai (1993)). x and y axes are along N-Fe-N axes.

示す。両者での対応するプロトンに由来するシグナルの擬コンタクトシフトは、それらの符号と大きさが類似している。また、Fig. 1 の式からわかるように、擬コンタクトシフトはヘム鉄からの距離とは無関係にその値が実質的にゼロになる曲面が存在するが、 γ -CH₃の擬コンタクトシフトの符号が他のプロトンと異なることは、その曲面がこの残基と交差していることを示している。これらの結果は、HT と PA でヘムに対する Ile46 (Ile48) の配向および磁化率テンソルが類似していることを示す。

磁化率テンソルはヘム鉄の配位構造に依存することが知られている。Class I シクロム c に属する HT と PA は共にヘム鉄の軸配位子として His と Met をもつ。HT と PA の構造を比較すると、ヘム鉄に結合することにより光学活性となる Met のイオウのヘム鉄への配位様式が HT と PA で光学異性体の関係にあることが明らかとなっている。したがって、HT と PA での磁化率テンソルの高い類似性は、Fe-Met 配位結合は磁化率テンソルにあまり影響を及ぼさないことを示している。磁化率テンソルが報告されている他の Class I シクロム c の磁化率テンソル (Feng *et al.* (1990), Gao *et al.* (1991), Banci *et al.* (1997)) がお互いに高い類似性を示すことも、Fe-His 配位結合の方が磁化率テンソルに及ぼす影響が大きいことを支持している。

NMR により決定された還元型 HT の構造 (Hasegawa *et al.* (1998)) では、ヘム鉄の配位構造は X 線結晶構造解析で決定された PA の構造 (Matsuura *et al.* (1982)) のものに比べ正八面体構造からの歪みが大きい (Fig. 3) が、今回の磁化率テンソルの解析結果は、両者での配位構造が類似していることを示している。プロトンの空間密度の低さや、それに起因する NOE 情報の少なさのためにヘム近傍の立体構造を NMR により決定することは困難である。したがって、擬コンタクトシフトの解析を利用したヘム鉄の配位構造や近傍の立体構造の決定が有効であると考えられる。

結論

タンパク質の立体構造の高い類似性を反映して、HT と PA の磁化率テンソルは両者でほとんど一致することが明らかとなった。また、磁化率テンソルの z 軸は His とヘム鉄との配位結合により決まることが示唆された。

謝辞 本研究は文部科学省科学研究費補助金特定領域研究 (2) 「強相関ソフトマテリアルの動的制御」 (No. 413 / 14045203) により行われている。

Table 1 Chemical shifts (ppm) for a Ile proton signals of HT and PA.

HT (318K, pH 5.0)			
Ile46	δ_{obs}	δ_{dia}	δ_{para}
γ -H	-0.45	1.22	-1.67
γ' -H	-2.60	1.35	-3.95
γ -CH ₃	1.40	0.69	0.71
δ -CH ₃	0.51	1.21	-0.70
PA ^{a)} (323K, pH 5.2)			
Ile48	δ_{obs}	δ_{dia}	δ_{para}
γ -H	-0.48	1.01	-1.49
γ' -H	-2.49	1.76	-4.25
γ -CH ₃	0.82	0.62	0.20
δ -CH ₃	0.08	1.32	-1.24

δ_{ox} and δ_{re} are shifts observed for the oxidized and reduced forms of the protein, respectively. $\delta_{para} = \delta_{ox} - \delta_{re}$
^{a)} Timkovich and Cai (1993)

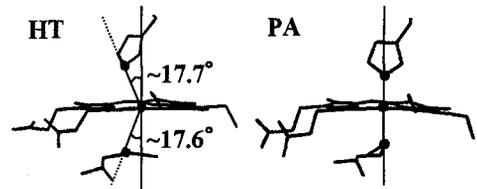


Fig. 3 Coordination geometry of heme iron in HT (Hasegawa *et al.* (1998), left) and PA (Matsuura *et al.* (1982), right). The bonds between axial ligands and heme iron are further away from heme normal in HT than those in PA.

P 38 クロレラユビキチンの立体構造と局所的構造変化の NMR 解析

CREST/JST¹、都立大院理²、九大院農³、クロレラ工業(株)⁴

○ 小神 将²、野村 薫²、菅 向志郎^{3,4}、
松林 恒夫⁴、大木 進野¹、甲斐荘 正恒^{1,2}

Three-dimensional structure of chlorella ubiquitin and local structural analysis by NMR Spectroscopy

*CREST/JST¹, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University²,
Graduate School of Bioresources and Bioenvironmental Science, Kyushu University³,
Research Department, Chlorella Industry Co., Ltd.⁴
Masaru Kogami², Kaoru Nomura², Koushiro Suga^{3,4},
Tsunee Matsubayashi⁴, Shin-ya Ohki¹ and Masatsune Kainosho^{1,2}*

Around neutral pH the 2D ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of uniformly ¹⁵N labeled chlorella ubiquitin exhibited two peculiarly broadened cross peaks in the lower proton chemical shift region, which were assigned to G53 and E24. At lower pHs, where side-chain carboxyl groups are protonated, these cross peaks were shifted up-field and became sharper. As the pH dependence of the two cross peaks were very similar and because these two residues are spatially close, it is reasonable to expect that the pH dependence of these peaks are correlated. Here we present a molecular explanation for this unusual pH dependence from data obtained using extensive amino acid replaced mutants.

ヒト、及びクロレラユビキチンの中性付近 (pH 6.6) における 2D ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル中、E24 と G53 は低磁場の ¹H-化学シフト領域に際立って幅広い相関ピークを与える。両ユビキチンはアミノ酸配列、立体構造ともに高い類似性を持ち、E24 と G53 の残基は立体構造上近接した位置関係にある。ユビキチンは真核細胞に幅広く分布しておりアミノ酸配列の高い保存性も良く知られており、また NMR 解析のモデルとしても良く利用されている。従って、これまで原因が説明されていないこのような局所的現象を詳しく説明する必要がある。本研究においては、クロレラユビキチンの数多くのアミノ酸置換変異体を用い、それらの NMR スペクトルの pH 依存性などを基に E24 および G53 残基周囲の局所的な構造変化を解析した。

Keywords : クロレラユビキチン、アミノ酸置換変異体、局所構造、pH 滴定

こがみ まさる、のむら かおる、すが こうしろう、まつばやし つねお、
おおき しんや、かいのしょう まさつね

[方法]

本研究においては、大腸菌を用いた大量発現系により ^{15}N -および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -標識クロレラユビキチン、およびそのアミノ酸置換変異体を調製し NMR 解析に用いた。NMR 測定には約 1.5 mM の試料を 0.04% の NaN_3 を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.6) または HCl/KCl 緩衝液 (pH 2.0) に溶かしたものを、あるいは HCl、NaOH により各 pH に調製した試料溶液をシゲミ管に入れたものを用いた。NMR 測定は Bruker DRX 600、DMX 500 及び AV 500 を用い結果 310K で測定した。立体構造解析は通常のプロトコルに従って行った。pH 滴定データは次に示した Henderson-Hasselbach 式により解析した。

$$\delta_{obs} = \delta_A + \frac{\delta_A - \delta_B}{10^{(pH - pKa)} + 1} \dots\dots\dots(1)$$

[結果と考察]

クロレラユビキチンの E24A 変異体においては WT の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルで観測された G53 クロスピークの異常 (著しい ^1H -低磁場シフトと広幅化) は見られず、また WT であっても E24A 側鎖が完全にプロトン化する低 pH においては G53 シグナルの異常は見られなかった。また、G53 シグナルの化学シフトの pH 変化は E24 のそれと完全に一致し、ユビキチン類においては E24 と G53 の関与する何らかの静電的相互作用が存在することが明らかとなった。これらの原因をより詳しく解明するために両残基近傍に存在する解離性残基 (Asp、Glu、Lys) 等を逐一、或は同時に改変にした多くの変異体を作成し、それらの NMR スペクトルを解析した。これらの結果から G53 と E24 の相互作用に関して詳細な情報を得ることができた。特に、側鎖カルボキシル基の pH 変化から各残基の pKa を測定し、それらの結果からユビキチンの表面解離性残基間の静電的相互作用ネットワークに関する知見が得られたことは、今後ユビキチン類の構造と機能に関する研究を進める上で有用と思われる。

[参考文献]

- Nomura, K. *et al.*, manuscript in preparation.
Sharager, R. E. *et al.*, *Biochemistry*, **11**, 541-547 (1972)
Arata, Y. *et al.*, "スペクトルで見るタンパク質の NMR", 講談社サイエティク (1987)
Takizawa, Y. 東京都立大学修士論文 (1994)

P 39

アルツハイマーペプチドとシクロデキストリンとの
分子間相互作用のNMR法による研究

(産総研・生物情報解析研究センター(1)、東京理科大学基礎工(2))

○ 秦旭栄(1)、阿部寛志(1),(2)、中西洋志(1),(2)

NMR Studies on the Intermolecular Interaction
of Alzheimer peptide with Cyclodextrin

(AIST・BIRC, Tokyo University of Science)

Qin xu-rong, Hiroshi Abe, and Hiroshi Nakanishi

NMR and CD spectra were used to investigate the interaction between cyclodextrin and A β (12-28) peptide. CD spectral analyses show that of the α -, β - and γ -cyclodextrins only β -cyclodextrin inhibits the aggregation of A β (12-28) at pH5.0. Analysis of the 1D proton NMR spectra clearly indicates that there are chemical shift changes in the aromatic ring of F19 and the methyl groups of V18 in the peptide. The NOESY spectra show cross-peaks between H-3 and H-5 of β -cyclodextrin and the aromatic protons of F19 and F20.

In this work we have been able to evidence the mechanism of interaction between A β (12-28) and β -cyclodextrin, which opens the way to exploring further this type of compound for the optimization of its pharmacological properties and potential therapeutic use.

序 ヒトの痴呆の一因であるアルツハイマー病の一形態は、アミロイド β -ペプチド分子が分子間会合し、凝縮現象を起こして、フィブリル(fibril)を形成し、さらにそれが高分子化することにより、大脳皮質上に老人斑として現れるものである。本研究では、NMR法やCD法を用いて β -アミロイド分子 A β (12-28)の溶液中の立体配座及び自己会合について研究するとともに、A β (12-28)とシクロデキストリン糖鎖との分子間相互作用について検討を行い、これらの相互作用がA β の会合や凝縮にどのような影響を与えるかを研究した結果、興味ある知見が得られたので報告する。

アルツハイマー病 アミロイドペプチド 分子間相互作用 包接 NMR

しんきょくえい、あべひろし、なかにしひろし

実験 本研究に用いたアミロイド β -ペプチドは、天然由来のヒトからの A β (1-40)や A β (1-42)が水溶液に溶解しにくく、また会合を起こし aggregation しやすいため、分子間相互作用に関与すると考えられる A β (16-21)部分を含む A β (12-28)の分画のペプチドを化学合成して用いた。A β (12-28)(VHHQKLVFFAEDVGSNK)は A β (1-40)などよりはるかに溶解性が良好である。溶媒はリン酸バッファー溶液を用いて調整した。シクロデキストリン類は市販のものをそのまま用いた。CD スペクトルの測定は、日本分光 J720 を用いて行った。NMR スペクトルの測定は、Bruker DMS750 分光器を用いて行った。スペクトルの解析は、NMR pipe などを用いて行った。

結果 1mM の A β (12-28)を pH5.0 のリン酸バッファー溶液に溶解し、CD スペクトルを直後に測定すると、典型的なランダムコイルの conformation を示す。しかし、この溶液は、48 時間後に 216nm に極小値をもつ CD スペクトルを与える。これはランダムコイルから β -構造への立体配座の遷移が起こったことを示している。3 種類の α 、 β 、 γ -シクロデキストリンをこの A β (12-28)溶液にそれぞれ添加すると、 α と γ のシクロデキストリンを添加した場合には、無添加の時と同様に A β (12-28)は β 構造をとり、aggregation を起こすが、 β -シクロデキストリンを添加した場合には、ランダムコイルのまま、 β 構造をとらず、凝縮も起こらないことが観察された。このことは A β (12-28)と β -シクロデキストリンが分子間相互作用(包接現象)を起こし、A β ペプチドの β 構造を介した凝縮反応を阻害していることを示唆している。

より分子の局所的な構造を観察するために、NMR スペクトルを測定した。A β (12-28)溶液へ β -シクロデキストリンを徐々に添加していった時のみ、¹H NMR スペクトルの一部が変化した。シフトしたプロトンのシグナルは F19 の芳香族プロトンと V18 のメチル基のプロトンである。

2次元の NOESY スペクトルを詳細に測定、解析すると、F19 と F20 の芳香族プロトンと β -シクロデキストリンの H3 と H5 のプロトンのシグナルの間に NOE が観測された。その他の NOE や化学シフト変化の解析の結果、A β (12-28)の F19 と F20 のベンゼン環に β -シクロデキストリンが広い方の環口から包接していること及び、V18 のイソプロピル基は β -シクロデキストリンによって包接されていないことが明らかになった。

- 文献**
- 1) Hiroshi Abe, Kazunori Kawasaki, and Hiroshi Nakanishi, J.Biochem, 2002, in press
 - 2) Xu-rong Qin, Hiroshi Abe, and Hiroshi Nakanishi, Biochem, Biophys. Res. Com, 2002, in press

家族性パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin のユビキチン様ドメインの動的な高次構造と分子認識の解析

(名市大・院薬¹、理研・GSC²、東大・院理³、北大・院薬⁴、順天堂大・医⁵、都臨床研・分子腫瘍⁶) ○坂田絵理¹、山口芳樹¹、栗本英治¹、菊池淳²、横山茂之^{2,3}、川原裕之⁴、横沢英良⁴、服部信孝⁵、水野美邦⁵、田中啓二⁶、加藤晃一^{1,2}

Structure, dynamics and molecular recognition of the ubiquitin-like domain of parkin

○Eri Sakata¹, Yoshiki Yamagichi¹, Eiji Kurimoto¹, Jun Kikuchi², Shigeyuki Yokoyama^{2,3}, Hiroyuki Kawahara⁴, Hideyoshi Yokosawa⁴, Nobutaka Hattori⁵, Yoshikuni Mizuno⁵, Keiji Tanaka⁶ and Koichi Kato^{1,2}

¹Department of Structural Biology and Biomolecular Engineering, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, ²Genomic Sciences Center, RIKEN, Yokohama, ³Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo, ⁴Department of Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo, ⁵Department of Neurology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo and ⁶Department of Molecular Oncology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

Parkin, a product of the causative gene of autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP), is a RING-type E3 ubiquitin-ligase and possesses the N-terminal ubiquitin-like domain (Ubl). Although a single mutation that causes Arg→Pro substitution at position 42 of the Ubl domain has been identified in AR-JP patients, the functional role of this domain is not clear at present. We have determined the three-dimensional structure of the Ubl domain of parkin by NMR, especially by extensive use of backbone ¹⁵N-¹H residual dipolar coupling data. Inspection of chemical shift perturbation data revealed that Ubl binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes with the surface area that includes position 42. Our findings suggest that the mutation induces a conformational change in the Rpn10-binding site of Ubl, resulting in impaired proteasomal binding of parkin, which could be the structural basis of AR-JP.

常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子産物である parkin は、E3 ユビキチンリガーゼであり、その N 末端にユビキチン (Ub) とアミノ酸配列上 32% の相同性を示すユビキチン様ドメイン (Ubl) を有する。近年、多くの変異が parkin 遺伝子上で確認されており、その結果 E3 としての機能が損なわれることが報告されている。しかしながら、parkin-Ubl の機能は未だ明らかではない。我々は parkin の Ubl の NMR 解析を行い、その動的三次元構造を決定するとともに、parkin-Ubl の分子認識機構を明らかにすることを試みた。

さかたえり、やまぐちよしき、くりもとえいじ、きくちじゅん、よこやましげゆき、かわはらひろゆき、よこさわひでよし、はつりのぶたか、みずのよしくに、たなかけいじ、かとうこういち
keywords ; パーキンソン病、parkin、ユビキチン様ドメイン、残余双極子相互作用、プロテアソーム

parkin-Ubl は溶解度が低く、10 mM [^2H]DTT 存在下において 0.1 mM のタンパク質濃度で NMR 測定を行った。このような希薄溶液中では ^1H - ^1H 間の NOE 情報を網羅的に収集するには困難であったため、2 種類の配向媒体 (bicelle および CTAB-doped bicelle) を用いて、主鎖 ^{15}N - ^1H 残余双極子相互作用の解析を行った。NMR 解析の結果、Ubl は典型的な Ub フォールドをとっていることが示された。得られた 10 個の構造と平均構造との主鎖 rmsd は、0.371 Å であった。また、 ^{15}N の緩和解析により、第 1 ストランドおよび第 2 ストランドの間に位置するターン部分 (Asn8-Ser10) は複数のコンフォーマーの間を揺らいでいることが示された。

最近、hHR23a、Dsk2 などの Ubl を有するタンパク質が、26S プロテアソームと相互作用することが報告されている。我々は、parkin-Ubl とプロテアソームの相互作用を検討するため、26S プロテアソームの構成サブユニットである Rpn10 のフラグメント (196-306) と parkin-Ubl の結合に伴う NMR スペクトルの変化を解析した。その結果、parkin-Ubl は主に β シートの第 3 ストランドから第 4 ストランド (R40-R51) を用いて Rpn10 と相互作用していることが判明した。この結果は、E3 とプロテアソームの相互作用の構造的基盤を初めて与えるものである。更に、parkin-Ubl 上の Rpn10 の結合部位に位置する Arg42 は、AR-JP 患者の家系において Pro に変異している例が報告されている。この変異により parkin の Rpn10 結合部位に高次構造変化が誘起され、26S プロテアソームとの複合体形成に破綻をきたすものと考察した。

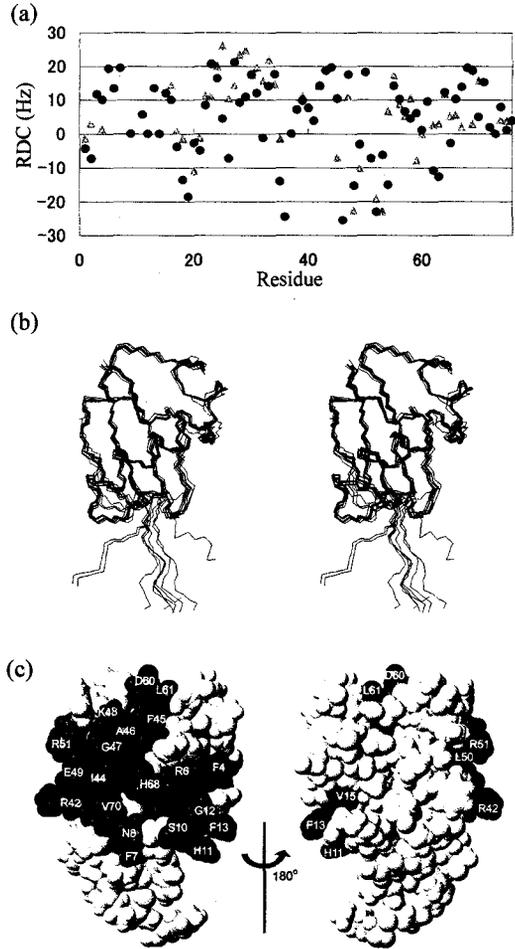


Fig. 1 (a) Plots of backbone ^{15}N - ^1H residual dipolar couplings of parkin-Ubl (circle: Bicelle, triangle: CTAB-doped bicelle) (b) Stereo view of 10 converged structures of parkin-Ubl (c) Mapping of Rpn10-binding site of parkin-Ubl

P 41

リン酸化に依存してミオシンフォスファターゼを阻害する 蛋白質 CPI-17 の溶液構造 (1)

(JST/都立大・理¹, バージニア大², 北大・理³, [現所属; 北陸先端大[§]])
○大木進野^{1, §}, 江藤真澄², 狩谷英里¹, 早野俊哉¹, 林雄一郎³, 矢沢道生³,
David L. Brautigan², 甲斐荘正恒¹

Solution NMR structure of CPI-17, a Phosphorylation-dependent myosin phosphatase inhibitor – (1)

(JST / Tokyo Metro. Univ.¹, Univ. of Virginia², Hokkaido Univ.³, [Present address; JAIST[§]])

S. Ohki^{1, §}, M. Eto², E. Kariya¹, T. Hayano¹, Y. Hayashi³, M. Yazawa³, D.L. Brautigan², & M. Kainosho¹.

It is well known that contractility of vascular smooth muscle depends on phosphorylation of myosin light chains, and is modulated by hormonal control of myosin phosphatase activity. Signaling pathways activate kinases such as PKC or Rho-dependent kinases which activate a myosin phosphatase inhibitor, CPI-17 (protein kinase-C dependent protein phosphatase-1 inhibitor protein of 17kDa). Phosphorylation of Thr38 in CPI-17 amplifies its inhibitory potency $\sim 10^3$ fold, creating a molecular on/off switch for regulating contraction.

As the first NMR study of CPI-17, here we report solution NMR structure of the CPI-17 inhibitory domain (residues 35-120) which shows the signature biological properties of the full-length protein. The final ensemble of 20 sets of NMR coordinates overlaid onto their mean structure with backbone r.m.s.d. values of 0.84 ± 0.22 Å.

構造, CPI-17, リン酸化, 阻害, ミオシンフォスファターゼ.

おおきしんや, えとうますみ, かりやえり, はやのとしや,
はやしゆういちろう, やざわみちお, D.L.Brautigan, かいのしょうまさつね.

The protein forms a novel 4-helix bundle in the shape of letter V. The structure is comprised of a central anti-parallel helix pair (B/C helices) flanked by two large spiral loops formed by the both N and C termini. And the B/C helices are held together by another anti-parallel helix pair (A/D helices) stabilized by the hydrophobic sidechains including Trp55, Phe98, and Leu111.

We also examined the phosphorylation induced conformational change of CPI-17 by monitoring ^1H - ^{15}N HSQC. Chemical shift perturbations suggested that phosphorylation on Thr38 induces a conformational change involving displacement of the helix A. This structural transition seems to flex one arm of the molecule, thereby exposing new surfaces of the helix A and the nearby phosphorylation loop to form specific interactions with the catalytic site of the phosphatase. The results presented here will give new insights to understand the function of CPI as a phosphorylation-dependent molecular switch.

Acknowledgements This work was supported by the National Institutes of Health NCI Grant CA40042, National Institutes of Health Grant GM56362 NIH (to D.L.B.), a research grant from Takeda Science Foundation (to M. Y.) and Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of the Japan Scientific and Technology Cooperation (JST) (to M.K.).

(JST-CREST/東京都立大学¹、バージニア大学²、北陸先端大⁵)○高田零¹、大木進野^{1,5}、江藤真澄²、清水真人¹、David L. Brautigan²、甲斐荘正恒¹

Solution structure of CPI-17. A phosphorylation-dependent myosin phosphatase inhibitor (2)

(CREST-JST / Tokyo Metro. Univ. ¹, Univ. of Virginia², JAIST⁵)R.Takada¹, S.Ohki^{1,5}, M.Eto², M.Shimizu¹, D.L. Brautigan², and M.Kainosho¹.

CPI-17 is a 17 kDa kinase-C dependent protein phosphatase-1 inhibitory protein. In order to obtain further insights on the structural basis of the molecular switching mechanism associated with the CPI-17 – protein phosphatase-1 complex, we planned to solve the structure of CPI-17 in its “active state” by NMR. To obviate the difficulties involved in preparing significant amounts of the pure phosphorylated “active state” CPI-17, we prepared a T38D mutant in which the Thr at the phosphorylation site was replaced with aspartic acid. Although the T38D mutant exhibited weak inhibitory activity, but a ¹H-¹⁵N HSQC spectrum was very similar to the (partially purified) phosphorylated CPI-17, and is thus a reasonable structure model of the active form of native CPI-17. Detailed structural comparisons will be made between native CPI-17 (inactive form) and T38D mutant (active form).

CPI-17 はアミノ酸 147 残基、分子量 17kDa を持つリン酸化依存性の protein phosphatase-1 (PP-1)、或はミオシンフォスファターゼ (MP) の阻害蛋白質である。CPI-17 の 38 番目の Thr 残基がリン酸化されることにより活性化され、標的酵素と結合しそれらの活性を失わせる。本研究の目的は、リン酸化に伴う構造変化を通して CPI-17-フォスファターゼ複合体における分子スイッチの機構を解明することである。しかしながら、阻害活性を持つ Thr38 を特異的にリン酸化した CPI-17 を NMR 測定に十分な量、単離・精製するのは困難であった。

構造、CPI-17、リン酸化、阻害、ミオシンフォスファターゼ

たかだれい、おおきしんや、えとうますみ、しみずまさと、デービッドブローティガン、かいのしょうまさつね

一般にリン酸化タンパク質ではリン酸化部位の Thr を Asp や Glu に組み換えた変異体は側鎖のサイズや電荷状態からリン酸化蛋白質と類似した構造・機能を示すことが知られている。本研究では Asp に組み換えた変異体 (T38D) を用いることにした。この変異体は弱いながらスファターゼ阻害活性を持つことが確かめられている。また 147 残基のうち、N 末端 (1-22) と C 末端 (120-147) は CPI-17 単独では揺らいでおり、一定の高次構造を持たない。この部分はフォスファターゼ阻害機能に関係していないことが deletion mutant を用いた実験からわかっているため、22 から 120 残基までペプチド鎖部分のみを発現させ、それらの立体構造解析を行うこととした。

[実験・結果] 大腸菌を用いた大量発現系により ^{15}N -、 ^{15}N , ^{13}C -の標識した His-tag 付き T38D 変異体を発現させ、Ni カラム、酵素による tag 切断、ついでアフィニティーカラムを用いて単離・精製した。これらの標識蛋白質をリン酸緩衝液 (50mM)、KCl(100mM)、DDT(1mM)、pH6.8 の条件下で濃度 1 mM 程度の (重) 水溶液としてシゲミ管に注入し、Bruker DMX500, DRX600 及び DRX800 により NMR 測定を行った。通常のプロトコルに従い、主鎖及び側鎖の帰属を行い、それをもとに NOESY スペクトルから ^1H 間距離情報を集積した。さらに水素結合情報、二面角情報、非等方溶液中の測定により得た残余双極子結合定数を合わせ、X-PLOR により立体構造計算を行った。同様の手法で WT CPI-17 の構造も精密化し、両者を比較した。

T38D 変異体の二次構造は WT とほぼ変わらず、4 本の α ヘリックス (N 末端側から A、B、C、及び D とした) から成り、活性中心である 38 番目の Asp 残基は N 末端とヘリックス A との間の長いループ領域にある。WT と T38D 変異体を比較すると、WT では分子の内側に入っているこのループが溶媒に露出していることが明らかになった。また A、B 両ヘリックスの相対的位置が大きく変化し、“ループ”部分を押し出すような位置に動くことで、外に出た“ループ”が戻らないようになっていた。これに対して C、D ヘリックスは WT と T38D 変異体との間で良く重なり、これらの 2 つのヘリックスを含む部分が分子の“土台”を形成していることが明らかになった。これらの立体構造比較から判明した構造変化部位は、先に我々が明らかにした化学シフト変化部位と良く一致している[JMB,314, 839-849(2001)]。

この構造変化に伴って表面電荷分布も大きく変化することが明らかになったが、詳細に関してはポスターで発表する。

Selective protonation of aromatic rings of Phe, Tyr and Trp using shikimic acid, for the improved global fold determination of larger proteins.

理化学研究所¹、横浜市立大学大学院総合理学研究科²、CREST/JST³

○Sundaresan Rajesh^{1,2}, 柴田武彦^{1,2,3}, 伊藤 隆^{1,2,3}

Selective protonation of aromatic rings of Phe, Tyr and Trp using shikimic acid, for the improved global fold determination of larger proteins.

○Sundaresan Rajesh,^{1,2} Takehiko Shibata^{1,2,3} and Yutaka Ito^{1,2,3}

¹Laboratory of Cellular & Molecular Biology, RIKEN

²Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University

³CREST/JST

ABSTRACT

We had recently reported a novel inexpensive method to selectively protonate aromatic rings of Phe and Tyr and Trp using shikimic acid in proteins expressed in a completely ²H, ¹⁵N background. This aromatic ring selective protonation was combined with methyl selective protonation and has been utilised to determine the global fold of the 26.5 kDa YUH1 protein using limited NOEs, with high accuracy. Further the improved efficiency of the aromatic selective protonation using mutants and auxotrophic strains of E.coli, blocked in endogenous shikimate synthesis will be discussed.

INTRODUCTION

NMR studies on proteins with >250 amino acids require perdeuteration to improve the spectral overlap and to decrease the rapid ¹H and ¹³C transverse relaxation. Selective protonation of methyl groups of residues together with residual dipolar couplings, to overcome the limitations posed by perdeuteration, was shown to be sufficient for determining the global fold of a 42 kDa protein in a low NOE density approach. However, the methyl protonation approach strongly depends on the second structure of the protein and fails to yield accurate structures for helical proteins, even in the presence of residual dipolar couplings. Inclusion of distance information involving aromatic amino acids improved the accuracy of structures calculated using limited NOEs. We had introduced an elegant and inexpensive method to selectively protonate aromatic rings of amino acids (Phe, Tyr, Trp) while retaining complete deuteration at the α - and β - carbons atoms. We have combined this approach with methyl selective protonation to calculate the global folds of high molecular weight proteins with increased accuracy and precision.

EXPERIMENTAL METHODS

To prepare 99% ²H, ¹⁵N labelled Ub, in which the aromatic side chains of Phe and Tyr were protonated, the bacterial cells [*E.coli* BL21 (DE3)] expressing Ub were grown at 37°C on a M9 medium containing ²H-glucose, ¹⁵N-NH₄Cl and 99.99% D₂O. The aromatic amino acid precursor shikimic acid (completely ¹H/¹²C), was added to multiple sets of bacterial cultures at various time points prior to induction with IPTG. Completely deuterated

Selective protonation, aromatic amino acids, deuteration, global folds.

Rajesh S., しばた たけひこ, いたう ゆたか

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -YUH1 with methyl selective ILV protonation through $[3\text{-}^2\text{H}]/^{13}\text{C}$ α -ketoisovalerate and $[2,3\text{-}^2\text{H}_2]/^{13}\text{C}$ -Val, together with aromatic ring-selective protonation through $^{12}\text{C}/^1\text{H}$ shikimate was also prepared. NOESY spectra aimed at extracting aromatic-methyl, aromatic-NH, methyl-methyl, methyl-NH, NH-NH NOE based distance restraints were collected at 30°C on a Bruker DRX600 spectrometer on the above aromatic-methyl protonated sample. Structure calculations using only unambiguous NOE restraints from the aromatic-methyl protonated YUH1 sample were performed using CNS-based protocols.

RESULTS AND DISCUSSION:

Aromatic ring-selective protonation at ϵ , δ and ζ of Phe, ϵ and δ of Tyr, and $\zeta 3$, $\eta 2$, $\epsilon 3$ and $\zeta 2$ of Trp derived from exogenously added shikimic acid, a metabolic precursor of aromatic amino acids and vitamins in microbes and higher plants, was achieved (Fig. 1A). The labeling efficiency of shikimate, tested using the $^2\text{H}/(\text{aro}^1\text{H})/^{15}\text{N}$ -Ub, was improved with the co-expression of a membrane-bound shikimate transporter from a low-copy plamid. Protonated aromatic amino acids can be used in combination with methyl-protonation, as together with aliphatic amino acids they are predominant in the hydrophobic protein core. Further, divergent biosynthetic pathways for aliphatic and aromatic amino acids promises a successful labeling combination, without scrambling of labels from added precursors. A methyl-aromatic selectively protonated YUH1 sample using metabolic precursors of aliphatic and aromatic amino acids in a $u\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ background (aromatic rings are ^{12}C) was prepared. Complete assignment of methyl protons (no signal overlap as seen in Fig. 1B), with nearly complete assignment of aromatic side chains permitted the unambiguous assignment of NOEs involving methyl and aromatic side chains. The global fold of YUH1 using only unambiguous methyl-methyl, methyl-NH, aromatic-methyl, aromatic-NH and NH-NH NOEs, and dihedral angles from CSI values, together with long-range scalar hydrogen bonds ($^3J_{\text{NC}}$) was calculated. The r.m.s.d for backbone heavy atoms from 10 best low-energy structures was 2.63 Å when averaged for all residues and 1.0 Å when averaged over the beta-sheet residues. The presence of aromatic based distance restraints yielded more accurate structures than those calculated with methyl and amide based restraints alone. The applicability of this method to reverse label aromatic rings in $u\text{-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ proteins was improved using a shikimate auxotrophic *E.coli* mutant.

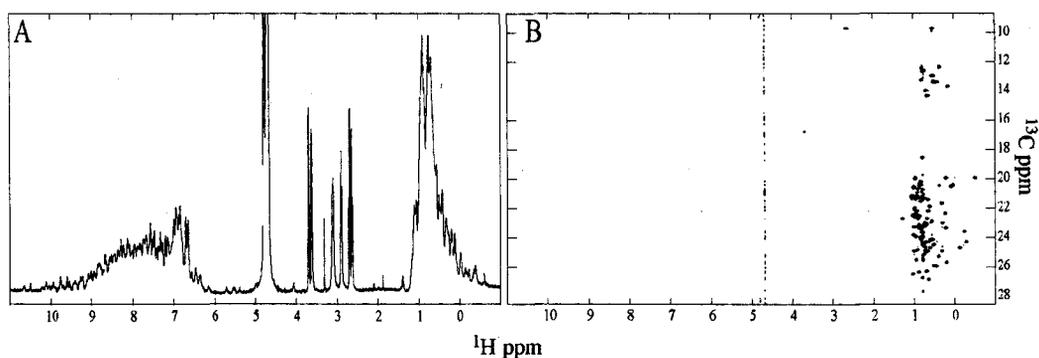


Figure 1: Methyl-aromatic selectively protonated YUH1 sample in a $u\text{-}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ background. A) 1D ^1H spectrum indicating specific protonation of amide, aromatic and methyl resonances. B) 2D ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of ILV ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$)-FYW (aromatic ring- $^1\text{H}/^{12}\text{C}$)-YUH1.

Interactions between Wheat-germ Agglutinin and GlcNAc β 1,6Gal sugar
 (Biological Information Research Center, AIST)

Kenji Kanazawa, Tadashi Nemoto, Hiroshi Nakanishi, Michiro Muraki

In order to clarify the interactions between wheat-germ agglutinin (WGA) and GlcNAc- β 1,6Gal sugar in aqueous solution we measured Transferred NOE spectra of WGA/GlcNAc- β 1,6Gal mixture in phosphate buffer solution (pH7). We observed some intermolecular Transferred NOE cross-peaks among WGA and sugar protons. The Transferred NOE data show that WGA interacts with non-reducing and reducing end of GlcNAc β 1,6Gal in aqueous solution. It was found that 1H of Galactose residue of GlcNAc β 1,6Gal is in close proximity to methyl group of GlcNAc residue in WGA/GlcNAc β 1,6Gal complex.

1. はじめに

細胞表面におけるレクチンと糖鎖との相互作用は、細胞の成長や分化、免疫応答などの生物学的なプロセスにおいて重要な役割を果たすことが明らかになってきている。小麦胚芽レクチン (WGA) はいくつかのタイプの細胞表面リセプター-糖蛋白質と特異的な相互作用をすることが知られている。N-acetyl-D-glucosaminyl- β (1 \rightarrow 6)-D-galactopyranose (GlcNAc β 1,6Gal) は I 血液型抗原である β 1,6-branched ploy-N-acetyl-lactosaminoglycan 構造の特徴的な構成糖鎖であり、WGA との相互作用の解明は興味深い。本報告では、WGA isolectin と GlcNAc β 1,6Gal との混合溶液の NMR スペクトルを測定し、溶液中における WGA と GlcNAc β 1,6Gal との相互作用について検討した結果について発表する。

2. 実験

NMR 測定試料として、WGA isolectin 1、2 及び 3 と GlcNAc β 1,6Gal を用いた。WGA isolectin 及び GlcNAc β 1,6Gal をリン酸バッファー溶液 (pH7.0) に溶解し、NMR スペクトルを測定した。NMR スペクトルの測定は Varian UNITY INOVA 600MHz で行った。

3. 結果

溶液中での WGA と GlcNAc β 1,6Gal との相互作用を解析するため、WGA isolectin/GlcNAc β 1,6Gal 混合溶液の 2D Transferred NOE スペクトルを測定した。Fig.2 に示すように WGA isolectin/GlcNAc β 1,6Gal 混合溶液の Transferred NOE スペクトルにおいて、GlcNAc β 1,6Gal の還元末端残基の 3 位プロトン及び非還元末端残基の 2 位プロトンと WGA isolectin の異なる芳香族アミノ酸残基との間にそれぞれ分子間 Transferred NOE ピークが認められた。この結果は WGA が GlcNAc β 1,6Gal の還元末端残基と非還元末端残基の両方を認識していることを示している。また、WGA isolectin/GlcNAc β 1,6Gal コンプレックス中では、GlcNAc β 1,6Gal が Galactose の 1 位のプロトンと GlcNAc のアセチル基のメチルプロトンとが距離的に近い構造を取ることが明らかになった。

レクチン、糖鎖、相互作用、Transferred NOE

かなざわけんじ、ねもとただし、なかにしひろし、むらきみちろう

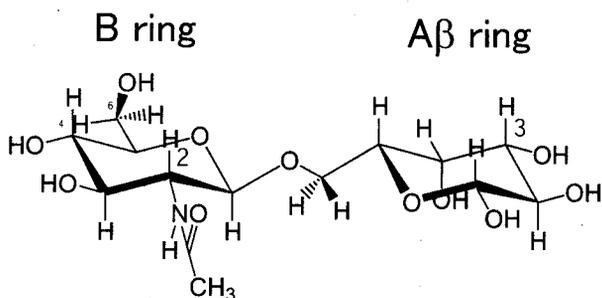


Fig. 1 Structure of GlcNAc β 1,6Gal β isomer

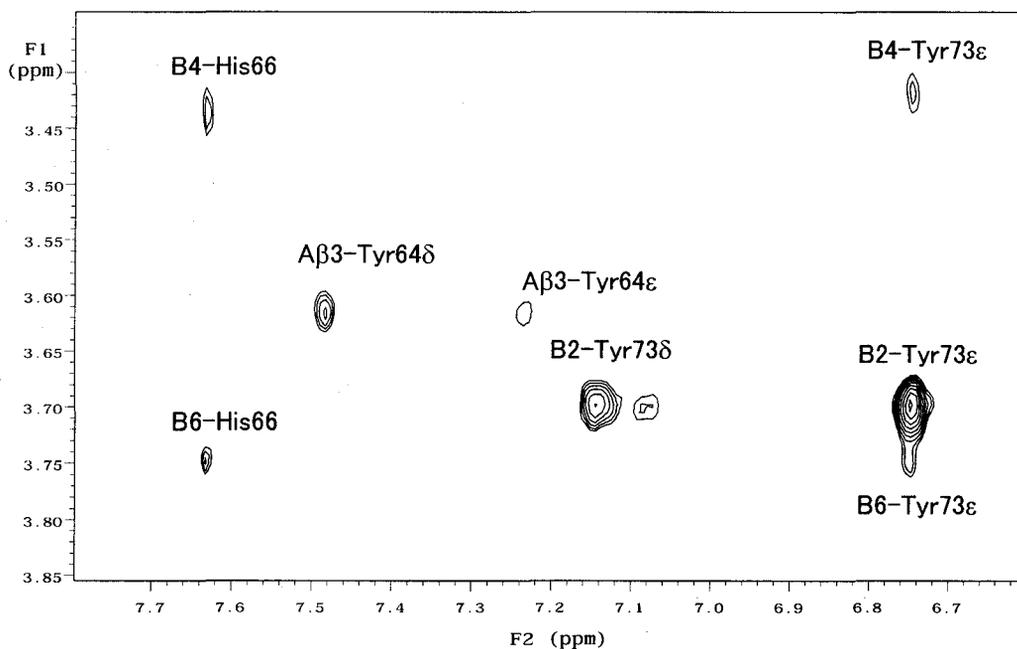


Fig. 2 Transferred NOE Spectrum of WGA isolectin 3/
GlcNAc β 1,6Gal Mixture in Phosphate Buffer Solution
(pH7, 100% D₂O), mixing time: 0.24 s

(¹産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター, ²東京大学大学院薬学系研究科,
³(社)バイオ産業情報化コンソーシアム・生物情報解析研究センター,
⁴大阪大学蛋白質研究所)

○高橋 栄夫¹, 宮沢 真由美², 伊奈 康夫³, 福西 快文¹, 中村 春木^{1,4},
 嶋田 一夫^{1,2}

Utilization of side chain resonances in cross-saturation experiments

¹Biological Information Research Center (BIRC), AIST,

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,

³Japan Biological Information Research Center (JBIRC), JBIC,

⁴Institute for Protein Research, Osaka University

○Hideo Takahashi¹, Mayumi Miyazawa², Yasuo Ina³, Yoshifumi Fukunishi¹, Haruki Nakamura^{1,4},
 and Ichio Shimada^{1,2}

It has been shown that cross-saturation method enables us to identify the contact residues of a large protein complexes ($M_w > 50K$) more rigorously than the conventional NMR approaches. For successful applications of cross-saturation experiment to a large molecular weight complex, the high level of deuteration for ligand proteins is required, resulting in effective suppression of spin diffusion in ligand proteins. To attain this requirement, the solvent with a low concentration of H_2O is used in the cross saturation experiment. However, this experimental condition causes the sensitivity loss of the measurement. Furthermore, cross-saturation effect is detected by main chain amide protons, which are not generally exposed on the molecular interface but are buried at diverse times. Therefore, the amide resonance would not be quite suitable with respect to an efficiency of saturation transfer from target molecule to ligand molecule.

Here we report an alternative cross-saturation method, which utilizes methyl protons of side chains of ligand protein. The method was applied to the B-domain of Protein A (FB), of which methyl groups were selectively protonated, complexed with mouse intact IgG1 (M_w 164K). Efficient cross-saturation phenomenon was observed for the methyl containing residues, which are located at the interface of the complex and the sensitivity of this experiment was exceedingly high compared with the previous experiments. Distinctive features of methyl protons in cross-saturation experiment also will be discussed.

《序》

交差飽和(Cross-saturation experiment)法は、高分子量蛋白質複合体($M_w > 50K$)の相互作用界面に存在するアミノ酸残基を、従来法(化学シフト摂動法や H-D 交換法など)に比較し高精度に決定する方法として開発された¹。さらに、より高分子量の蛋白質複合体($M_w > 150K$)に対し適用するために、交換系を利用した転移交差飽和(Transferred Cross-saturation)法へと拡張されている²。本法は高分子量蛋白質複合体におけるスピン拡散を抑制するために、リガンド蛋白質を高度に重水素化することがポイントとなる。そのためには、蛋白質の完全重水素化のみならず、溶媒の軽水/重水比を小さくすることが有効であることが明らかと

蛋白質複合体, 交差飽和, メチル基

たかはし ひでお, みやざわ まゆみ, いな やすお, ふくにし よしふみ, なかむら はるき, しまだ いちお

なっている。しかしながら、これはアミドプロトン検出における、測定感度の低下を引き起こすことにもなる。また、高い重水率の溶媒条件ではアミドプロトンの T_1 がより長くなり、繰り返し遅延時間を長くとる必要が出てくることから、測定時間は長くなる傾向がある。

一方、一般に蛋白質複合体においてその相互作用に直接寄与するのは、側鎖原子であることが多い。この場合、主鎖アミドプロトンは相互作用の界面からはやや離れた(4~7 Å)距離に存在することになる。このため、アミドプロトン検出による交差飽和法の場合、標的蛋白質からの飽和移動の効率はそれほど高いとはいえない。

本研究では、側鎖メチルプロトンを利用することで、交差飽和法におけるこれらの問題点を克服することを試みた。メチルシグナルはプロトン3個分のシグナル強度を有するうえ、その速い回転運動のため先鋭化しており、高分子量蛋白質の場合でもスペクトルにおける分離は比較的良いことが知られている⁴。また、メチル基の特微的な緩和特性が、交差飽和現象にどのような影響を及ぼすかは興味深い点でもある。側鎖メチルプロトンを利用した交差飽和法の有効性について、理論・実験の両側面から検証する。

《方法と結果》

1. 蛋白質複合体データ解析によるメチル基プローブの妥当性

Lo Conte らによる蛋白質-蛋白質複合体立体構造データベース³において、メチル基が結合界面に存在する頻度を算出した。その結果、メチルプロトンが結合界面付近に存在する頻度は、主鎖アミドプロトンに比較して同等かもしくは高いと結論づけられた。このことから、メチル基を蛋白質複合体の相互作用部位を同定するプローブとして用いることは妥当であると考えた。

2. 交差飽和現象におけるメチルプロトンの特殊性(シミュレーション)

交差飽和法は、緩和行列を用いた解析を行うことでシミュレーションすることが可能である。高分子量蛋白質複合体の場合、近傍に存在するプロトン対はスピン拡散の影響により、短時間に飽和が伝播してしまい、交差飽和実験における結合界面残基の同定に曖昧さを生じることになる。一方、メチル基は通常速い回転運動を行っているため、メチルプロトンは、分子の相関時間とは独立に比較的速く T_1 緩和することが知られている。そこで、交差飽和実験におけるスピン拡散効果に対し、メチルプロトンがどのように寄与するかを明らかにするために、モデル系によるシミュレーションを行った。

はじめに、モデル系(Fig.1)において、メチル基が固

定されている条件で、シミュレーションを行ったのが Fig.2(left)である。高分子量複合体を仮定した(回転相関時間 60ns=約 150K 複合体)シミュレーションの場合、メチル(1)とメチル(2)は飽和されたプロトンからの距離が異なるにも関わらず、0.5 sec を超える飽和時間においては、その飽和因子は、ほぼ同じ値を示すようになり、最終的には両プロトンとも完全に飽和された状態(飽和因子-1.0)になる。この結果は、高分子量蛋白質に

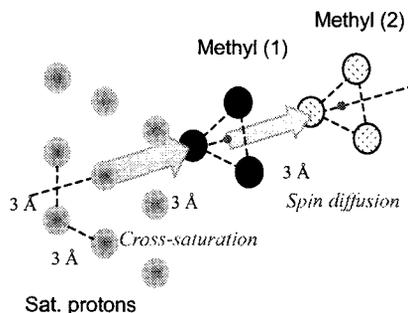


Fig.1 : Proton arrangement for simulations. Saturated protons consist of 9 protons. Each proton is separated by 3 Å apart. Methyl(1) protons are 3 Å apart from saturated protons and Methyl(2) protons are further 3 Å apart from Methyl(1) protons.

おけるスピン拡散の影響を示しており、飽和原子からの距離情報は得るためには、注意深く飽和時間を選ぶ必要がある。

これに対し、メチル基の速い回転運動(局所相関時間 50ps を仮定)が存在する、通常の条件でシミュレーションを行ったのが Fig.2(right)である。メチルプロトンの速い T_1 緩和のために、飽和因子の値が抑制されることになるが、ある程度(この場合 0.5 sec 程度)の照射

時間ですら定常状態を示す。しかも、その定常状態の飽和因子は、メチル基を固定した場合と異なり、飽和プロトンからの距離に従った値を示し、低分子の定常状態 NOE 実験のような挙動を示す。すなわちメチルプロトンは高分子量蛋白質複合体中においても、スピン拡散の影響を大きく受けるわけではないとすることができる。この結果から、メチルプロトン検出交差飽和実験では、従来のアミドプロトン検出交差飽和実験のような検出プロトンのプロトン密度を下げる必要がなく、交差飽和法において十分な検出感度を得ることが期待できる。

3. 交差飽和実験

試料としては、リガンド蛋白質:黄色ブドウ球菌外膜蛋白質プロテイン A の Bドメイン (FB) と標的蛋白質:マウスモノクローナル抗体(サブクラス γ 1: mIgG1) の相互作用系(複合体分子量 164K 程度)を用いた。メチルプロトンのみを残し、他の部位を重水素化した FB を調製するために、Kay のグループにより提案されている方法を利用した⁵。調製した FB を重水素溶媒中で測定したのが Fig.3 上段のスペクトルである。メチルプロトン (Ile[δ], Leu[δ], Val は FB に存在しない)のみが選択的に観測されている。特に CH_3 体のみが観測され、他

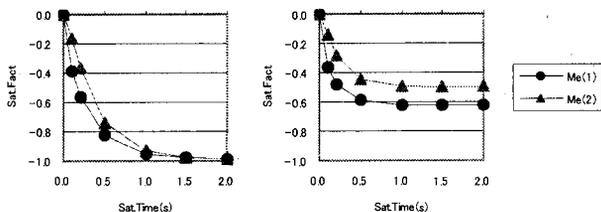


Fig.2 : Results of simulations. Calculated irradiation time dependence of saturation factors for the simulations of cross-saturation experiments. Methyl groups are assumed to be fixed (left), or rotated with local correlation time of 50 ps (right). Rotational correlation time and observed frequency of the model system are assumed to be 60 ns and 600 MHz, respectively.

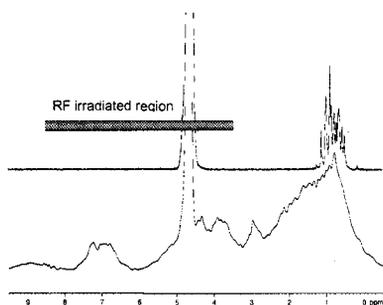


Fig.3 : Comparison of one-dimensional 1H -NMR spectra between [$^2H(^1H,^{13}C\text{-methyl})$]FB (upper) and mouse IgG1 (lower) at 298K. The samples were dissolved in 2H_2O , 10 mM sodium phosphate buffer (pH6.0), 200 mM NaCl.

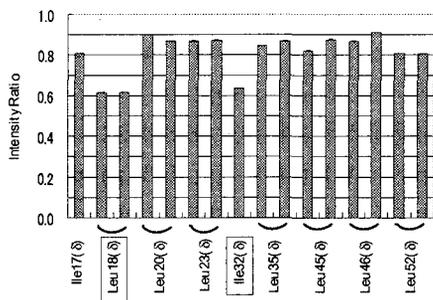


Fig.4 : Intensity ratio vs residue for methyl group of FB. The intensity ratios of the crosspeaks originating from the methyl groups with irradiation to those without irradiation. Irradiation time was 0.25 sec.

の isotopomer は存在しなかった。

本相互作用系は結合定数が 10^4 [M⁻¹] オーダーの速い交換系であるため、FB-mIgG1 の比を 5:1 とした転移交差飽和法を適用した。交差飽和実験における照射 (WURST-2) 領域は 3.5ppm~8.5ppm 付近とし、試料を重水緩衝液により調製することで標的蛋白質 (mIgG1) のみの照射が可能となった (Fig.3)。250 ミリ秒の照射時間を用いた交差飽和実験の結果を Fig.4 に示す。

250 ミリ秒の短い照射時間でも、相互作用界面に存在するメチルプロトン (Leu18[δ 1],[δ 2], Ile32[δ 1]) に交差飽和による顕著な強度減少が見られたことから、分子間飽和移動の効率は極めて高いことがわかる。さらに、メチルプロトンの T_1 は平均して 400 ミリ秒程度であることから、短い繰り返し時間で測定を行えることもあり、アミドプロトン検出 (90% 重水条件) の場合に比べ、圧倒的に検出感度は高い。

《結論》

メチルプロトンは、その緩和特性から、交差飽和法におけるスピン拡散効果を軽減することが明らかとなった。実際に、ILV 標識体を調製し交差飽和実験を行う事で、メチルプロトンを利用した交差飽和実験は極めて高感度でかつ高効率であることが示された。特に高分子量蛋白質において、メチルプロトン検出は、TROSY を利用したアミドプロトン検出以上に感度が良いことが知られていることから⁴、本法は高分子量蛋白質複合体の相互作用残基の決定において極めて有効な方法になると考えられる。

1. Takahashi, H., Nakanishi, T., Kami, K., Arata, Y. and Shimada, I., *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 220-223 (2000)
2. Nakanishi, T., Miyazawa, M., Sakakura, M., Terasawa, H., Takahashi, H. and Shimada, I. *J. Mol. Biol.*, **318**, 245-249 (2002)
3. Lo Conte, L., Chothia, C. and Janin, J. *J. Mol. Biol.*, **285**, 2177-2198 (1999)
4. Hajduk, P. J., Augeri, D. J., Mack, J., Mendoza, R., Yang, J., Betz, S. F. and Fesik, S. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7898-7904 (2000)
5. Goto, N. K., Gardner, K. H., Mueller, G. A., Willis, R. C. and Kay, L. E., *J. Biomol. NMR.* **13**, 369-374 (1999)

アカザラガイ閉殻筋トロポニンIフラグメントを結合した
トロポニンC C 端ドメインの溶液構造解析

(¹東大院・農生科・応生化、²東京慈恵医大・生理学第二、³東大・生物生工セ、
⁴海洋バイオ研・清水研、⁵バリアンテクノロジーズジャパン、⁶北大院・水産科)

○湯本史明^{1,2}、永田宏次³、足立恭子⁴、根本暢明⁵、
尾島孝男⁶、西田清義⁶、大槻磐男²、田之倉優¹

Structural analysis of the C domain of troponin C complexed with troponin I fragment from

Akazara scallop striated muscle in solution

○Fumiaki Yumoto^{1,2}, Koji Nagata³, Kyoko Adachi⁴, Nobuaki Nemoto⁵,
Takao Ojima⁶, Kiyoyoshi Nishita⁶, Iwao Ohtsuki², Masaru Tanokura¹

¹Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
University of Tokyo, Tokyo, ²School of Medicine, Jikei University, Tokyo, ³Biotechnology Research
Center, University of Tokyo, Tokyo, ⁴Marine Biotechnology Institute, Shimizu, Shizuoka,

⁵Varian Technologies Japan Ltd., Tokyo,

⁶Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Graduate School of Fisheries Science,
Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido

Troponin C (TnC), consisting of four EF-hand motifs (Sites I-IV), is responsible for Ca^{2+} -regulated contraction of striated muscles. Vertebrate striated muscle TnCs are capable of binding four or three Ca^{2+} , while Akazara scallop (*Chlamys nipponensis akazara*) TnC binds only one Ca^{2+} at its C-terminal EF hand motif (at Site IV), because all the other EF-hand motifs (Sites I-III) lack critical residues for the coordination of Ca^{2+} . We are conducting the analysis of Ca^{2+} -dependent structural changes and functional regulation of Akazara TnC, especially using NMR on TnC C-domain complexed with TnI fragment. The solution structure determined shows that TnC C-domain contains four α -helices and two short β -strands. This structure has an open conformation and hence the signal triggering muscle contraction is likely to exist in C-domain of Akazara scallop striated adductor muscle TnC.

Ca^{2+} 結合タンパク質、トロポニンC、トロポニンIフラグメント、溶液構造

ゆもとふみあき、ながたこうじ、あだちきょうこ、ねもとのぶあき、

おじまたかお、にしたきよよし、おおつきいわお、たのくらまさる

序論 トロポニン C (TnC) は、横紋筋の収縮を制御する Ca^{2+} 結合タンパク質である。脊椎動物骨格筋の速筋や遅筋、あるいは心筋に由来する TnC は、4 つの EF ハンドモチーフから構成され、1 分子あたり Ca^{2+} を 4 つあるいは 3 つ結合する。骨格筋速筋では N 端側の 2 つ、骨格筋遅筋および心筋では N 端側から 2 番目の EF ハンドモチーフに 1 つの Ca^{2+} が結合することで、機能制御が行われている。一方、ホタテガイの一種であるアカザラガイの閉殻筋で見出される TnC は、 Ca^{2+} をサイト IV において 1 つしか結合しない。したがって、アカザラガイ TnC においては、 Ca^{2+} 依存的な制御機構は C 端ドメインに存在することになり、脊椎動物骨格筋や心筋とは異なって C 端側からの機能制御機構が存在すると考えられる。そこで、アカザラガイ TnC の Ca^{2+} による構造変化と機能制御機構を明らかにするため、我々はアカザラガイ TnC の制御ドメインである C 端ドメインについて NMR による溶液構造解析を行った。TnC 全長、および C 端ドメインは、いずれも会合しやすい性質であったが、トロポニン I (TnI) の TnC C 端ドメイン結合領域 (TnI₁₂₉₋₁₈₃) との複合体形成により自己会合が抑制され、NMR 構造の解析が可能となった。

方法 それぞれ単独に発現・精製を行った $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 TnC C ドメインと非標識 TnI₁₂₉₋₁₈₃ をモル比 1:1.2 の混合し、ゲルろ過により複合体サンプルを得て、濃縮することにより NMR サンプルを得た。多核多次元 NMR スペクトル (^{15}N - ^1H HSQC, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, (HCA)CO(CA)NH, HNCO, C(CO)NH, H(CCO)NH, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY) の測定は Varian INOVA 750 を用いて行い、これらのスペクトルデータを基に、NMRPipe および Sparky を用いて NMR シグナルの帰属を完了した。 ^{15}N -edited NOESY, ^{13}C -edited NOESY および HNHA 実験から得られた距離および角度情報と TALOS による角度情報を基に DYANA による構造計算を行った。

結果・議論 TnI₁₂₉₋₁₈₃ との複合体において、アカザラガイ TnC C 端ドメインは、4 本の α ヘリックスと 2 本の短い β ストランドをもち、これらの β ストランドは逆平行 β シートを形成していた。溶液構造は EF ハンド型タンパク質としては、開いたコンフォメーションをとっており、脊椎動物骨格筋や心筋 TnC の N 端ドメインにおいて提唱されているように、アカザラガイ TnC においても C 端ドメインにおける Ca^{2+} 依存的なコンフォメーション変化による筋収縮制御機構の存在の可能性が考えられる。本発表では、アカザラガイ TnC C 端ドメインの構造機能相関について議論し、また、これまでに構造解析が行われている脊椎動物骨格筋速筋および心筋 TnC C 端ドメインとの構造比較を行い、それらの類似性および相違について議論したい。

(北大院理¹、岩手大農²)○川口恭輔¹、安嬰²、鈴木幸一²、熊木康裕¹、出村誠¹、新田勝利¹**Structural characterization of the paralytic peptide of wild Silkmoth*****Antheraea yamamai* by NMR**Kyosuke Kawaguchi¹, Ying An², Koichi Suzuki², Yasuhiro Kumaki¹, Makoto Demura¹,
Katsutoshi Nitta¹(Graduate School of Science, Hokkaido University¹,
Faculty of Agriculture, Iwate University²)

Recently a novel member of the paralytic peptide consisting of 23 amino acid residues has been identified in the silkmoth *Antheraea yamamai*. In this study, the solution structure of this paralytic peptide (AnyParP) was determined by two-dimensional ¹H NMR spectroscopy with the aid of distance geometry and simulated annealing to understand structural-functional relationships of this peptide. AnyParP has an ordered structure, which is composed of a short antiparallel β -sheet, β -turns, β -hairpin and disulphide bridge at residues Cys⁷-Thr²² while the six residues in the N terminus is disordered. Conformational similarity and differences of AnyParP with the ENF families were discussed.

(序論)

野蚕の一種である天蚕(*Antheraea yamamai*)の麻痺ペプチド(AnyParP)は、天蚕の5齢幼虫の体液抽出物から単離された、1組のジスルフィド結合を有する、アミノ酸23残基からなる活性因子である。このペプチドは鱗翅目の Paralytic Peptide、Plasmatocyte-spreading Peptide、Growth-Blocking-Peptide と高い相同性を示し、N末端側の保存性の高いアミノ酸配列を取って ENF ファミリーペプチドと呼ばれる。ENF ファミリーは、25残基前後の短いペプチドでありながら、幼虫に対する麻痺活性、拍動の制御のほか、血球細胞活性化活性、細胞増殖活性などの細胞レベルでの活性も有することから、多機能のサイトカインと考えられている。AnyParP は天蚕由来にもかかわらず、カイコ(*Bombyx mori*)に対して麻痺活性、休眠活性を発現すること、またカイコ個体に対する休眠活性では、AnyParP と他の Paralytic Peptide とで休眠活性も異なることが明らかになっている。そこで本実験では、AnyParP の立体構造を NMR 法により決定し、ENF ファミリーとしての構造特性を明らかにすることを目的とした。

(実験)

AnyParP サンプルは Boc 法による固相合成によって作製した。NMR 測定用試料は以下の条件(3mM ペプチド、90% H_2O / 10% D_2O 、pH4.4)に調製した。¹H NMR 測定は Bruker DRX-600、Jeol alpha 600 NMR 測定装置を用い、TOCSY(mixing time: 80 msec)、

キーワード：paralytic peptide、蚕、昆虫、麻痺性ペプチド、溶液 NMR

まなえ：○かわぐちきょうすけ、Ying An、すずきこういち、くまきやすひろ、
でむらまこと、にったかつとし

NOESY(mixing time: 150、300 msec)、DQF-COSY、ECOSYの測定を、測定温度 20℃で行った。NMR 信号の帰属は連鎖帰属を用いて行った。

水素結合の確認は、AnyParP サンプルを D₂O 溶媒に溶かし、4 時間後まで保存されているアミドプロトン共鳴シグナルを水素結合供与対とし、水素結合受容体については NOE 情報などから得られた 2 次構造をもとに予測した。AnyParP の立体構造計算は NOE 制限、二面角制限、水素結合制限を用いて行った。NMR データの解析には NMRpipe 及び XEASY を用い、Unix ワークステーション上で行った。

(結果・考察)

AnyParP の NMR 信号については、N 末端アミノ酸以外の構造計算に必要な全残基の ¹H 信号の帰属を完了した。構造計算に必要な距離および角度制限として mixing time 150 msec で測定した NOESY スペクトルの NOE 相関ピークから 166 個の距離情報、また DQF-COSY および ECOSY スペクトルからは 14 個の Φ 角度情報 (³J_{HNH α}) を得た。重水素交換実験からは 6 個のアミドプロトンが水素結合により十分保護されていることがわかった。これらの構造制限に基づいて、X-PLOR ver.3.851 で構造計算を行った。50 個計算したもののうち、violation が無くポテンシャルエネルギーの低い 25 個の収束した立体構造を得た (Fig.1)。構造計算の収束の度合いを示す主鎖原子のコア領域 (Cys⁷-Thr²²) での RMSD は 0.20±0.06 Å であった。AnyParP の立体構造は他の Paralytic Peptide 同様、ディスオーダーな N 末端(残基 1-6)と、Cys⁷-Cys¹⁹ 間のジスルフィド結合によって安定化されているコア(残基 7-22)領域からなる。コア領域では 4 残基からなる 2 つのストランドがターン構造をはさんで逆平行 β シートを形成する。

Fig.1 の結果では、ジスルフィド結合部分の Cys⁷、Cys¹⁹ の側鎖 χ^1 angle がそれぞれほぼ -60 度に収束していた。これは、独立に求められた ECOSY 測定から各残基の ³J _{$\alpha\beta 2$} 、³J _{$\alpha\beta 3$} 値と NOE(α , $\beta 2$)、NOE(α , $\beta 3$) および NOE(NH, $\beta 2$)、NOE(NH, $\beta 3$) の各強度から決定される χ^1 angle と一致していた。

これまでに ENF ファミリーに分類されるペプチドの立体構造は *Pseudaletia Separata* 由来 Growth-Blocking Peptide (GBP) (PDB: 1BQF)、*Pseudoplusia includens* 由来 Plasmacyte-spreading Peptide PSP1 (PDB: 1B1V)、*Manduca sexta* 由来 Paralytic Peptide (PDB: 1HRL)、*Bombyx mori* 由来 Paralytic Peptide

が報告されている。本研究で明らかとなった AnyParP の folding は、これまでの ENF ファミリーペプチドと同様に PSP1-like Family に分類されることが分かった。さらにコア領域の残基ごとのコンフォメーションについての詳細は現在検討中である。

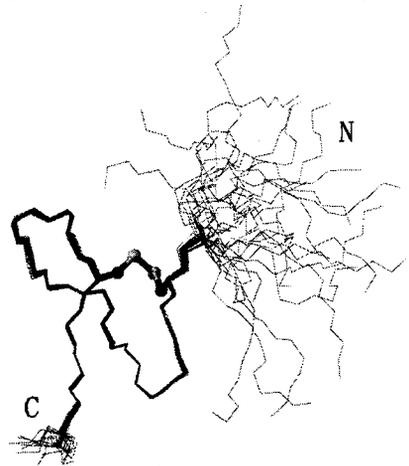


Fig. 1 Superpositions of the backbone of twenty-five NMR derived structures of paralytic peptide (AnyParP) with lowest energy and no violation. Disulfide bond between Cys⁷-Cys¹⁹ is indicated with ball and stick model.

Solution structure of the fibronectin type III domain from *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1

(Yokohama City University¹, GSC RIKEN², NAIST³, Niigata University⁴)

○Jun-Goo Jee^{1,2}, Takahisa Ikegami³, Masayuki Hashimoto⁴, Takeshi Kawabata³,
Mitsunori Ikeguchi¹, Takeshi Watanabe⁴, Masahiro Shirakawa¹

Growing evidence suggests that horizontal gene transfer plays an integral role in the evolution of bacterial genomes. Certain extracellular proteins of soil bacteria contain an unusual cluster of FnIIIDs which exhibits sequence similarity to those of animals. It has been proposed that the bacterial FnIIID had been acquired horizontally from animals. We have used NMR spectroscopy to elucidate the three-dimensional structure of the FnIIID of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. To the best of our knowledge, this is the first tertiary structure to be reported for an FnIIID from a bacterial protein. Striking structural similarities to animal counterpart in the hydrophobic core-forming residues are found. The total lack of surface-exposed aromatic residues displays that the role of this FnIIID is different from those of other bacterial β -sandwich domains which function as carbohydrate-binding modules.

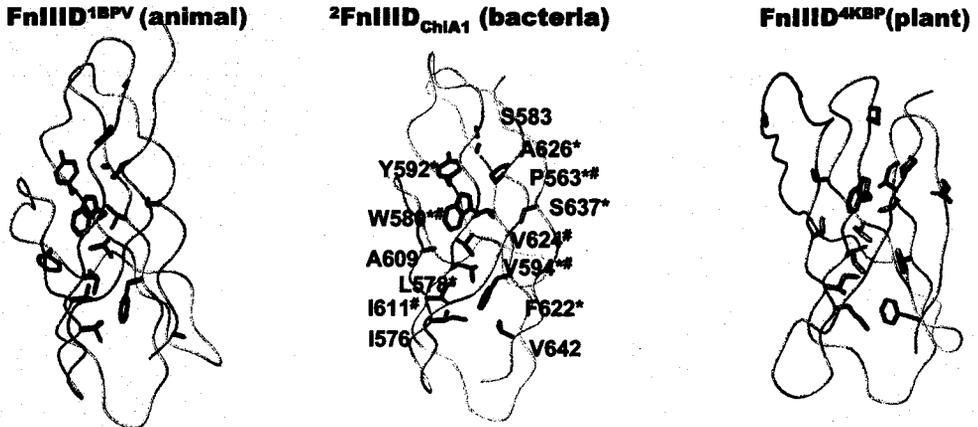
1. NMR structure of ²FnIIID_{ChiA1}



(A) Stereo view of the superposition of the final 30 lowest energy structures (residues Ala-559 to Thr-644) calculated by ARIA. Regular secondary structure regions are shown in dark colors. (B) Ribbon diagram of the lowest energy structure. The β -strands (A, B, C, C', E, F and G (G1 and G2)) are labeled. The average root mean square deviation (r.m.s.d.) values of these structures (Ala-559 to Thr-644) are 0.431 and 0.714 Å for the backbone and all the heavy atoms, respectively.

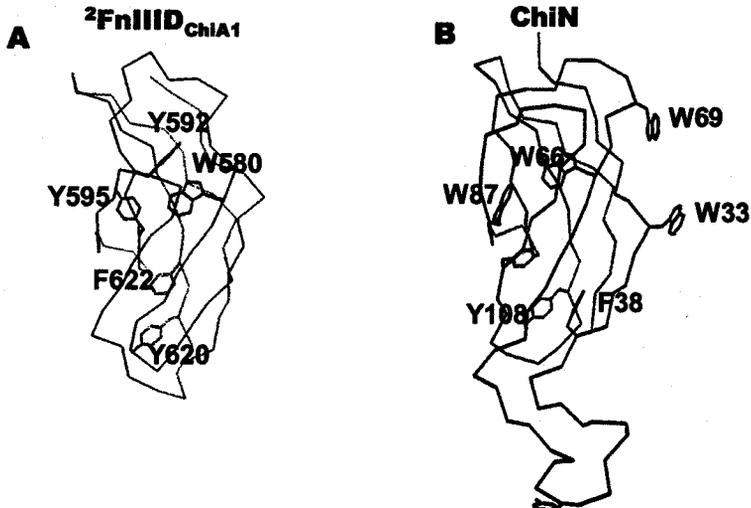
Key words : fibronectin type III domain, horizontal gene transfer, chitinase

2. Similarity of hydrophobic cores between FnlIID^{1BPV} of bacteria and animal



The core-forming residues of ²FnlIID_{ChIA1} and their counterpart residues of FnlIID^{1BPV} (animal) and FnlIID^{4KBP} (plant) are drawn. Among the counterparts, the residues showing similar hydrophobic properties are colored violet (FnlIID^{1BPV}) and green (FnlIID^{4KBP}). The core-forming residues of ²FnlIID_{ChIA1} which are identical in FnlIID^{1BPV} and in FnlIID^{4KBP} are labeled with * and # respectively.

3. ²FnlIID_{ChIA1} does not have surface exposed aromatic rings like other bacterial β-sandwich domains



α traces of ²FnlIID_{ChIA1} (A) and the N-terminal domain of chitinase A from *Serratia marcescens* (ChiN) (B). Aromatic side chains are drawn. Tryptophan residues of ChiN, which are involved in the chitin interaction, are labeled in red. There is no exposed aromatic side chain in ²FnlIID_{ChIA1}.

(味の素(株)ライフサイエンス研究所) ○篠原美奈、榛葉信久、横山敬一、
 柏木立己、石川弘紀、江島大輔、鈴木榮一郎

**Enhancement of transglutaminase activity by NMR identification of its
 flexible residues affecting the active site**

Institute of Life Sciences, Ajinomoto Co., Inc.

○ Mina Shinohara, Nobuhisa Shimba, Kei-ichi Yokoyama, Tatsuki Kashiwagi,
 Kohki Ishikawa, Daisuke Ejima, Ei-ichiro Suzuki

By using NMR, we have shown that the residues exhibiting relatively high flexibility in MTG (microbial transglutaminase) are localized in the N-terminal region; however, the N-terminal region influences the microenvironment of the active site. These results suggest that the N-terminal region is not of primary importance for the global fold, but influences in the substrate binding. Therefore, in order to increase the Tgase activity, the N-terminal residues were chosen as candidates for site-directed replacement and deletion. We obtained several mutants with higher activity, del1-2, del1-3, and S2R. We propose a strategy for enzyme engineering targeted toward flexible regions involved in the enzymatic activity.

【序論】

Transglutaminase (TGase)はタンパク質分子間に Gln-Lys のイソペプチド結合を形成し、タンパク質の重合化を引き起こす。Microbial transglutaminase (MTG)を用いた食品タンパク質分子間の架橋形成は、多くの食品タンパク質の物理的又は構造的な特性を改善するのに有用である。一方我々は、TGaseを用いた¹⁵N標識法、ELT (enzymatic labeling technique)を開発し、ELTとNMRを用いてGln残基に対する基質特異性や反応速度の検出ができることを以前報告した。今回我々は、N末端部の異なる2種の変異体(Met付加体とAsp1削除体)を調製し、NMRやELTを用いてN末端残基の構造的役割を解析した。また、NMRによる動的構造解析に基づいた部位特異変異実験により、野生型MTGよりも活性の向上した変異体を得ることに成功した。

キーワード：酵素活性、部位特異的置換、残基削除、フレキシビリティ、トランスグルタミナーゼ

しのはらみな、しんぼのぶひさ、よこやまけいいち、かしわぎたつき、いしかわこうき、
 えじまだいすけ、すずきえいいちろう

【方法】

大腸菌による大量発現系を用いて、N末端にMetが付加した変異体 (Met-MTG)、N末端のAsp1を削除した変異体 (Ser-MTG) 及びこれらの ^{15}N -Cys 標識体をそれぞれ調製した。また、Quick change Site-Directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いてMet-MTGに部位特異変異を施した各種変異体を調製した。NMR測定はBruker DMX600を用い、CPMGパルス系列による測定及び ^1H - ^{15}N HSQC測定をそれぞれ実施し、MTG分子内のフレキシビリティや基質特異性及び反応速度を解析した。

【結果・考察】

MTGの活性中心であるCys64を ^{15}N 標識したMet-MTGとSer-MTGの ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル及びMet-MTGのCPMGスペクトルより、N末端部位はタンパク質のグローバルフォールドには重要でないが、基質との結合に影響を及ぼすことが判明した。

そこで、N末端部位に部位特異的置換や削除を施した結果、del1-2、del1-3、S2R変異体が野生型MTGよりも高い活性を示した。

また、各種変異体の活性評価結果を含めてN末端の構造的役割を議論する他、基質特異性の異なる2種類以上のTGaseを用いることにより、基質となり得るタンパク質中のGln残基の数を増やせることを紹介する。

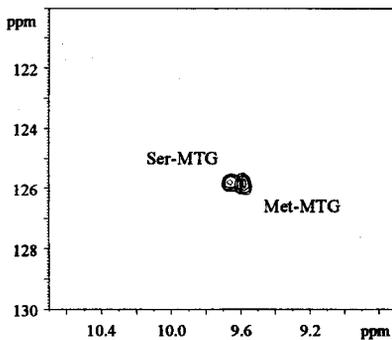


Fig. 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of Met-MTG and Ser-MTG labeled with ^{15}N cysteine. Resonances in both spectra are assigned to Cys64 in Met-MTG and Ser-MTG, respectively.

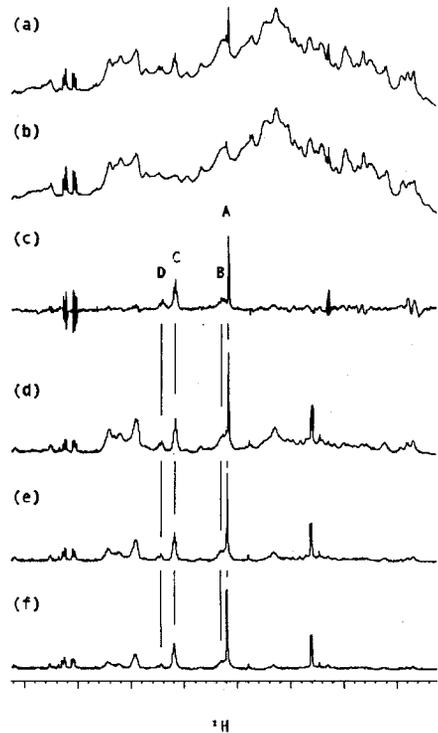


Fig. 2. ^1H NMR spectra of (a) Met-MTG and (b) Ser-MTG, and (c) their difference spectrum. The ^1H spectra of Met-MTG were obtained by using a CPMG pulse sequence with a delay time of (d) 10.5 ms, (e) 21 ms, or (f) 31.5 ms.

P 50 大腸菌転写因子 PhoB の DNA 結合ドメインと DNA の複合体の立体構造解析

¹横浜市立大学総合理学研究科、²大阪大学微生物病研

○岡村英保¹、牧野耕三²、西村善文¹

NMR Structure of a DNA Complex of the PhoB DNA-binding Domain

¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University

²Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Hideyasu Okamura¹, Kozo Makino², Yoshihumi Nishimura¹

PhoB is a transcriptional factor in the bacterial two-component signal transduction system and is activated under phosphate starvation. PhoB consists of 229 amino acids and contains two functional domains: an N-terminal half is a phosphorylation domain and a C-terminal half is a DNA-binding domain (DBD). Here, we have determined the NMR structure of the PhoB-DBD in bound to a specific DNA. In comparison with the structure of the DNA-free form of the PhoB-DBD, the internal hydrophobic cores of both forms were found to be dynamically and structurally different. Recently, the X-ray crystal structure of the dimer of the PhoB-DBD bound to a specific DNA has been reported. We have examined the details of the NMR and the X-ray crystal structures and found some differences between them.

原核生物では多様な外界の刺激に対応するために、刺激を感知するセンサー蛋白質とその情報を受け取り転写因子などとして応答するレギュレーター蛋白質という2種類の蛋白質による情報伝達系が広く存在し、二成分制御系と総称されている。大腸菌では、培地中のリン酸が不足すると、少ないリン酸を有効に利用するために一群の遺伝子群が発現する。PhoB 蛋白質は、これらの遺伝子群の発現を制御するレギュレータータンパク質である。PhoB は分子量 26 kDa で、229 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、N 末端側にリン酸受容ドメイン、C 末端側に DNA 結合ドメインのほぼ大きさの等しい二つのドメインから構成されている。以前に我々が決定した DNA 結合ドメインの立体構造は N 末から 4 本の β ストランドからなる β シート、3 本の α ヘリックスバンドル、C 末の β ヘアピンから成り立っていて、ウイングド・ヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフの一種であると考えられた。3 本のヘリックスのうち、2 本目と 3 本目のヘリックスが DNA 結合蛋白質に特徴的なヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを構成していると考えられるが 2 本のヘリックスの間のターン領域は典型的なもの(4 残基)よりも長いループ(11 残基)となっていた。このループ領域はこれまでの変異体実験から RNA ポリメラーゼと直接相互作用する領域と推定されていた。そこで、我々は PhoB の DNA 結合ドメインと DNA の複合体の形成を試み、その溶液中の立体構造を NMR 多次元多重共鳴法により決定した。

キーワード 蛋白質 立体構造解析 多次元多重共鳴法 DNA 結合ドメイン 複合体

著者ふりがな おかむらひでやす、まきのこうぞう、にしむらよしふみ

PhoB の DNA 結合ドメインは残基番号 126-229 の 104 残基を用いて、DNA は 16 塩基対 5'-ACTGTCATAAATCTGT-3'を用いた。得られた複合体の立体構造(Fig.1)は PhoB の DNA 結合ドメインと DNA が 1:1 の複合体で、PhoB の 3 本の α -ヘリックスバンドルのうち、3 本目のヘリックスの N 端側が DNA の主溝にはまり塩基を特異的に認識しており、C 末の β -ヘアピンで DNA の副溝側から認識していた。PhoB の DNA 結合ドメインについて DNA フリーの状態と複合体の状態との比較では、二次構造成分においては大きな変化は見られなかったが、分子内の疎水性コアを形成している一つの Leu 残基(L162)の配向が変化していた。そこで、この Leu 残基を含めたメチル基の運動性を調べるために ^2H 緩和実験を行った(Fig2)。その結果、DNA フリーの状態では L162 の周りの Leu 残基は高い運動性を持っていることがわかった。ここは、DNA との相互作用面を形成している部分の内部コアに存在する Leu 残基であり、DNA との相互作用に何らかの関係があるのかもしれない。また、RNA ポリメラーゼと直接相互作用するとされている 2 本目のヘリックスと 3 本目のヘリックスの間のループは、ループ中にある Val 残基から DNA へと分子間 NOE が比較的強く観測されるものの、高い運動性を保ったままであることがわかった。最近になり、PhoB の DNA 結合ドメイン 2 分子と DNA の複合体構造が X 線結晶構造解析により報告された。その構造との比較においても、構造に若干の違いが見られた。当日はそれらと NMR データの比較も行う予定である。

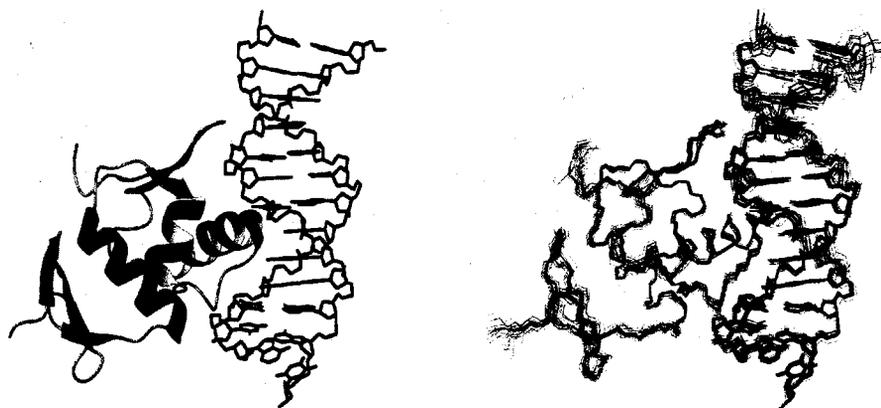


Fig.1 The solution structure of the PhoB DBD-DNA complex

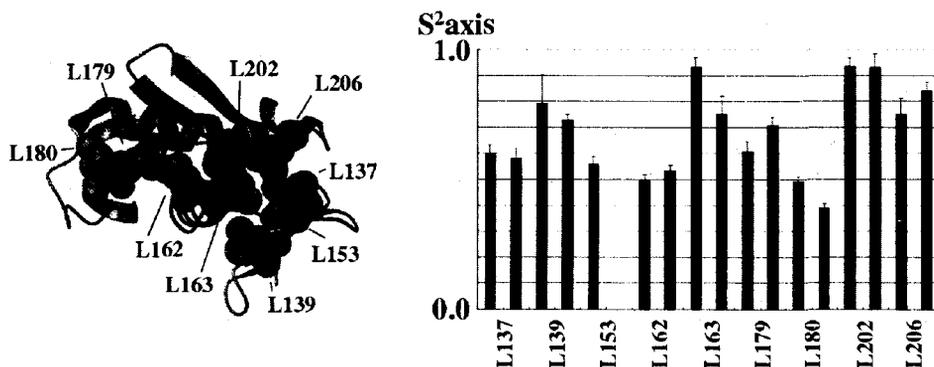


Fig.2 Methyl symmetry order parameters (S²axis) for methyl groups of leu residues

木原記念横浜生命科学振興財団¹、横浜市大院総理²、阪大院生命機能³

○ 奥田昌彦^{1,2}、佐藤真奈美²、田中亜紀³、花岡文雄³、大熊芳明³、
西村善文²

Structural Domain Analysis of the General Transcription Factor TFIIE

Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Sciences¹,
Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University², Institute for
Molecular and Cellular Biology, Osaka University³,

Masahiko Okuda^{1,2}, Manami Satoh², Aki Tanaka³, Fumio Hanaoka³,
Yoshiaki Ohkuma³, Yoshifumi, Nishimura²

The transcription initiation of eukaryotes requires five general transcription factors, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF and TFIIH in addition to RNA polymerase II. TFIIE has multiple functions during the transcription. TFIIE is a heterotetramer consisting of two α subunits (57kDa) and two β subunits (34kDa). We have focused to analyze the structures of its functional domains by using NMR. First, we performed a limited proteolysis of each of α and β subunits and identified several domains in solutions. So far we have examined a few domains, which are highly conserved from human to yeast. In addition, the deletion analysis of each domain showed a dominant negative effect for the basal transcription. However, their functions remained unknown. We will report the solution structures of these domains and their functions elucidated from our structures.

真核生物においてタンパク質をコードする遺伝子の転写の開始には RNA ポリメラーゼ II と基本転写因子と呼ばれる 5 種類のタンパク質群、TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIH が必要とされる。これらが DNA のプロモーター領域に順次集合し転写開始前複合体が形成される。続いて、プロモーターメルティング、プロモータークリアランスを経て転写可能な成熟した複合体に活性化された後、転写伸長段階へと移行する。基本転写因子 TFIIE は、転写開始前複合体の形成、TFIIH の酵素活性制御、プロモーターメルティング、プロモータークリアランスにおいて重要な役割を果たす多機能タンパク質である。ヒト由来の TFIIE は 57kD の α サブユニットと 34kD の β サブユニット、各々 2 個ずつからなる $\alpha_2\beta_2$ のヘテロ 4 量体である。非常に重要なタンパク質であるにもかかわらず、原子レベルでの立体構造情報はほとんど得られていない。主な原因は、構造解析研究に必要な濃度では容易に凝縮してしまう性質にある。個々のサ

キーワード TFIIE、タンパク質、構造ドメイン、立体構造、多次元 NMR 法

著者ふりがな おくだまさひこ、さとうまなみ、たなかあき、はなおかふみお、
おおくまよしあき、にしむらよしふみ

サブユニットでも同様である。実際これまでに複数のグループが X 線結晶構造解析を試みているが成功には到っていない。そこで、我々は TFIIIE の多機能性に注目し、NMR 法を用いて構造ドメイン解析を行った。

α 、 β 各サブユニットに対し限定分解実験を行い、いくつかの構造ドメインを同定した。このうち、 α サブユニットの N 末端領域に存在する 4 Cys タイプの Zn フィンガーモチーフを含む Zn 結合ドメインと β サブユニットの中央に位置するコアドメインに注目した。両ドメイン領域は酵母からヒトまで高度に保存されている。欠損変異体解析では、それぞれの領域を欠損させた変異体が基本転写に対しドミナントネガティブ効果を示した。このことから両ドメインはある特定の機能を担っていることは明白である。しかしながら、その具体的な機能はいずれも解明されていない。そこで、我々は立体構造から機能を類推できるのではないかと考え、両ドメインの構造解析を行った。本学会では NMR 法により得られた α サブユニットの Zn 結合ドメイン、 β サブユニットのコアドメインの立体構造、及びそれから類推、同定された機能について報告したい。

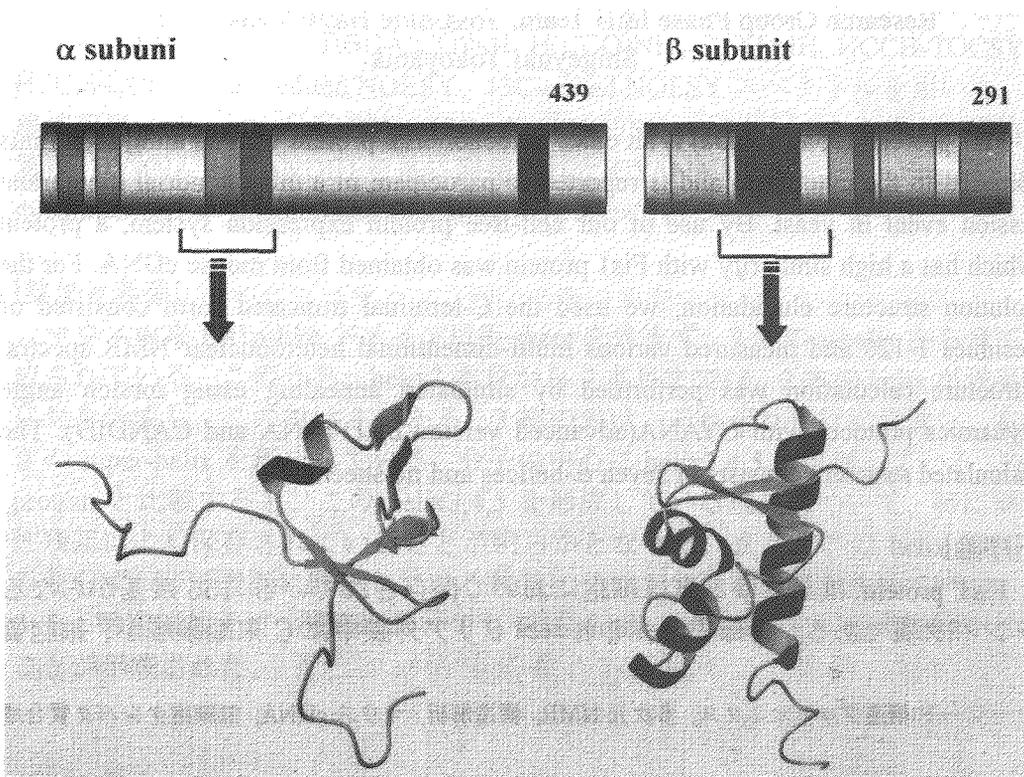


Fig.1 Structural domains of human general transcription factor TFIIIE

マウス構造プロテオミクス：
マウス由来 Fis1p like ドメインの構造解析
(理研 GSC)

○大橋若奈、廣田洋、山崎俊夫、小柴生造、武藤裕、
小林直宏、林文晶、濱田季之、好田真由美、白水美香子、寺田貴帆、
木川隆則、松尾洋、理研ゲノムセンター遺伝子グループ Phase 1&2 チーム、
林崎良英、横山茂之

Mouse structural genomics : Structural analysis of Fis1p-like domain derived
from mouse cDNA
(RIKEN GSC)

Wakana Ohashi, Hiroshi Hirota, Toshio Yamazaki, Seizo Koshihara,
Yutaka Muto, Naohiro Kobayashi, Fumiaki Hayashi, Toshiyuki
Hamada, Mayumi Yoshida, Mikako Shirouzu, Takaho Terada,
Takanori Kigawa, Yo Matuo, The RIKEN Genome Exploration
Research Group Phase I&II Team, Yoshihide Hayashizaki, and
Shigeyuki Yokoyama

Fis1 protein(155aa 17kDa) is an outer mitochondrial protein with its amino terminus exposed to the cytoplasm and is reported to participate in a mitochondrial membrane fission event in yeast. By use of our cell-free protein expression system, a protein which has a high similarity with Fis1 protein was obtained from mouse cDNA. For the solution structure elucidation, we used the C-terminal truncated form consisted of residues 1-120 and measured various multi-dimensional heteronuclear NMR spectra. Structure calculation was performed by simulated annealing using torsion angle dynamics protocol with CYANA(advanced version of DYANA and CANDID). The calculated structure consists of seven α -helices and no sheet.

[序論]

Fis1 protein はあらゆる真核細胞において保存されている 155 残基からなるタンパク質である。酵母では、ミトコンドリア外膜中に C 末端領域が、細胞質

キーワード:構造プロテオミクス, 多次元 NMR, 構造解析, マウス cDNA, 無細胞タンパク質合成

おおはしわかかな, ひろたひろし, やまざきとしお, こしばせいぞう, むとうゆたか, こばやしなお
ひろ, はやしふみあき, はまだとしゆき, よしだまゆみ, しろうずみかこ, てらだたかほ, きがわ
たかのり, まつおよう, りけんげのむせんたーいいでんしぐるーぷふえーず 1 & 2 ちーむ, はやし
ざきよしひで, よこやましげゆき

側に N 末端領域が存在し、dynamamin-related GTPase の *dnm1p* と作用してミトコンドリアの分裂に関与することが知られている。しかし、Fis1 protein の詳細な役割、及び立体構造は明らかではない。今回、我々はこれらのタンパク質と相同性が高い、マウス cDNA から発現された 152 アミノ酸からなるタンパク質の N 末端領域 120 残基について、多次元 NMR による構造解析を行った。

[方法]

マウス由来 Fis1p-like ドメインを無細胞タンパク質合成系によって大量発現させ、安定同位体標識させた試料を用いて、多種多次元 NMR スペクトルを測定した。測定試料は、0.6mM Fis1p-like ドメインを使用し、バッファーは 20mM リン酸ナトリウムバッファー(pH6.5)、100mM NaCl, 1mM DTT を用いた。測定は Bruker 社の DRX600 及び 800 を用いて、298K で行った。データの処理は NMRPipe を用い、データ解析は NMRView を用いた。主鎖の帰属は、3D HNCA、HN(CO)CA、HNCACB、CBCA(CO)NH、¹⁵N-edited NOESY スペクトルを用いて行い、側鎖の帰属は、HBHA(CO)NH、H(CCO)NH、C(CO)NH、HCCH-TOCSY、HCCH-COSY、¹⁵N-edited NOESY、¹³C-edited NOESY スペクトルを用いた。距離情報は、¹⁵N-edited NOESY、¹³C-edited NOESY スペクトルから得た。構造計算は、DYANA と CANDID を基に開発された CYANA 1.0.6 を用い、torsion angle dynamics を用いた simulated annealing 法によって行った。

[結果と考察]

マウス由来 Fis1p-like ドメインはβ-sheet を含まず、7本のα-helix から全て構成されている。このうち、helix2 本目から 7本目までは、2本の helix が逆平行に対を形成し、この対は 3組ある。3組の対は、それぞれ平行に位置し、右巻きの super-helix を形成している。分子の中心に helix3,4,5 は位置している。Fis1 protein と比較すると、この helix3,4,5 を形成している残基について、特に疎水性残基はよく保存されていることが明らかとなった。また、この helix 領域のみならず、分子表面に露出している残基についても両方で保存されていることから、構造に加えて、機能においても Fis1 protein と類似している可能性があることが示唆された。

蛋白質ランダムコイル鎖の NH proton および ^{15}N の化学シフトの圧力依存性

(1 理研・細胞情報伝達、2 神戸大・理学部、3 近大・理工学部)
鎌足雄司¹、Tara N. Niraula²、山田博昭²、橘秀樹²、横山茂之¹、赤坂一之^{1,3}

Pressure-dependence of NH Proton and ^{15}N Chemical Shifts of Random Coil Peptides

(1. Cellular Signaling Lab. Riken Harima Institute, 2. Faculty of Science, Kobe University, 3. Faculty of Biology-oriented Science and Tehcnology, Kinki University)

Yuji O. Kamatari¹, Tara N. Niraula², Hiroaki Yamada², Hideki Tachibana², Shigeyuki Yokoyama¹, and Kazuyuki Akasaka^{1,3}

We have estimated pressure-dependence of NH proton and ^{15}N chemical shifts of random coil peptide using ^{15}N -labeled unfolded proteins (lysozyme in 8 M urea, θ -SS lysozyme in 0 M urea, and θ -SS lysozyme in 8 M urea). This is a most basic and important information for high pressure NMR studies.

高圧 NMR は蛋白質の構造や機能に関してさまざまな重要な情報を与えることが、これまでに多くの蛋白質で示されてきた。しかしながら、まだこの新しい分野の研究は始まったばかりで、蛋白質がランダムコイル構造を持つ場合の化学シフトの圧力依存性といった、もっとも基本的な情報さえ不足していた。これについて、 ^1H のランダムコイル構造の化学シフトの圧力依存性については、最近ドイツの Kalbitzer らのグループが、GGXA ペプチドをもちい、各アミノ酸ごとのを見積もっている (文献1)。しかしながら、他核他次元 NMR が常用される今日、 ^1H だけでなく ^{15}N や ^{13}C の情報も不可欠である。本研究では、ほぼランダムコイル構造をとっていると思われる蛋白質 (lysozyme in 8 M urea, θ -SS lysozyme in 0 M urea, & θ -SS lysozyme

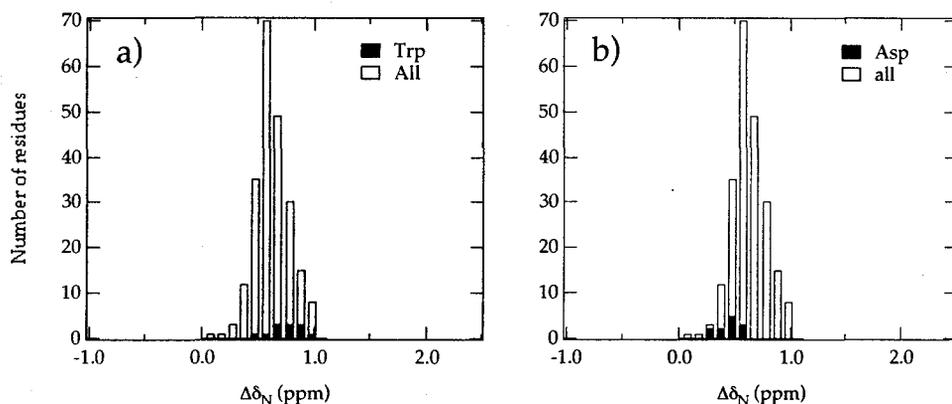
キーワード: 高圧 NMR、化学シフト、ランダムコイル鎖

著者ふりがな: かまたりゆうじ、タラ・ニラウラ、やまだひろあき、たちばなひでき、よこやましげゆき、あかさかかずゆき

in 8 M urea) の ^1H および ^{15}N の高圧 NMR のデータ (文献 2) をもとに、各アミノ酸ごとのランダムコイル構造の主鎖の NH プロトンおよび ^{15}N の化学シフトの圧力依存性を見積もった。

^{15}N の化学シフトは平均で 0.61 ppm/kbar の変化をする。変化の一番大きい残基 Trp で 0.73 ppm/kbar (Figure1a)、一番変化の小さい残基 Asp で 0.43 ppm/kbar (Figure1b)、の圧力依存性が見積もられた。また、NH プロトンについては平均で 0.087 ppm/kbar の変化をする。一番大きい Trp 残基で 0.114 ppm/kbar、一番変化の小さい Gly 残基で 0.042 ppm/kbar、の圧力依存性が見積もられた。我々の値は、Glu, Lys 残基をのぞき、Kalbitzer らのグループの GGXA ペプチドを使って求めた値とほぼ一致した。

このランダムコイル構造の主鎖の NH プロトンおよび ^{15}N の化学シフトの圧力依存性に関する情報は、今後の高圧 NMR の研究を進めていく上で非常に基本的で重要な情報となる。



文献 1. Arnold, M. R. et al., 2001, Biophys. Chem., 96, 129-140.

文献 2. Kamatari et al., 2001, Eur J Biochem. 268, 1782-93.

P 54 putative minimal nucleotidyltransferase の構造解析
(¹理研・GSC、²阪大・院理、³理研・播磨、⁴横浜市大・院総合理、
⁵理研・遺伝生化、⁶東大・院理)

○鈴木咲良¹、畠中秀樹¹、本藤隆亨¹、奥村亜子¹、黒田裕¹、
倉光成紀^{2,3}、柴田武彦^{4,5}、井上頼直³、横山茂之^{1,3,6}

Structure of putative minimal nucleotidyltransferase

¹Genomic Sciences Center, RIKEN, ²Graduate School of Science, Osaka University, ³Harima Institute, RIKEN, ⁴Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, ⁵Cellular & Molecular Biology Laboratory, RIKEN, ⁶Graduate School of Science, University of Tokyo

Sakura Suzuki¹, Hideki Hatanaka¹, Takayuki Hondoh¹, Ako Okumura¹, Yutaka Kuroda¹, Seiki Kuramitsu^{2,3}, Takehiko Shibata^{4,5}, Yorinao Inoue³, and Shigeyuki Yokoyama^{1,3,6}

The NMR structure of a putative protein (95aa) from *Thermus thermophilus* HB8 of unknown function has been determined. The determined structure of our protein resembles structural elements found in some nucleotidyltransferase families in spite that their sequence similarities are quite low. Moreover, we have found in the literature a hypothesis proposed from elaborate database analysis that a family of small prokaryotic proteins, which includes homologues of our protein, is the minimal nucleotidyltransferase family. However, our putative protein is small in comparison with members of the already established nucleotidyltransferase families. Therefore it is difficult to predict whether our putative protein possesses the transferase activity or not. Here we report the three-dimensional structure of this putative minimal nucleotidyltransferase determined by using NMR.

[はじめに]

高度好熱菌の構造ゲノム科学プロジェクトの一環として、機能未知である高度好熱菌由来タンパク質の溶液構造を NMR を用いて決定した。その構造からこのタンパク質は多数の nucleotidyltransferase の触媒ドメインと似ていることが示された。真核生物でのこのタイプの nucleotidyltransferase は触媒ドメイン以外に RNA 結合ドメインなどのいくつかのドメインで形成されており、数百残基のタンパク質である。しかしこの高度好熱菌由来タンパク質は全長が 95 残基と非常に小さい。ここではこの高度好熱菌由来タンパク質の構造を示す。

[方法]

¹³C/¹⁵N 安定同位体ラベルされた高度好熱菌由来タンパク質は、大腸菌による大量培養後、Ni²⁺-NTA カラムとゲルろ過カラムで精製した。最終試料として 0.77mM の試料を 5mM リン酸バッファー (pH6.0)、50mM NaCl、4mM dithiothreitol (DTT)、10% D₂O に溶かしたものを作成した。すべての NMR 測定は Varian Unity INOVA 600MHz と 800MHz を用い 25 °C で行った。主鎖の帰属用に ¹⁵N-HSQC、HNCACB、CBCA(CO)NH、HNCO、側鎖の帰属用に C(CO)NH、H(CCO)NH、HCCH-TOCSY、¹³C-HSQC、2D-TOCSY を測定した。また距離制限情報 (NOE) として ¹⁵N-edited NOESY と ¹³C-edited NOESY (mixing time は 75ms) を測定した。スペクトルの処理や

キーワード: nucleotidyltransferase、高度好熱菌、金属配位

すずきさくら、はたなかひでき、ほんどうたかゆき、おくむらあこ、くろだゆたか、くらみつせいき、しばたたけひこ、いのうえよりなお、よこやましげゆき

構造計算には NMRPipe, NMRView, XplorUp, DYANA/CANDID, TALOS を用いた。

[結果と考察]

高度好熱菌由来タンパク質の 20 個の構造の重ね合わせを Fig.1 に示す。他の構造既知タンパク質との構造類似性を検索したところ、一次配列の相同性が非常に低いにも関わらず、多数の nucleotidyltransferase ファミリーが共有する触媒ドメインと構造が似ていることが示された。一ヶ所 β ストランドと α ヘリックスが置き換わっている領域があったが、それを除けば特に kanamycin nucleotidyltransferase のドメインと高い類似性が見られた。また金属イオンと結合する 3 つのアスパラギン酸残基は高度好熱菌由来タンパク質でも保存されていた。更に文献を調べたところ、PSI-BLASTなどによるデータベース解析を駆使して nucleotidyltransferase の触媒ドメインと配列がわずかに似た一群の小さなタンパク質を検出し、これらを minimal nucleotidyltransferase であると提唱した仮説も見つかった。これらはゲノム解析がなされたうちのすべての古細菌といくつかのバクテリアに存在していることから、進化の過程で保存され機能的にも重要であると考えられる。我々の高度好熱菌由来タンパク質は、基質結合に必要な残基などが保存されていることからこのファミリーに属すると考えられ、現在のところ他のメンバーの実際の構造解析が報告されていないことから、このファミリーにおける初めての立体構造決定になると考えられる。しかしこのタンパク質は上記の仮説で提唱された nucleotidyltransferase スーパーファミリーの他のファミリーと比較して極めて全長が短い為、nucleotidyltransferase としての活性を有するという予測は容易には受け入れ難い。今後は金属・基質との結合能の有無を調べながら、この putative minimal nucleotidyltransferase の機能的な解析を進めていく。



Fig.1 Superposition of 10 NMR structures of putative minimal nucleotidyltransferase (4-98).

References

1. L. Aravind and E. V. Koonin (1999) *Nucleic Acids Res.* 27, 1609-1618.
2. G. Martin, W. Keller and S. Doublie (2000) *EMBO J.* 19, 4193-4203

(¹東京大学大学院理学系研究科、
²理化学研究所ゲノム科学総合研究センター)

○葛西卓磨^{1,2}、井上真²、木川隆則²、松尾洋²、矢吹孝²、布川絵未²、
 関英子²、松田貴意²、青木雅昭²、白水美香子²、寺田貴帆²、小柴生造²、
 理研ゲノムセンター遺伝子グループPhase1&2チーム²、林崎良英²、
 横山茂之^{1,2}

Mouse structural proteomics: Solution structure of BolA-like protein

(¹Graduate School of Science, The University of Tokyo and ²Genomic Sciences Center, RIKEN)

○Takuma Kasai^{1,2}, Makoto Inoue², Takanori Kigawa², Yo Matsuo², Takashi Yabuki²,
 Emi Nunokawa², Eiko Seki², Takayoshi Matsuda², Masaaki Aoki², Mikako Shirouzu²,
 Takaho Terada², Seizo Koshiba², The RIKEN Genome Exploration Research Group
 Phase I&II Teams², Yoshihide Hayashizaki² and Shigeyuki Yokoyama^{1,2}

BolA-like proteins are widely conserved through prokaryotes and eukaryotes. In *E. coli*, the expression of BolA is regulated by both growth rate and various stresses. It is also known that overexpression of BolA alters morphology and transcription level of some other genes. However, the actual molecular function of BolA-like protein remains unknown. Here we determined the solution structure of mouse BolA-like protein. *E. coli* cell-free protein synthesis system was used for preparation of ¹³C/¹⁵N-labeled protein. Structure calculation was achieved with automated NOE assignment programs and subsequent manual refinements. The overall structure is $\alpha\beta\beta\alpha\alpha\beta\alpha$, while $\alpha 2$ and $\alpha 3$ helices are located at an angle of more than 90 degrees. This fold belongs to class II KH fold, in spite of no similarity in primary sequences between BolA-like proteins and other known KH fold proteins. This result suggests that BolA-like protein binds to nucleic acids.

大腸菌のBolAタンパク質と、そのホモログからなるBolA-likeタンパク質ファミリーは、原核生物から高等動植物にいたるまで幅広く保存しており、その多くは全長100アミノ酸前後のタンパク質である。これまでに大腸菌のBolAタンパク質について、定常状態およびストレス下において発現が誘導されること、強制発現すると菌が丸型になったり、他の遺伝子の転写活性化がおこったりすることが報告されている。しかし、BolA-likeタンパク質の分子レベルの機能はまだわかっていない。

我々は、今回、マウスにおけるBolA-likeタンパク質の立体構造解析を行った。このタンパク質は全長86アミノ酸であるが、この配列のN末端にポリヒスチジンを含んだ配列を付加した、113アミノ酸のタンパク質を発現し、構造解析に用いた。発現系は、大腸菌の無細胞タンパク質合成系を用い、¹³C/¹⁵N標識されたタンパク質を得た。600MHzのNMR装置を用い、¹H/¹⁵N HSQC, ¹H/¹³C HSQC, HNC0, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, HCCH-COSY, CC(CO)NH, H(CCCO)NH, ¹⁵N-

構造プロテオミクス、マウスcDNA、無細胞タンパク質合成、KHフォールド、核酸結合タンパク質

かさいたくま、いのうえまこと、ぎがわたかのり、まつおよう、やぶきたかし、
 ぬのかわえみ、せきえいこ、まつだたかよし、あおきまさあき、しろうずみかこ、
 てらだたかほ、こしばせいぞう、りけんげのむせんたーいんでんしぐるーふふえーず^{1&2}
 ちーむ、はやしざきよしひで、よこやましげゆき

NOESY, ^{13}C -NOESYの各スペクトルを測定し、解析に用いた。まず、ARIA/CNSおよびDYANA/CANDIDによりNOEを自動帰属し、その結果を検討・修正して、CNSを用いて最終的な構造を計算した。

その結果、BolA-likeタンパク質は、 $\alpha\beta\alpha\alpha\beta\alpha$ 構造をとっていることがわかった(Fig.1)。 β シートのうち、 $\beta 1$ と $\beta 2$ は反平行であり、 $\beta 3$ は $\beta 2$ に平行である。 $\alpha 2$ と $\alpha 3$ は短いターンを介して鋭角に折れ曲がっており、HTH(Helix-Tum-Helix)モチーフを形成している。この構造は、DALIによる立体構造相同性検索の結果、class II KH(hnRNP K homology)フォールドに分類された。KHフォールドは、核酸結合タンパク質によく見られるフォールドのひとつで、鋭角に折れ曲がった2つの α ヘリックスを含む $\beta\alpha\alpha\beta$ 構造を基本とし、 $\beta\alpha\alpha\beta\alpha$ 構造のclass I KHと、 $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ 構造のclass II KHに分類される。KHフォールドを持つタンパク質の多くは、鋭角に折れ曲がった2つの α ヘリックス間のターン部分に、よく保存されたGXXG配列を持つ。BolA-likeタンパク質はこのGXXG配列がなく、KHフォールドをもつ既知のタンパク質との一次配列上の相同性もないが、class II KHフォールドをとっていることから、BolA-likeタンパク質が核酸結合性を持っていることが示唆された。

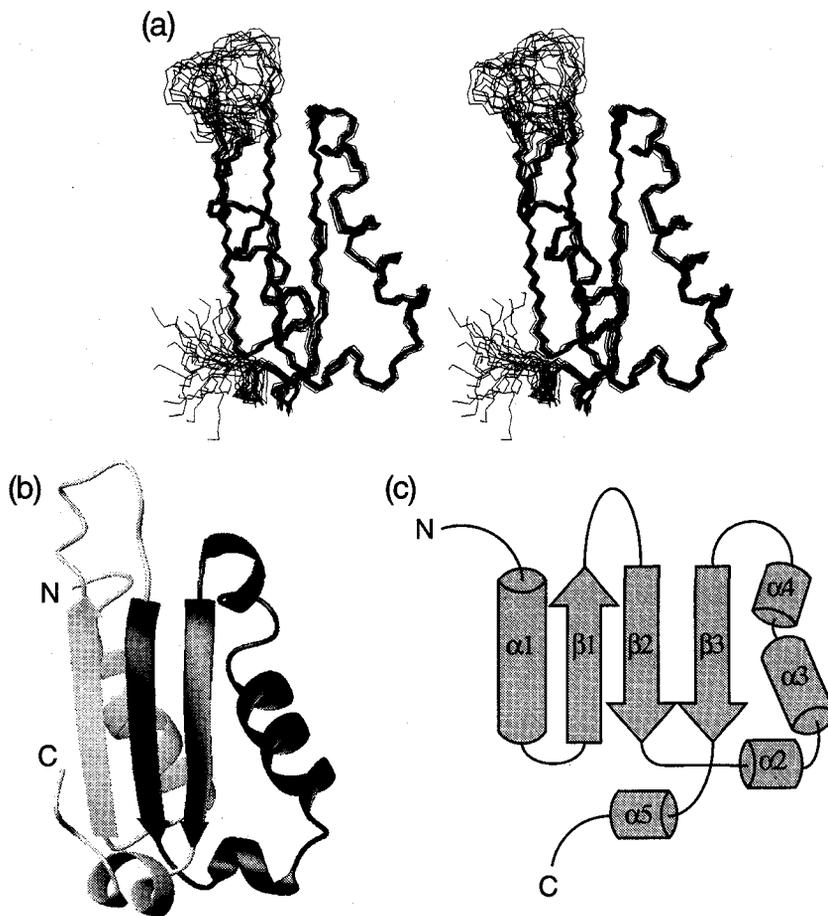


Fig.1 Three-dimensional structure of mouse BolA-like protein. (a) Stereo diagram of backbone trace. 20 best structures out of 200 calculated are superimposed. The purification tag region is not shown. (b) Ribbon diagram. The core $\beta\alpha\alpha\beta$ motif of KH fold is indicated by dark gray color. (c) Schematic diagram of overall topology.

ヒト構造プロテオミクス：

ARSACS 病原遺伝子産物 Sacsin より見出された DnaJ 様タンパク質 J-ドメインの溶液構造

(理研 GSC¹, かずさ DNA 研究所²)○小林直宏¹、木川隆則¹、小柴生造¹、松尾洋¹、白水美香子¹、矢吹孝¹、布川絵未¹、関英子¹、松田貴意¹、青木雅昭¹、井上真¹、寺田貴帆¹、小原収²、中山学²、田仲昭子¹、横山茂之¹

Mouse Structural proteomics:

NMR study on DnaJ-like domain of Sacsin

¹RIKEN Genomic Sciences Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama 230-0045,²Facility for Genome Structure Analysis, Kazusa DNA Research Institute, 2-6-7 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0000.N. Kobayashi¹, T. Kigawa¹, S. Koshiba¹, Y. Matsuo¹, M. Shirouzu¹, T. Yabuki¹, E. Nunokawa¹, E. Seki¹, T. Matsuda¹, M. Aoki¹, M. Inoue¹, T. Terada¹, O. Ohara², M. Nakayama², A. Tanaka¹, and S. Yokoyama¹

Sacsin was found as a putative gene product of SACS responsible for neurodegenerative disease, ARSACS (Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Seeuenay) (1). The function of sacsin has been suggested to be chaperone mediated protein folding from the fact that the protein contains the N-terminal ATP binding region of Hsp90 and Hsp40 (DnaJ) like domains. However, the low sequence identity between the DnaJ-like domain and eukaryotic Hsp40 family indicates that the domain function is still largely unclear. Recently, we have found a highly soluble and stable domain from sacsin corresponding to the J-domain of DnaJ. We have expressed uniformly ¹³C, ¹⁵N labelled J-domain by cell-free expression system, and carried out 3D-NMR experiments. Using the experimental NMR data, a high resolution structure of the J-domain has been determined using a fully automated NOE assignment module, dyana-CANDID ver. 1.68 (2). The calculated structures have been refined by simulated annealing using CNS ver. 1.1. In the calculated structure, three distinctive helices form a compact, anti-parallel helical coiled-coil structure. In spite of the poor sequence similarity, the region containing highly conserved motif, His-Pro-Asp, showed a helix2-loop-helix3 structure quite similar to the other Hsp40 family proteins.

【序論】

分子シャペロンとして真核、原核生物に広く見出されるDnaJは、DnaKとともにタンパク質のフォールディングを介助する機能を有することで知られている。最近、カナダ-ケベック州でみられるけいれん性運動失調障害(ARSACS)の原因遺伝子がコードしているタンパク質Sacsinが同定され、その配列中にDnaJと一部相同性のある配列が含まれていることが示された(1)。

本研究ではこの新規DnaJ様タンパク質J-ドメインを用い、NMRによる立体構造解析を行った。

【方法】

¹³C,¹⁵N標識体J-ドメインの発現には無細胞タンパク質合成系を用いた。Bruker社製Avance600およびAvance800を用いた多核多次元NMRを測定後、NMRpipeによるデータ処理、NMRView-Kingyoによるシグナル帰属を行い、dyana-CANDID ver. 1.68 (2)によるNOE自動帰属と立体構造計算を行った。得られた構造はCNS ver. 1.1を用いたSimulated Annealing 計算により精密化した。

構造プロテオミクス、ヒトcDNA、無細胞タンパク質合成

こばやし なおひろ, きがわ たかのり, こしば せいぞう, まつお よう, しろうず みかこ, やぶき たかし, ぬのかわ えみ, せき えいこ, まつだ たかよし, あおき まさあき, いのうえ まこと, てらだ たかほ, おはら おさむ, なかやま まなぶ, たなか あきこ, よこやま しげゆき

【結果と考察】

DNAJ様タンパク質J-ドメインは分子シャペロンとして知られているDNAJファミリーにおいて保存されているHPDモチーフと呼ばれる配列を含む(Fig.1)。最終的に得られた構造はFig.2に示すように3本のヘリックスが束ねられた構造を有していた。HPDモチーフを含む2番目と3番目のヘリックスにより構成される部位、ヘリックス-ターン-ヘリックス構造は他のDnaJファミリーと比較して相同性が高く、この部位付近でのアミノ酸配列が保存されているという事実と良く一致している。

DNAJlike (Human)	ILKEVTSVVEQAWKLPESERKKIIRRLYLKWH HPD KNPENHDI	42
DNAJ (Human)	DYYQTLGLAR...GASDEEIKRAYRQALRY HPD KNKEPG	37
DNAJlike (Human)	ANEVFKHLQNEINRLEKQAFLDQADRASRRTF	75
DNAJ (Human)	AEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYG	65

Fig1. Amino acid similarity between DNAJ like domain of human Sacsin and human DNAJ protein. Conserved residues are shaded. HPD motif is indicated with open rectangular.

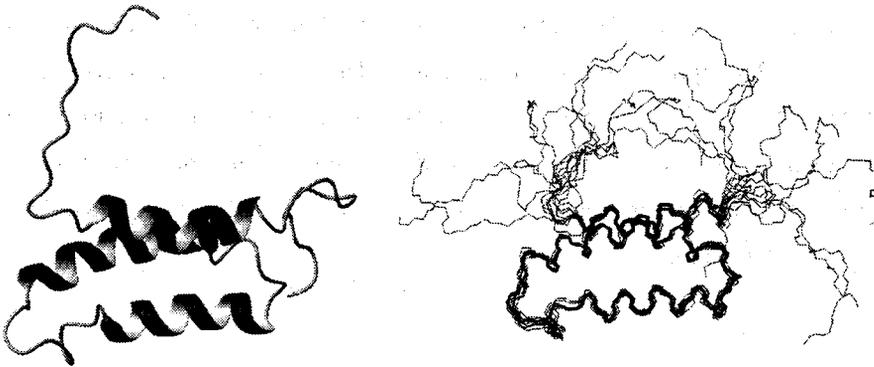


Fig2 Ribbon model (left) and 20 SA structures (right) of J-domain.

References

1. Engert, J. C., Bérubé, P., Mercier, J., Doré, C., Lepage, P., Ge, B., Bouchard, J. P., Mathieu, J., Melancon, S. B., Schalling, M., Lander, E. S., Morgan, K., Hudson, T. J., and Richter, A. (2000) *Nat. Genet.* 24, 120-5.
2. Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002) *J. Mol. Biol.* 319, 209-27.

マウス構造プロテオミクス：cullin-3 C 末端ドメインの溶液構造
(理研 GSC)

○井上真, 木川隆則, 松尾洋, 矢吹孝, 布川絵未, 関英子, 松田貴意, 青木雅昭, 白水美香子, 寺田貴帆, 小柴生造, 理研ゲノムセンター遺伝子グループ Phase1&2 チーム, 林崎良英, 横山茂之

Mouse Structural Proteomics: Solution structure of cullin-3 C-terminal domain
(RIKEN Genomic Sciences Center)

M. Inoue, T. Kigawa, Y. Matsuo, T. Yabuki, E. Nunokawa, E. Seki, T. Matsuda, M. Aoki, M. Shirouzu, T. Terada, S. Koshiba, The RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II teams, Y. Hayashizaki, S. Yokoyama

Mouse cDNA (DDBJ code AK003885) encodes a 91-aa protein identical to the C-terminal domain of cullin-3. To approach the function of this cDNA product, we determined the solution structure by NMR. The protein folds into $\alpha\beta\alpha\alpha\beta\beta$ topology, which is known as the winged-helix domain. As most of the members of the winged-helix proteins have been shown to bind to DNA, the present result implies that the C-terminal domain of cullin-3 is also implicated in DNA binding.

【序】

理研ゲノム科学総合研究センターでは、タンパク質の立体構造と機能を包括的に理解する構造プロテオミクスの一環として、マウス cDNA がコードするタンパク質の網羅的な立体構造解析を行っている。マウス cDNA (DDBJ コード AK003885)は、ユビキチンリガーゼを構成する cullin-3 の C 末端部分と同一の、91 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードする。本研究では、NMR 法によりこのタンパク質の立体構造解析を行い、その機能を予測した。

構造プロテオミクス, マウス cDNA, 無細胞タンパク質合成, winged-helix ドメイン, ユビキチンリガーゼ

いのうえまこと, きがわたかのり, まつおよう, やぶきたかし, むのかわえみ, せきえいこ, まつだたかよし, あおきまさあき, しろうずみかこ, てらだたかほ, こしばせいぞう, りけんげのむせんたーいでんしぐるーぷふえーず1&2ちーむ, はやしざきよしひで, よこやましげゆき

【方法】

すべての NMR 実験は、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識タンパク質を用いて行った。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識タンパク質は、大腸菌抽出物を用いた無細胞タンパク質合成系により調製した。NMR 測定には Bruker 社の 600 MHz, および 800 MHz の装置を用いた。主鎖の帰属には AUTOASSIGN を用いた。NOE の帰属は ARIA により半自動的に行った。最終的な立体構造計算には CNS を用いた。

【結果・考察】

立体構造解析の結果、解析に用いた 91 アミノ酸残基のうち、N 末端側約 20 残基は特定の立体構造を形成していなかった。一方 C 末端側約 70 残基は、 $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ のトポロジーの、"winged-helix ドメイン" を形成していることが明らかとなった。DALI により類似する立体構造を検索したところ、転写因子 E2F-4/DP, ADAR1 DNA 結合ドメイン, histone H5 をはじめとする数多くの DNA 結合タンパク質との類似性が認められた(Figure)。このことから、cullin-3 の C 末端ドメインにも DNA 結合能があり、ユビキチン化を介したタンパク質分解系に DNA が直接的に関与している可能性が示唆される。

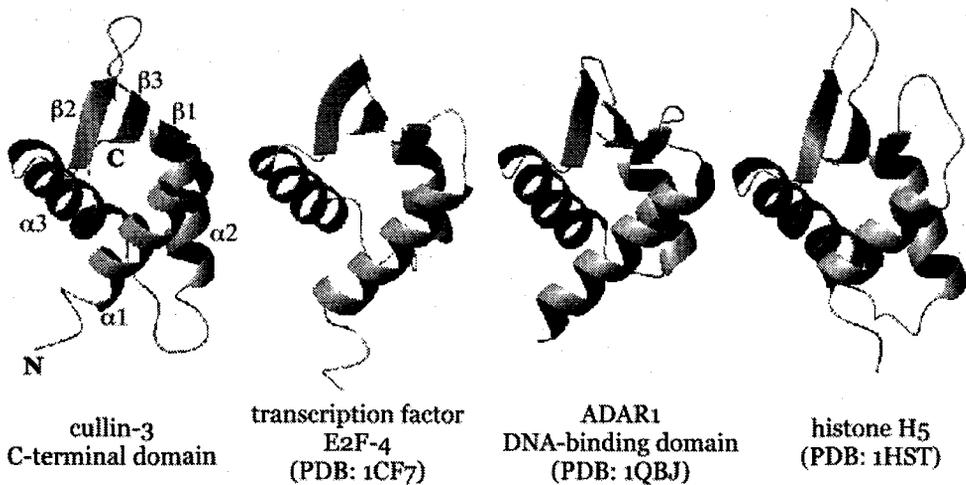


Figure: The cullin-3 C-terminal domain and the structural homologues.

The tertiary structure of the cullin-3 C-terminal domain (left) and three representative homologues identified by DALI search (Z -score > 7.0 ; right) are shown in ribbon diagram. All of these homologues are known as DNA-binding domains.

マウス構造プロテオミクス： ヒト MUC16 ホモログの SEA ドメインの溶液構造

(東大院理生化¹、理研 GSC²)

○前田健^{1,2}、井上真²、木川隆則²、松尾洋²、矢吹孝²、布川絵未²、関英子²、松田貴意²、青木雅昭²、白水美香子²、寺田貴帆²、小柴生造²、理研ゲノムセンター遺伝子グループ Phase1&2 チーム²、林崎良英²、横山茂之^{1,2}

Mouse structural proteomics:

Solution structure of the SEA domain of human MUC16 homologue

¹Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo. ²RIKEN Genomic Sciences Center, Japan.

T. Maeda^{1,2}, M. Inoue², T. Kigawa², Y. Matsuo², T. Yabuki², E. Nunokawa², E. Seki², T. Matsuda², M. Aoki², M. Shirouzu², T. Terada², S. Koshiba², The RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I&II teams, Y. Hayashizaki², S. Yokoyama^{1,2}

SEA domain, which has approximately 120 residues, is found in extracellular regions of a number of membrane-associated proteins such as sea urchin sperm protein, enterokinase, and agrin. It is suggested that SEA domain serves as the site for proteolytic cleavage in ER, but its detailed function is not clearly known. In this research, by using multidimensional NMR spectroscopy we determined the solution structure of the SEA domain from murine protein which is homologous to human ovarian cancer antigen MUC16. It has an α/β sandwich structure composed of two α helices and four antiparallel β strands. It is remarkable that all conserved aromatic residues, Tyr25, Tyr37, Phe52, and Phe61 participate in forming a well-defined hydrophobic core. In addition, $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE values indicate the low mobility of its overall structure in solution.

【序論】

SEA ドメインは sea urchin sperm protein, enterokinase, agrin などから、配列の類似性により見出されたドメインである。いずれのタンパク質も膜タンパク質であり、SEA ドメインは必ず細胞外側に存在する。SEA ドメインの多くは、その近傍に O-結合型糖鎖の修飾を受けている。翻訳後に小胞体中で加水分解をうける部位として働くとの報告もあるが、機能の詳細は不明である。今回、我々は多次元 NMR を用いて SEA ドメインの溶液構造を決定した。

【方法】

構造解析に用いた SEA ドメインは、マウスタンパク質(FANTOM clone ID = 1110008I14RIK, ヒト卵巣がん抗原 MUC16 の C 末端に相同)の SEA ドメイン(67-185)である。ドメインの境界は配列の比較により決定した。

構造プロテオミクス, マウス cDNA, 無細胞タンパク質合成, SEA ドメイン, 細胞外

まえだ たけし, いのうえ まこと, きがわ たかのり, まつお よう, やぶき たかし, ぬのかわ えみ, せき えいこ, まつだ たかよし, あおき まさあき, しろうず みかこ, てらだ たかほ, こしば せいぞう, りけんげのむせんたーいでんしぐるーぶふえーず 1 & 2 ちーむ, はやしざき よしひで, よこやま しげゆき

発現は、大腸菌の無細胞合成系をもちいて、非標識体、 ^{15}N 標識体および ^{13}C , ^{15}N 標識体を調製した。NMR測定は、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)中で温度298K、装置はBruker社Avance600およびAvance800で行なった。種々の3次元NMRスペクトルを測定し、連鎖帰属法により主鎖および側鎖の化学シフトを帰属した。芳香環側鎖が13個と非常に多いので、帰属には特別に800MHzでDQF-COSYなどのスペクトルを測定した。NOEの帰属および構造計算にはARIA-CNSを用い、まず大まかな構造を得た。次いで、得られた帰属を見直し、側鎖二面角の情報を加えて最終構造を得た。 ^1H - ^{15}N 異核NOEの測定実験は ^{15}N 標識体を用いて、同様の条件で測定した。

【結果と考察】

得られた構造をFig.1に示す。4本の逆平行 β シートと2本の α ヘリックスからなる α/β サンドウィッチ型の構造をとる。短い β シートがあり、表面をふさぐように折れ返っているのが特徴的である。DALIによる検索では特に類似した構造は見つからず、新規の構造をとっているといえる。SEAドメインではファミリー間で芳香環残基(本タンパク質ではTyr25, Tyr37, Phe52, Phe61)の保存性が高いが、これらはいずれも疎水性コアの形成に参加していた。そのほかではThr34が、Ser/Thrとして非常に保存性が高く、これは1本目の α ヘリックスのN末あたりに存在するが、これが何のために保存されているかは不明で、機能に重要な可能性もある。

また、 ^1H - ^{15}N 異核NOEの測定により分子内運動を見積もった。結果はFig.2に示す通りである。全体的に値の差はなく、0.5以下の値をとっているのはN末端、C末端以外では数残基でいずれもループ部分に相当する。運動性は全般的に低く、堅い構造をとっているといえる。

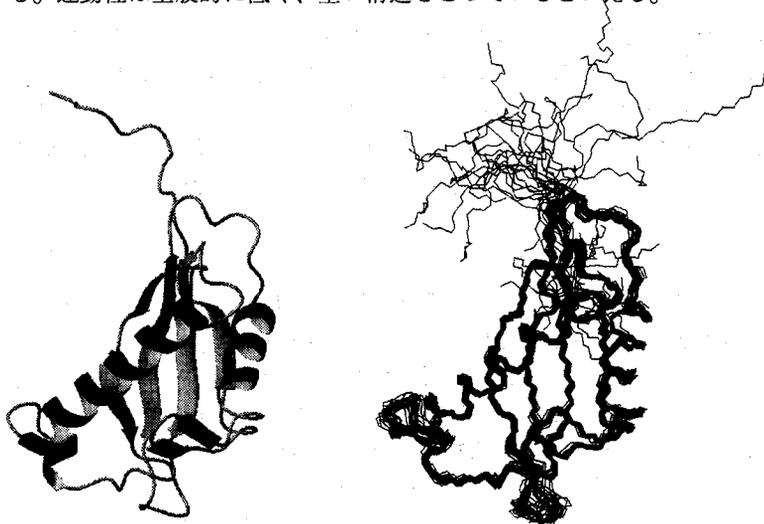


Fig.1 Ribbon diagram and superposition of 20 calculated structures of the SEA domain

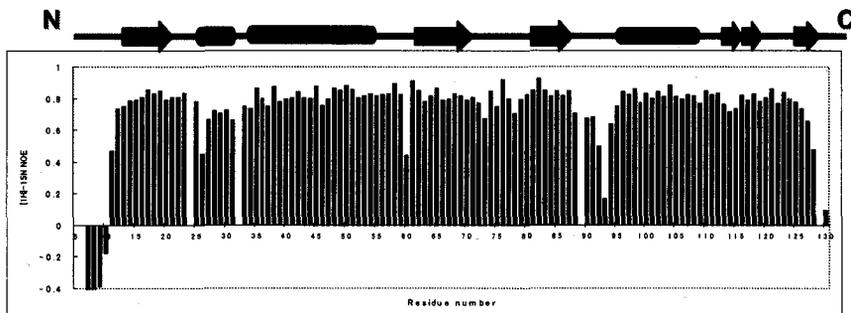


Fig.2 The $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE values. Secondary structure elements of the SEA domain are also indicated.

ペプチドを安定同位体ラベルする系の改善
(群馬大・工¹、三菱化学生命研²、CREST・JST³)

○稲岡齊彦¹、飯塚靖子¹、窪田健二¹、河野俊之²、若松馨^{1,3}

Improvements of an expression system for isotope-labeled peptides

(¹Gunma Univ., ²Mitsubishi Kagaku Inst. Life Sci., ³CREST JST)

¹Inaoka, Y., ¹Iizuka, Y., ¹Kubota, K., ²Kohno, T., ^{1,3}Wakamatsu, K.

We have shown that uniform isotope labeling of peptides is quite useful for detailed structure analysis of short peptides and that labeled peptides can be obtained as fusion proteins with ubiquitin when expressed in *E. coli* cells. Here we report improvements of the expression system that enhance the yield of peptides and enable the expression of the peptide that could not be expressed in a labeled form due to its toxicity. Isotope labeling was found to improve the resonance dispersion also for magainin 2.

[要旨]

ペプチドの安定同位体ラベルはペプチドの詳細な構造解析に非常に有用であり、ラベルペプチドはユビキチンとの融合蛋白質として大腸菌で発現できる事を我々は示している。今回、ペプチドの発現系を改良し、収量を向上させるとともに、従来の方法では毒性のためにラベルできなかったペプチドを発現可能にしたので報告する。また安定同位体ラベルはマガイニン2についてもシグナルの分離を向上させることが確認された。

[背景]

TRNOE は蛋白質等に結合したペプチドの構造を決定するための有用な方法であるが、短いペプチドは水溶液中で特定の立体構造を取らないので、プロトンシグナルの分離が悪く、TRNOE シグナルの分離も悪いという問題があった。我々は、ユビキチンとの融合蛋白質として発現させることによってペプチドを ¹⁵N や ¹³C でラベルできること、また、その化学シフトで展開するとランダムコイル状態のペプチドのシグナルも分離が良くなることを示している (1)。しかし、安定同位体ラベル化合物は高価であるのでラベル化合物当たりのペプチド発現量を向上させることが望ましい。また、従来の方法では大腸菌への毒性のためにラベルできないペプチドも存在する。今回、これらの課題を解決したので報告する。

[方法および結果]

1. 発現系の改良

(1) ユビキチン部分の codon usage は全て大腸菌での発現に最適化した。

安定同位体ラベル、ペプチド、発現、マガイニン2

いなおかよしひこ、いづかやすこ、くぼたけんじ、こうのとしゆき、わかまつかおり

(2) BL21 Star(DE3) 株は mRNA の分解に関与している RNase E の C 末端側が欠損しているため、mRNA の安定性が増し蛋白質の発現量が増加することが知られている。この BL21 Star(DE3) 株を用いることにより、マストパラン X とユビキチンとの融合蛋白質の発現量は従来の BL21 (DE3) 株での発現に比べて約 3 倍増加した。

(3) マガイニン 2 とユビキチンとの融合蛋白質は富栄養培地である LB 培地では発現するが、貧栄養培地である M9 培地ではその毒性のために発現しなかった。pLysS プラスミドによって発現される T7 リゾチームは T7 RNA polymerase と結合しその転写活性を抑制するため、マガイニン 2 のような毒性ペプチドが leaky に発現してホストに負荷を与えるのを軽減する。今回、pLysS プラスミドを BL21 Star(DE3) に導入した BL21 Star(DE3)/pLysS をホストとして用いることによって、マガイニン 2-ユビキチン融合蛋白質を約 50 mg/L という実用的な収量で M9 培地で発現できるようになった。

2. 精製系の改良

ペプチドとユビキチンとの融合蛋白質は溶菌後、可溶性画分と不溶性画分（封入体画分）の両方にほぼ相当ずつ存在する。従来、封入体画分の融合蛋白質は可溶性画分とは別にグアニジン塩酸によって可溶化し、精製・refolding を行っていたため、1 つの培養サンプルについて 2 回精製作業を行う必要があった。

今回、操作を簡略化するために可溶性画分と不溶性画分とに分離せず、菌体を 6 M グアニジンを含む buffer で破碎・可溶化し、精製・refolding を行った。精製作業は半分になったにもかかわらず、マストパラン X-ユビキチン融合蛋白質の収量は以前の約 1.5 倍に増加した。

3. 誘導前の菌体濃縮の効果

Marley らは「非ラベル培地で培養した菌体を安定同位体ラベル培地に移す前に菌体を濃縮しておくことによって、単位ラベル培地当たりの発現量を増やすことができる」と報告している (2)。この方法の有用性を確認するために、マストパラン X-ユビキチン融合蛋白質を発現させる菌を 8 倍に濃縮した後に ^{15}N ラベルした M9 培地に移して誘導を行った。

菌を 8 倍に濃縮することによって融合蛋白質の収量は 2 倍に増えたものの、 ^{15}N のラベル化率は約 50% と低かった。なお、菌を濃縮していない物はほぼ 100% ラベルされていた。Marley らの方法は、菌体の濃縮・ラベル培地による菌体の洗浄といった余計な手間がかかる割には、必ずしも質の良いサンプルが得られないように思われる。

4. ^{15}N ラベルしたマガイニン 2 の HSQC スペクトル

我々は脂質ベシクルに結合したマガイニン 2 の構造を TRNOE によって決定しているが (3)、マガイニン 2 の ^1H シグナルは分離が悪いために、構造決定にはかなりの困難があった。マストパラン X のシグナルの分離は安定同位体ラベルによって向上したので、マガイニン 2 のシグナルも向上すると期待された。実際、 ^{15}N ラベルしたマガイニン 2 の水溶液の HSQC スペクトルは良い分離を示した。そこで、安定同位体ラベルはランダムコイル状態のペプチドのシグナルの分離を向上させるのに有用であることが確認された。

(1) Kohno et al. (1998) *J. Biomol. NMR* 12, 109-121.

(2) Marley et al. (2001) *J. Biomol. NMR* 20, 71-75.

(3) Wakamatsu et al. (2002) *Biopolymers* 64, 314-327.

NMRによる大腸菌由来 DNA 修復蛋白質 Ada の Cys69 メチル化による
立体構造変化解析
(阪大院薬) ○瀧之脇浩人、松田安弘、吉田卓也、小林祐次、大久保忠恭

NMR Study of Cys69 Methylation Induced Conformational Change of
Escherichia coli DNA repair protein Ada

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

○Hiroto Takinowaki, Yasuhiro Matsuda, Takuya Yoshida,
Yuji Kobayashi and Tadayasu Ohkubo

The N-terminal 16kDa domain of *Escherichia coli* DNA repair protein Ada (N-Ada16k) is converted into a transcriptional regulator for methylation-resistance genes by the transfer of a methyl group from a DNA methylphosphotriester to its own Cys69 residue. To investigate the DNA recognition mode and the functional switch mechanism of Ada protein, solution structures of methylated N-Ada16k (me-C69 N-Ada16k) has been determined by NMR. The structures calculated with NOEs revealed that me-C69 N-Ada16k consisted of a four-stranded β -sheet and six α -helices. The comparison of HSQC spectra between N-Ada16k and me-C69 N-Ada16k show that the conformational change at the four-stranded β -sheet region in the vicinity of Cys69. Furthermore, the DNA binding mode of meC69 N-Ada16k has been elucidated by HSQC spectra of meC69 N-Ada16k complexed with synthetic DNAs derived from *ada* or *alkA* promoter sequence. These results indicate that the difference of the mechanism of transcriptional regulation by meC69 N-Ada16k between *ada* and *alkA* is caused by the position of consensus sequence on *ada* or *alkA* promoter.

化学物質による DNA のランダムなメチル化は塩基対のミスマッチを引き起こし生物にとって致命的な影響を与える。大腸菌では、DNA のメチル化による損傷は Ada 蛋白質を中心とした適応応答により修復されることが知られている。

Ada 蛋白質の N 末端 16 k Da (N-Ada16k) のドメインはメチル化されたリン酸骨格に対する DNA 修復を行う。まず、N-Ada16k は DNA メチルトランスフェラーゼ活性により DNA 上のメチル基を自身の Cys69 のチオール基に転移して、DNA 損傷を修復する。次に、メチル基が Cys69 に転移されることがトリガーとなって、N-Ada16k は転写制御因子に機能をスイッチし *ada* レギュロンと呼ばれる一群の DNA 修復酵素遺伝 (*ada, alkA, alkB, aidB*) のプロモーター領域に DNA 配列特異的に結合する。そして、転写制御因子として作用し

キーワード ; DNA 修復蛋白質 Ada、転写制御因子、メチル化修復、NMR、立体構造決定

著者ふりなが ; ○たきのわきひろと まつだやすひろ よしだたくや こばやしゆうじ
おおくぼただやす

大腸菌の DNA 修復系を活性化する。この時、Cys69 がメチル化された N-Ada16k(me-C69 N-Ada16k)は *ada* 遺伝子に対してはリプレッサーとして作用し、*alkA* 遺伝子に対してはアクチベーターとして作用する。我々は N-Ada16k の転写制御のスイッチ機構を原子レベルで解明するために NMR による立体構造解析に着手した。

N-Ada16k(146 残基)の大量発現系を構築し、選択的にメチル化の処理を行った meC69 N-Ada16k を得た。安定同位体ラベル及び多核多次元 NMR 法を用いてほとんどすべての NMR シグナルの帰属を行った。NOE を用いた構造計算の結果、me-C69 N-Ada16k は 6 個の α ヘリックスと 4 つのストランドからなる β シートを持つこと、中央部にはフレキシブルなループが存在して 2 ドメイン構造をとっていることが明らかになった。C 末側の 4 本のヘリックスに転写制御因子に普遍的に見出される DNA 結合モチーフであるヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) 構造を見出した。また N-Ada16k と me-C69 N-Ada16k の HSQC スペクトルの比較を行った所、N 末側、特に Cys69 近傍の β シート付近ではケミカルシフトの変化が顕著であったにも関わらず、C 末側の HTH 領域はほとんど変化がなかったことが明らかになった。さらに、*ada* 遺伝子及び *alkA* 遺伝子のプロモーター領域のコンセンサス配列を含む 2 本鎖 DNA (*ada21mer*, *alkA21mer*) と me-C69 N-Ada16k の複合体の HSQC スペクトルの比較を行った。その結果、メチル化した蛋白質は複合体を形成することで、 β シート領域と HTH 領域のアミドプロトンのシグナルが変化していた。また、*ada21mer* と *alkA21mer* DNA 複合体の HSQC スペクトルの間にはほとんど変化はなかった。このことは *ada* と *alkA* のそれぞれのプロモーター領域に対して me-C69 N-Ada16k は同じ結合モードで DNA に結合していることを示している。以上のことから me-C69 N-Ada16k の転写制御に対する機能スイッチ機構を考察し *ada*, *alkA* 遺伝子に対する転写調節機構の違いは *ada* と *alkA* の各プロモーター上のコンセンサス配列の位置の違いを巧みに利用したものであると考えられた。

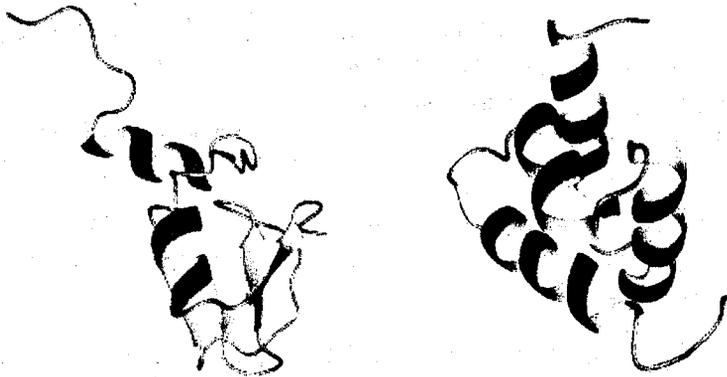


Fig1: Solution structure of N-terminal domain (1-73, left) and C-terminal domain (82-146, right) of me-C69 N-Ada16k

¹H NMR によるゲル化に伴う
ゼラチン鎖のダイナミクスの変化に関する研究
(東水大水産)○阿部 絹子、松川 真吾、渡部 徳子

¹H NMR Studies on the Change of Dynamics in Gelatin Solution during Sol-Gel Transition

○Kinuko Abe, Shingo Matsukawa, Tokuko Watanabe

Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries,
4-5-7, Konan, Tokyo 108-8477, Japan

The change of diffusional behavior of gelatin chain was studied by employing ¹H pulsed-field gradient stimulated echo sequence with varying observation time to elucidate the change of the inhomogeneous structure of gelatin system. We assumed that the vacant space (pore) is sphere and the inner-sphere diffusion of gelatin chains is restricted but the inter-sphere diffusion is free. From this analysis, we decided inner-sphere and inter-sphere diffusion coefficients and radius of the pore.

【目的】ゼラチン水溶液は、温度低下に伴いゼラチン鎖がトリプルヘリックスを形成することにより、三次元網目構造が形成され、最終的にゲル化することが知られている。このような構造変化は系内の物質の拡散挙動に影響する。本研究では、拡散時間 Δ (=パルス磁場勾配間隔) を変えてパルス磁場勾配NMR測定を行うことにより、ゾル状態とゲル状態におけるゼラチン鎖の拡散挙動について考察し、ゾル-ゲル転移に伴うダイナミクスの変化に関する情報を得ることを目的とした。

【実験】**試料調製** ゼラチン(新田ゼラチン(株)、牛骨アルカリ処理)を蒸留水に懸濁し、室温で 30 分膨潤させ、その後 80℃で 10 分間加熱溶解し、8%ゼラチン水溶液を調製した。

測定方法 Bruker 社製 DRX300 分光器を用い、Δ = 7~250ms、磁場勾配継続時間 δ = 1, 2ms、磁場勾配強度 g = 32~1143 G/cm で Pulsed-Field Gradient Stimulated Echo 法によってゼラチン鎖の拡散係数を測定した。これらの測定は 20~50℃の温度範囲で行った。試料内の温度は光ファイバー温度計を用いて±0.1℃の精度で測定した。

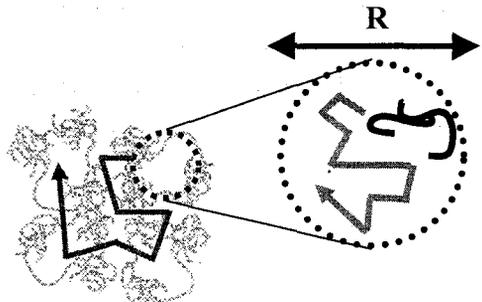


Fig.1 Schematic representation of the inter-sphere diffusion(left) and the inner-sphere diffusion(right)

【水溶液中におけるゼラチン鎖の拡散】水溶液中のゼラチン鎖の拡散が直径 R の球状の内包(制限空間)内の制限拡散であると考えると(Fig.1 右図)、信号強度は以下の式で表される¹⁾。

$$A_{2\tau, g\delta} / A_{2\tau, 0} = \varphi g \delta$$

$$= 9 \left(\frac{a \cos[a]}{(a)^3} \right)^2 + 6a^2 \sum_{n=0}^{\infty} \left((j_n'(a))^2 \sum_n \frac{(2n+1)\alpha_{nm}^2}{\alpha_{nm}^2 - n^2 - n} \exp\left(-\frac{\alpha_{nm}^2 D_{in}\Delta}{R^2}\right) \frac{1}{(\alpha_{nm}^2 - a^2)^2} \right) \quad (1)$$

Keywords :ゼラチン、緩和時間、拡散係数、ゾル-ゲル転移

あべきぬこ、まつかわしんご、わたなべとくこ

ここで、 $a = \gamma g \delta R$ 、 j_n は球ベッセル関数、 α_{nm} は $j_n' = 0$ の m 番目の根、 D_m は網目内包内でのゼラチン鎖の拡散係数である。さらに、この内包が比較的長いタイムスケールで移動する場合を考えた場合、内包が自由拡散しているとみなすことができる (Fig.1 左図)。これらの網目内包内でのゼラチン鎖の拡散と網目内包の拡散が独立に起こるのであれば、信号強度は次式となる。

$$A_{2\tau, g\delta} = F \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta D_{out}) \varphi_{g\delta} \quad (2)$$

D_{out} は網目内包の拡散係数、 F は Δ の間の T_1 と T_2 による減衰分であり、時間重みづけの平均 T_{av} を用いると、 $F = f \exp(-\Delta/T_{av})$ で表される。 f は観測されたゼラチン鎖に対する真の存在割合である。

ゾル状態及びゲル状態の各温度において、ゼラチン鎖の凝集状態を反映して、2成分の拡散成分が観測された。速い拡散成分は、1本鎖のランダムコイルとして存在する鎖であり、遅い拡散成分は会合したり、トリプルヘリックスを形成することにより分子量の大きな鎖であると考えられる。それぞれの成分の変位により、信号強度の減衰は次式となる。

$$A_{2\tau, g\delta} = F_{fast} \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta D_{out, fast}) \varphi_{g\delta, fast} + F_{slow} \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta D_{out, slow}) \varphi_{g\delta, slow} \quad (3)$$

$$\varphi_{g\delta, fast} = 9 \left(\frac{a \cos[a]}{a^3} \right)^2$$

$$\varphi_{g\delta, slow} = 9 \left(\frac{a \cos[a]}{a^3} \right)^2 + 6a^2 \sum_{n=0}^{\infty} \left(j_n'(a) \right)^2 \sum_m \frac{(2n+1) \alpha_{nm}^2}{\alpha_{nm}^2 - n^2 - n} \exp\left(-\frac{\alpha_{nm}^2 D_{in, slow} \Delta}{R^2} \right) \frac{1}{(\alpha_{nm}^2 - a^2)^2}$$

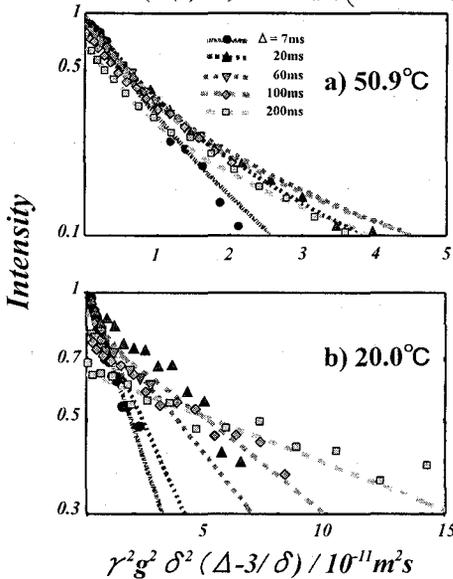


Fig.2 Spin echo attenuation for 8% gelatin solution and theoretical curves by Eq.3

Table.1 The radius of network domain and diffusion coefficients using Eq.3

Temp/°C	R / m	$D_{in, slow} / m^2 s^{-1}$	$D_{out, fast} / m^2 s^{-1}$	$D_{out, slow} / m^2 s^{-1}$
50.9	3.68×10^{-7}	1.34×10^{-10}	1.58×10^{-11}	3.40×10^{-12}
40.8	4.00×10^{-7}	1.33×10^{-10}	1.12×10^{-11}	2.89×10^{-12}
30.7	4.30×10^{-7}	1.50×10^{-10}	6.90×10^{-12}	1.69×10^{-12}
20.0	6.88×10^{-7}	5.00×10^{-12}	—	$< 10^{-13}$

但し、速い拡散成分について、 $\langle Z(\Delta) \rangle \gg R$ として(1)式中の第2項を省いた。しかし、ゲル状態の解析では、遅い拡散成分の寄与が大きくなることを考慮した。さらにゲル状態では網目内包の拡散は極端に小さくなり、網目内包内のゼラチン鎖の拡散が支配的になると仮定し、解析を行った。また、 T_{av} については、 $T_{av} \sim T_1 \sim T_2$ と仮定し、解析を行った。

【結果・考察】式(3)による解析結果を Fig.2、Fig.2 より求めた網目内包サイズ R と網目内包、網目内包内での拡散係数の温度依存性を Table.1 に示した。粘弾性測定によって求められたゾル-ゲル転移温度は、8%では 27°Cであるため、20°Cではゲル状態である。温度低下に伴い、拡散係数は減少するが、ゲル化に伴いその変化量は大きくなる。また、このとき網目内包サイズは大きくなる。これはゲル化に伴いゼラチン鎖が凝集することによるものであると考えられる。ゲル化点近傍の結果については当日発表する予定である。

Reference

1) B.Balinov, B.Jönsson, P.Linse, O.Söderman; *J. Magn. Reson. A*, **104**, 17-25(1993)

P 62

リボカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の立体構造決定と
疎水性低分子結合様式の解析

○乾正樹¹、乾隆^{2,3}、吉田卓也¹、裏出良博^{2,3}、小林祐次¹、大久保忠恭¹
(阪大院・薬¹、大阪バイオ研²、CREST・JST³)

Solution structure and lipophilic ligands binding mode of Prostaglandin D Synthase investigated by NMR

○Masaki inui¹, Takashi inui^{2,3}, Takuya Yoshida¹, Yoshihiro Urade^{2,3}, Yuji Kobayashi¹
Tadayasu Ohkubo¹

(Grad. School of Pharm. Sci. Osaka Univ.¹, Osaka Bioscience Institute², CREST・JST³)

Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) possesses dual functions as a PGD₂-synthesizing enzyme and a transporter for lipophilic ligands. Sequence analyses have revealed that L-PGDS is a member of lipocalin superfamily which is a diverse group of transporter proteins of small lipophilic molecules. L-PGDS also has the ability to bind various lipophilic ligands such as retinoid, bilirubin and biliverdin. To clarify the molecular mechanism for a wide variety of ligand binding, the solution structure of L-PGDS was determined by NMR. The overall structure of L-PGDS has a typical lipocalin fold consisting of an eight-stranded β -barrel and a long α -helix. The interior of the barrel forms a hydrophobic cavity. In addition, we have identified the retinoic acid binding site of L-PGDS by analyzing NMR chemical shift changes upon complex formation.

【目的】 分子量約2万のリボカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は中枢神経系において多量に発現し、脳内で PGH₂ から睡眠誘発に関与する PGD₂ への異性化反応を触媒する酵素である。さらに、アミノ酸配列の相同性から L-PGDS はリボカリンファミリーに属しており、様々な疎水性低分子のトランスポーターとしての性質も兼ね備えている。このように L-PGDS は脳内活動の制御に深く関与しており、副作用のない新たな睡眠薬等の開発のキーとなると考えられるので、L-PGDS の酵素反応機構、疎水性低分子との相互作用様式を原子レベルで解明するために NMR を用いて溶液中の立体構造を決定した。

キーワード

NMR リボカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 疎水性低分子結合 β バレル構造
運動性

いぬいまさき、いぬいたかし、よしだたくや、うらでよしひろ、こばやしゆうじ、
おおくぼただやす

【方法】 NMR 測定は、L-PGDS の安定性を高めるため疎水性低分子であるレチノイン酸を結合させ、100mM リン酸バッファー (pH8.0) 中、タンパク質濃度を 0.50mM の試料を用いた。主鎖の帰属は各種 2 次元、3 次元 NMR 測定法を用いて行い、167 残基中 155 残基を帰属した。各残基の C α 、C β 、C α H の化学シフトの値から 2 次構造の同定を行った(Fig.1)。三次元構造決定には ^{15}N edited NOESY、 ^{13}C edited NOESY 法を用いて NOE を集め、X-PLOR で立体構造計算を行った。

【結果および考察】 得られた L-PGDS の立体構造は 2 本のヘリックスと 9 本の β ストランドからなっており、他のリポカリンファミリーと同様に 8 本の β ストランドによるバレル構造をとっていることが明らかとなった(Fig.2)。さらに、 α ヘリックスの相対位置、バレルの入口及び底の大きさも類似していた。次に遊離型の L-PGDS の ^{15}N - ^1H HSQC との比較によりレチノイン酸結合部位を同定した。これによりバレル構造の入口付近においてループを形成する G113、T114、K115、G116 に顕著な HSQC のスペクトル変化が観測された。また、ストランド D、E、F においても HSQC スペクトル変化が観測された。これらの結果からレチノイン酸結合にはバレル構造の入口付近に位置するループ部分及びストランド D、E、F を含むバレルの側面が関与すると考えられる。また、主鎖の運動性の変化を調べた結果も併せて報告する。

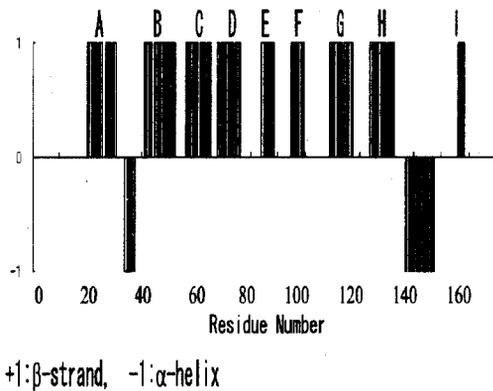


Fig.1 Chemical Shift Index of L-PGDS

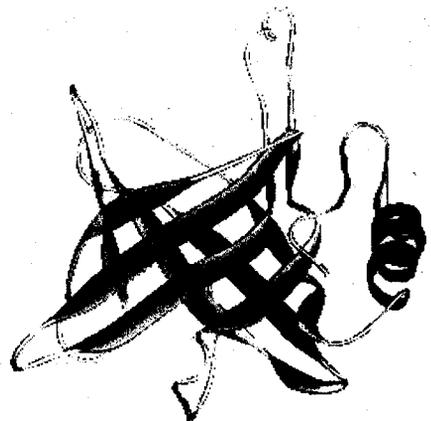


Fig.2 Solution structure of L-PGDS

NMRによる水、シリコン油及び界面活性剤系で生成するバイコンティニュアス相の状態分析

(株)資生堂 安全性分析センター 分析研究室)○木村朋子、渡辺啓、小松一男

NMR study of bi-continuous phase by Water/ Silicone Oil /Surfactant

(Safety & Analytical research center ,Shiseido co. Ltd.,)

Tomoko Kimura, Kei Watanabe, Kazuo Komatsu

The "bi-continuous" phase was observed in a specific composition with completely balanced hydrophilicity and lipophilicity in a water/Silicone oil/surfactant system. The "bi-continuous" phase has an oil -and water -continuous microstructure, showing an affinity with both aqueous and oily substances. In this study, NMR self-diffusion coefficient measurements showed by means of evidence that this phase was "bi-continuous", and was found useful in study of the phase diagrams, not only the "bi-continuous" phase but also micellar solution or lamellar liquid crystal.

【序】

水、油分及び界面活性剤で構成される系では、その組成比により様々な溶液状態が形成される。これらの組成比を変えて調製した種々のサンプルの状態観察で得た相図からは、ミセル相、逆ミセル相、液晶相及びバイコンティニュアス相等種々の構造を持つ領域が見出される。バイコンティニュアス相は、低粘度で透明な溶液で、ミセル相及び逆ミセル相等とは異なり、油水分間の界面張力が極小となる物理化学的特徴を有しており、水及び油が連続的な特殊な相である。このため、液晶状態等とは異なり規則性が低く、「ゆらぎ」の大きい状態であることから、分光学的に詳しく構造を解析した報告例は少ない。この相の確認については、電気伝導度測定及びフリーズフラクチャー法によるレプリカ調製技術を利用した透過型電子顕微鏡観察や、NMRによる自己拡散係数(D_{self})による報告例がある*)。我々は、油分としてシリコン油、界面活性剤としてポリオキシエチレン脂肪酸グリセリルを用い、エタノールをコサーファクタントとして調製した系で、バイコンティニュアス相が形成されていることを観察したが、この領域内の組成比を変化させたときの水及びシリコン油の D_{self} 値の変化を測定することで、本領域が、水及び油の連続的に変化したバイコンティニュアス相であることを実証するとともに、本法が系全体の状態解析にも有用であることを明らかにした。

【実験】

装置は、JNM ECP-400(日本電子)・共鳴周波数(¹H; 399. 0MHz)及び、磁場勾配ユニット(最大磁場勾配強度; 60gauss/cm)を用いた。パルスシーケンスは基本的に知られる Stimulated-echo 法では、渦電流による位相の乱れが生じたため、Stimulated-

キーワード: 自己拡散係数、バイコンティニュアス相

きむらともこ、わたなべけい、こまつかずお

echoに2組の磁場勾配パルスを加え、FIDの取り込み前にプローブ内の渦電流を消すための待ち時間(t_e)を組み込んだ方法を用いて行った。

試料は、検出コイル外での拡散の影響を避けるために、シゲミ製2重管を用いてサンプル高さ 10mmに調製した。

【結果と考察】

本実験で用いた系の相図をFig. 1 に示した。

ミセル相では、水のDsel値は自由拡散と同等の大きさであるのに対して、シリコン油のDsel値は運動が制限

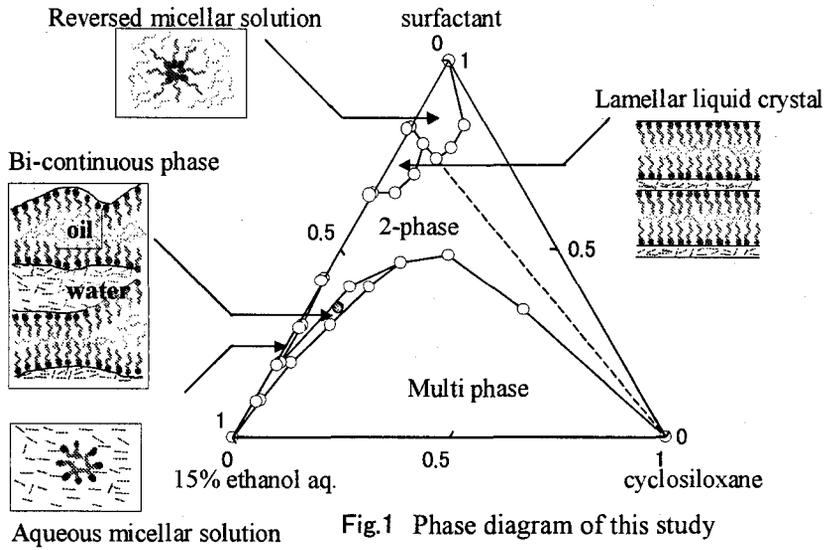


Fig.1 Phase diagram of this study

されているために自由拡散状態に比べ小さい値を示した。これは、ミセル相は水の中に親水基を外側に向けた界面活性剤ミセル相に取り込まれた油分が存在する構造を有するためである。反対に、逆ミセル相では、シリコン油の中に疎水基を外側に向けた界面活性剤逆ミセル相に水が取り込まれた構造を有しているため、水のDsel値は制限を受けているためにかなり小さくなり、シリコン油は自由拡散に近い値を示した。これらの領域中では、その組成比が変化しても水及びシリコン油のDsel値はほぼ一定の値を示した。また、水の組成比を変えずにシリコン油の割合を多くしたラメラ液晶と考えられる相のDsel値を測定した結果、水のDsel値は一定で、シリコン油のDsel値は配合量が増えるに従って大きくなる傾向が確認された。これは、液晶の間隔が水相は一定であるのに対し、シリコン油相がだんだん広がっていくために、拡散の制限を受けにくくなっているためであると考えられた。

一方、水と油が連続的な相を形成しているバイコンティニュアス領域でのDsel値は、シリコン油の組成比が高まるに連れて、シリコン油は連続的に大きくなり、逆に水は小さくなる傾向を示した。これは、この領域の水とシリコン油の相が連続的に変化していく状態を反映しているものと考えられた。

このように、水及び油のDsel値は、系の構造とよく一致しており、NMR測定が系の構造解析に役立つことが確認できた。特に、バイコンティニュアス相においては、水及び油が連続して変化する特殊な相であることが実証できた。

【文献】

- *) C.Solans, R.Pons, S.Zhu, H.T.Davis, D.F.Evans, K.Nakamura, and H.Kunieda; Langmuir, Vol.9, No.6, p1479-1482,1993

(東工大院理工・高分子センター) ○山根祐治、松井政徳、木村英昭、黒木重樹、安藤勲

Diffusional behavior of amino acids in polymer gels and network structure of gels
as studied by ^1H pulsed field-gradient spin-echo NMR methodYuji Yamane, Masanori Matsui, Hideaki Kimura, Shigeki Kuroki and Isao Ando
(Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology)

The diffusion coefficients (D) of amino acids in gels used as a solid-phase peptide synthesis have been determined in the temperature range from 30 to 50°C by means of the ^1H pulsed-field-gradient spin-echo NMR method. From these experimental results, it was found that dependence of the diffusion coefficients of amino acids in various polymer gels on the nature and molecular weight of amino acid was elucidated and was sensitive to the degree of volume swelling, and the effect of heterogeneity in the network size was significantly clarified as studied by time-dependent diffusion experiments.

【緒言】

本研究で対象とした PS (polystyrene) ゲルは、イオン交換樹脂、カラム、触媒の支持体、Merrifield のペプチド固相反応場として利用されている。これらの物性や機能の発現は、網目鎖の構造やダイナミクス、網目鎖と溶媒分子またはプローブ分子との分子間相互作用、さらに、これに関連したプローブ分子の拡散過程と密接な関係がある。これまでに、PS ゲル中の溶媒及びアミノ酸の拡散過程について、体積膨潤度・アミノ酸濃度・温度依存性を明らかにし^{1) 2)}、本手法をペプチド固相反応場において、溶媒及び反応基質の拡散速度・過程の解析に展開している^{3) 4)}。本研究では、固相反応場中のアミノ酸の拡散過程を ^1H パルス磁場勾配スピネコー (pulsed-field-gradient spin-echo : PFGSE) NMR 法により明らかにし、得られた拡散係数から、反応基質と反応活性点との衝突頻度を計算し、反応温度・基質の種類・固相担体について比較検討した。また、PS ゲル中のアミノ酸の拡散過程の解析を通して、高分子ゲルのネットワーク構造の不均一性を評価する手法の開発を行った。

【実験】

NMR 測定は非常に強い磁場勾配(最大 2200G/cm)を発生できる磁場勾配ユニットを付属した日本電子製 GSX-270NMR 分光器を用い、測定温度は 30°C~50°C で、 ^1H PFGSE NMR 法により高分子ゲル中のアミノ酸の自己拡散係数 D を決定した。 $k = \gamma^2 G^2 \Delta^2 / 3$ とすると、次式により D を決定した。

磁場勾配 NMR、ポリスチレンゲル、アミノ酸、ネットワーク、制限拡散

やまねゆうじ、まついまさのり、きむらひであき、くろきしげき、あんどういさお

$$\frac{A(\delta)}{A(0)} = f_1 \exp(-D_1 k) + f_2 \exp(-D_2 k) \quad (1)$$

ここで、拡散係数が D_1 の核の分率を f_1 、拡散係数が D_2 の核の分率を f_2 とした。ただし、 $f_1 + f_2 = 1$ である。

また、高分子ゲルのネットワーク構造の不均一性を評価するために、得られる拡散係数の観測時間依存性を詳細に調べた。この際、観測時間 Δ は 1ms ~ 100ms まで変化させた。

アミノ酸は Boc-Gly、Boc-L-Phe、Boc-L-Trp、Boc-L-Asn、Fmoc-Phe 等を用いた。高分子ゲルとして乾燥状態で直系 100 μ m ~ 200 μ m のビーズ状のゲルを選び、MPS(Merrifield polystyrene network)ゲル、PEG-PS(polyethylene-glycol grafted polystyrene network)ゲル及び CLEAR(cross-linked ethoxylate acrylate)ゲルを用いた。

【結果と考察】

<A> 固相反応場中のアミノ酸の拡散過程

Table 1 に、固相反応場として利用されている 4 種類のゲル中の Boc-L-Phe、Boc-L-Trp 及び Fmoc-L-Phe の拡散係数の測定結果を示す。これらのゲル中のアミノ酸分子の拡散係数は測定のタイムスケール ($\Delta = 10$ ms) において、2 成分以上の拡散成分が存在し、例えば Boc-L-Phe について、ジビニルベンゼン (DVB) 2mol% で架橋された MPS ゲル中では 80%、DVB1mol% で架橋された MPS ゲル中では 60%、PEG-PS ゲル中では 70%、CLEAR ゲル中では 70% の遅い (平均化された) 拡散成分が存在することがわかった。これらの拡散成分の割合は、温度依存性 (30 $^{\circ}$ C ~ 50 $^{\circ}$ C) が確認されなかった。遅い拡散成分は、ポリマー鎖近傍を移動し、ポリマー鎖と相互作用をしているアミノ酸分子を反映し、その他の速い拡散成分はポリマー鎖との距離の違いにより決まり、比較的束縛を受けてないアミノ酸分子の拡散成分を反映したものと考えられる。このため、ゲル中のプローブ分子の拡散過程は巨視的に見れば均一であるが、実際には拡散速度の広い分布を持っていることが示された。今回用いた固相反応場として利用されている 4 種類のゲル中のアミノ酸についても、10ms の測定のタイムスケールで拡散係数の分布を得た。さらに異なるゲル中においても、アミノ酸分子が同一の速度で移動している成分があることが確認された。予稿集では省略させていただくが、本討論会では、反応基質と反応活性点との衝突頻度を比較したグラフ及びマップを紹介する。

Table 1 Determined diffusion coefficients of amino acids in gels

Amino acids (M.W.)	solution	MPS resin	MPS resin	PEG-PS resin	CLEAR resin
		DVB2mol%	DVB1mol%		
		Diffusion coefficient / $10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$		(Degree of volume swelling)	
Boc-L-Phe (265.30)	D_{fast}	6.43	21.4	14.2	17.3
	D_{slow}	2.08	8.82	9.17	12.5
Boc-L-Trp (304.34)	D_{fast}	7.26	12.0	12.3	17.1
	D_{slow}	2.43	5.16	7.04	10.8
Fmoc-L-Phe (387.43)	D_{fast}	8.42	11.5	11.4	14.0
	D_{slow}	2.40	4.22	5.61	8.46

高分子ゲルのネットワーク構造の不均一性

一般に、高分子ゲルは不均一なネットワーク構造を有していると言われている。これまでに、静的/動的な光散乱を利用して、網目鎖の局所的な揺らぎを観測し、ゲルについて網目鎖の相関長についての評価がなされている。しかし、膨潤ゲルのネットワークサイズの分布を精密に評価する手法は確立されていない。また、高分子ナノキャビティーを有する材料を評価するには、平均的なキャビティーサイズとキャビティーサイズの分布の評価が不可欠であり、特に分布を制御することは、ナノ空間を利用した材料が、安定な機能を発揮できるかを決定する因子といえる。例えば、分離膜において、キャビティーの欠陥は機能を大幅に落とす原因となる。今回の実験で、高分子ゲルのキャビティーサイズの分布を評価する手法に発展しうるデータが得られた。具体的には、ポリスチレンゲル中のアミノ酸分子の拡散係数の分布が観測時間に依存することを見出した。一般に、ネットワークキャビティー中のプローブ分子の拡散速度はキャビティーサイズに大きく依存する。しかし、通常の拡散係数の測定では観測時間（拡散距離）が長いため、拡散係数は平均化された一成分のみ得ることができる。一方、超高磁場勾配を用いて、観測時間を短くしたところ、ポリスチレンゲル中のアミノ酸分子の拡散係数について、拡散係数の分布が得られ、拡散係数の分布と観測時間の関係を明らかにすることができた。これは、プローブ分子の拡散速度の分布から、高分子ゲルのネットワークサイズの不均一性を捉えたものである。

PFGESE NMR 法により決定される D は観測時間 Δ に依存し、プローブ分子を t 時間拡散させて測定した D と t 時間後の z 方向への自乗平均拡散距離 $\langle z^2 \rangle$ との関係は次式のようになる。

$$\langle z^2 \rangle = 2Dt \quad (2)$$

今回の測定において t は Δ として良い。また、平均拡散距離 $\langle z \rangle$ は次式のように表すことができる。

$$\langle z \rangle = 2\sqrt{\frac{D\Delta}{\pi}} \quad (3)$$

$\langle z \rangle$ は測定時間内に拡散した距離であるので、測定において、一辺 $\langle z \rangle$ に分割したゲルを観察していることになり、得られた D は分割されたゲルの特徴を反映している。つまり、 $\langle z \rangle$ は分解能と言っても良い。式 (3) より求めた $\langle z \rangle$ は用いたゲルのネットワークサイズ (数 10nm) より大きい、ゲルビーズの直径 (100 μm ~ 200 μm) より小さい。自乗平均拡散距離の計算をすることは、得られた D がどの程度の大きさのドメインサイズを反映したものなのかを理解するうえで非常に重要なことであり、得られる拡散

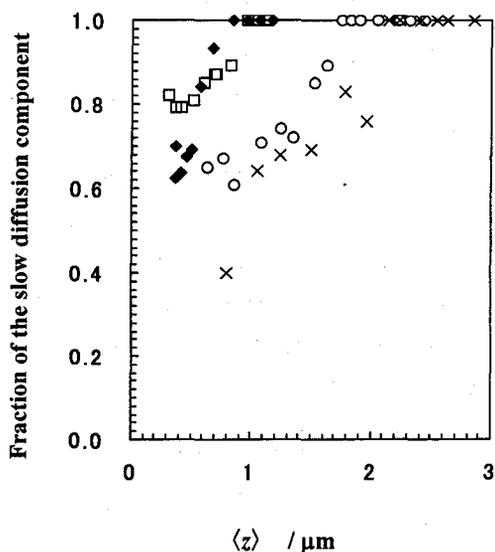


Figure 1. Dependence of the fraction of slow diffusion component of Boc-Phe10wt% (solvent : DMF- d_7) in MPS (DVB1mol% cross linking) gels (O), MPS (DVB2mol% cross linking) gels (◆), MPS (DVB5mol%) gels (□) and CLEAR gels (×) on the diffusion distances $\langle z \rangle$ of slow diffusion component in the experimental times at 30 °C.

成分が多成分から単一成分へと変化するドメインサイズが、ゲル中のプローブ分子の拡散過程に関して、ゲルが均一なドメインサイズと決定することができる。

架橋密度の異なる MPS ゲル及び CLEAR ゲル中の Boc-L-Phe について、遅い拡散成分の割合 f_{slow} を $\langle z \rangle$ に対してプロットした結果を Fig.1 に示す。 f_{slow} は、 $\langle z \rangle$ の増加とともに増加し、1.0 になることがわかる。これより、ゲルが均一なドメインサイズを決定することができ、この時の $\langle z \rangle$ が大きいほどゲルの不均一性は大きいことになる。MPS (DVB5mol%) は $\langle z \rangle = 970\text{nm}$ ($\Delta = 50\text{ms}$)、MPS (DVB2mol%) は $\langle z \rangle = 841\text{nm}$ ($\Delta = 20\text{ms}$)、MPS (DVB1mol%) は $\langle z \rangle = 1.80\mu\text{m}$ ($\Delta = 40\text{ms}$)、CLEAR は $\langle z \rangle = 2.14\mu\text{m}$ ($\Delta = 30\text{ms}$) で f_{slow} が 1.0 になることがわかる。体積膨潤度は Table 1 に示してあるが、体積膨潤度が大きくなるとゲルの不均一性が大きくなることが理解できる。また、ゲルビーズの直径の異なるサンプルについても同様の実験を行ったところ、架橋密度が同程度であるにもかかわらず、ビーズの直径が大きなゲルの方が不均一性が大きいことが観察された。本討論会では、プローブ分子を変化させた場合も同様な結果が得られるか、また温度を変化させた場合はどうなるか、さらに数種類のゲルの不均一性について報告する予定である。

Fig.2 に MPS (DVB2mol%) ゲル中の Boc-L-Phe について得られた拡散係数の Δ 依存性をプロットした。測定のタイムスケール $\Delta = 20\text{ms}$ において、得られる拡散係数が平均化され、このタイムスケールでゲル中の Boc-L-Phe の拡散過程は均一に見えている。ここで、短い Δ での測定で拡散係数の分布を得ているが、この分布の仕方はゲルのネットワーク構造を反映していると考えられ、今後本手法が発展すると架橋構造の推測ができると思われる。今回の測定では、拡散係数の分布が正規分布ではなく多く(半分以上)の遅い拡散成分が観察されたこと、短い Δ においてもかなりの遅い拡散成分が存在すること、さらに遅い拡散係数が平均の拡散係数に近いことから、今回用いたゲルはネットワークサイズが正規分布しているのではなく、一定サイズのネットワークを有するが局所的に未架橋部分が存在し、ネットワークの欠陥(大きなサイズのネットワーク)が存在すると推測できる。

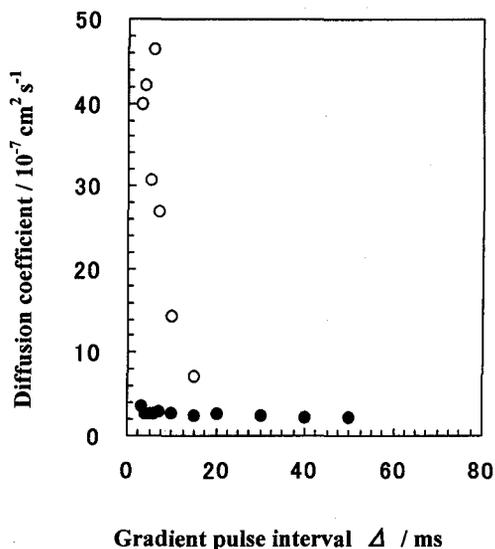


Figure 2. Dependence of the diffusion coefficients of the fast(○) and slow(●) diffusion component of Boc-L-Phe 10wt% (solvent : DMF- d_7) in MPS (DVB2mol% cross linking) gels on the gradient pulse interval Δ at 30 °C.

- 1) Yamane, Y.; Kobayashi, M.; Kuroki, S.; Ando, I. *Macromolecules*, 34, 5961-5967(2001).
- 2) Yamane, Y.; Kobayashi, M.; Kimura, H.; Kuroki, S.; Ando, I. *Polymer*, 43, 1767-1772(2002).
- 3) Yamane, Y.; Matsui, M.; Kimura, H.; Kuroki, S.; Ando, I. *J. Appl. Polym. Sci.*, in press.
- 4) Yamane, Y.; Kuroki, S.; Ando, I. *Network Polymer(in Japanese)* in press.

Measurement of restricted self-diffusion coefficients in the plant cell by PFG-NMR
(Institute for Molecular Science) Osamu OISHI

The diffusion coefficient of the water in the root cell of a carrot was measured by the PFG-NMR method, changing diffusion time between 1-100ms, in order to see the restricted self-diffusion coefficient of water in plant cell. The result showed the following things. i) The water in a carrot cell showed the feature of the restriction space which is not seen with the water of a bulk system. ii) It suggested that one of the boundary space existed near about 10 micrometer as root mean square distance.

【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。動植物の細胞の水分子は細胞膜や小器官の膜によって閉じられた系の中に存在するために、その拡散は制限されたものとなり、制限の無い bulk な系と異なった特性を示す。そのため閉じられた系での見掛けの拡散係数を拡散時間を変化させながら測定することにより、逆にその閉じられた系の大きさ等を推測することができる。今回の研究では、植物細胞中の水の拡散係数を、拡散時間を 1ms-100ms まで変化させながら測定した。

【実験】

1. 装置：0.93T(40MHz) の電磁石の NMR 装置に、磁場勾配発生コイルに四極コイルを用いた自作のプロープを用いて測定を行った¹⁾。
2. 試料：、市販の NMR5mm 管に入る大きさにニンジンの根幹細胞を切り取り、表面の水分を除去した後、NMR 管に封入した。
3. パルス系列：Figure 1 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 35℃ で測定した。パルス幅は拡散時間 Δ を 1-100ms まで変化させて、各拡散時間において磁場勾配パルス δ を 0.4-0.6ms まで 0.05ms おきに变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。
5. 測定：測定は同一試料で二回測定を行い拡散係数の時間変化を調べた。また試料依存性を見るために試料を取り替えて三回測定した。

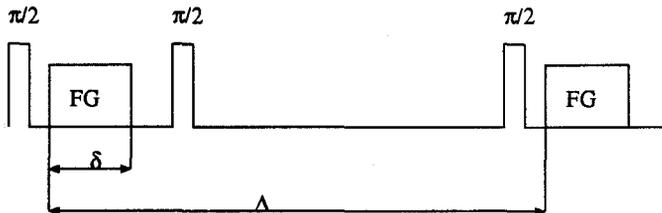


Figure 1. Pulse sequence for PFG-stimulated-echo

キーワード：パルス磁場勾配・自己拡散係数・制限空間・植物細胞

おおいし おさむ

6. 標準試料：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試料の測定条件において、ポリジメチルシロキサン、グリセリン、bulkの水、bulkのdimethylformamideを標準物質として拡散係数を測定して確認した。

【結果及び考察】

Figure 2a はニンジン細胞中の水の拡散係数を拡散時間に対してプロットしたものである。またニンジン中の水に対する比較として、同条件で測定した、bulkの水とニンジンとほぼ等しい拡散係数を持つdimethylformamideの拡散係数をプロットしている。bulkの水、dimethylformamideの拡散係数が拡散時間に依存せずほぼ一定なのと対比的に、ニンジン細胞中の水の見掛けの拡散係数は時間とともに減少して行き、制限系の特徴が見て取れる。ニンジンの拡散係数におけるデータのばらつきは主に試料に依存したものであり、拡散時間に無関係に拡散係数を増減させている事から、試料中で細胞内に閉じこめられた水とbulk的な環境の水の割合の違いが現れたものと示唆される。また、試料の時間変化による違いはほとんど見られなかった。

NMRで観測される見掛けの自己拡散係数(D)に対して拡散分子の二乗平均拡散距離(r)は拡散時間をtとして、 $r = \sqrt{2Dt}$ で示される。Figure 2b は二乗平均拡散距離の時間変化を示している。bulkな系における水とdimethylformamideの拡散係数は時間の平方根に対して直線的に変化して、その分子は無制限に広がっていく一方で、ニンジン中の水の拡散距離は制限の為に直線からずれる。またニンジンでは、平均拡散距離で約10 μmを境にして折れ曲りの傾向を見せており、このあたりに一つの境界があることが示唆される。

以上のようにして約6T/mの磁場勾配パルスを用いて1ms以上の拡散時間で、ほぼ問題なく細胞中の水の拡散係数を測定することができた。また1-5ms程度の拡散時間は10 μm程度の大きさの制限拡散が見える領域であるので²⁾、これらの結果から動物細胞や細菌の細胞内の制限拡散測定が装置的には可能であることが示された。

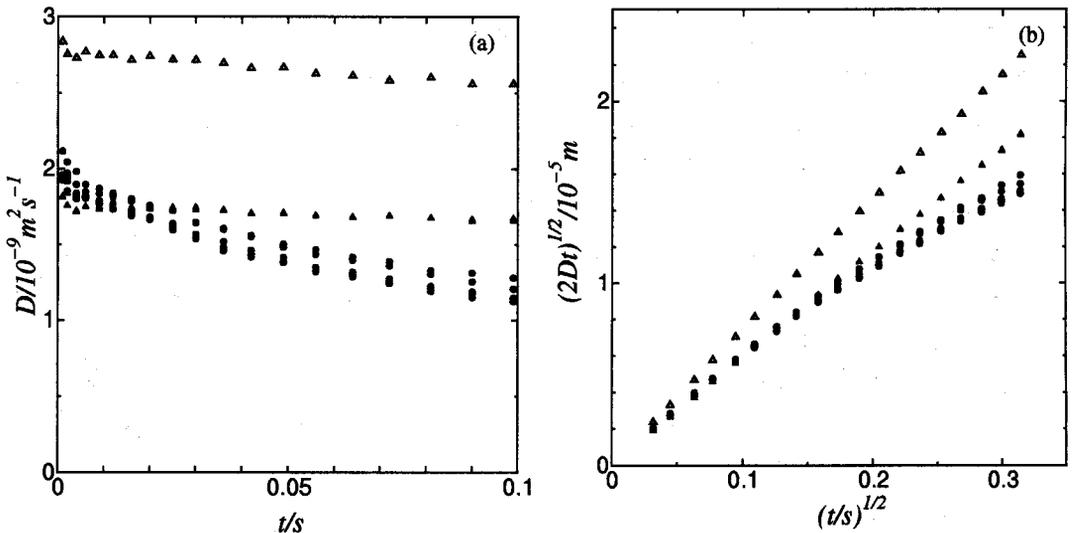


Figure 2. Self-diffusion coefficients(a) and root mean square distances(b) of water in carrot at 35°C

●:water in carrot cell, △:bulk water and ▲:dimethylformamide

1)Osamu OISHI and Seiichi Miyajima, J. Magn. Reson. A, 123, 64-71 (1996)

2)D. G. Cory and A. N. Garroway, Magn. Reson. Medicine, 14, 435 (1990)

*Two Dimensional NMR and Determination of Order Parameters of Optically Active Triazole Compounds in Chiral Liquid Crystalline Solution.*Makiko Sugiura¹, Atsuomi Kimura², Hideaki Fujiwara², Hiromi Haino¹, Masayoshi Ito¹¹Kobe Pharmaceutical University²School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University

Chiral triazole compounds, uniconazole (I) and diniconazole (II) which show antifungal and plant growth regulating activities, have been dissolved in PBLG-CDCl₃ chiral liquid crystalline solvent and their Het2DJ spectra have been measured to obtain dipolar coupling constants D_{CH} values. The orientations of the molecule in liquid crystalline phase have been calculated by means of the observed D_{CH} values. The small differences are observed on the calculated molecular orientations between I-S and II-R, which seem to be due to the enantiomeric difference.

【はじめに】ウニコナゾール (I), ジニコナゾール (II) など光学活性トリアゾール系化合物は、その光学異性体の活性に差があり、植物生長調節作用としては S 体が、殺菌作用としては R 体の方がそれぞれはるかに強い活性を有することが知られている。昨年の本討論会において、キラル液晶を溶媒として用いるキラル液晶 NMR 法の応用として、これら光学異性体が特に化学シフト異方性の差によって分離観測が可能であり、R/S 体の存在比をほぼ定量的に決定出来ることを明らかにした。

今回は、Het2DJ スペクトルから得られる結合定数から C-H 双極子結合定数を求め、それにより液晶中での配向パラメーターの計算を行い、R 体、S 体の配向の違いを検討した。

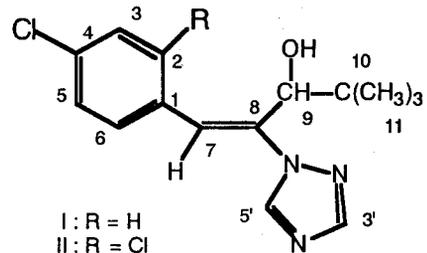
【実験】 I (R/S=21/79), II (85/15) それぞれを、Poly- γ -(benzyl-L-glutamate) (PBLG) - CDCl₃ 液晶に溶解し (I/PBLG/CDCl₃:

50/190/910, II/PBLG/CDCl₃: 70/190/810), サ

ンプルとした。液晶状態の確認は、²D NMR によって行った。NMR の測定は、Varian VXR-500 または INOVA-500 (¹³C:125.7 MHz, ²D:76.8MHz) を用い、いずれの測定も、

キラル液晶, 光学異性体, 直接結合定数, 配向パラメーター, トリアゾール系化合物

すぎうらまきこ, きむらあつおみ, ふじわらひであき, はいのひろみ, いたうまさよし



Lock なしで行った。

【結果と考察】 Het2DJ の測定によって得られる結合定数は、直結 C-H 間、遠隔 C-H 間共に、 $J_{CH} + D_{CH}$ となるため、双極子結合定数 (D_{CH}) は得られた結合定数から溶液の結合定数 (J_{CH}) を差し引いて得られる。I, II いずれも、光学異性体の存在比に片寄りがあるため、多量に存在するもの (I-S, II-R) については、

Het2DJ によって、遠隔 C-H 間についてもかなり細かく読みとることが出来たが、少量のもの (I-R, II-S) については化学シフト異方性によって分離観測される数個の芳香環炭素の直結 C-H 間しか読みとることが出来なかった。Table 1 に、得られた I-S 体, II-R 体の双極子結合定数 (D_{CH}) をまとめた。

これらの得られた値を用いて、それぞれの化合物について、液晶中での分子配向を計算した。得られた配向パラメーターの主値を Table 2 に、またその時の D_{CH} の計算値を、Table 1 に示した。

10 Hz 程度の実験誤差を考慮すると、いくつかの値を除いては、観測値と計算値は比較的良好に一致している。また、得られた分子の配向は、I-S 体と II-R 体ではわずかながら C-9, C-7 に差が見られる。これは、I, II の構造上の違いよりはむしろ S 体, R 体の立体構造の違いを反映しているものと思われる。

Table 1. Observed and Calculated C-H Dipolar Coupling Values .

I-S 体			II-R 体		
Vector	D_{ij}^{obs}/Hz	D_{ij}^{calc}/Hz	Vector	D_{ij}^{obs}/Hz	D_{ij}^{calc}/Hz
1C-2,6H	45.0	68.1	1C-6H	36.0	38.9
1C-3,5H			1C-3,5H	13.0	10.2
1C-7H	93.4	99.9	1C-7H	59.0	59.6
2,6C-2,6H	214.7	200.6	6C-6H	161.8	169.7
2,6C-6,2H	21.1	16.8	2C-6H	14.1	14.6
2,6C-3,5H	67.8	68.1	6C-5H	79.6	74.4
2,6C-7H	27.3	29.4	6C-7H	12.3	8.3
3,5C-3,5H	203.3	216.1	3,5C-3,5H	134.7	129.6
3,5C-5,3H	22.7	17.4	3,5C-5,3H	17.7	14.0
			3C-6H	11.6	3.5
3,5C-2,6H	72.2	66.4	5C-6H	80.6	75.6
4C-2,6H	7.9	8.2	4C-6H	12.6	10.0
4C-3,5H	59.6	71.4	4C-3,5H	60.7	58.9
7C-7H	-19.9	-19.8	7C-7H	23.1	25.3
8C-7H	34.0	33.8	8C-7H	32.0	36.9
8C-9H	52.0	57.2	8C-9H	68.7	60.4
8C-5'H	0.8	5.8	8C-5'H	12.0	9.0
9C-9H	185.0	185.0	9C-9H	186.4	186.4
3'C-3'H	-463.7	-454.4	3'C-3'H	-410.2	-419.2
3'C-7H	21.3	6.9	3'C-7H	14.1	16.5
			3'C-5H	12.6	5.9
5'C-5'H	459.2	469.1	5'C-5'H	353.3	360.9
			5'C-7H	29.7	31.2
5'C-9H	28.2	27.3	5'C-9H		
5'C-3'H	7.5	3.4	5'C-3'H	9.6	4.3

Table 2. The Estimated Principal Axes Order Parameters for I-S and II-R.

	I-S 体	II-R 体
$Sx'x'$	0.00027	-0.0580
Syy'	0.22026	-0.3648
$Sz'z'$	-0.22053	0.4228

Structural analysis of Na-montmorillonite by multi nuclei solid state NMR

Research Laboratory for Nuclear Reactors, Tokyo Institute of Technology¹,Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Laboratory²○Takahiro Ohkubo¹, Koji Kanehashi², Koji Saito², Moriaki Hatakeyama², Yasuhisa Ikeda²

The Na-montmorillonite has lamellar structure with parallel layers of tetrahedral silicate and octahedral aluminate sheets. Although it is very important to study its properties such as swelling with water, the layer structure of Na-montmorillonite has not been sufficiently examined. In this study, multi nuclei (²⁷Al, ²³Na, ²⁹Si, ¹H) solid state NMR were applied to Na-montmorillonite. ²⁷Al MQMAS experiments at high magnetic field indicate two cross peaks, it was evidenced that there are two different structures of aluminum in tetrahedral sheets. Moreover, the mobility of Na ion in the sample of 10wt.% water contents is better and quadrupolar coupling constant is larger than that of 7wt.%. It is concluded that multi nuclei solid state NMR is effective method in structural analysis of clay minerals.

1. 緒言

Na 型モンモリロナイトは、AlO₆八面体層を2つのSiO₄四面体層が挟み込んだ層を単位層とする層状粘土化合物である。単位層と単位層の間に交換性のカチオンを含む。今までのNMRによるモンモリロナイトの構造解析は、²⁹Si MASによる四面体層の縮重度の決定および²⁷Al MASによる層内Alの配位数の決定⁽¹⁾に適用されている。しかし²⁷Al MASによる構造解析は、四極子相互作用によるスペクトルの広幅化のために詳細な解析が困難であった。そこで今回、四極子相互作用を平均化できるMQMAS法を用いてNa型モンモリロナイト中のAl及びNaの構造を検討した。さらにSiおよびHについても、それぞれCP/MAS、CRAMPSを用い、Na型モンモリロナイトの層構造および含水効果を多角的に解析したところ、興味深い結果が得られたので報告する。

2. 実験

Na 型モンモリロナイトは、日本粘土協会により提供されているJCSS3101を用いた。試料の含水率は、カルルフイシャー水分計により測定し、室温での含水率10wt.%を標準試料とした。含水Na型モンモリロナイトは、標準試料に純水を加えて調整した。含水率7wt.%の試料は、標準試料を真空状態で200°C48時間脱水し調整した。

²³Na MQMAS および ²⁷Al MQMAS は、z-filter 型 3 パルスシーケンス⁽²⁾を用いた。また、¹H CRAMPS は、BR24 パルスシーケンスを用いた。スピナー格子緩和時間(T₁)は、飽和回復法により測定した。NMR スペクトルの取得に用いた装置と手法について、Table 1 にまとめる。

Table 1 Experimental terms of each nuclei.

Spectrometer	EX-270	CMX-300	ECA-700
Magnetic fields	6.35 T	7.05 T	16.4 T
Nuclei	²⁹ Si (I=1/2)	²³ Na (I=2/3)	¹ H(I=1/2)
Methods	CP/MAS	MQMAS	CRAMPS
Spinning rate	5.5 kHz	16 kHz	4 kHz
Resonance frequency	53.5 MHz	79.5 MHz	300 MHz
Reference	Silicon rubber -22.333 ppm	1.0 M NaCl aq. 0 ppm	Silicon rubber 0.119 ppm
			1.0 M AlCl ₃ aq. -0.1 ppm

3. 結果および考察

含水率の異なるNa型モンモリロナイトの²⁷Al MAS スペクトルは、AlO₆ユニット中のAl(Al_[6])に相当するピークとSiO₄ユニット中のSiを一部置換した4配位Al(Al_[4])に対応するピークを示すが、二次の四極子相互作用のために詳細な構造解析が困難である。そこで、二次の四極子相互作用を平均化できる

キーワード: 層状化合物、MQMAS、CRAMPS

おおくぼたかひろ かねはしこうじ さいとうこうじ はたけやまもりあき いけだやすひさ

MQMASによる測定を行った。Fig. 1は、16.4T下で測定した含水率10wt.%Na型モンモリロナイトの ^{27}Al 5QMAS スペクトル ($\text{Al}_{[4]}$ 領域を拡大)である。Fig. 1からわかるように、 $\text{Al}_{[4]}$ の2つのサイト(IおよびII)の存在が、「高磁場+MQMAS」の組み合わせにより初めて明らかになった。これらクロスピークは、アモルファス構造に由来するCS軸方向への分布を示す。また、含水率を7wt.%から10wt.%に変化させた試料のスペクトルは、ピークIIの強度が減少し、Iが増加する。よってピークIは、 AlO_4 四面体ユニットの酸素に水分子が水素結合した化学種に、IIは水分子と水素結合していない AlO_4 ユニット中のAlに相当している可能性がある。

次に ^{23}Na の T_1 および3QMASの測定を行い、層間Naイオンの状態及び運動性に関して検討した。含水率7wt.%と10wt.%の T_1 値は、それぞれ約0.01sおよび0.001sであり、少量の含水により著しい影響を受ける。この理由として、層間Naイオンの水和によりNaイオンの自由度が増し、運動性が向上したためだと考えられる。またFig. 2に示す ^{23}Na 3QMAS スペクトルも含水率によって大きな変化が見られた。含水率7wt.%のNaは、複数サイトに分布して存在しているが、含水率を増加させると(7wt.%→10wt.%)、明確な1サイトへと変化する事が明らかとなった。さらに2つの試料のMASスペクトルのシフト値はほぼ一定であるにもかかわらず、等方シフト値($\Delta\sigma$)は大きく変化しており、含水率10wt.%では四極子結合定数 $P_Q(=2\pi C_Q(1+\eta^2/3)^{1/2})$ が増加していることがわかった。この結果は、含水率10wt.%の状態は、Naイオン周りの立体的な対称性が低くなっていることを示唆している。

以上のことから、モンモリロナイトのような粘土鉱物の構造解析には、その材料を構成する各々の元素からの多角的なアプローチが非常に有効であることがわかった。当日は、 ^{29}Si CP/MAS および ^1H CRAMPS のスペクトルの結果も併せて報告する。また、さらに高い含水率(30wt.%)での構造解析結果についても報告する。

【参考文献】

- (1)D. Muller, W. Gessner, H.J. Behrens, G. Scheler, *Chem. Phys. Lett.*, 79 (1981) 59.
- (2)J.P. Amoureux, C. Fernandez, S. Steuernagel, *J. Magn. Reson.*, A123 (1996) 116.

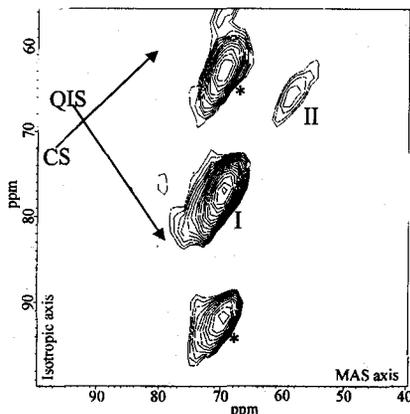


Fig. 1 ^{27}Al 5QMAS spectrum of Na-montmorillonite. excitation pulse width: 2.8 μs , conversion pulse width: 1.1 μs , z-filter pulse width: 14 μs , t_1 increment: 3.7 μs , pulse delay: 0.3 s, 1440 scans. * denote the spinning side bands.

Table 2 Quadrupolar parameters and spin-lattice relaxation time of Na site in the Na-montmorillonite.

	$\Delta\sigma/\text{ppm}$	P_Q/MHz	T_1/s
7wt. %	-14.1	9.69	0.01
10wt. %	-3.09	21.08	0.001

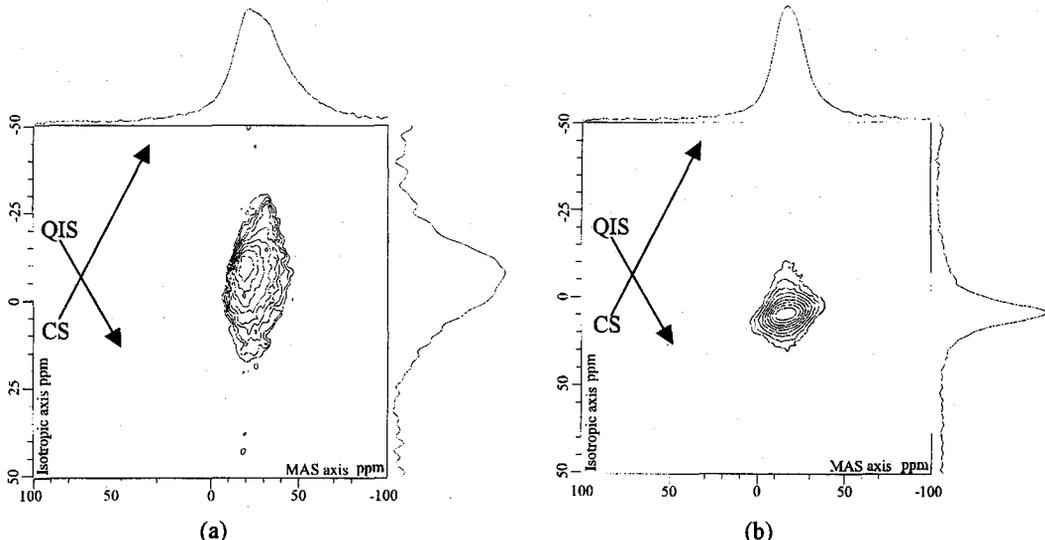


Fig. 2 ^{23}Na 3QMAS spectra of Na-montmorillonite. water contents: (a)7wt.% (b)15wt.%, excitation pulse width: 2.7 μs , conversion pulse width: 1.0 μs , z-filter pulse width: 14 μs , t_1 increment: 31.3 μs , pulse delay: (a)0.005 s (b)0.01 s, 24000 scans.

セクロピン A-マガイニンハイブリッド
抗菌性ペプチドの膜中での NMR 構造解析(農工大¹、国際基督教大²、(株)東レリサーチセンター³)○吹田宏英¹、鈴木悠¹、梅本公子²、川口謙^{1,3}、朝倉哲郎¹

Structural Study of Antimicrobial Peptide, Cecropin A-Magainin 2 Hybrid in Membrane by NMR

Kohei Suita¹, Yu Suzuki¹, Kimiko Umemoto², Ken Kawaguchi^{1,3}, Tetsuo Asakura¹¹ Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology,² Department of Chemistry, International Christian University, ³ Toray Research Center

The structure and orientation of antimicrobial peptide, cecropin A (1-8) - magainin 2 (1-12) hybrid, (CAMA;KWKLFKKIGIGIKFLHSAKKFG), in phospholipid bilayers was studied using ³¹P and ¹⁵N solid-state NMR. The [¹⁵N]L4 or [¹⁵N]A17 labeled CAMA together with [¹⁵N]F5 and [¹⁵N]A17 labeled CAMA were synthesized by solid phase method and were incorporated into a phospholipid bilayer, a mixture of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoyl-phosphatidylglycerol on the glass slides. ¹⁵N NMR spectra of the oriented CAMA samples show that the helical peptide is predominantly oriented in the plane of the lipid bilayer. The orientational behavior of the peptide analogue (W2→A2) was also studied with similar analytical method.

[緒言] CAMA はカイコ由来の抗菌性ペプチド cecropin A (1-8)とアフリカヒキガエル由来の magainin 2 (1-12)のシーケンスをハイブリッドさせた合成ペプチドである。オリジナルのペプチドである cecropin A と magainin 2 は両方とも、グラム陰性細菌にのみ特異的に作用するペプチドであるが、そのハイブリッドである CAMA は、オリジナルのペプチドよりも高い活性を示し、さらに、グラム陰性細菌のみならず、グラム陽性細菌、ならびに、一部の癌細胞にも活性を示すことが報告されている¹⁾。また、溶液 NMR を用いて、dodecylphosphocholine ミセル中において、中央の Gly-Ile-Gly をヒンジとした 2 本のヘリックスからなる構造であること、さらに、N 末端側に存在する Trp 残基の有無によって、ペプチドの構造および活性が大きく変化することが報告されている²⁾。本研究では、CAMA ペプチドの脂質二重膜中での配向構造を検討するために、ペプチドの N 末端側半分と C 末端側半部分を各々、¹⁵N ラベルしたペプチドを合成し、脂質二重膜中での CAMA ペプチドの配向構造を、配向構造に敏感な角度依存固体 NMR^{3),4)}を用いて検討した。また、活性および構造に重要な影響を及ぼすと考えられている Trp 残基に着目し、Trp 残基を他のアミノ酸に置換したことによる配向構造の変化を検討し、Trp 残基が配向構造に及ぼす影響を検討した。

[実験]

安定同位体ラベル CAMA ペプチドの合成

安定同位体ラベル部位を変えた 3 種類の安定同位体ラベル CAMA ペプチド(CAMA-L4, CAMA-A17, CAMA-F5A17)と Trp を Ala に置換した安定同位体ラベル CAMA ペプチド(CAMA(W2→A2)-L4, CAMA(W2→A2)-A17)を Fmoc 固相合成法により合成し、逆相液体クロマトグラフィーを用いて精製した。

NMR サンプル試料調製

DMPC/DMPG/CAMA を 7:3:1 の割合で混合し、CHCl₃/CH₃OH に溶解させ、ガラスプレート上に展開した後、乾燥させた。それを Fig.1 のようにサンプルホルダーに詰め、水和率 60%に調整した後、両端を密封し、脂質二重層を形成させた^{5),6)}。

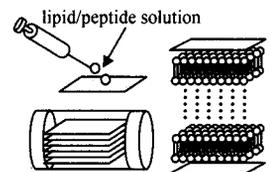


Fig.1 Sample preparation for solid state NMR observation. Oriented samples on glass plate are stacked in a glass tube.

抗菌性ペプチド、脂質二重膜、固体 NMR、配向構造、安定同位体ラベル

すいた こうえい、すずき ゆう、うめもと きみこ、かわぐち けん、あさくら てつお

NMR 測定

脂質極性部分の配向状況を検討するために固体³¹P NMR を、脂質中に導入された 10mol%(脂質に対して)のペプチドの配向構造を検討するために固体¹⁵N NMR を用いた。測定は ChemMagnetic 社製 CMX 400NMR 装置を使用、角度可変ゴニオメータ付固体 NMR ユニットを用いて行った。

[結果及び考察]

DMPC/DMPG/CAMA について、固体³¹P NMR を測定した。³¹P ピークはガラスプレート面が磁場に対して垂直な場合($\theta=0^\circ$), 23ppm に、ガラスプレートを 90° 傾けた場合($\theta=90^\circ$), 12ppm に出現した。よって、このピークは配向成分由来のピークであり、ガラスプレート面に対して脂質膜アシル鎖が垂直になるように脂質二重膜が形成されていることがわかる (Fig.2)⁵⁾。

CAMA1 の粉末¹⁵N パターンを Fig.3(a)に、配向脂質二重層系での固体¹⁵N NMR 測定の結果を Fig.3(b),(c)に示す。脂質膜法線と磁場とのなす角度が 0° の時、60ppm に(Fig.3b)、 90° の時、54ppm から 162ppm の範囲にピークが出現する(Fig.3c)。 0° の時の 60ppm のピークは、¹⁵N Phe ならびに Ala の化学シフトテンソルの σ_{22} 成分に対応する⁶⁾。この σ_{22} 成分はヘリックスの軸である N-H と垂直に近い、つまり、これらのサンプルのラベル部位の Phe⁵ならびに Ala¹⁷は、膜に対して平行に近い角度で配向している⁷⁾。このことから、CAMA ペプチドの N 末端ヘリックスと C 末端ヘリックスは、いずれも膜に対して平行な配向を形成し、cecropinA⁸⁾や magainin⁹⁾などで報告されている Carpet モデルを形成していると考えられる。Fig.3(d)に、CAMA ペプチドの Trp に近い Leu⁴を¹⁵N ラベルした CAMA2 と、Fig.3(e)に Trp を Ala に置換したペプチド A1 の配向脂質二重膜における固体¹⁵N NMR スペクトルを示す。CAMA2 のスペクトルでは、Fig.1 同様にペプチドが膜に対して平行に配向していることがわかる。さらに Trp を Ala に置換したペプチド A1 においても、同様なピークが表れ、依然として Carpet モデルを形成することがわかる。

参考文献

- (1) Shin SY., Kang JH. & Hahn KS. *J.Pept.Res.*, **53**, 82, (1999)
- (2) Oh D., Shin SY., Lee S., Kang JH., Kim SD., Ryu PD., Hahn KS. & Kim Y. *Biochemistry*, **39**, 11855, (2000).
- (3) Demura, M., Minami, M., Asakura, T. & Cross, T.A. *J.Am.Chem.Soc.*, **120**, 1300, (1998).
- (4) Asakura, T. & Demura, M. *Solid State NMR of Polymers* (Ando I. & Asakura, T., Eds.) 307, (1998).
- (5) Hori, Y., Demura, M., Niidome, T., Aoyagi, H. & Asakura, T. *FEBS Letters* **455**, 228, (1999).
- (6) Hori, Y., Demura, M., Iwadata, M., Ulrich, A.S., Niidome, T., Aoyagi, H. & Asakura, T. *Eur. J.Biochem.* **268**, 302, (2001).
- (7) Marassi FM., Opella SJ., Juvvadi P., & Merrifield RB. *Biophys J.*, **77**, 3152, (1999)
- (8) Bechinger B., Zasloff M. & Opella SJ. *Biophys. J.* **74**, 981, (1998)

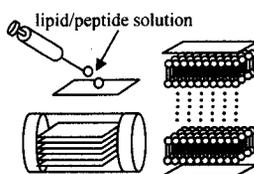


Fig.1 Sample preparation for solid state NMR observation. Oriented samples on glass plate are stacked in a glass tube.

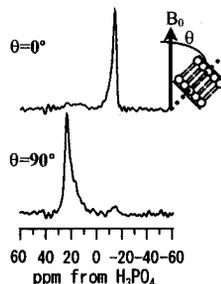


Fig.2 ³¹P solid state NMR spectra of aligned DMPC/DMPG/CAMA sample as a function of the angle θ between the bilayer normal and B_0 .

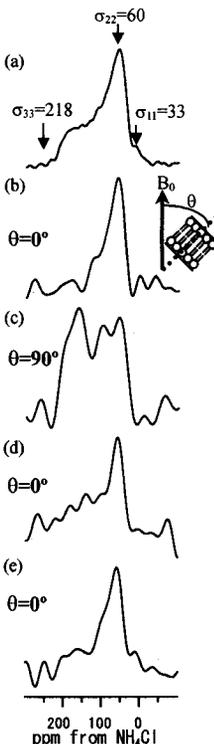


Fig.3 ¹⁵N solid state NMR spectra of ¹⁵N labeled CAMA and its analogue. θ is the angle between the bilayer normal and B_0 . (a) ¹⁵N Phe⁵, Ala¹⁷-labeled CAMA powder, (b) Oriented CAMA1/lipid sample, where the axis is parallel to B_0 . (c) Oriented CAMA1/lipid sample, where the axis is perpendicular to B_0 . (d) Oriented CAMA2/lipid sample, where the axis is parallel to B_0 . (e) Oriented A1/lipid sample, where the axis is parallel to B_0 .

Si-Nb-C-O 系コーティング溶液の NMR によるキャラクタリゼーション

(東工大 応セラ研・*資源研)

○福島 学・中村 義之*・安田 榮一・田邊 靖博

NMR Characterization of Si-Nb-C-O coating solution

Materials and Structures Laboratory and *Chemical Resources Laboratory,
Tokyo Institute of Technology

○M.Fukushima, Y.Nakamura, E.Yasuda and Y.Tanabe

Si-Nb-C-O coating solution was synthesized through a sol-gel process. In this study, relationship between molecular structure and mechanical properties was investigated. The coating solution was characterized by H-NMR and ^{29}Si -NMR. The hardness and adhesion of coating film indicated maximum value according to JIS. These properties increased with increasing degree of siloxane bonding condensation.

1.[序] ゼルゲル法により合成したポリシロキサン薄膜は耐熱性・撥水性・耐磨耗性・電気絶縁性等の優れた特性から、有機高分子樹脂の保護膜や金属および有機物質の接着剤として応用されつつある。しかしながら、これらの共重合体は構造が複雑であり、物性に及ぼす構造因子の評価が困難であるため、これらの相関関係の比較・検討の報告例は数少ない。膜の構造と物性は構造と密接な関係にあり、したがって高機能・高性能膜の調整は前駆体の構造との関係が検討されることにより発現するはずである。これまでに Ta/Nb 等の遷移金属を骨格中に導入したゲルを合成しており、遷移金属を導入したゾル溶液は加水分解反応・ゲル化が短時間で進行することを見出しており、更には加水分解反応・ゲル転移後の構造等を解析してきた[1]。とりわけ三官能性シランに遷移金属アルコキシドを導入し同時に加水分解させた材料合成例は無く、従って繊維や膜の調整に関する報告は無い。Ta/Nb の導入によるネットワーク強化及び、機械的特性・耐熱性の向上が見込まれる。そこで本研究は新規・透明高機能コーティング膜を合成及び、その構造と膜の機械的物性との相関関係を明らかにすることを目的とする。

2.[実験方法] 試薬・コーティング膜の調整 シリコン源にはメチルトリエトキシシラン： $\text{CH}_3\text{Si}(\text{OEt})_3$ (MTES) を用いた。一方、ニオブ源にはアセチルアセトン(AcAc)を用いて化学改質させたペンタエトキシニオブ： $\text{Nb}(\text{OEt})_5$ を(Niobium solution)用いた。出発物質の混合モル比は MTES： $\text{Nb}(\text{OEt})_5$ ： H_2O ： EtOH = 1:0.05:2:3 とした。これらの攪拌直後のゾル溶液をディップコーティング法によりスライドガラスへコーティングを行なった。その後、 40°C ・ 80°C で乾燥することによってコーティング膜を調整した。

コーティング溶液・膜の構造評価 物性と構造の相関関係を検討するにはコーティング液・コーティング膜の構造を評価する必要がある。コーティング膜の構造解析は困難であるため同一実験条件下で作製した独立膜を用いて検討した。ゾル溶液は ^1H 及び ^{29}Si -NMR スペクトルを日本電子製 La-500MHz NMR で測定した。また固体試料に対しては ^{29}Si -CP/MAS NMR スペクトルを Excalibur-270MHz NMR で測定した。FT-IR は SHIMADZU FTIR-8600PC を用い、測定には KBr法を用いた。環境型走査電子顕微鏡は Nikon E-SEM2700 を用い、加速電圧 20kV として測定した。

コーティング膜の物性評価 付着力の評価は、JIS 規格(K5400)に従いクロスカットテープテストを、硬度評価は JIS 規格(K5600)に従い手かき法を用いて行なった。

3.[結果・考察] 付着力・引っかかり硬度の評価 Table1. にコーティング膜と基板との付着力(JIS-K5400)を示す。特に 40°C という低い乾燥処理の場合においても付着力は最大値を示していた。Table2. に基板上にコーティングした膜の引っかかり硬度(JIS-K5600)の結果を示す。 80°C において硬度は最高値を示した。これらの物性は乾燥温度、言い換えれば膜の構造に大きく影響されていることが考えられる。付着力は Nb 未添加試料と同等であるが、引っかかり硬度は Nb 添加により増大した[2]

Table1. Adhesive strength of coating films.

Dry temperature($^\circ\text{C}$)	40°C	80°C
Point	10	10

Table2. Scratch-Hardness tests of coating film on soda-lime glass.

Dry temperature($^\circ\text{C}$)	40°C	80°C
Pencil-Hardness	6H	9H

Key words: ゼルゲル法、加水分解、縮合度、ディップコーティング、コーティング膜
○ふくしま まなぶ、なかむら よしゆき、やすだ えいいち、たなべ やすひろ

コーティング膜の構造と物性との相関関係

シリコンやポリシロキサンは、分子間の相互作用が低いため引っ張り強度や引き裂き抵抗は弱く、小さい抵抗で傷が伝播するため各種材料への応用に対して制約となっている。Table 1.および 2.の JIS 規格に従った物性評価では、いずれも最高値を示した。これらと構造との相関関係について IR/NMR を用いて検討を行なった。

まず Fig.1.に独立膜の IR スペクトルを示す。Si-O 振動に由来するピークが 1040 cm^{-1} に、Si-O-Nb 骨格に関与するピークが 915 cm^{-1} に検出された[2-4]。これらの分子構造の存在は基板上の水酸基と塗膜との間の化学結合を示唆しており、付着力は最大値を示したと考えられる[2,5]。

コーティング膜の乾燥温度が高くなるにつれ同時に引っかかり硬度も向上した(Table2.)。これは、膜の構造に影響されていると考えられる。Fig.2.に独立膜の ^{29}Si -CP/MAS NMR スペクトルを示す。また、これらのピーク面積から算出したシロキサン構造単位を Table3 に示す。乾燥温度が高いと T^3 ユニットに帰属される構造[4]が支配的である。即ち、 $40\text{-}80^\circ\text{C}$ では残存溶媒の揮発・重縮合の進行により分子間距離が縮みネットワークが強化されたことが伺える。それにより、引っかかり硬度は 9H と最高値を示したと考えられ、言い換えれば耐磨耗性も向上したと考えられる。

得られたコーティング膜の SEM 観察行なったところ、クラックおよび気孔等は観察されなかった。また、塗膜/基板界面も強固に接着している様子が観察された。

以上の各結果は接着剤・保護膜への応用展開の可能性を示唆している。

4.[まとめ]

ポリシロキサン薄膜前駆体溶液の室温調整を行い、その塗膜の物性と構造との相関関係について以下の知見が得られた。

- 1.得られたコーティング膜は極めて平滑であり、気孔・クラック等は観察されなかった。
- 2.コーティング膜と基板との付着力は化学結合に起因するものと考えられ高い付着力を示した。
- 3.JIS 規格に従いスクラッチハンドテストを行なったところ、コーティング膜の硬度は最高硬度を示した。

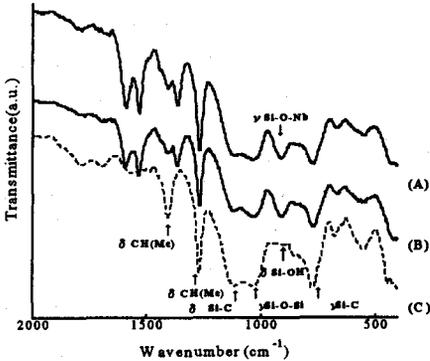


Fig.1. IR spectra of self-supported films (A) (B) for drying at 40 and 80°C and (C) for no Nb.

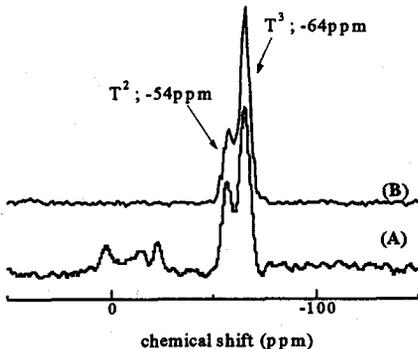


Fig.2. ^{29}Si -CP/MAS NMR spectra of self-supported films after drying at (A) 40 and (B)80°C.

Table3. The structure of self-supported films after drying.

Temperature(°C)	Units (%)			DC (%)
	T ¹	T ²	T ³	
40	0	34	66	88
80	0	28	72	91

* units :siloxane units, T¹: $\text{MeSi}(\text{OSi}\equiv)(\text{OEt})_2$, T²: $\text{MeSi}(\text{OSi}\equiv)_2(\text{OEt})$ and T³: $\text{MeSi}(\text{OSi}\equiv)_3$.
* DC: Degree of condensation of siloxane bonding.

References

- [1]M.Fukushima et al., Annual meeting of the Ceramic Society of Japan, p99(2002).
- [2]Y.abe et al., J.Non-Cryst.Solids, 261 p39-51 (2000).
- [3]N.Yamada et al., J.Sol-GelSci.Tech.,17 123-130 (2000).
- [4]K.Kamiya et al., J.Non-Cryst.Solids, 121 p182-187 (1990).
- [5]Y.Yamamoto et al., Yogyo-kyokai-shi 90 (1983).

Behavior of *p*-Nitroaniline Molecules in the Mesoporous Materials Studied by Solid-State NMR
(Institute for Materials & Chemical Process, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)) Yoshihiko Komori and Shigenobu Hayashi

Behavior of *p*-nitroaniline (pNA) in the mesopores of FSM-16 and modified FSM-16 was investigated by means of solid-state NMR. Deuterated pNA (pNA-*d*) was loaded to FSM-16 and modified FSM-16 which was prepared by a reaction of FSM-16 with *n*-octyltriethoxysilane. ^2H NMR spectra of the samples at 300 K showed a sharp signal at the central region, and the width of the signal for modified FSM-16 was sharper than that for FSM-16, indicating the faster isotropic motion of pNA-*d* in modified FSM-16. On the other hand, the ^2H NMR spectrum of pNA-*d* in modified FSM at 220 K showed a narrow doublet with a split of 28 kHz, suggesting the 180° flip-flop motion around the C_2 axis of the molecule. These results indicated that dynamics of pNA molecules was varied with the chemical environments of the inner surface of the mesopores.

1. 緒言

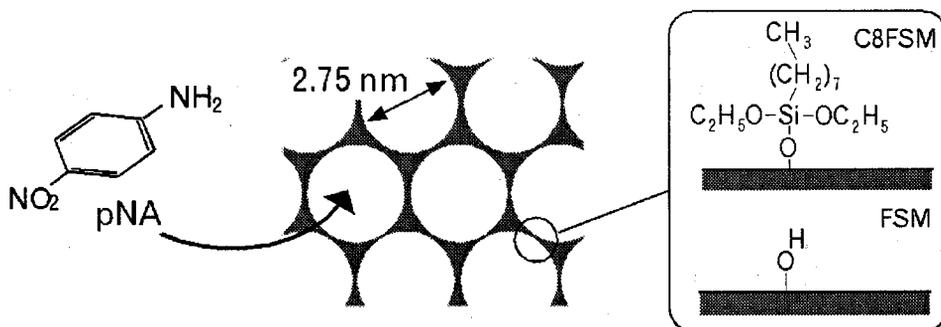
無機有機ナノ複合体は無機・有機双方の利点を兼ね備えた新しい材料として注目を集めている。しかしながら、無機物（ホスト）中における機能分子（ゲスト）のダイナミクス等について検討された例は少なく、効率的なナノ材料の創製のためにはゲスト分子の挙動やホスト-ゲスト間相互作用を明らかにし、それに基づいた材料設計の指針の確立が重要であると考えられる。当研究グループではゼオライトなどの無機ホスト中におけるニトロアニリン類の運動について検討を行ってきた。¹

本研究ではメソポーラスを有する多孔体 FSM-16 (FSMと略記) に吸着した *p*-ニトロアニリン (pNA) の挙動に着目した。FSMは細孔径が 2~3 nmと大きいのが特徴であり、また細孔内表面はシラノール基 (Si-OH) が突き出しており、シリル化剤による有機修飾により細孔内の環境や細孔径の制御が可能である (Scheme1)。この細孔内における pNA の挙動を ^2H および ^{13}C NMR を用いて分析した。

2. 実験方法

FSM (細孔直径: 2.75 nm) は豊田中央研究所が作製したものを用いた。有機修飾 FSM (C8FSM) は *n*-octyltriethoxysilane をシリル化剤として用いて合成した。² ホスト (FSM, C8FSM) を 150°C、3 h で脱水した後、重水素化 *p*-ニトロアニリン (ring- d_4 , pNA-*d*) を 423 K で導入して複合体を得た。すべての pNA-*d* 分子が細孔内表面に吸着するように吸着量は 10% 以下とした。固体 ^2H NMR 分析は Bruker MSL400 (測定周波数: 61.42 MHz) を用い、quadrupole echo pulse により測定した。 ^{13}C MAS NMR は Bruker ASX400 (測定周波数: 100.61 MHz) を用い、試料を 3.5 kHz で回転させて測定した。

固体NMR、メソポーラス材料、ニトロアニリン、ナノ空間、分子挙動
こもりよしひこ、はやししげのぶ



Scheme 1. Schematic view of pNA and the mesopores of FSM and modified FSM (C8FSM).

3. 結果・考察

図1 aにFSMに吸着したpNA- d の ^2H NMRスペクトルを示す。140 Kでは分裂幅132 kHzのdoubletが観察されているが、220 Kにおいて不明瞭となった。さらに、温度の上昇とともに先鋭なシグナルへと変化しており、pNA分子の等方的な速い運動が示唆された。一方、C8FSMに吸着したpNA- d の ^2H NMRスペクトル(図1 b)においては140 Kにおいてベンゼン環の固定を示すPake doubletが明瞭に見られた。また、220 Kにおいては28 kHzの狭い分裂幅をもつシグナルが観測された。ベンゼン環がpNA分子の C_2 軸回りで100 kHz程度の速さで 180° 反転運動をしていると考えられる。温度の上昇とともにdoubletは消失し、中央にシャープな線形をもつ成分が出現した。FSMの場合と比較して線幅は細く、pNA分子はより速い等方的な運動をしていると考えられた。

室温における ^{13}C MAS NMRを測定したところ、どちらの試料においてもpNA分子のベンゼン環に由来する4本のシグナルが観測されたが、スピニングサイドバンドは観測されなかった。これはpNA分子が速い等方的な運動をしていることを示しており、 ^2H NMRの結果と一致した。

以上、メソ多孔体中に吸着したpNA分子は室温において等方的な運動を行うことがわかった。さらにpNA分子の挙動は細孔表面の環境により変化することが明らかとなった。

4. 参考文献

- [1] S. Hayashi and Y. Komori, *Studies in Surface Sci. Catalysis* **2001**, *135*, 13P06.
 [2] T. Kimura, S. Saeki, Y. Sugahara and K. Kuroda, *Langmuir* **1999**, *15*, 2794.

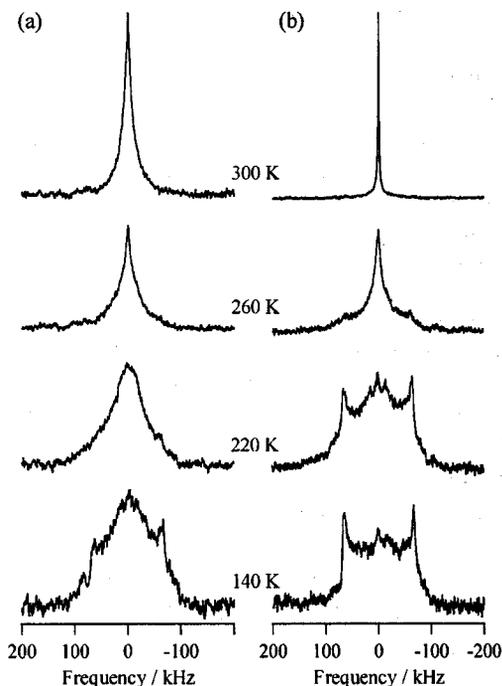


Figure 1. ^2H NMR spectra of pNA- d in the mesopores of (a) FSM and (b) C8FSM.

P 71 エチルメチルイミダゾール (EMI) カチオンと種々のアニオンからなるイオン性液体とリチウム塩をドープした電解質のイオン拡散と伝導

(産総研) 早水紀久子、○Emmanuelle Raekelboom、秋葉悦男
(ユアサコーポレーション) 中川裕江、相原雄一

Measurement of the ionic diffusion and conduction of 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (EMIBF₄) salt electrolytes doped with lithium salts.

E. Raekelboom, K. Hayamizu, E. Akiba, *National Institute of Advanced Industrial Sciences and Technology*, H. Nakagawa, Y. Aihara, *Yuasa Corporation*

Ionic diffusion and conductivity of ionic liquids (IL) have been studied using the pulsed gradient spin echo (PGSE) NMR technique [1]. To use ILs as electrolytes for lithium batteries, addition of lithium ions is necessary. Lithium salts such as LiBF₄, LiTFSI (Li(SO₂CF₃)₂) and LiBETI ((Li(SO₂CF₂CF₃)₂)) were added to ethylmethylimidazolium borate (EMIBF₄) and the diffusion of the ions was measured by changing the anions and the concentration of LiBF₄. This work concerns the ionic conductivity, self-diffusion coefficient and the thermal property of EMIBF₄ doped with different concentrations of LiBF₄. The ions diffuse in the order of EMI⁺ > BF₄⁻ > Li⁺ in the temperature range 30-80 °C, and this order is opposite to the ion size. We show that the addition of lithium salt to EMIBF₄ leads to the deterioration of the diffusion. The molar conductivities decrease first slightly until ~0.5 M from which they fall sharply due to an increase of the viscosity. This is consistent with the concentration dependence of the DSC curves on heating.

Introduction

The ionic liquids (ILs) are organic molten salts that are liquids at room temperature. They are stable liquids and less volatile due to small vapor pressures. They are of interest since they could be potential candidate media for lithium battery electrolytes. The effects induced by addition of the lithium salts were studied by PFG-NMR, DSC and ionic conductivity.

Experiments

Sample preparation Various concentrations (0.05 to 1.5 M) of LiBF₄ were added to EMIBF₄ by stirring at room temperature for six hours. **Self diffusion coefficient** The PGSE NMR measurements were made with a Tecmag Apollo spectrometer with a 4.7 T wide bore magnet. The system is equipped with JEOL pulse field gradient probes. **Ionic Conductivity** The measurements were carried out using a Solartron Frequency Response analyser in the frequency range from 0.1 Hz to 1 MHz in the temperature range 30- 80 °C. **Thermal properties** The DSC measurements were performed using a DSC220C differential scanning calorimeter from -150 to 100 °C at a rate of 10 °C min⁻¹.

Result and Discussion

Self-diffusion Coefficients

The self-diffusion coefficients of the EMI⁺, BF₄⁻ and Li⁺ ions were measured by the PGSE-NMR method using the ¹H, ¹⁹F and ⁷Li NMR under 4.7 T, respectively in the temperature range 30 to 80 °C. As an example, the concentration dependence of the self diffusion coefficients at 60 °C is shown at Figure 1. It was found that they decrease as the concentration of LiBF₄ increases, probably due to the rise of the bulk viscosity. The components diffuse in the order of EMI⁺ > BF₄⁻ > Li⁺. The lithium ions are expected to diffuse the fastest due to their smallest size. In fact the PGSE NMR method gives an average self-

イオン性液体、常温熔融塩、リチウム塩添加、自己拡散係数、イオン伝導度
エマヌエルラエケルboom、はやみずきくこ、あきばえつお、なががわひろえ、あいはらゆういち

diffusion coefficient for the isolated ions and ion pairs. The lithium ions (Li^+) are therefore suggested to have larger effective diffusion radii due to solvation, association with the anion BF_4^- or aggregation of lithium ions in EMIBF_4 .

Ionic conductivity

The temperature dependence of the ionic conductivity measured by AC complex impedance method is plotted in the range 30-80°C at Figure 2. The conductivities increase with the temperatures following to the Vogel-Tamman-Fulcher (VTF) equation, characteristic of a viscous solution electrolytes. The molar conductivities are plotted versus the salt concentrations in Figure 3 for $T = 30, 60$ and 80°C . Two regions can be distinguished, a dilute region for $c < 0.5\text{ M}$ where the molar conductivity is almost independent of the salt concentration and a concentrated region above 0.5 M where the molar conductivity falls sharply as the local viscosity increases.

This phenomenon could be related to the sudden change in the DSC plots on heating shown at Figure 4, where the crystallization and melting point could not be seen at concentrations higher than 0.5 M .

[1] A. Noda, K. Hayamizu, M. Watanabe, *J Phys. Chem.*, **105** (20), 4603

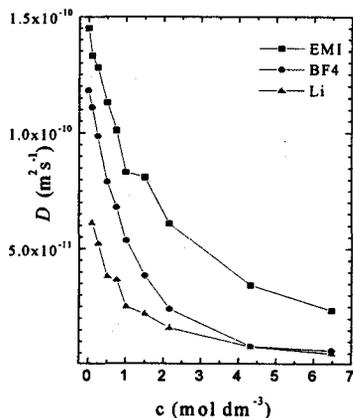


Figure 1 Self-diffusion coefficients v.s. the LiBF_4 concentration at 60°C .

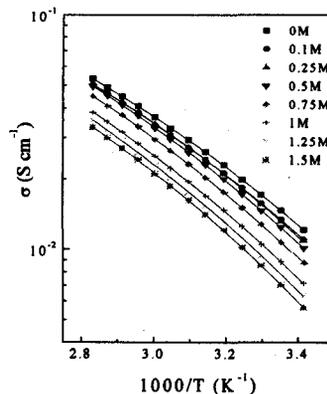


Figure 2 Arrhenius plots AC conductivity for EMIBF_4 containing LiBF_4

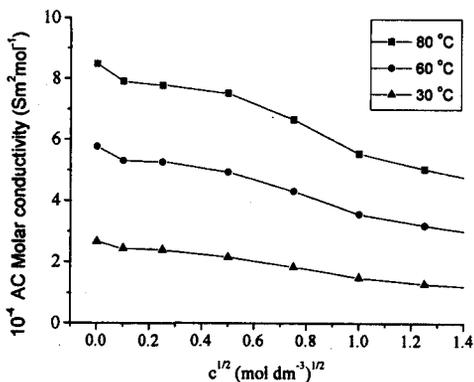


Figure 3 Molar conductivities by ac impedance v.s the LiBF_4 concentration.

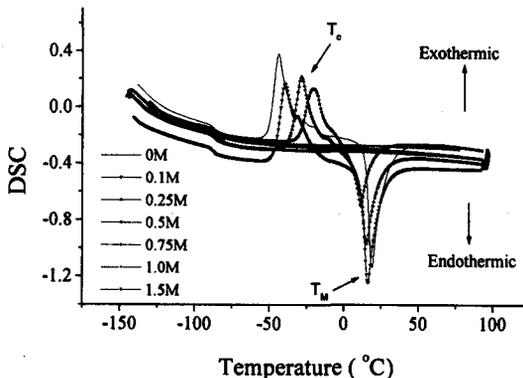


Figure 4 DSC plots for $c=0-1.5\text{ M}$

The structural analysis of the activating group-modified mesoporous silicates by solid state NMR method.

(Department of Chemistry, Kanagawa University)○T. Takayama, K. Honda

In this study, solid NMR measurements were carried out in order to clarify synthetic process and structure of mesoporous silicates (MPS) with specific catalytic property. The mesoporous silicates included transition metals (Pd, Ni, Co) by chemical attachment to the reactive hydroxyl groups were prepared. From ^{29}Si -CP/MAS NMR spectra it became clear that the MPS (Pd) is almost Q_3 type unlike the other mesoporous silicates. The MPS (Pd) was the best for the catalytic effect (87%) at the acetal synthesis with cyclohexanone and methanol.

1. はじめに

メソポーラスシリカ層間化合物の形成によって母結晶層の層間距離や層の電荷密度などが変化し、層間の分子あるいはイオンは、その形状、極性基の有無、種類などによって、層空間で特殊な配列状態をとる。従ってインタカレートする化合物が触媒活性を有する場合、層間化合物を形成することによってこれらの活性が修飾を受けることが考えられる。本研究では活性基を付与したメソポーラスシリカ層状組織体化合物の生成過程と構造を解明するために固体 ^{13}C 、 ^{29}Si -NMR測定を行った。さらにその層状組織体の触媒効果について明らかにするために溶液 ^{13}C -NMRをもちいた簡便な方法を検討した。

2. 実験

高い表面積をもつメソポーラスシリカ層状組織体(MPS)をカネマイトにヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド(HDTMA)を挿入し、 600°C に焼成して合成した。さらに、MPSと $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pd}$ 、 Ni 、 Co 塩をアセトンまたは H_2O 中反応させ、次いで 540°C に焼成し触媒活性金属を挿入した。そして各金属包摂MPS中にシクロヘキサノンと CH_3OH とを混合し、その触媒効果を検討した。

固体NMRにはJEOL-ECA270WBを用い、 ^{13}C 、 ^{29}Si -NMR測定は通常のパルス法にて行った。溶液 ^{13}C -NMRはJEOL-ECA600を用いて、定量性を得るためフリップ角を小さく(20°)し、繰り返し時間を長めに取った(30秒)。シフト基準はいずれの測定もTMSにした。

3. 結果及び考察

各化合物の生成過程と構造を明らかにするために固体 ^{13}C 、 ^{29}Si -NMR測定を行った。カネマイトの ^{29}Si -NMRスペクトルをFig.1に示す。 $\delta = -98.0$ に一本のピークを示した。これは Q_3 構造であり、カネマイトが単一の薄板構造をとっていることが分かる。焼成前の層状組織体中に包摂されているHDTMAはゴーシュ構造をとっていることがn-アルキル基のintra部分の $\delta = 30.3$ の化学シフトから分かった。その層状組織体の ^{29}Si スペクトルをFig.2に示す。主として Q_3 、 Q_4 構造を示していた。次に、 600°C に焼成後のMPSの ^{29}Si -NMR測定を行った。そのスペクトルをFig.3に示す。

キーワード：固体 ^{13}C -NMR、固体 ^{29}Si -NMR、メソポーラスシリカ層状組織体、インタカレート、触媒活性

○たかやまとしお、ほんだこうじ

その結果、焼成後では Q_4 構造が減少したことが分かる。

次に、金属粒子を包摂したMPSの $(CH_3COO)_2Pd$ と Ni 、 Co 塩との反応で得た三つの化合物の ^{29}Si -NMR 測定を行った。その結果、特異なスペクトルを示したのは Pd 包摂物で、そのピークはブロードではあるがほとんど Q_3 構造のみであり (Fig.4)、 Ni 、 Co 包摂物とは明らかに異なっていた。そこで金属包摂物の触媒効果を見るためにシクロヘキサノンのメタノールによるアセタール化を行いその効果を比較した。各MPSによるシクロヘキサノンのアセタール化変換率はそれぞれMPS(本体)29、 Ni /MPS 11、 Co /MPS 10、 Pd /MPS 87%であった。 Pd 包摂物が他のものと比較してその変換に大きな効果があることが分かった。 Ni 、 Co の場合、 Pd はもとよりMPS本体より変換率が小さかったのは、 Ni 、 Co が空孔を埋めたためMPSのキャピティーの大きさが減少したためと思われる。

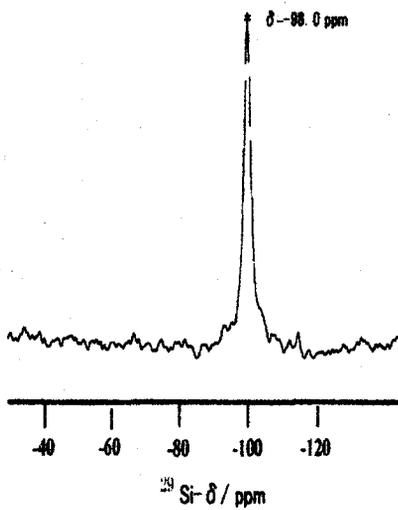


Fig.1 ^{29}Si -CP/MASNMR spectrum of kanemite

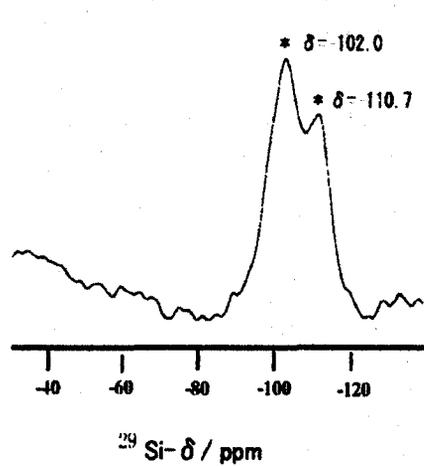


Fig.2 ^{29}Si -CP/MASNMR spectrum of the kanemite/HDTMA complex

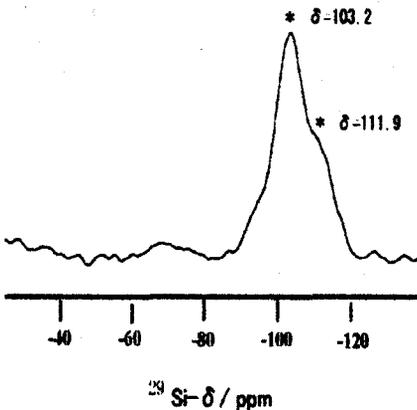


Fig.3 ^{29}Si -CP/MASNMR spectrum of the calcined kanemite /HDTMA

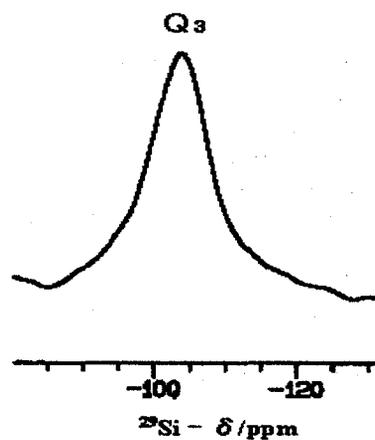


Fig.4 ^{29}Si -CP/MASNMR spectrum of the mesoporous silicate loaded with Pd metal

固体NMR法による π 共役系高分子の準秩序構造とダイナミクス

(東工大院生命理工)○ 浅川直紀, 守誠一朗, 松原清彦, 櫻井実, 井上義夫
(東工大資源化学研究所) 山本隆一

Dynamics of Quasi-ordered Structure of Regio-regulated π -conjugated Polymers
Naoki Asakawa,[†] Seiichiro Mori,[†] Kiyohiko Matsubara,[†] Takakazu Yamamoto,[‡] and Yoshio Inoue[†]

[†]Graduate School of Bioscience and Biotechnology and [‡]Chemical Resources Laboratory, 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 Dynamics of some five-membered ring π -electron conjugated polymers with high regio-regularity was investigated by differential scanning calorimetry(DSC) and ¹H and ²H solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The ²H quadrupolar echo spectra of a head-to-head(HH) type of perdeuterated poly(4-methylthiazole-2-diyl)[d₃-HH-P4MeTz] show an asymmetric line shape above ca. 290K, which could be due to wagging motion of the methyl groups in the quasi-ordered structure of the polymer. This wagging motion would be closely related to the backbone twist. The ¹H transverse relaxation time measurements of the methyl protons in HH-P4MeTz with two pulse Hahn echo (TPHE) and Carr Purcell Meiboom Gill(CPMG) methods shows that there exists diffusion-like motion in the system, which is probably due to the modulation waves of backbone twist. The dynamics of the modulation was investigated by ²H two dimensional exchange NMR spectroscopy and the exchange rate was estimated as slow as an order of 100Hz at room temperature.

keywords: π -conjugated polymers, transverse relaxation time, CPMG, Hahn echo, 2D exchange NMR

1. 緒言

一次構造制御型のポリ(4-メチルチアゾール-2,5-ジイル)[Head-to-head(HH)-P4MeTz]は複素五員環がface-to-face型の π スタッキングすることにより側鎖に存在する多数のメチル基が異常に高密度に配列したユニークな結晶構造を形成する。これまで我々は、主に固体NMRを用いて π 共

役系高分子の分子構造を調べてきた。今回我々は、HH-P4MeTzのメチル基を99%重水素化した試料を用いて²H二次元交換NMR測定により、主鎖のねじれのダイナミクスを調べた。

2. 実験

一次構造制御型のポリ(4-メチルチアゾール)[P4MeTz]を脱ハロゲン化重縮合法により合成し、NMR実験(JEOL GSX270, Varian Unity400)を行った。²H NMRの測定は室温条件下で行った。

[†] π 共役系高分子・横緩和時間・CPMG・Hahnエコー・二次元交換

あさかわなおき, もりせいいちろう, まつばらきよひこ, やまもとたかかず, いのうえよしお

3. 結果・考察

DSC 測定により、P4MeTz では約 290K に大きな比熱の変化を伴った吸熱ピークが観測され、P3MeTh では約 363K に比熱の変化を伴わない吸熱ピークが観測された。P4MeTz は複素五員環が face-to-face 型の π スタッキングすることにより側鎖に存在する多数のメチル基が高密度に配列した構造を形成することが X 線回折によりわかっている。側鎖のメチル水素を 99% 重水素ラベルした P4MeTz を合成し、固体 ^2H 四極子エコースペクトルを 118~393K の温度範囲で測定したところ、転移の高温相側では、メチル重水素の粉末スペクトルに非対称性が現れた。非対称性の原因として、電荷の存在・ ^2H - ^2H 双極子カップリング・ C_{3v} 対称性の破れ・Wagging 運動・discommensuration が考えられる。非対称性が高温相側でのみ現れるので、電荷の存在や ^2H - ^2H 双極子カップリングや C_{3v} 対称性の破れによるとは考えにくい。残る二つの可能性の wagging 運動と discommensuration は必ずしも独立ではなく、構造不整相などの準秩序構造での原子変位の変調波が拡散している場合には Wagging 運動として観測されることも有り得る。HH-P4MeTz において構造不整が存在するかどうかはまだ明らかではないが、 ^2H スペクトルの二つの垂直端の温度依存性の違いより、HH-P4MeTz には原子の変位の非局在化した変調波が存在していると推測される。今回、交換時間 (τ_{mix}) を変化させて ^2H 二次元交換固体 NMR 測定を行なったところ、スペクトルの対角成分は小さく、結晶中の大部分のメチル基が変調波に参加していることがわかった。プロトンの横緩和時間測定の結果と併せると、結晶中に変調波の拡散が起きて、その変調波の拡散は非常に遅く、100Hz 程度であると見積もられた。

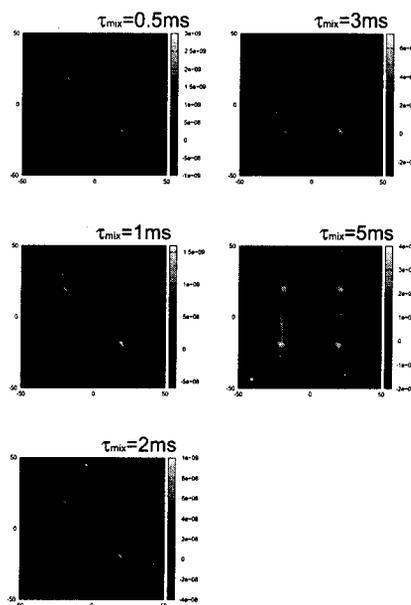


Figure 1. Two dimensional exchange NMR spectra for perdeuterated HH-P4MeTz at room temperature with a function of mixing time.

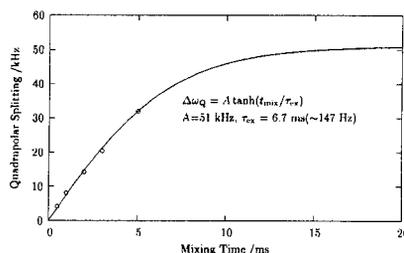


Figure 2. The time course of ^2H quadrupolar splitting of the methyl-deuteron in HH-P4MeTz as a function of mixing time (τ_{mix})

固体NMRによる廃ガラスリサイクルプロセスの解析
(産総研¹⁾・科技団さがけ 21²⁾・姫路工大³⁾)

○赤井智子¹⁾²⁾・陳丹平²⁾・増井大二²⁾・矢澤哲夫³⁾

Analysis of recycling process of waste glass by using solid-state NMR.

(National Institute of Advanced Science and Technology¹⁾, PRESTO Japan Science and Technology Corporation²⁾, Himeji Institute of Technology³⁾)

○Tomoko Akai¹⁾²⁾, Danping Chen²⁾, Hirotsugu Masui²⁾ and Testuo Yazawa³⁾

Recently, we have developed a new glass recycling process, in which alkali and metal ions are extracted from waste colored glass by remelting the waste glasses with B_2O_3 followed by acid leaching. In this study, microscopic structure in this remelted glass ($Na_2O-CaO-B_2O_3-SiO_2$ with small amount of Al_2O_3 and metal oxide), which strongly affect the efficiency of the leaching of each ion, was studied by ^{11}B , ^{27}Al and ^{29}Si NMR. ^{11}B static NMR spectra show that leaching rates of Al and Cr are related to the fraction of BO_3/BO_4 in glasses. ^{27}Al MAS, ^{29}Si MAS and ^{11}B MQ-MAS are also measured to elucidate the microstructure in glasses.

【はじめに】埋め立て処分場が不足するに従い、産業・家庭からの廃棄物について様々な処理方法の開発がすすめられている。着色ガラスは微量に着色金属イオンを含んでおり、その種類が多様であるため、再熔融して利用することが難しく現在年間数十万トン廃棄されており、その再資源化方法の開発が必要とされている。我々は $Na_2O-B_2O_3-SiO_2$ 系の特定の組成域のガラスがアルカリホウ酸相とシリカ相に相分離し、酸処理を行うと、アルカリホウ酸相が取り除かれ、ナノポーラスシリカが得られることに着目し¹⁾、窓・瓶に使用される着色ガラス ($Na_2O-CaO-SiO_2$ 系のガラスに微量の Al_2O_3 と着色金属を含む) に、 B_2O_3 を加えて再熔融して $Na_2O-CaO-B_2O_3-SiO_2$ 系のガラスとした後、酸処理を行うことでアルカリ及び着色金属イオンをガラスから脱離することを試みてきた。その結果、廃ガラスからシリカ以外の成分をすべて酸中に抽出し、比較的高純度の SiO_2 を得ることに成功した²⁾⁴⁾。

この方法において、再熔融後の $Na_2O-CaO-B_2O_3-SiO_2$ ガラスからの各イオンの酸処理時の溶出率は、添加した B_2O_3 の量と酸処理前のガラスの熱処理条件に大きく依存することがわかっており²⁾³⁾、これは、酸処理前のガラスの微細構造が組成、熱処理条件によって変化し、浸出に影響を与えるためと考えられている。そのため、本研究においては、 ^{11}B , ^{29}Si , ^{27}Al NMR を用いてこのプロセスにおけるガラス構造の変化を検討した。

キーワード：廃ガラス、再資源化、 ^{11}B 、 ^{27}Al 、 ^{29}Si

著者ふりがな：○あかいともこ・ちんたんぺい・ますいひろつぐ・やざわてつお

【実験】 15.2Na₂O·10.2CaO·73.2SiO₂·1.3Al₂O₃(wt%)のガラスに着色剤として Cr₂O₃ を 0.1wt%添加したガラスを着色ガラスの模擬ガラスとして用いた。これに溶融後の B₂O₃ の重量比にして 20~45wt%となるように H₃BO₃ を加えて再溶融し、冷却しガラスを得た。得られたガラスは粗粉碎して 1N から 3N の硝酸で処理を行った。一部のガラスは 560~720℃ の間で熱処理を行ってから粗粉碎し酸処理を行った。これらのガラスの ¹¹B, ²⁷Al, ²⁹Si NM R スペクトルの測定は Chemagnetics CMX200 を用いて行った。

【結果と考察】 Fig.1 に再溶融して得たガラスからの各元素の酸処理時における溶出量の B₂O₃ 添加量依存性を示す。ガラス中の微量成分である Cr 及び Al の溶出量は Na、Ca とは大きく異なり、B₂O₃ を 35wt%以上加えた領域で大きくなることがわかった。処理前のガラスについて ¹¹B 広幅 NMR の測定を行った結果を Fig. 2 に示す。酸素 4 配位の BO₄ 4 面体は空間対称性が高いため 2 次の四極子相互作用による分裂が見られないのに対して、酸素 3 配位の BO₃ は平面三角形構造をとるため、四極子相互作用により分裂した共鳴線が観測されている。BO₃ の信号強度は、x>35%の領域で強くなっており、Cr、Al のガラスからの溶出と BO₃/BO₄ の割合に関連性があると考えられる。

当日は、²⁷Al、²⁹Si MAS NMR スペクトル、Cr の ESR スペクトル及び、¹¹B MQ-MAS、などをあわせて、ガラス中での各イオンの分布と浸出率について詳しく検討した結果を報告する予定である。

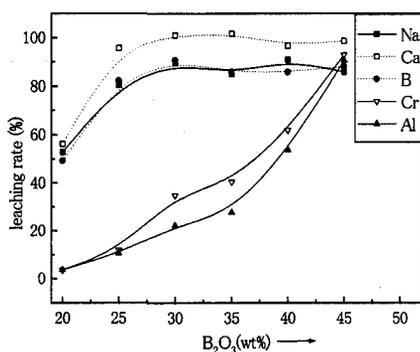


Fig. 1 Extraction rate of each ion from the remelted green glass with different amount of B₂O₃. Leaching rate of Na and B appears lower than 100% because of the weight loss during the remelting

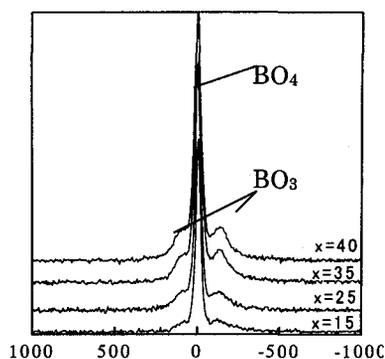


Fig. 2 ¹¹B static NMR spectra of the re-melted glass with different amount of B₂O₃. X shows wt% of B₂O₃.

【参考文献】

- 1) W. F. Du, K. Kuraoka, T. Akai and T. Yazawa, J. Phys. Chem. B., 105, 11949 (2001).
- 2) D. Chen, H. Masui, T. Akai and T. Yazawa, Ceram. Trans. *in press*
- 3) D. Chen H. Masui, T. Akai and T. Yazawa, Phys. Chem. Glasses, *in press*,
- 4) T. Akai, D. Chen. H. Masui and T. Yazawa. *ibid*, *in press*

Refocused CP-INADEQUATE、FSLG-HETCOR法による天然セルロースの結晶構造解析

(ブルカーバイオスピン株式会社、北海道大学大学院工学研究科)

○甲野 裕之¹、恵良田 知樹²、高井 光男²Structural Analysis of the Native Cellulose
by the Refocused CP INADEQUATE and FSLG-HETCOR Experiments

Hiroyuki Kono, Tomoki Erata,* and Mitsuo Takai*

Bruker BioSpin Co. Ltd., Tsukuba 305-0051, and

*Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060-8628

Abstract: Using a refocused INADEQUATE NMR experiment we show that homonuclear carbon-carbon through bond correlation spectra of the natural abundant *Cladophora sp.* and *Halocynthia sp.* celluloses. The 2D correlation maps are used to assign unambiguously the carbon resonance of the native cellulose I_{α} and I_{β} , respectively. The results of the ^{13}C assignments for the two allomorphs are in complete agreement with those determined by using the 1D ^{13}C spectra of ^{13}C enriched bacterial celluloses that were reported previously.¹ After the assignment of ^{13}C resonance lines for cellulose I_{α} and I_{β} , proton chemical shifts for both allomorphs were estimated by the HETCOR experiment under fast MAS and FSLG decoupling. When the short mixing times ($< 20 \mu\text{sec}$), only one-bond J_{CH} correlation signals were observed in the HETCOR spectra without geminal $^2J_{\text{CH}}$ couplings, which allowed assignment of the proton chemical shifts of the native cellulose I_{α} and I_{β} for the first time. In addition, these techniques were applied to the assignment of ^1H and ^{13}C chemical shifts of some cellulose derivatives in order to obtain their structures in the solid-state.

1. はじめに； 天然セルロース (セルロース I) が二つの結晶多形 (I_{α} , I_{β}) の混合物であることが CP/MAS ^{13}C NMR によって明らかにされて以来、²⁾ 固体NMRは有力なセルロース結晶構造解析手段として用いられてきた。しかし複数の共鳴線が重なりあい、単一の結晶を持つセルロースが存在しないため共鳴線の帰属がされておらず、NMR スペクトルから得られる構造情報は僅かであった。最近、我々は位置選択的 ^{13}C ラベルバクテリアセルロースを調製し、それらスペクトルの共鳴線強度を比較することで、複雑なセルロース I_{α} , I_{β} の固体NMR スペクトルを帰属することに成功した。¹⁾ その結果、I. 及び I. の殆ど全ての炭素原子は等価な強度をもつ二重線であることが明らかになり、 I_{α} , I_{β} 結晶構造中には異なる二つのコンフォメーションを持ったグルコース残基が含まれていることが示唆された。そこで本研究では二次元 INADEQUATE 法⁴⁾ によってセルロース I_{α} , I_{β} に含まれる二つのグルコース残基のサブスペクトルを導出し、FSLG-HETCOR 実験⁵⁾ でセルロースの ^1H 化学シフトの帰属を初めて試みた。また、三酢酸セルロースの結晶多形 (CTA I, II) についても同様の手法により構造情報を得ることを行った。

2. 実験； NMR測定試料としてシオグサ (*Cladophora sp.*、 $I_{\alpha}/I_{\beta}=64/36$)、ホヤ (*Halocynthia sp.*、 $I_{\alpha}/I_{\beta}=92/8$) から精製したセルロースを用いた。NMR実験は Bruker AV300WB を使い、室温にて行った。INADEQUATE 実験は Bruker 7mm 二重共鳴 MAS プローブ、回転速度 6 kHz、接触時間 1 msec、 $\tau=3.4$ msec で行った。FSLG-HETCOR 実験は Bruker 4mm 二重共鳴 MAS プローブを用い、試料容量 20 μL 、回転速度 12 kHz、ミキシングタイム 20 μsec にて行った。スペクトルの線形分離は Bruker WINFIT を用い、各共鳴線を Lorentz 関数近似して行った。三酢酸セルロース測定試料はラミーセルロースを均一・不均一アセチル化することによって調製した。NMR測定は上述の手法に準じた。

3. 結果と考察； シオグサ (I_{α} リッチ)、ホヤ (I_{β} リッチ) セルロースの INADEQUATE スペクトルをそれぞれ示す。二次元 INADEQUATE スペクトルでは、J カップリングした隣接炭素原子は二量子遷移軸方向で同じ周波数を示す。即ち、C 1 の共鳴線から C 6 まで全ての炭素原子を直接的に帰属することが可能で

固体二次元NMR INADEQUATE HETCOR セルロース

この ひろゆき、えらた ともき、たかみ みつお

ある。シオグサのスペクトルではC 1は一重線であるが、二次元スペクトル上では異なるDQシフトを持つ二つのピークが観測された。この二つのピークからC 2以降、連続的にC 6まで全て二つの炭素-炭素相関ピークが確認できる。ホヤセルロースのスペクトルでも同様、C 1からC 6まで異なる二組の相関ピークの組が観測できた。INADEQUATE スペクトルからの帰属結果は我々が以前報告した¹³Cエンリッチ酢酸菌産生セルロースを用いた¹³Cラベル化率と共鳴線強度比によって求めた結果¹⁾と完全に一致するため、シオグサ、ホヤのスペクトル上に観測された相関ピークはそれぞれI_α、I_β由来の共鳴線であるといえる。即ち、INADEQUATE スペクトルに見られた相関ピークの二組はI_α、I_β中に二種類のグルコース残基が存在することを直接証明しており、I_α、I_β各二つのグルコース残基のサブスペクトルが初めて明らかになった。また、計4つのグルコース残基各炭素原子の化学シフトはそれぞれ異なるため、4種類のコンフォメーションは互いに異なっていると予想される。さらに、各共鳴線は等しい強度を持つことから、I_α、I_βの単位胞中にはともに異なる2組のグルコース残基が1:1で存在すると考えられる。

次にセルロースの分子内・分子間水素結合に関する情報を得るために FSLG-HETCOR (混合時間 20 μs~2 ms) 実験を行った。一般に強い双極子相互作用によって¹H 共鳴線の線幅は数千 Hz に及ぶが、高速試料回転 (12 kHz)、FSLG プロトンデカップリングの併用によって高分解能な¹³C-¹H相関スペクトルが得られた。INADEQUATE スペクトルによって帰属された¹³C化学シフトとFSLG-HETCOR スペクトル (混合時間 20 μs) の比較によって各炭素原子に直接結合した¹H原子の化学シフトが帰属できた。シオグサとホヤの各¹H化学シフトは互いに大きく異なり、水素結合様式の違いを反映した結果が得られた。ポスター発表時にはNMRにより得られたセルロース I_α、I_βの構造上の違いについてより詳細に述べる。また三酢酸セルロースの結晶多形の構造的な違いについてもNMRスペクトル (図-2) から議論する。

参考文献 ; (1) Kono *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002) 7506-7511., (2) Atalla and VanderHart,

Solid State Nucl. Magn. Reson., **15** (1999) 1-19., (3) Kono *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002) 7512-7518., (4) Lesage *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 10987-10993., (5) Lesage *et al.*, *J. Magn. Reson.*, **148** (2001) 449-454.

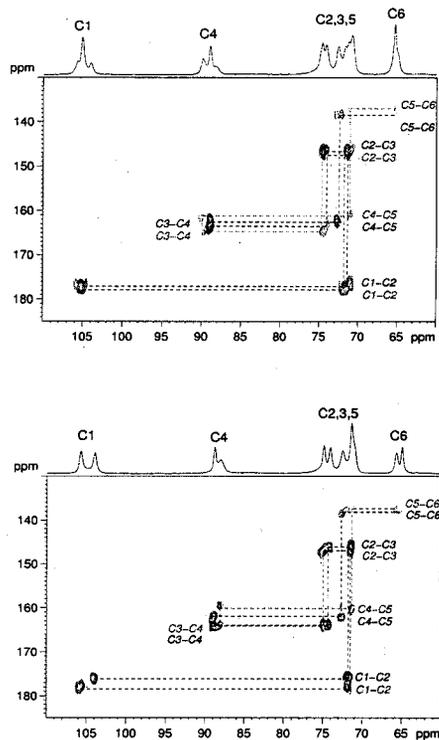


Figure 1 Refocused INADEQUATE spectra of Cladophora (top) and tunicate (bottom) celluloses

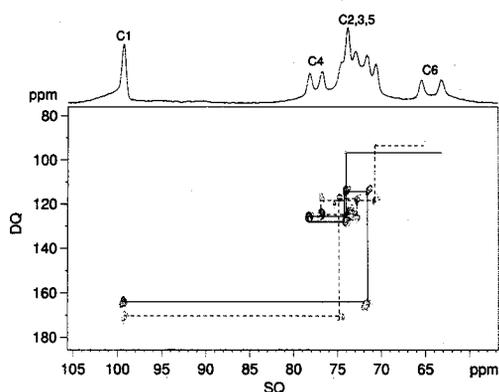


Figure 2 Expansion of the refocused INADEQUATE spectrum of cellulose triacetate II (ring carbon region)

パルス NMR 法によるアクリル酸、
 アクリル酸エステルの塊重合に関する研究
 側鎖の違いがネットワーク形成に及ぼす影響 (3)
 (防衛大応化) ○福田敦子、木本博喜、浅野敦志、黒津卓三

The study of bulk polymerization of acrylic acid and its esters by pulsed NMR
 The effects of side chain on formation of polymer networks (3)
 (Department of Applied Chemistry, National Defense Academy)
 A.Fukoda, H.Kimoto, A.Asano, and T.Kurotsu

^1H spin-spin relaxation times (T_2) of methyl acrylate (MA), acrylic acid (AA), and 2,2,2-trifluoroethyl acrylate (FEA) were measured as a function of the polymerization time. Three kinds of the relaxation times, T_{2L} (long), T_{2M} (intermediate), and T_{2S} (short) were observed. In the case of MA and FEA, a sum of $P_M + P_S$ (fraction of $T_{2M} + T_{2S}$) was in good agreement with the polymer yields and T_{2S} component was not observed in the early stage of polymerization. In the case of AA, however, T_{2S} component was observed in the early stage and was in good agreement with the polymer yields. These observations indicate that the formation of polymer network reflects the difference in the side chains between MA (COOCH_3) and AA (COOH).

(序) 我々は、これまでにアクリル酸 (AA)、アクリル酸メチル (MA)、アクリル酸 2,2,2-トリフルオロエチル (FEA) の塊重合過程にパルス NMR 法を適用し、塊重合過程を分子運動論的に検討してきた。これらの T_2 の値とその分率は、重合過程を良く反映している。ここでは FEA を用いて、フッ素核の T_2 を解析することにより、重合過程におけるモノマー分子の側鎖の運動性の違いを検討した。その結果、重合中に生じるネットワーク形成において、側鎖の違いが反映されていることがわかってきた。側鎖の違いによる影響について、固体高分解能 ^{13}C NMR も使用し、検討した結果を併せて報告する。

(実験) 緩和時間は、日本電子 JNM-MU25 を使い、プローブ中で重合させながら水素核及びフッ素核について測定した。固体高分解能 ^{13}C NMR 測定には、Bruker DMX-500 を使用した。

(結果と考察) 反応開始直後は、AA、MA、FEA 共に溶液状態であり、単一の緩和時間として観測されるが、反応が進行すると、 T_2 は3つの成分に分離

パルス NMR、アクリル酸、アクリル酸エステル誘導体、塊重合、緩和時間

ふくだあつこ、きもとひろき、あさのあつし、くろつたくぞう

される (Figs.1,2)。AA では、重合開始直後 (約 1500 分後) から、 T_{2S} が観測され、それに伴い T_{2L} が大きく減少している。一方、側鎖がエステルである FEA と MA では、 T_{2L} がほぼ一定となる約 500 分後から T_{2S} が観測される。AA では、反応の最終段階において、反応温度に関わらず、 T_2 の分率が P_L 約 2%、 P_M 約 30%、 P_S 約 68% と一定になるが、FEA では、温度により T_2 の分率が大きく異なっている。FEA の場合、50℃では P_M が約 70% に増加するが、60℃では、約 50% までしか増加しない。

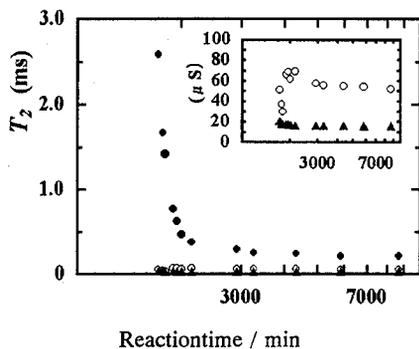


Fig.1 T_2 vs. Reactiontime at 50 °C for AA

●, T_{2L} ; ○, T_{2M} ; ▲ T_{2S}

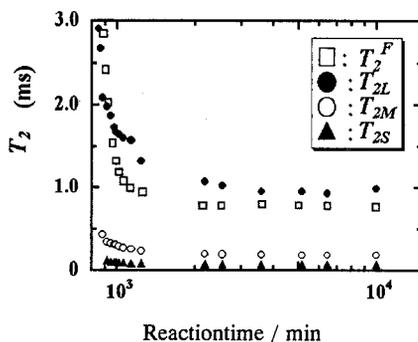


Fig.2 T_2 vs Reactiontime at 50 °C for FEA

恒温槽中で重合させたポリマー収率 (Fig.3) は、AA では P_S と良い一致を示した。しかし、側鎖がエステルである MA、FEA (Fig.4) では P_S とポリマー収率の間には良い相関関係が得られず、 $P_M + P_S$ で収率の約 80% 以上でのみ良い一致を示した。これは、AA では反応初期の段階からエステルでは見られないネットワーク (3 次元的架橋) が形成されており、分子運動が阻害されているものと考えられる。

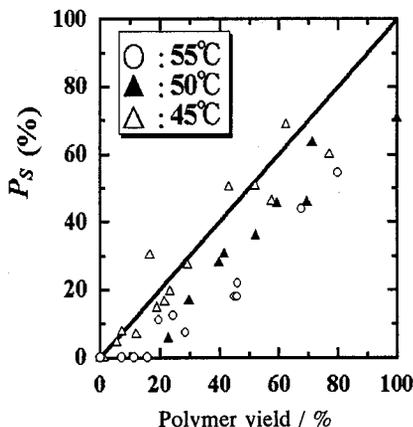


Fig.3. P_S vs polymer yield for AA

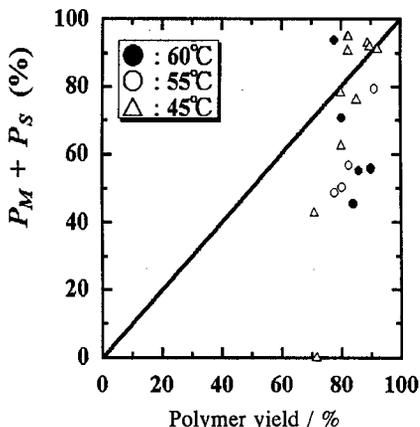


Fig.4. $P_S + P_M$ vs polymer yield for FEA

We applied MQMAS methods to characterize the hydration process of organic sodium salts. For sodium carbonate, at least six components of anhydride and two components of monohydrate are separated in the ²³Na-MQMAS NMR spectra. Even for the mixture sample having various hydration, each of these sites are clearly observed in the spectra. For sodium acetate trihydrate, which was partially dehydrated in the nitrogen atmosphere, three components were observed in the MQMAS spectra. This indicates there seems to be two forms in the dehydration process for sodium acetate.

はじめに MQ-MAS 法は ²⁷Al, ²³Na, ¹¹B, ¹⁷O などの四極子核の固体高分解能スペクトルを得る方法として既に無機材料、特にゼオライトの構造解析の分野で広く応用されている。最近では変調パルスによる感度向上法の研究や CP や REDOR 法と組み合わせた手法にも発展している。一方、有機材料への応用例は未だ多くない。近年、医薬品や食品分野において有機化合物の水和状態や結晶多形等への興味が高まっており、それらの中には金属塩として精製される結晶性化合物も多い。固体 NMR 測定は主に ¹³C が対象になっているが、四極子核は核の周りの配位環境によって共鳴線の形状が大きく変化するため、I=1/2 核よりも構造の違いを鋭敏に反映する可能性がある。そこで、本研究ではカルボン酸のナトリウム塩の標準的な化合物について ²³Na-MQMAS 測定を試み、その有用性を検討した。

実験と結果 測定には Chemgnetics CMX-400 および 4mm φ MAS プローブを用いた。Na₂CO₃ の無水物、一水和物の ²³Na-MQ-MAS スペクトルを Fig.1 に示す。無水物には少なくとも 6 つ、一水和物には少なくとも 2 つのサイトが存在することが判る。無水物を大気中に長時間放置した試料のスペクトル (Fig.1c) では上記の 2 つのスペクトルに見られた成分以外に新たなピークが観測された。水和数の異なる複数の状態 (おそらく一、七、十水和物) の混合物であると考えられる。このようなスペクトルにおいても t₁ 軸でピークが明瞭に分離されているため、個々の成分のスペクトルを詳細に解析することにより、Na イオン近傍の構造に関する情報を得ることが可能である。

次に CH₃COONa の無水物と三水和物の ²³Na-MQ-MAS スペクトルを Fig.2a,b に示す (無水物には三水和物がわずかに含まれていた)。この化合物の場合、無水物と水和物では四極子相互作用の大きさが著しく異なるため、MQ-MAS を用いなくともサイトの区別は容易である。しかしながら三水和物を窒素雰囲気下に長時間放置した試料のスペクトルは Fig.2c のようになった。幅広いスペクトルは t₁ 軸では 3 つのピークとして分離された。水分子の脱離とともに水和状態あるいは結晶構造が少なくとも 2 段階に変化していることが示唆された。この様にカルボン酸のナトリウム塩については MQ-MAS 法から水和状態や結晶構造に関する情報が引き出せることが判った。上記化合物の他、シュウ酸 Na、サリチル酸 Na やスルホン酸塩化合物についても検討を行った。比較のため固体 ¹³C-NMR スペクトルも測定も行っており、詳細は当日報告する。

キーワード : MQ-MAS, 水和, 結晶, ²³Na

○たばた さちお、さかた やすゆき、うえがき たかひろ

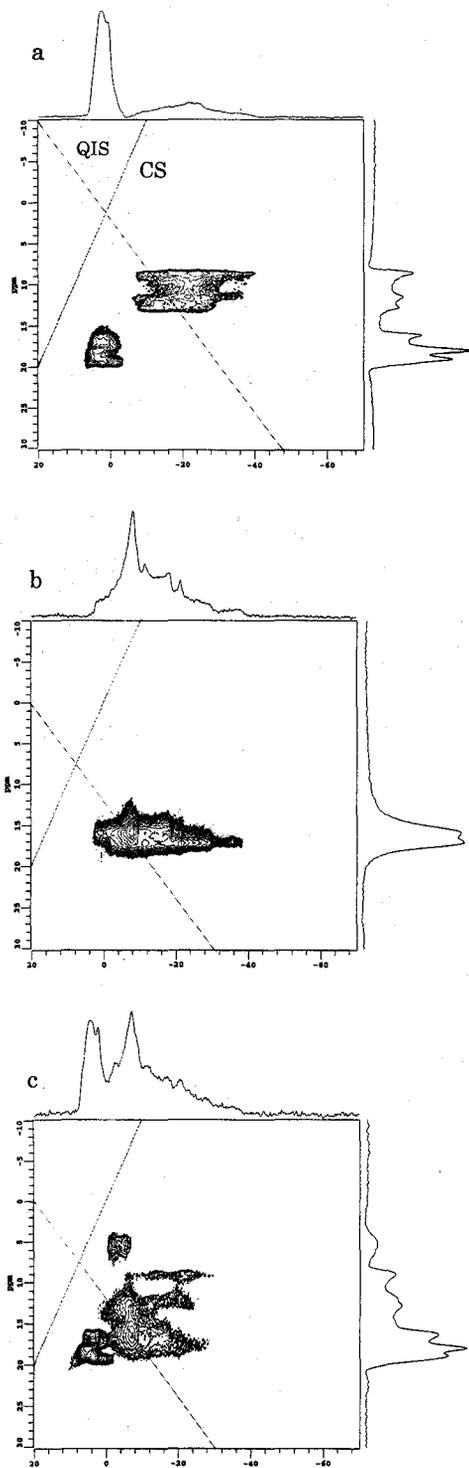


Fig1. Solid state ^{23}Na -MQMAS NMR spectra of (a) Na_2CO_3 anhydride, (b) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, and (c) Na_2CO_3 exposed in the air for long time.

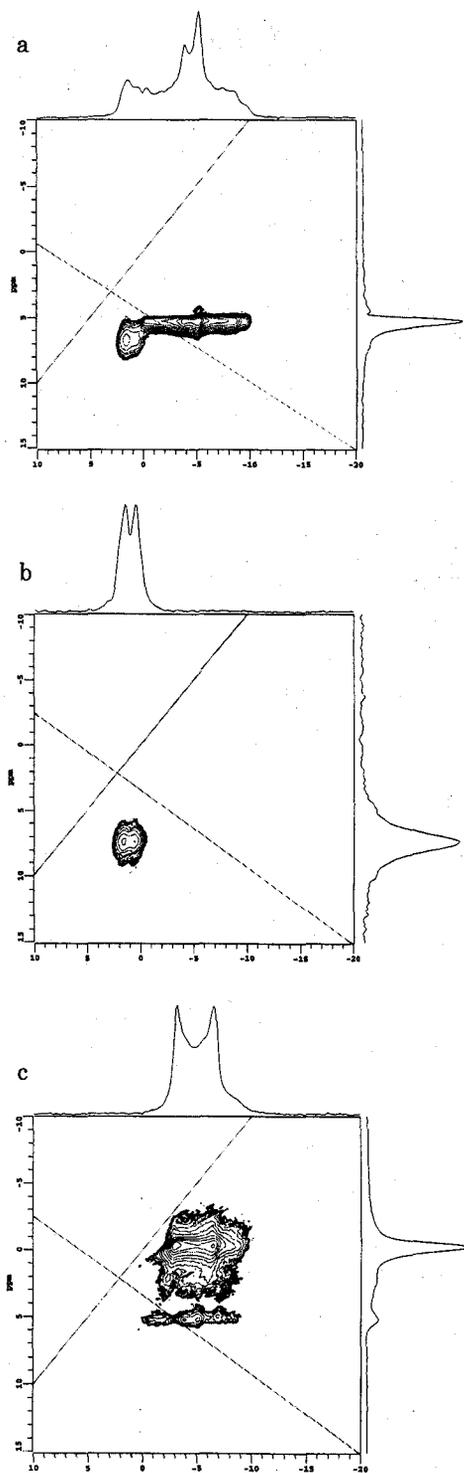


Fig2. Solid state ^{23}Na -MQMAS NMR spectra of (a) CH_3COONa anhydride, (b) $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, and (c) $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, exposed in the nitrogen atmosphere.

The advantage of High Magnetic Field NMR for the Structural Investigation in Solid Inorganic Materials

Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Laboratories

○Koji Kanehashi, Koji Saito

Although the structural analysis of solid inorganic materials that have small amounts of the target nucleus and considerable large quadrupolar coupling constant is often difficult when middle magnetic field (7.0 T) device is applied, MQMAS under high magnetic field (16.4 T) being capable of averaging the second-order quadrupolar interaction gave large advantage in terms of both increase of sensitivity and improvement of resolution. Moreover, high field NMR is found to be very effective to low frequency nucleus such as ^{17}O .

【はじめに】

^{27}Al [1], ^{17}O [2], ^{11}B [3]等の $I=1/2$ 以外の半整数スピン核を対象とした固体無機材料の構造解析に対しては、2 次の核四極子相互作用を平均化できる MQMAS 法による構造解析は非常に有効である。しかしながら、実用材料は一般的に測定対象核の濃度が数%と低いものが多く、非常に複雑な構造を持つことから、核四極子結合定数 $P_Q (= 2\pi C_Q \sqrt{(1+\eta^2/3)})$ も大きい場合も多い。このような場合、7.0 T (300 MHz) クラスの装置を用いた MQMAS 測定では、解析に必要な S/N を得るのに長時間を有すると同時に、大きい 2 次の核四極子相互作用により十分な分解能を持つスペクトルが得られない場合があった。そこで今回、16.4 T (700 MHz) の高磁場固体 NMR を用いて、いくつかの原材料中の Al の構造解析を行い、固体無機材料に対する高磁場の有効性について検討した。さらに、高磁場化によって ^{17}O 等の低周波数核への NMR 適用範囲も期待できることから、 ^{17}O について磁場強度の違いがスペクトルに与える影響についても検討したので報告する。

【実験】

NMR スペクトル測定には、JEOL ECA-700 (^{27}Al : 182.4 MHz, ^{17}O : 94.9 MHz, 4mm ϕ JEOL 製 ^{27}Al 及び ^{17}O 単核プローブ、試料回転速度: 18-20 kHz) および Chemagnetics CMX-300 (^{27}Al : 78.3 MHz, ^{17}O : 40.7 MHz, 4mm ϕ Chemagnetics 製 HX プローブ、試料回転速度: 16 kHz) を使用した。測定に用いた試料は Table 1 の通りである。 ^{17}O ラベルしたアモルファス AlPO_4 (a- AlPO_4) は $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ と ^{17}O -enriched H_3PO_4 (^{17}O : 20 atom %) とから、 NH_3 水を用いて pH=8 で調整し、120 $^\circ\text{C}$ 20 h、500 $^\circ\text{C}$ 6.5 h の順で乾燥、焼成することによって得られた。MQMAS パルスシーケンスは、z-Filter 型 3 パルスシーケンスを用いた [4]、shearing 変換により F1 軸方向の位相処理を行った。また、CS (Chemical Shift) 軸の傾きが 1 になるように F1 軸方向のスケーリング処理を行った。 ^{27}Al 及び ^{17}O NMR スペクトルの化学シフト基準はそれぞれ 1 mol/l AlCl_3 水溶液: -0.1 ppm, H_2O : 0 ppm とした。

Table 1 Measured samples and target nucleus contents

Sample	Slag A	Coal A	Clay A	a- AlPO_4
Nucleus and Content	Al: 2.9 wt%	Al: 1.8 wt%	Al: 12.2 wt%	O: 22.1 wt%

【結果・考察】

固体無機実用材料に対する高磁場 NMR の適用例として、Fig. 1 に石炭 A の ^{27}Al 3QMAS スペクトルの結果を示す。石炭中の無機成分は Si, Al, Ca 等から成る複合酸化物であり、7.0 T 下での MQMAS 測定では 2 次の核四極子相互作用の影響により、MQMAS を用いても十分な分解能が得られなかったが、高磁場化により分解能が飛躍的に向上した結果、6 配位 Al に相当する領域に少なくとも 2 種の化学構造が存在していることが明らかとなった。さらに、MAS の重心及び isotropic shift 値から求められる各サイトの四極子パラメータ (等方化学シフト $\Delta\sigma$, P_Q) の抽出もより容易になり、分子構造を決定する上で重要な知見が得られるようになった。また、S/N もかなり向上し、より短時間で測定が可能となっており、MQMAS のような感度の良くない測定法に対しては特に有効である。

高磁場、MQMAS、固体無機材料

かねはしこうじ、さいとうこうじ

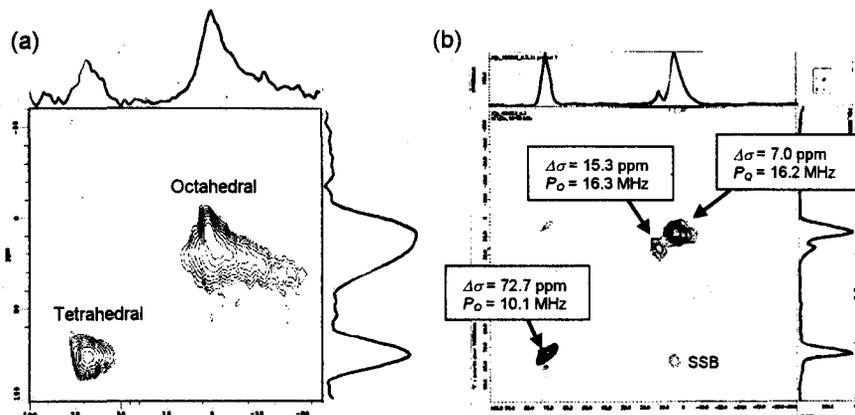


Fig. 1 ^{27}Al 3QMAS spectra of coal A. (a) 7.0 T, spinning rate: 16 kHz, acquisition: 1920, total experiment time: 102 h, (b) 16.4 T, spinning rate: 18 kHz, acquisition: 240, total experiment time: 25 h.

次に、低周波数核である ^{17}O へ適用した。 $\alpha\text{-AlPO}_4$ の ^{17}O 3QMAS スペクトルを Fig. 2 に示す。7.0 T では多数のスピンサイドバンドが出現し、メインピークの強度を上回っていたのに対し、11.7 T (500 MHz) では 2 種の化学構造の存在が明らかとなり、アモルファス構造に起因する CS (Chemical Shift) 方向への分布が観測された。さらに 16.4 T に磁場強度が増加すると、2 種の存在および CS 軸へのピーク分布がより明瞭となっている。また、一般的に MQMAS スペクトルの定量性は乏しいとされており、実際 11.7 T においては、MAS スペクトルでは低磁場側ピークのほうが強度が強いのにに対し、3QMAS クロスピークでは高磁場側ピークのほうが強くなっており、強度比が逆転してしまっている。これに対し、16.4 T では MAS スペクトルの強度比に対応する 3QMAS スペクトルが得られており、より定量的な議論が可能となると考えられる。このように、従来測定が困難であった低周波数核に対しても、高磁場化による共鳴周波数の上昇によって、詳細な構造解析を行うことができるようになる。

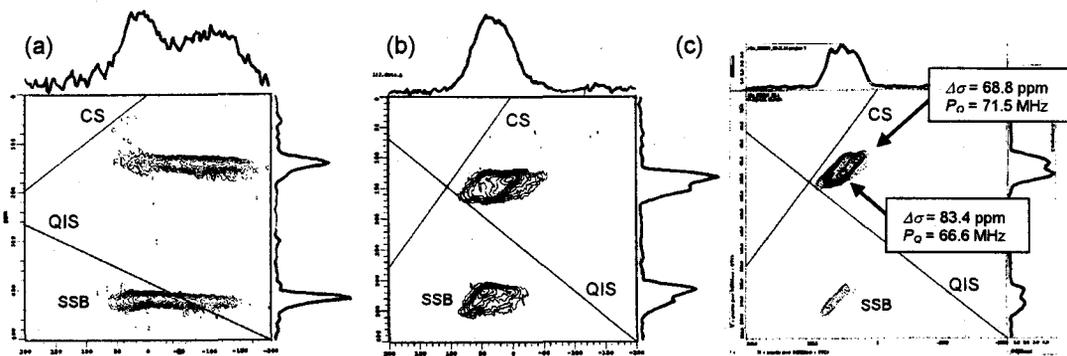


Fig. 2 ^{17}O 3QMAS spectra of amorphous AlPO_4 . (a) 7.0 T, spinning rate: 16 kHz, acquisition: 12000, total experiment time: 128 h, (b) 11.7 T, spinning rate: 12.5 kHz, acquisition: 4800, total experiment time: 64 h, (c) 16.4 T, spinning rate: 20 kHz, acquisition: 288, total experiment time: 10 h.

【まとめ】

スラグのような大きな P_0 を有し、測定対象核の濃度の低い固体実用無機材料の詳細な構造解析を行うためには、高磁場下での MQMAS が必須であることがわかった。以上の結果のように、基本的に高磁場は非常に有利であるが、7.0 T クラスの磁場強度でも MQMAS を用いれば十分に高分解能なスペクトルを得ることができる材料もあることから、測定材料の P_0 の大きさや測定核の存在量に応じて最適な装置を選択することが重要である。

【文献】

- [1] K. Saito, K. Kanehashi and I. Komaki, *Annual reports on NMR spectroscopy*, **44** (2001) 23.
- [2] K. Kanehashi and K. Saito, *Chem. Lett.*, **7** (2002) 668.
- [3] K. Kanehashi and K. Saito, *J. Mole. Struct.*, **602-603** (2002) 105.
- [4] J. P. Amoureux, C. Fernandez and S. Steuernagel, *J. Magn. Reson.*, **A123** (1996) 116.

P 79 ヘリックス構造を有する野生種蚕の絹タンパク質に関する固体 NMR 精密構造解析
～体内における特異的構造安定化機構の解明～

(農工大工) ○中澤靖元、朝倉哲郎

Precise Structure of Silk Fibroin from Wild Silkworm studied with Solid State NMR
~Stabilization of α -helical Structure of the Silk Fibroin in Silkworm~

Yasumoto Nakazawa and Tetsuo Asakura

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588
Tel: 042-383-7733 Fax: 042-383-7733 e-mail: yasumoto@cc.tuat.ac.jp

The precise structure of silk fibroin from a wild silkworm, *S. c. ricini*, whose amino acid sequence consists of repeated poly-Ala and Gly-rich regions, was clarified. The torsion angles of Ala and Gly residues in the model peptide of *S. c. ricini* silk fibroin, GGAGGGYGGDGG(A)₁₂GGAGDGYGAG, were determined by the conformation-dependent ¹³C chemical shifts, 2D spin-diffusion NMR and REDOR methods.

The torsion angle of the central Ala residue in poly-Ala region of the model peptide was determined to be $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -45^\circ)$, which was a "typical α -helix". On the other hand, the torsion angles of the Ala and Gly residues at both ends of poly-Ala were determined to be $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$ which means that these residues wind strongly than α -helix. Thus, a tightly winded helical structure at both terminal regions of poly-Ala, indicates the presence of the mechanism of stabilization of α -helical structure of poly-Ala region in *S. c. ricini* silk fibroin before spinning in order to avoid their death.

【Introduction】

野生種のカイコであるエリ蚕(*S. c. ricini*)は、家蚕とは異なる独特の性質を持つ絹糸を生産する。その物性の違いは一次構造の違いに起因しており、前者は Ala 連鎖領域と Gly リッチ領域という 2 つの特異的なモチーフの繰り返しからなり、後者の Ala と Gly の交互共重合体とは異なる。エリ蚕絹フィブロインは体内において、Ala 連鎖領域が α -helix 構造を形成し、吐糸することによって不溶性の β -sheet 構造へと変化する。

これまでに、エリ蚕絹フィブロインの繊維構造については、通常の ¹³C CP/MAS NMR¹ とともに、角度依存固体 NMR² 法を用いて研究が行われてきた。特に後者の研究によって、Ala の 75%、Gly の 65% が配向していること、さらに、配向した Ala の内部回転角、 (ϕ, ψ) を $(-130^\circ \pm 10^\circ, 140^\circ \pm 5^\circ)$ 、Gly の内部回転角 (ϕ, ψ) を $(-130^\circ \pm 10^\circ, 140^\circ \pm 10^\circ)$ と決定された。また、繊維化前の構造の決定は、溶液 ¹³C および ¹⁵N NMR、ならびに ¹³C CP/MAS NMR によって行われた。Ala 残基の約 70% は、Ala 連鎖を形成し、0°C で 100% α -helix、温度上昇につれ、 α -helix-random coil 間の早い交換を生じ、random coil へ変化することがわかった³⁻⁵。さらに最近、エリ蚕液状絹の温度変化に伴う Gly 残基の挙動も明らかとなり、Ala 連鎖領域の N 末端側に隣接した Gly 残基が α -helix 構造に巻き込まれ、温度の上昇にともない、random coil へと構造転移する様子が詳細に解析された⁶。また、エリ蚕液状絹の構造変化に伴う Ala および Tyr 残基の運動性の変化や⁷、同様の一次構造を有するサク蚕絹フィブロインのメタノール処理による構造変化の過程が固体 NMR によって詳細に解析された⁸。このタンパク質の構造をいかなるメカニズムでコントロールしているのかを解明することは、エリ蚕絹を模倣した新規絹様材料を設計する上で必要不可欠である。そこで本研究では、二次元 ¹³C スピン拡散 NMR 法ならびに REDOR 法を併用することによって安定化を担っていると考えられる α -helix 構造ならびにその末端領域の構造を原子レベルで明らかにした。

¹³C 二次元スピン拡散 NMR、REDOR、 α -helix、絹フィブロイン、安定同位体ラベル
なかざわやすもと、あさくらてつお

【Materials and Methods】

エリ蚕絹モデルペプチド、GGAGGGYGGDGG(A)₁₂GGAGDGYGAG は Fmoc 固相合成法により合成した。モデルペプチドは必要に応じて安定同位体ラベルを施した。Table 1 には合成したモデルペプチドを示した。

Table 1. Several ¹³C and ¹⁵N-labeled model peptides of the silk fibroin from *S. c. ricini*, GGAGGGYGGDGG(A)₁₂GGAGDGYGAG synthesized by the solid-phase method for 2D spin diffusion and REDOR experiments.

Peptide	Method	Information
GGAGGGYGGD[1- ¹³ C]G[2- ¹³ C]G[3- ¹³ C]A(A) ₁₁ GGAGDGYGAG	¹³ C CP/MAS NMR	local structure
GGAGGGYGGDGA(A) ₁₁ [1- ¹³ C]G[2- ¹³ C]G[3- ¹³ C]AGDGYGAG	¹³ C CP/MAS NMR	local structure
GGAGGGYGGDGG(A) ₅ [1- ¹³ C]Ala ₁₈ [1- ¹³ C]Ala ₁₉ (A) ₅ GGAGDGYGAG	Spin-diffusion	Ala ₁₉ (φ, ψ) Angle
GGAGGGYGGD[1- ¹³ C]Gly ₁₁ [1- ¹³ C]Gly ₁₂ (A) ₁₂ GGAGDGYGAG	Spin-diffusion	Gly ₁₂ (φ, ψ) Angle
GGAGGGYGGDGG[1- ¹³ C]Gly ₁₂ [1- ¹³ C]Ala ₁₃ (A) ₁₁ GGAGDGYGAG	Spin-diffusion	Ala ₁₃ (φ, ψ) Angle
GGAGGGYGGDGG(A) ₁₁ [1- ¹³ C]Ala ₂₄ [1- ¹³ C]Gly ₂₅ GAGDGYGAG	Spin-diffusion	Gly ₂₅ (φ, ψ) Angle
GGAGGGYGGDGG[1- ¹³ C]Gly ₁₂ (A) ₃ [¹⁵ N]Ala ₁₆ (A) ₈ GGAGDGYGAG	REDOR	[1- ¹³ C]Gly ₁₂ ---[¹⁵ N]Ala ₁₆ Distance
GGAGGGYGGDGG(A) ₈ [1- ¹³ C]Ala ₂₁ (A) ₃ [¹⁵ N]Gly ₂₅ GAGDGYGAG	REDOR	[1- ¹³ C]Ala ₂₁ ---[¹⁵ N]Gly ₂₅ Distance

¹³C 二次元スピン拡散 NMR 測定は、Varian Unity INOVA 400 によって Off MAS(54+9°)条件下で行った。ミキシングタイムは 2s、試料回転速度は 6KHz、室温で測定した。アミノ酸残基の内部回転角に依存するスペクトルパターンのシミュレーションを Multi-step 法を用いた Fortran プログラムを使用して行った。これらのシミュレーション計算は SGI 社製の OCTANE を用いた。スペクトルパターンのグラフィック化は、数値解析ソフト MATLAB を用いて行った。また REDOR 測定には、CMX Infinity400NMR 分光計(Chemagnetics Co)を用い、¹³C 共鳴周波数は 100MHz、プローブは Chemagnetics 社製、HYX Triple Resonance T-3 プローブを用いた。試料回転速度は 3kHz および 6kHz でおこない、Evolution time は 24ms まで測定した。

【Results and Discussion】

本研究で得られたエリ蚕絹フィブロインのモデルペプチドと繊維化前のエリ蚕絹フィブロインから作成したフィルムの ¹³C CP/MAS NMR の結果を Figure 1 に示す。Gly ピークの強度が違うものの、すべての化学シフト値が一致することから、モデルペプチドは繊維化前構造と一致することがわかる。また、Ala Cα はシャープなピークを与え、α-helix 構造の化学シフト値を示すが、Ala Cβ ピークに関しては、2 成分のピークを与えることがわかった。一次構造中に含まれる Ala 連鎖領域以外の Ala 残基は約 10% であり、これらを random coil としても、両者の比率(高磁場側：低磁場側)は 2:1 となる。これは Ala 連鎖領域の形成する α-helix 構造が凝集する際に環境が異なる Ala 残基が生じたためと考えられる。

また、Ala 連鎖領域の N 末端側に存在する Gly₁₁、Gly₁₂、Ala₁₃ 残基は helix 構造であることが、選択的に同位体ラベルされたモデル化合物の化学シフト値よりわかった。この結果から、α-helix 構造は

Ala 連鎖領域のみならず、Gly リッチ領域にも及んでいることが推測される。しかしながら、これらの局所構造は Ala 連鎖領域の中央部に存在する

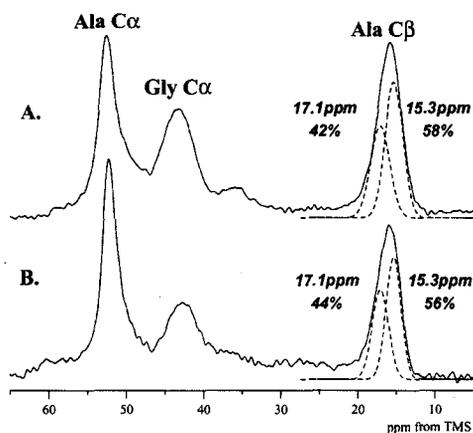


Figure 1 ¹³C CP/MAS NMR spectra(5-65ppm) of (A) the model peptide from *S. c. ricini* silk fibroin, GGAGGGYGGDGG(A)₁₂GGAGGGYGAG and (B) *S. c. ricini* silk fibroin film.

構造と同一のものであるか、あるいは特殊な構造を形成しているのか、化学シフト情報からでは特定することができない。特に Gly 残基については、化学シフト値の構造依存性が小さいため、断定することは困難である。そこで本研究では、他の固体NMR法を用いて、 α -helix 構造を中心とした局所構造の決定を行った。

二次元スピン拡散固体 NMR 法により、Ala 連鎖領域中央部に存在する Ala₁₉ 残基についてその内部回転角を決定したところ、 $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -45^\circ)$ であった (Figure 2, e f)。この内部回転角の値は典型的な α -helix 構造を示している。また、この結果は、繊維化前の状態を形成しているエリ蚕絹フィブロインフィルムの DOQSY による構造解析の結果と一致している⁹。

一方、Ala 連鎖領域の N 末端側に存在する Gly₁₂ 残基の内部回転角値を決定したところ、 $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$ であった (Figure 2 a-b)。また、Ala₁₃ に関しても同様の結果が得られた。この結果より、Ala 連鎖領域中央部は $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -45^\circ)$ 、最初の helix ターンにあたる N 末端側 4 残基の Gly₁₁-Gly₁₂-Ala₁₃-Ala₁₄ のみ $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$ となり、N 末端側が、すばまった構造、すなわち「winding helical structure」を形成していることが明らかとなった。

また REDOR 法により、 $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{Gly}_{12}$ - $[15\text{N}]\text{Ala}_{16}$ 原子間距離を測定したところ、 $5.0 \pm 0.1 \text{ \AA}$ と決定された。この距離は典型的な α -helix 構造を形成した場合の距離である 4.2 \AA を上回り、Ala 連鎖領域を中心とする helix 構造が単一な α -helix ではないことを支持している。そこで、REDOR から得られた距離をもとに helix 末端 4 残基のとりうる $\phi\psi$ マップを作成した (Figure 3)。このプロットによると、 $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$ の内部回転角の値のときに REDOR の結果を満たしていることがわかる。また、Ala 連鎖領域 C 末端側に存在する Gly₂₅ についても同様の実験を行ったところ、Ala 連鎖領域の N 末端側の内部回転角と同一の内部回転角の値であることがわかった。すなわち、エリ蚕絹フィブロイン繊維化前における Ala 連鎖領域はその両末端側において helix ピッチを若干短くしていることですばまった構造を形成していることが明らかとなった。

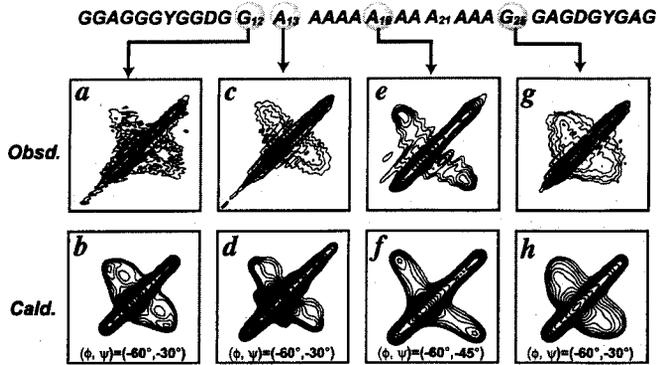


Figure 2 The experimental and simulated 2D spin-diffusion NMR spectra of the model peptide from *S. c. ricini* silk fibroin, GGAGGGYGGDGG(A)₁₂GGAGDGYGAG. The torsion angles (ϕ and ψ) were determined to be $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -45^\circ)$ for Ala₁₉ and $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$ for the other amino acid residues, Gly₁₂, Ala₁₃, Gly₂₅, respectively.

Table 2 The torsion angles of the model peptide from *S. c. ricini*, GGAGGGYGGD₁₀GGAAAAAAA₂₀AAAAGGA₃₀YGAG determined by 2D spin diffusion NMR

Residue	ϕ	ψ
Gly ₁₂	$-60^\circ \pm 5^\circ$	$-30^\circ \pm 5^\circ$
Ala ₁₃	$-60^\circ \pm 5^\circ$	$-30^\circ \pm 5^\circ$
Ala ₁₉	$-60^\circ \pm 5^\circ$	$-45^\circ \pm 5^\circ$
Gly ₂₅	$-60^\circ \pm 5^\circ$	$-30^\circ \pm 5^\circ$

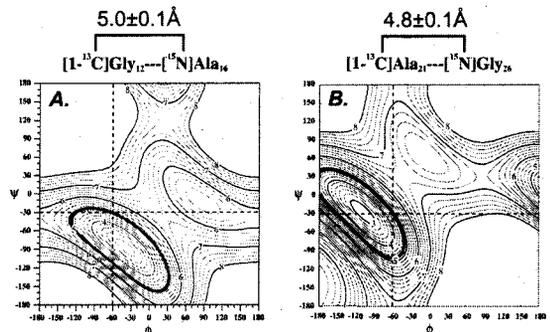


Figure 3 The contour plots of the conformation-dependent distance between the labeled sites at the (A) N-terminal and (B) C-terminal groups determined from REDOR experiments. The bold lines mean the distance obtained by REDOR experiments and the dotted lines mean the torsion angles $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$.

【Discussion】

本研究では、エリ蚕絹フィブロインのモデル化合物を用いて、局所的な構造解析を行った。その結果、現在までにわかっていた α -helix構造の存在に加え、その末端領域において、 ψ 角がわずかに 15° 異なることを明らかにした (Figure 4)。この局所構造は Ala 連鎖領域の α -helix構造全体を安定化させることによって、体内での構造転移を阻害すると推測される。このようにわずかな内部回転角の変化を決定することができる高精度の解析によって、この構造安定性の議論が可能となった。

エリ蚕をはじめとした繊維タンパク質の特徴は強固な凝集構造を形成することで、繊維状態に構造変化することである。しかしながら、この特徴は繊維となる直前まで阻害する必要があり、このメカニズムが欠損したものはその個体の死を意味する。本研究で決定した「winding helical structure」は、繊維化前の状態において、helix構造全体を安定化し、不溶性の β -sheet構造を不用意に形成させることを阻害する安定化機構であると結論できる。また、これらの安定化機構は、繊維化する際、容易に繊維構造である β -sheet構造に移行していることから、それほど強固な安定構造を形成することなく、あくまで体内における特異的構造安定化機構として存在していると結論づけられる。

エリ蚕繊維化前の模式図を Figure 5 に示した。本研究で決定したエリ蚕絹フィブロインの繊維化前構造は、Ala 連鎖領域の有する疎水性相互作用や α -helix構造の macrodipole 等の相互作用によって、凝集状態を形成している。またその周囲には Gly リッチ領域によるネットワークが存在する。このような小さな疎水性ドメインを形成して、Gly リッチ領域に周囲を囲むことで、エリ蚕液状絹は体内において可溶化している。その際、本研究で明らかとなった局所構造はこれら凝集構造の安定化に寄与している。

本研究で用いたペプチドの安定同位体ラベリングおよびNMR解析の手法は、例えば、 β -amyloidにおける α -helix \leftrightarrow β -sheet 転移のモデル系として有効であり¹⁰、新規絹タンパク質の分子設計と同様に、その転移過程における重要な知見を与える。

【References】

1. Ishida, M., Asakura, T., Yokoi, M. & Saito, H., *Macromolecules* **23**, 88-94 (1990).
2. Asakura, T., Ito, T., Okudaira, M. & Kameda, T., *Macromolecules* **32**, 4940-4946 (1999).
3. Asakura, T., Kashiba, H. & Yoshimizu, *Macromolecules* **21**, 644-648 (1988).
4. Asakura, T., Yoshimizu, H. & Yoshizawa, *Macromolecules* **21**, 2038-2041 (1988).
5. Asakura, T. & Murakami, *Macromolecules* **18**, 2614-2619 (1985).
6. Nakazawa, Y. & Asakura, T., *FEBS Lett.*, in press (2002).
7. Nakazawa, Y., Nakai, T., Kameda, T. & Asakura, T., *Chem. Phys. Lett.* **311**, 362-366 (1999).
8. Nakazawa, Y. & Asakura, T., *Macromolecules* **35**, 2393-2400 (2002).
9. van Beek, J. D., Beaulieu, L., Schafer, H., Demura, M., Asakura, T. & Meier, B. H., *Nature* **405**, 1077-9. (2000).
10. Tycko, R., *Annu Rev Phys Chem* **52**, 575-606 (2001).

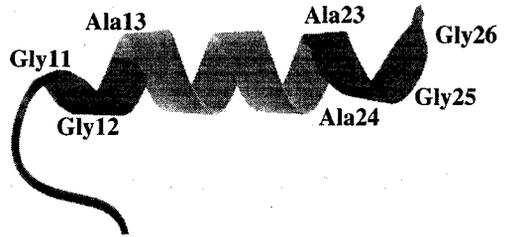


Figure 4 The local structural model of poly (Ala) region in silk fibroin from *S. c. ricini* before spinning. The torsion angles at N and C terminals of poly-Ala region was determined to be $(\phi, \psi) = (-60^\circ, -30^\circ)$ that is different from typical α -helix structure

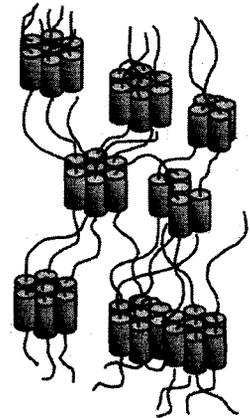


Figure 5 Proposed aggregated structure for *S. c. ricini* silk fibroin before spinning.

β シクロデキストリン包接体のケト-エノール互変異性の研究

(京大院理) ○松本 聖、中村 新治、竹腰 清乃理、寺尾 武彦

¹³C solid-state NMR study on keto-enol tautomerization in Dimedone/β-Cyclodextrin inclusion compound

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

○Sei Matsumoto, Shinji Nakamura, Kiyonori Takegoshi, Takehiko Terao

<ABSTRACT>

Dimedone (5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione) takes the enol form (Scheme 1) in the crystalline state, forming infinite helices by intermolecular hydrogen bonds [1]. Tautomeric proton transfer of dimedone (Scheme 2) in the solid state does not occur, because it requires all protons in the infinite molecular chain move at once. Such requirement would be removed or alleviated if we include dimedone in certain host molecules. In this work, we examined tautomeric proton transfer of dimedone included in β-cyclodextrin by analyzing ¹³C CP/MAS spectra at various temperatures. We show that, by isolating a dimedone molecule from others, 1,3 keto-enol tautomeric proton transfer occurs with the activation energy of 56 kJ/mol.

[1] D. Semmingsen, Acta Chem. Scand. B28 (1974) 169; I. Singh and C. Calvo, Can. J. Chem. 53 (1975) 1046.

¹³C solid-state MAS NMR spectra of 1,3-¹³C labeled dimedone included in β-cyclodextrin at various temperatures are shown in Fig.1. Figure 2 show simulated spectra assuming two-sites exchange motion as a function of exchange rate *k*. For calculation, we use

$$S(\omega) \propto \gamma B_1 M_0 \frac{\left(1 + \frac{1}{2k} \cdot \frac{1}{T_2}\right)}{P} \quad \text{with} \quad P = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{2k} \left\{ \frac{1}{T_2^2} + \frac{1}{4} (\omega_A - \omega_B)^2 \right\},$$

where T_2 is the transverse relaxation time, $\omega_A = 2\pi\nu_A$ and $\omega_B = 2\pi\nu_B$ are chemical shifts in $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$ of the C=O and C-OH carbons, respectively. The obtained *k* values are plotted in Fig.3 as a function of temperature, which we fitted to the Arrhenius equation $k = k_0 e^{-E_a/kT}$ by taking k_0 and E_a as adjustable parameters. We obtain $k_0 = 3.05 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$ and $E_a = 56.2 \text{ kJ/mol}$. (uncorrected yet) Apparently, by isolating dimedone in β-cyclodextrin, we could free the tautomeric process from the infinite hydrogen bonding chain. In order to obtain more information about molecular dynamics, X-ray analysis is now undergoing.

キーワード: β シクロデキストリン・固体 NMR・分子運動・包接化合物

まつもとせい・なかむらしんじ・たけごしきよのり・てらおたけひこ

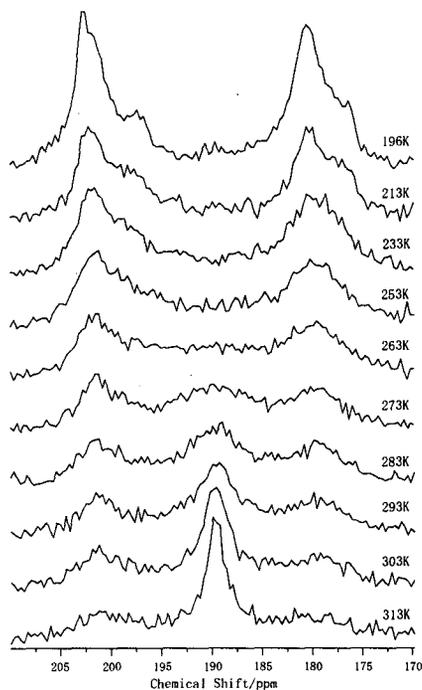


Fig.1 Observed ^{13}C solid-state CP/MAS NMR spectra of dimedone/ β -cyclodextrine inclusion complex at various temperatures. These temperatures are read directly from the controller, and not corrected yet.

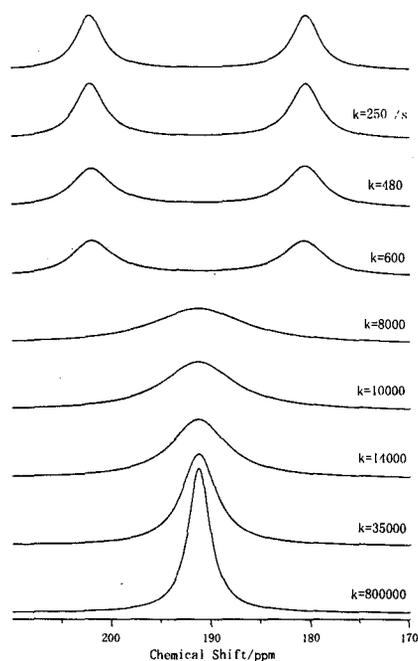


Fig.2 Simulated spectra for two equally populated co-exchanging at various exchange rates k . Each k values was chosen to reproduce the corresponding spectrum in Fig.1.

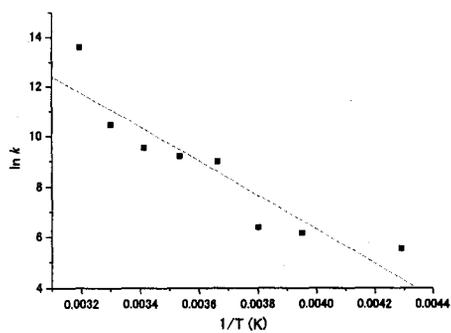
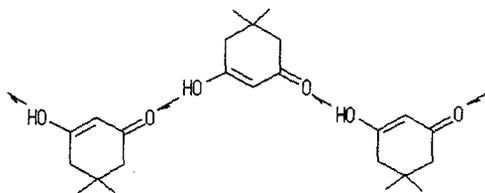
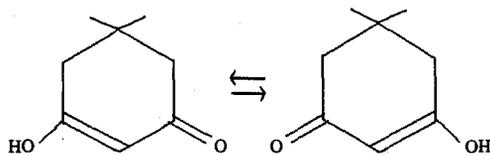


Fig.3 Arrhenius plots of k . The dotted line is the least-squares fitted one.



Scheme 1 Infinite hydrogen bonding of dimedone in the crystalline state.



Scheme 2 Keto-enol tautomeric proton transfer in dimedone.

固体NMRによる、青色蛍光体ZnS:Ag,Alの
付活剤濃度変化に対する発光特性と微細構造との関係

(三菱化学本社¹・化成オプトニクス²・東京水産大³)

○原園としえ¹・徳永幸男²・渡部徳子³

Activation Content Dependence of Luminous Characteristic and Fine Structure
in ZnS:Ag,Al Studied by Solid State NMR

(Mitsubishi Chemical Co.,Ltd.,¹ Kasei Optonix,² Tokyo University of Fisheries³)

○Toshie Harazono¹, Yukio Tokunaga², and Tokuko Watanabe³

²⁷Al-MAS, ⁶⁷Zn-static, and ³³S-static NMR spectra were measured in blue phosphor, ZnS:Ag, Al, where Zn atoms in ZnS were replaced with Ag or Al. The spectra indicated the presence of three Al sites, (a); Al replaced to a Zn site, which has a symmetrical electric field gradient, (b); Al replaced to a Zn site, which has an asymmetrical electric field gradient, (c); Al released from a lattice site, e.g., Al₂O₃ or Al(OH)₃ etc.. The Al concentration of a) and the half line-widths of ⁶⁷Zn- and ³³S-static NMR peaks were strongly related to the efficiency of the blue light emission.

著者らはこれまで、固体 NMR を用いて種々の蛍光体の発光特性と微細構造との関係を調べてきた。青色蛍光体、ZnS:Ag,Al に関しては、すでに第 3 4 回 NMR 討論会で、発光特性と ²⁷Al-static NMR スペクトルとの関係について報告した。¹⁾ 今回は、付活剤濃度の異なる種々のサンプルで、発光特性と微細構造との関係を調べるため ²⁷Al-MAS, ⁶⁷Zn-,及び、³³S-static NMR を測定し、新たな知見を得た。

試料、及び、測定方法：

本研究で用いた試料は、ZnSO₄ 水溶液に H₂S ガスを吹き込むことによって得られる ZnS に Ag を AgNO₃ 水溶液として添加し、Al を Al₂(CH₃COO)₃·4H₂O として添加し、他の融剤と共に 930°C で焼成して得られた。本研究で用いたサンプルの諸特性を表 1 に示した。不純物濃度は、全て 1ppm 以下であった。⁶⁷Zn、及び、³³S-static-NMR の測定は、Bruker 社製 MSL-300 固体 NMR 装置に static プローブを装着し、四極子エコーパルスプログラムを用いて行なった。また、²⁷Al-MAS NMR の測定は、4mm MAS プローブを用い、single パルス、回転数 8000rpm で行った。測定核、及び、Ag の磁氣的性質を表 2 に示した。

結果とまとめ： ZnS は立方晶型結晶で、Ag と Al はいずれも Zn サイトを置換していることが知られている。試料が電子線励起されると、Ag と Al が近傍に存在している場合、ドナーである Al 順位から、アクセプターである Ag 順位に電子遷移が起こり、450nm 付近にピークを持つ青色発光が起こる。前回、²⁷Al-static NMR スペクトルから、Al の存在形態は少なくとも 3 種類、即ち、a): Zn サイトを置換した対称性の良い電場の中に存在する

⁶⁷Zn NMR、³³S NMR、²⁷Al NMR、青色蛍光体、ZnS:Ag,Al

○はらぞの としえ・とくなが ゆきお・わたなべ とくこ

4 配位 Al、(Al-S₄)、b): Zn サイトを置換した対称性の悪い電場の中に存在する 4 配位 Al、(Al-S₄)、c): Al₂O₃ や Al₂(OH)₃ 等の遊離 Al、が存在することを報告した。¹⁾ 今回、b) は大きな電場勾配を持ち、ケミカルシフトがわずかに異なる数種類の Al に対応していることが明らかになった。MA と MB では、a) の Al 濃度が最大の所で、また、⁶⁷Zn と ³³S-static NMR ピークの線幅が極大、または、最大となった所で、発光効率が最大となった。

Table 1 Characteristic properties of ZnS:Ag,Al

Sample	Ag ¹⁾ /ppm	Al ¹⁾ /ppm	Al/Ag ¹⁾	Particle size d ₅₀ / μm	Br / y ²⁾ / %
MA1	100	12	0.5	12.8	57.4
MA2	100	25	1	12.4	87.0
MA3	100	50	2	9.6	93.5
MA4	100	126	5	7.2	91.2
MA5	100	252	10	6.0	89.7
MA6	100	504	20	5.9	89.1
MA7	100	750	30	6.1	89.7
MA8	100	1260	50	5.2	85.5
MA9	100	2520	100	5.0	84.8
MA10	100	5040	200	5.6	67.7
MB1	700	0	0	13.7	13.7
MB2	700	35	0.2	14.4	28.1
MB3	700	88	0.5	14.5	45.2
MB4	700	175	1	13.2	95.0
MB5	700	350	2	10.8	95.0
MB6	700	875	5	8.4	92.1
MB7	700	1750	10	7.8	88.1
MB8	700	3501	20	5.7	81.7
MC1	20	7.5	1.5	11.2	66.8
MC2	50	18.8	1.5	10.9	83.1
MC3	100	37.5	1.5	11.8	90.0
MC4	200	75.0	1.5	11.6	97.9
MC5	500	187.5	1.5	11.0	100
MC6	700	262.5	1.5	13.7	99.5
MC7	1000	375.0	1.5	14.3	93.0
MC8	1500	562.5	1.5	15.2	65.2
MC9	2000	750.0	1.5	13.9	78.3

1) Incorporated activation content.
2) Efficiency of the blue light emission.

Table 2 Characteristic parameters of nuclei

Nuclear	Spin	Quadrupole	Gyromagnetic	Reson.	Natural	Sensitivity	Ion radii coord.
	numb.	moment	ratio (γ)	freq.	abund.	/ ¹ H	by 6 numb. ²⁾
		/ 10 ⁻²⁴ cm	/ 10 ⁷ radT ⁻¹ s ⁻¹	at 7.05T	/ %		/ pm
²⁷ Al	5/2	0.15	6.9704	78.205	100	0.206	67.5(Al ³⁺)
¹⁰⁹ Ag	1/2	/	-1.2448	13.961	48.18	1.01 x 10 ⁻⁴	129(Ag ⁺)
⁶⁷ Zn	5/2	0.18	1.6737	18.779	4.12	2.86 x 10 ⁻³	88(Zn ²⁺)
³³ S	3/2	-0.05	2.0534	23.038	0.74	2.26 x 10 ⁻³	170(S ²⁻)

References

- 1) 原園 et.al., 第 3 4 回 NMR 討論会要旨集, p. 145、1995.
- 2) Inorganic Chemistry principles of structure and reactivity, 2ed edition, James E. Huheey, Harper & Row, Publishers, New York, Hagerstown, San Francisco, London.

An Estimation of Free Volume in a Rubbery Polymer using ^{129}Xe NMR spectroscopy
Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology
Maki Ohno, Tomoyuki Suzuki, Hiroaki Yoshimizu, Yoshiharu Tsujita

In this study, the ^{129}Xe NMR spectra and Xe sorption isotherms of acrylonitrile-butadiene copolymer rubbers(NBR) with various acrylonitrile(AN) contents were measured in order to clarify the relationship between ^{129}Xe NMR chemical shift and free volume of rubbery polymers. The sorption of NBRs obeyed Henry's law and ^{129}Xe NMR chemical shift showed a few and linear low-field shift against sorption amounts of Xe. The ^{129}Xe NMR chemical shift of ^{129}Xe nuclei in NBR samples was linearly decreased with increasing the both fractional free volume and temperature, indicating that the ^{129}Xe NMR spectroscopy is one of the methods on estimation of free volume of rubbery polymers.

《緒言》高分子中に存在する自由体積は粘弾性、耐衝撃性、耐疲労性などの力学物性に影響を与える。この自由体積についての情報を得る方法として ^{129}Xe NMR 法が挙げられる。Xe は他の物質と相互作用しにくく、また大きな分極率を有するため、周りの環境を反映して幅広い NMR 化学シフトを示す。したがって Xe をプローブとして高分子に吸着させて NMR 測定を行い、その NMR シグナルを解析することにより高分子の様々な情報を得ることができる。実際、我々は種々のガラス状高分子を対象に ^{129}Xe NMR 化学シフト値と Xe ガス吸着特性を調べた結果、未緩和体積に対応付けられる微空孔、ミクロボイドの平均サイズを評価できることを示してきた。高分子鎖のセグメント運動が凍結したとみなせるガラス状態では、個々のミクロボイドは一定不変の経時変化しない(或いは無視し得る程度に遅い)微空孔である。これに対し、ゴム状高分子では時間及び空間的に固定された微空孔はありえないので、ここに存在する ^{129}Xe 核が示す NMR 信号はガラス状高分子の場合とは異なると予想される。本研究では、まず種々のアクリロニトリル(AN)含有率を有するアクリロニトリル-ブタジエン共重合体ゴム(NBR)の ^{129}Xe NMR 測定及び Xe 吸着測定を行い、自由体積分率(FFV)と ^{129}Xe NMR 化学シフト値の相関関係を検討し、次に温度可変測定から自由体積の温度依存性の検討を行い、ゴム状高分子に溶解した ^{129}Xe の NMR 化学シフト値と自由体積の関連性を評価した。

《実験》サンプルは溶媒にテトラヒドロフラン(THF)を用い、溶液キャスト法で調製した。Xe 吸着測定は CAHN 社製精密電子天秤を用い、重量法により圧力範囲 0~760cmHg、測定温度 25°C

^{129}Xe NMR 化学シフト値、ゴム状高分子、自由体積、アクリロニトリル-ブタジエン共重合体ゴム

おおのまき、すずきともゆき、よしみずひろあき、つじたよしはる

で行った。 ^{129}Xe NMR 測定は圧力範囲 0~760cmHg、温度範囲-10~25°Cにおいて観測周波数 110.5MHzにてシングルパルス法で行った。NMR 管にサンプルを充填した後、充分真空乾燥し所定の圧力に相当する Xe を導入し、収着平衡に達した後に測定に用いた。 ^{129}Xe NMR 化学シフト値は同時に観測される気体 ^{129}Xe のピークを内部基準として補正した。

《結果と考察》Xe 収着測定を行った結果、いずれのサンプルもゴム状高分子に特徴的な Henry 型の収着等温線を示した。また Xe 収着量は AN 含有率の増加に伴い減少した。25°Cにおいて ^{129}Xe NMR 測定を行った結果、圧力の増加に伴い若干の線形的低磁場シフトが観測された。通常の有機高分子では、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値(δ)は $\delta = \delta(\text{S}) + \delta(\text{Xe})$ と表してよい。ここで $\delta(\text{S})$ は Xe 原子と空隙内壁との衝突による項であり、空隙が小さいほど大きくなる。 $\delta(\text{Xe})$ は Xe 原子同士の衝突による項であり、Xe 密度とともに線形的に増加する。この線形低磁場シフトは $\delta(\text{Xe})$ 項の寄与、即ち Xe 収着量に比例して増加する Xe 原子同士の相互作用が原因である。 ^{129}Xe NMR 化学シフト値を収着量 0 に外挿した値、 $\delta(\text{S})$ 値は AN 含有率の増加に伴い大きくなった。 $\delta(\text{S})$ 値は分子鎖間隙が狭いほど Xe 原子との相互作用が強くなるため大きな値をとる。得られた各サンプルの $\delta(\text{S})$ 値を自由体積分率(FFV)に対してプロットしたところ良い相関が見られた(Figure 1)。次に温度依存性を検討した。AN 含有率 37%の NBR37 について T_g 以上の温度範囲で ^{129}Xe NMR 測定を行った。得られた各測定温度における ^{129}Xe NMR 化学シフト値($\delta(\text{S})$ 値)を測定温度に対してプロットした結果、相関関係が見られ(Figure 2)、温度低下に伴う自由体積の減少が確認された。以上の結果から、 ^{129}Xe NMR 法はゴム状高分子の自由体積を評価するための一手法であることが示された。一方、NBR で得られた $\delta(\text{S})$ 値はガラス状高分子における値(約 160~210ppm)よりも低磁場である。仮に $\delta(\text{S})$ 値から空孔サイズに換算すれば、ゴム状高分子の方がガラス状高分子よりも小さいことになる。温度上昇によりガラス状態からゴム状態に移るので、一般論としてゴム状高分子のほうが自由体積は大きいといえるにもかかわらずゴム状高分子の $\delta(\text{S})$ 値の方が大きい、即ち個々の空孔サイズが小さいとするなら、必然的にその個数が多いと考えざるを得ない。これは言い換えれば、活発なセグメント運動の故に Xe 原子と高分子鎖との衝突頻度が上がり、高分子-Xe 原子間相互作用($\delta(\text{S})$)の寄与が Xe-Xe 原子間相互作用($\delta(\text{Xe})$)の寄与を相対的に上回った結果として、Xe 原子同士が衝突する確率が低下し、収着量の増加に対する低磁場シフトの割合がガラス状高分子の場合に比べて概ね一桁小さくなったと考察できる。

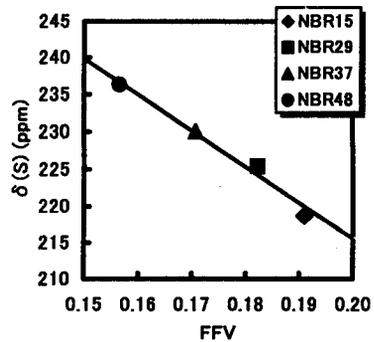


Figure 1 Plot of ^{129}Xe NMR chemical shift $\delta(\text{S})$ vs. fractional free volume.

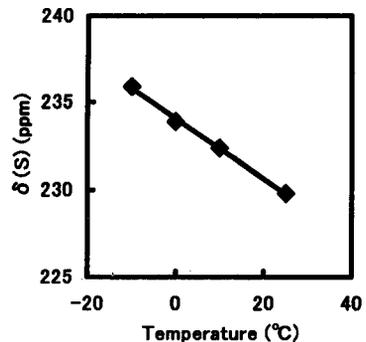
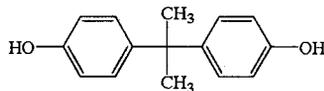


Figure 2 Temperature dependence of ^{129}Xe NMR chemical shift $\delta(\text{S})$ of NBR37.

^1H HS-MAS NMR Studies of Bisphenol-A CrystalsHisashi Honda¹, Hiroyuki Kono²Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University¹Bruker BioSpin Co. Ltd.²

In a crystal lattice of bisphenol-A, molecules take three conformations and each molecule is linked by H-bond network. To reveal some characters of -OH group of bisphenol-A, NMR measurements were carried out. ^1H HS-MAS NMR spectrum (Fig. 1 (a)) with spinning rate of 35 kHz showed ^1H - ^1H interaction between intra- and intermolecule are large. In order to reduce this interaction, we observed ^1H HS-MAS NMR spectrum of bisphenol-A-*d*16, in which a few percentages ^1H atoms were contained. Obtained spectrum shown in Fig. 1 (b) had roughly same line width of that observed by CRAMPS (Fig. 2). To get information of three conformations, we employed ^{13}C - ^1H FSLG-HETCOR method and obtained spectra as shown in Fig. 3. We also synthesized some bisphenol-A - base complexes and measured ^1H HS-MAS NMR spectra (Fig. 4) to study *pKa* dependence of chemical shift of hydrogen atom forming H-bond.

【序論】ビスフェノール A は、エポキシ樹脂やポリカーボネートの原料などとして工業的に広く用いられている。一方でビスフェノール A は内分泌攪乱物質(環境ホルモン)に分類されており、生態に与える影響が調査されている。環境ホルモン物質のほとんどは、ビスフェノール A と同様にフェノール性 OH 基を持っており、この OH 基がレセプターと水素結合を介してホルモン活性を示していると考えられている。そこで、環境ホルモン物質のフェノール性 OH 基に関する知見を得るために NMR 測定をおこなった。水素結合を形成している水素のケミカルシフトは、水素結合に関する情報を含んでいるので、本研究では ^1H HS-MAS NMR 測定を主に行った。また、 ^1H - ^1H 間の双極子相互作用を小さくする測定方法を試み、既存の CRAMPS 法と比較した。



ビスフェノール A の結晶は、空間群 $P2_1/n$ をとり、各分子が水素結合ネットワークを形成していることから、物性面でも非常に興味深い物質である。ビスフェノール A 分子は単位格子中に 3 種類存在している。これらは、2 つのフェノール基が作る 2 面角が、それぞれ 86.9° 、 83.6° 、 79.7° と異なったコンフォメーションをとっている。そこで、 ^1H HS-MAS、CRAMPS、 ^{13}C CP/MAS、 ^{13}C - ^1H FSLG-HETCOR 測定を行い、各分子の電子状態に関する情報を得た。

また、ビスフェノール A の OH 基に関する情報を多方面から得るために、様々な *pKa* を持つ塩基と塩を形成させ、水素結合の状態変化を調べた。

【実験】ビスフェノール A は市販のものを用いた。ビスフェノール A-*d*16 (D 化率 98%) はCIL社のもを用いた。アミン塩の合成には各塩に対して適切な有機溶媒を用いた。 ^1H HS-MAS 測定には、Bruker Avance 600 (14.09 T) 分光器を用いた。試料体積は約 $12 \mu\text{l}$ で、MAS の回転速度は 35 kHz である。CRAMPS、CP/MAS、FSLG-HETCOR 測定には Bruker Avance 300 (7.04 T) 分光器を用いた。試料体積は約 $25 \mu\text{l}$ で、CP/MAS 測定時の回転速度は 12 kHz、CRAMPS 測定には BR-24 パルス系を用い、回転速度は 2.2 kHz であった。また、FSLG-HETCOR 測定は、回転速度 12 kHz でミキシングタイムが $10 \mu\text{s}$ と $20 \mu\text{s}$ の 2 種類行った。

キーワード：環境ホルモン、水素結合、固体 ^1H スペクトル、固体二次元

ほんだ ひさし、こうの ひろゆき

【結果と考察】 図 1(a)に得られたビスフェノール A の ^1H HS-MAS NMR スペクトルを示す。0.6 と 6.7 ppm に幅広のピークが得られた。この線幅の原因として以下のことが考えられる。つまり、非等価なビスフェノール A が結晶中に 3 分子存在することに加え、各分子間の距離が小さいため双極子-双極子相互作用が大きい。この双極子-双極子相互作用を小さくする方法として二つ考えられる。一つは、CRAMPS 法である。もう一つは、 ^{13}C のスペクトル線幅が狭いことからヒントを得た方法で、重水素置換体に含まれる不純物の ^1H 核を HS-MAS 測定する方法である。ビスフェノール A- d_{16} の D 化率は 98 % なので、2% 弱の ^1H 核が試料中に含まれている。これは、 ^{13}C の天然存在比よりも大きい。この方法で得られたスペクトルを図 1(b)に示す。比較のため CRAMPS 測定で得たスペクトルを図 2 に示す。図 1(b)と図 2 から明らかなように、両測定方法の線幅は、ほぼ同程度であるが、CRAMPS 法のケミカルシフト値の誤差が大きいことを考慮すると今回試みた方法は、非常に有効と考えられる。

ビスフェノール A 結晶中に存在する 3 種類の分子の電子状態を明らかにするために、 ^{13}C CP/MAS および ^{13}C - ^1H FSLG-HETCOR 測定を行った。ミキシングタイムが 10 μs のときの結果を図 3 に示す。結晶構造に対応し、 ^{13}C のピークが複数本ずつ観測された。30 ppm 付近のピークはメチル基に、115 ppm 付近が OH 基から見て *o* 位、120~130 ppm が *m* 位、143 ppm 付近が *p* 位、150 ppm 付近は OH 基が結合した成素に帰属できた。

ビスフェノール A は、種々の pK_a を持つ塩基と塩を形成する。得られた塩の ^1H HS-MAS NMR スペクトルの一部を図 4 に示す。10 ppm よりも低磁場側に表れているピークが水素結合を形成している水素である。ビスフェノール A の pK_a 値 (9.73) よりも小さい pK_a 値を持つ塩基と塩形成した場合、ケミカルシフト値は pK_a 値が増すに伴い低磁場側にシフトした。また、 pK_a が 9.93 のトリブチルアミンと塩を形成した場合、N-H と O-H の信号が観測された。これは O-H...N と O...H-N の状態が等しい確率で存在しているためと考えられる。

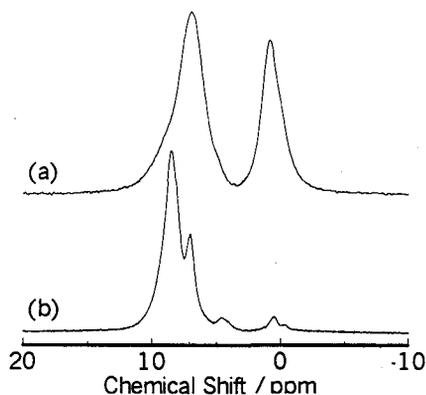


Fig. 1 ^1H HS-MAS NMR Spectra of (a) Bisphenol-A and (b) Bisphenol-A- d_{16}

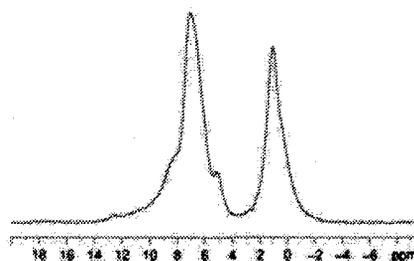


Fig. 2 ^1H CRAMPS (BR-24) Spectrum of Bisphenol-A. Observed frequency: 300.13 MHz, MAS frequency: 2.2 kHz.

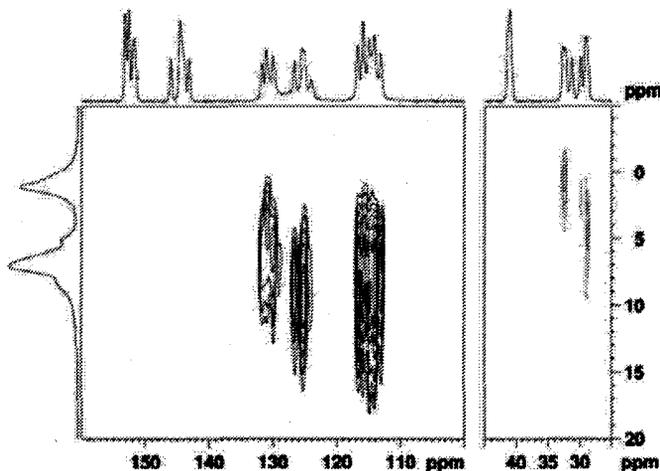


Fig. 3 ^{13}C - ^1H FLSG-HETCOR Spectrum of Bisphenol-A. MAS Rate: 12 kHz, Mixing Time: 10 μs

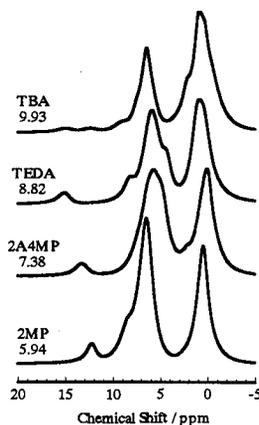


Fig. 4 ^1H HS-MAS NMR Spectra of Bisphenol-A Salts. The numerical values mean pK_a of base

High-Pressure ^{129}Xe NMR Study of Cation Effect in X-Zeolites○Bunsow Nagasaka¹, Jun Isemoto¹, Hironori Omi², Taro Eguchi^{2,3}¹Material Analysis Research Laboratories, Teijin Ltd., Hino, Tokyo 191-8512²Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043³The Museum of Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043

Several types of X-zeolites have been investigated by the high-pressure ^{129}Xe NMR. In the low-pressure region, two ^{129}Xe NMR signals were observed for the Xe adsorbed in each molecular sieve, which are assigned to the adsorbed Xe in the zeolite and in the binder, respectively. According to the analysis of the Langmuir model for the pressure dependence of the ^{129}Xe NMR chemical shift of the adsorbed Xe in each zeolite, it was found that the low-silica Li-X zeolite has the stronger adsorption affinity and the more amount of adsorption among the samples used in this study. The 2D-exchange NMR experiment suggested the slow dynamics of Xe between the zeolite and the binder and/or the free in the low-pressure region.

Si/Al 比およびカチオン種の異なる数種の X 型ゼオライトからなるモレキュラーシーブについて、高圧 ^{129}Xe NMR で調べた。その結果、高磁場側にモレキュラーシーブに吸着されていない Free Xe ピークが観測され、Fig. 1 に示すようにこの ^{129}Xe NMR 化学シフトは、臨界点 ($P_c = 5.84$ MPa) 近傍で密度の急激な増大に伴って大きく低磁場シフトした。

一方、モレキュラーシーブに吸着した Xe は、低磁場側に 2 本の信号が観測され、より低圧の $P = 0 - 1$ MPa の範囲で大きく低磁場側にシフトし、 $P > 1$ MPa では 1 本のブロードピークとなった。この 2 本の吸着 Xe ピークは化学

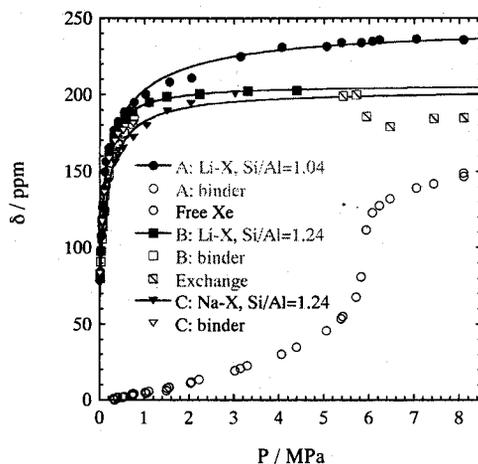


Fig. 1. Pressure dependence of the ^{129}Xe NMR chemical shift of Xe / X-zeolite at 293 K. The solid lines are calculated by the Langmuir model.

Key words: 高圧 NMR、 ^{129}Xe NMR、X 型ゼオライト、バインダー、Langmuir モデル

ながさかぶんそう、いせもとじゅん、おみひろのり、えぐちたろう

シフト値からそれぞれゼオライトとバインダーへの吸着であることが確認され、より高圧領域ではこれらの中で化学交換が速くなるため1本のピークとして観測されたと解釈できる。

ゼオライトに吸着したXeの ^{129}Xe NMR 化学シフト圧力依存性についてLangmuirモデルで解析した結果、バインダーやFree Xeとの化学交換が速くなる高圧領域では単一の成分として表せないが、 $P < 1$ MPaの圧力範囲ではTable 1に示すように各パラメータを見積もることができ、今回測定を行った試料の中ではSi/Al比が1.04で Li^+ に置換したゼオライトが吸着力(K)、吸着量(δ_{Xe})ともに大きいことがわかった。

Table 1 Adsorption parameters in Langmuir model for high-pressure ^{129}Xe NMR of Xe / zeolites.

Sample	zeolite type	Si / Al	δ_{wall} / ppm	δ_{Xe} / ppm	K / MPa^{-1}
A	Li-X	1.04	65	142	12
B	Li-X	1.24	65	140	10
C	Na-X	1.24	65	121	9.3

また $P < 1$ MPaにおけるモレキュラシーブ内外におけるダイナミクスを調べるため、2次元交換NMRを適用したが、Fig. 2に示すようにmixing time = 0.1 sでも交換ピーク強度が小さく、比較的遅い運動であることが示唆された。

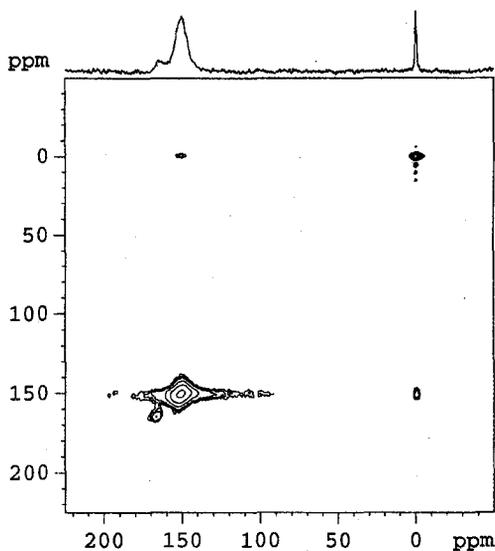


Fig. 2 Contour plot of ^{129}Xe 2D-exchange NMR of Xe / Na-X zeolite (sample C) at $P = 0.3$ MPa, $T = 295.3\text{K}$. Mixing time was 0.1 s.

(阪大院理¹、阪大博物館²)○加藤範子¹、尾身洋典¹、宮久保圭祐¹、上田貴洋^{1,2}、江口太郎^{1,2}**High pressure ^{129}Xe NMR study of adsorption characteristics and the chemical exchange of Xe in some zeolites***Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University¹,**The Museum of Osaka University²*○Noriko Kato¹, Hironori Omi¹, Keisuke Miyakubo¹, Takahiro Ueda^{1,2}, and Taro Eguchi^{1,2}

Molecular sieves and zeolite NaY are typical microporous materials. In order to investigate Xe adsorption characteristics in molecular sieve 5A, 13X and zeolite NaY, ^{129}Xe NMR spectra were measured at 0.02 – 10 MPa and $T=298\text{K}$ using a high pressure probe. In addition, we tried to simulate exchange signals with varying not only the ratio of free xenons to confined xenons in the pore but also the exchange rate. Our high pressure measurements are very useful to study the existence of metastable adsorption sites, the saturated amount of Xe adsorbed in the pore, and the exchange process of Xe.

【序】モレキュラーシーブ 5A、13X およびゼオライト NaY は、マイクロ細孔を持つ代表的なゼオライトであり、吸着特性もきわめて良好である。これらの試料について、高圧 ^{129}Xe NMR 測定を行い、吸着特性を定量的に調べ、ゼオライトの構造やカチオンによる影響を比較した。高圧下における研究は、細孔物質への吸着質の飽和吸着量や、エネルギー的に準安定な吸着サイトの存在、吸着質の交換プロセスについて知るために、有効であると考えている。シミュレーションなどを用いて細孔に吸着された Xe と free Xe gas 間の化学交換についても調べた。

【実験】モレキュラーシーブ 5A、13X、ゼオライト NaY の粉末試料(Aldrich)を使用した。400°Cで真空加熱脱水処理した試料について、自作高圧プローブを用いて、Bruker MSL-200 分光計により ^{129}Xe NMR スペクトル (共鳴周波数 55.6 MHz) を圧力範囲 0.02–10 MPa、温度 298 K で *in-situ* 測定した。

【結果と考察】Fig.1(a), (b)は、モレキュラーシーブ 5A および 13X に吸着された Xe の ^{129}Xe NMR 化学シフトの圧力依存性を示している。 ^{129}Xe NMR スペクトルには、free Xe gas 及び吸着された Xe に対応する共鳴線がそれぞれ高磁場側と低磁場側に観測された。free Xe gas のピークの化学シフトは、6MPa 付近で急激に低磁場シフトしているが、これは、Xe の超臨界流体への転移が起こっているためである(Xe の臨界圧 $P_c=5.8\text{MPa}$)。モレキュラーシーブ 5A および 13X に吸着された Xe の化学シフトの圧力依存性は、いずれも Langmuir タイプの吸着の式(1)でフィッティングすることができ、見かけ上 Langmuir タイプの吸着が起こっていると考えられる。

$$\delta(P) = \delta_{\text{Xe-Wall}} + \delta_{\text{Xe-Xe}^{\text{max}}} \frac{KP}{1+KP} \quad (1)$$

得られたパラメータをまとめて Table 1 に示す。ここで、 $\delta_{\text{Xe-Wall}}$ は Xe と細孔壁の衝突による寄与、 $\delta_{\text{Xe-Xe}^{\text{max}}}$ は Xe 同士の衝突による寄与、 K は [吸着速度] / [脱離速度] である。 $\delta_{\text{Xe-Wall}}$

キーワード：高圧 ^{129}Xe NMR、ゼオライト、吸着、交換

○かとうのりこ、おみひろのり、みやくぼけいすけ、うえだたかひろ、えぐちたろう

はゼオライトでは細孔径に反比例することが知られている。パラメータより、細孔径は 13Xの方が大きく、Xe の吸着量は 5A の方が多いことがわかる。また Fig.1(c)は、ゼオライト NaY に吸着された Xe の ^{129}Xe NMR 化学シフトの圧力依存性を示している。この場合は、明らかに Langmuir タイプの吸着とは異なる。ゼオライト NaY は、モレキュラーシーブ 13X と Si/Al 比のみが異なる Y 型ゼオライトである。ゼオライトの Si/Al 比を ^{29}Si MAS NMR のピーク強度比から求めたところ、モレキュラーシーブ 5A は 1、13X は 1.3、ゼオライト NaY では 2.7 であった。このことから、ゼオライト NaY は、モレキュラーシーブ 5A、13X に比べて Si/Al 比が大きく、つまり、骨格中に含まれるカチオンの数が少ないことがわかる。Fig.1(c)からわかるように、細孔に吸着された Xe のピークは、

低圧側では圧力とともに低磁場側にシフトするが、高圧側では圧力とともに、高磁場側にシフトしている。線幅は、はじめはシャープだが圧力が高くなるにつれてブロードになり、Xe の臨界点 ($P_c = 5.8 \text{ MPa}$) 付近からは再びシャープになる。したがって、このピークは Xe の細孔内と外との交換によると考えられる。この交換のダイナミクスについて調べるために、2 サイトモデルを用いてシミュレーションを行ったところ、交換速度の圧力依存性は、Fig.2 のようになった。交換速度は低圧側で、圧力とともに速くなり、臨界点よりも高圧側で、圧力とともに遅くなるという興味深い結果が得られた。

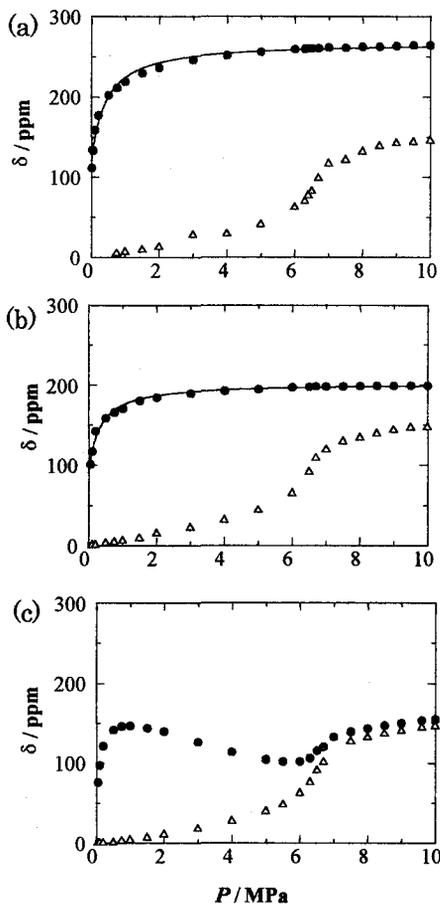


Fig.1 ^{129}Xe NMR chemical shift of Xe in (a) molecular sieve 5A, (b) molecular sieve 13X, and (c) zeolite NaY. (●: Confined Xe, Δ : Free Xe)

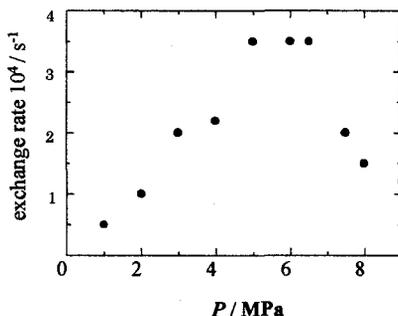


Fig.2 Exchange rate of Xe in zeolite NaY.

Table 1 The best-fit parameters for eq. (1).

Sample	$\delta_{\text{Xe-Wall}} / \text{ppm}$	$\delta_{\text{Xe-Xe}^{\text{max}}} / \text{ppm}$	K / MPa^{-1}
5A	120	148	2.4
13X	90	120	3.1

Solid-state ^{29}Si -NMR study of silica gel surface of packing material for Reversed-Phase HPLC

(Safety & Analytical research center, Shiseido co. Ltd.,) Tomoko Kimura, Kazuo Komatsu
Solid-State ^{29}Si -NMR was used as a tool to observe surface structure in designing chromatographic stationary phases. In this study, the change of patterns in NMR spectra was compared with chromatographic data between before and after acid- or alkaline-resistance test. The NMR was found useful in structural study of stationary phases, which used to rely on indirect methods based on observation of chromatographic retention behaviors of standard compounds.

【序】

HPLC用逆相系充填剤は分離特性や耐酸性・耐アルカリ性の向上を目的に、種々のタイプの充填剤開発が行われてきている。これらの性能評価やタイプ判別については、平面認識能や溶出時間の変化等、クロマト的分離挙動を指標としているが、充填剤の表面構造から評価した報告例は少ない。結晶構造を持たない非結晶部位についても高分解能スペクトルが得られる固体高分解能NMR法は、表面状態や物性の有力な研究手段となっており、我々も、化粧品に用いられる無機粉末原料の改質技術を応用して開発したポリマー被覆型逆相系オクタデシル化シリカゲル(ODS)充填剤の表面構造解析について、 ^{13}C 及び ^{29}Si -固体高分解能NMR法を応用してきた^{*1)}。今回、我々は岡ら^{*2)}の報告にある ^{29}Si -固体高分解能NMR法による充填剤のタイプ別分類を上市されている種々の充填剤について適用するとともに、耐酸性及び耐アルカリ性試験による充填剤表面のスペクトルパターン変化とクロマトでの分離挙動の変化との関係を検討したので報告する。

【実験】

測定は、JNM ECP-400(日本電子)に固体高分解能専用プローブ(6mmφ)を接続し、共鳴周波数(^{29}Si ; 78. 00MHz)、MAS 回転数; 6kHz、CP/MAS法(接触時間 5ms、繰り返し時間 5s)で行った。

充填剤の耐酸性試験には、1%トリフルオロ酢酸(TFA)・水/メタノール系及び2% TFA・水/アセトニトリル系溶離液を用い、耐アルカリ性試験には、ホウ酸バッファーを用いた水/メタノール系溶離液を用いて実施して得られた充填剤について解析した。

【結果と考察】

1. ODS充填剤のタイプ別分類

キーワード : ^{29}Si -固体高分解能NMR法、HPLC用逆相系充填剤、シリカゲル表面

きむらともこ、こまつかずお

充填剤のタイプは、シリカゲルにODS基結合する試薬の官能基数によって分別され、モノ(一官能性試薬)、ジ(二官能性試薬)及びトリ(三官能性試薬)ファンクショナルタイプと、それとは別にポリマーコートタイプの4種のタイプが知られている。これまで、充填剤のタイプの分類はクロマト的評価パラメータの1つである平面認識能(α)

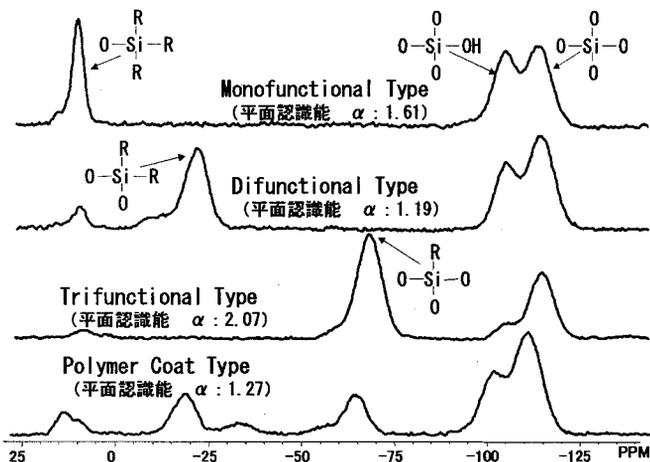


Fig.1 ^{29}Si CP/MAS NMR spectra of difference Type of Silica gel packing materials

の数値の大ききで類推してきた。しかし、この評価方法では、必ずしも明確な

分類ができないこともあった。上市されている種々の充填剤について、 ^{29}Si -固体高分解能NMRスペクトルを測定した結果、ポリマーコート型を含めたこれまで分類が困難であった充填剤についても、明確な判別が可能であることがわかった(Fig.1)。

2. 酸性及び耐アルカリ性試験における充填剤表面の状態分析

耐酸性及び耐アルカリ性試験前後での ^{29}Si -NMRスペクトルを測定し、分離挙動の変化に大きく寄与していると考えられるシラノール基に着目し、スペクトルを波形分離したときのシラノール量(Q3)をQ4に対する比として比較した。耐酸性試験前後では、ODS基やエンドキャッピング剤が切断されることによって生じたシラノール基の増加がすべての充填剤のタイプで確認され(Fig.2)、その変化の大きさは、モノ>ジ>トリの順となっており、クロマトグラム上での分離挙動の変化の大きさと対応していることがわかった。

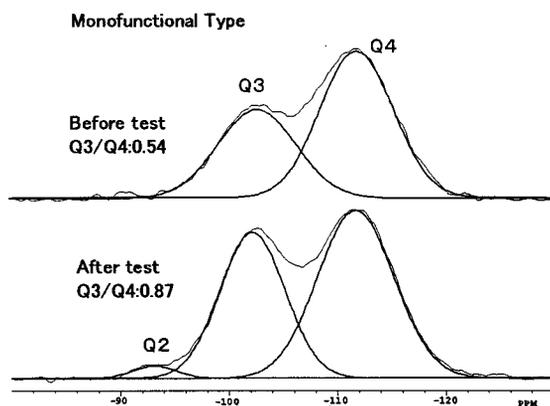


Fig.2 The relative amount of silanol between before acid-resistance test and after test determined by ^{29}Si -NMR spectra

耐アルカリ性試験前後では、クロマトグラム上での変化は認められているものの、 ^{29}Si -NMRスペクトルパターンに現れるほどの大きな変化は見られなかった。

これらの結果から、固体高分解能NMR測定により、充填剤の特徴をよく評価できることがわかった。

【文献】

- *1) 小松ら、J.Soc.Cosmet.Chem.Japan, Vol.22, No.4, 1989
- *2) 岡ら、東ソー研究報告, Vol.41, p57~63, 1997

多孔性金属錯体の固体高分解能NMR—ゲスト分子の吸着挙動
(京大院工) ○堀毛悟史、中西康哲、北浦良、北川進

Solid-State NMR for porous coordination polymers - Dynamics of guest molecules
Satoshi HORIKE, Yasunori NAKANISHI, Ryo KITaura, and Susumu KITAGAWA
Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto 606-8501

[Abstract]

High resolution solid-state NMR spectra were measured for guest molecules adsorbed in porous coordination polymers, whose size and/or shape of channels are rationally constructed from modification of the organic ligands and transition metals. The adsorption guest behavior and host dynamics were studied by estimating the activation energy from temperature dependence of ^1H NMR spectra. The mobility of the guests well correlate to the channel size, similar to that of several zeolites.

[緒言]

金属錯体は、配位子の持つ高い設計性と金属イオンの持つ多様な立体構造を組み合わせることにより、様々なサイズおよび形状のチャンネルを有する多孔性配位高分子を合理的に構築することが可能である。我々はそのチャンネル空間が、ゼオライトを凌ぐ量のメタンを始めとする気体吸着能を見出してきた¹⁾。また最近では既存の吸着剤には見られない、高い柔軟性を有するものやゲスト選択性を持つ多孔性錯体も報告されており^{2,3)}、全く新しい機能をもつ多孔性物質群として期待される。

本研究では常磁性および反磁性金属を含めた異なる四種類の多孔性錯体を用い、それらの中に取り込まれているゲストの挙動、およびホストの運動性評価を目的とした。

[実験]

多孔性錯体およびサンプルの合成

二次元シートがピラー配位子によって連結される三次元錯体 $\{[\text{Cu}_2(\text{pzdc})_2(\text{L})] \cdot x\text{H}_2\text{O}\}_n$ (pzdc=pyrazine-2,3-dicarboxylate) (L=pyrazine(1); L=4,4'-bipyridyl(2))の合成は、 Na_2pzdc (20mM, 50mL) と各配位子 (10mM, 50mL) の水/エタノール1:1溶液に CuBF_4 (20mM, 50mL) の水/エタノール1:1溶液をゆっくりと滴下させることにより得た。また反磁性二次元錯体 $[\text{Cd}_2(\text{azpy})_2(\text{NO}_3)_2]$ (3) は、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (1.5mM, 15mL) アセトン溶液に azopyridine (3mM, 15mL) エタノール溶液を滴下することにより得た。また銅ダイマーユニットを用いた三次元錯体4の合成は文献の通りに行った⁴⁾。またゲストを吸着させた各サンプルは、得られた粉末固体を室温で1日間真空乾燥させた後、室温飽和蒸気圧下でゲスト溶媒と共存させることにより調製した。これらの同定は単結晶および粉末X線構造解析、そして元素分析によって行った。

固体NMR測定

測定は日本電子社製 JNM-LA300 FT-NMR (^{13}C 観測周波数75.4626MHz) および Chemagnetics社製 CMX-300 (^1H 観測周波数45.8250MHz) を用いて行った。 ^{13}C NMR測定はシングルパルス+ ^1H デカップリング法を、また ^1H NMR測定は四極子エコー法とその改良法を用いて行った。それぞれのスピン-格子緩和時間(T_1)測定は反転回復(inversion recovery)法を用いた。

[参考文献]

- 1) S. Kitagawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 140-143.
- 2) S. Kitagawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 134-135.
- 3) Kepert *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9574-9581.
- 4) Seki, *Chem. Commun.* **2001**, 1496-1497.

キーワード：固体高分解能NMR、多孔性錯体、ゲスト

ほりけさとし、なかにしやすのり、きたうらりょう、きたがわすすむ

[結果および考察]

Fig.1(a)に示すようなPillared-layer型三次元多孔性錯体1(チャンネルサイズ: 5.0×5.0 Å)および2(8.0×5.0 Å)に対し、ゲストとしてメタノール d を吸着させ、その ^2H NMRを測定した結果をFig.1(b)(c)に示す。それぞれのスペクトルの形から、観測した温度領域全てにおいて錯体1中のメタノールは異方的な運動を取っているのに対し、錯体2では室温から130K付近までほぼ等方的な運動を取っていることが明らかとなった。また得られた T_1 の温度依存プロットから、BPP理論を用いたフィッティングにより運動の活性化エネルギー E_a は錯体1が16.0kJ/mol、2が12.2kJ/molであることが分かった。この結果はチャンネルの大きさとよく対応しており、特に錯体1の E_a はH-ZSMやHYゼオライト中のメタノールの E_a と比較しても高い値である。また錯体2においては143Kにおいてスペクトルの形および T_1 の値が不連続に変化しており、何らかの状態変化が起こっているものと思われる。

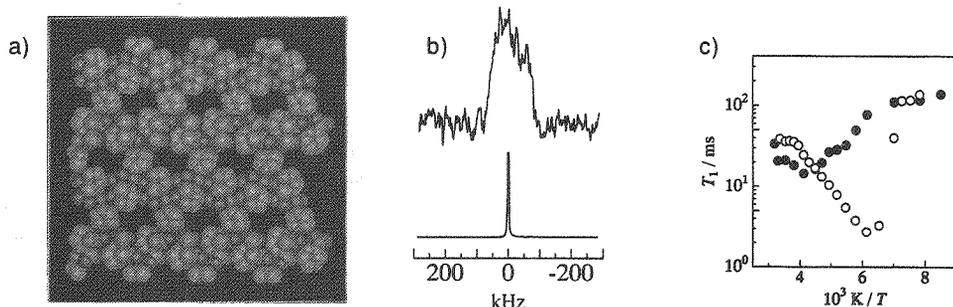


Fig.1 (a) Structure of 3D pillared-layer complex1. (b) ^2H NMR spectra of 1 (upper), 2 (bottom) at 283K. (c) ^2H NMR spin-lattice relaxation data as a function of temperature for methanol- d , adsorbed in complex1 (●) and 2 (○).

次に錯体1とほぼ同じチャンネルサイズを有している二次元錯体3を用い、同様にメタノール d を吸着させてその挙動を調べた。その結果、スペクトルは測定した温度領域ではあまり変化はなく、また T_1 の温度依存プロットから E_a は12.6kJ/molと見積もられた。この結果から、吸着されたメタノールは錯体の次元性よりもむしろチャンネルサイズに依存した E_a を取ることが分かる。

最後にホストである多孔性錯体の運動性を評価するため、ポリマー骨格中にあるベンゼン環部位に ^2H を導入した三次元錯体4を用い(Fig.2(a))、ゲストを吸着させていない状態で ^2H NMRを測定した。そのスペクトルをFig.2(b)に示す。骨格を構成している銅ダイマーユニットは温度依存性を持つ常磁性であるため、スペクトルの形にその影響を及ぼすが、173K~223Kの温度領域において明確なPake doubletパターンを示しており、温度が上昇するに従いFig.2(b)のように変化している。この三次元錯体は513Kまで骨格が安定に保たれることが分かっているため、本実験の結果から、測定温度領域で三次元骨格が保たれながら、温度によって部分的に運動性が異なる部位を有していることが分かった。現在この変化を支配する運動モードとしてベンゼン環の180度フリップを検討しており、その運動の活性化エネルギーと含めて当日報告する。

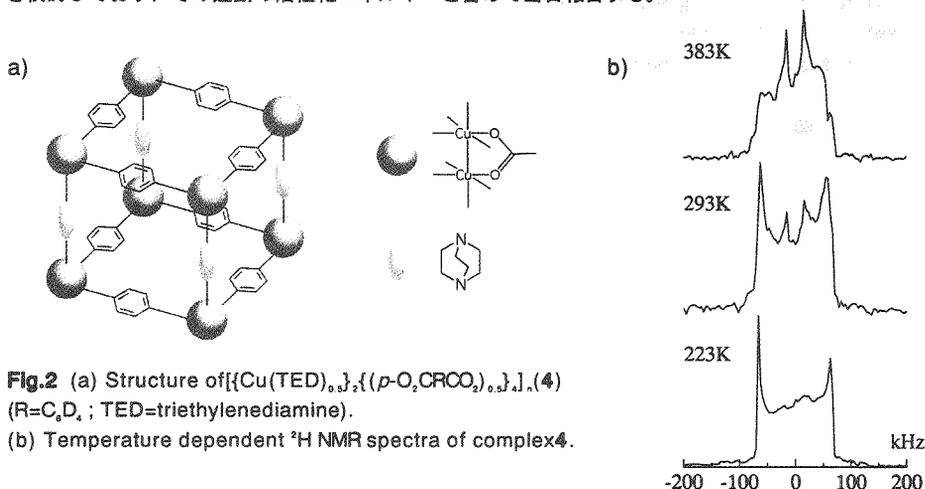


Fig.2 (a) Structure of $[\text{Cu}(\text{TED})_{0.5}]_2\{(\text{p-O}_2\text{CRCO}_2)_{0.5}\}_2$ (4) ($\text{R}=\text{C}_6\text{D}_4$; TED=triethylenediamine). (b) Temperature dependent ^2H NMR spectra of complex4.

静的磁場勾配を用いた高分子の拡散と 局所磁場勾配の測定

(東工大院生命理工)○佐藤耕平, 浅川直紀, 井上義夫

Measurement of diffusion and local magnetic field gradient of polymers by solid state NMR

Kohei Sato, Naoki Asakawa and 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: kosato@bio.titech.ac.jp

We have been trying to detect local magnetic field gradients (LMFG) in solid polymers and organic solids by nuclear magnetic resonance (NMR) transverse relaxation time measurements. We observed the anisotropic proton transverse relaxation for a C-form single crystal of stearic acid (SA). We also found that by variable temperature T_2 measurements of SA there exist the transition point between the diffusion dominant regime and the localization regime. The local magnetic field gradient at 293K was $4 \times 10^{-2} \text{T} \cdot \text{cm}^{-1}$. The T_2 measurements with a function of CPMG echo time show that the transition point between the localization regime and the motional averaging regime for a polycrystalline sample of hexamethylethane (HME). Numerical simulation for transverse relaxation rate was carried out to extract diffusion parameters such as diffusion coefficient, restriction length, local magnetic field gradient.

1. 目的

我々はこれまで長鎖脂肪酸単結晶(ステアリン酸単結晶)および柔粘性結晶(ヘキサメチルエタン)の横緩和時間 T_2 測定を行い、分子の運動性、また結晶構造を反映すると予想される内部の磁気的環境を明らかにすることを目的に研究を進めてきた。ステアリン酸単結晶は分子が等方的、規則的に配列しているため考えられる分子運動は空間的にかなり制限されていると考えられる。ステアリン酸単結晶の場合の分子運動としては分子長軸周りの回転拡散および、結晶格子内での振動拡散がある。一方ヘキサメチルエタン結晶内での運動はステアリン酸と大きく異なりっている。柔粘性結晶相をもつヘキサメチルエタン結晶は結晶重心位置での回転の他に、空孔メカニ

ズムに基づいた並進拡散を行うという特徴を持っている。これまでステアリン酸単結晶の T_2 測定を行い放物線磁場勾配モデルに基づく Bloch-Torrey 方程式の Green 関数解によるフィッティングを行い内部に存在する局所磁場勾配の決定を行った。さらにこの局所的に存在する磁場勾配が非常に大きな値であると予想される結果を得ている。しかし T_2 測定の結果、ある時間以降において予想される T_2 値から外れる振舞をする時間領域が見られた。この特異点を説明するための理論として、Sen らの三つの無次元の距離スケール (Diffusion length, Dephasing length, Sample size) を導入しシミュレーションを作成した。このシミュレーションから実験結果において見られた特異点を説明することができるのではないかと考えられる。

¹ π 局所磁場勾配・横緩和時間・CPMG-Hahn エコー

さとうこうへい, あさかわなおき, いのうえよしお

**距離スケールを導入した
シュミレーション作成:**

我々はスピンのパルス間隔 τ (測定磁間) の間に拡散する平均距離を L_D 、スピンの運動を制限する間隔の大きさを L_S 、そしてスピンの拡散する間に磁化が $1/e$ になるまでの距離を L_G とし CPMG 磁化減衰のシュミレーションを作成した。NMR で拡散を測定するときには、始めにパルスを当てることによって分散していったスピンの位相をそろえ、測定時間中にその位相が様々な要因によってデフェーズしてゆく割合を位相分布の強度として観測している。よってスピンの観測時間中に素早くデフェーズしてしまうと、ある制限距離に到達する前に観測されなくなる。このような場合デフェーズ距離 L_D がスピンエコーの強度の振舞を支配する。三つの距離スケールを定義しどの距離スケールが支配的であるかを考えることでスピンエコー減衰には次の三つの異なる領域が存在すると考えられる。

- 拡散支配領域
- 運動平均化支配領域
- 局所化支配領域

CPMG 磁化は連続する π パルスによって磁化を反転させる。この π パルスの印加前の距離スケールを考慮にいたした時間展開行列を U_+ とすると π パルス後の時間展開行列は U_+ の複素共役である $U_- = U_+^*$ で表すことが可能である。また二度目の π パルス後のエコーは $U = U_+ U_- U_+$ で表すことが可能であることが理解できる。よって以上より CPMG の磁化の減衰は U^N で表現することが可能となる。そこで様々なパラメーターにおいてシュミレーションを行い実験結果との相関関係を見出した。これまでのところ転移が現れる条件は三つの距離スケールの実際の大きさではなく、距離スケールの比が支配的であると考えている。

T_2 測定実験:

二つのサンプル (ステアリン酸単結晶、ヘキサメチルエタン結晶) に関して TPHE と CPMG 法を用いて T_2 測定を行った。また実験には非常に広帯域 (200MHz~1000MHz) に渡って測定が可能な自作のリエントラントキャビティープローブ、および Doty 社製の NMR プローブを用いて測定を行った。自作のプローブの仕様に関してはポスターにて紹介する。

2. 実験結果

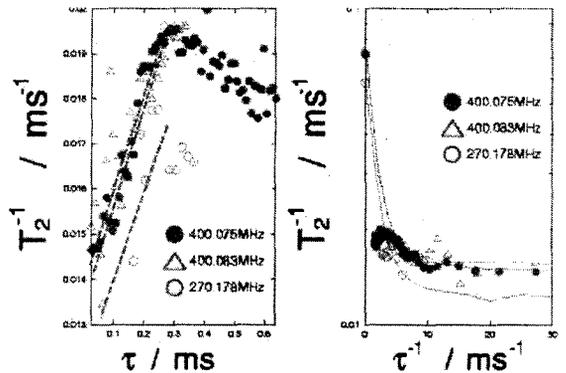


Figure 1. Results of T_2 measurement and fitting

上の図左のように T_2 測定を行い理論式にフィッティングし拡散係数および内部に存在する磁場勾配の大きさを求めた。これらの結果からステアリン酸内部に非常に大きな局所的磁場勾配が存在することが予想された。またある時間 τ において τ の増加とともに増加が予想される T_2 値が予想から外れる値を示す時間領域が存在することも観察された (上図左)。他のサンプル (ヘキサメチルエタン) に関する結果およびシュミレーション結果はポスターにて紹介する。

臭素化されたカルド型ポリイミドの

 ^{13}C 及び ^{15}N -CP/MAS による構造解析

(日鐵テクノリサーチ) ○畠山盛明

(新日鐵 先端研) 齋藤公児、金橋康二

Structural Analysis of Br-substituted Cardo type Polyimides using ^{13}C and ^{15}N -CP/MAS

(Nippon Steel Techno Research) Moriaki Hatakeyama

(Nippon Steel Corporation Advanced Research Lab.) Koji Saito, Koji Kanehashi

The structural analysis of Br substituted cardo type polyimides which have high gas separation properties are carried out using ^{13}C and ^{15}N -CP/MAS. As Br substituted rate is higher, $T_{1\rho}$ of ^{13}C become shorter and ^{15}N chemical shift is going downfield. Since this behavior of NMR parameters is consistent with the results of gas separation properties, we can estimate gas separation properties according to NMR parameters.

1. はじめに

カルド型ポリイミドは嵩高い環状構造を有する剛直性の高いポリイミドで、様々な用途開発を行ってきている。その中のひとつの応用としてガス分離膜があり、 CO_2/N_2 分離膜素材としての応用展開を実施している。しかし、実用化には更なるガス分離性能の向上が求められていた。そこで、臭素原子の立体効果によりガス透過性能を向上させる可能性

があることに着目し、「臭素化カルド型ポリイミド」の合成開発(Fig.1)に成功したり。開発した膜の CO_2 ガス透過性能は、臭素化置換率約 80% の場合、ガス透過性 $P(\text{CO}_2)$ は 10^{-8} を保持しつつ、ガス分離性能 $P(\text{CO}_2)/P(\text{N}_2)$ は 3.5 を達成

し(35°C、1atm、混合ガス $\text{CO}_2/\text{N}_2=10/90$)、世界トップクラスの非常に優れた透過性と分離性を示した。しかし、この臭素化カルド型ポリイミドのガス分離機能と化学構造の関係は明らかとなっていない。そこで今回、 ^{13}C 及び ^{15}N -CP/MAS 法で構造解析と緩和時間解析 (^{13}C - T_1 及び ^{13}C - $T_{1\rho}$) を行い、本材料の臭素化置換率とガス分離能及び化学構造との関係を検討した。また本材料の劣化前後による構造の変化についても併せて検討を行った。

2. 実験

本材料の臭素化の方法は、臭素化試薬として *N*-プロモスクシンイミドを利用し、カルド型ポリイミドの芳香環側鎖メチル基に臭素を直接化学修飾法で導入した合成法で行なった。測定した試料は、臭素化置換率が 0, 22, 65, 83% の試料である。一連の NMR 測定には、日本電子製 EX-400 (^{13}C : 100.4 MHz, ^{15}N : 40.4 MHz) を使用し、回転数は 6 kHz とした。化学シフトの基準は外部基準として ^{13}C : ヘキサメチルベンゼンを 17.3 ppm, ^{15}N : NH_4Cl を 18.0 ppm とした。 ^{13}C -CP/MAS 測定時のコンタクトタイム(ct) は 5 ms に設定した。また ^{15}N -CP/MAS では、ラベル化した ^{15}N フタルイミドを用いて①交差分極時間、②パルスの繰り

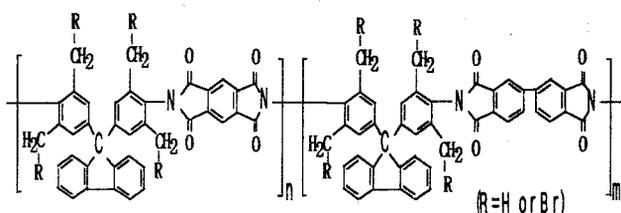


Fig.1 Chemical structure of cardo type polyimides

固体NMR、高分子、 ^{13}C -CP/MAS、 ^{15}N -CP/MAS

はたけやまもりあき、さいとうこうじ、かねはしこうじ

返し時間、③交差分極時の水素核照射周波数の最適化を行った²⁾。¹H 照射周波数をベンゼン環の¹H の共鳴周波数に合わせ、 $ct=25ms$ 、パルス繰り返し返し時間=25 s のときに積算効率が最大となった(Fig2)。この最適化した条件で感度が低く実用材料には不適であった¹⁵N-CP/MAS 法でも、一週間程度で解析可能なスペクトルを得ることが出来た。

3. 結果・考察

臭素化置換率の増加に伴う¹³C-CP/MAS スペクトルの変化について検討したところ、臭素化したメチル基由来のピーク以外には大きな変化は見られなかった(Fig.3)。対して、¹⁵N-CP/MAS スペクトルでは、すべての臭素化置換率でイミド窒素由来のほぼ 1 本のピークが観測された。Fig4 に示すように、臭素化置換率が増加するにつれて、吸収位置が高磁場シフトする傾向が見られた。これは臭素化導入に伴う分子の局所電子状態が変化したためと考えられる。次に、緩和時間測定を行った。主鎖の運動性を示す炭素緩和時間 (¹³C-T_{1ρ}) ではイミド基で少し長くなる変化が見られるが、他の官能基にほとんど変化が見られなかった。対して、局所的な運動を反映している回転座標系での炭素緩和時間 (¹³C-T_{1ρ}) に顕著な変化が見られた。Fig4 に示すように、イミドカルボニル基の吸収である 165 ppm で、臭素化置換率が増加するに従い、¹³C-T_{1ρ} の緩和時間が短くなっていることがわかった。つまり本臭素化カルド型ポリイミドでは、臭素化置換率が増加すると、CO₂/N₂ の選択的な分離能が向上しているの、局所的な分子運動とガス分離能に相関関係があり、イミド近傍がガス分離に深く関与していることが示唆された。劣化前後の¹³C-CP/MAS 炭素緩和時間 (¹³C-T_{1ρ})、¹⁵N-CP/MAS 等の結果については当日報告する。

4. まとめ

¹³C 及び¹⁵N-CP/MAS 及び緩和時間等の多くのパラメータを持つ固体NMR 法は高分子の機能と化学構造の関係を解析する上で、貴重な情報を与えることがわかった。

参考文献

- (1) A.Tachiki, K. Saito, Y.Fujioka, H.Mano, K.Haraya, 日本化学会第 80 秋季年会講演予稿集(2001)41.
- (2) M. Shinohara, K. Saito, M. Hatakeyama, M. Yuasa and N. Furukawa, *J. Mole. Struct.*, 441 (1998) 189.

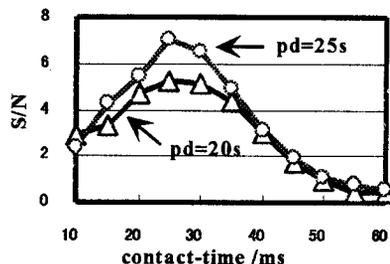


Fig2 ¹⁵N-CP/MAS of potassium-¹⁵N

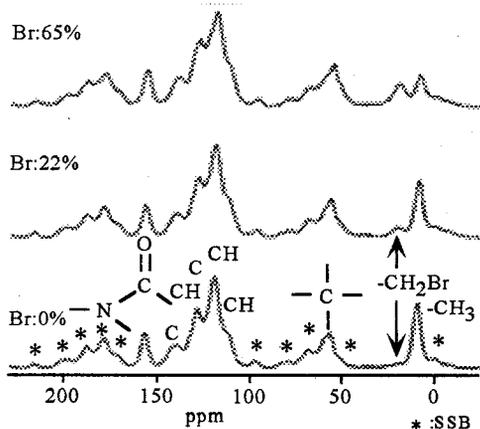


Fig3 ¹³C-CP/MAS spectra of cardo type polyimides

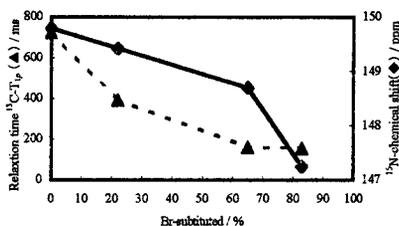


Fig4 The result of relaxation time and ¹⁵N chemical shift for Br-substituted cardo type polyimides

Synthesis and structural analysis of the model peptides of silk to determine the intra- and inter-molecular structures by ¹³C solid state NMR

Kazuto Yabuki¹, Yasumoto Nakazawa¹, Tsunenori Kameda¹, Jun Ashida^{1,2}, and Tetsuo Asakura¹

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, ²Varian Technologies Japan

Rotational Echo Double Resonance (REDOR) NMR technique was used to determine the inter-nuclear distances between ¹³C and ¹⁵N labeled nuclei in the model peptide of silk, (Ala-Gly)₁₅. We applied this REDOR technique to determine the intra- and inter-molecular structures of (Ala-Gly)₁₅ with silk I and silk II forms. The repeated β-turn structure for the silk I model proposed previously by us could be reproduced with only REDOR data. The head to tail inter-molecular arrangement was proposed with REDOR data of (Ala-Gly)₁₅ with ¹⁵N labeling of N-terminal Ala and ¹³C labeling of C-terminal Gly residues for both silk I and silk II forms.

【緒言】 2D スピン拡散 NMR と異種核 ¹³C 及び ¹⁵N 核の原子間距離を精密に決定するための REDOR 法の組み合わせは、単結晶にならないために X 線回折による精密構造解析を十分に行うことのできない絹の繊維化前の構造(Silk I 型)決定に極めて有力であることを報告してきた^{1)~5)}。そこで、REDOR 法のみでどこまで絹モデル化合物のコンフォメーションの決定が可能であるかを検討するために、絹の繊維化前の構造を有するモデル化合物(AG)₁₅について、¹³C 及び ¹⁵N ラベル部位を変えた 7 種類の(AG)₁₅ 試料を調整し、REDOR 法のみによる構造決定を行った。また、蟻酸処理により繊維化後(Silk II 型)の構造へと構造転移を起こさせた(AG)₁₅ について、主鎖構造のコンフォメーションを決定した^{6),7)}。さらに、分子間構造の決定を行うために、分子内の ¹³C と ¹⁵N 核のラベルサイト間の距離が十分に離れた部位に ¹³C と ¹⁵N ラベルを施した。その REDOR 測定から、分子間構造の情報を得ることを試みた。

【実験】 (AG)₁₅ を Fmoc 固相合成法により作成した。中央の Ala 及び Gly 残基の構造情報を得るため、¹³C,¹⁵N のラベル部位の異なる 7 種類の試料(R1~R7)を合成した(Fig.1 及び Tabel 1 にまとめた)。特に、R5 は β-turn 構造において、分子内水素結合に関わる ¹³C=O と ¹⁵NH にラベルを施した。さらに、R5 をノンラベル(AG)₁₅ で 50%に希釈した R5(diluted)の構造解析も行った。一方、それらを蟻酸処理することによって、Silk II 型試料とした。

さらに、分子間構造の情報を得るために、¹³C ならびに ¹⁵N のラベル部位の異なる R11~R13 を合成した(Table2)。R11 は一本の分子鎖の N-端を ¹⁵N で、C-端を ¹³C で同位体ラベルした(AG)₁₅ であり、分子同士が head-to-tail か head-to-head であるかを REDOR 法によって判断するために合成した。さらに、R12 は(AG)₁₅ が parallel β-sheet 構造か anti-parallel β-sheet 構造を形成するかを判断するために合成した。すなわち、anti-parallel β-sheet 構造の場合にのみ、REDOR 効果が観測されるはずである。R13 も同様の考え方で合成を行った。

REDOR 測定は Chemanetics cmx infinity 400 を用い、プローブは 4mm-9turns coil HXY triple resonance T-3 probe を用いた。主な測定条件は spinning speed: 6666Hz, π pulses for ¹³C: 6 μ sec, π pulses for ¹⁵N: XY-8 pulse sequence, 8 μ sec, evolution time: up to 24m sec である。

キーワード (Ala-Gly)₁₅、REDOR、コンフォメーション、分子間構造、安定同位体ラベル

やぶきかずと、なかざわやすもと、かめだつねのり、あしだじゅん、あさくらてつお

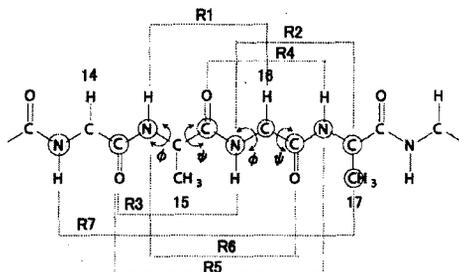


Fig.1 Labeling sites to determine the distances, R1 to R7.

Table 1 Observed and calculated inter-atomic distances, $^{13}\text{C}\cdots^{15}\text{N}$, of both ^{13}C and ^{15}N labeled (AG)₁₅ in the silk I and silk II structures.

Sample	Distance			
	Silk I		Silk II	
	Obsd.	Cald.	Obsd.	Cald.
R1	4.7±0.1 Å	4.7 Å	4.6±0.1 Å	4.8 Å
R2	4.3±0.1 Å	4.3 Å	4.7±0.1 Å	4.8 Å
R3	3.8±0.1 Å	3.8 Å	4.5±0.1 Å	4.5 Å
R4	3.2±0.1 Å	3.2 Å	4.5±0.1 Å	4.6 Å
R5	4.0±0.1 Å	4.0 Å	5.5±0.1 Å	7.0 Å
R5 (dilute)	4.0±0.1 Å		5.7±0.1 Å	
R6	5.0±0.1 Å	5.0 Å		
R7	5.8±0.3 Å	6.0 Å		

【結果ならびに考察】 (1)主鎖コンフォメーションの決定； R1~R7のREDOR測定を行うことによって、Silk I型及びSilk II型の主鎖コンフォメーションの決定に必要な多くの距離情報を得ることができた。R1とR3の原子間距離は、各々、Ala(ϕ)およびAla(ϕ, ϕ)に依存し、R2とR4の原子間距離はGly(ϕ)およびGly(ϕ, ϕ)に依存する。これまでに当研究室では、2Dスピン拡散NMR法を用いて、Silk I型の(AG)₁₅の内部回転角を決定してきた。その角度から得られたtype II repeated β -turn構造の原子座標に基づいて計算された7種類の各サイト間の原子間距離と、REDOR測定から得られた原子間距離は定量的に良く一致し、REDORのみからも、精密に構造が決定できることがわかる。一方、同一試料を蟻酸処理によって構造変化させたSilk II型の(AG)₁₅に関するREDOR測定の結果は、R5の試料の場合を除いて、Ala, Gly残基の ϕ, ϕ 値をanti-parallelの値とした場合の原子間距離の値と良く一致した^{9,10}。

(2)分子間構造の決定； R11のREDOR測定の結果、他の試料に比べて、より大きな双極子相互作用が検出された。ペプチドの末端がhead to tail構造を形成した場合、アミノ酸配列や立体構造に関わらず3~4Åであることから、Silk I型、Silk II型共に分子鎖は、主にhead to tail構造でつながっていることがわかる。

一方、R12, R13のラベリングサイト間距離はSilk I型、Silk II型共に5.7~6.0Åであった。このように、REDOR効果が観測されたので、Silk I型、Silk II型共に分子鎖間の配置は、anti-parallel構造をとることがわかる。

Table2 Observed inter-atomic distances, $^{13}\text{C}\cdots^{15}\text{N}$, of both ^{13}C and ^{15}N labeled (AG)₁₅ in the silk I and silk II structures. The distance between ^{13}C and ^{15}N nuclei was very long within one chain.

Sample	Obsd. Distance		Labeling site
	Silk I型	Silk II型	
R11	4.4(±0.2) Å	4.4(±0.1) Å	[^{15}N]A ₁ ...[1- ^{13}C]G ₃₀
R12	5.7(±0.3) Å	5.8(±0.3) Å	[^{15}N]G ₂ ...[1- ^{13}C]A ₂₃
R13	5.8(±0.3) Å	6.0(±0.3) Å	[^{15}N]A ₁ ...[1- ^{13}C]A ₂₃



【参考文献】

- Asakura, T., Ashida, J., Yamane, T., Kameda, T., Nakazawa, Y., Ohgo, K., and Komatsu, K., *J. Mol. Biol.*, **306**, 291-305 (2001).
- Kameda, T., Asakura, T., *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, **46**, 102-149 (2001).
- Kameda, T., Nakazawa, Y., Kazuhara, J., Yamane, T., and Asakura, T., *Biopolymers*, **64**, 80-85 (2002).
- Kameda, T., Zhao, C., Ashida, J., and Asakura, T., *J. Mag. Res.* 2002 submitted.
- Zhao, C., Asakura, T., *Progress in NMR Spectroscopy*, **39**, 301-352 (2001).
- Asakura, T., Yamane, T., Nakazawa, Y., Kameda, T. and Ando, T., *Biopolymers*, **58**, 521-525 (2001).
- Asakura, T., Sugino, R., Yao, J., Takashima, H., and Kishore, R., *Biochemistry*, **41**, 4415-4424 (2002).
- Ashida, J., Ohgo, K., and Asakura, T., *J. Phys. Chem.*, (2002) in press.
- Asakura, T., Yao, J., Yamane, T., Umemura, K., and Anne S. Ulrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8794-8795 (2002).
- Asakura, T., Yao, J., *Protein Sci.* (2002) in press.

固体 $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ CP/MAS NMRを用いたフッ化ビニリデン系高分子の 高次構造と分子運動性の解析

東工大院理工 ○相見敬太郎、小関佑、安藤慎治

Structural analysis and molecular mobility of vinylidene fluoride polymers
using solid state $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ CP/MAS NMR

Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology
Keitaro Aimi, Yu Koseki, Shinji Ando

The phase structures and molecular mobility of PVDF and P(VDF₇₅/TrFE₂₅) were analyzed using solid state $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ CP/MAS NMR. Only amorphous and β crystalline (all-*trans* sequences) peak were observed for electroplated film of PVDF in the ^{19}F MAS NMR spectrum, whereas α crystalline characteristic peak was observed for powder sample. The effective H-F distance was estimated from the fitting of dipolar oscillations in the CP curves for PVDF. Solid state ^{19}F NMR spectra of as-received film and single crystalline (SC) film of P(VDF₇₅/TrFE₂₅) have been recorded. No α crystalline peak was observed for VDF component. Moreover, the spectral shapes and the chemical shifts of the crystalline phase of as-received film and SC film are similar to each other. This indicates that the crystalline phase have all-*trans* conformation in both samples. The spin-lock decay of the signals from TrFE region in SC film almost consists of long components (for the crystalline phase). This indicates that most of the TrFE components in SC film exists in the crystalline phase.

[緒言] 固体 ^{19}F MAS 及び $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ CP/MAS NMR法を用いて、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)及びフッ化ビニリデン-三フッ化エチレン共重合体(75:25) (P(VDF₇₅/TrFE₂₅))のNMRスペクトル形状及び種々の緩和時間測定とCP曲線の解析を行い、構造及び分子運動性の解析を行った。

[実験] 試料には、PVDFの粉末試料(呉羽化学KF1100)とフィルム試料(呉羽化学KF-ピエゾフィルム)、P(VDF₇₅/TrFE₂₅)のフィルム試料(ダイキン工業VHP-61020)とその単結晶状フィルム(DMF溶液からのキャストフィルムを一軸延伸後 145°Cで熱処理¹⁾)を用いた。固体 ^{19}F MAS NMR及び $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ CP/MAS NMR測定は、室温で、Chemagnetics社製H-F二重共鳴CP/MASプローブを用いて、 ^1H 共鳴周波数 300.4 MHz (日本電子製EXデータシステム)、 ^1H 90°パルス幅 3.0 μs 、 ^{19}F 90°パルス幅 2.4 μs 、積算回数 32 回(delayed CP測定では 256 回)、MAS回転数 16 kHzの条件で行った。化学シフト基準はC₆F₆(-163.6 ppm)を外部基準に用いた。

[結果と考察] 図1はPVDF粉末試料(a)及びフィルム試料(b)の固体 ^{19}F MAS NMRスペクトルである。粉末試料には α 結晶部(TGTG連鎖)由来のピーク(▲●)²³⁾、 β 結晶部(all-*trans*連鎖)のみを含むピーク(●)、非晶部(○)と異常結合部(head-to-headやtail-to-tail(◇△))の5本のピークが観測されているが、フィルム試料では α 結晶部由来のピークは観測されず、非晶部と β 結晶部の存在が確認された。Delayed CP及びDIVAM²⁴⁾シーケンスにより非晶部を選択的に観測したスペクトル(図は示していない)には、○、◇、△の3本のピークのみが観測されることから、異常結合は主に非晶部に存在すると考えられる。スピニングサイドバンドを含めた各々のピーク強度比から、粉末試料の結晶化度は約 64%、フィルム試料は約 48%と見積もられ、粉末試料はかなり結晶性が高い。

図2(a)は、PVDF粉末試料の $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ CP/MAS測定におけるCP接触時間に対する磁化強度のプロットである。各々のピークについてCPの初期段階にオシレーションが観測された。このことは、非晶部においてもH-Fスピン対がカップリング

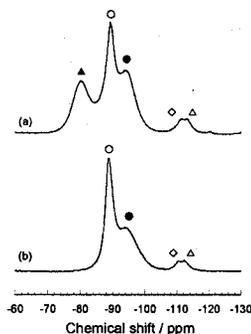


Fig.1 ^{19}F MAS NMR spectra of (a) PVDF powder and (b) electroplated film.

キーワード: PVDF、P(VDF/TrFE)、 ^{19}F NMR、CP/MAS、緩和時間

あいみ けいたろう、こせき ゆう、あんどう しんじ

していることを示している。観測されたCP曲線のフィッティング(図2(b))⁵⁾から、双極子カップリング定数は、結晶部(▲)で 15500 ± 1000 Hz、非晶部(O)で 8800 ± 500 Hzとなり、H-F有効核間距離はそれぞれ、 1.94 ± 0.04 Å、 2.33 ± 0.04 Åと見積もられた。前者の値は分子内のHF間最近接距離よりも短く、これはスピン対が完全に孤立していないことに起因している。

図3(a)は、P(VDF₇₅/TrFE₂₅)のフィルム試料の固体¹⁹F MAS NMRスペクトルである。-88 から-135 ppm付近のピーク(1~6)はCF₂、-195 から-210 ppm付近のピーク(7,8)は、CFHに帰属される。ピーク1から3はVDF部分に帰属され、ピーク5から8はTrFE部分に帰属される⁶⁾。ピーク1の化学シフトはPVDFの非晶部ピーク(図1のO)と一致しており、-79 ppm付近にピークが観測されていないことから、P(VDF₇₅/TrFE₂₅)中のVDFにはα結晶部に相当するTGTG連鎖が存在していないことがわかる。図3(b)と(c)はそれぞれ、非晶部を選択的に観測したスペクトル、及びCP/MASで接触時間を50 μsとして結晶部を強調して観測したスペクトルである。(b)からフィルム試料の非晶部にはVDF部分とTrFE部分が共に含まれていることがわかる。図3(d)は単結晶状フィルムの¹⁹F MAS NMRスペクトルである。PVDFのβ結晶部のピーク(図1の●)と同じ共鳴位置にピーク2が観測されている。また、ピーク8'の化学シフトは非晶部のピーク(図3(a)のピーク8)から2.6 ppm低磁場に観測されており、ピーク8に相当する化学シフトにはピークがみられない。(c)と(d)のスペクトル形状と化学シフトは類似しており、これはフィルム試料の結晶部と単結晶状試料が同じall-transのコンホメーションをとっていることと一致する¹⁾。(e)は単結晶状フィルムの非晶部を選択的に観測したスペクトルである。強度は弱いものの非晶部に由来する信号も観測された。

図4は、P(VDF₇₅/TrFE₂₅)のフィルム試料(a)と単結晶状フィルム試料(b)のスピロック時間に対する各々のピーク強度のプロットである。ピーク分離が困難であることからピークの高さをプロットしているため非晶部と結晶部の両方の成分が重なっている(図3(a)-(c))。2成分のフィッティングから得られたCF₂ピーク(ピーク1から6)の短い成分の割合は、フィルム試料では50~75%であるが、単結晶状フィルムでは10~30%程度、特にTrFE部分(ピーク4から6)は15%前後であり、単結晶状フィルムではTrFE部分は非晶部にはほとんど存在していないと考えられる。

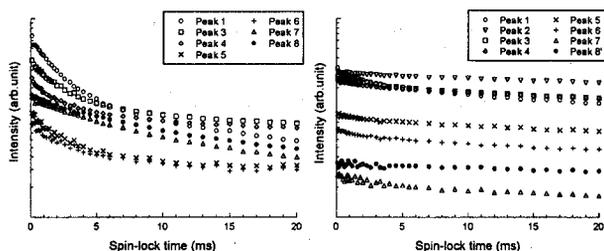


Fig.4 Spin-lock time dependence of the ¹⁹F signal intensity for (a) P(VDF₇₅/TrFE₂₅) film and (b) P(VDF₇₅/TrFE₂₅) single crystalline film.

- 1) H. Ohgashi *et al.*, *Appl. Phys. Lett.*, 66, 3281 (1995) 2) S. Ando *et al.*, *Magn. Reson. Chem.*, 49, 97(2002)
 3) P. Holstein *et al.*, *Polymer*, 39, 4937 (1998) 4) S. Ando *et al.*, *Polymer*, 42, 8137 (2001) 5) C.A. Fyfe *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 6882 (2002) 6) P.-Y. Mabboux and K. Gleason, *J. Fluorine Chem.*, 113, 27 (2002)

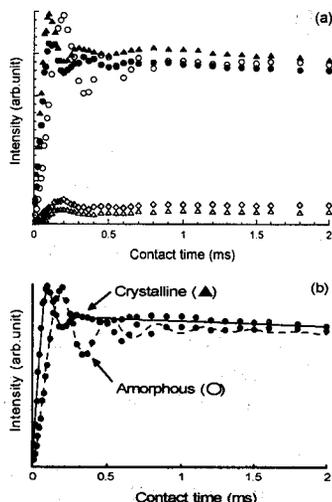


Fig.2 (a) Contact time dependence of the signal intensity for PVDF powder and (b) the results of fitting the oscillations of amorphous and crystalline peaks in (a).

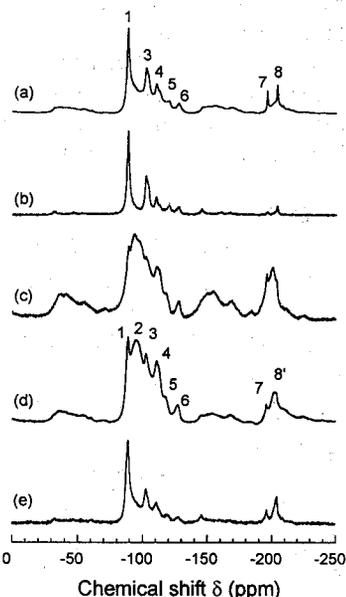


Fig.3 NMR spectra of P(VDF₇₅/TrFE₂₅) film (a-c) and single crystalline film (d,e). (a) single pulse (b) delayed CP (amorphous selective) (c) CP/MAS (contact time of 50 μs) (d) single pulse (e) delayed CP (1024 scans, recycle delay = 2 s).

(理研・高分子化学¹、東工大院・総合理工²、理研・物質基盤³)○桑原 和弘¹、Gan Zhihua²、仲村 高志³、阿部 英喜¹、土肥 義治^{1,2}

Crystalline/Amorphous Phase Structure and Molecular Mobility of Biodegradable Poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate)

(¹Polymer Chemistry Laboratory, RIKEN Institute, ²Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, ³Characterization Center, RIKEN Institute)
Kazuhiro Kuwabara¹, Zhihua Gan², Takashi Nakakura³, Hideki Abe¹, and Yoshiharu Doi^{1,2}

Differential scanning calorimetry (DSC), atomic force microscopy (AFM), wide-angle X-ray diffraction (WAXD), and solid-state ¹³C NMR have been used to investigate the crystalline/amorphous structure and molecular mobility of biodegradable poly(butylene adipate-co-44 mol % butylene terephthalate) [P(BA-co-44 mol % BT)] sample crystallized from the melt. The DSC endothermic peak and the WAXD pattern were broad relatively to those reported for conventional partially crystalline polyesters. These results have indicated that P(BA-co-44 mol % BT) sample contains small crystals with a wide distribution in size. Solid-state ¹³C NMR technique was also used to perform molecular-level and selective analyses for both butylene terephthalate and butylene adipate units. For the butylene terephthalate units, the existence of two components with different microstructure and molecular mobility was detected: one component was assigned to the α -form crystal of poly(butylene terephthalate) homopolymer (PBT) and the other was in amorphous regions. In contrast, all of butylene adipate units were located in amorphous regions. Solid-state NMR data have suggested that sizes of crystalline regions are less than 3 nm.

1. 緒言

脂肪族ポリエステルにテレフタレート基がランダムに導入された脂肪族-芳香族ポリエステルは、芳香族含量があまり多くなければ認証基準を満たす生分解性を有し、「グリーンプラ」として最近認められるようになった。芳香環の導入によりガスおよび水蒸気バリア性や耐熱性の改良が期待されているが、製品として市場に出た他の生分解性高分子と比べて、構造と物性に関する研究例はまだ少ない。本研究では脂肪族-芳香族ポリエステル共重合体の中で、材料として最も注目されているポリ(ブチレンアジペート-44 mol %ブチレンテレフタレート)ランダム共重合体 (P(BA-co-44 mol % BT)、図 1) に対して、固体構造と物性のキャラクターゼーションを行った¹⁾。

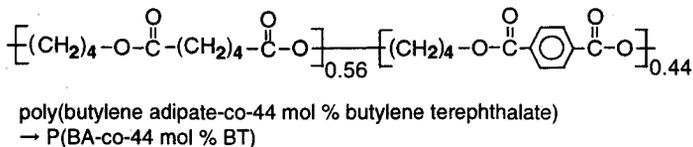


Fig. 1. Chemical structure of P(BA-co-44 mol %BT).

2. 実験

P(BA-co-44 mol %BT)試料として、BASF製のEcoflex[®]を用いた。各測定の前に、クロロホ

キーワード：固体NMR、分子運動、結晶構造、生分解、核磁気緩和時間

くわばら かずひろ、Gan Zhihua、なかむら たかし、あべ ひでき、どい よしはる

ルムで一旦溶解させ、エタノールで再沈殿させることにより試料を精製した。ブチレンテレフタレート分率の決定およびランダム共重合体であることの確認は、溶液 ^1H および ^{13}C NMR法により行った。

DSC、広角X線、AFM、および固体 ^{13}C NMRによる解析には、熔融状態から結晶化したP(BA-co-44 mol % BT)試料を用いた。昇温過程におけるDSC測定の結果、ガラス転移が -28°C に観測され、結晶の融解は、 110°C にピークトップをもつ幅広い吸熱ピークとして観測された。広角X線測定は、理学電機RINT-2500によりCu K_α 線を用いて行った。固体 ^{13}C NMR測定は、Chemagnetics Infinity-400分光計により9.4 Tの静磁場下で行った。

3. 結果

P(BA-co-44 mol % BT) に対して得られた広角X線の回折パターンを、ポリブチレンアジペート (PBA) ホモポリマーとポリブチレンテレフタレート (PBT) ホモポリマーの場合と比較した。その結果、非晶に帰属されるブロードなピークが大部分を占めて、PBT結晶に帰属され得る回折ピークもわずかながら認められた。この結果は、P(BA-co-44 mol % BT)の結晶化度はホモポリマーの場合と比べて非常に小さく、またホモポリマーに見られるような大きな結晶も成長していないことを示す。

P(BA-co-44 mol % BT)の芳香環領域における通常のCP/MAS ^{13}C NMR スペクトル (図2 (a)) には、PBTの非晶に相当する130 ppmの共鳴線以外に、PBTの α 型結晶に相当する131 ppmの共鳴線も認められた。CPT1法において ^{13}C スピン-格子緩和時間 (T_{1c}) の減衰時間を2 sおよび4 sにセットしたスペクトル (図2 (b)および(c)) では、131 ppmの共鳴線は130 ppmの共鳴線よりもさらに強調された。この結果は、 α 型結晶と考えられる成分は非晶成分よりも T_{1c} が長くて分子運動性が小さいことを示す。

一方、ブチレンアジペートユニットのみを反映した ^{13}C 化学シフト領域においては、分子運動性の小さい成分を強調したスペクトルにさへもPBAホモポリマーの非晶に相当する共鳴線しか認められなかった。以上の固体 ^{13}C NMRによる解析の結果、P(BA-co-44 mol % BT)の結晶領域は、芳香環を含むブチレンテレフタレートユニットから形成され、ブチレンアジペートユニットは結晶から排除されることが分かった。

メチレン鎖の分子運動性に関する情報を得るため、P(BA-co-44 mol % BT)の CH_2 炭素に対して T_{1c} 解析を行い、PBTおよびPBAホモポリマーの場合と比較した。P(BA-co-44 mol % BT)とPBTに対する結果は類似しており、すべての炭素の T_{1c} は、ガラス転移温度以上では1秒以下であり、結晶中に存在したとしても、その分子運動性はゴム状非晶中における場合とほとんど変わらず、分子運動性は極めて大きかった。この結果は、ブチレンテレフタレートユニットの結晶形成には、メチレン鎖でなく芳香環が重要な役割を果たすことを示す。一方PBAの場合は、メチレン鎖を有する一般的な結晶性高分子と同様、 T_{1c} が数十秒程度の結晶成分に帰属される成分も存在した。

参考文献

1) Kuwabara, K.; Gan, Z.; Nakamura, T.; Abe, H.; Doi, Y. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 390.

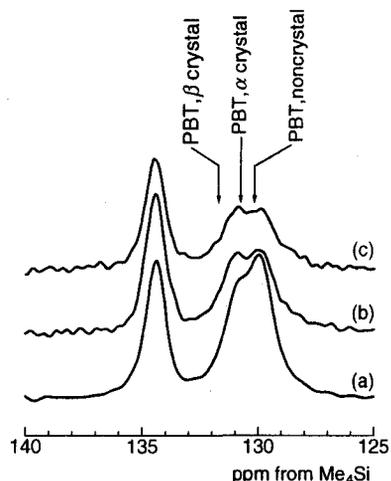


Fig. 2. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of the poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate) in the aromatic region. The spectrum (a) was obtained by the conventional CP pulse sequence. The spectra (b) and (c) were obtained by the CPT1 pulse sequence by setting the T_{1c} decay time to 2 and 4 s, respectively.

固体 ^{15}N 化学シフトテンソルを用いた ポリイミド及びイミドモデル化合物のコンホメーション解析

(東工大院理工¹、東工大院生命理工²)

○小宮山 孝¹・相見 敬太郎¹・浅川 直紀²・安藤 慎治¹

Conformational Analysis of Polyimides and Imide Model Compounds based on Solid State ^{15}N Chemical Shift Tensors

Takashi Komiya¹, Keitaro Aimi¹, Naoki Asakawa² and Shinji Ando¹

¹Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology

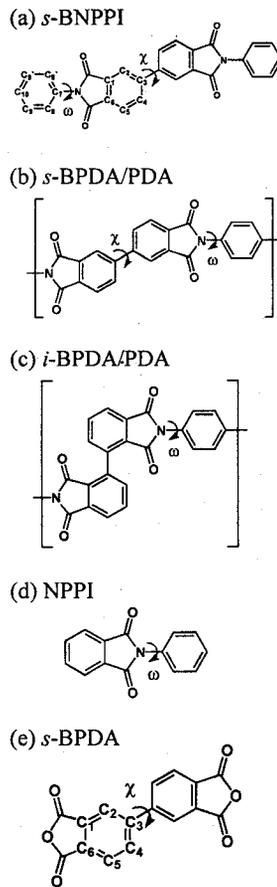
²Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

Solid state ^{15}N and ^{13}C NMR and *ab initio* shielding constants calculations have been used to estimate the dihedral angles of *N*-phenylphthalimide (NPPI) and aromatic polyimides (*s*-BPDA/PDA, *i*-BPDA/PDA). The chemical shift tensor of each nitrogen was determined from the analysis of spinning sidebands in ^{15}N CP/MAS NMR spectra. The shielding constants of model compounds were calculated by varying the dihedral angles from 0° to 90° at intervals of 10° using B3LYP/6-31G(d) and B3LYP/6-311+G(2d,p) levels of theory. By comparing the experimental chemical shift tensors with the calculated NMR shieldings, the dihedral angles of NPPI and polyimides were successfully estimated. Different isotropic chemical shifts were observed for the biphenyl carbons of highly crystalline particles and spin-coated film of *s*-BPDA/PDA polyimide. This can be attributed to the difference of their inter-ring dihedral angles between the two phenyl rings.

【緒言】 ポリイミド(PI)の二面角によって規定されるコンホメーションは物性の発現に重要な役割を果たしている。しかし、PIの単結晶作成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。本研究では、固体 ^{15}N , ^{13}C NMR スペクトルから得られた等方平均化学シフト、化学シフトテンソルの主値及び *ab initio* 量子化学計算を用いて、PI 及びイミドモデル化合物の二面角の推定を行った。

【実験】 イミド窒素を ^{15}N で 10% ラベルした(a)4,4'-bis(*N*-phenylphthalimide) (*s*-BNPPI)、異なる加熱イミド化過程による2種 (PI 粉体とスピンコートフィルム (フィルム)) の(b)PI(*s*-BPDA/PDA)、同様に2種 (PI 粉体とフィルム) の(c)PI(*i*-BPDA/PDA)を調製した(Scheme 1.)。 *s*-BNPPI は、3,3',4,4'-biphenyltetracarboxylic dianhydride(*s*-BPDA)とアニリンを NMP に溶解させて 180°C で 3 時間還流した後に濾過し、メタノールで洗浄、乾燥して得た。PI は一般的な二段階合成法で合成した。窒素雰囲気下で脱水 DMAc に *p*-phenylenediamine(PDA)を完全に溶解させた後、酸無水物を加え室温で 24 時間攪拌してポリアミド酸を得た。2,2',3,3'-biphenyltetracarboxylic dianhydride(*i*-BPDA)は (株) JSR から提供されたものを精製せずに用いた。PI 粉体は、ポリアミド酸 DMAc 溶液を窒素雰囲気下 180°C で 2 時間還流した後に析出した粉末を濾過し、洗浄・乾燥した後にさらに 400°C で 1 時間加熱して得た。この方法を用いると、*s*-BPDA/PDA では高結晶性粉体が得られることが知られている¹⁾。フィルムは、ポリアミド酸 DMAc 溶液をシリコン基板上にキャストし、窒素雰囲気下 70°C で 2 時間、 160°C で 1 時間、 250°C で 30 分、 350°C で 1 時間加熱して得た。磁気遮蔽定数計算は Gaussian 98 Rev. A.9 で B3LYP/6-31G(d)基底を用い、環を平面として二面角(ω , χ)を 5° または 10° おきに變化させて結合長及び結合角の構造最適化を行った後、B3LYP/6-311+G(2d,p)基底を用いて磁気遮蔽定数(σ)を計算した。二面角 ω の計算には *N*-phenylphthalimide(NPPI)(Scheme 1(d))を用い、二面角 χ の計算には *s*-BPDA(Scheme 1(e))を用いた。

【結果・考察】 二面角 ω の推定には、 ^{15}N CP/MAS NMR スペクトルのスピニングサイドバンド(SSB)解析から決定したイミド窒素の化学シフトテンソルの主値の差($\delta_{11} - \delta_{33}$, $\delta_{22} - \delta_{33}$)、及び異方性パラメータ $\eta (= (\delta_{11} + \delta_{22}) / 2 - \delta_{33})$ と ω との相関関係を用いた。磁気遮蔽定数計算によって二面角 ω が増加する



Scheme 1.

conformation, dihedral angle, ^{15}N NMR, chemical shift tensor, *ab initio* calculation
こみやまたかし、あいみけいたろう、あさかわなおき、あんどうしんじ

とイミド窒素の $|\sigma_{11} - \sigma_{33}|$, $|\sigma_{22} - \sigma_{33}|$ 及び η は減少することが示された(Fig. 1)。このグラフにSSB解析から得られたそれぞれの実測値を当てはめ、 ω の値を読み取った。この方法で推定したNPPIの二面角($\omega = 62 \pm 5^\circ$)は、X線回折法により得られた値(58.4°)²⁾と比較して妥当な値であった。s-BPDA/PDAのPI粉体(Fig. 2(a))とフィルム(Fig. 2(b))の¹⁵N CP/MASスペクトルに同様の方法を適用したところ、PI粉体は $\omega = 72 \pm 5^\circ$ 、フィルムは $\omega = 56 \pm 10^\circ$ と推定された。フィルムのスペクトルは ω の分布を反映して変化する化学シフトのピークが重なっているために高結晶性のPI粉体のピークより線幅が広がっていると考えられ、求めた化学シフトテンソルの主値にも ω の分布の影響が含まれていると考えられる。PI粉体とフィルムの ω が異なるのは、イミド化時の分子の運動性が異なるためと考えられる。PI粉体のイミド化は溶媒中で進行するために分子運動の自由度が高く安定なコンホメーションをとることができるのに対し、フィルムではイミド化が完結する前に溶媒が蒸発するためコンホメーションが制限され、二面角に分布が生じたと考えられる。同様の方法で*i*-BPDA/PDAの¹⁵N CP/MASスペクトルから二面角 ω を推定したところ、PI粉体(Fig. 3(a))では $70 \pm 5^\circ$ 、フィルム(Fig. 3(b))では $69 \pm 5^\circ$ とほぼ等しい値となった。二面角 χ の推定には固体¹³C CP/MAS NMRスペクトルから得た等方平均化学シフト値とs-BPDAの磁気遮蔽定数計算の結果を用いた。計算結果からC₃が最も二面角の影響を受けやすく、C₅はあまり影響を受けないことがわかった。Fig. 4にC₃とC₅の磁気遮蔽定数の差と二面角 χ の相関を示す。このグラフにC₃とC₅の等方平均化学シフト差を当てはめ、その時の χ の値を読み取ることでs-BNPPI(Fig. 5(a))の二面角 χ を $2 \pm 5^\circ$ と推定した。これはX線回折法により得られた値(0.1°)³⁾と良く一致する。同様の方法でs-BPDA/PDAの二面角 χ をPI粉体(Fig. 5(b))では $0 \pm 5^\circ$ 、フィルム(Fig. 5(c))では $21 \pm 5^\circ$ と推定した。これらの結果は結晶化したイミドやポリイミドにおいてはs-BPDAのビフェニル部分が共平面となるが、結晶化しにくい条件ではねじれたコンホメーションをとることを示している。一方、*i*-BPDAでは立体障害によりビフェニル部分が大きくねじれており⁴⁾、密なパッキングを形成しにくいいため分子鎖は結晶化せず、結果としてPI粉体とフィルムのコンホメーションに違いが見られなかったと考えられる。

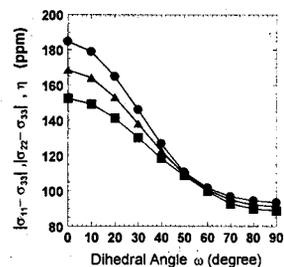


Fig. 1. Dihedral angle (ω) dependence of $|\sigma_{11} - \sigma_{33}|$ (●), $|\sigma_{22} - \sigma_{33}|$ (■) and η (▲) for NPPI.

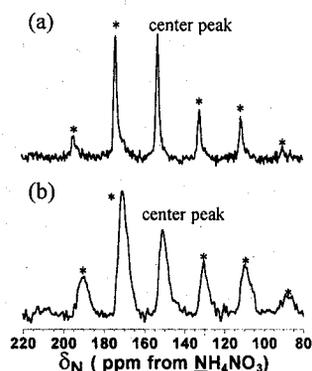


Fig. 2. ¹⁵N CP/MAS NMR spectra of s-BPDA/PDA. (a) PI powder, (b) spin-coated film.

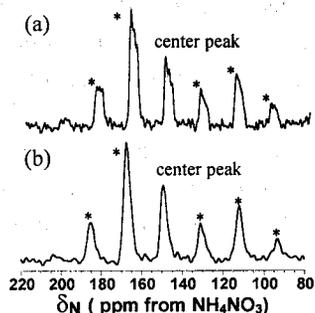


Fig. 3. ¹⁵N CP/MAS NMR spectra of *i*-BPDA/PDA. (a) PI powder, (b) spin-coated film.

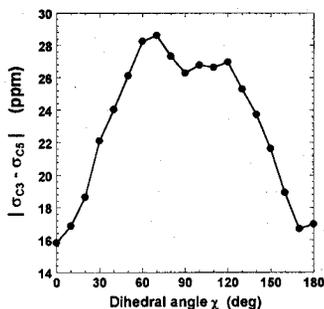


Fig. 4. Dihedral angle (χ) dependence of the difference in isotropic shieldings between C₃ and C₅ carbons of s-BPDA.

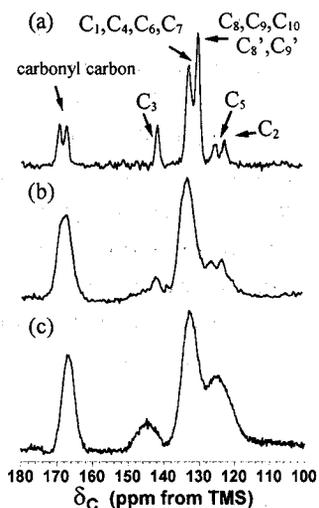


Fig. 5. ¹³C CP/MAS NMR spectra of s-BNPPI(a), s-BPDA/PDA highly crystalline powder (b), s-BPDA/PDA spin-coated film(c).

【参考文献】

- 1) Nagata, Y.; Ohnishi, Y.; Kajiyama, T. *Polymer Journal*, **28**(11), 980 (1996).
- 2) Magomedova, N, S. et al. *Sov. Phys. Crystallogr.* **26**(4), 475 (1981).
- 3) Okuyama, K.; Rozhanskii, I.; Goto, K. *Acta Crystallogr., Sect. C*. **55**, 424 (1999).
- 4) Rozhanskii, I.; Okuyama, K.; Goto, K. *Polymer*. **41**, 7057 (2000).

^{13}C - ^{13}C distance measurement by DARR using multiply ^{13}C labeled powder samples
(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University)

○ R. Ohashi, T. Mizuno, E. Katoh, K. Takegoshi, T. Terao

While NOESY has long been the most useful technique to obtain ^1H - ^1H distances in liquids NMR, we still have no such technique in solids. In this work, we examine whether ^{13}C - ^{13}C 2D exchange NMR with DARR [1] can be used to obtain many ^{13}C - ^{13}C distances using a multiply/uniformly ^{13}C labeled samples in solids.

Firstly, we examined ^{13}C - ^{13}C polarization transfer curves under DARR using fully ^{13}C labeled glycil-isoleucine (Gly-Ile) dilute by natural-abundance one with a ratio of 1:9. Fig. 1 shows the 2D ^{13}C - ^{13}C DARR polarization-transfer spectrum taken at the mixing time of 100 ms and the MAS speed of 22 kHz ($\nu_0 = 100$ MHz for ^{13}C). Similar 2D spectra were taken at various mixing times, and the build-up curves for the $\text{C}_{\beta}^{\text{Ile}}$, $\text{C}_{\gamma}^{\text{Ile}}$, $\text{C}_{\alpha}^{\text{Gly}}$, and $\text{C}^{\text{Gly}}=\text{O}$ peaks, whose magnetization is transferred from $\text{C}_{\alpha}^{\text{Ile}}$, are plotted in Fig. 2. Close examination of the transfer curves indicates that for the mixing times longer than 500ms spin diffusion among nearby ^{13}C spins becomes to obscure the direct polarization transfer from $\text{C}_{\alpha}^{\text{Ile}}$. This suggests that the cross-peak intensities at a mixing time shorter than 500 ms may be used to estimate the corresponding C-C distances.

The initial build-up rates for the individual carbons were obtained by fitting the initial region (≤ 200 ms) of the curve in Fig. 2 to a single-exponential function and plotted in Fig. 3 with the corresponding C-C distance. Fig. 3 shows that the initial build-up rate is approximately expressed by r^{-6} , where r is the C-C distance. It is hence possible to determine C-C distances by a series of the 2D DARR experiments.

Fig. 4 shows correlation between the cross-peak intensities normalized to the corresponding diagonal-peak intensity and the C-C distance taken at the mixing time of 100 ms (a), 200 ms (b), and 500 ms (c). The cross-peak intensities were measured at the cross-section spectra along the F2 axis. Fig. 4 shows that even one 2D ^{13}C - ^{13}C polarization-transfer experiment with DARR at a mixing time of ~ 500 ms would possibly be used to deduce C-C distances roughly. To establish the correlation more firmly, we are currently examining DARR in several uniformly ^{13}C -labeled peptides with known structure.

[1] K. Takegoshi, S. Nakamura, and T. Terao, Chem. Phys. Lett., **344**, 631 (2001).

Key words : 2D NMR in solids, Multiple ^{13}C -labeled peptide, Determination of distance

おおはし りゅうたろう、みずの たかし、かとう えつこ、たけごし きよのり、
てらお たけひこ

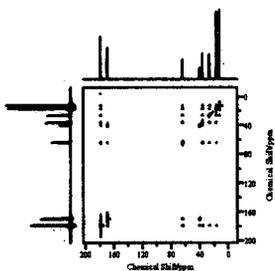


Fig. 1 : 2D ^{13}C - ^{13}C polarization transfer spectrum of 10% uniformly ^{13}C -labeled Glycylisoleucine with the mixing time of 100ms.

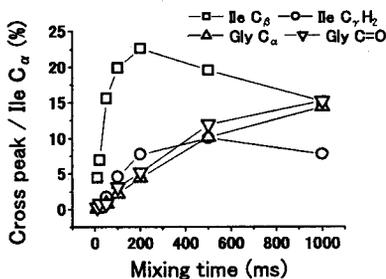
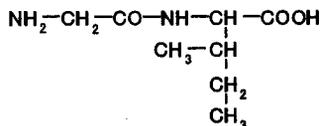


Fig. 2 : Correlation between the normalized cross-peak intensity in the Ile C_α F2 slice spectra and the mixing time.

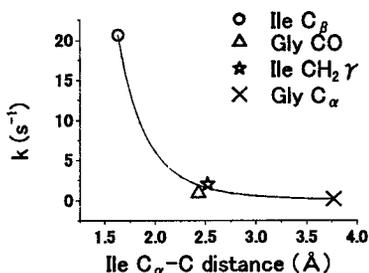
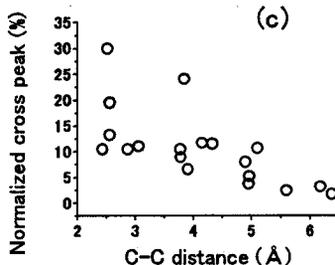
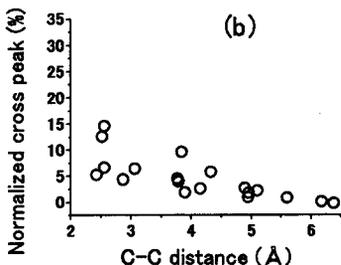
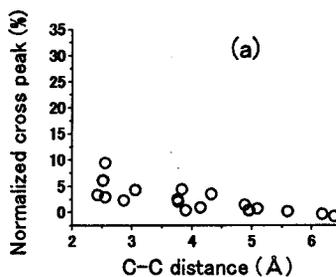


Fig. 3 : Correlation between the initial build-up rate k and the C-C distances (r) between Ile C_α and \circ Ile C_β , \triangle Gly CO, \star Ile $\text{CH}_2 \gamma$, \times Gly C_α . The solid line is $k = A r^{-6}$, with $A = 3.86 \times 10^{-58} \text{m}^6 \text{s}^{-1}$.

Fig. 4 : Correlation between the normalized cross-peak intensity obtained from the cross-section spectrum of (a) 100ms, (b) 200ms, (c) 500ms and C-C distance.



Structure of Nascent Isotactic Polypropylene Powders

○Takeshi Yamanobe, Mayumi Kawai, Katsunori Ueki, Hiroki Uehara, 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 which are obtained by bulk and slurry polymerizations, and crystallized samples by several crystallization conditions were investigated. From NMR results, it is found that, the fraction of intermediate component for nascent iPP powders is much larger than those for melt quenched sample and isothermally crystallized sample. TEM micrograph of nascent powder dose not show typical lamellar structure. From these results, the fine structures of both nascent powders are discussed.

1. 緒言

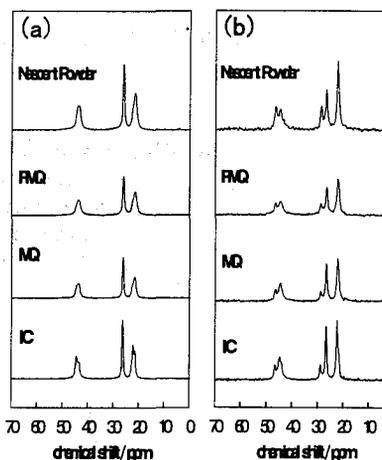
ポリオレフィン重合パウダーは、種々の特異なモルフォロジーを有することが知られている。溶液もしくは熔融結晶化のような穏やかな結晶化条件とは異なり、重合パウダーは重合時に触媒活性点からの急速な結晶化が予想される。そのため、重合パウダーは、溶液、熔融結晶化物とは異なったモルフォロジーを有し、また、分子運動性の点でも違いがあるものと考えられる。本研究では、アイソタクチックポリプロピレンについて、重合パウダーと熔融結晶化物等との比較から、重合パウダーに特徴的な構造についての知見を得ることを目的とした。

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 (バルク及びスラリー重合物) 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℃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℃で熔融後、135℃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。これらの試料について、CPMAS NMR測定、¹H NMR測定と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行い、その構造と分子の運動性を検討した。

3. 結果と考察

Fig.1(a)に各試料の室温での¹³C CPMAS 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。Fig.1(b)に100℃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も非晶の

Fig.1 ¹³C CPMAS NMR spectra of iPPs

(a) root temperature and (b) 100°C

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、固体NMR

やまのべたけし、かわいまゆみ、うえきかつのり、うえはらひろき、こうもとただし

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で比較してみると、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高い。このことは、重合パウダーにおける分子運動性が他の試料に比べて異なることを示している。

そこで、 ^1H パルスNMRにより、結晶、中間相、非晶の各成分について比較した。測定の結果、得られた ^1H T_2 の温度変化は試料間で差はなく、同じような挙動を示した。Fig. 2(a), (b)にMQと重合パウダーの結晶、中間相、非晶の分率の変化を示した。MQでは各相の割合は温度変化にあまり影響を受けず、ほぼ一定であり、結晶成分が最も多く、続いて中間相、非晶の順になっている。これに対して重合パウダーでは室温を除いて、中間相が最も多く、結晶、非晶の順になっている。室温では中間相と結晶の運動性が近いために成分分離が難しく、比が逆転している。IC、PMQなどの他の試料はFig. 2(a)のMQと同じような挙動であった。つまり、重合パウダーにおいては結晶と非晶の中間の成分が非常に多く存在し、これにより、CPMASスペクトルの挙動が他のものと異なっていたと考えられる。結晶成分の割合が少ない、中間相が多いことから他の試料に比べて結晶自体の大きさが小さく、その周りを中間相が取り巻いていると考えられる。

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。TEM観察の結果、急冷試料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った。一方、重合パウダーについては他の試料と異なり、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ないか、または取ったとしてもその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。そして、中間相が多いことから、微結晶の周りを構造の少し乱れた中間成分が取り巻いていると考えられる。このような重合パウダーの特異な構造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。バルク重合法で得られた試料とスラリー重合法で得られた試料の比較についても報告する予定である。

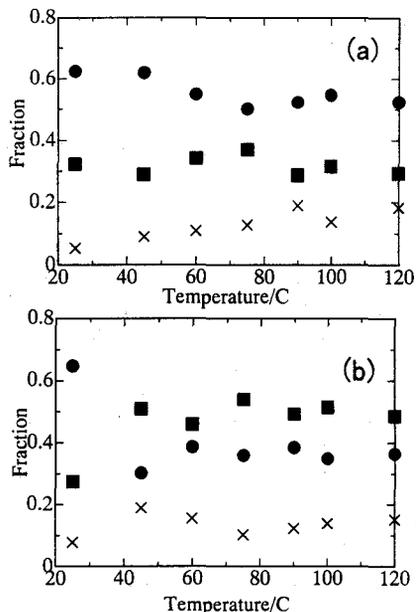


Fig.2 Temperature dependences of ^1H T_2 of crystalline (●), intermediate (■) and amorphous phases (×) for (a) melt quench and (b) nascent iPP

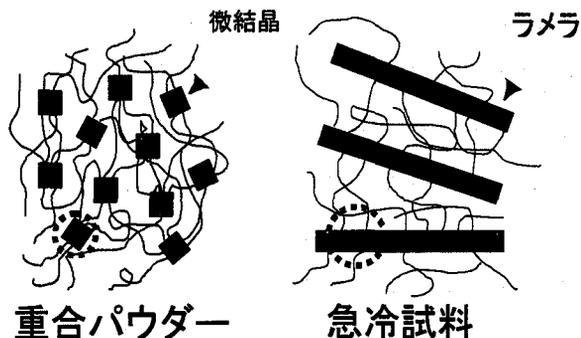


Fig.3 Model structures of nascent powder and melt quenched sample of iPP.

北大院工 石井 文明

Local Relaxation Mode of at-PMMA studied by NMR ^1H - ^{13}C Cross Relaxation method
 Division of Applied Graduate School of Engineering, Hokkaido University, 060-8628, Japan
 Fumiaki Ishii

The local relaxation mode of at-PMMA below the glass transition temperature T_g was studied from NMR ^1H - ^{13}C Cross Relaxation. The ^1H spin-lattice relaxation times $T_{1\rho\text{H}}$ in rotating frame of all carbon groups in main and side chains were clearly minimized in the same β_{T1} temperature region below T_g . The asymmetry of the $T_{1\rho\text{H}}$ minimization was reasonably represented by the Davidson-Cole $T_{1\rho\text{H}}$ equation of parameter $\beta=0.7$, based on the local relaxation mode theory. The β_{T1} process of the $T_{1\rho\text{H}}$ minimization was located on the dielectric $\beta\epsilon$ -dispersion curve of at-PMMA in the relaxation frequency map. The activation energy $\Delta E=18$ kcal/mol agreed well with 20 kcal/mol of the $\beta\epsilon$ -dispersion and 19 kcal/mol of the local relaxation mode of Kel-F. These findings verified that the $T_{1\rho\text{H}}$ minimization process below T_g is attributed to the lattice vibration of the local relaxation mode to the main chain segments in at-PMMA as well as the β -dispersion of PVAc.

1. はじめに

固体 at-PMMA の分子運動やその緩和現象は NMR、誘電分散や力学分散測定等で古くから多くの研究者によって研究されている。¹⁾ そのガラス転移点 T_g 以上と以下の誘電分散や力学分散測定ではそれぞれ主分散 α と副分散 β および γ が観測されている。その主分散 α は T_g 以上での主鎖セグメントのミクロブラウン運動に、 T_g 以下の副分散 β と γ は主に側鎖エステル基および主鎖の α -メチル基の運動に依っているとされている。特に、 T_g 以下の副分散 β は PVAc と異なり、主鎖セグメントの局所緩和の格子振動でなく、側鎖自身の 2 site jump に基因していると主に解釈されている。一方、最近 Schmidt-Rohr et al²⁾ は 2D 交換 NMR 測定を行い、 T_g 以下に於いて側鎖エステルの site jump 運動が局所的主鎖部位の軸周りの微小回転運動に依っているとした。このように副分散、 β についてはその実体はまだ明らかになっていない。本研究では、at-PMMA の ^1H - ^{13}C 交叉緩和測定を行い、 T_g 以下での回転系 ^1H スピン・格子緩和時間 $T_{1\rho\text{H}}$ の極小化が局所緩和の格子振動緩和スペクトルで良く解釈できたので報告する。

2. 結果・考察

Fig.1 は主鎖 $=\text{C}$ -基の回転系 ^1H スピン-格子緩和時間 $T_{1\rho\text{H}}$ と逆温度 $1/T$ との関係である。その $T_{1\rho\text{H}}$ は $T_g=110^\circ\text{C}$ 以上と以下の2つの温度域、 α_{T1} と β_{T1} で極小化が起きており、 β_{T1} 域では極小化温度 $T_{\text{min}}=105^\circ\text{C}$ の非対称な極小化過程がはっきり観測されている。主鎖や側鎖の他

キーワード： at-PMMA ガラス転移 β -分散 ^1H - ^{13}C 交叉緩和 ^1H スピン-格子緩和時間
 局所緩和 モード NMR 相関時間スペクトル

著者 : いしい ふみあき

の全ての基の $T_{1\rho H}$ 極小化挙動や T_{\min} も=C=基と同様であった。この β_{T1} 域は Schmidt-Rohr²⁾と同様、緩和地図上で誘電(ϵ)や力学(M)分散の β_x ($x = \epsilon, M$) 域に局在していた。Fig 1 に於ける β_{T1} 域の実線は Davidson-Cole 相関時間分布 $L_N(\tau_c)$ を用いた $T_{1\rho H}$ の(1)式を実測値に最適化したもので、良く一致している：

$$1/T_{1\rho H} = M_2 [2\tau_c \sin\{\delta/2 \tan^{-1} 2\omega\tau_c\} / (1 + 4\omega^2\tau_c^2)^{\delta/2}]$$

(1) ここで、 $\tau_c = \tau_0 \exp(\Delta E/RT)$, $\delta = 1 - \beta$ は分布パラメータ、 M_2 は NMR2 次能率である。最適化された β は 0.7 で、活性化エネルギー ΔE は 18 kcal/mol であり、誘電や力学分散の β_x ($x = \epsilon, M$) の ΔE_x

= 20 kcal/mol と一致し、Kel-F の 19 kcal/mol と良く一致している。Protonated ^{13}C の接触時間に対する 1H - ^{13}C 交叉分極は理論的に基内と基間交叉緩和を考えることで実験値の最適化が初めてできた。このことは Protonated ^{13}C の 1H - ^{13}C 交叉分極が基内と基間で起きていると云える。各基内と基間の交叉過程に対し得られた主鎖の CH_2 基や α - CH_3 基、側鎖の =CO 基や CH_3 基の $T_{1\rho H}$ 極小化過程も Fig1 での=C=基と同じ β_{T1} 温度域で起き、実験値の最適化は誤差範囲で、 β が 0.7、活性化エネルギー ΔE は 18 kcal/mol ででき、同じ結果を得た。

一般に、 $T < T_g$ では無定形鎖の力定数 f は $T < T_g$ では $f \gg 1$ であるので local relaxation mode に対する石田・山藤の誘電的緩和スペクトル密度 $J_D(\omega)$ は $\beta = 0.5$ の Davidson-Cole 緩和時間分布 $F_{DC}(\tau_c)$ のものと見なすことが出来る。そこで、この local relaxation mode に対する NMR 局所場揺らぎのスペクトル密度 $J_N(\omega)$ を、特性相関時間 τ_c の Davidson-Cole 相関時間分布 $L_N(\tau_c)$ を用い局所緩和理論¹⁾から考察し、得られた $1/T_{1\rho H}$ の理論式は(1)式と一致した。

以上のように、主鎖や側鎖の各基に対する $T_{1\rho H}$ の極小化が同じ温度域で起き、局所緩和理論¹⁾で説明できた事と $T_{1\rho H}$ と他との ΔE の一致は T_g 以下、 β_{T1} 温度域での側鎖運動が主鎖セグメントの非干渉格子振動に基因しており、local relaxation mode の検証となっている。

References

- 1). N.G.McCrum, B.E.Read, and G.Williams. Anelastic and dielectric Effect in Polymeric Solids (John Willy & Sons, London.)
- 2). K. Schmidt-Rohr, A. S. Kulik, H. W. Beckham, A. Chlemacher, U. Pawelzik, C. Boeffel and H. W. Speiss, macromolecules 21, 2934 (1988).

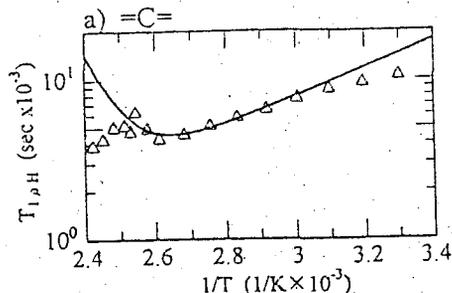


Fig. 1. $T_{1\rho H}$ vs. $1/T$ plot for the =C= group in at-PMMA

Effective Reduction of rf Power for ^1H Homonuclear Dipolar Decoupled Cross Polarization in Solid State NMR Spectroscopy

○西村 勝之¹、Timothy A Cross^{2,3}、内藤 晶¹

横浜国立大学 大学院工学研究院¹、National High Magnetic Field Laboratory²、FSU³

<概要>

^1H 同種核間磁気双極子相互作用のデカップル条件下で、観測核に任意の強度の弱いラジオ波を適用し、交差分極に基づく観測核の感度向上を可能にする新規方法 (Time Averaged Nutation at Magic Angle-CP) の開発を行った。 ^1H 核に適用するラジオ波を特定の短い周期内で Lee-Goldburg の条件を満たすよう、位相と周波数の双方を同時に反転させ、歳差周波数の時間平均を行った。これにより ^1H 同種核間磁気双極子相互作用を消去しながら、交差分極を行うための Hartmann-hahn 条件を、任意に調節が可能にした。自発磁場配向試料を用いて、既存の交差分極法と比較を行い、本方法では観測核の接触時間中のラジオ波強度に依存することなく、既存の交差分極法以上の感度を 1/10 の出力で維持可能であることが実験的に観測された。

<序論>

生体膜と相互作用をするペプチドや膜蛋白質の立体構造解析や膜に対する相対配置を決定する手段として、近年、ガラスプレートによる配向試料¹⁾または、自発磁場配向試料²⁾の固体 NMR 解析が成功を収めつつある。これら試料では MAS が適用できないため、MAS に依存しない NMR 測定法の開発が必要である。本研究ではまず、これらの静止試料に適用可能な感度向上法の開発を行った。

<理論>

交差分極(CP)法による磁化移動では、90 パルスで励起した ^1H 核(I)の磁化および、観測核(S)に連続的なラジオ波を適用しスピロックを行い、そのラジオ波歳差周波数 ω_{H} 、 ω_{S} を一致させる Hartmann-hahn(HH)条件¹⁾ $\omega_{\text{H}} = \omega_{\text{S}}$ を満たすことにより、I-S 異種核間磁気双極子相互作用のフリップフロップ項による磁化移動を可能にする。ただし $\omega_{\text{Ik}} = \gamma_{\text{k}} H_{\text{Ik}}$ ($\text{k} = \text{I}, \text{S}$)。すなわち観測核では、HH 条件を満たすために ^1H 核と観測核の磁気回転比の比 $\gamma_{\text{I}}/\gamma_{\text{S}}$ に比例したラジオ波出力を必要とする。これは ^{15}N のような磁気回転比が小さい核では高出力アンプが必要になることを意味する。またスピンを有効にロックするには、内部相互作用に対して十分に強力なラジオ波を適用する必要がある、通常 30~50 kHz のラジオ波強度を必要とする。一方 Lee-Goldburg-CP (LG-CP)法⁴⁾は回転座標系で磁化を静磁場から 54.7°傾いた軸でオフレンジスピンロックすることにより、 ^1H 同種核間磁気双極子相互作用を有効磁場の歳差周期毎に平均化する LG デカップリング⁵⁾と CP を組み合わせた方法であり、HH 条件は $\omega_{\text{eff}} = \omega_{\text{S}}$ に変形される。ただし、以下の LG 条件を満たすようラジオ波強度、オフセット周波数を設定する。

Cross polarization, Homonuclear dipolar decoupling Solid state NMR Power reduction

にしむら かつゆき Timothy A. Cross ないとう あきら

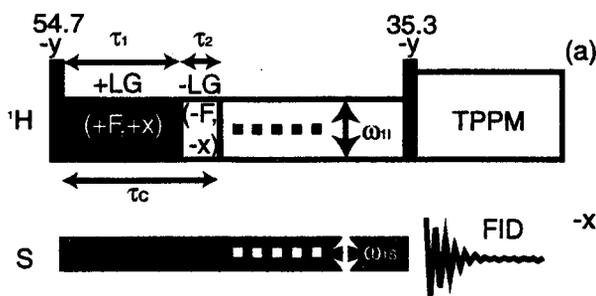


Figure 1. Pulse sequence for Time Averaged Nutation at Magic Angle-CP (TANMA-CP).

$$\omega_{eff} = \sqrt{\Delta\omega_{0I}^2 + \omega_{1I}^2}, \quad \Delta\omega_0 = \sqrt{\frac{1}{2}}\omega_1$$

さらに CP 法で観測核の HH 条件を緩和する方法として Time Averaged Precession Frequency-CP (TAPF-CP)法⁶⁾が考案されている。TAPF-CP 法は ^1H 核に適用するラジオ波の位相を τ_1 、 τ_2 の周期で反転させることにより ^1H 核の歳差周波数を時間平均し、観測核の HH 条件に必要な際差周波数を下げることが可能にする。

結果として HH 条件は $(\frac{\tau_1 - \tau_2}{\tau_c}) * \omega_{1I} = \omega_{1S}$ のよ

うに変形される⁶⁾。ただし τ_1 、 τ_2 はそれぞれ $+x$ 、 $-x$ の位相でスピロックする時間で、 $\tau_c = \tau_1 + \tau_2$ である。

本研究では上述の LG-CP および TAPF-CP の長所を組み合わせ、Fig1. に示

した ^1H 同種核間磁気双極子相互作用を消去しつつ CP を行い、かつ観測核に必要なラジオ波出力を劇的に減少させる方法 Time Averaged Nutation at Magic Angle-CP (TANMA-CP)を開発した。ラジオ波のオフレゾナンス照射条件下で有効磁場方向を逆方向へスイッチする場合、上述の TAPF-CP とは異なり、図 2 に示すようにラジオ波の位相と周波数の双方を同時に切り替える必要がある。すなわち τ_1 、 τ_2 ではそれぞれ(位相,周波数) $(+x, +\Delta\omega)$ 、 $(-x, -\Delta\omega)$ でスピロックを行う。これはすなわち $+LG$ と $-LG$ の照射時間が異なる Frequency Switched Lee-Goldburg (FSLG)デカップリング⁷⁾であり、 $\tau_1 = \tau_2$ の時 FSLG デカップリングの $+LG$ 、 $-LG$ を周期 τ_c で切り替えたものと一致する。また LG では不可能な ^1H 同種核間磁気双極子相互作用の高次項の消去による oscillation ダンプの改善が期待される。TANMA-CP での HH 条件は

$(\frac{\tau_1 - \tau_2}{\tau_c}) * \omega_{eff} = \omega_{1S}$ と表現できる。また異種核間磁気双極子相互作用は LG-CP と同

様の $\sqrt{\frac{2}{3}}$ の高いスケールリングファクターを持つ。

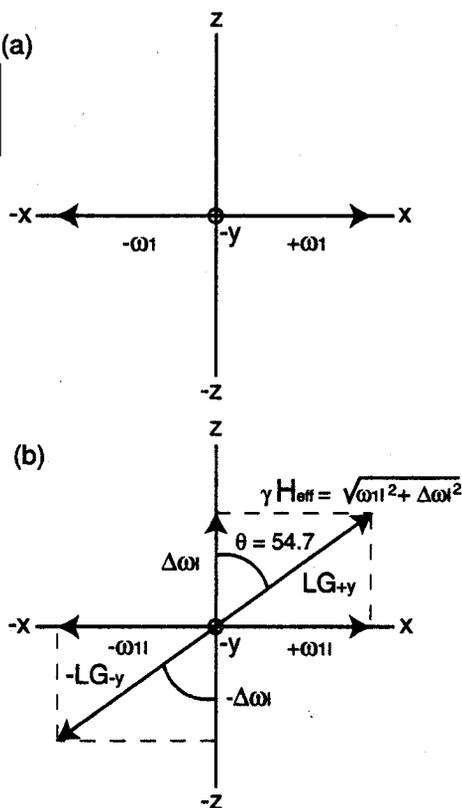


Figure 2. Schematic representation of ^1H effective field during (a) TAPF-CP and (b) TANMA-CP, which consists of $+LG$ and $-LG$ spin locking schemes.

実験

液晶試料 MBBA を用いて NMR 測定を行った。すべての NMR 測定は Chemagnetics Infinity 400 分光器と 5mm コイル内径の 2 重共鳴 MAS プローブを用いて静止状態で行った。試料は MAS 試料管内の中央 5mm の領域になるよう設計したガラスチューブに封入し、温度は 25°C に設定した。すべての実験で接触時間中の ^1H 核のラジオ波を 40 kHz に固定し、各々の実験で Hartmann-Hahn(HH)条件を満たす観測核のラジオ波を調整した。異なる time averaging factor $0.67(\tau_1, \tau_2)=(7.5\mu\text{s}, 1.5\mu\text{s})$, $0.50(\tau_1, \tau_2)=(6.75\mu\text{s}, 2.25\mu\text{s})$, $0.33(\tau_1, \tau_2)=(6.0\mu\text{s}, 3.0\mu\text{s})$ に関して TANMA-CP と既存の CP 法と比較した。

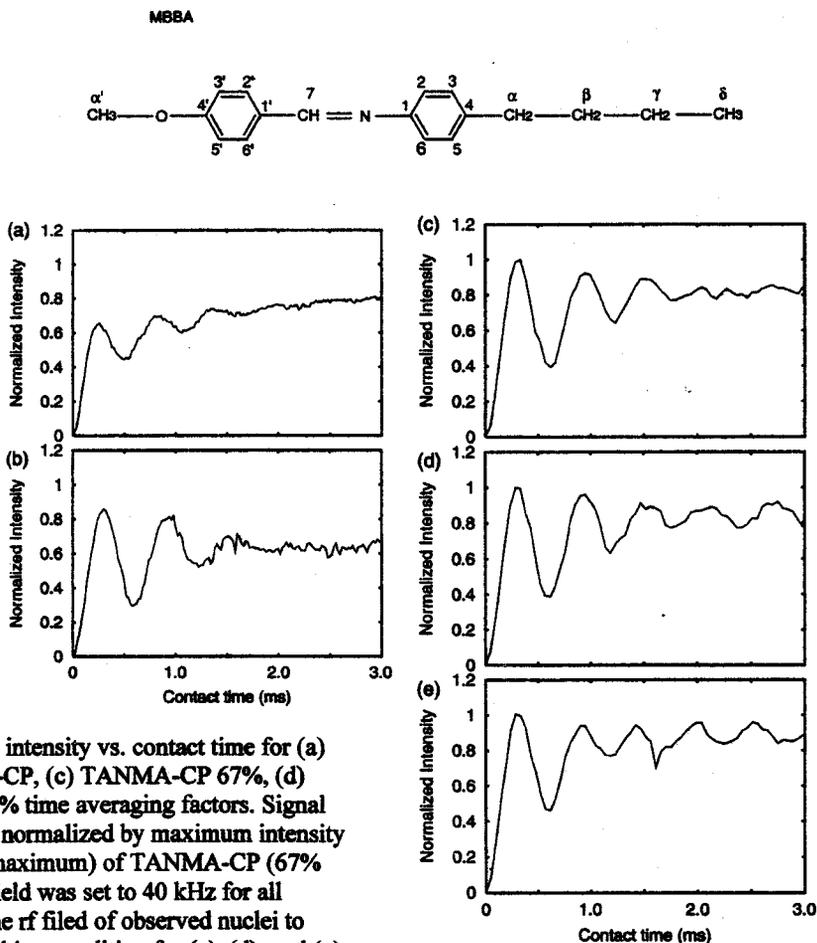


Figure 3. Signal intensity vs. contact time for (a) HH-CP, (b) LG-CP, (c) TANMA-CP 67%, (d) 50%, and (e) 33% time averaging factors. Signal intensities were normalized by maximum intensity (1st oscillation maximum) of TANMA-CP (67% scaling). ^1H rf field was set to 40 kHz for all experiments. The rf field of observed nuclei to satisfy HH matching condition for (c), (d), and (e) were 32, 20, 13.3 kHz, respectively.

結果

3 位炭素核の信号の 20Hz 低磁場側に搬送周波数を設定した場合の 3 位炭素信号の接触時間変化に対する信号強度を Fig. 3 に示す。液晶試料であるため、 ^1H 同種核間磁気双極子相互作用は一部分子運動により平均化を受け減少し、HH-CP においてもわずかに dipolar oscillation が観測された。また LG-CP ではゼロオーダーの ^1H 同種核間磁気双極子相互作用のみが消去されるため、高次項に起因する oscillation ダンピ

ングは極めて早く、1.5ms程度からダンプされているのが分かる。一方 TANMA-CP では実験を行ったすべての time averaging factor (67-33%)でも 3.0ms 以降までは明確な dipolar oscillation が観測された。また最初の oscillation 極大での信号強度は HH-CP、LG-CP の双方の最大信号強度より約 20%高いことが確認された。これは FSLG 未満ではあるが、 ^1H 同種核間磁気双極子相互作用の高次項の部分的消去によるデカップリング能力の改善によるものと考えられる。図 5 に各 CP 法での最大感度におけるスペクトルを示す。TANMA-CP 法では観測核のラジオ波強度の減少とともに信号強度のオフセット依存性が生じていることが分かる。発表では観測核のラジオ波傾斜による低出力でのオフセット依存性の改善についても議論をする。33% time averaging factor で HH 条件を満たす観測核のラジオ波強度は 13.3 kHz であり、この時の出力は 6.0w であった。これは LG-CP 時の 67.0w に対して $6.0/67.0=8.96\%$ に相当し、歳差周波数を 1/3 に、また HH 条件に必要な出力を 1/10 以下に抑制できたことが分かる。またオンレゾナンスでは、ラジオ波強度傾斜を行わなくても CP および LG-CP 以上の感度を維持できていることが実験的に証明できた。対照的にさらに time averaging factor をより小さく設定することにより、周波数選択的磁化移動も可能である。本方法は初期磁化の準備および異種核間多次元相関 NMR の混合期のシーケンスとしての適用が期待される。またさらに $\pm\text{LG}$ の周期が正味で同一になるような工夫をすることによって、PISEMA 法の改良にも適用することが可能である。

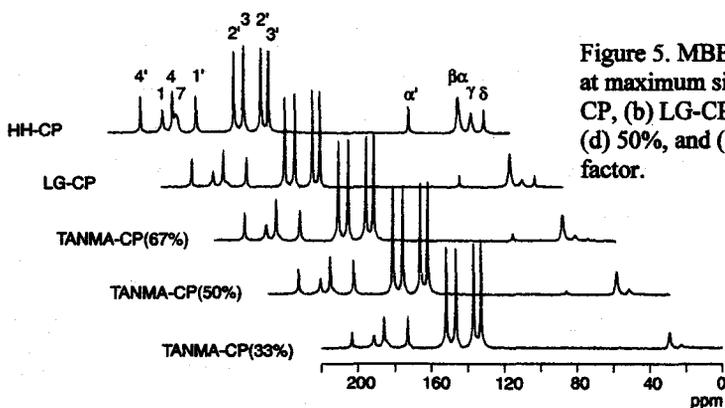


Figure 5. MBBA ^{13}C -CP spectra obtained at maximum signal intensity by (a) HH-CP, (b) LG-CP, (c) TANMA-CP 67%, (d) 50%, and (e) 33% time averaging factor.

References

- 1) J. Wang, J. Denny, C. Tian, S. Kim, Y. Mo, F. Kovacs, Z. Song, K. Nishimura, Z. Gan, R. Fu, J. R. Quine, T. A. Cross, J. Magn. Reson. ,2000, 144, 162.
- 2) A. Naito, T. Nagao, K. Norisada, T. Mizuno, S. Tuzi, H. Saito, Biophys. J. 2000, 78, 2405.
- 3) S. R. Hartmann E. L. Hahn, Phys. Rev. 1962,128, 2042.
- 4) R. K. Hester, J. L. Ackerman, V. R. Cross, and J. S. Waugh, Phys. Rev. Lett. 1975,34, 993.
- 5) M. Lee, W. W. I. Goldberg, Phys. Rev. A. Lett. 1965,140, 1261.
- 6) K. Takegoshi, and C. McDowell, J. Magn. Reson, 1986, 67, 356.
- 7) A. Bielecki, A. C. Kolbert, M. H. Levitt, Chem. Phys. Lett. 1989, 155, 341.

(北大院工) ○平沖敏文、堤 耀廣

Sol-Gel Transition of Rod-like Polymer

Toshifumi Hiraoki and Akihiro Tsutsumi

Department of Applied Physics, Hokkaido University,
N13W8, Kita-ku, Sapporo 060-8628

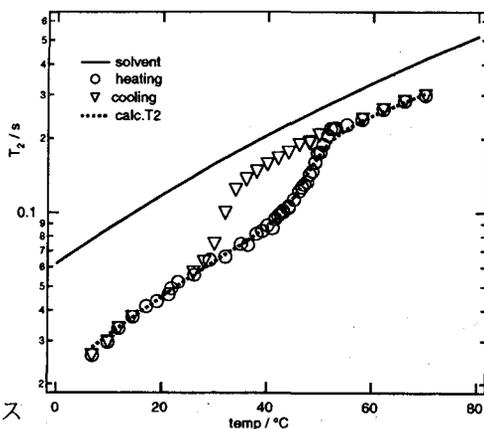
An α -helical rigid-rod poly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG) forms a thermoreversible gel in benzyl alcohol(BzOH). Deuterium relaxation times of BzOH and the phenyl ring of PBLG, which are selectively deuterated, were measured to investigate the sol-gel transition and the dynamics of them in solution. The solvent T_2 reflects remarkably the sol-gel transition of the solution, showing the presence of slow motional states in gel. The solvent dynamics were analyzed with the two state model of the free and the bound BzOH on PBLG molecule. Relaxation times of the PBLG ring consist of both slow and fast components. They do not vary with temperature, but their fractions were clearly altered in the gel-sol transition region.

Poly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG)はベンジルアルコール (BzOH) 中で α -helix構造をとる剛直な棒状高分子である。低温ではPBLG分子が互いに物理的架橋してゲルを形成し、温度可逆的なゾルーゲル転移(転移中点 $\sim 45^\circ\text{C}$)を示す。本研究では、PBLG-BzOH溶液のゾルーゲル転移を溶媒・高分子両者のダイナミクスの面から検討するため、溶媒とゲルの架橋点と考えられるPBLG側鎖末端のフェニル基の重水素緩和時間のPBLG濃度・温度依存性を測定した。

PBLG ($M_n=56000$) を1%重水素化BzOHを含むBzOHに溶解して、高分子濃度0.5~9.3%wtの試料を調整した。PBLGのフェニル基のみを選択的に重水素化したPBLG-d5 ($M_w=128000$) にBzOHを加え、濃度3%wtの試料を得た。重水素NMRの測定は、41.4MHzで行った。緩和時間 T_1 , T_2 はそれぞれIR, CPMG法で測定した。

Fig.1に9.3%wt試料のBzOHの T_2 の温度依存性を示す。低温のゲル状態では、 T_2 は T_1 や溶媒のみの値よりかなり小さく、ゲル中の溶媒には遅い運動状態が存在することを示している。昇温に伴い、42~50 $^\circ\text{C}$ で急に増加し、溶媒のみの値に接近し、ゲルからゾルへの転移を示す。この

棒状高分子、ゾルーゲル転移、緩和時間、ダイナミクス

Fig.1 Temperature dependent T_2 of BzOH

ひらおきとしふみ、つつみあきひろ

温度以上でゾル状態である。ゾルへの転移温度は高分子濃度にはほとんど依存しない。一方降温過程ではゲル化は36℃以下で生じ、温度ヒステリシスを示す。ゲル化温度は高分子濃度が低いほど、低温側にずれる。このような T_2 の温度依存性を溶媒がPBLG分子表面にboundした状態とfreeな状態の二状態間で化学交換すると仮定してゲル状態における溶媒分子の運動の相関時間を求めた。25℃のゲル状態では、 6×10^{-10} sであり、freeな場合の 6×10^{-11} sに比べ一桁長く運動が束縛されていることを示している。化学交換時間はms以下である。

PBLG-d5のシグナルはゲル状態で半値巾が75Hzのsingletを示し、側鎖末端のフェニル基はかなり速い等方的な運動状態にあることを示している。このシグナルの T_1, T_2 緩和曲線はいずれも値が1桁異なる短い成分 (T_{1s}, T_{2s}) と長い成分 (T_{1l}, T_{2l}) に分離できた。 T_1, T_2 の昇温過程における温度依存性をFig.2に示す。 T_{1s}, T_{2s} はそれぞれ8, 4.5msから温度上昇に伴いわずかに増加する。 T_{1l} は40~50℃付近に40msのプロードな極小が現れ、 T_{2l} は温度にほとんど依存せず約35msの値をとる。ゲルからゾルへの転移領域で両緩和時間の明瞭な変化はみられない。 T_{1s}, T_{2s} から求めた等方的な運動の相関時間は25℃で $\sim 3 \times 10^{-10}$ sであり、PBLG分子表面にboundした溶媒分子の相関時間に近く、boundした溶媒分子はゲル状態の高分子表面のダイナミクスを反映していることを示唆している。一方 T_{1l}, T_{2l} から得られる相関時間は25℃で $\sim 4 \times 10^{-11}$ sである。

Fig.3に両緩和時間の各成分の割合 (f_{1s}, f_{2s} ; f_{1l}, f_{2l}) の温度依存性を示す。ゲル・ゾル両状態で各割合はほぼ一定であり、ゲルからゾルへ転移温度領域で各割合が顕著に変化した。 f_{1s} は0.6から0.3へ減少し、 f_{1l} は0.4から0.7に増加した。一方、 f_{2s} は0.6から0.7へ、 f_{2l} は0.4から0.3へわずかに変化する。 f_{1s} をimmobileなフェニル基の寄与と仮定すると、用いた高分子濃度 (3%wt) での1高分子あたりの架橋点の割合は $f_{1s} \sim 0.6$ よりはるかに少ないと考えられるので、ゲル状態でのこの値は、架橋点近傍のかなりの領域にわたって分子表面がimmobileであることを示唆している。高温のゾル状態では f_{1s} は0にならないので、分子会合が生じている可能性がある。

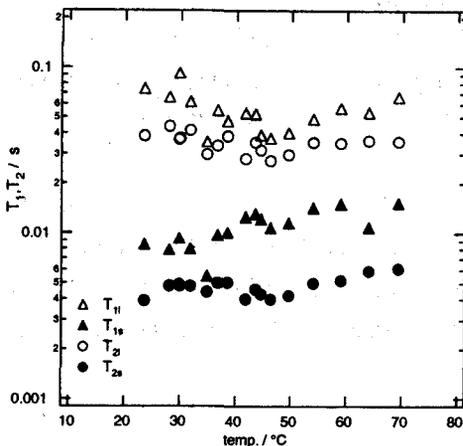


Fig.2 Temperature dependent T_1, T_2 of PBLG-d5.

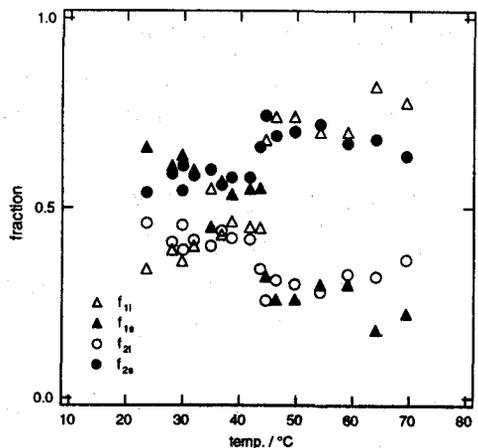


Fig.2 Temperature dependence of the fractions of T_1, T_2 of PBLG-d5.

凍結乾燥製剤中の高分子の ^1H について測定した T_1 および $T_{1\rho}$ の帰属と分子運動性の解析

(国立衛研) ○吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄

Molecular Mobility of Lyophilized Poly(vinylpyrrolidone) and Methylcellulose as Measured by T_1 and $T_{1\rho}$ of Proton

(National Institute of Health Sciences) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima

The T_1 and $T_{1\rho}$ of protons and carbons in lyophilized poly(vinylpyrrolidone)(PVP) and methylcellulose (MC) were measured by using solid-state pulsed ^1H -NMR and high resolution ^{13}C -NMR. $T_{1\rho}$ could determine the increased mobility of backbone methine in PVP and MC associated by increased water content. Mobility of methylene in MC was also reflected on $T_{1\rho}$ in the dry state. In contrast, methylene in MC in the presence of moisture exhibited too high mobility to be reflected on $T_{1\rho}$, suggesting higher mobility than methylene in dextran.

【目的】凍結乾燥製剤の安定性と分子運動性の関係を明らかにすることを旨として、医薬品添加剤として汎用されるポリビニルピロリドン(PVP)およびメチルセルロース(MC)の凍結乾燥状態における分子運動性を ^1H および ^{13}C の T_1 および $T_{1\rho}$ を指標として検討し、高分子添加剤の主鎖および側鎖の運動性の温度依存性を明らかにする。また、前回までに報告したデキストランを添加剤とする凍結乾燥製剤の T_1 および $T_{1\rho}$ との比較を行い、高分子添加剤の構造に起因する分子運動性の差異を考察する。

【実験】重水に溶解したPVPおよびMCの溶液(2.5%w/w)を凍結乾燥し、 ^1H の T_1 および $T_{1\rho}$ をパルスNMR(MU-25、日本電子)を用いて測定した(-90~150°C)。 T_1 の測定はInversion-recovery法で行った。 $T_{1\rho}$ は10 Gaussのスピンロッキング磁場を照射して測定した。また、PVPおよびMCのそれぞれについて、主鎖および側鎖の炭素の T_1 および $T_{1\rho}$ を固体高分解能 ^{13}C -NMR(Varian)を用いて測定した(5~65°C)。MCについては、メチル基を ^{13}C で置換した試料を用いて、側鎖メチル炭素の T_1 および $T_{1\rho}$ を測定した。 T_1 の測定にはTorchiaのパルス系列を用い、 $T_{1\rho}$ の測定には54 Gaussのスピンロッキング磁場を用いた。

【結果】PVPの運動性 重水を用いて凍結乾燥されたPVPの ^1H の $T_{1\rho}$ は、Fig.1のような温度依存性を示した。乾燥状態では、10°Cより高い温度領域において、温度の上昇にともなう $T_{1\rho}$ の減少が観察された。この $T_{1\rho}$ の減少は、湿度の上昇とともに低温側へ移動し、75%相対湿度下では50°C付近に極小値が見られた。Fig.1には、PVPの主鎖のメチン炭素について

凍結乾燥製剤、分子運動性、緩和時間、高分子添加剤

よしおかすみえ、あそゆきお、こじまげお

測定した T_{1p} も示すが (23% および 60% 相対湿度)、メチン炭素の T_{1p} は ^1H の T_{1p} とほぼ一致する値を示した。これらの結果から、高温領域で観察された ^1H の T_{1p} の変化は、PVP の主鎖にあるメチンプロトンの動きを反映していると考えられ、水分含量の増大にともなうメチンの運動性の上昇を観察することができる。なお、温度の低下に伴うメチン炭素の T_{1p} の上昇が頭打ちになるのは、メチン炭素のピークが側鎖のピロリドン環にある一部の炭素と重なるためと考えられる。

乾燥状態では、 -90°C までの温度領域において、メチンプロトンに起因する緩和以外に明確な ^1H の T_{1p} の変化は観察されなかったが、水分の存在する系では、低温領域に広範な温度領域にわたる T_{1p} の変化が観察された。乾燥状態では観察されないこと、また、 T_{1p} の極小値が湿度の上昇にともない低温側に移動することから、この緩和は PVP に結合した水分子に起因すると考えられる。試料は重水を用いて調製したが、一部不純物として H_2O が存在したためと思われる。

^1H の T_{1p} と同時に測定した T_1 は、乾燥状態では見かけ上、fast motional regime に相当する温度変化を示したが、水分の存在する系では温度による変化が小さく、運動性を反映していないことが示唆された。

MC の運動性 重水を用いて凍結乾燥した MC の ^1H の T_{1p} は、乾燥状態で 2 種類の緩和を示唆する温度変化を示した。高温領域で観察された緩和は主に主鎖のメチンプロトンに起因し、低温領域の緩和はそれ以外のプロトン (側鎖の $-\text{OCH}_3$ や $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ など) に起因すると考えられる。 T_1 には後者の緩和のみが高温領域で観察された。水分の存在する系では、メチンプロトン以外のプロトンは運動性が高いため、その動きを反映する T_{1p} の変化は -90°C までの温度領域では観察されなかった。しかし、メチンプロトンに起因する T_{1p} の変化の他に、重水中に不純物として存在する H_2O に起因すると思われる広範な温度領域にわたる T_{1p} の変化が観察された。

【まとめ】 PVP および MC の凍結乾燥品における主鎖のメチンの運動性は、 ^1H および ^{13}C の T_{1p} を指標として定量的に測定できることが分かった。MC のメチレンの運動性は乾燥状態では T_{1p} によって測定できるが、水分存在下では高い運動性のために T_{1p} によって測定できないことが分かり、デキストランのメチレンより著しく高い運動性を持つことが明らかになった。

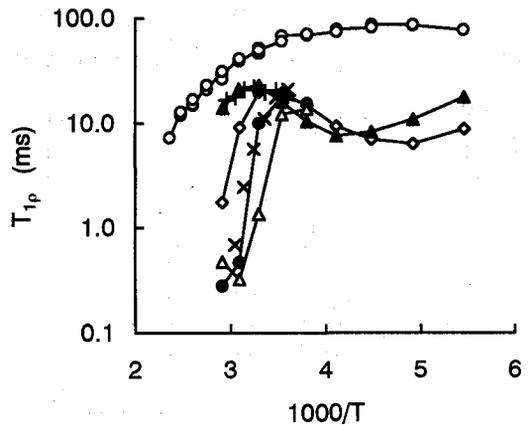


Fig.1. T_{1p} of proton at 75% (Δ), 60% (\bullet), 43% (\diamond), 23%RH (\blacktriangle) and dry state (\circ), and T_{1p} of carbon at 60% (\times) and 23%RH ($+$) in lyophilized PVP

P 100 Broadband ^{13}C - ^{13}C recoupling in rotating solids by high-speed SASS

○ Takashi Mizuno, K. Takegoshi and Takehiko Terao
Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University,
Kyoto 606-8502, Japan

Abstract

In order to promote ^{13}C - ^{13}C spin-diffusion in multiply ^{13}C -labeled molecules in solids with high-resolution observation, we examined off-magic angle spinning. We developed a new SASS (Switching Angle Sample Spinning)¹ NMR probe with a fast spinning over 10 kHz. Experiment and results on a few uniformly ^{13}C -labeled peptides are given.

To determine ^{13}C - ^{13}C internuclear distances by solid-state NMR, ^{13}C - ^{13}C spin-diffusion has been widely used. However, magic-angle spinning prerequisite for high-resolution observation suppresses ^{13}C - ^{13}C dipolar couplings. Hence, a certain recoupling method is required to observe ^{13}C - ^{13}C spin-diffusion under MAS.

In this work we examined off-magic angle spinning (MAS), which would realize spectral overlap caused by the first-order ^{13}C - ^1H dipolar coupling and by ^{13}C CSA which are recovered at off-MAS (see Fig.1). In fact, this scheme has already been proposed and demonstrated at a low spinning speed of 4.5 kHz^{2, 3}. Application of this method to multiply ^{13}C -labeled molecules requires a much high spinning speed to avoid spinning side-bands and to remove ^{13}C - ^{13}C dipolar couplings during high-resolution observation.

Firstly, we built a new ^1H - ^{13}C - ^{15}N triple resonance SASS probe based on the Doty 5 ϕ H-X (^1H frequency is 400 MHz) double resonance probe. The upper limit of spinning speed of this probe is about 12 kHz. We undertook experiments at the spinning speed of 8 kHz to avoid rotary resonance (R^2), and off-magic angle, θ , of 40° from the external field direction.

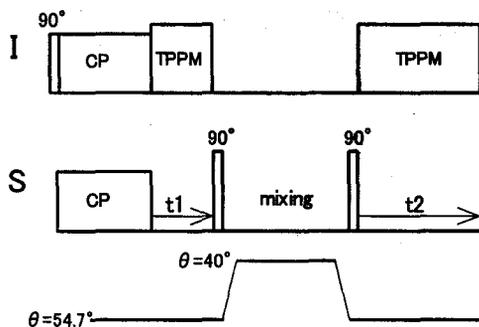


Figure 1 Experimental scheme for off-magic angle assisted broadband recoupling. The pulse sequence is basic 2D homonuclear exchange NMR. The preparation and evolution of S-spin magnetization is at magic angle ($\theta = 54.7^\circ$). The mixing occurs at an off-magic angle ($\theta = 40^\circ$). The rotor axis is moved by step-motor. The evolution (t_1) and detection (t_2) of S-spin magnetization takes place under TPPM decoupling at magic angle.

¹ T.Terao et al. *J. Chem. Soc.* (1986) **85**, 3816

² A.C. Colbert et al., *J. Phys. Chem.* (1994) **98**, 7936

³ B.H. Meier, *Adv. Magn. Opt. Reson.* (1994) **18**, 1

Keywords : solid-state NMR, SASS probe, broadband recoupling, CSA, spin-diffusion

みずの たかし、たけごし きよのり、てらお たけひこ

Fig.2 shows the 2D contour plot of fully ^{13}C -labeled glycyl-isoleucine taken at the mixing time of 120 ms. In Fig.3, we correlate the observed cross-peak intensities and the corresponding ^{13}C - ^{13}C distances. In this plot, data for the C-C pairs close to the R^2 conditions are omitted. Fig.3 clearly demonstrates good correlation between the cross peak intensity and the C-C distance. The advantage of this scheme over the similar experiment using DARR⁴ is that ^{13}C - ^{13}C spin-diffusion occurs much short mixing time. Hence, this off-MAS scheme is useful for ^{13}C spins with short T_1 values.

Currently, we are building a new SASS probe based on the Chemagnetics 3.2 ϕ spinning module, which would achieve 16 ~ 18 kHz spinning speed. It is true that this scheme requires a SASS probe, however, off-MAS is one of the most simple schemes to re-introduce anisotropic interactions to high-resolution solid-state NMR.

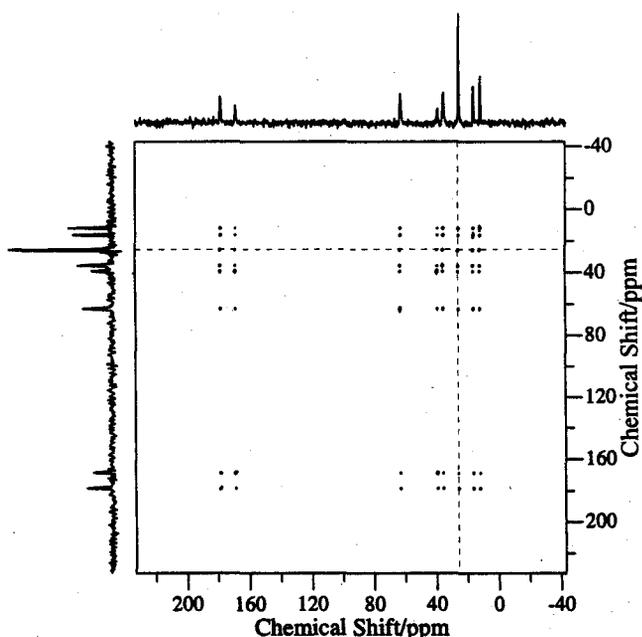


Figure 2 2D contour plot of off-magic angle assisted ^{13}C spin-diffusion experiment at the mixing time of 120 ms.

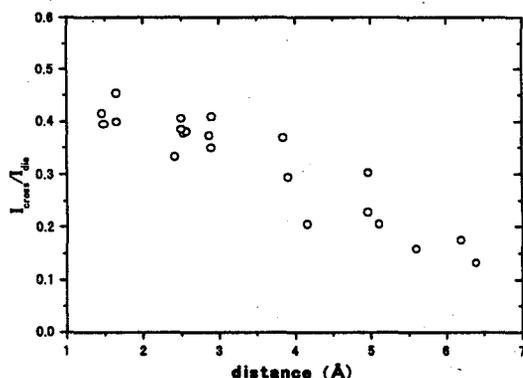


Figure 3 Plot of normalized intensities of off-magic angle assisted ^{13}C spin-diffusion cross peaks and C-C distances at the mixing time of 120 ms.

⁴ K. Takegoshi et al., *Chem. Phys. Lett.* (2001) 344, 631

P 101 ニフェジピンと水溶性高分子の分散状態に関する固体スピン拡散 NMR 解析
(国立衛研) ○阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄

^1H spin-diffusion analysis of solid dispersions of nifedipine and water soluble polymers
(National Institute of Health Sciences) Yukio Aso, Sumie Yoshioka and Shigeo Kojima

^1H spin diffusion was measured by using Goldman-Shen pulse sequence for solid dispersion of nifedipine and poly(hydroxyethyl- α,β -aspartamide (PHEA). A smaller domain size of nifedipine was suggested for solid dispersion with higher PHEA content.

はじめに

難溶性医薬品と水溶性高分子を固体分散体化することによって溶解性を改善する試みが多数の医薬品において行われている。昨年の本討論会において難溶性の医薬品のモデルとしてニフェジピンを用い、PVP やポリアスパラギン誘導体(Poly(hydroxyethyl- α,β -aspartamide)、PHEA)などの水溶性高分子との固体分散体における分散状態を緩和時間の平均化を指標として検討した結果、PVP や HPMC との固体分散体では $T_{1\rho}$ の平均化が起こり、数 nm レベルで均一に分散しているのに対し、ニフェジピンと PHEA の固体分散体では $T_{1\rho}$ の平均化が起こらず、数 nm ~ 数十 nm の大きさをもつドメイン構造を有することが明らかになった。本研究においては Goldman-Shen のパルスシーケンス(Fig. 1)を用いてニフェジピンと PHEA の固体分散体の分散状態をさらに検討した。

実験

ニフェジピンと PHEA との固体分散体は、結晶ニフェジピンと PHEA をジメチルホルムアミドに溶解し(重量比 3:7 および 2:8)、約 80°C で減圧乾燥して調製した。固体分散体の ^1H の T_1 はスピン拡散によって平均化されたが、 $T_{1\rho}$ は平均化されず、ニフェジピンは数 nm から数十 nm のサイズドメイン構造をとっていることが示唆された。Fig. 1 に示すパルスシーケンスを用いて、プロトンのスピン拡散測定を行った。

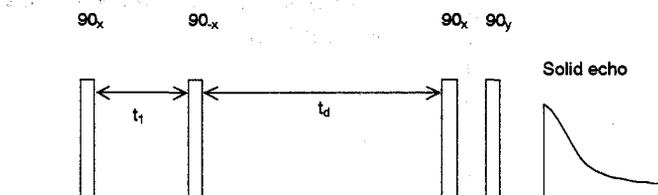


Fig. 1 Pulse sequence for ^1H spin diffusion measurements.

キーワード：スピン拡散、緩和時間、固体分散体

あそゆきお、よしおかすみえ、こじましげお

結果および考察

非晶質ニフェジピンのソリッドエコーシグナルはガウス型の緩和成分のみが観測されるのに対し、PHEA ではガウス型の緩和成分とローレンツ型の緩和成分が観測された。Fig. 1 における t_1 の値をガウス型の成分が消失する時間 $20\mu\text{s}$ に設定し、 t_d の値を変化させながらソリッドエコーの測定を行った。重量比 3:7 の固体分散体について得られた FID の測定例を Fig. 2 に示す。 t_d が $10\mu\text{s}$ の時に比べ $50\mu\text{s}$ の時はガウス型の緩和を示すプロトンの比率が上昇しており、この時間の中にスピンの拡散が起きていることがわかる。ガウス型の緩和を示すプロトンの比率 P_{gauss} と t_d の値と関係を Fig. 3 に示す。重量比 3:7 の固体分散体においては約 $40\mu\text{s}$ 以上で P_{gauss} 値がプラトーに達した。それに対し、重量比が 2:8 の固体分散体においては 30 から $35\mu\text{s}$ 以上で P_{gauss} 値が一定になった。従って、ニフェジピンのドメインサイズがニフェジピンと PHEA の混合比によって異なることを示唆するものと考えられる。しかしながら、プラトーに達する時間の差は小さく、他の混合比の固体分散体での検討が必要と考えられる。また、プラトーにおける P_{gauss} の値は通常のソリッドエコーで測定される P_{gauss} の値よりも小さく、より長い t_d の領域で測定が必要であると思われる。さらに、 ^{13}C -CP/MAS NMR によって、PHEA からニフェジピンへ磁化の移動を確認する必要がある。

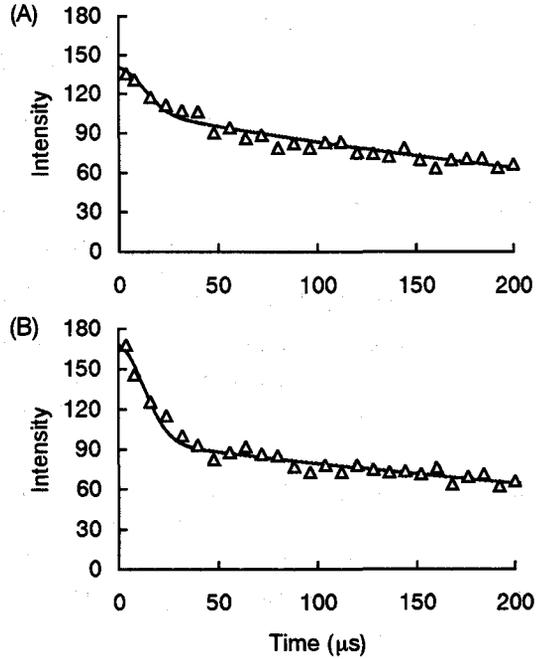


Fig. 2 Solid echo signals for nifedipine solid dispersion.
 t_a : $10\mu\text{s}$ (A), $50\mu\text{s}$ (B)

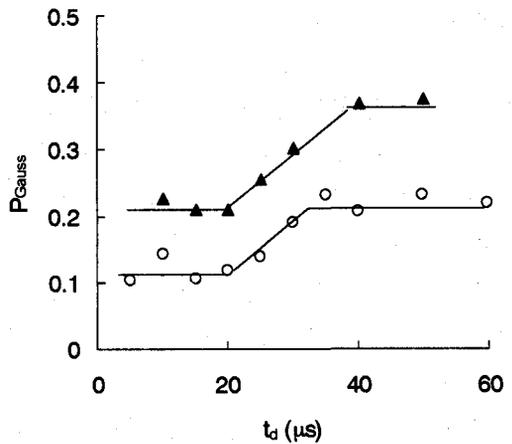


Fig. 3 Proton signal which exhibits Gaussian decay as a function of t_d for nifedipine solid dispersion.
Nifedipin:PHEA: 3:7 (▲), 2:8 (○)

Investigation of Molecular mobility of Guest molecule in Syndiotactic Polystyrene complex
by means of Solid-State ^2H NMR Spectroscopy

Yusuke Yamamoto, Masahiro Kishi, Hiroaki Yoshimizu, Yoshiharu Tsujita

*Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology,
Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8555, Japan*

Tel & Fax: +81-52-735-5272, E-mail: yosimizu@mse.nitech.ac.jp

Syndiotactic polystyrene (sPS) forms clathrate compound (complex) with many solvents. The molecular mobility of C_6D_6 as a guest, have been investigated by ^2H NMR spectroscopy. The frequency separations ($\Delta\nu=62\text{-}68\text{MHz}$) and asymmetry parameters ($\eta=0.04$) were constant from ^2H NMR spectra in the range of temperature from 297K to 153K. in the sPS-complex, whereas in the atactic-PS they were gradually changing. Assuming to the out-of-plane motions of C_6D_6 in the sPS complex, within a cone of half angle was estimated to be 32-35 deg. using the value of $\Delta\nu$ in the sPS- C_6D_6 system. Moreover, the activation energy of this motion was calculated from the slope in Arrhenius plots. The obtained activation energy, 3.8 kJ/mol., in the sPS- C_6D_6 system was almost same to that value, 3.0kJ/mol., in the aPS- C_6D_6 system. It could be concluded that C_6D_6 in the sPS complex was more stable as well as that in the aPS.

【目的】 シンジオタクチックポリスチレン (sPS) は種々の有機低分子とコンプレックスを形成する。これまでゲスト分子に芳香族炭化水素を用いたコンプレックスの形成速度や熱安定性、その含有量等のコンプレックス形成能について検討してきた。 ^{13}C NMR 測定より sPS 及びゲスト分子の置換着の分子運動評価よりコンプレックスの熱安定性の違いについて説明できた。しかし ^{13}C NMR 測定では sPS 側鎖にベンゼン環とゲスト分子ベンゼン環との区別が困難であった。本研究では、sPS コンプレックス中のゲスト分子に ^2H NMR スペクトルからの分子運動解析が比較的容易な重水素化ベンゼンを用い、アタクチックポリスチレン中の重水素化ベンゼンの分子運動と比較検討した。

【実験】 sPS ベレット(出光石油化学(株)より供与 ; $M_w=200,000$, $M_w/M_n=2.00$)を C_6D_6 の沸点以上で溶解し、急冷して sPS コンプレックスを得た(sPS- C_6D_6)。また、余分な溶媒は真空乾燥して除去した。 C_6D_6 を含むアタクチックポリスチレン(aPS- C_6D_6)についても溶媒濃度を同程度に調製した。 ^2H NMR 測定は Varian 社製 Unity 400Plus NMR 分光計及び重水素固体プローブを用い、Solid Spin Echo 法をよってスペクトルを得た。測定温度は $25^\circ\text{C}\sim 120^\circ\text{C}$ で行った。

【結果と考察】 sPS- C_6D_6 の 2H NMR スペクトルは対称性のよい pake ピークを示した(Fig.1)。Pake ピークの分裂幅は温度の減少と共に僅かに増加したが、非対称性パラメータ(η)は約 0.04 とほぼ変化しなかった。これらの事から C_6D_6 の回転運動の回転軸に対し C-D 結合が角度(θ)で歳差運動している model を仮定し、解析した。各温度における角度(θ)は、 C_6D_6 の回転軸に対して 32-35° 揺らいている model で描く事ができた。また緩和時間(T_1)から得た相関時間(τ_c)を arrhenius plot した結果、この運動は約 3.8kJ/mol の活性化エネルギーを持つものであった。比較としてコンプレックスを形成しない aPS- C_6D_6 では、得られたスペクトルは温度の減少と共に single ピークから pake ピークへと変化した(Fig.2)。また η も 0.26~0.04 へと減少したため分子運動が温度によって変化している事が分かった。また、aPS- C_6D_6 の Pake ピークが観察された温度範囲での活性化エネルギーは約 3.0kJ/mol と sPS- C_6D_6 系とほぼ同じであった。以上より、sPS コンプレックス中の C_6D_6 は広い温度範囲で sPS キャビティー内で束縛された運動を行っているが、aPS に溶解した C_6D_6 と同程度の活性化エネルギーで運動していた。本研究の一部は (財) 科学技術交流財団及び文部科学省科学研究費補助金(特定領域(B)(2),13133202)の補助を受けて行われた。

Syndiotactic Polystyrene / Molecular Cavity /
Molecular Mobility / complex

やまもと ゆうすけ、きし まさひろ、よし
みず ひろあき、つじた よしはる

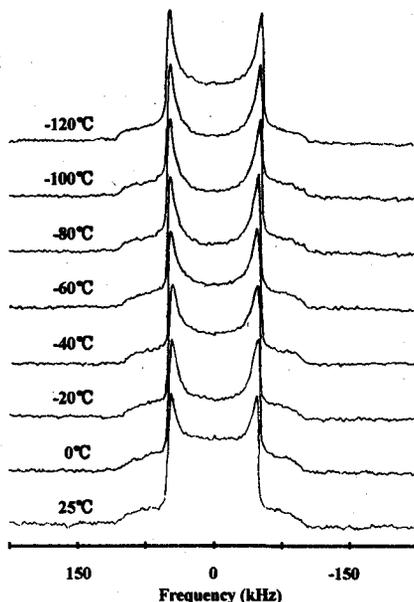


Fig. 1 2H NMR spectra of C_6D_6 at various temperatures in the sPS- C_6D_6 system.

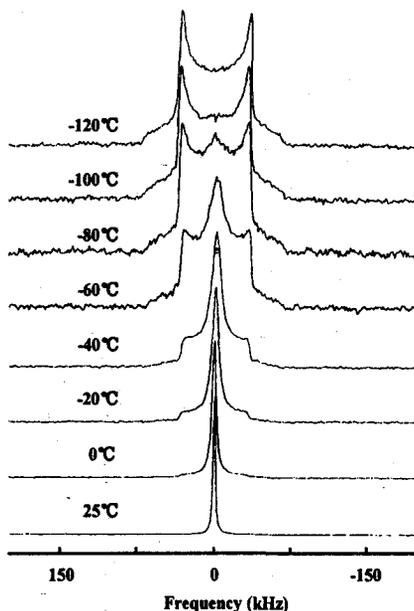


Fig. 2 2H NMR spectra of C_6D_6 at various temperatures in the aPS- C_6D_6 system.

P 103 単結晶 $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ における分子運動と変調構造の ^2H NMR に及ぼす効果

(物材機構¹、金沢大理²) ○飯島隆広¹、水野元博²

Effect of Molecular Dynamics and Modulated Structure on ^2H NMR Studied in Single Crystal $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$

Takahiro Iijima¹ and Motohiro Mizuno²

¹National Institute for Materials Science (NIMS)

²Department of Chemistry, Kanazawa University

We developed the simulation-program which interprets the ^2H NMR spectra in the presence of the molecular motion and the modulated structure. The ^2H NMR spectra measured in the incommensurate phase of $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ were simulated by using this program. We explained for the first time the line-narrowing effect of the rotational modulation on the ^2H NMR spectra in the motional narrowing region.

《語言》

固体 ^2H NMR スペクトルは、その線形が分子運動のモードや速さに敏感であるため、これまで固体物質中の分子運動の研究に広く用いられてきた。一方、NMR スペクトルは結晶の変調構造にも敏感であり、“edge singularities”という特徴的な線形を示す [1]。そのため固体 NMR は不規則性結晶の研究にも有効である。しかし、これまで分子運動と変調構造を有する系に対して NMR の研究は行われていない。これらが組み合わさった系についての研究には、 ^2H NMR スペクトルのシミュレーションに多くの場合用いられている Spiess ら [2] や Vold ら [3] による汎用プログラムは対応していない。そこで本研究では、分子運動と変調構造を同時に考慮したシミュレーション・プログラムを作成し、これらが ^2H NMR スペクトルの線形に及ぼす効果を調べることを試みた。本プログラムは単結晶 $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ の不整合相の ^2H NMR スペクトルで検証した。この結晶には5つの安定相が知られており、高温から順に I, II, ..., V 相とすると II 相が不整合相である [4]。II 相では $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの C_3 軸方向の振動変調および回転変調の存在が報告されており、このうち ^2H NMR スペクトルに主に寄与するのは後者であることが分かっている。

《理論》

分子運動と変調構造が存在する場合の ^2H NMR スペクトルの定式化を示す。 ^2H NMR のサイト周波数 ω_i は2次の Wigner 回転行列 $D_{nm}^{(2)*}(\Omega)$ を用いて以下で表される [3]。

^2H NMR、分子運動、変調構造、数値シミュレーション

いじまたかひろ、みずのもとひろ

$$\omega_i = \sqrt{\frac{3}{2}} \sum_{n,m=-2}^2 D_{0n}^{(2)*}(\psi, \theta, \phi) D_{nm}^{(2)*}(\alpha, \beta, \gamma) T_m^{(2)}, \quad (1)$$

$$T_0^{(2)} = \sqrt{\frac{3}{8}} \frac{e^2 Qq}{\hbar}, \quad T_{\pm 2}^{(2)} = \frac{\eta e^2 Qq}{4 \hbar}. \quad (2)$$

ここで (α, β, γ) 及び (ψ, θ, ϕ) はそれぞれ EFG テンソルの主軸系と分子軸系及び分子軸系と実験室系を結ぶ Euler 角を表す。 $(e^2 Qq/\hbar, \eta)$ は核四極相互作用パラメータを表す。回転変調が分子軸系の z 軸方向に存在する場合、この変調は以下で与えられる。

$$\alpha = \alpha_0 + \Delta\alpha \cos \zeta(z). \quad (3)$$

ここで α_0 は α の初期位相を表す。 $\Delta\alpha$ と $\zeta(z)$ はそれぞれ回転変調の振幅と位相である。 z は変調軸方向の座標である。 $\zeta(z)$ は次の sine-Gordon 方程式の解と仮定できる [1]。

$$\frac{d^2 \zeta}{dz^2} = \chi^2 \sin(p\zeta). \quad (4)$$

ここで χ^{-1} と p はそれぞれソリトン幅と normal 相に対する commensurate 相の単位格子の比を表す。 $\zeta(z)$ が z の線形関数であるとき、変調波は平面波で表される。四極子エコー信号 $G(t, z)$ はサイト占有率を表すベクトル \mathbf{P} を用いて以下で与えられる。

$$G(t, z) = \mathbf{P} \cdot \exp[\hat{\mathbf{A}}(z)t] \exp(\hat{\mathbf{A}}(z)\tau) \exp(\hat{\mathbf{A}}^*(z)\tau) \cdot \mathbf{1}. \quad (5)$$

ここで $\mathbf{1}$ は各要素が 1 のベクトルである。 N サイト間を全て等しい速度 k でジャンプするモデルでは、行列 $\hat{\mathbf{A}}(z)$ の ij 成分 $A_{ij}(z)$ は以下となる。

$$A_{ij}(z) = \begin{cases} i\omega_i + (1-N)k & \text{for } i=j, \\ k & \text{for } i \neq j. \end{cases} \quad (6)$$

単結晶試料についての信号 $G(t)$ はソリトン間距離 z_0 を用いて以下で表される。

$$G(t) = \int_0^{pz_0} G(t, z) dz. \quad (7)$$

スペクトルは (7) を Fourier 変換することにより得られる。

《実験》

分子運動と変調構造を考慮した ^2H NMR スペクトルのシミュレーション・プログラムは上式 (1)-(7) により作成した。 $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ 結晶の ^2H NMR スペクトルは CMX-300 分光器を用い、共鳴周波数 45.823 MHz、四極子エコー法 ($90_x^\circ - \tau - 90_y^\circ - \tau - \text{acq}$) で測定した。II 相での空間群は $P\bar{3}$ であり、 C_3 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(a) に II 相の 338 K での二つの結晶配向の ^2H NMR 実測スペクトル ($I_{\text{obs}}(\nu)$) を示す。 θ_y は結晶の Y 軸まわりの回転角で、結晶 Z 軸と静磁場とのなす角である。この温度で

は、水分子の二つの ^2H のEFGテンソルは H_2O の速い 180° フリップにより完全に平均化されており、また $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ には反転対称が存在するため、 ^2H の非等価なEFGテンソルは三つである。さらに、この三つのEFGテンソルは $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ の C_3 軸まわりの再配向運動により平均化されている。従って、Fig. 1(a)のスペクトルは一つの四極子分裂による二つのピークから成っている。スペクトルのシミュレーションは、分子運動が $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの C_3 軸まわりの3サイト・ジャンプ、変調構造が $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの C_3 軸方向の回転変調として、上述の理論を用いて行った。シミュレーションに用いたEFGテンソルは、IV相での ^2H NMR四極子分裂の角度変化の結果[4]から見積もられたテンソルであり、 H_2O の速い 180° フリップにより平均化されているが $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ の C_3 軸まわりの再配向運動による平均化は受けていない。Figs. 1(b)と1(c)の実線はそれぞれ変調構造の寄与を入れた場合と入れない場合のシミュレーション・スペクトル($I_{\text{cal}}(\nu)$)である。スペクトルは変調波の非線形性にほとんど依存しなかったため、変調波は平面波とした。従って、スペクトルのシミュレーション・パラメータは再配向運動の速さ k と変調の振幅 $\Delta\alpha$ となった。Figs. 1(b)と1(c)の波線は実測と理論のスペクトルの差($\Delta I(\nu) = |I_{\text{obs}}(\nu) - I_{\text{cal}}(\nu)|$)を表す。 $\Delta I(\nu)$ の積分値($S = \int \Delta I(\nu) d\nu$)をFigs. 1(b)と1(c)の図中に示す。 $\theta_Y = 90^\circ$ ($C_3 \perp B_0$)では、 S は変調構造にほぼ独立なため k を正確に決定できた。一方、 $\theta_Y = 135^\circ$ では S は変調構造に敏感であったため、 $\theta_Y = 90^\circ$ で見積もった k を用いて $\Delta\alpha$ を決定することができた。このようにして、338 Kでは $k = 7.7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 、 $\Delta\alpha = 23^\circ$ と見積もられた。

我々の結果の興味深い点は次の2点であろう。(i) 変調構造は θ_Y が 90° でなく 135° のスペクトルに寄与している。(ii) $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ の回転変調のスペクトルへの影響は“edge singularities”を生ずることだけでなく線幅の先鋭化である。この2点は分子運動と変調構造の寄与を同時に考慮することで説明できる。すなわち、回転変調に伴う異なった $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ の配向の信号は(7)により加えられるが、それぞれの信号に対応するスペクトルの強度や線幅は $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ の再配向運動のために異なる；その結果、全体のスペクトルはより先鋭化されたスペクトルに支配され得る。 $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ の再配向運動が各角度 $\alpha - \alpha_0$ のスペクトルに及ぼす効果は、運動の速度に対する ^2H

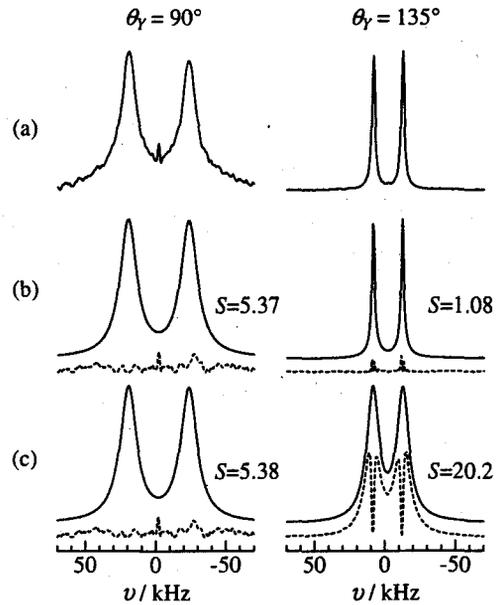


Fig. 1: ^2H NMR spectra of $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ at θ_Y of 90° and 135° . (a) shows the observed spectra at 338 K. The solid lines in (b) and (c) show the simulated spectra with $k = 7.7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$. (b) takes account of the modulated structure ($\Delta\alpha = 23^\circ$) but (c) does not ($\Delta\alpha = 0^\circ$). All the spectra are normalized. The broken lines in (b) and (c) show the differences between observed and calculated spectra. The integrated differences of the spectra (S) are also shown in (b) and (c).

NMR のサイト周波数の差により決定される。Fig. 2(i) に (1) と (2) から計算した $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ の三つの非等価な水分子に対する ^2H NMR サイト周波数 ($\nu_i = \omega_i/2\pi$) の角 $\alpha - \alpha_0$ 依存性を示す。簡単のため、quadrupole doublet のうちの一成分に対応する ^2H NMR 周波数だけを表示している。Figs. 2(ii) と 2(iii) にそれぞれ三つのサイト間の周波数差 ($|\Delta\nu_{ij}| = |\nu_i - \nu_j|$) 及び平均周波数差 ($|\overline{\Delta\nu}| = \frac{1}{3} \sum_{i>j} |\Delta\nu_{ij}|$) の角 $\alpha - \alpha_0$ 依存性を示す。Fig. 2(iii) より、 $\theta_Y = 90^\circ$ では $|\overline{\Delta\nu}|$ は角 $\alpha - \alpha_0$ によらず約 70-80 kHz の一定値であることがわかる。 $k = 7.7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ の運動速度においては $k/|\overline{\Delta\nu}|$ ($= k/2\pi|\overline{\Delta\nu}|$) はこの結晶配向では約 1.6 と計算された。一方、 $\theta_Y = 135^\circ$ では $|\overline{\Delta\nu}|$ は角 $\alpha - \alpha_0$ に敏感で約 20-90 kHz の値となった。これは $k/|\overline{\Delta\nu}|$ では約 6.1-1.4 に対応する。 $k/|\overline{\Delta\nu}|$ がこの程度の値の時、スペクトルは“motional narrowing”の領域に属するため [5]、 $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ イオンの C_3 まわりの再配向運動による EFG テンソルの平均化により、四極子分裂はただ一つ現れることになる。また、スペクトルの強度は $k/|\overline{\Delta\nu}|$ が大きくなるほど上がる。従って、変調構造に起因する異なる $\alpha - \alpha_0$ からの信号の足し合わせによるスペクトルの変化は、 θ_Y が 90° でなく 135° に表れることになる。さらに、より小さな $\alpha - \alpha_0$ のスペクトルが全体のスペクトルを支配するため、変調構造の $\theta_Y = 135^\circ$ のスペクトルへの寄与は“edge singularities”ではなくスペクトルの先鋭化として現れる。

《参考文献》

- [1] R. Blinc, *Phys. Rep.* **79**, 331 (1981).
- [2] V. Macho, L. Brombacher, and H. W. Spiess, *Appl. Magn. Reson.* **20**, 405 (2001).
- [3] M. S. Greenfield, A. D. Ronemus, R. L. Vold, R. R. Vold, P. D. Ellis, and T. E. Raidy, *J. Magn. Reson.* **72**, 89 (1987).
- [4] T. Iijima, M. Mizuno, M. Suhara, and K. Endo, *Z. Naturforsch.*, in press.
- [5] P. W. Anderson, *J. Phys. Soc. Japan* **9**, 316 (1954).

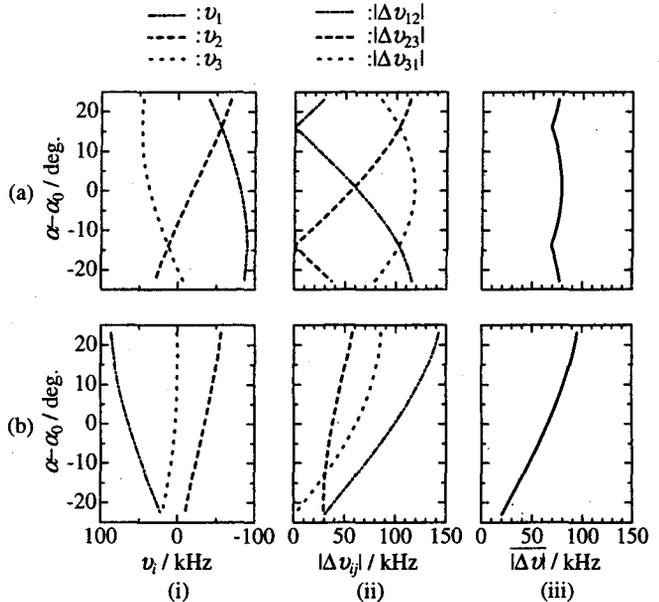


Fig. 2: Dependence of the angle $\alpha - \alpha_0$ on (i) the site-frequency of ^2H NMR for three unequal water molecules in $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, (ii) the frequency-difference of ^2H NMR between three sites, and (iii) the averaged frequency-difference of ^2H NMR in $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$. The rows (a) and (b) show the dependences at θ_Y of 90° and 135° , respectively. The ^2H NMR frequencies for one component of the quadrupole doublet calculated by (1) and (2) are shown in the column (i).

固体 NMR 法による無機-有機分子ハイブリッド材料の
 溶媒含有結晶状態における構造と分子運動の解析
 京大化研 ○日下 康成・増田 憲二・梶 弘典・堀井 文敬

Solid State NMR Analysis of the Structure and Dynamics for Inorganic-Organic
 Molecular Composite Materials in Solvent-Containing Crystal States.

Institute for Chemical Research, Kyoto University

Yasunari Kusaka, Kenji Masuda, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii

Octaantimonate $[(n\text{-C}_4\text{H}_9)_4\text{N}]_4[\text{Sb}_8\text{O}_{12}(\text{OH})_{20}]$ reacts with *tert*-butyldimethylsilanol ($t\text{-C}_4\text{H}_9$)(CH_3) $_2\text{SiOH}$ to yield $[(n\text{-C}_4\text{H}_9)_4\text{N}]_2[\text{Sb}_4\text{O}_6(\text{OH})_4\{\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(t\text{-C}_4\text{H}_9)\}_6]$. The structure and molecular dynamics of this anion, especially of substituted siloxy groups, in the solvent-containing crystals have been characterized by CP/MAS ^{13}C and ^{29}Si NMR spectroscopy. This inorganic-organic molecular composite material has 6 bulky siloxy groups and these siloxy groups are divided into two kinds of sites, two siloxy groups bonded to the Sb atoms by 1:1 [site 1] and another by 1:2 [site 2]. $T_{1\rho}$ measurements have revealed the existence of these sites in anion, but split of the resonance line of the siloxy groups shows that the two siloxy groups at site 2 should be located under different circumstances. ^{29}Si spectra measured at different contact times have suggested that the CH_3 groups of the siloxy groups at site 1 rotate faster than those at site 2. ^1H NMR spectra have also indicated that the siloxy groups are greatly inhibited in rotation around the O-Si bonds even in CD_3CN solution.

[緒言] アンチモン原子 8 個と 32 個の酸素原子から成る三次元かご型アニオンであるオクタアンチモン酸 (Fig. 1) の TBA^+ 塩 $\{\text{TBA}^+ = (n\text{-C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+\}$ 、 $\text{TBA}_4[\text{Sb}_8\text{O}_{12}(\text{OH})_{20}]$ が 1995 年にポリアンチモン酸の初めての単離例として報告された。¹⁾ 著者らはこのオクタアンチモン酸と $(t\text{-C}_4\text{H}_9)(\text{CH}_3)_2\text{SiOH}$ との縮合反応により、

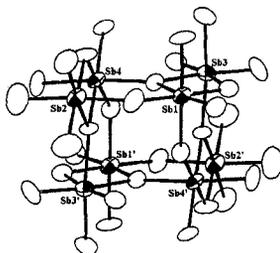


Figure 1. The structure of $[\text{Sb}_8\text{O}_{12}(\text{OH})_{20}]^{4-}$ anion. Ellipsoids are drawn to encompass 50 % of the electron density. As indicated in the formula, all 20 terminal oxygen atoms are protonated.

オクタアンチモン酸塩からの初めての誘導体 $\text{TBA}_2[\text{Sb}_4\text{O}_6(\text{OH})_4\{\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(t\text{-C}_4\text{H}_9)\}_6]$ ($\text{TBA}_2(\text{Si}_6\text{Sb}_4)$) の合成、単離に成功し、すでにその構造 (Fig. 2) を解明した。²⁾

このアニオンは嵩高い 6 個のシリル基を放射状にもち、全体として球状にシリル基が伸びている。結晶中でこれらのシリル基はアニオンの両側に一つずつポケットのような空孔を形成することが分っており、このポケットが CH_2Cl_2 分子のような小分子を選択的に内包すること、またそのポケットの内部にある水酸基と水素結合させる機能をもつことを見出した。本研究ではこれらを背景として、アニオン部分の構造、特にシリル基の分子運動の解析を、 CH_3CN を含んだ $\text{TBA}_2(\text{Si}_6\text{Sb}_4)$ 結晶試料について CP/MAS ^{13}C 、 ^{29}Si NMR、および溶液 NMR 法により行った。

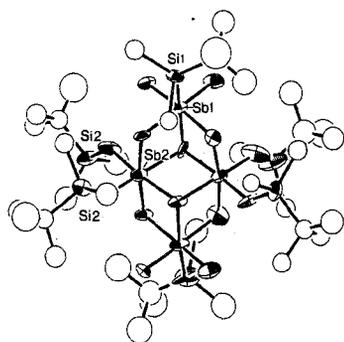


Figure 2. The structure of $[\text{Sb}_4\text{O}_6(\text{OH})_4\{\text{OSi}(\text{CH}_3)_2(t\text{-C}_4\text{H}_9)\}_6]^{2-}$ anion.

Antimony, inorganic-organic composites, polyoxometalate, CP/MAS NMR, nanocomposites

くさかやすなり・ますだけんじ・かじひろのり・ほりいふみたか

[実験] CH_3CN を含有した $\text{TBA}_2(\text{Si}_6\text{Sb}_4)$ 結晶を N_2 雰囲気下で、新たに作成した外径 5.7 mm のダイフロン製密閉試料管中に充填し、7 mm MAS ローターに挿入して固体 NMR 測定を行った。固体 NMR 測定は Chemagnetics CMX400 分光計により 9.7 T の静磁場下で行った。測定前後の試料の重量変化から測定中の溶媒減少がないことを確認した。

[結果と考察] Fig. 3 には、 $\text{TBA}_2(\text{Si}_6\text{Sb}_4)$ の CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを示す。すべての炭素の各共鳴線はそれぞれ 3、4 本に分裂しており、これは結晶中における複数のサイトの存在を反映している。図ではアニオン中の炭素原子の共鳴線を拡大して示している。アニオン中の 6 つの silyl 基は大きく分けて、Sb1 原子と 1:1 で結合している silyl 基 1(Si1)と、Sb2 原子と 1:2 で結合している silyl 基 2(Si2)に区別できる(Fig.2 参照)。しかし、NMR 共鳴線の分裂は 3 種のサイトの存在を示唆しており(Fig.3)、これは結晶中のカチオン、溶媒などの分子間相互作用により silyl 基 2(Si2)がさらに 2 種類に分けられると考えられる。また、CPT1 法による ^{13}C スピン - 格子緩和時間($T_{1\rho}$)測定では、3 本の *tert*-Bu 基の CH_3 基の共鳴線の内、高磁場側の 2 本の共鳴線はほぼ同じ $T_{1\rho}$ を示し、低磁場側の 1 本がそれよりも長い $T_{1\rho}$ を示した。これより silyl 基 1(Si1)の *tert*-Bu 基が silyl 基 2(Si2)のものよりも速い運動をしていると考えられる。さらに ^{29}Si NMR 共鳴線強度の CP 接触時間依存性の測定からも、silyl 基 1(Si1)の Si1 に直接結合した CH_3 基の分子運動性は silyl 基 2(Si2)のそれより高いことがわかった。以上のように結晶格子を形成している溶媒を含有した状態での結晶の解析が可能になったことにより、NMR による結晶格子中の溶媒に関する研究も期待でき、今後、ジクロロメタンなどをアニオン中に内包した試料についての解析も検討している。

CD_3CN 中で測定した溶液の ^1H NMR スペクトル(Fig. 4)には Si に直接結合した CH_3 基のプロトンの共鳴線が 3 本に分裂して現れる。silyl 基 2(Si2)の O-Si 結合のまわりの回転が起こっていると考えた場合二つの Si2 原子に結合している CH_3 プロトンは等価になるはずである。実際には doublet となっていることから、溶液中において立体障害のために silyl 基 2(Si2)の O-Si 結合まわりの回転が束縛されていると考えられる。このことは ^{29}Si NMR, ^1H NOESY スペクトルからも支持された。

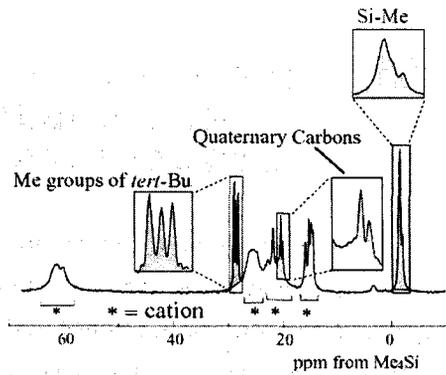


Figure 3. CP/MAS spectra of $\text{TBA}_2(\text{Si}_6\text{Sb}_4)$

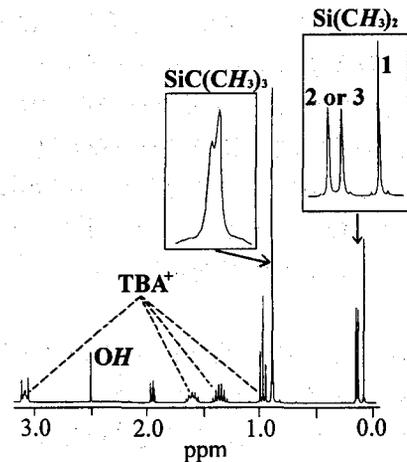


Figure 4. ^1H NMR spectra of $\text{TBA}_2(\text{Si}_6\text{Sb}_4)$ in CD_3CN .

¹⁾ H. Nakano, Y. Ozawa, and A. Yagasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12007.

²⁾ Y. Kusaka, Y. Ozawa, and A. Yagasaki, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2634.

P 105 TMPC/PS ポリマーブレンド系の

相溶化に伴う体積変化の ^{129}Xe NMR による解析

名古屋工業大学工学部 ○村上隆史、鈴木智幸、吉水広明、辻田義治

The analysis on a contraction in volume of exchange for TMPC/PS miscible polymer blend system by using ^{129}Xe NMR Spectroscopy

Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology
Takafumi Murakami, Tomoyuki Suzuki, Hiroaki Yoshimizu, Yoshiharu Tsujita

In this study, to clarify the contraction in volume TMPC/PS polymer blend system which is one of the miscible polymer blends, the specific volumes, Xe sorption isotherms, and ^{129}Xe NMR Spectra were measured. The specific volumes of blend samples showed a contraction in volume compared with that expected from a single additive rule. The result of Xe sorption measurement, since the sorption isotherms of all samples obeyed the dual-mode sorption model, the Langmuir saturation constant, C_H' which is corresponding to the sum of microvoids, was calculated by applying the model. The calculated values of C_H' for the blend samples were smaller than those expected from a single additive rule. From the analysis of ^{129}Xe NMR chemical shift, the average volume of microvoids in blend samples was contracted by miscible blending. These results revealed that the contraction in volume of TMPC/PS polymer blend by miscible blending is caused by the decrease of the sum of microvoids derived from the contraction in volume of each microvoid.

(緒言) ^{129}Xe 核は、数気圧程度でも比較的良好な NMR スペクトルが観測でき、また大きな分極率を有するため、Xe 核をプローブとしてポリマー試料に吸着させ、その ^{129}Xe NMR シグナルよりポリマー試料の様々な情報を得られる。 ^{129}Xe NMR 化学シフト値は高分子系では一般的に $\delta = \delta(\text{S}) + \delta(\text{Xe})$ で表される。ここで $\delta(\text{S})$ は Xe 原子と空孔内壁との相互作用による項であり、 $\delta(\text{Xe})$ は Xe 原子同士の相互作用による項である。本研究では、TMPC(テトラメチルポリカーボネート)/PS(ポリスチレン)ポリマーブレンドの相溶化による体積変化について、 ^{129}Xe NMR 測定及び Xe 吸着測定の両面から評価を行った。

(実験) サンプルにはブレンド比(重量比)が TMPC/PS=0/100, 20/80, 50/50, 80/20, 100/0 に調製したものをを用いた。各ブレンドサンプルが相溶しているのを DSC 測定より確認した。各サンプルの密度(25°C)は、浮沈法で決定した。Xe 吸着測定は、CAHN 社製

TMPC、PS、相溶性、ポリマーブレンド、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値、マイクロボイド

むらかみたかふみ、すずきともゆき、よしみずひろあき、つじたよしはる

精密電子天秤を用い、重量法により圧力範囲 0~760cmHg、測定温度 25°Cで行った。 ^{129}Xe NMR 測定は、NMR 管に約 1g 充填した後十分に真空乾燥を行った後、所定圧力 (0~760cmHg) の Xe を導入し、収着平衡に達するまで少なくとも 24 時間放置し、日本電子社製 GX400NMR 分光計を用い、観測周波数 110.5MHz にてシングルパルス法により測定した。また、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値は同時に観測される気相 ^{129}Xe のピークを内部基準として補正した。

(結果と考察) 密度測定の結果、ブレンドサンプルの比容は加成性から予想される値より小さくなったので、相溶化に伴う体積収縮が確認された。また Xe 収着測定の結果、いずれのサンプルもガラス状高分子に特有な二元収着型の収着等温曲線が得られたのでこれらに二元収着モデルを適用して解析した。マイクロボイドの総量を示すパラメーターである Langmuir 飽和定数 C_H' 値は、体積加成性から予想される値よりも小さくなっていましたので、相溶化によるマイクロボイド総量の減少が確認された。各サンプルに種々の圧力で Xe を収着させて ^{129}Xe NMR 測定を行い、得られた ^{129}Xe NMR 化学シフト値を Xe 収着量に対してプロットした結果、いずれのサンプルも収着量の増加に伴い非線形的に低磁場シフトした。これは導かれた結論、即ちガラス状高分子における Xe 収着サイト(Henry サイトと Langmuir サイト)の存在に起因する。しかし、実際に得られた ^{129}Xe NMR スペクトルは対称性の良い単一のピークを示しているので、両サイト間での Xe 原子の交換が速いと仮定して、実測の NMR 化学シフト値から各サイトの化学シフト値を見積もった。またゼオライト系化合物における ^{129}Xe NMR 化学シフト値($\delta(S)$)と空孔サイズの相関関係を適用し、Langmuir サイトにおける $\delta(S)_H$ 値からマイクロボイドの平均サイズを算出した。さらにその値をもとに一個のマイクロボイドの平均体積を算出した結果、相溶化による平均体積の収縮が確認された。(Figure 1) 以上より、相溶化による体積収縮はマイクロボイドの体積収縮の結果として、マイクロボイドの総量が減少したためと結論できた。

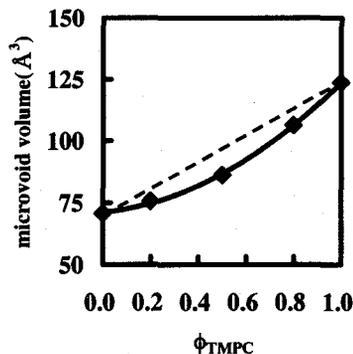


Figure 1 The plot of microvoid vlume vs. volume fraction of TMPC in blend.

P 106 固体 NMR によるメリチンの動的膜結合構造解析

(横浜国大院・工)

○虎谷 秀一、西村 勝之、内藤 晶

Dynamic Structure of Melittin Bound to Lecithin Vesicles Studied by Solid-state NMR

(Faculty of Engineering, Yokohama National University)

Shuichi Toraya, Katsuyuki Nishimura, and Akira Naito

Melittin is the principal constituent of the venom of a honeybee, *Apis mellifera*, and an amphiphilic 26-residue peptide. In this study, dynamic structure of melittin bound to membranes was analyzed by solid-state ^{31}P and ^{13}C NMR studies with alteration of acyl chain length of lecithin to understand the mechanism of membrane fusion and disruption induced by melittin. Consequently, it was found that melittin laterally diffuses in the membrane with rotation about an axis that is parallel to the bilayer normal under the condition where membrane fusion occurs. It was also found that the angles between the helical rods of melittin and the axis of rotation depend on the length of the acyl chain.

【序論】

メリチンはミツバチ毒の主成分であり、一次構造を GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂ とする 26 アミノ酸残基から成る両親媒性ペプチドである。メリチンは生体膜の構造を破壊する性質をもち、また、レシチンから成る膜小胞の融合および分断を誘起することが知られている。これまで様々な手法によりその動的な膜との相互作用機構を明らかにする試みがなされてきたが、従来の手法は上述の活性を示さない条件下におけるメリチンの膜結合構造を知ることに限られていた。本研究では、メリチンの膜融合・分断を誘起する機構に対する詳細な知見を得るためリン脂質のアシル鎖の長さを変化させ、その変化が膜融合条件下におけるメリチンの動的膜結合構造にどのような影響を及ぼすかを固体 NMR により明らかにする試みを行った。

【実験】

カルボニル炭素を部位特異的に ^{13}C 標識したメリチンを固相法により化学的に合成して HPLC により精製した。ペプチド対レシチンのモル比が 1:10 になるように量り取った全量 50 mg のメリチンと 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (12:0/12:0-phosphatidylcholine; DLPC) または 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0/16:0-phosphatidylcholine; DPPC) を 300 μl のトリス緩衝液 (20 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane, 100 mM NaCl, pH 7.5) で水和した。 ^{31}P および ^{13}C NMR 測定は、Chemagnetics CMX infinity-400 NMR 分光器を用いて、 ^1H 高出力デカップリング条

キーワード：動的膜結合構造、固体 NMR、自発磁場配向膜、膜融合・分断、膜厚依存性

とらやしゅういち、にしむら かつゆき、ないとう あきら

件下で行った。また、上述の試料を膜融合・分断平衡点よりも十分高い温度で一時間放置し、膜分断が起こらない状態から急速に凍結させた後に凍結乾燥して粉末試料を得た。粉末試料の ^{13}C NMR スペクトルの測定は、回転周波数を 2 kHz とした CP-MAS 法を用いて 0 °C で行った。得られたサイドバンドパターンと計算によるシミュレーションパターンを照合させることで各標識カルボニル炭素の ^{13}C 化学シフトテンソルの主値を決定した。

【結果と考察】

メリチンが結合した DLPC および DPPC 巨大膜小胞は、それぞれ膜融合が誘起される条件である 30 °C と 50 °C において静磁場に対し膜面を平行にして配向することが ^{31}P NMR スペクトルの温度変化からわかった。これらの系を用いてメリチンの動的膜結合構造を固体 ^{13}C NMR により調べた結果を表 1 と表 2 にまとめた。等方化学シフト値からメリチンは α -ヘリックス構造をとり、配向条件下の化学シフト値 δ_{obs} が 100 Hz の MAS 条件下で得られた軸対称粉末線形の δ_1 と一致したことからメリチンの回転軸は膜面に対し垂直であることがわかった。さらに、C 末端および N 末端のヘリックスロッドに存在するアミノ酸残基のカルボニル炭素の ^{13}C 化学シフト異方性 $\Delta\delta$ は、一残基ずれると符号が反転するほど大きな変化を示した。したがって、メリチンは膜法線に対して平行な軸のまわりを回転するように膜中で二次元的に拡散しており、ヘリックス軸は膜法線から一定の角度傾いた状態を保っていることが明らかになった。同じ残基のカルボニル炭素における $\Delta\delta$ は、アシル鎖の長さによって異なる値を示した。この結果は、脂質のアシル鎖の長さに応じて回転軸とヘリックス軸が成す角度が変化することを示している。発表では、メリチンの動的膜結合構造を求める新しい手法に重点を置いて研究成果を報告する。

TABLE 1 ^{13}C chemical shift values of melittin bound to magnetically oriented DLPC vesicles at 30 °C

	δ_{iso} / ppm ‡	STRUCTURE ‡	δ_{obs} / ppm	$\Delta\delta$ / ppm †	δ_1 / ppm *	δ_2 / ppm *	δ_3 / ppm *	δ_{iso} / ppm **
[1- ^{13}C]Ala ⁴	177.9	α -helix	169.6	24.9	247.5	189.5	93.5	177.3
[1- ^{13}C]Val ⁵	175.1	α -helix	177.0	-5.7	248.0	193.0	85.5	175.5
[1- ^{13}C]Leu ¹⁶	175.8	α -helix	175.4	1.2	245.0	193.0	89.5	175.9
[1- ^{13}C]Ile ²⁰	174.7	α -helix	170.9	11.4	243.5	192.5	90.0	175.5

TABLE 2 ^{13}C chemical shift values of melittin bound to magnetically oriented DPPC vesicles at 50 °C

	δ_{iso} / ppm ‡	STRUCTURE ‡	δ_{obs} / ppm	$\Delta\delta$ / ppm †	δ_1 / ppm *	δ_2 / ppm *	δ_3 / ppm *	δ_{iso} / ppm **
[1- ^{13}C]Ala ⁴	177.3	α -helix	167.7	28.8	242.5	193.5	94.5	176.7
[1- ^{13}C]Val ⁵	175.1	α -helix	179.1	-12.0	244.5	192.5	89.0	175.2
[1- ^{13}C]Leu ¹⁶	175.8	α -helix	178.5	-8.1	245.0	193.0	89.5	175.9
[1- ^{13}C]Ile ²⁰	174.8	α -helix	172.6	6.6	244.5	192.5	89.0	175.2

*Obtained from CP-MAS measurements of the lyophilized powder systems at 0 °C.

$$^{\dagger}\Delta\delta = 3(\delta_{\text{iso}} - \delta_1)$$

‡Typical ^{13}C chemical shift values of (δ_{iso} of α -helix, δ_{iso} of β -sheet) are (176.4, 171.8), (174.9, 171.8), (175.7, 170.5), and (174.9, 172.7) for [1- ^{13}C]Ala, [1- ^{13}C]Val, [1- ^{13}C]Leu, and [1- ^{13}C]Ile, respectively (Saito and Ando, 1989. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* 21: 209-290).

Analysis of Dynamics in Liquid Crystalline Polymers by the Two-Dimensional Solid-State ^{13}C MAT Method

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011

Miwa Murakami, Hiroyuki Ishida, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii

^{13}C chemical shift anisotropies (CSA) were measured at room temperature for thermotropic liquid crystalline polyurethane, polyether, and polyester with similar mesogen and spacer units by the two-dimensional solid-state ^{13}C magic angle turning (2D MAT) method and molecular motion of their mesogen groups was characterized in detail. The CSA spectra of the polyester in the supercooled liquid crystalline state suggest that the phenylene groups undergo rapid fluctuation with rather large amplitudes around their bond axes. In contrast, no apparent narrowing for the CSA spectra from the rigid powder line shapes was observed for the phenylene carbons in the polyurethane and polyether samples, indicating no occurrence of the 180° flip motion even in the noncrystalline components. CSA spectra will be separately examined for the very short T_{1c} components included in these samples.

[緒言]

これまでに、同一のメソゲンとスペーサーユニットをもつ、主鎖型サーモトロピック液晶性ポリウレタン (UDMB-10; Fig.1a) およびポリエーテル (EDMB-10; Fig.1b) について、メルトからネマチック液晶相を経て結晶化させた試料の固体NMR解析を行ってきた^{1,2)}。また、スメクチック液晶相を示す類似の構造を持つ液晶性ポリエステル (BB-8; Fig.1c) の解析も行った³⁾。本研究では、水素結合の有無が液晶相形成並びにそれらの構造にどのように反映されるかを明らかにすることおよびネマチック液晶とスメクチック液晶の比較を目的として、 ^{13}C 化学シフトの異方性(CSA)を二次元 Magic Angle Turning (2D MAT)^{4,5)}法により測定し、各試料のメソゲン部分のダイナミクスを検討した。

[実験]

EDMB-10,UDMB-10 および BB-8 は、それぞれメルトから徐冷することにより液晶相を経て、結晶化させた。固体 ^{13}C NMR 測定は、Chemagnetics CMX400 分光計により行った。MAT 法における試料の回転速度は EDMB-10 および BB-8 で $130(\pm 2)\text{Hz}$ 、UDMB-10 で $127(\pm 2)\text{Hz}$ である。

[結果および考察]

Fig.2 に BB-8 の室温における 2D MAT スペクトルを示す。 ω_1 軸には CP/MAS スペクトルとほぼ同等の分解能を持つ projection が得られており、 ω_2 軸では重なり合っている各炭素の CSA が良好に分離していることが分かる。UDMB-10, EDMB-10, BB-8 の全てのメソゲン炭素には、 T_{1c} の異なる少なくとも 2 成分が観測され、結晶および過冷却液晶成分でメソゲンの運動性が異なることが明らかになっている。2D MAT 法を用いて得られる ^{13}C 化学シフトの異方性 (CSA) スペクトルは、これら複数成分の CSA の重ね合わせになると考えられる。BB-8 の C2 (CH 炭素) および C4 (4 級炭素) について、どの成分も剛直状態にあると仮定して計算し

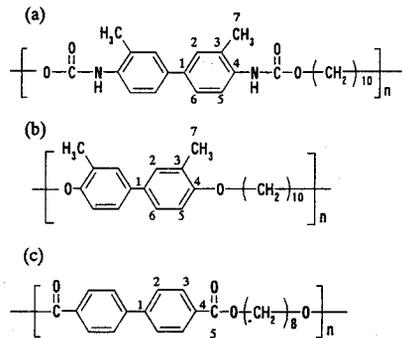


Fig. 1 (a) UDMB-10, (b) EDMB-10, (c) BB-8

Keyword: 液晶性高分子、ダイナミクス、二次元固体 NMR、MAT 法

むらかみみわ、いしだひろゆき、かじひろのり、ほりいふみたか

たスペクトルと実測のスペクトルを比較すると、特に C2 炭素では計算と実測スペクトルに違いが見られた。 T_{1c} 実験で得られた成分比を考慮した差スペクトル (Fig.3b) と MAS を行わないで 90° パルス法により T_{1c} の短い成分を選択的に測定した結果 (Fig.3c) との比較から、過冷却液晶成分ではフェニレン環は結合軸周りの振幅数十度以内の揺動運動を行っていることが示唆された。

一方、EDMB10 の C5 (CH 炭素)、C4 (4 級炭素) では、Fig.4 に示すように剛直状態の計算スペクトル (破線) と実測スペクトル (実線) は比較的良好に一致した。各炭素で観測された T_{1c} の異なる 2 成分は、 T_{1c} を規定する 10^8 Hz 程度の速い運動性に違いがある成分と考えられる。得られた CSA スペクトルが、いわゆる剛直状態の形状と良く一致することより、メソゲンの運動はフェニレン環の結合軸回りの揺動運動であり、 π フリップのような運動は起こっていないと考えられる。ただし、 T_{1c} の短い成分 (過冷却液晶成分) が MAT では観測されていないことも考えられる。このため、EDMB10 および UDMB10 について、 T_{1c} の短い成分の選択的な CSA 測定を行い、検討する予定である。

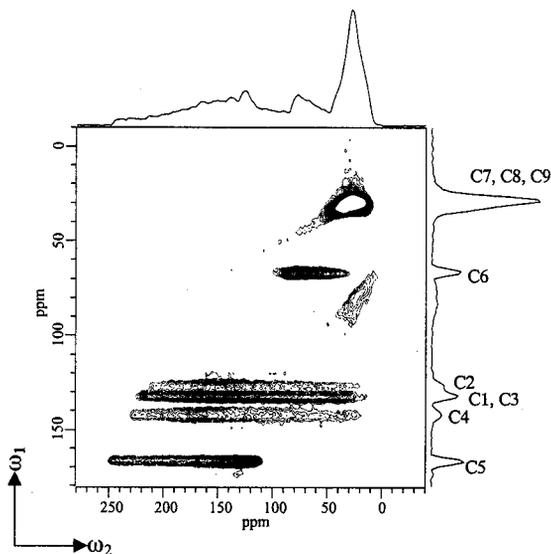


Fig. 2 2D ^{13}C MAT spectrum of BB-8. The sky projections are also shown for both dimensions.

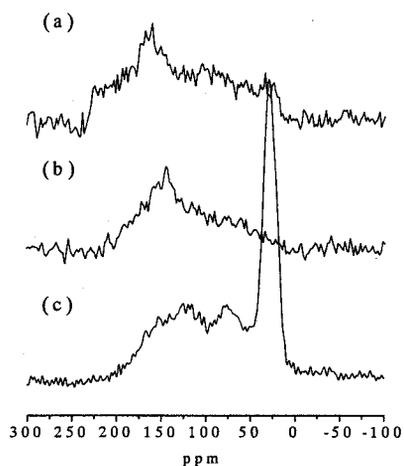


Fig. 3 Difference CSA spectra of C4 (a) and C2 (b) carbons for BB-8 obtained by subtracting a calculated rigid pattern from experimental one. Spectrum c was obtained by using the saturation-recovery pulse sequence with a recovery time of 2s without MAS.

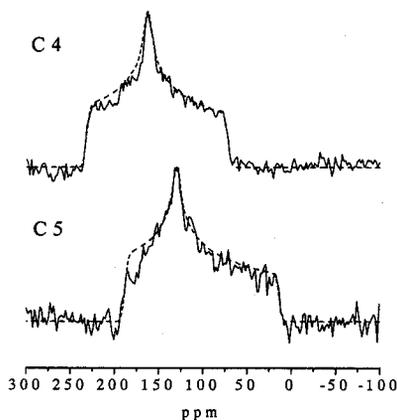


Fig. 4 ^{13}C CSA spectra of C4 and C5 carbons for EDMB-10 obtained by 2D MAT experiments (solid lines) and calculated rigid patterns (dotted lines).

- 1) Ishida, H.; Kaji, H.; Horii, F. *Macromolecules* **1997**, *30*, 5799.
- 2) Ishida, H.; Horii, F. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7751.
- 3) Murakami, M.; Ishida, H.; Kaji, H.; Horii, F., in preparation.
- 4) Gan, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8307.
- 5) Hu, J. Z. *et al.*, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **1994**, *3*, 181.

京大化研 ○小野山吾郎・梶 弘典・堀井文敬

Local Structure Change of Poly(acrylonitrile) during the Heat-Treatment Process

Goro Onoyama, Hironori Kaji, and Fumitaka Horii

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, JAPAN

The structure change of atactic poly(acrylonitrile) (aPAN) fibers during the heat-treatment process in the temperature range from 150 to 300 °C was investigated using one- and two-dimensional solid-state NMR methods. By the heat-treatment at 250 °C, the C≡N carbon signal disappears and new several aromatic signals appear in the CP/MAS spectrum, indicating that the cyclization reaction occurs. With increasing reaction temperature, the intensities of aromatic signals increase and those of aliphatic signals decrease, showing the development of aromatization. From the isotropic chemical shift and the principal values of chemical shift anisotropy (CSA) obtained from CP/MAS and two-dimensional ¹³C magic angle turning (MAT) experiments, we propose a model of aPAN reacted at 250 – 300 °C in the air (see Fig. 6).

1. 緒言

高分子を高温で熱分解-再結合してつくれる炭素系材料、いわゆる「パイロポリマー」は、その高い導電性や優れた力学特性・耐熱性・耐薬品性のため古くから研究が行われてきた。しかし、その化学的構造が複雑であるために、物性発現に対する詳細な検討が困難であった。一方、最近、高分子の高温熱処理により、カーボンナノチューブ(CNT)を作製できることが報告されており、CNTの安価な量産技術として注目を集めている。このことは、パイロポリマーにおいてプレカーサーである高分子の組成、モルフォロジー、熱処理条件(雰囲気・温度・時間)等を制御することにより、様々な新しい材料開発が可能であることを示唆している。

アタクチックポリアクリロニトリル(aPAN)の熱処理によって得られた材料は、パイロポリマーの代表的なものである。その熱処理による構造変化の一つのモデルを Fig.1 に示したが、実際にこのような構造変化が起こっているのか実験的に明らかにされておらず、様々なモデル¹が提案されている。今後、種々の高機能性材料を開発するためには、熱処理過程における構造変化を詳

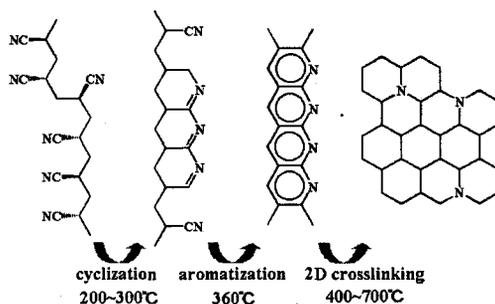


Fig. 1. A model of aPAN heat-treated under N₂ gas by Thünemann and Ruland.^{1a}

キーワード： 熱処理 ポリアクリロニトリル 局所構造解析 二次元 MAT 法

おのやま ごろう、かじ ひろのり、ほりい ふみたか

細に検討することが必要である。しかし、これらの材料は溶媒に溶けないため、通常の有機材料のように溶液 NMR を用いることができず、また、非晶性であるため X 線回折によっても解析が困難である。このような背景に基づき、本研究では、一次元および二次元固体 ^{13}C NMR 法により、aPAN の熱処理過程における構造変化について検討した。

2. 実験

aPAN を、加温できるプレス機を用いて空气中で様々な温度 (150~300°C) で圧力 (30MPa) をかけながら約 1 時間かけて熱処理し、試料を調製した。これらの試料に対して、 ^{13}C CP/MAS 測定、CP/MAS/dipolar dephasing 測定および二次元 magic angle turning (2D MAT) 測定を行った。測定は Chemagnetics CMX-400 分光計により 9.4 T の静磁場下、室温で行った。

3. 結果と考察

Fig. 2 に aPAN の構造を示す。Fig. 3 に、各温度において 1 時間熱処理した aPAN の CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルを示す。シグナル強度は C2/C3 共鳴線で規格化してある。ピーク C1 は、250°C で急激に減少しており、ほぼ全てのニトリル基が反応したことが分かる。ピーク C2/C3 は、300°C までに約半分に減少するとともに、C4~C9 炭素共鳴線は増加している。したがって、C2/C3 は脱水素反応により芳香族化したか、あるいは酸化されたと考えられる。

熱処理により新しく生じた C4~C9 炭素の帰属を明らかにすることを目的として、以下の測定を行った。

dipolar dephasing 測定および CP/MAS 測定で CP 接触時間を 40 μs とした測定により、C2~C4, C7 炭素は直接水素と結合しており、C5, C6, C8, C9 炭素は水素と直接結合していないことが分かった。また、ピーク C4 は、その等方化学シフトからピーク C3 の炭素が酸化された炭素に由来すると思われる。

さらに、ピーク C5~C9 の詳細な帰属を行うために 2D ^{13}C MAT の測定を行った。Fig. 4 に、

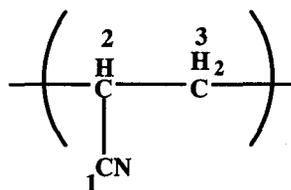


Fig. 2. The structure of PAN.

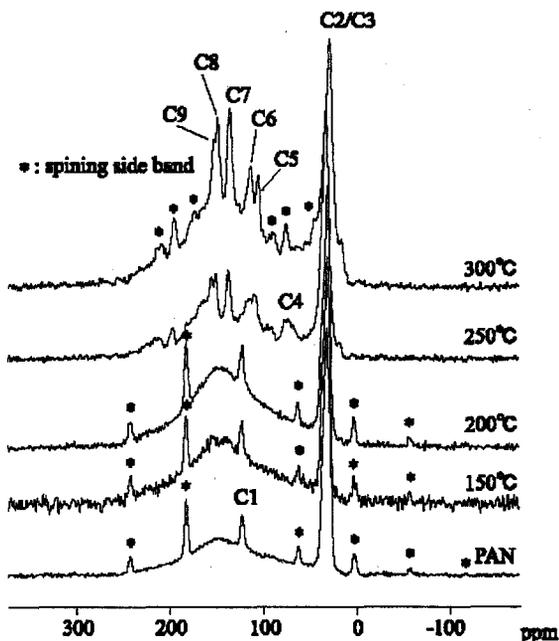


Fig. 3. CP/MAS ^{13}C NMR spectra of aPAN heat-treated at different temperatures.

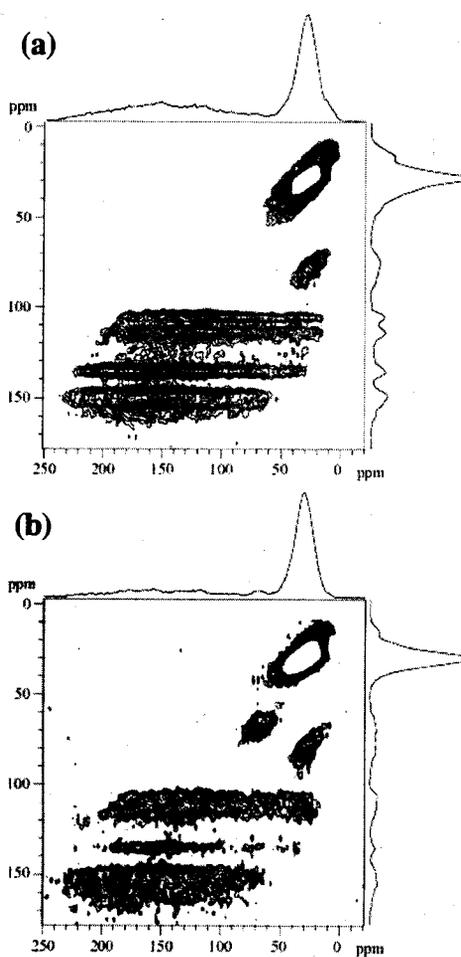


Fig. 4. 2D ^{13}C MAT NMR spectra of aPAN heat-treated at (a) 300°C and (b) 250°C.

The sky projections are also shown for both dimensions

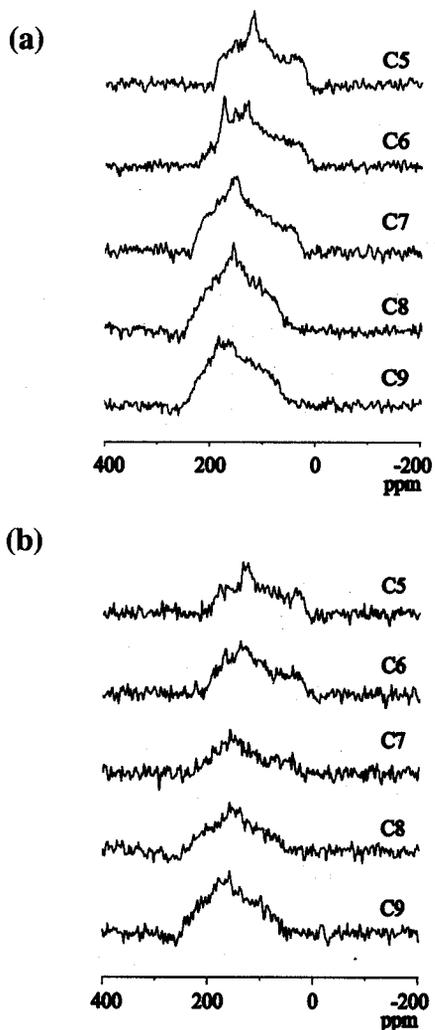


Fig. 5. ^{13}C CSA spectra of aPAN heat-treated at (a) 300°C and (b) 250°C obtained by 2D MAT spectra in Fig. 4.

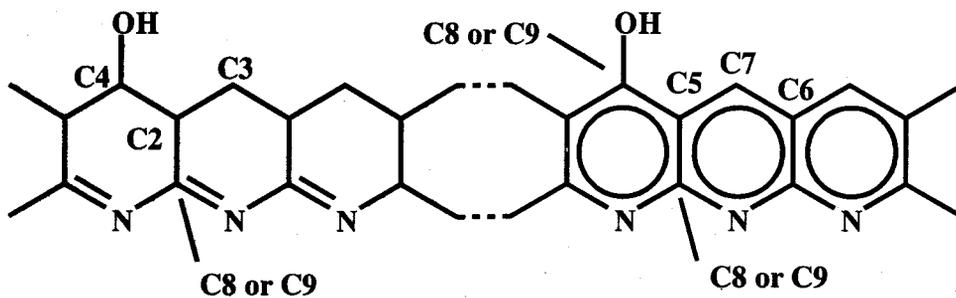


Fig. 6. Our proposed model of aPAN heat-treated at 250 – 300°C in the air.

250℃および300℃で1時間熱処理した aPAN の 2D ^{13}C MAT スペクトルをその sky projection とともに示す。Fig. 5 には、Fig. 4 のスライスより得られる各炭素の CSA スペクトルを示す。得られた CSA の主値 ($\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}$) および等方化学シフト σ_{iso} を過去のデータ²と比較することにより考えられる、250~300℃で熱処理した aPAN の構造モデルを Fig. 6 に示す。

250~300℃で熱処理した aPAN は、Fig. 6 で示すようにニトリル基の反応による環構造と、この環構造から脱水素あるいは脱水反応が起こった芳香族構造の二種類の構造からなっていると考えられる。さらに 250℃から 300℃へ熱処理温度が上昇するにつれて、C5~C9 共鳴線の強度が増大するとともに、ゆるやかに高磁場シフトすること、さらには水酸基の付加した C4 炭素の減少から、芳香族化が進んでいることが分かる。一方、グラファイト構造の場合は、その構造対称性から軸対称の CSA 形状をとる。しかし、Fig. 5 にはそれに対応する軸対称 CSA^{2b} がみられないことから 300℃までの熱処理では二次元的なグラファイト構造にはなっておらず、一次的に構造が発達していることが分かる。

C4 共鳴線は、現在 -CH(OH)- によるものと考えている。しかし、-OCH₂- や -C(OH)- の炭素もほぼ同じ σ_{iso} を示すため、これらの可能性も否定できない。これらの炭素種の CSA は明確に異なっているため、したがって CSA の比較から明確な帰属が可能である。今回の 2D MAT 測定では、C4 炭素の CSA が artifact と重なってしまったが、今後 artifact-free な測定によりその帰属を行う予定である。また 200~250℃における測定および不活性ガス中での熱処理を行うことにより、芳香族炭素、特に C8, C9 炭素の帰属を明確にしていく予定である。これらの試料に対し、さらに ^{13}C - ^1H HETCOR 測定、relaxation-induced dipolar exchange with recoupling (RIDER) 法³ による ^{14}N に結合した ^{13}C の選択的観測等も行うことにより、さらに詳細な解析を試みていく。

謝辞 試料の aPAN を頂きました日本エクスラン(株) 渡辺氏に深く感謝いたします。

文献

- (1) (a) A. F. Thünemann and W. Ruland, *Macromolecules* **2000**, *33*, 2626. (b) M. K. Jain et al., *J. Mater. Sci.* **1987**, *22*, 278. (c) Z. Bashir et al., *Carbon* **1991**, *29*, 1081.
- (2) (a) 産業技術総合研究所 研究情報公開データベース http://www.aist.go.jp/aist_j/database/database.html. (b) T. M. Duncan, *A Compilation of Chemical Shift Anisotropies*, The Farragut Press: Chicago, **1990**. (c) J. C. Facelli et al., *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 8268. (d) J. C. Facelli et al., *Nature* **1993**, *365*, 325. (e) J. Z. Hu et al., *Solid State NMR* **1997**, *126*, 120. (f) W. Wang et al., *Solid State NMR* **1995**, *5*, 257. (g) R. J. Ilulicci et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4880. (h) J. C. Facelli et al., *J. Phys. Chem.* **2000**, *104*, 149.
- (3) (a) K. Saalwächter, K. Schmidt-Rohr, *J. Magn. Reson.* **2000**, *145*, 161. (b) 梶弘典、堀井文敬、Klaus Schmidt-Rohr、第40回 NMR 討論会講演要旨集、p. 128 (2001).

放線菌由来 ϵ -poly-L-Lysine およびその誘導体の
 ^{13}C および ^{15}N 固体高分解能 NMR による分子構造解析

福井大工¹, 金沢大工²

前田史郎¹, 〇森貴志¹, 佐々木千鶴², 国本浩喜²

Molecular Structural Analysis of Microbial ϵ -poly-L-Lysine by using ^{13}C and ^{15}N solid-state high-resolution NMR.

¹Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering, Fukui University, Fukui, 910-8507, Japan

²Department of Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kanazawa University, Kanazawa, 920-1154, Japan

Shiro Maeda¹, Takashi Mori¹, Sasaki Chizuru² and Ko-ki Kunimoto²

Molecular structure of ϵ -poly-L-Lysine (EPL) produced by a variant of *Streptomyces albulus* and its derivatives, of which side chain α -amino group of EPL were grafted with several azo dyes, were characterized by means of high-resolution solid state ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopies. ^{13}C , ^{15}N spectra and relaxation time measurements showed, (1) the α -amino groups of EPL hydrochloric acid salt are protonated and the conformation of EPL/HCl differs from EPL, (2) there are two kinds of grafting with azo dyes, a covalent bond and ion complex.

[はじめに] 必須アミノ酸の1つである L-Lysine が ϵ -位でアミド結合している ϵ -poly-L-Lysine(EPL, Fig1)は、生分解性・抗菌性を有しており、すでに食品保存料などとして実用化されている。EPLには反応性の高い側鎖 α -アミノ基があり、さまざまな分子をグラフトさせて誘導体を作成することで、新規の機能性材料としての利用が期待できる。そこで、種々のアゾ色素を化学修飾させた誘導体を作成し、固体状態での EPL と誘導体の構造を解析することを目的とし、 ^{13}C および ^{15}N スペクトルと各種緩和時間測定を行った。

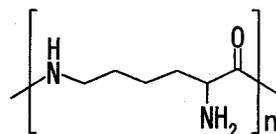


Fig.1 ϵ -poly-L-Lysine

[実験] 試料は EPL と、その塩酸塩(EPL/HCl), EPL 誘導体として側鎖 α -アミノ基を t-butoxycarbonyl(EPL-BOC), Methyl Orange(EPL/MO), そして Dabsyl Chloride(EPL/DC)で化学修飾したものを使用した。EPL の重合度は 32 である。

固体高分解能 ^{13}C および ^{15}N NMR 測定は、Chemagnetics CMX Infinity 300 を用いて 75.56MHz と 30.45MHz で測定した。 ^{13}C 化学シフトは、ヘキサメチルベンゼンのメチル炭素を TMS から 17.35ppm, ^{15}N 化学シフトはグリシンを $\text{NH}_3(\text{liq.})$ から 32.50ppm とした。 ^1H の T_1 測定は saturation recovery 法を, ^{13}C と ^{15}N の T_1 測定は Torchia の TICP パルス系列を使用した。

固体 ^{13}C NMR・固体 ^{15}N NMR・ ϵ -ポリリジン・生分解性高分子・depolarization

まえだ しろ, もり たかし, ささき ちづる, くにもと こうき

[結果と考察] EPL と EPL/HCl の ^{13}C および ^{15}N スペクトルを Fig.2, Fig.3 に示す¹⁾. ^{13}C スペクトルの脂肪族部分のシグナルが両者で異なり, EPL が塩酸塩となることにより C=O 炭素が高磁場シフトした. これは, EPL の直鎖構造が崩れ, 結晶構造が変化したと考えられる²⁾. $T_1\rho$ 測定結果は, それぞれの試料に結晶相と非晶相の 2 成分があること, EPL と EPL/HCl の間で結晶化度の違いがあることを示した. EPL と EPL/HCl の側鎖 α -アミノ基の ^{15}N 化学シフトはそれぞれ 26.5ppm と 44ppm であった. 塩酸塩では側鎖 α -アミノ基がプロトン化していると考えられる. $T_1\rho$ 測定結果は, $T_1\rho$ と同様の結果を示し 2 つの試料の間に結晶化度の違いがあることを示した.

EPL 誘導体の ^{15}N スペクトルを Fig.4 に示す. BOC は側鎖 α -アミノ基に共有結合しており, EPL-BOC の側鎖 α -アミド NH は 90ppm に現れた.

EPL/MO には主鎖 ϵ -アミド NH(115ppm)のほかに 2 つのシグナルが現れた. 低磁場側 60ppm は MO のジメチルアミノ基である. 高磁場側 34ppm のシグナルは, EPL と EPL/HCl の側鎖 α -アミノ基シグナルの中間にあり, キトサン複合体の場合³⁾と同様にイオンコンプレックスを形成していると思われる.

EPL/DC も同様に主鎖 ϵ -アミド NH(121ppm), DC のジメチルアミノ基 (62ppm) が現れた. さらに

102.5ppm と 35ppm 前後に幅広の小さなシグナルが現れた. 102.5ppm は EPL-BOC のように, 共有結合した側鎖 α -アミド NH と思われる. 35ppm 前後のシグナルは, DC の一部が反応中に MO になり, 側鎖 α -アミノ基が完全に共有結合ではなく, 部分的にイオンコンプレックスを形成していることが原因と考えられる.

[引用文献]

- 1) S.Maeda, T.Mori and Ko-Ki Kunimoto, *Polym.Prep., Jpn.*, 51, 1073(2002)
- 2) S.Maeda, Ko-Ki Kunimoto, C.Sasaki, N.Yoshida, J.Hiraki, A.Kuwae and K.Hanai, to be published.
- 3) 前田史郎・飯田貴之・中江一浩・山下伸一郎・大島孝友・桜井謙資, 第 40 回 NMR 討論会講演要旨集, 170(2001)

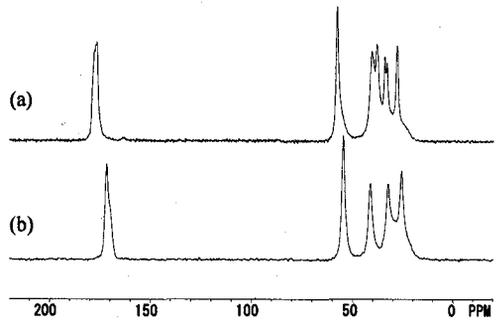


Fig.2 ^{13}C CP/MAS spectra (a)EPL, (b)EPL/HCl.

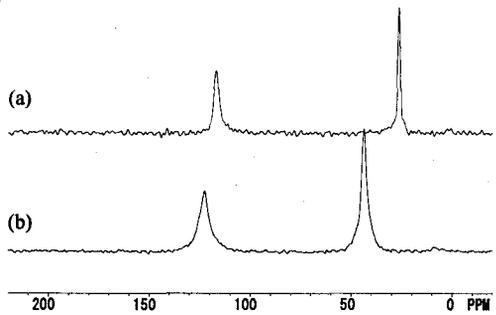


Fig.3 ^{15}N CP/MAS spectra (a)EPL, (b)EPL/HCl.

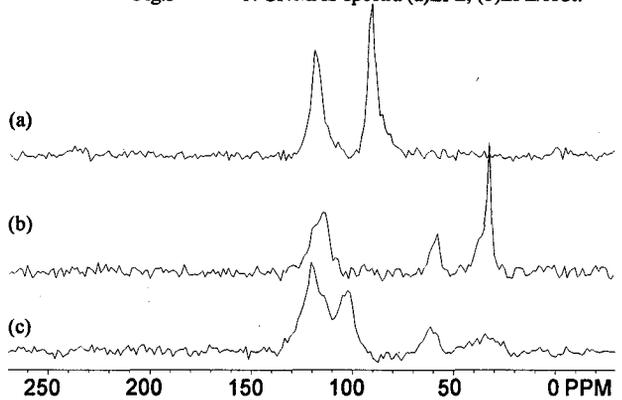


Fig.4 ^{15}N CP/MAS spectra (a)EPL-BOC, (b)EPL/MO, (c)EPL/DC

北大院工 ○鈴木淳司・尾張洋史・堤耀廣
奈良先端科技大院 荘司長三、千葉大工 中平隆幸

¹³C - NMR Investigations of Molecular Motion in Poly(L-glutamine)s Having Naphthyl Group in the Side Chain

¹Atsushi SUZUKI, ¹Hiroshi OWARI, ¹Akihiro TSUTSUMI, ²Osami SHOJI, and ³Takayuki NAKAHIRA

¹Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Hokkaido University,
² Nara Institute of Science and Technology
³Department of Materials Technology, Faculty of Engineering, Chiba University,

Poly(L-glutamine)s having a naphthyl group in the side chain are known to show some interesting photophysical properties. To investigate the molecular motion in such polymers, ¹³C-NMR relaxation times were measured as a function of temperature for poly(1-naphthylmethyl L- glutamine) and poly(1-naphthylethyl L- glutamine) in N,N-dimethylacetamide. It was found that the backbone undergoes the ellipsoidal rotational motion with a correlation time of 10⁻⁸s at 300K about the long axis. In the side chain the motion of naphthyl group was controlled by the anisotropic libration of the side chain peptide group. The correlation times of naphthyl group were shorter in the order PNMLG < P(S)NELG < P(R)NELG at 300K. These results were discussed in the relation to photophysical properties.

〔目的〕芳香族発色団を導入した高分子系で、特に主鎖が剛直で規則的な形態を持つ場合は、芳香族発色団が相互規則配向することにより、光および電子機能を発現できる可能性が高い。そのため、芳香族発色団の規則配向と光機能との関係が研究的となっている。

本研究では、アミド結合を介して芳香族発色団を側鎖に導入したポリ(1-ナフチルメチル-L-グルタミン)(PNMLG)ならびに側鎖に不斉をもつポリ[(1-ナフチル)エチル-L-グルタミン](P(S)NELG, P(R)NELG)

について、¹³C-NMR緩和測定から分子運動を調べ、光機能特性との関連について検討した。

キーワード：¹³C核磁気共鳴 緩和時間 ポリ(L-グルタミン) 光特性 相関時間

すずきあつし、おわりひろし、つつみあきひろ、しょうじおさみ、なかひらたかゆき

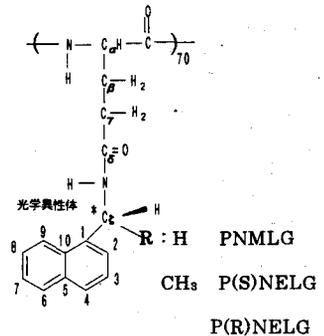


Fig.1 Structure of Poly(L-glutamine)s having Naphthyl Groups

〔実験〕ポリマー（重合度 70）濃度 5wt%の重水素化ジメチルアセトアミド溶液について、主鎖がヘリックス状態とランダムコイル状態での ^{13}C -NMR 緩和測定(T_1 , NOE)を共鳴周波数 75.48 および 100.5 MHz、温度 300~393K で行った。また、ヘリックス-ランダムコイル転移は TFA（三フッ化酢酸）を添加することで行った。

〔結果・考察〕磁気緩和の温度依存性から主鎖、および側鎖の分子運動解析を行った。PNMLG、P(S)NELG、P(R)NELG について次のような結果が得られた。

主鎖は長、短軸周りの回転相関時間の比が $P = \tau_{//} / \tau_{\perp} \sim 1/7$ の回転楕円体運動を行っている ($\tau_{//} = 10^{-8}\text{s}$, 300K)。この主鎖回転運動を考慮し側鎖の内部回転運動を解析した。Fig.2 に光特性を左右する側鎖ナフチル基の 75.4MHz におけるスピン-格子緩和時間 T_1 の温度依存性を示した。各々の試料で T_1 値はどの炭素でもほぼ同じ値を示したことから、ナフチル基の C_β - C_γ 軸 (Fig.1 参照) 周りの回転は制限されていることが分かる。更に、側鎖ペプチド平面が 4 残基ごとに水素結合しているとし、このペプチド平面が水素結合軸周りとそれに垂直な軸周りに高速の微小揺らぎをしているモデルを仮定すると T_1 の温度依存性を良く説明できた。300K において、その微小揺らぎの相関時間は PNMLG、P(S)NELG、P(R)NELG でそれぞれ $2.1 \times 10^{-10}\text{s}$ 、 $8.5 \times 10^{-10}\text{s}$ 、 $1.4 \times 10^{-9}\text{s}$ であった。即ち、3 つの試料におけるナフチル基の運動性は、PNMLG > P(S)NELG > P(R)NELG であることが NMR から導くことができた。Fig.3 は P(S)NELG 主鎖 C_α のケミカルシフトの TFA% 依存性を示したものである。実験結果から 5% 以上でヘリックス-ランダムコイル転移することが分かった。TFA15% を含む溶液についても同様の ^{13}C NMR 緩和測定を行いヘリックス状態との比較を試みた。

以上、NMR 緩和測定から得られた結果を基に、3 種類の試料における主鎖と側鎖の運動解析を詳細に報告する。

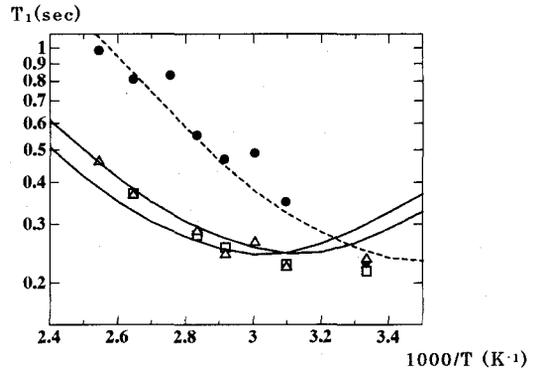


Fig.2 ^{13}C T_1 values for the naphthyl carbon of

●PNMLG, Δ P(S)NELG, \square P(R)NELG, 75.48 MHz

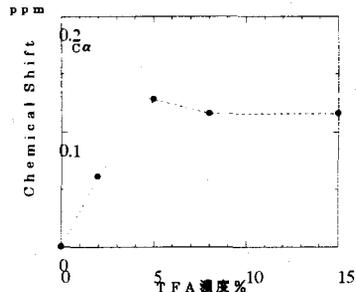


Fig.3 ^{13}C n.m.r. chemical shifts of P(S)NELG in

N,N-dimethylacetamide - TFA mixed solvents at 300K

A Study of Conformational Stability of Polypeptides by Solid State ^{13}C NMR. IV
Katsuyoshi Murata¹, Hiroyuki Kono², Shigeki Kuroki¹ and Isao Ando¹¹Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology
/ Research Center of Macromolecular Science, ²Bruker Bio Spin

Polypeptide blends such as poly(L-alanine)/poly(L-isoleucine) blends, poly(D-alanine)/poly(L-valine) blends and polyglycine/poly(L-valine) blends have been prepared by using the method developed by us. The structures of the polypeptide blends are elucidated by solid-state NMR experiments. It has been clarified that the hydrogen bonding plays an important role for the polypeptide blends.

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。ポリペプチドは、 $\text{C}\alpha$ 炭素周りの二面角 (ψ, ϕ) の回転により多種多様な構造をとることが期待されるが、安定な高次構造として、Helix や Sheet 構造をとることが知られている。高次構造を安定化させる要因としては、水素結合、分子内 S-S 結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用などがあるが、そのなかでも分子内及び分子間の C=O と H-N 間の水素結合が重要な働きをしていることが知られている。ホモポリペプチドやアミノ酸共重合体(含蛋白質)のコンフォメーションの分子鎖間に働く相互作用の研究は数多く行われてきた。しかし、2種類 of ホモポリペプチド同士を混合することによる異種ポリペプチド鎖間の相互作用やそれぞれの高次構造の安定性などについてはあまり研究されていない。本研究では、2種類のホモポリペプチドを混合した系内における各々の分子の高次構造の安定性、及び分子鎖間に働く相互作用について研究を行った。

実験

Poly (L-alanine) (PLA)、Poly (D-alanine) (PDA)、Poly (L-valine) (PLV)、Poly glycine(PG)、Poly(L-isoleucine)(PLIL) のポリペプチド使用し、このなか

Structure; Polypeptide; Polymer Blend; Solid State NMR; HETCOR; hydrogen bond.

むらたかつよし、こうのひろゆき、くろきしげき、あんどういさお

から2種類のポリペプチドを 0/100、20/80、50/50、80/20、100/0 の重量比でそれぞれ採取混合し、溶媒 (2wt%の H_2SO_4 を添加した Trifluoroacetic acid (TFA)) を加えて溶解後、アルカリ水溶液に添加して固化させ減圧乾燥して試料を得た。測定は Bruker 4 mm-double tuned MAS probe の装備されている Bruker DSX 300 NMR (75 MHz for ^{13}C and 300 MHz for 1H) を用いた。

結果と考察

調製した試料について ^{13}C CP/MAS NMR 測定を行った。その結果、PLA、PDA、PG などの Helix-type のポリペプチドの高次構造の一部が β -sheet に変化した。

これらの試料の高次構造の変化がそれぞれのポリペプチド分子間の相互作用にどのような変化を与えたかを確認するため High-speed frequency-switched Lee-Goldburg (FSLG) ^{13}C - 1H heteronuclear correlation (HETCOR) の実験を行った。その結果、 β -sheet に変化したポリペプチドと元々 β -sheet だったポリペプチドの間で水素結合を形成していることがわかった。また、我々は、以前に 1H $T1\rho$ 測定の結果から、それぞれの分子が約 3 nm のスケールで相溶していることを報告している。^{1,2} 今回の HETCOR の結果は、これまでの 1H $T1\rho$ の結果を支持している。当日、これらについて詳細な報告を行う。

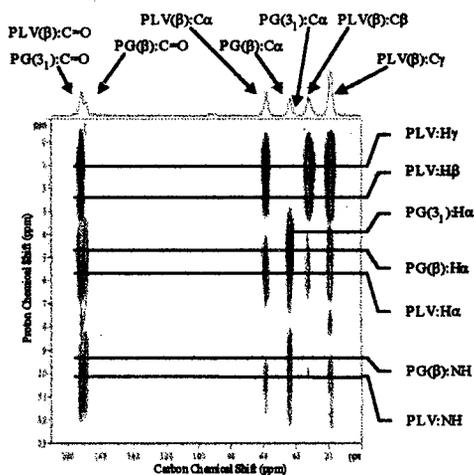


Fig. 1 ^{13}C - 1H HETCOR spectrum (mixing time: 1.5 ms) of PG/PLV(50/50) blend sample which were prepared by adding a TFA solutions of the polypeptides containing a 2.0 wt/wt % amount of H_2SO_4 to alkaline water.

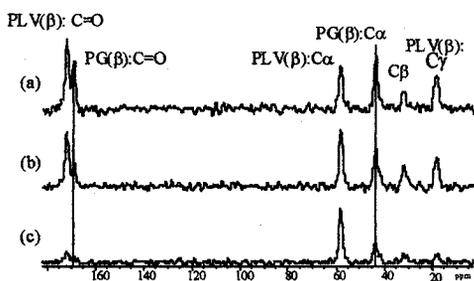


Fig. 2 One-dimensional slices along the horizontal axis of the HETCOR spectra taken at 55 ppm (PLV:Ho) on the 1H chemical shift axis. The spectra are mixing time by (a) 1.5, (b) 0.5 and (c) 0.2 ms, respectively.

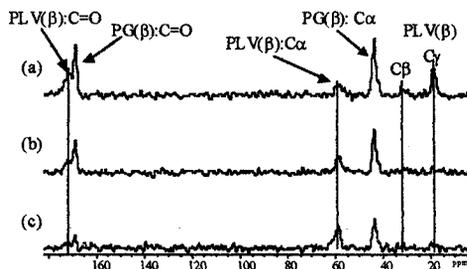


Fig. 3 One-dimensional slices along the horizontal axis of the HETCOR spectra taken at 45 ppm (PG(β):Hoα) on the 1H chemical shift axis. The spectra are mixing time by (a) 1.5, (b) 0.5 and (c) 0.2 ms, respectively.

1, Murata, K.; Kuroki, S.; Kimura, H.; Ando, I. *Biopolymers* 2002, 64, 26.

2, Murata, K.; Kuroki, S.; Ando, I. *Polymer*, in press.

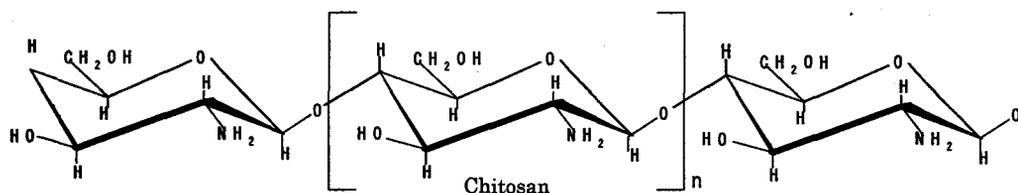
キトサンおよびキトサン-高分子複合体の
 固体高分解能NMRによる分子構造解析
 (福井大工) 前田史郎, ○山下伸一郎, 武藤勝紀, 櫻井謙資
 High-Resolution Solid-State NMR Study

on Chitosan and Chitosan/Polymer Complex
 Shiro Maeda, Shin-ichiro Yamashita, Katsunori Muto, Kensuke Sakurai
 Faculty of Engineering, Fukui University, 910-8507, Japan

The inter-polymer interactions of chitosan/(carboxymethyl cellulose) (CS/CMC) and chitosan/poly(acrylic acid) (CS/PAA) complex obtained from formic acid and hydrochloric acid aqueous solution were investigated by using ^{13}C high-resolution solid-state (CP/MAS) NMR. ^{13}C NMR spectra of both CS/CMC and CS/PAA obtained from formic acid and hydrochloric acid aqueous solution showed similar chemical shift change of C_1 , C_3 , C_4 , and C_5 signal. This showed that inter-polymer interactions of CS/CMC and CS/PAA complex were formed without the effect of formylation.

【はじめに】 キトサン(CS)は酸性溶液に溶解するとポリカチオンになり, 金属, もしくはポリアニオンと複合体を形成することがよく知られている. また, 溶媒和したCS結晶は, 酸性CS溶液から形成されることが知られている.

^{13}C および固体高分解能 NMR による CS/PAA(キトサン/ポリアクリル酸)¹⁾と CS/CMC(キトサン/カルボキシメチルセルロース), 2つの高分子複合体の形成機構の解明を試みている¹⁾. これまで, 溶媒にギ酸を使用してきたおり, キトサンのホルミル化の影響を考慮しなければいけなかった²⁾. そこで, 溶媒に塩酸を使用した.



【試料】 CS(片倉チッカリン, DAC=97%, DPn=5,500)は 5%過ホウ酸ナトリウム水溶液で8時間混合することにより解重合した後, 濾過, 洗浄, そして1日間凍結乾燥した. 解重合したCSは粘度測定から, DPn=480である. PAA(Aldrich, Mw=5,000)は精製せずに使用した.

CS/PAAは 2%/1%塩酸およびギ酸水溶液にそれぞれ溶解し, 60~70 °Cで8時間乾燥した. CS/CMCは 2wt%/1%塩酸水溶液で化学量論的に 1:1になるよう調製し, 60~70 °Cで8時間乾燥した.

固体NMR, キトサン, カルボキシメチルセルロース, ポリアクリル酸

まえだ しろ, やました しんいちろう, むとう かつのり, さくらい けんすけ

【装置】 固体 NMR 測定には Chemagnetics CMX Infinity 300 を使い、 ^{13}C はヘキサメチルベンゼンにおけるメチル炭素を TMS から 17.35ppm, ^{15}N はグリシンのシグナルを液体 NH_3 から 32.5ppm とし、それぞれ外部基準とした。バックグラウンド信号の影響を無くすために、セラミックス製 5mm CP/MAS プローブを用いた。90°パルス幅は 3.0us, MAS 回転数は 7kHz, 積算回数は 8,000 回である。

【結果と考察】 CS, CMC, CS/CMC の ^{13}C CP/MAS のスペクトルを、それぞれ図 1 の(a), (b), (c)に示す。複合体中における CS と CMC の C_1 シグナルは高磁場側に 3~8ppm シフトし、 C_4 シグナルの大部分が高磁場側にシフトしている。 C_3 , C_5 、にも高磁場側のシフトが見られる。また、CMC では 178ppm に COOH 炭素のシグナルが現れている。溶媒にギ酸を用いた CS/CMC は、ほとんどシフトしていないのに対して溶媒に塩酸を用いた CS/CMC では 175ppm にシフトしている。図 2 に(a)CS, (b)CS/PAA(ギ酸), (c)CS/PAA(HCl)の ^{13}C CP/MAS のスペクトルを示す。複合体中における CS の C_1 シグナルは 4~7ppm 高磁場シフトし、 C_4 , C_3 , C_5 のそれぞれのシグナルは高磁場シフトして 2 本に大きく分裂している。これらの結果は、溶媒がギ酸、塩酸のどちらでも見られる。以上のことから、CS/CMC および CS/PAA のそれぞれの C_1 , C_3 , C_4 , C_5 シグナルのシフトは 2 種類の溶媒で同様の結果が得られた。ただし、CS/CMC 中における CMC および CS/PAA 中における PAA の COOH 炭素シグナルのシフトについては現在検討中である。

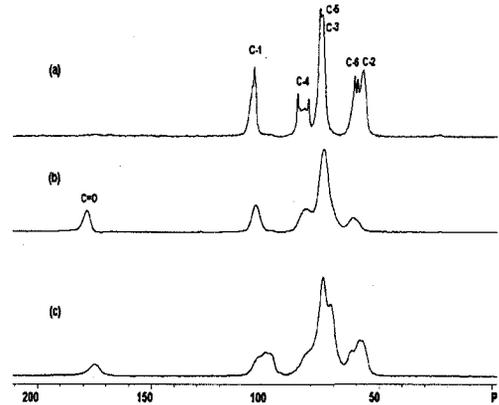


Fig.1 ^{13}C CPMAS NMR spectra of (a)chitosan, (b)CMC, and (c)CS/CMC.

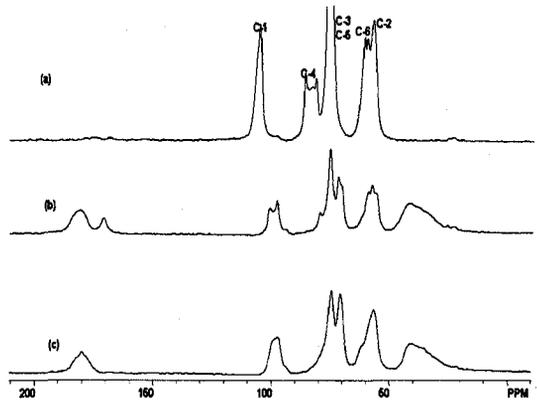


Fig.2 ^{13}C CPMAS NMR spectra of (a)chitosan, (b)CS/PAA castfilm from 2% formic acid, (c)CS/PAA castfilm from 1% hydrochloric acid.

【引用文献】

- 1) S. Maeda, T. Ohshima, and K. Sakurai, *Proc. XVIIIth Int. Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, 166(1998); K. Sakurai, T. Ohshima, and S. Maeda *Adv. Chitin Sci.*, 135-140(1998).
- 2) 桜井謙資, 前田史郎, 原謙吾, *キチン・キトサン研究*, 2(3), 197-204(1996).
- 3) 前田四郎, 飯田貴之, 中江一浩, 山下伸一郎, 大島孝友, 桜井謙資, 第 41 回 NMR 討論会講演要旨集, 170-171, (2001).

¹³C NMR of membrane protein: residue dependency

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology,

○Satoru Yamaguchi, Aya Shiraiishi, Tadashi Arakawa, Satoru Tuzi and Hazime Saito

We examined residue dependency of ¹³C solid state NMR by using bacteriorhodopsin(bR) for a typical model of G-protein coupling receptor. The bR was labeled by [1-¹³C]Trp or [1-¹³C]Phe and spectra were acquired by CP-MAS and DD-MAS. Even if an amino acid is located in the transmembrane α -helix, we are not always able to observe all signals arising from protein. This problem was caused by interference between protein mobility and decoupling and/or MAS frequency.

膜蛋白質は生体内において受容体、チャンネル、トランスポーター、イオンポンプなど重要な役割を果たしている。これら膜蛋白質の生理学的機能の解明には原子レベルでの構造解析が必要である。通常、溶液 NMR では蛋白質を均一 ¹⁵N、¹³C に標識する手法が一般的であるが、揺らぎが大きく十分に水和した膜蛋白質の場合は標識部位、残基の種類によって ¹³C 信号が消滅、あるいは広幅化が生じる。すなわち[3-¹³C]Ala 標識バクテリオロドプシン(bR)の場合は全ての信号を検出できるのに対して、[1-¹³C]Ala 標識 bR の場合はループ、および界面付近にある残基の信号が観測されない。一方、[1-¹³C]Val 標識 bR の場合はこれらの信号が観測できる。¹⁾これはアミノ酸側鎖の大きさによって変化する 10⁴~10⁵ Hz の揺らぎとプロトンデカップリング、マジック角回転周波数の干渉に伴って信号の先鋭化が機能しなくなることによる。このことは十分に水和した室温における膜蛋白質の一般的性質であるため、バクテリオロドプシン(bR) (図 1) を対象として部位特異的固体 NMR を用いて ¹³C 信号の残基依存性について研究を行った。この際、Mn²⁺を加え、揺らぎの大きな膜表面部位の信号を消去することで膜貫通部位由来の信号を区別した。

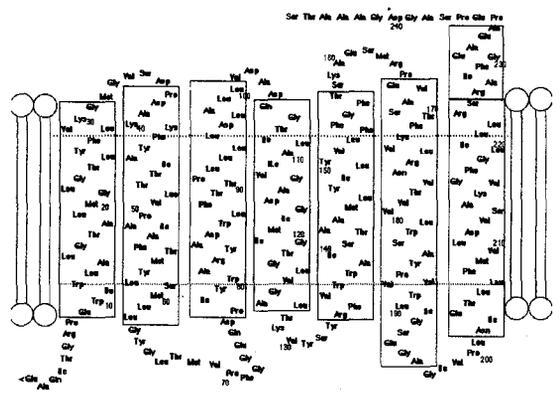


図 1. バクテリオロドプシンのアミノ酸配列

固体 NMR、膜蛋白質

○やまぐちさとる、しらいしあや、あらかわただし、つじさとる、さいとうはじめ

図2に $[1-^{13}\text{C}]$ Trp 標識 bR の CP-MAS スペクトルを示す。Trp は bR 中に 8 残基存在するが (図1)、CP-MAS スペクトルからは 3 本のシャープな信号が観測された。一方、DD-MAS スペクトルは高磁場側、低磁場側に新たに信号が観測された。コンフォメーション依存化学シフトから低磁場の信号は α -ヘリクス由来の信号であり、この結果は CP-MAS で観測する限り膜貫通 α -ヘリクスの全ての信号を捕らえることができないことを示唆している。点線は Mn^{2+} 処理を行い脂質二重膜表面部位の信号を消したスペクトルである。CP-MAS、DD-MAS 共に 175.0、175.8、177.0ppm の 3 本の信号が残った。これらの信号はどれも蛋白質中心部位の揺らぎの小さいレチナルポケット付近の信号由来のものと考えられる。図3に $[1-^{13}\text{C}]$ Phe 標識 bR の CP-MAS スペクトルを示す。 $[1-^{13}\text{C}]$ Trp 標識の場合とは異なり、膜貫通部位由来の信号は CP-MAS、DD-MAS 共にほぼ同じ線形を示している。

bR は全体として不均一な揺らぎ構造を持つことをすでに報告しており、特に膜貫通 7 本ヘリックスを持つ蛋白質の場合、ヘリックス間のパッキングの程度、側鎖の方向、膜表面からの距離によって揺らぎが大きく異なることが容易に予想される。 $[3-^{13}\text{C}]$ Ala 標識 bR を温度変化させた場合、蛋白質の揺らぎとデカップリング周波数もしくは MAS 周波数との干渉により信号の消失が確認されており、この問題が主鎖標識の場合にも起こりうることを示唆している。よって膜蛋白質の同位体標識を行う場合、蛋白質の揺らぎに注意し、アミノ酸の種類を慎重に吟味する必要があることが分かった。

1) H.Saito, T. Tsuchida, K.Ogawa, T.Arakawa, S.Yamaguchi and S.Tuzi, *Biochim Biophys Acta*, 2002, in press

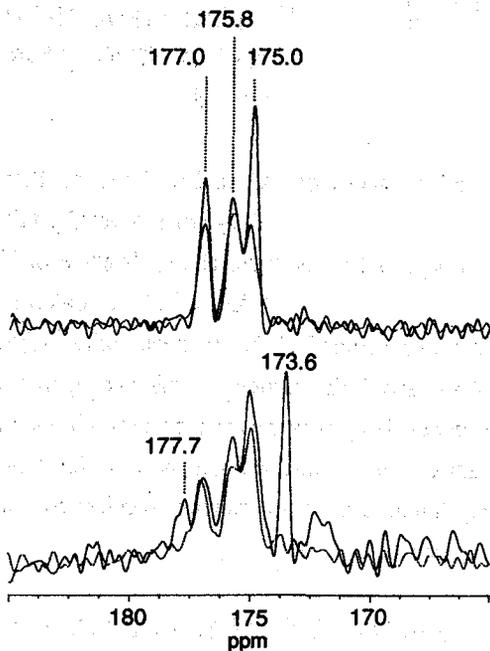


図2 $[1-^{13}\text{C}]$ Trp 標識(黒線)と Mn^{2+} 処理された(点線) bR の CP-MAS(上)と DD-MAS(下)スペクトル。

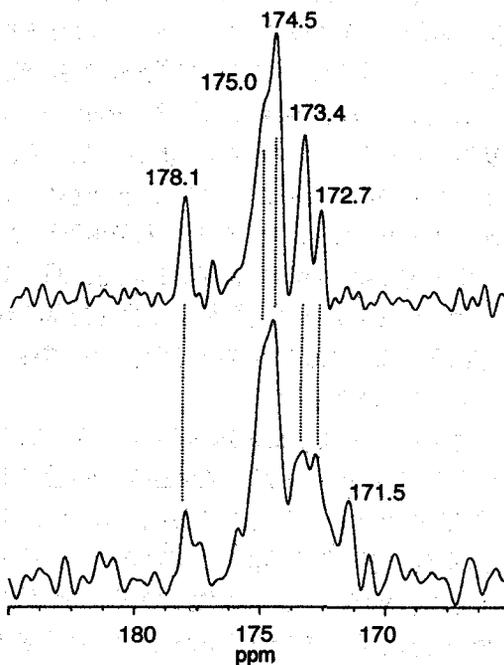


図3 $[1-^{13}\text{C}]$ Phe 標識 bR の CP-MAS(上)と DD-MAS(下)スペクトル。

NMR Studies on ^{13}C -labeled Membrane Proteins: The Effect of Oligomerization and Formation of Two-dimensional Crystalline Lattice

(Dept of Life Science, Himeji Institute of Technology) Hazime Saito, Takahiro Tsuchida, Keiji Ogawa, Tadashi Arakawa, Satoru Yamaguchi and Satoru Tuzi

We have recorded ^{13}C NMR spectra of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ - and $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}$ -labeled bacteriorhodopsin (bR) and W80L and W12L mutants in which hexagonal crystalline lattice might be disrupted or disorganized, in order to clarify how protein dynamics of these mutants are affected by the presence of the crystalline lattice. It turned out that fluctuation motion of the transmembrane α -helices of these mutants without the crystalline lattice is substantially accelerated to the frequency with 10^4 Hz as compared with that of wild type bR with 10^2 Hz.

生体における信号伝達、物質輸送、その他重要な働きをする膜蛋白質は、生体系を対象とする固体高分解能NMRに課せられた最後のフロンティアでもある。しかし、これまでのアプローチでは、*intact* な膜蛋白質とは程遠い、ペプチド断片にとどまっている。また、生理条件に対応する室温かつ高水和状態を念頭においた系も極めて少ない。一方、部位特異的固体高分解能 ^{13}C NMRでは^{1, 2}、keyとなる信号の帰属にコンホメーション依存 ^{13}C シフト、部位特異変異株を用い、生理条件である室温かつ高水和条件における *intact* への適用が可能である。実際、バクテリオロドプシン(bR)に限らず、最近光走向性蛋白質としてのホボロドプシン³、信号伝達系のジアシルグリセロールキナーゼ (DGK)⁴ に対しても適用可能であることを示した。

本研究では、膜蛋白質NMR測定に関して蛋白質自身のオリゴマー化(図1では三量体)、二次元結晶の有無が ^{13}C NMR測定にどのような影響を与えるか、 ^{13}C 標識 W80L, W12L 試料について検討を行った。

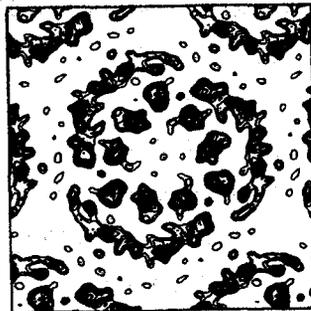


図1 bRの三量体と六方晶の単位格子(投影図)

図2は、 $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ 標識 W80L (A,D)および W12L (B,E) 変異体の ^{13}C CP-MAS (左側) DD-MAS (右側) NMR スペクトルを野性株 (C,F) と比較したものである。明らかに野性株に比べ、変異株のスペクトル幅が増加すると同時に信号強度が減少している。 ^{13}C 標識アラニンからハロバクテリアの脂質メチルに移行した、星印ピーク信号強度の著しい増強からもわかるように、野性株 bR 周辺にある 10 個の脂質量が、六方晶の消滅ないしは不全のために 10—20 倍に増大しているためであ

^{13}C 膜蛋白質、オリゴマー化、2次元結晶、ダイナミックス、NMR

さいとうはじめ、つちだたかひろ、おがわけいじ、あらかわただし、やまぐちさとる、つじさとる

る。一方、図3に示すように [1-¹³C]Ala 標識 W80L (A,D) および W12L (B,E) 変異体の ¹³C CP-MAS (左側) DD-MAS (右側) NMR スペクトルを野性株の bR (C,F) と比較したものである。図1と著しく異なり、変異株の信号強度が野性株のスペクトルに比べて著しく減少していることである。これは、蛋白質骨格の揺らぎの周波数が、化学シフト異方性が大きいカルボニル基の ¹³Cシフトの先鋭化に必要なマジック角回転周波数 4kHz 程度にあるとき、相互に干渉をおこして信号が消滅してしまうためである。

これらのデータから、三量体形成が不全 (これはCDスペクトルから検証可能) あるいは六方晶が消滅の場合、蛋白質蛋白質のパッキングによって、二次元結晶がある場合の膜貫通ヘリックスの揺らぎの周波数 10²Hz から、この場合のように揺らぎの周波数が増大して 10⁴Hz におよぶことが明らかになった。

¹³CNMR スペクトル測定の観点からは、その揺らぎが小さい二次元結晶における観測がより望ましいことがわかる。

この結果は、膜蛋白質における標識の選択が特に重要で、化学シフト異方性の大きい核をプローブにした場合、蛋白質骨格の揺らぎの周波数とともに干渉をおこすことがあるので十分に注意を要する。

- 1 H. Saito, S. Tuzi, M. Tanio, A. Naito, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 47, 39-108 (2002)
- 2 H. Saito, S. Tuzi, S. Yamaguchi, M. Tanio, A. Natio, *Biochim. Biophys. Acta*, 1460, 39-48 (2000)
- 3 荒川規, 下野和実, 山口悟, 辻暁, 加茂直樹, 斉藤肇, 日本生物物理学会第40回年会
- 4 山口悟, 辻暁, 斉藤肇, 日本生物物理学会第40回年会, 名古屋, 2002

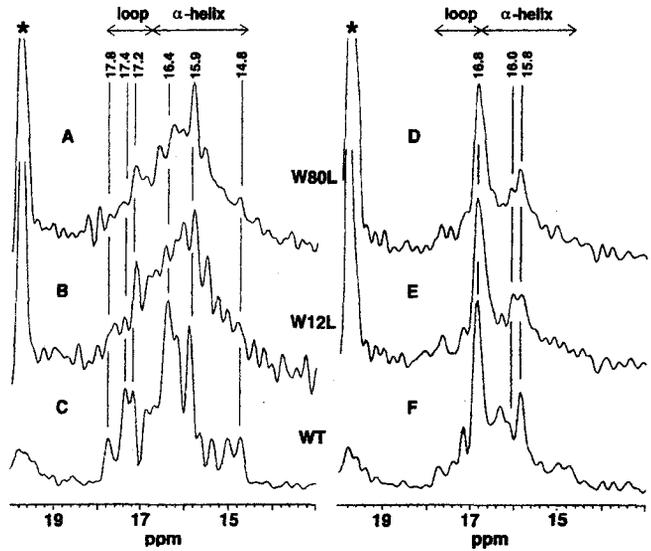


図2 [3-¹³C]Ala 標識 W80L, W12L および bR の ¹³C NMR

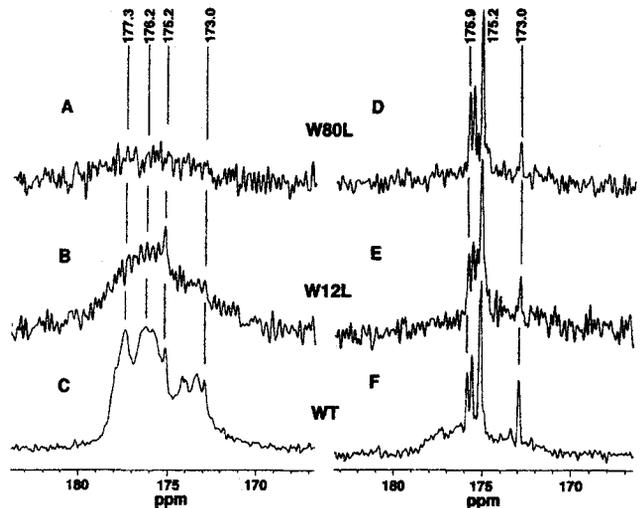


図3 [1-¹³C]Ala 標識 W80L, W12L および bR の ¹³C NMR

P 115 固体2次元交換 ^{13}C NMR法によるPMAA/PVAcブレンドの研究

(防大応化) ○浅野敦志

Two dimensional ^{13}C exchange NMR study of PMAA/PVAc blends Atsushi Asano

Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Japan

^1H spin-lattice relaxation times in the laboratory and the rotating frames have shown that the poly(methacrylic acid)/poly(vinyl acetate) (PMAA/PVAc) blends are homogeneous on a scale of 20-50 nm, but the PMAA/PVAc-rich blends are partially inhomogeneous on a scale of 2-5nm, while the PMAA-rich/PVAc blends, including PMAA/PVAc=1/1 blend, are completely miscible on the scale.¹ Decomposition of ^{13}C NMR spectra for the carboxyl (COOH) and carbonyl (COO) regions and ^{13}C spin-lattice relaxation times in the laboratory frame (T_1^{C}) indicated the existence of the inter-polymer hydrogen bonding between PMAA and PVAc: the fraction against whole amount of COOH or COO groups is 30%. Two-dimensional exchange ^{13}C NMR spectrum provides the cross peak between the COOH group at 179 ppm for PMAA and the COO group at 175 ppm for PVAc. This cross peak is taken place owing to the close proximity of those $^{13}\text{COOH}$ and ^{13}COO functions less than 1 nm.

<はじめに> ポリメタクリル酸 (PMAA) とポリ酢酸ビニル (PVAc) は構造が類似しており、またPMAAの側鎖がCOOH、PVAcの側鎖が OCOCH_3 であるので、それらのブレンドは側鎖どうしのポリマー間水素結合により、非常によく相溶すると予想される。実際 PMAA/PVAcポリマーブレンドの ^1H の緩和時間 T_1^{H} と $T_{1\rho}^{\text{H}}$ の観測から、広い組成比で非常によく相溶することがわかっている¹⁾。このポリマー間に形成される水素結合は ^{13}C NMRスペクトルの化学シフト値の変化を生じさせ、ブレンド中で相互作用しているカルボキシル基/カルボニル基ピークは、単体とは全く違う位置に観測される。相互作用部位と相溶性を、水素結合により分裂したと考えられるPMAA由来のピークとPVAc由来のピーク間を2次元交換 ^{13}C NMR法から観測して議論した。

<実験> 固体 ^{13}C NMRスペクトルの測定にはBruker DMX 500 分光光度計を用いた。MAS回転速度はカルボニル/カルボキシル基のスピンングサイドバンドのアリファティック領域への重なりを省くために 8 kHz に設定した。 ^{13}C 核と ^1H 核のラジオ波強度は 55.6 kHzである。固体2次元交換 ^{13}C NMRスペクトルは、DOTY製5φプローブを用いて、台形型の強度変調CPとTPPMデカップリングを用い位相検波方式 (TPPIモード) で測定した。ミキシング時間は100 ms から 10 sまで変化させた。

キーワード：固体2次元交換 ^{13}C NMR、ポリメタクリル酸 (PMAA)、ポリ酢酸ビニル (PVAc)、ポリマーブレンド

あさのあつし

<結果と考察>

図1にPMAA/PVAcブレンドのCPMAS ^{13}C NMR スペクトルを示した。図1 Aはカルボキシル/カルボニル (CO) 基、図1 Bにはアリファティック領域を拡大して示している。

それぞれのスペクトルの右側にはPMAA単体とPVAc単体のスペクトルをブレンドの組成比に応じて加算したスペクトルを示してある。実測とシミュレーションとを比較すると、アリファティック領域ではシミュレーションしたスペクトルが実測と全く同じスペクトルを与えるのに対し、CO基領域のシミュレーションのスペクトルは実測のスペクトルと全く違うことがわかる。

CO基領域の実測のスペクトルはシミュレーションに比べて複雑に分裂している。このことは、PMAAとPVAcとの側鎖間で ^{13}C NMRスペクトルに影響を与えるほどの相互作用が存在していることを示している。CO基領域の実測スペクトルを5つのGaussian波形でシミュレーションすると、PMAA由来の183ppmに観測されるブロードなピークが187, 183, 179ppmの3本にわかれ、PVAc由来の171ppmに観測される、よりシャープなピークが175, 171ppmの2本に分裂していることがわかった。PMAA由来の179ppmとPVAc由来の175ppmのピークは $T_1\rho$ のブレンド組成依存の観測から、単独に存在しているというよりは、互いに協調的に運動していると結論づけられる¹⁾。化学シフト変化を伴う水素結合がこれらピーク間に存在するならば、2次元交換 ^{13}C NMRの測定からクロスピークが観測されると考えられる。

図2に固体2次元交換 ^{13}C NMRスペクトルを示した。図2からわかるように、179ppmと175ppmとの間にクロスピークが観測され、これらピークの残基同士が空間的に非常に近い位置に存在していることが示唆された。

1) A. Asano, et al., *Macromolecules*, 2002 in press.

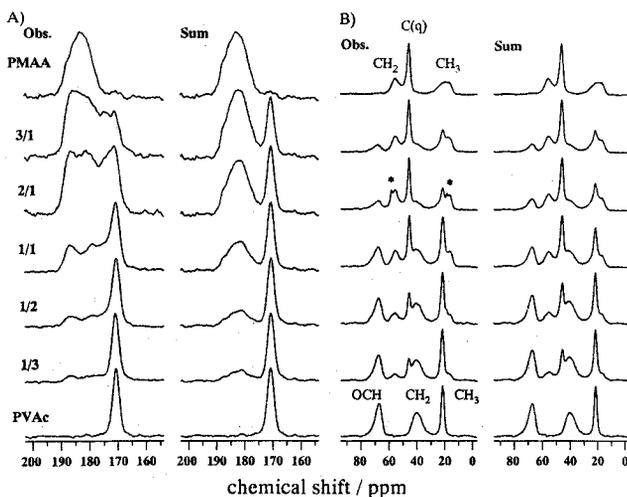


Fig.1 Observed CPMAS ^{13}C NMR spectra of PMAA, PVAc and the PMAA/PVAc blends: (A) Carboxyl regions of PMAA and Carbonyl regions of PVAc, (B) aliphatic region. Sum of the ^{13}C NMR spectra of pure PMAA and pure PVAc at the respective molar unit ratio is also depicted on each right hand of the observed spectra.

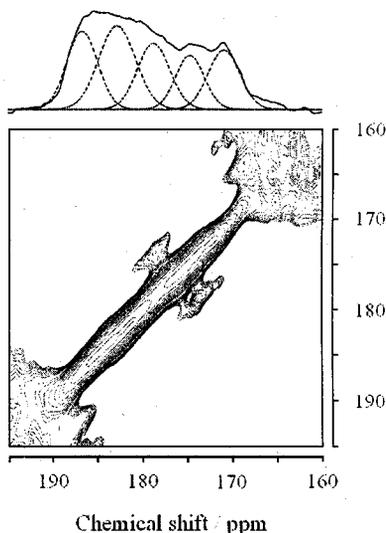


Fig. 2 Two dimensional exchange ^{13}C NMR spectrum in the CO region of the PMAA/PVAc=3/1 blend. The observed CPMAS ^{13}C NMR spectrum is shown on the top of the 2D spectrum and each decomposed peak is also depicted by a broken line. The cross peaks between 179 ppm and 175 ppm are clearly observed.

(農工大工) ○嘉数あや 姚菊明 川村純司 横井恵理子 亀田恒徳 朝倉哲郎

Genetically Engineered Syntheses of Silk-like Materials and Their Structural Analysis
with Solid-state NMR

Aya Kakazu, Juming Yao, Junji Kawamura, Eriko Yokoi, Tsunenori Kameda and Tetsuo Asakura

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology

The silk filaments of silkworms, wild silkworms and spiders have high-performance character and consist of repeated amino acid sequences. We synthesized several new silk-like materials with combinations of these unique sequences using genetically engineered synthesis. In some silk-like materials, additional functional sequences selected from in elastin and fibronectin are introduced into the chain in order to create new functions of the silk-like materials. The ^{13}C CP/MAS NMR spectra were observed and the Ala C β region was used to analyze the structure in detail.

[緒言] 蚕やクモは、水溶液から常温、常圧において、同じ太さの鋼鉄線の強度に匹敵する、あるいはそれを超える絹を瞬時に作成する。絹の一次構造の特徴の一つは、多くの繰り返し配列からなることであり、その繰り返し配列が固有の高次構造を形成することにより、固有の物性を発現していると考えられる。当研究室では各種絹ならびに、その繰り返し配列を有するペプチドについて詳細なNMR構造解析を行い、その結果に基づいて、繰り返し配列を組み合わせた新しい絹様物質を分子設計するとともに、遺伝子組換え法を用いて実際に作成してきた¹⁾⁹⁾。さらに他のタンパク質の機能部位、例えば細胞接着活性を有する繰り返し配列を導入することにより、新たな機能を付与した絹様物質の作成を試みてきた。

本研究では、遺伝子組換え法を用いて作成した新しい絹様物質の構造を、Ala C β ピークに着目して解析した結果について述べる。

[実験] 現在、当研究室で作成に成功した各種絹様物質について、一次構造をTable 1にまとめた。試料(1)と(2)は、家蚕絹の基本構造である(GAGAGS) $_n$ を基本とし、エリ蚕やクモ牽引糸の絹のGly rich領域を組み合わせており、新しい物性発現

Table 1 Silk-like materials prepared with genetically engineered synthesis in our laboratory.

samples	n:number of repeats
(1)[GGAGSGYGGGGYGHGYGSDGG(GAGAGS) $_3$] $_n$	2,4,6
(2)[(AGSGAG) $_6$ ASYGGLGSGAGRAS] $_n$	4
(3)[TGRGDSPAGG(AGAGSG) $_3$ AS] $_n$	5
(4)[(GVPGV) $_2$ GG(GAGAGS) $_3$ AS] $_n$	8,16
(5)[TGRGDSPA(GVPGV) $_2$ GG(GAGAGS) $_3$ AS] $_n$	8
(6)[(A) $_{18}$ TSGVGAGYGAGAGYGVGAGYGAGVGYGAGAGY] $_n$	4
(7)[DGG(A) $_6$ GGAASGAGYGA(GAGSCA) $_2$ GAGYGA] $_n$	4

を目的とした。試料(3)は、フィブロネクチンの細胞接着部位であるRGDを含む配列を家蚕絹の基本構造に導入した材料で、細胞接着性と熱安定性の向上を目的とした。試料(4)は、エラスチンの弾性部位である(GVPGV) $_n$ を家蚕絹の基本構造に導入した材料であり、ドラッグデリバリー等の生体材料としての使用を目的とし、試料(5)は、(3)と(4)の特性を併せ持つように設計された。試料(6)は、エリ蚕絹のAla連鎖部位を強調し、家蚕絹のGly rich領域を組み合わせた材料であり、試料(7)は、クモ牽引糸のAla連鎖部位と家蚕絹の基本構造を組み合わせた材料で、いずれも、より高強度な絹様物質の作成を目的とした⁸⁾⁹⁾。各々の絹様物質をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、そのDNAモノマーを重合することにより目的DNAを構築し、最終的に大腸菌により絹様物質を発現させた。20-40mg(培養液Lあたり)の最終生成物が得られた。さらに、試料(4)については、M9最小培地中に[3-

キーワード 機能性絹様物質 安定同位体ラベル 遺伝子組換え法 固体NMR構造解析

○かかずあや やおじゅみん かわむらじゅんじ よこいえりこ かめだつねのり あさくらてつお

^{13}C AlaおよびノンラベルのValを添加して培養することによって、選択的に発現タンパク質中のAla C β を ^{13}C ラベルした。培養液Lあたり30mgが得られた。

[結果および考察] 絹の ^{13}C CP/MASスペクトルにおいて、Ala C β 領域は、コンホメーションならびに分子間構造に極めて敏感である。当研究室では(GAGAGS) $_n$ を主成分とする家蚕絹の結晶部について、Fig.1の帰属を報告してきた^{1),2),5),9)}。家蚕絹の繊維化前の構造(Silk I)は繰り返しtype II β -turn構造であるが、繊維化後(Silk II)は、3つの構造が混ざった不均一構造となる。

遺伝子組換え法を用いて作成した絹様物質のうち、Ala C β 部位の安定同位体ラベルを行った試料(4)の結果について述べる。Fig.2(a)に示したように、絹様物質(4)のスペクトルは複雑であり、安定同位体ラベルなしに、詳細な構造解析は不可能であったが、Ala C β 部位の選択的ラベル(Fig.2(b))により可能となった。ノンラベル試料との差スペクトルを得(Fig.3)、Fig.1のSilk IとSilk IIの、構造解析結果を参考にして、ピークを分離した。しかしながら、24-30ppmには、トランスアミネーションによるPro C β 、C γ 、Val C β のピークが出現する。16.2ppmにSilk Iの化学シフトと一致するピークが出現するが、少しブロードであり、distorted β -turnと考えられる⁹⁾。低磁場側には、Silk IIの不均一ピークが出現する。各々の割合は、40:60であった。なお、本研究は生研機構基礎技術推進事業により行われた。

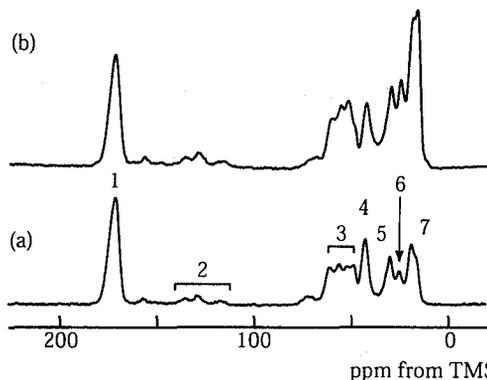


Fig.2 ^{13}C CP/MAS spectra of non-labeled (a) and $[3-^{13}\text{C}]$ Ala labeled (b) sample(4). The assignment of each peak is follows: 1. C=O; 2. His C γ , ϵ_1 , δ ; 3. Ser C β , Val C α , Pro C α , Ala C α , Ser C α , His C α , Pro C δ , etc.; 4. Gly C α ; 5. Val C β , Pro C β ; 6. His C β , Pro C γ , etc.; 7. Ala C β , Val C γ .

参考文献

- 1) Asakura T., Ashida J., Yamane T., Kameda T., Nakazawa Y., Ohgo K. and Komatsu K. *J. Mol. Biol.*, 306, 291-305 (2001).
- 2) Asakura T., Yamane T., Nakazawa Y., Kameda T. and Ando K. *Biopolymers*, 58, 521-525 (2001).
- 3) van Beek, J., Beaulieu, L., Schafer, M., Demura, M., Asakura, T. and Meier, B. H. *Nature*, 405, 1077-1079 (2000).
- 4) Asakura, T., Sugino, R., Okumura, T. and Nakazawa, Y. *Protein Sci.*, 11, 1873-1877 (2002).
- 5) Asakura, T., Yao, J., Yamane, T., Umemura, K. and Ulrich, A. S. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 8794-8795 (2002).
- 6) Asakura T., and Yao J. *Protein Sci.*, (2002) in press.
- 7) Yamane T., Umemura K., and Asakura T. *Macromolecules*, (2002) in press.
- 8) Yao, J. and Asakura, T. Silks. Encyclopedia of Biomaterials and Biomechanical Engineering Material, Marcel Dekker Inc. NY. (2002) in press.

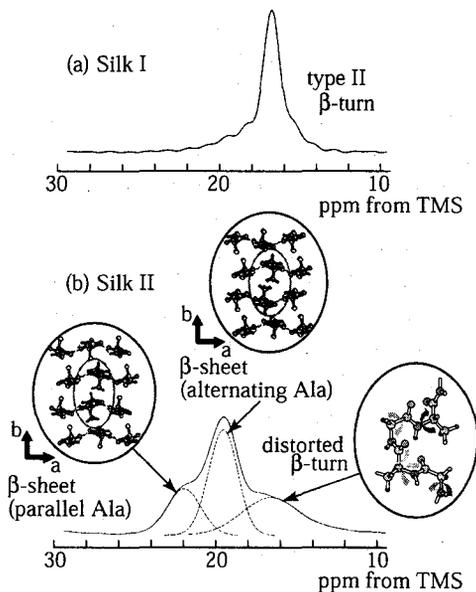


Fig.1 Expanded Ala C β peaks of crystalline fraction with Silk I (a) and Silk II (b) forms. Silk I was concluded to be type II β -turn^{1),2)}. In the Silk II, the peak was deconvoluted into three components and the relative intensities were determined to be 23:45:32 from low field to high field⁹⁾.

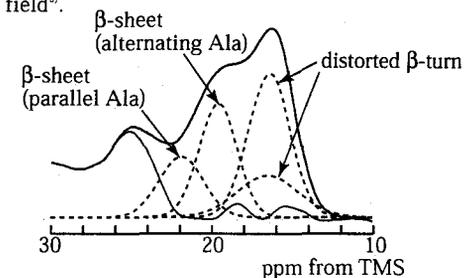


Fig.3 Expanded Ala C β peak region in the difference spectrum, Fig.2 (b) - (a). The carbonyl peak at 171ppm was used for the reference peak.

筑波大物工1、横浜創英短大2、応用数理研(株)3

松井 茂1、斎藤誠治1、○平山裕子1、橋本雄幸2、井上多門3

Second Moment Imaging Using the Jeener-Broekaert Dipolar Signal

S. Matsui,* S. Saito,* H. Hirayama,* T. Hashimoto,† and T. Inouye ‡

*Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8573

† Yokohama Soei College, Yokohama, Kanagawa 226-0015

‡ Institute for Applied Mathematics, Inc., Tsukuba, Ibaraki 305-0005

The second moment is a useful parameter for characterizing molecular mobility in solids. Here, we focus on the imaging experiment in which the information of ^1H NMR second moment is extracted from the Jeener-Broekaert (JB) dipolar signal (I). The JB dipolar signal is induced by the JB sequence, $90^\circ_x \cdot \tau \cdot 45^\circ_y \cdot \tau' \cdot 45^\circ_y \cdot t$, and observed during t (Fig. 1). Compared to the second moment imaging experiments based on the usual Zeeman signal (Z), the signal sensitivity is lost to some extent in the JB experiments because of the less efficient JB transfer of order from the Zeeman to the dipolar reservoir (I), and of the decay by the often fast T_{1D} relaxation. However, due to a "weighted" creation of dipolar order by the JB sequence (I, δ), the use of JB dipolar signal allows a "weighted" powder average of the second moment, which we call "JB second moment", to be obtained. The JB second moment can yield more detailed information on the second moment than that obtained using the Zeeman signal.

It is well known that the Zeeman FID signal, $G(\delta)$, can be expanded in terms of the Van Vleck moments (δ) such that

$$G(t) = G_0 \left(1 - \frac{M_2 t^2}{2!} + \frac{M_4 t^4}{4!} - \frac{M_6 t^6}{6!} + \dots \right), \quad [1]$$

where M_n ($n = 2, 4, 6, \dots$) denotes the n th moment and G_0 is the initial amplitude of the FID. The previously reported methods of second moment imaging using the Zeeman signal (Z) were based on Eq. [1]. The second moment M_2 can be extracted from the initial curvature of the FID; namely,

$$M_2 = \left| \lim_{t \rightarrow 0} \frac{d^2 G(t)}{dt^2} \right| / G_0. \quad [2]$$

In most imaging experiments of materials, the imaging object is usually orientationally disordered, i.e., a powder. In such a case, the observed Zeeman FID signal, $G(\delta)$, and the measured n th moments, M_n , in Eqs. [1] and [2] may be expressed by the corresponding powder averages (δ):

$$G(t) = \frac{\int G^{\text{av}}(t) d\Omega}{\int d\Omega} \quad [3]$$

キーワード： 2次モーメントイメージング、Jeener-Broekaertパルス系列、双極子信号、異方的2次モーメント、マジックエコー

まついしげる、さいとうせいじ、ひらやまひろこ、はしもとたけゆき、いのうえたもん

and

$$M_n = \frac{\int M_n^\Omega d\Omega}{\int d\Omega}, \quad [4]$$

where $G^\Omega(t)$ and M_n^Ω represent, respectively, the FID and the n th moments obtained from a tiny single crystal having an orientation Ω with respect to the static magnetic field, and $\int d\Omega \equiv \iint \sin\theta d\theta d\phi$.

The expression for the JB dipolar signal, on the other hand, may be more complicated than that for the Zeeman signal. This is because the JB sequence, $90^\circ_x - \tau - 45^\circ_y - \tau' - 45^\circ_y - t$, consists of the three RF pulses separated by the time intervals τ and τ' while the Zeeman FID signal can be induced by applying a single RF pulse. The original JB experiment was performed on the ^{19}F spin system in a CaF_2 single crystal with the (100) crystal axis aligned along the static magnetic field (D). It shows that the JB dipolar signal can be given for the oriented (Ω) single crystal by (δ)

$$S^\Omega(\tau, \tau', t) = S_A \left[\frac{1}{M_2^\Omega G_0} \frac{dG^\Omega(\tau)}{d\tau} \right] \exp\left[-\frac{\tau'}{T_{1D}^\Omega}\right] \left[\frac{1}{G_0} \frac{dG^\Omega(t)}{dt} \right]. \quad [5]$$

Here, the term $[(M_2^\Omega G_0)^{-1} dG^\Omega(\tau)/d\tau] \equiv E^\Omega(\tau)$ represents the efficiency of creating the dipolar order, the exponential term $\exp[-\tau'/T_{1D}^\Omega] \equiv R^\Omega(\tau')$ denotes the T_{1D}^Ω relaxation decay of the created order, the last term $[G_0^{-1} dG^\Omega(t)/dt]$ indicates the shape of the dipolar signal, and S_A is the amplitude of the created order that is proportional to G_0 . For an orientationally disordered sample, the powder average must be taken similarly as in Eq. [3]:

$$S(\tau, \tau', t) = \frac{\int S^\Omega(\tau, \tau', t) d\Omega}{\int d\Omega}. \quad [6]$$

Due to the orientation dependence of the efficiency and relaxation terms, the expression for the powder-averaged JB dipolar signal $S(\tau, \tau', \delta)$ is complicated and the signal shape generally depends on τ and τ' .

We assume that the JB dipolar signal $S(\tau, \tau', \delta)$ can be expanded in terms of the JB moments such that

$$S(\tau, \tau', t) = S_A \tau \left(M_{2(\text{JB})} t - \frac{M_{4(\text{JB})} t^3}{3!} + \frac{M_{6(\text{JB})} t^5}{5!} - \dots \right), \quad [7]$$

where the n th JB moments, $M_{n(\text{JB})}$, are not equivalent to the usual powder averages of the n th moments M_n^Ω but regarded as the "weighted" powder averages of M_n^Ω with the weighting factor given by the efficiency and relaxation terms $E^\Omega(\tau)$ and $R^\Omega(\tau')$. We define the n th JB moments by

$$M_{n(\text{JB})} = \frac{\int [-E^\Omega(\tau) R^\Omega(\tau') / \tau] M_n^\Omega d\Omega}{\int d\Omega}. \quad [8]$$

Generally, the JB moments depend on τ and τ' .

Equations [5]-[8] indicate that in the case of JB dipolar signal, the JB second moment $M_{2(\text{JB})}$ can be related to the initial slope of the signal (I, δ). Since the normalization factor $S_A \tau$ is given by the area under the JB dipolar signal,

$$S_{A\tau} = \int_0^{\infty} S(\tau, \tau', t) dt, \quad [9]$$

the JB second moment can be evaluated as (5)

$$M_{2(JB)} = \left| \lim_{t \rightarrow 0} \frac{\partial S(\tau, \tau', t)}{\partial t} \right| / \int_0^{\infty} S(\tau, \tau', t) dt. \quad [10]$$

Unlike the usual second moment M_2 (powder average), the JB second moment $M_{2(JB)}$ cannot easily be calculated theoretically because the "weighting" factor $[-E^{\Omega}(\tau)R^{\Omega}(\tau)/\tau]$ is usually unknown. It is only shown (5) that the JB second moment $M_{2(JB)}$ reduces to the usual second moment M_2 in the limits of $(M_2^{\Omega})^{-1/2} \gg \tau$ and $T_{1D}^{\Omega} \gg \tau$.

However, the qualitative behavior of the τ dependent shape of the JB dipolar signal and hence of the τ dependent JB second moment $M_{2(JB)}$ can be seen by assuming a Gaussian function for the Zeeman FID signal. Namely, when $G^{\Omega}(\tau) = G_0 \exp(-M_2^{\Omega}\tau^2/2)$, the "weighting" factor becomes $\exp(-M_2^{\Omega}\tau^2/2)$. For simplicity, we have neglected the relaxation effect $R^{\Omega}(\tau)$ by assuming $T_{1D}^{\Omega} \gg \tau$. It is clear that for short τ satisfying $(M_2^{\Omega})^{-1/2} \gg \tau$, the "weighting" factor becomes independent of the crystal orientation, i.e. $M_{2(JB)} = M_2$. Also, the shape of the JB dipolar signal coincides with the time derivative of the shape of the Zeeman FID signal. For longer τ , the components of the JB dipolar signal with larger M_2^{Ω} may be suppressed in accordance with $\exp(-M_2^{\Omega}\tau^2/2)$ and the components with smaller M_2^{Ω} is relatively enhanced. This results in the JB dipolar signal relatively expanded in time. The $M_{2(JB)}$ value estimated by using the expanded signal will correspondingly be smaller; i.e., the $M_{2(JB)}$ value decreases with increasing τ . Such τ dependence of the $M_{2(JB)}$ can thus reflect the distribution of the M_2^{Ω} value due to the crystal orientation dependence in the powder sample.

Analysis of the τ dependence would elucidate detail of the M_2^{Ω} distribution, which is potentially useful as a new image contrast. But, it is not easy to perform such an analysis because *a priori* knowledge of the M_2^{Ω} distribution is required. Nevertheless, by using the "weighting" factor of $\exp(-M_2^{\Omega}\tau^2/2)$ and simply assuming a uniform M_2^{Ω} distribution which is symmetric about $M_2^{\Omega} = M_2$ and has the half range of the distribution ΔM_2^{Ω} , the τ dependence would be related to the half distribution range ΔM_2^{Ω} . Thus, the measurement of $M_{2(JB)}$ would allow an approximate measure of the M_2^{Ω} distribution range to be obtained, in addition to the usual powder average M_2 .

Figure 1 shows the pulse sequence for the second moment 1D imaging using the JB dipolar signal. For imaging, the time evolution of the signal is suspended at a time t after the monitoring 45° pulse by the application of the magic echo time-suspension sequence, TREV-16TS (7). Appropriate application of field gradient pulses (8) imposes the imaging evolution. Signal sampling (A/D) at even-numbered magic echo peaks (7) allows the imaging detection. The time t is scanned to cover the whole evolution of the JB dipolar signal. One-dimensional Fourier transformation along the time axis representing the imaging detection converts the obtained 2D data to the spatially 1D resolved JB dipolar signals as illustrated in Fig. 2. The initial slope and the area under the signal, which respectively correspond to $M_{2(JB)}$ and the spin density, can be extracted from such converted data at each resolved location based on Eqs. [10] and [9], permitting the second moment imaging using the JB dipolar signal.

To confirm the theoretical expectations mentioned above, we have performed both

non-imaging and imaging experiments by using mainly adamantane (ADAM) and hexamethylbenzene (HMB) powders. The experiments were performed on a homebuilt NMR imager, operating at 59.85 MHz for protons. The results will be reported in the poster presentation.

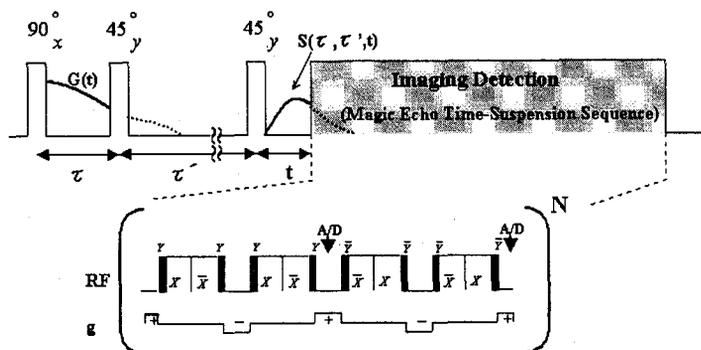


FIG. 1. Pulse sequence for second moment 1D imaging using the Jeener-Broekaert (JB) dipolar signal. The pair of pulses, $90^\circ_x \tau \cdot 45^\circ_y$, creates the dipolar order. The amplitude of the order decays during the following time interval τ' due to the spin-lattice relaxation with the time constant, T_{1D} , and is then monitored by the application of a second 45°_y pulse. The signal, $\langle I_y \rangle$, induced immediately after the second 45°_y pulse assumes an “echo-like” shape and is called the JB dipolar signal, $S(\tau, \tau', t)$. See text for detail of imaging.

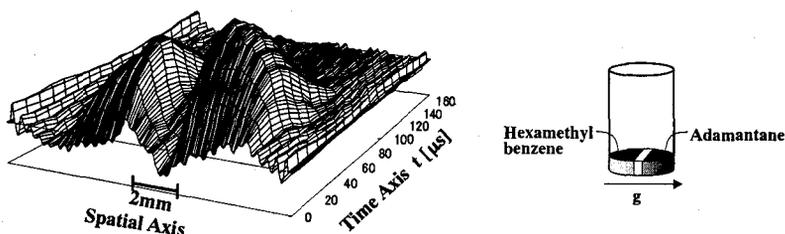


FIG. 2. Example of spatially 1D resolved JB dipolar signals obtained for the test sample consisting of adamantane (ADAM) and hexamethylbenzene (HMB) powders as shown by the inset. The 2D data acquired with the pulse sequence shown in Fig. 1 was converted by 1D Fourier transformation along the time axis representing the imaging detection to give this example.

REFERENCES

1. J. Jeener and P. Broekaert, *Phys. Rev.* **157**, 232-240 (1967).
2. F. Weigand, D. E. Demco, B. Blümich, and H. W. Spiess, *Solid State NMR* **6**, 357-365 (1996).
3. S. Matsui, M. Nonaka, T. Nakai, and T. Inouye, *Solid State NMR* **10**, 39-44 (1997).
4. M. Nonaka, S. Matsui, and T. Inouye, *J. Magn. Reson.* **145**, 315-318 (2000).
5. M. Bloom, E. E. Burnell, S. B. W. Roeder, and M. I. Valic, *J. Chem. Phys.* **66**, 3012-3020 (1977).
6. A. Abragam, “The Principles of Nuclear Magnetism,” Oxford University Press, London (1961).
7. S. Matsui et al, *Chem. Phys. Lett.* **179**, 187-190 (1991); *J. Magn. Reson.* **95**, 149-153 (1991); *J. Magn. Reson.* **98**, 618-621 (1992); *J. Magn. Reson. A* **105**, 215-218 (1993); *J. Magn. Reson. A* **112**, 130-133 (1995); *J. Magn. Reson. A* **120**, 11-17 (1996); *J. Magn. Reson.* **138**, 220-224 (1999).

Spatial information on a polymer gel as studied by ^1H NMR imaging ; Shrinkage by the application of an electric field to a polymer gel

Tokyo Institute of Technology *Hotta Yoshio, and Ando Isao

We have measured the spatial distribution of ^1H spin density of water molecules in a cross linked poly(methacrylic acid)(PMAA)gel under a DC electric field using a new glass cell for applying DC electric field designed in this work inside an NMR probe by means of proton nuclear magnetic resonance imaging. From these experimental results, it was found that the negative side of the gel is swelling and the ^1H spin density of this side is high.

目的

物質内部の物理的、化学的情報について非破壊で得られるという利点は、NMR イメージング法が化学や生物、また医学の分野で注目されるのに十分な理由であった。高分子電解質ゲルのように溶媒に水が含まれている場合には、プロトン核に対するイメージング測定が可能であり、その場合にはゲル中の水分子に関する情報が得られる。

本研究室ではこれまでに、高分子ゲルに応力を印加したときのゲルの変形と内部状態の変化や、直流および交流電場を印加したときの高分子ゲルの応答、温度変化によるゲルの体積相転移、直流電場を印加したときの高分子ゲル内の金属イオン分布の変化について研究を行ってきた。

直流電流を高分子電解質ゲルに印加すると収縮することが見出され、この現象の説明に対し、様々なアプローチがなされてきた。本研究室でも前述の通り、イメージング法を用いてこの収縮過程を測定し考察を行ってきたが、それらは装置上の問題から電場印加したゲルについて直接測定できなかった。

本研究の目的は、今までの研究をもとに電場を印加したゲルについて直接的にNMRイメージング測定を行う方法を考察し、電場印加セルを改良製作してゲルの収縮過程をリアルタイムに画像化することにある。また、その電場印加セルの応用についても検討する。

実験

実験に用いたゲルはポリメタクリル酸 (PMAA) ゲルである。3.0Mのメタクリル酸をモノマーとし、架橋剤に 8.4×10^{-3} MのN,N-メチレンビスアクリルアミド (MBAA) を用いてラジカル重合にて合成をした。得られたPMAAゲルを精製水で膨潤させ洗浄した後、平衡膨潤状態に達するまで放置した。

NMRイメージングプローブの試料部分の口径が10mmであるため、この中で電場印加実験を行うためには10mmのNMR管内に電極板を組み込む必要がある。このとき用いる電極板の磁場への影響を少なくするために厚さの薄い白金板 (0.02mm) を用いた。また、電場印加の際には電極板を常に密着させる必要があるが、これは電極をゲルに対し上下方向で挟むことで解決した。下部電極板が固定されるので、上部電極板の自重により、ゲルが収縮したとしても追従できるためである。さらに、これにより

キーワード：NMR イメージング 高分子電解質ゲル 電場印加 方法論の開発

著者ふりがな：ほったよしお、あんどういさお

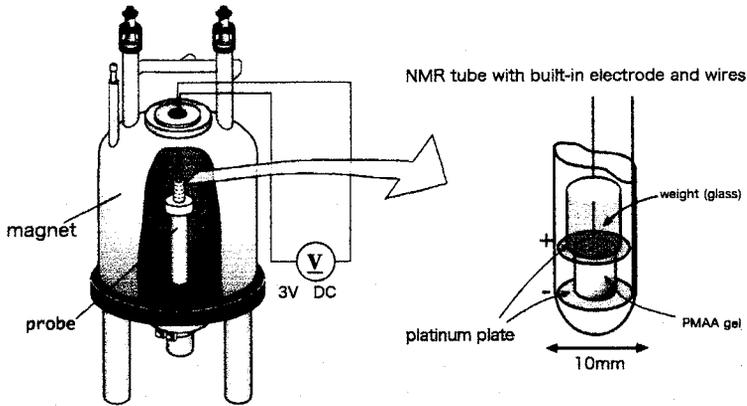


Fig.1 The apparatus for applying an electric field to a gel

電極板も最大限に広くすることが可能となり、試料となるゲルの径や長さを可能な限り大きく取れるようになるという副次的な効果も生まれた。以上のような過程で電場印加装置の作製し、10mmのNMR管内に電源装置を除く電場印加装置を組み込むことが可能となった。装置の概略をFig.1に示す。

^1H NMR イメージング測定は、NM-GIM270 イメージングシステムを接続した270MHzのGSX-270NMR分光器（日本電子製）を用い、スピネコー法により行った。

電場印加実験はPMAAゲルに3Vの直流電圧を加えて行った。このときの収縮過程についてイメージング測定を行った。

結果および考察

プロトンスピ密度画像が得られた。画像を見ると今回の実験でもこれまでと同様に、ゲルの収縮している様子が分かる。さらにこのプロトンスピ密度の三次元プロファイル (Fig.2) を作成すると、電場印加から30分後のスピ密度の分布から、負極のスピ密度の高い部分は膨潤した部分である。すなわち、この膨潤した部分には水分子が多く存在しているものと考えられる。また、正極では収縮により、ゲル中の水は凝集したようになり、スピ密度が高くなったと考えられる。その後、ゲルの収縮により吐き出された水の部分において、スピ密度が高くなる分布をとることがわかる。詳しくは会場にて発表します。

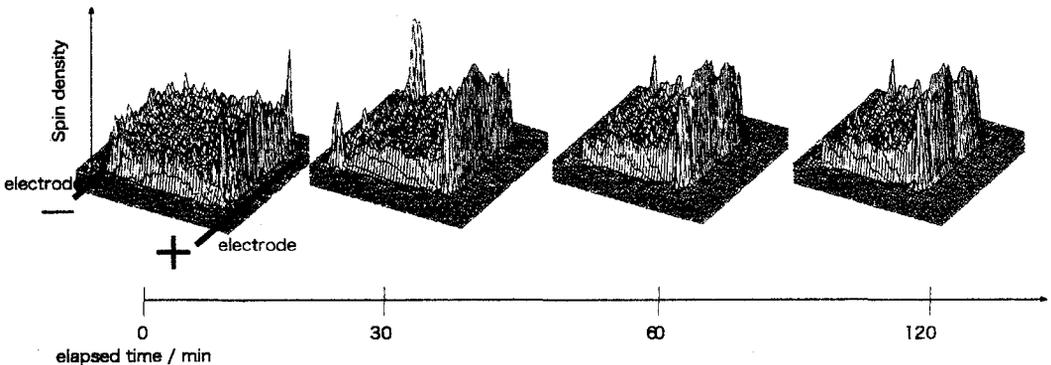


Fig.2 The three dimensional histograms of ^1H spin density of the PMAA gel under a 3V DC electric field

Spatial Distribution of Paramagnetic Metal Ions in a Polymer Gel
as studied by ^1H NMR Imaging Method

Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology
Akitsugu Sasaki, Satomi Yokota, Yoshio Hotta, Shigeki Kuroki and Isao Ando

Spatial distribution of Cu^{2+} and Lanthanide Pr^{3+} metal ions, in a poly(methacrylic acid)gel was successfully elucidated as a function of the degree of swelling by spin-density ^1H NMR imaging, diffusion ^1H NMR imaging, and chemical shift ^1H NMR imaging methods. It is shown that NMR imaging is a very useful means for characterizing three-dimensional structure of hydrogel systems containing metal ions.

【緒言】

NMRイメージング法は現在主に医学分野において医療診断に用いられ、臨床医学を中心に活発に利用されている。その特徴として、材料を非破壊にしてそのままの状態ですべて三次元的に観察することができること、任意の断面の画像を得ることができること等が挙げられる。

このような背景を踏まえて、我々は、NMRイメージング法を用いて、高分子ゲルの外的刺激-応答についての物理学的情報（空間密度分布や運動性の空間分布等）の空間分布を画像として得ることにより、ゲルの構造・ダイナミクスについて、マイクロ・マクロな面から三次元解析を行い、NMRイメージング法の有用性を示してきた。[1] - [8]

以上のような背景を踏まえ、本研究では、水を溶媒としたポリメタクリル酸ゲル中の Cu^{2+} イオン及びランタナイド Pr^{3+} イオンの拡散過程について T_1 強調画像、拡散強調画像、化学シフトイメージング画像の観測を行い、高分子ゲルの特性を解析することを目的としている。

【実験】

ポリメタクリル酸ゲル（以下PMAAゲル）は、モノマーとしてメタクリル酸（MAA）、架橋剤にN, N-メチレンビスアクリルアミド（MBAA）および、開始剤にペルオキシ二硫酸カリウムを用いてラジカル重合させた。この重合はテフロンチューブ内で行ったため、作成されたゲルは全てロッド状になった。金属イオンは、生成したゲルを0.005mol/lの CuSO_4 、及び $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$ 溶液に漬け込むことで添加した。また、ゲルの膨潤時の重量 M_{swollen} と乾燥時の重量 M_{dry} を用いて、膨潤度 q を

$$q = M_{\text{swollen}} / M_{\text{dry}} \quad (1)$$

と定義した。NMRイメージング測定は、Bruker社製300MHz DSX300NMR分光器にイメージングアクセサリを付属させ、イメージングソフト Paravision を用いて、室温で行った。観測核は全て ^1H である。

NMRイメージング法、常磁性金属イオン、化学シフト試薬、高分子ゲル、拡散過程

ささきあきつぐ、よこたさとみ、ほったよしお、くろきしげき、あんどういさお

【結果と考察】

重合させた膨潤度 5.5 の PMAA ゲルに Cu^{2+} イオンを 1 分間添加し、その拡散過程を T_1 強調画像で測定した。測定条件は繰り返し時間を 1s、エコー時間を 15ms とした。 ^1H NMR イメージング法により観測された信号は、全て水分子に帰属できる。常磁性の Cu^{2+} イオンは緩和速度を速くする性質があるために、 Cu^{2+} イオンの拡散した部分は緩和が速く、 T_1 強調画像では信号が大きく観測される。ここから Cu^{2+} イオンの拡散過程が観測された。

次に同様のゲルにおいて Pr^{3+} イオンを同様に一分間添加し、同様の過程を T_1 強調画像により測定したが、画像に大きな明暗の差があらわれず、 Pr^{3+} イオンの拡散過程は観察できなかった。この理由として Pr^{3+} イオンが Cu^{2+} イオンほど T_1 に対して影響を与えないことが考えられる。そこで、次に拡散強調画像、化学シフトイメージング画像を用いて Pr^{3+} イオンの拡散過程を調べた。この結果を画像処理することによりプロファイル化したものを Fig.1 に示す。詳細は発表にて述べる。

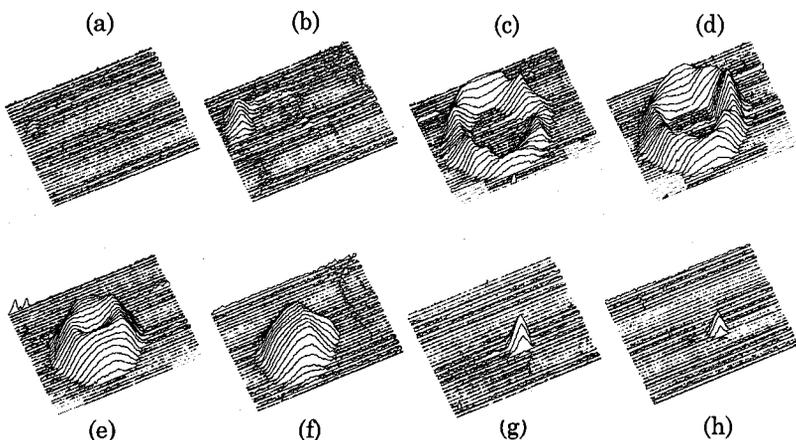


Fig.1 ^1H chemical shift imaging profiles of water in a PMAA gel with paramagnetic lanthanide Pr^{3+} ions sliced as a function of ^1H chemical shift, 6.10 ppm (a), 5.84 ppm (b), 5.58 ppm (c), 5.32 ppm (d), 5.06 ppm (e), 4.80 ppm (f), 4.54 ppm (g), and 4.28 ppm (h).

- [1] H.Yasunaga, H.Kurosu, I.Ando, *Macromolecules* 25(1992)6505. [2] T.Shibuya, H.Yasunaga, H.Kurosu, Iando, *Macromolecules* 28(1995)4377. [3] H.Kurosu, T.Shibuya, H.Yasunaga, I.Ando, *Polym.J.*28(1996)80. [4] A.Yamazaki, Y.Hotta, H.Kurosu, I.Ando, *Polymer* 39(1998)1511. [5] N.Tanaka, S.Matsukawa, H.Kurosu, I.Ando, *Polymer* 39(1998)4703. [6] H.Hotta, H.Kurosu, I.Ando, *Polym.Gels Networks* 6(1998) [7] H.Yasunaga, M.Kobayashi, S.Matsukawa, H.Kurosu, I.Ando, *Ann.Rep.NMR Spectrosc.*34(1997)39. [8] I.Ando, H.Kurosu, S.Matsukawa, A.Yamazaki, Y.Hotta, N.Tanaka, *Polym.Networks Rev.*1(1998)331.

P 120 ^1H 間距離測定のための ^1H - ^1H 二量子双極子結合を用いた
固体 MAS 二次元 $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ 化学シフト相関法

(阪大蛋白研) ○松木陽、藤原敏道、阿久津秀雄

Two-dimensional $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ Chemical Shift Correlation Spectroscopy
for the Measurement of ^1H - ^1H Distances by Recoupling of
Homonuclear ^1H Double-Quantum Dipolar Interactions

Yoh Matsuki, Toshimichi Fujiwara, and Hideo Akutsu

Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

The ^1H - ^1H distance information is useful for elucidating the molecular structure. However, the low resolution of the proton NMR spectrum in solids hampers the direct observation of the proton signals to determine the inter-proton distances. We show that the side-chain conformation of the fully ^{13}C -labeled L-valine can be determined on the basis of the inter-proton distance obtained with ^1H - ^1H DQ-dipolar interaction recoupled under the POST-C7 sequence. Our method provides the inter-proton distances via high-resolution ^{13}C spectra. The DQ-dipolar coupling transfers the initial proton magnetization to the other protons in positive and negative intensity when, respectively, odd and even number of protons intermediate between the source and destination spins in the transfer process. With this feature, our experiment discriminates the direct magnetization transfer (with zero intermediating proton) from the relayed one. Inspection for the side chain conformation of valine as an example revealed that the inter proton distance d_{12} can be obtained accurately at $d_{12} \lesssim 3\text{\AA}$.

はじめに

核スピン間の双極子相互作用を利用して核間距離を見積もることができる。 ^{13}C で均一に標識された有機固体試料では通常、ある ^{13}C 原子にとって共有結合している隣接 ^{13}C 原子が最も近接していて、双極子結合のネットワーク内で支配的な影響を及ぼす。これは分子構造の決定に重要な長距離の核間距離情報を観測しにくくする。また一般的に一次構造上離れた ^{13}C 原子は分子の折りたたみがあっても ^1H 原子同士ほど空間的に接近しない。したがって分子構造の決定には ^1H 間距離の測定がより重要である。しかしながら固体系で ^1H の NMR スペクトルは分解能が低く、 ^1H 信号の観測から ^1H 間距離を見積もることは難しい。

最近 Levitt らが RF パルス照射の対称性に基づいてスピン間相互作用を MAS 条件下でリカップリング/デカップリングする一般的な方法を報告した [1]。C7 $_{\frac{1}{2}}$ (POST-C7) [2], C5 $_{\frac{1}{2}}$ (SPC5) [3] といった対称性のパルス列で同種核二量子双極子相互作用をリカップリングできる。我々は POST-C7 を使ってリカップリングした ^1H - ^1H 二量子双極子相互作用を用いた混合期を通じて ^{13}C 磁化を観測することで ^1H 間距離を見積もる新しい方法を報告する。この方法は ^{13}C 信号の高い分解能を利用して ^{13}C 均一標識した試料について ^1H 間距離情報を一度に多数収集することができる。ある ^1H 上の初期磁化が奇数および偶数の二量子双極子相互作用を介して別の ^1H に移動すると、対応する信号はそれぞれ負および正の符号をもつ。この特徴を利用すると直接の磁化移動(信号は負)を間接的なものと区別することができるので正確な ^1H 間距離を得ることができる。

水素核間距離、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、固体 NMR
まつきよう、ふじわらとしみち、あくつひでお

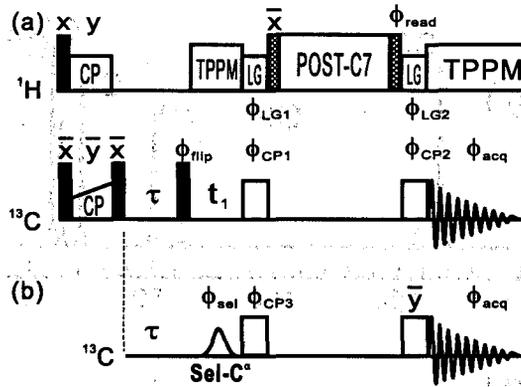


FIG. 1: Pulse scheme for a ^1H - ^1H DQ-dipolar coupling-mediated $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -chemical shift correlation experiments (a), and its 1D version (b). The filled and hatched rectangular pulses represent 90° and 54.7° pulse, respectively.

方法

図 1 には ^1H - ^1H 二量子双極子相互作用を混合期に用いた二次元 $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ 化学シフト相関実験と、その一次元版のパルススキームが示してある。 t_1 期に等方化学シフトで展開された ^{13}C 磁化は ^1H - ^1H 双極子相互作用をデカップリングする Lee-Goldburg CP (LGCP) で ^1H に移され ^1H - ^1H 二量子双極子相互作用で時間 τ_m のあいだ混合される。再び LGCP で ^{13}C に戻された磁化が t_2 期に観測される。図 1(b) では磁化は C^α に選択的に励起されて最初の LGCP に入力される。CH 間の磁化移動にごく短い期間 ($80\mu\text{s}$) の LGCP を用いることで、共有結合した CH スピン間の磁化の交換を強調している。POST-C7 が必要とする ^1H への強い RF 磁場が τ_m 中の CH 双極子相互作用を効果的に除くので、観測する ^{13}C 磁化の τ_m 依存性は ^1H - ^1H 二量子双極子相互作用の影響をおもに反映する。すべての実験は試料回転周波数 $\nu_R = 13\text{ kHz}$ 、 ^{13}C の共鳴周波数 125.1 MHz で分光器はバリアン社 Infinity-plus 500 を用いて行った。プローブには 3.2 mm 径スピナー用の二重共鳴プローブを用いた。

パルススキーム (LGCP₁-POST-C7-LGCP₂) の下でのスピンドYNAMIX をバリン分子のモデル 7 スピン系 H^α - C^α ($-\text{H}^N$)- C^β - H^β ($-\text{H}^{\gamma 1}$)-($-\text{H}^{\gamma 2}$) について数値計算した。バリン分子内のふたつの γ メチル基とアミノ基に各々 3 つずつあるジェミナルプロトンはそれぞれ仮想的なプロトン $\text{H}^{\gamma 1}$ 、 $\text{H}^{\gamma 2}$ 、 H^N をひとつずつ割り当てて代表させている。

結果、考察

図 2 は CP と、図 1(b) のパルススキームで得た [^{15}N , ^{13}C] 均一標識バリン粉末試料の ^{13}C 化学シフトスペクトルである。図 2(b) に見られる C^β の負の信号は $\text{C}^\alpha \rightarrow \text{H}^\alpha \rightarrow \text{H}^\beta \rightarrow \text{C}^\beta$ の経路を移動した磁化による。 C^γ にも見られる負の信号は H^α が H^γ とも弱いながら直接の双極子結合を持つことを示している。図 3 は C^α と C^β の信号強度の τ_m 依存性について、実験と数値計算の結果を示している。実験で得た依存性 (黒丸) はがゴースク配座のバリン側鎖 ($\chi = 60^\circ$, H^α - H^β 間距離は 2.47 \AA) に対する数値計算で得たもの (実線) と一致している。計算では同一分子内に存在するプロトンの影響だけを考慮した。実験と計算の良い一致から磁化移動 $\text{H}^\alpha \rightarrow \text{H}^\beta$ への他のプロトンの影響を考えると、短い τ_m では分子内のものを考慮すれば充分だと分かる。 C^β 信号強度の τ_m 依存性は χ の変化に対して $0^\circ \leq \chi \leq 60^\circ$ の範囲で大きく変化するが $60^\circ \leq \chi \leq 180^\circ$ では比較的变化が小さい。これは χ が大きい配座ほど双極子結合 H^α - H^β に H^γ がより強く影響するからである。トランス配座 ($\chi = 180^\circ$, H^α - H^β 間距離は 3.02 \AA) では τ_m 依存性は特徴のないごく小さい

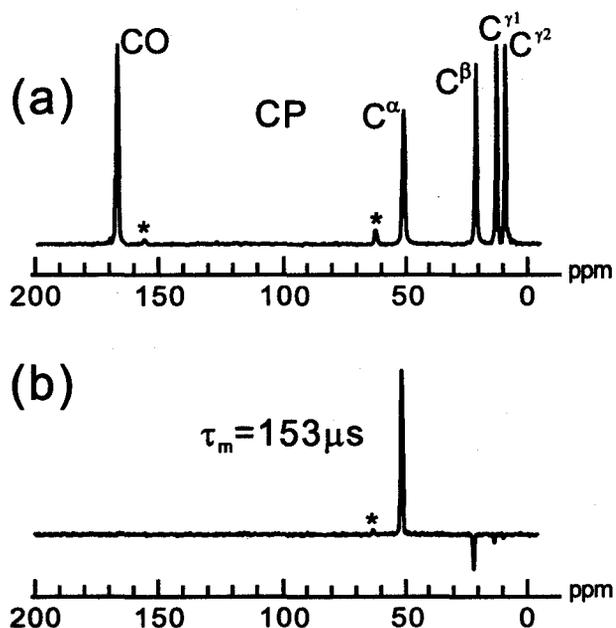


FIG. 2: Carbon-13 high resolution spectra of U-[^{15}N , ^{13}C] L-valine obtained with CP MAS (a), and with the pulse scheme shown in Fig. 1(b) at the H-H DQ-dipolar mixing time $\tau_m = 153 \mu\text{s} = 2\tau_R$ (b). The asterisks denote the spinning side bands.

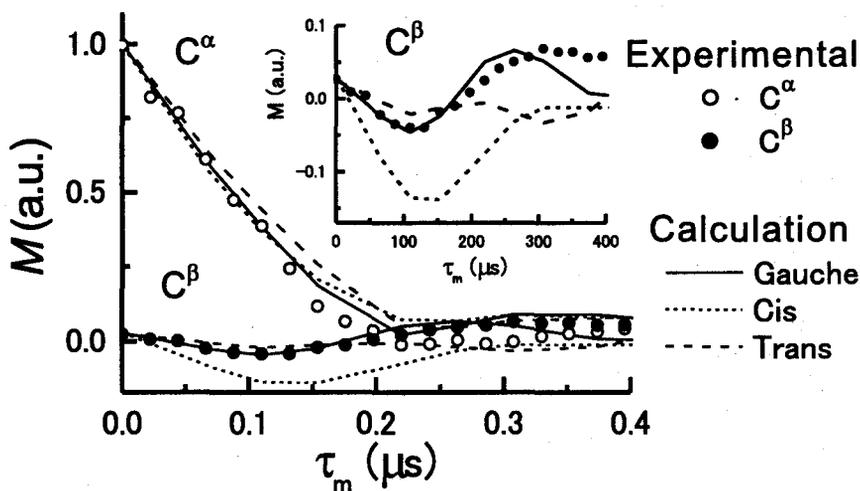


FIG. 3: The mixing time-dependence of C^α - and C^β -signal intensity obtained by experiments (circles) and numerical calculations (lines). The y scale for the C^β signal is expanded in the inset. The pulse scheme shown in Fig. 1(b) was used in the experiments. The time dependence was calculated for valine molecules with side chains in gauche (solid line), trans (dashed line), and cis (dotted line) conformations.

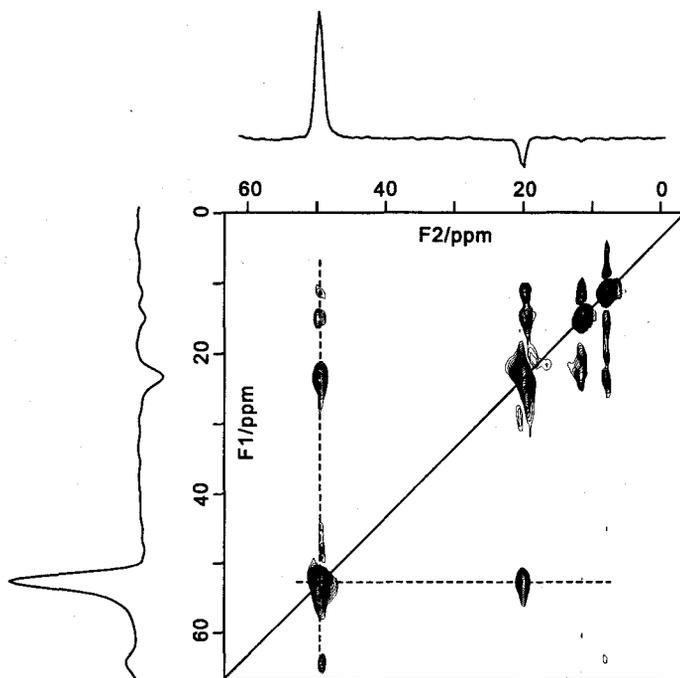


FIG. 4: The aliphatic carbon region of the 2D H-H DQ-dipolar coupling-mediated C/C-chemical shift correlation spectrum, and the slice spectra taken along the dashed lines. The spectrum was obtained with the pulse scheme shown in Fig. 1(a) under the sample spinning rate of 13 kHz. The mixing time was 153 μ s.

振動しか見せなかった（破線）。したがって我々の方法は、バリウム分子のような ^1H 密度の高いスピ
ン系では3 Å以下の ^1H 間距離を正確に見積もるのに適していると言える。

図4は図1(a)のスキームを用いて観測した二次元H-H二量子双極子混合C/C化学シフト相関ス
ペクトルの脂肪族 ^{13}C 領域の拡大である。F1軸に沿って破線のところで取ったスライススペク
トルから分かるように $\text{C}^\alpha\text{-C}^\beta$ 間、 $\text{C}^\alpha\text{-C}^\gamma$ 間のクロスピークともに負の強度を示している、 H^α は
 H^β にも H^γ にも直接的に双極子結合している事がわかる。各クロスピーク強度は相関するふたつ
の ^{13}C に共有結合した ^1H 間距離に依存している。 CH_2 のふたつの ^1H への距離を分離して観測す
ることはできないが、これは一方のプロトンを立体特異的に重水素化すれば可能になる。我々の方
法はひとつの二次元データセットから、複数の ^1H 間距離情報を一度に抽出できるので、 ^{13}C 均一
標識試料の効率的な構造解析に有用だと思われる。

参考文献

- [1] A. Brinkmann and M. H. Levitt, *J. Chem. Phys.* **115**, 357–384 (2001).
- [2] M. Hohwy, H. J. Jakobsen, M. Edén, M. H. Levitt, and N. C. Nielsen, *J. Chem. Phys.* **108**, 2686–2694 (1998).
- [3] M. Hohwy, C. M. Reinstra, C. P. Jaroniec, and R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **110**, 7983–7991 (1999).

Distance measurement by the magnetization transfer due to ^1H - ^1H zero quantum dipolar interaction with ^{13}C detection under MAS conditions

Hiroki Takahashi, Toshimichi Fujiwara and Hideo Akutsu

Institute for Protein Research, Osaka University, Suita 565-0871, Japan

The measurement of ^1H - ^1H distances is one of the most useful methods to characterize molecular structures. A new ^{13}C -detected solid-state NMR experiment for determining the ^1H - ^1H distance under MAS conditions is demonstrated. The rate of the direct magnetization transfer by ^1H - ^1H zero quantum dipolar interaction is monitored through ^{13}C spins in this experiment, since ^1H spectra are too broad to quantify the signal intensity even under fast MAS. The mechanism of the transfer between two protons in a ^1H - ^{13}C - ^{13}C - ^1H moiety of an organic molecule is revealed. The ^{13}C - ^1H dipolar interactions reintroduce ^1H - ^1H dipolar interactions during the mixing period. The pulse sequence for this experiment was applied to uniformly [^{13}C , ^{15}N]-labeled valine. The distance between the protons was determined by fitting the calculated values to the experimental ones. The obtained distance of 2.6 Å between H^α and H^β allowed the distinction between conformers. This method can be extended to 2D NMR for protein structures.

“序”

溶液状態では 2D-NOESY 法で得られるような ^1H 間距離情報は構造解析をする上で重要である。隣接する ^{13}C 間距離情報は構造情報を持たないのに対し、 ^1H 間では二面角のような構造情報を与える。固体 NMR においては双極子相互作用が強く複雑であるため、近接した ^1H 間の距離を決めるのは難しく、現在はドメイン間のような長い距離の測定がスピンの拡散法を用いて行われている¹。本研究では ^{13}C 標識した固体について 2D-NOESY 法と同様な ^1H 間距離情報を得る方法を開発した。高いスペクトル分解能を得るため ^1H 間の磁化移動は MAS 条件下で ^{13}C を通じて観測し、そこで働く ^1H - ^1H 双極子相互作用を理論的に検討した。

“理論”

高速 MAS 条件下で 4 スピン系 $I^1 - S^1 - S^2 - I^2$ に働く双極子相互作用は単純化すると、下記のように表される。

$$\mathcal{H}_{DD} = \mathcal{H}_{I^1 I^2} + \mathcal{H}_{S^1 I^1} + \mathcal{H}_{S^2 I^2} \quad (1)$$

固体 NMR、MAS、 ^1H 間距離測定、 ^1H スピン拡散、 ^{13}C 標識アミノ酸

たかはしひろき、ふじわらとしみち、あくつひでお

$$\mathcal{H}_{I_1 I_2} = \frac{1}{\sqrt{6}} A_{20, I_1 I_2}^{\text{LAB}} \left\{ I_{1z} I_{2z} - \frac{1}{4} (I_1^+ I_2^- + I_1^- I_2^+) \right\} \quad (2)$$

$$\mathcal{H}_{S, I_1} = \sqrt{\frac{2}{3}} A_{20, I_1 S_1}^{\text{LAB}} I_{1z} S_{1z} \quad (3)$$

ここで、 I は ^1H を S は ^{13}C を表し、 $A_{20, I_1 I_2}^{\text{LAB}}$ は核間ベクトルの配向に依存した実験室系の相互作用テンソル要素である。 ^1H 間双極子相互作用ハミルトニアンに時間推進演算子 $U(t) = \exp\left[-i\int_0^t \{\mathcal{H}_{S, I_1}(t') + \mathcal{H}_{S, I_2}(t')\} dt'\right]$ を作用させると、ゼロ次の平均ハミルトニアンは(4)式のように表される。

$$\begin{aligned} \overline{\mathcal{H}}_{\text{DD}}^{(0)} &= \frac{1}{\tau_R} \int_0^{\tau_R} \exp\left[i\int_0^t \{\mathcal{H}_{S, I_1}(t') + \mathcal{H}_{S, I_2}(t')\} dt'\right] \mathcal{H}_{I_1 I_2} \exp\left[-i\int_0^t \{\mathcal{H}_{S, I_1}(t') + \mathcal{H}_{S, I_2}(t')\} dt'\right] dt \\ &= \frac{1}{\sqrt{6}\tau_R} \int_0^{\tau_R} A_{20, I_1 I_2}^{\text{LAB}}(t) \left[I_{1z} I_{2z} - \frac{1}{2} \{ I_{12,x}^{\text{ZQ}} \cos \Phi_{12}(t) + I_{12,y}^{\text{ZQ}} \sin \Phi_{12}(t) \} \right] dt \end{aligned} \quad (4)$$

$$\text{ここで、} \Phi_{12}(t) = \int_0^t \sqrt{\frac{2}{3}} \{ A_{20, I_1 S_1}^{\text{LAB}}(t') S_{1z} - A_{20, I_1 S_2}^{\text{LAB}}(t') S_{2z} \} dt' \quad (5)$$

である。 τ_R は試料回転の周期を、 $I_{12,x}^{\text{ZQ}}$ はゼロ量子スピン演算子の x 成分である。(4)式より、 $A_{20, I_1 I_2}^{\text{LAB}}(t)$ と $\Phi_{12}(t)$ の時間依存性が干渉するため、 ^{13}C - ^1H 双極子相互作用の動きにより、高速MAS条件下においても ^1H - ^1H 双極子相互作用は消失しないことを導ける。 $\overline{\mathcal{H}}_{\text{DD}}^{(0)}$ によるパワースペクトルを図1に示す。 ^1H - ^1H 距離が2.6 Åの時 ^1H - ^1H 双極子相互作用によるスペクトルの幅は約4 kHzである。

方法

1. 実験

今回用いた1次元のパルス系列を図2に示す。 ^{13}C 磁化をCPで増幅し、その後のGaussianパルスによって ^{13}C のみを選択励起させる。2つ目のCPでは ^{13}C から ^1H へ磁化移動させ ^1H コ

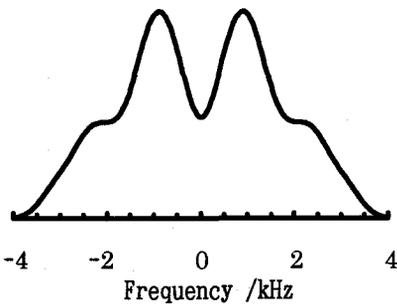


Figure 1. Dipolar powder spectrum based on the average Hamiltonian $\overline{\mathcal{H}}_{\text{DD}}^{(0)}$. The parameters are the same as those described below in the simulation section. MAS at 12.5 kHz

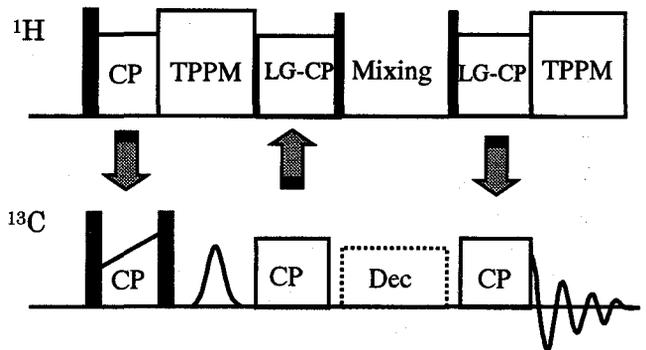


Figure 2. Pulse sequence used for the 1D ^1H - ^1H magnetization transfer experiment with ^{13}C detection under MAS. The initial ^{13}C magnetization is selectively prepared by the Gaussian pulse. The thin and thick dark pulses represent 90° and 54.7° pulses, respectively. TPPM: two pulse phase modulation decoupling, LG-CP: Lee-Goldburg cross polarization.

ヒーレンスを作り出す。このとき、 ^1H 間で混合が起こらないように ^1H にはLee-Goldburg(LG)スピロックを掛ける³。LGにおける有効磁場は静磁場からマジック角だけ傾いているため、 54.7° パルスを混合期の前後に照射している。 ^1H を混合させたあと、LG-CPによって ^{13}C に磁化が移される。最後にTPPMを用いて ^1H をデカップリングさせながら ^{13}C を観測する。試料として20%塩酸中で結晶化させた $u\text{-}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]\text{-L-Val HCl}$ を用いた。

2. シミュレーション

^1H および ^{13}C の双極子相互作用を含む時間依存ハミルトニアンを数値積分することで、4スピン系における時間発展を計算した。4スピン系にアミノ基の ^1H をその回転の重心に1つ加えたものを5スピン系とし、さらに2つのメチル基の ^1H を同様に加えたものを7スピン系とした。

//結果//

図3は上記のシミュレーションを用いた4~7スピン系の比較である。 ^{13}C デカップリング強度が0 kHzと80 kHzにおける混合時間依存性を示している。混合時間が $80\mu\text{s}$ ではどのスピン系でもほぼ同じ値を示している。混合時間が長くなるにつれて ^{13}C デカップリングした時は4スピン系と他のスピン系での差が大きくなっており、デカップリングしない時はどのスピン系の差も大きくなっている。デカップリングをしない時は単純に ^1H の数が多いほうが早く磁化移動している。第3番目の ^1H との $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ 双極子相互作用が $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$ 双極子相互作用と同じ働きをするため、5スピン系以上のスピン系ではデカップリングを行って $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$ 双極子相互作用を除去しても、磁化は移動する。 $80\mu\text{s}$ のような短い混合時間で考える限りは、磁化移動は4スピン系で説明できる。7スピン系でシミュレーションを行うと4スピン系より0.1 Å小さな値をとるため、 $\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta$ が一定でも、注目する部分のプロトン密度に依存して0.1 Å程度変化することがわかる。

^{13}C デカップリング強度を変化させたときの $\text{H}^\alpha \rightarrow \text{H}^\beta$ 磁化移動の実験結果を図4に示す。MASの回転速度は12.5 kHzである。CP過程において $\text{C}^\alpha \rightarrow \text{H}^\beta$ 、 $\text{H}^\alpha \rightarrow \text{C}^\beta$ という磁化移動の結果、 $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ 双極子結合による混合時間0の時でも磁化は移動している。混合時間 $80\mu\text{s}$ において ^{13}C デカップリングを行わない時の磁化移動の割合を4スピン系のシミュレーションと比較することで、 $\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta$ 間の距離を2.5-2.6 Åと見積もることができた。

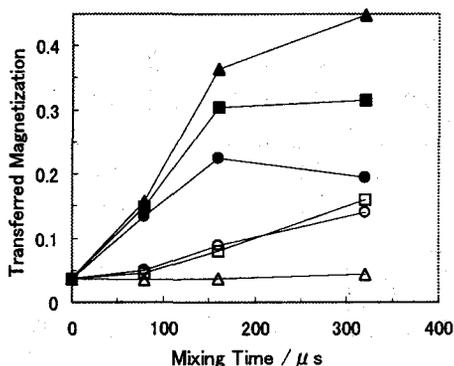


Figure 3. Calculated magnetization transfer from $^{13}\text{C}^\alpha$ to $^{13}\text{C}^\beta$ in various spin systems as a function of mixing time. Data at ^{13}C decoupling strength of 0 kHz (filled symbols) and 80 kHz (open symbols) are shown. Triangles, squares and circles represent four, five and seven-spin systems, respectively.

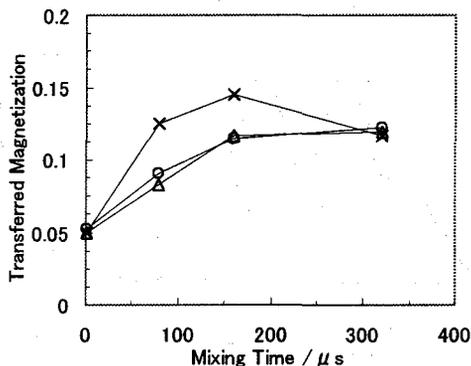


Figure 4. Experimental magnetization transfer from $^{13}\text{C}^\alpha$ to $^{13}\text{C}^\beta$ for powdered uniformly $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -labeled L-valine hydrochloride. The dependence of mixing time is shown at ^{13}C decoupling strength of 0 kHz (crosses), 40 kHz (circles) and 80 kHz (triangles).

“考察”

今回用いた方法で H^{α} - H^{β} 間距離を 2.5-2.6 Å と決定することができたが、中性子線回折による結果ではその距離は 2.465 Å である。今回得られた値は中性子線回折で得られた値より約 3.4% 大きな値となっている。これは分子運動により NMR では X 線や中性子線を用いる結晶構造解析結果より若干長めの距離が得られることによる³⁾。また、 H^{α} - H^{β} 間距離を求めることにより、このバリンはゴーシュ構造を取り、中性子線による結果と一致する。 ^{13}C - 1H 双極子結合にも 1H は依存するので、磁化移動の速度は C^{α} - C^{β} まわりの二面角にも大きく依存している。

H^{β} 磁化は 160 μs で極大値に達しており、 1H 間磁化移動を 1H スピン拡散過程として拡散定数を見積もると、0.07-0.1 nm^2/ms となる。 H^{α} 磁化の初期値に対する 160 μs の混合時間における H^{β} 磁化の割合を、実験と計算と比較した。その結果は H^{α} の最隣接 1H スピンが 5 個あるモデルと一致した。これまで硬い有機固体分子に対する 1H スピン拡散係数はおよそ 0.6-0.8 nm^2/ms と報告されている¹⁾。今回の結果がそれよりも小さな値を取るの、今までに比べて MAS の回転速度が 2 から 3 倍速く、 1H - 1H 双極子相互作用が弱まっているなどのためであろう。

図 2 のパルス系列において Gaussian パルスの代わりに、その部分を、展開期にすることで、この方法は 2D NMR に拡張することができる。同じくバリンを試料に用いて得られた 2D NMR スペクトルを図 5 に示す。LG-CP の接触時間を H^{α} と H^{β} に最適な値にとっているため、メチル基の対角ピークの強度は極めて小さい。この 2D NMR 実験により様々な情報を同時に測定することができ、ペプチドやたんぱく質といった大きく複雑な分子に適用することができる。

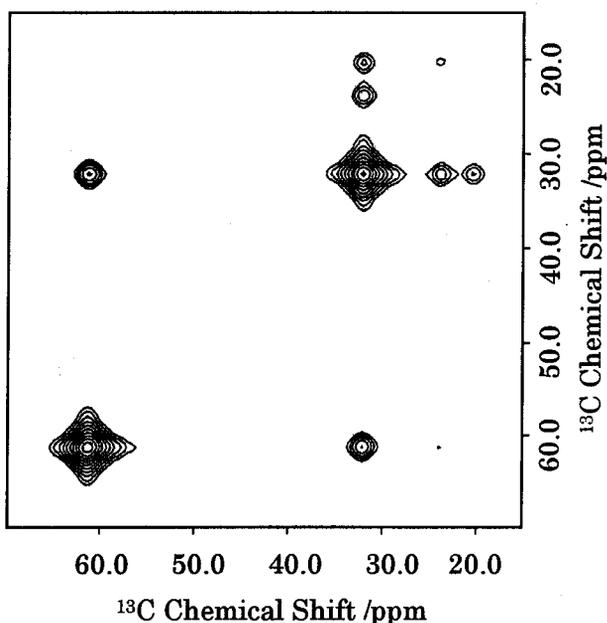


Figure 5. 2D ^{13}C NMR spectrum of fully ^{13}C -labeled valine obtained with the magnetization transfer experiment. The sample spinning frequency and the proton mixing time are 12.5 kHz and 80 μs , respectively without ^{13}C decoupling. LG-CP contact times were 80 μs . The assignments are C^{α} (61.3 ppm), C^{β} (32.2 ppm), CH_3 (24.0, 20.5 ppm) with DSS as external standard.

参考文献

1. K. Schmidt-Rohr and H. W. Spiess, "Multidimensional Solid-State NMR and Polymers," Academic Press, New York (1994)
2. B.-J van Rossum, C. P. de Groot, V. Ladizhansky, S. Vega, and H. J. M. de Groot *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3465-3472 (2000)
3. Y. Ishii and T. Terao *J. Chem. Phys.* **107**, 2760-2774 (1997)

Nuclear Overhauser Polarization (NOP)-MAS experiments for solid state proteins

(生物研¹、京大理学部化学²)

○加藤悦子¹、竹腰清乃理²、寺尾武彦²

Nuclear Overhauser Polarization (NOP)-MAS experiments for solid state proteins

(NIAS¹, Kyoto Univ.²)

Etsuko Katoh¹, Kiyonori Takegoshi² and Takehiko Terao²

A new ¹³C polarization technique using the nuclear Overhauser effect in rotating solid (NOP-MAS [1]) is applied to uniformly ¹³C, ¹⁵N-labeled proteins. It is shown that the observed NOP enhancement factor is 1.5 - 2.5, while that by cross polarization (CP) is ca. 1.0. Further, the enhancement occurs uniformly by NOP but not by CP. NOP is easy to carry out under fast MAS and works well even if molecules are mobile. These features would make NOP as alternative of CP.

[Introduction]

Cross polarization (CP) is a prerequisite technique for improving the sensitivity in solid-state NMR of dilute and/or low γ spin (S), such as ¹³C by using abundant ¹H spins (I) with a large γ_I . CP enhances the magnetization of the S spin with a low gyromagnetic ratio by $\sim\gamma_I/\gamma_S$ compared to the thermal equilibrium value. Recently, it is shown that NOP enhancement occurs for ¹³C spins in fast rotating groups such as CH₃ and the optimal enhancement factor in NOP is about 3.0 [1]. NOP has the advantage of quantitiveness, and is very easy to carry out, being insensitive to the adjustment of rf field intensity and requiring only very low rf power. In this work, these features are demonstrated for three kinds of uniformly ¹³C/¹⁵N-labeled proteins with two different sampling conditions.

[Experiments]

Uniformly ¹³C/¹⁵N labeled proteins (Yhh and thioredoxin from *E. coli*, RING finger domain of EL5 from rice) are produced using by an *E. coli* system. All samples were lyophilized from aqueous low-salt buffer and Yhh was precipitated from a (NH₄)₂SO₄-rich solution. NMR spectra were recorded at room temperature using a Chemagnetics CMX400 spectrometer.

キーワード : NOP、 protein、 solid state

かとう えつこ、 たけごし きよのり、 てらお たけひこ

[Results and Discussion]

Figure 1 shows the signal intensity of ^{13}C MAS spectra obtained for four kinds of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled proteins relative to the single 90° pulse experiment. For the experiment using CP, signal enhancement of each protein is 1 – 1.5 times relative to the single 90° pulse experiment. On the other hand, NOP enhancement is about 1.5 – 2.5 times. Fig.2 shows ^{13}C MAS spectra of Yhh(lyophilized) using a single 90° pulse, CPMAS and NOP. While ^{13}C CPMAS spectra show non-uniform enhancement depending on the contact time (ct), NOP occurred uniformly. Further, we compare each signal intensity in Table 1 showing high quantitiveness by NOP.

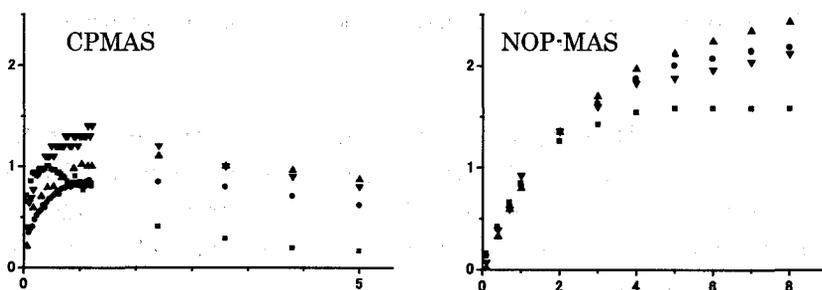


Fig.1 Contact-time (left) and NOP time (right) dependence of the area intensity of Yhh(precipitated)(■), Yhh(lyophilized)(●), Thioredoxin(lyophilized)(▼) and RING finger domain of EL5(lyophilized)(▲). Each area is normalized to the corresponding area intensity observed by a ^{13}C 90° pulse with a pulse delay of 10s.

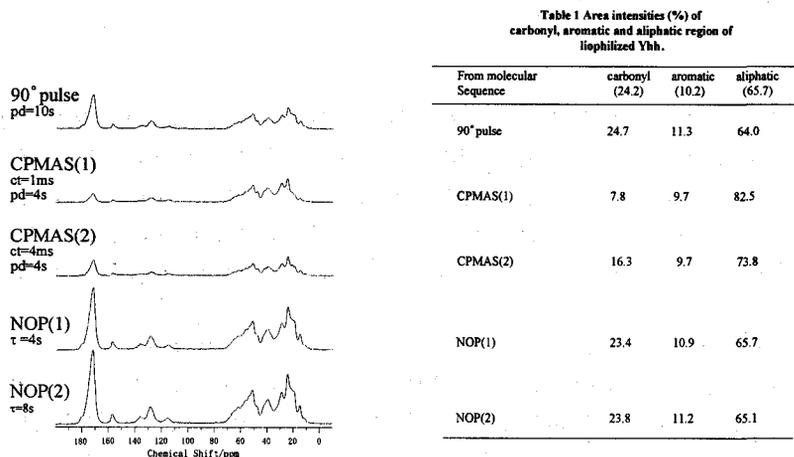


Fig. 2 90° pulse, CPMAS and NOP spectra of uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled Yhh (lyophilized)

Ref [1]: Takegoshi K. and Terao T. (2002) J. Chem. Phys. **117**, 1700-1707

ペプチド主鎖の構造決定

(京大院理) ○溝上 潤、大橋竜太郎、水野 敬、竹腰清乃理、寺尾武彦

Determination of peptide torsion angles by correlation of N-H and C-H dipolar interactions in solid state NMR

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

○ Jun Mizokami, R. Ohashi, T. Mizuno, K. Takegoshi, and Takehiko Terao

We show a 2D solid state NMR experiment enabling us to determine all ϕ angles at once in a fully ^{13}C and ^{15}N -labeled peptide. A torsion angle ϕ can be determined from 1D NMR experiment by correlating ^{13}C - ^1H and ^{15}N - ^1H dipolar interactions[1]. By adding ^{13}C high-resolution dimension to the 1D C-H/N-H correlation experiment, all ϕ angles can be obtained by one 2D experiment.

これまで我々はペプチドの二面角 ϕ の決定法として、FSLG $m(-2m)m$ 法[2]を用いることで高速 MAS 条件下での C-H/N-H 双極子2次元相関実験[1][3]を行い、さらに、1次元相関実験でも同様に二面角 ϕ を精度良く決定することが可能であることを示した[1]。本発表では、この1次元相関実験に高分解能スペクトルの次元を加えた2次元実験を行うことで、主鎖を ^{13}C , ^{15}N でフルラベルしたペプチド試料の二面角 ϕ を複数同時決定が可能であることを示す。

【手法】

本手法では Fig.1 のスピン系を想定して Fig.2 のパルス系列を用いた。このパルス系列ではまず ^{15}N に磁化を作り、FSLG1(-2)1 を $m \times t_R$ の期間かけることによって ^1H - ^{15}N 間の双極子相互作用の情報を織り込む。次に ^{15}N の磁化をそれぞれの N と直接結合している C_α に移し、その後 FSLG1(-2)1 によって C-H の双極子相互作用を復活させることで、 t_1 次元に N-H/C-H の 1 次元相関情報を得る。最後に時刻 t_2 で ^{13}C の高分解能スペクトルを観測することにより、ペプチド主鎖内の ϕ に関する情報を複数得る。

なお、Fig.2 では $t_1 > (n-1)t_R$ の場合のパルス系列を示したが、 $t_1 \leq (n-1)t_R$ のときは FSLG1(-2)1 パルスを $t_{1a} = t_1$ だけかけた後、パルス系列の最後まで TPPM decoupling を続けるものとする。このように ^{13}C の 180° パルス前後それぞれ t_R の期間に FSLG を照射しないのは、 ^{13}C のパルス照射と ^1H の FSLG 照射が重なることによって双極子相互作用の復活が不完全になるのを避けるためである。

キーワード： 固体 NMR、MAS、ペプチド主鎖構造、ペプチド主鎖二面角、2D 相関 NMR

○みぞかみ じゅん、おおはし りゅうたろう、みずの たかし、

たけごし きよのり、てらお たけひこ

【実験】

まず手法の有効性を確認するため、既に構造解析の行われている N-acetyl[1,2-¹³C-¹⁵N]DL-valine を試料として Fig.2 の実験を行った。この実験は ¹H 共鳴周波数 400MHz の磁場において CMX Infinity 分光計と Doty 5 φ 三重共鳴プローブを用いて行った。この実験で得られた 2 次元スペクトルの 1 次元スライスシミュレーション結果と比較し(Fig.3)、φ=156° という結果が得られた。これは、X線による結果 φ=154° [4]、NMR による結果 φ=155° [3] とほぼ一致する。

会場では、主鎖を ¹³C・¹⁵N でラベルした 4 残基ペプチド Phe-Ile-Gly-Leu-NH₂ について本手法を適用した結果について発表する。

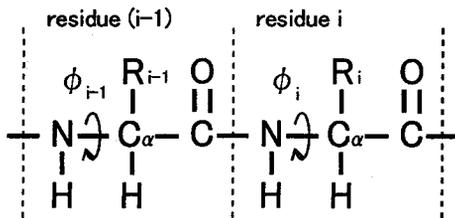


Fig.1. Spin system to be considered.

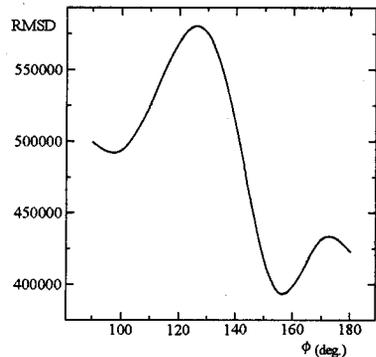


Fig.3. Dihedral angle φ dependence of RMSD between calculated and the experimental spectra.

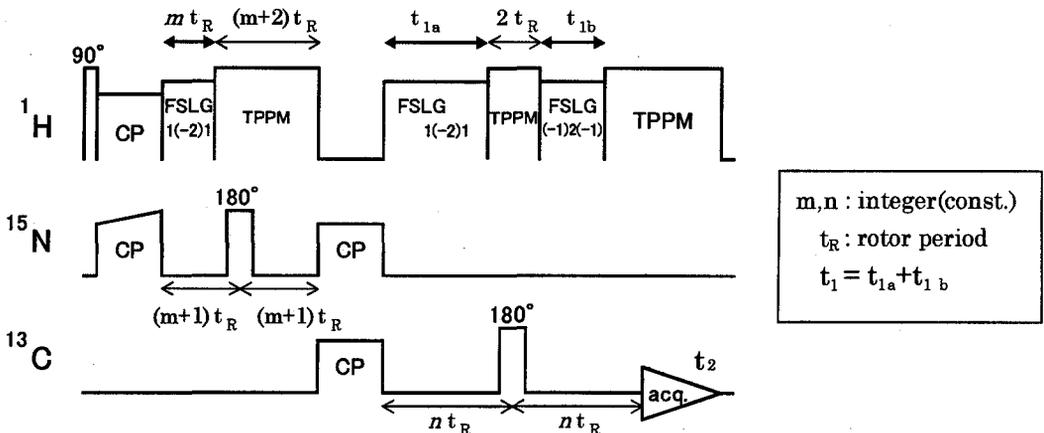


Fig.2. Pulse sequence to determine all φ angles.

References

- [1] K.Takegoshi, Takayuki Imaizumi and Takehiko Terao, *Solid State NMR* 16, 271 (2000).
- [2] K.Takegoshi and T.Terao, *Solid State NMR* 13, 203 (1999).
- [3] 今泉孝幸, 竹腰清乃理, 寺尾武彦, 第 38 回 NMR 討論会要旨集, 221 (1999).
- [4] P.J.Carroll, P.L.Stewart, S.J.Opella, *Acta Cryst.* C46, 243(1990).

Cross polarization via the non-Zeeman spin reservoir under MAS
(Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University)

○ R. Ohashi, K. Takegoshi, T. Terao

In setting a $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ heteronuclear correlation (CN-HETCOR) experiment under MAS, we unexpectedly found ^{13}C magnetization transferred from ^1H without ^1H radiation. Since removal of this magnetization is pre-requisite for a CN-HETCOR experiment, we examined the origin and the nature of this magnetization. We found that Vieth and Yannoni [1] examined polarization transfer via a non-Zeeman spin reservoir for a static sample using a similar pulse sequence. In their work, it was postulated that the origin is ^1H dipolar order created during spin locking. Our observation indicates that the dipolar order does live long enough for polarization transfer to ^{13}C even under MAS. As the behavior of the dipolar order under MAS is of interest, we examined ^1H to ^{13}C polarization transfer under MAS ($\nu_r=12\text{kHz}$) by the pulse sequence shown in Fig. 1 using l-alanine as a sample.

In Fig. 2, we compare the ^{13}C spectrum taken by using CP with taken by using the sequence in Fig. 1 with the following conditions : the ^1H rf power (ν_1^H) of 37 or 52kHz, the ^1H irradiation time (τ_{SL}^H) of $60\mu\text{s}$, the ^{13}C rf power (ν_1^C) of 38kHz, and the ^{13}C irradiation time (τ_{SL}^C) of $20\mu\text{s}$. In Fig. 3, we plotted the intensity of the C_α peak of l-alanine as a function of the ^{13}C rf power (ν_1^C). Fig. 4 shows the ^1H spin-lock power dependence. Fig. 5 shows dependences of the CH peak intensity on the interval between the ^1H spin-locking and the ^{13}C rf pulse at the optimal condition. The dependence is fourier transformed to exhibit clear peaks at $n\nu_r$ ($n = 0, \pm 1, \pm 2$) (Fig. 6). This result shows that the ^1H dipole order is modulated by MAS. We also examined ^1H to ^{15}N polarization transfer by this sequence. The largest signal intensity was about 1/10 for the amide nitrogen in ^{15}N labeled N-acetyl valine when compared to the CP signal intensity. The MAS modulation and the short life time (T_{1D}) make it difficult for the present polarization-transfer mechanism under MAS to be useful, nevertheless it is important to take account of the mechanism to avoid unwanted magnetization. The effect of the magnetization created via the present mechanism can be removed in a CN-HETCOR experiment by alternating ^{15}N rf phases properly.

[1] H. M. Vieth, C. S. Yannoni; Chem. Phys. Let. **205**, 153, 1993.

Key words : Cross polarization, Magic angle spinning, Dipole order

おおはし りゅうたろう、たけごし きよのり、てらお たけひこ

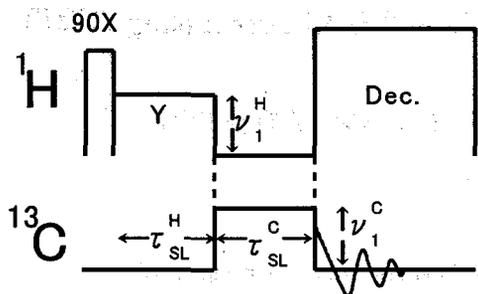


Fig. 1 : Pulse sequence for cross polarization via non-Zeeman order.

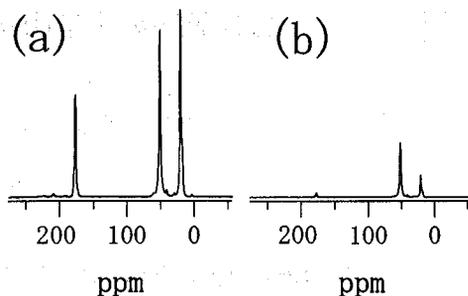


Fig. 2 : ^{13}C MAS spectra of l-alanine using (a) CP and (b) the sequence in Fig. 1. The CP contact time was 0.5 ms / and the condition for (b) are given in the text.

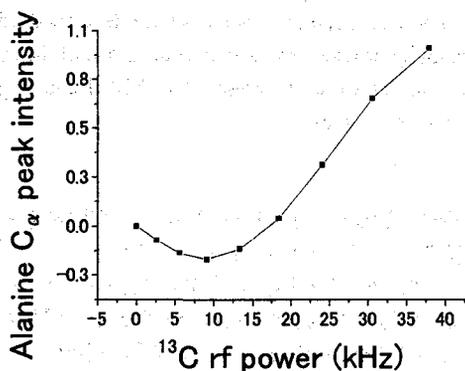


Fig. 3 : Dependence of the normalized $^{13}\text{C}_\alpha$ peak intensity on the ^{13}C rf power (ν_1^{C}) with $\tau_{\text{SL}}^{\text{H}} = 60 \mu\text{s}$, $\tau_{\text{SL}}^{\text{C}} = 20 \mu\text{s}$, and $\nu_1^{\text{H}} = 52 \text{kHz}$.

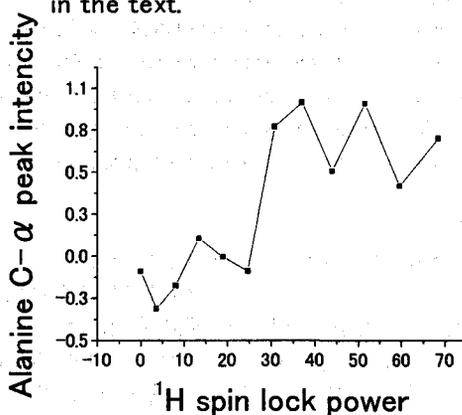


Fig. 4 : Dependence of the normalized $^{13}\text{C}_\alpha$ peak intensity on the ^1H rf power (ν_1^{H}) with $\tau_{\text{SL}}^{\text{H}} = 60 \mu\text{s}$, $\tau_{\text{SL}}^{\text{C}} = 20 \mu\text{s}$, and $\nu_1^{\text{C}} = 38 \text{kHz}$.

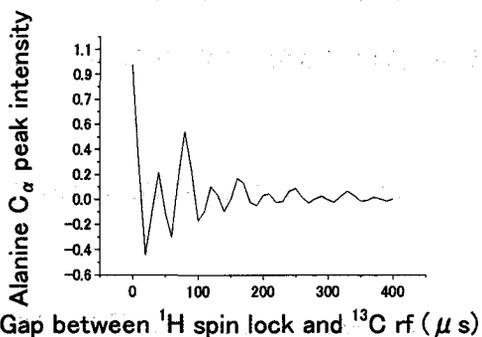


Fig. 5 : Dependence of the normalized ^{13}C peak intensity on the internal time between the ^1H spin-locking pulse and the ^{13}C rf in the Fig. 1 pulse sequence with $\tau_{\text{SL}}^{\text{H}} = 60 \mu\text{s}$, $\tau_{\text{SL}}^{\text{C}} = 20 \mu\text{s}$, $\nu_1^{\text{H}} = 52 \text{kHz}$, and $\nu_1^{\text{C}} = 38 \text{kHz}$.

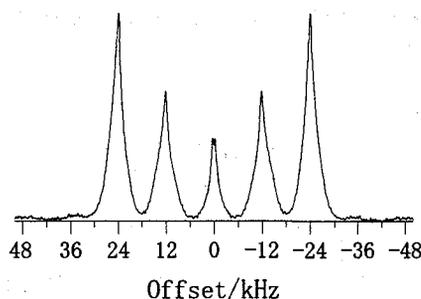


Fig. 6 : A fourier transformed spectrum of the time dependent signal in Fig. 5.

(バリアンテクノロジーズジャパン、東京農工大)

芦田 淳

XiX decoupling for Solid State ^{13}C NMR at Moderate Sample Spinning Speed.

Jun Ashida

Varian Technologies Japan Ltd., Tokyo University of Agriculture and Technology

In order to analyze the detailed local structure and dynamics by NMR spectroscopy, it is necessary to obtain high resolution spectra. For solid state NMR, continuous wave (CW) decoupling has been normally used to obtain high resolution ^{13}C solid state NMR spectra. Recently, several new decoupling techniques have developed using phase and/or amplitude modulation. XiX (X inverse-X) decoupling provided by Detken et al. is one of the most robust decoupling scheme for high spinning speed ($>20\text{kHz}$). In this work, we present that XiX decoupling is also effective under moderate sample spinning speed some mobile samples.

【緒言】

固体、溶液を問わず、NMR 分光法を用いて局所構造や運動性の詳細な解析を行う際に最も重要なことの一つは、一つ一つの信号が分離された高分解能のスペクトルを得ることである。特に ^{13}C NMR では、観測核と ^1H との間の異種核間スピンスピン結合による線幅の広がりをどのように抑えるかが問題となる。溶液 NMR では、GARP, WURST などの様々な broadband decoupling 法が開発されているが、固体 NMR では長い間連続波 (continuous wave : CW) decoupling 法が一般に用いられてきた。しかし、ここ数年の分光計の発展に伴い、高速でパルスの位相・強度・周波数の切替を行えるようになって、Two-Pulse Phase-Modulation (TPPM)法[1]を初めとする様々な decoupling 手法が発表されてきている[2-4]。

今年 Detken らは XiX (X inverse-X) decoupling を発表した[5]。TPPM などでは調整すべきパラメータが2つ以上あるのに対して、XiX decoupling ではパルス幅1つだけであり、より簡便な手法と言える。ただし彼らは、XiX decoupling が有効に働くためには、20kHz 以上の高速回転と 100kHz 以上の高出力 RF が必要であると述べている。

本発表では、XiX decoupling は 10kHz 以下の中低速回転下でも運動性の高い試料に対しては十分有効であることを示す。

【実験】

NMR 測定は、Varian ^{UNITY}INOVA400 で行った。プローブは、AutoMAS 5mm CP/MAS、T3 4mm HXY、T3 2.5mm HXY プローブを用いた。

【結果と考察】

まず線幅が最も狭くなるように、XiX decoupling のパルス幅(tp)の調整を行った。図1にアダマンタンのメチレン炭素の ^{13}C NMR 信号強度と XiX decoupling のパルス幅との依存性を示す。試料回転速度は 5kHz、ラジオ波強度は 50kHz であり、tr は試料回転周期である。信号強度は、同じ試料回転速度・

XiX decoupling、固体 NMR、高分解能化

あしだ じゅん

ラジオ波強度の CW decoupling 下での信号強度で規定化した。Detken らの報告と同様に、 $tp = n \times 1/4 \times tr$ (n は整数) のパルス幅において、信号強度が極小値となり線幅が広がっていることがわかる。しかし、その谷と谷の間では、 $tp > 0.5 \times tr$ の領域において、信号強度が CW decoupling で得られる信号強度 (図 1 の水平方向の破線) よりも大きくなり、従って線幅が狭い高分解能のスペクトルが得られることが示された。

図 2 に (a) CW、(b) XiX ($tp = 2.85 \times tr$)、(c) TPPM decoupling を用いたアダマンタンの ^{13}C NMR スペクトルを示す。メチレン炭素の半値幅はそれぞれ 4.7Hz (CW)、3.9Hz (TPPM)、3.7Hz (XiX) で、XiX での信号強度は CW と比較して約 10% 向上している。

図 3 に XiX (実線) と CW (破線) decoupling におけるアダマンタンのメチレン炭素の ^{13}C NMR 信号強度と decoupling パルス強度の依存性を示す。どちらの decoupling においても、 $\omega_{rf} = \omega_r \times n$ の条件を満たすときに rotary resonance 効果が観測されている[6]。この図より、ほぼ全ての decoupling パルス強度において、XiX decoupling の方が得られる信号強度が大きいこと、また XiX decoupling では CW decoupling と比較してより弱いパルス強度で同程度の分解能のスペクトルが得られることが示された。

Detken らによるグリシンの結果と本研究でのアダマンタンでの結果より、結晶性試料では 20kHz 以上の試料回転速度が必要であるが、運動性の高い試料だと 10kHz 以下の中速回転下でも XiX decoupling が有効であることがわかった。以上のことから、XiX decoupling の有効性は、試料の運動性に依存していると考えられる。

ポスターでは、他のサンプルに適用した例についても発表する。

【参考文献】

- 1) A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, and R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.*, 103, 6951 (1995)
- 2) Z. H. Gan, and R. R. Ernst, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 8, 153 (1997)
- 3) 竹腰、溝上、寺尾：第 39 回 NMR 討論会, 284 (2000)
- 4) K. Takegoshi, J. Mizokami, and T. Terao, *Chem. Phys. Lett.*, 341, 540 (2001)
- 5) A. Detken, E. H. Hardy, M. Ernst, and B. H. Meier, *Chem. Phys. Lett.*, 356, 298 (2002)
- 6) T. Nakai, and C. A. McDowell, *Chem. Phys. Lett.*, 227, 639 (1994)

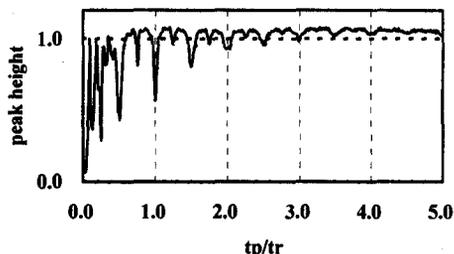


Figure 1. The dependence of the heights of methylene peak of adamantane on the pulse width (tp) of XiX decoupling at 5 kHz sample spinning speed, and 50 kHz proton decoupling power, where tr is rotor period. The peak heights are normalized to CW decoupling at the same sample spinning speed, and proton decoupling power.

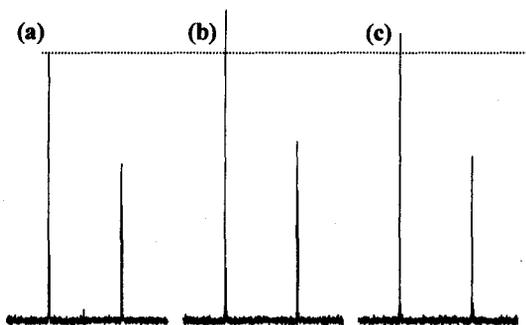


Figure 2. Adamantane ^{13}C MAS NMR spectra with (a) CW, (b) XiX and (c) TPPM decoupling at 5 kHz sample spinning speed, and 50 kHz proton decoupling power.

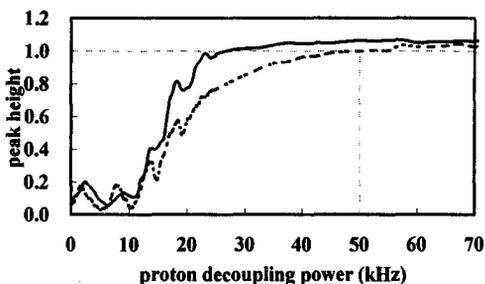


Figure 4. The dependence of XiX (rigid) and CW (dash) proton decoupling power and adamantane methylene peak height. The peak height is normalized to 50 kHz CW decoupling power, indicated by the horizontal dashed line.

P 126 高速 MAS のための基本技術の開発

(理化学研究所) ○仲村 高志

Development of Primary Technique for High Speed MAS

Takashi Nakamura RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research)

Magic Angle Spinning (MAS) is the most important technique on solid-state NMR. Still we need higher speed for sample spinning. Spinning technique were based on drive force, drive area (turbine design), drive method, and bearing. We focus drive force using air for sample spinning. The propelling gas is compressible by pressure. So we need to use compressible fluid dynamics. Compressible fluid can make supersonic speed. We design supersonic nozzle for more effective sample spinning.

はじめに

固体高分解能 NMR にとって MAS(Magic Angle Spinning)は、必須の技術として知られており、これの高速化は常に重要な課題である。この試料管回転のための技術要素は、駆動力、駆動面（ドライブするための羽の形状）、駆動方法、そして軸受と考えられる。

駆動力については、Andrew らの報告¹⁾にある回転を駆動するための流体を空気から He gas に変更し、回転速度を上げる報告がなされた例があげられる。この速度の向上は、ヘリウムが空気よりも高い音速が得られるためである。前回、筆者が駆動面についての研究を進めた結果、駆動面の形状の最適化はそれほど高速化に反影できなかった²⁾。このことは駆動力が回転の効率を決定していると思われる。つまり、駆動のための気体の圧力をあげても、それが実際の駆動力にならないことを示している。回転を駆動するノズルの部分で気体の圧縮による激み（チョーク）が生じる、このためにノズルから吹き出す流体は音速が最高速度となる。いわゆる音速の壁と言われている回転速度の限界である。しかし、現実にはノズルの形状を最適化することにより、音速以上の速度を得ることはできる。そこで駆動流体を空気のままで高速回転を実現するため、超音速ノズルの形状を設計した。

キーワード 高速 MAS

なかむら たかし

実験・考察

現在使用されているスピナーは Andrew らの採用した空気軸受のタイプを基本として設計されている。空気軸受を使用した場合、ベアリングとドライブを同じ供給元から受ける場合、供給元が十分なエアを供給できない場合には安定な回転が得られない。また、ベアリングは基本的にサンプル管に対して静圧をかけるのであるから、過剰の圧力は必要以上のドライブ圧を要求することになる。したがって、効率の良いベアリングとドライブが求められる。気体（空気、窒素）を利用した駆動系の場合、エア抜けの良いノズルを設計することで、より少ない供給量で同等の回転数を得ることが期待出来る。

実験では、市販品で最もエアの効率の良いと思われる Doty Scientific 社の XC-5 (サンプル管 ϕ 5mm) について最初に評価した。従来の評価では、駆動力の指標はドライブ圧である。ドライブ圧と回転速度の関係で回転速度の評価をしている(Fig.1)。しかし、

実際に知りたいのは駆動している流体の速度である。これを知るためには、その系の流量を測定することで求められる。最近では質量流量計で手軽に流量の測定ができる。今回はこの測定を行った(Fig.2)。この結果、このスピナーのノズルは圧力 260 kPa のときに 315 m/s に達し、速度は音速の 9 割程度である。このときのローターの回転数は 14 kHz で駆動力に対して約 70% の効率で回転していることがわかる。また、この測定から駆動する気体の性質が（非圧縮気体から圧縮気体へ）変わる点も明らかにされた。次に、テストノズルは既に音速を超えるものが可能だが、流量の測定は、圧力が高いため、もれが多く発生し正確な測定が困難なため、スピナーに組み込んでの結果をポスターで報告したい。

参考文献

- 1) E.R. Andrew, L.F. Farnell, M. Firth, T.D. Gledhill, and I. Roberts, *J. Magn. Reson.* 1, 27 (1969)
- 2) 仲村高志、第 39 回 NMR 討論会要旨集、p286(2000)

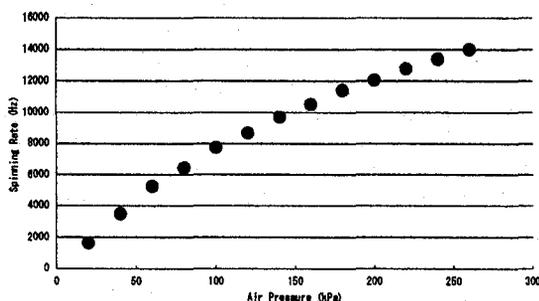


Fig.1 Spinning rate with air pressure for XC-5 (Air Bearing 200kPa)

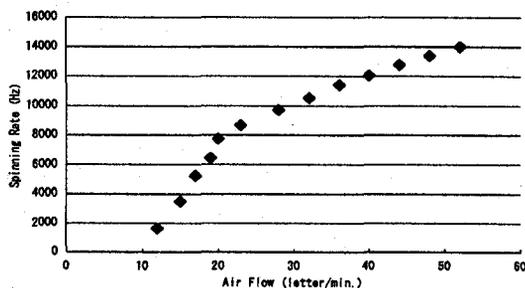


Fig.2 Spinning rate with air flow for XC-5 (Air Bearing 200kPa)

(農工大工) ○亀田恒徳、朝倉哲郎

*Change in the Structure of Fibers under Tensile Stress
Monitored with Solid State ¹³C NMR**Tsunenori Kameda and Tetsuo Asakura**Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology*

A new solid-state NMR equipment has been developed to monitor the change in the structures of fibers under tensile stress. The probe employs a saddle type of coil for inducing stress to oriented fibers in the direction of B_0 , and a single-coil-double-turning system for cross-polarization. The structural changes of silk fibroin fiber and biodegradable aliphatic polyester fiber of poly(tetramethylene succinate) (PTMS; $[-O(CH_2)_4OCO(CH_2)_2CO-]_n$) were observed as a function of tension. Moreover, the chemical shielding constants of carbon atoms were calculated for the model compounds with different local conformations using the GIAO-CHF with *ab initio* 6-311G** basis set.

【緒言】

半結晶性高分子繊維の引っ張り過程における可逆的、もしくは不可逆的な構造変化について、結晶領域のみならず非晶領域も含めて原子レベルで詳しく解析することは、繊維物性と局所構造との相関を得る上で重要である。そこで本研究では、張力を加えた状態において繊維の固体NMR測定を可能とするシステムを構築し、張力の大きさに応じて変化する繊維構造をモニターすることを目的とする。

【実験】

装置 張力を加えた状態で固体NMR測定を行うための装置図をFig.1に示す。本装置において試料に加えられる最大荷重は250kgである。試料の繊維軸を静磁場に平行に揃えて引っ張るために、ソレノイド型コイルではなくサドル型コイル(5mm径)を用いつつ、固体NMR測定が可能な高出力パルス(本研究では¹Hで60kHz以上)が印加できるようにプローブを改良した。またこのプローブは交差分極法が使用できるように設計しており、本測定では¹H-¹³Cの交差分極を33kHzで行い、接触時間は2msecとした。¹HデカップリングはCW法により56kHzの¹Hラジオ波を用いて行った。

試料 合成高分子のpoly(tetramethylene succinate) (PTMS; $[-O(CH_2)_4OCO(CH_2)_2CO-]_n$, Scheme 1)と野蚕の1種であるエリ蚕(*S. c. risini*)の絹フィブロインを実験に供した。PTMSは、市販の紡糸繊維(Field Mate, 東レ)をそのまま用い(無張力状態におけるPTMS繊維の直径は0.33mm)、90本束ねてNMR測定試料とした。またエリ蚕絹フィブロイン繊維試料は、5齢期の蚕体内から絹糸腺を取り出して、それを1.6m/minの速さで延伸した後、末端を固定し、室温にて数日間放置して作成した。

分子軌道計算 NMR遮蔽定数計算はGaussian98プログラムを用いて行った。基底関数は6-311G**とし、X線構造解析より得られたいくつかのコンホメーションの原子座標に基づいて計算用構造モデルを構築した。

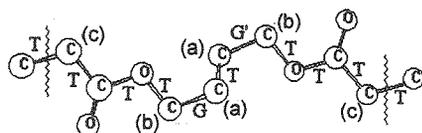
固体NMR、張力印加NMR、コンホメーション、構造変化、分子軌道計算
かめだ つねのり、あさくら てつお

【結果および考察】

静磁場に平行に試料の繊維軸を揃えて測定した固体NMRスペクトルは、繊維軸方向の化学シフトテンソルを敏感に反映する¹⁾。これによって張力を与えることによる分子の配向変化や高次構造変化を精度高く解析することができる。

PTMSの結晶領域は、無張力下において T_2GT_2T コンホメーションを有する α 型結晶を形成することがX線解析より知られている²⁾。Fig.2は、PTMS繊維を外部磁場に平行に束ねて引っ張る前(A)、張力下(B)、および張力解放後(C)における ^{13}C CPスペクトルの変化を示した³⁾。カルボニル炭素ピークは左右対称であり、その位置(255ppm)は α 型PTMS粉末パターン σ_{11} 成分に相当している。カルボニル炭素の σ_{11} 軸方向は分子鎖軸とほぼ平行であるので、PTMS繊維は外部磁場方向に平行に高配向していることがわかる。引っ張ることにより((A) \rightarrow (B))、高磁場側のメチレン域における22ppmのピークが相対的に減少し、8ppmのピークが増加していることがわかる。張力を加えてもカルボニル炭素のピーク位置および線形は変化していないことから、メチレン炭素シグナルの変化は、単に分子配向の変化によるものではないことがわかる。また、Fig.2 (A)と(C)がよく一致することから、引っ張ることによるPTMSの構造変化は可逆的であると言える。分子軌道計算を組み合わせることによって、このシフトはメチレン基がゴーシュからトランス型に転移することに伴って変化したものであることが明らかとなった。また、絹繊維⁴⁾⁵⁾についても同様に張力下におけるNMR測定を行ったので、詳細をポスターにて報告する。

【謝辞】 張力印加NMRシステムの構築にあたり、多大なご協力を戴いた日本電子データム(株)の今成司氏および藤戸輝昭博士に感謝します。また本研究は一部、生研機構の基礎研究推進事業により行われた。



Scheme 1 A PTMS chain with α form.

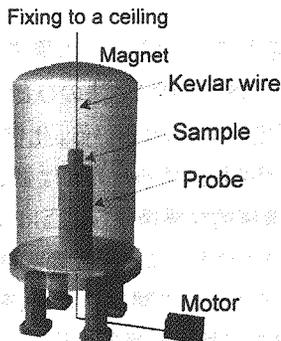


Fig.1 Schematic diagram of developed NMR equipment to monitor change in the NMR spectra of fibers under tensile stress.

【参考文献】

1. M. Demura, M. Minami, T. Asakura and T.A.Cross, *J.Am.Chem.Soc.*, **120** (1998) 1300.
2. Y. Ichikawa, H. Kondo, Y. Igarashi, K. Noguchi, K. Okuyama, and J. Washiyama, *Polymer*, **41** (2000) 4719.
3. T. Kameda, M. Kobayashi, J. Yao and T. Asakura, *Polymer*, **43** (2002) 1447.
4. T. Kameda and T. Asakura, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **46** (2002) 101.
5. T. Asakura, T. Ito, M. Okudaira, T. Kameda, *Macromolecules*, **32** (1999) 4940.

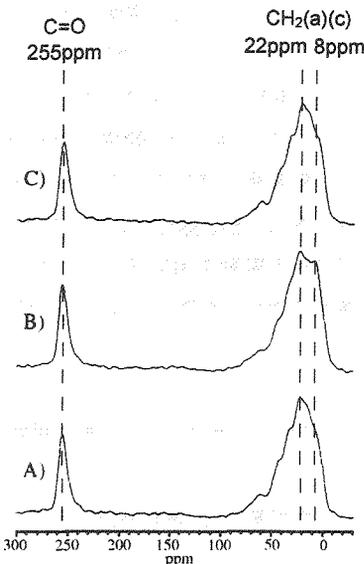


Fig.2 ^{13}C CP NMR spectra of PTMS fibers which are set to the external magnetic field. A) Free from tensile stress, B) under tensile stress of 45.6kgf, and C) free from tensile stress. The spectrum C) was observed immediately after removal of stress.

P 128 高周波振動による固体 NMR の高分解能化についての研究

東京工業大学大学院理工学研究科・高分子センター

○留田篤志, 木村英昭, 黒木重樹, 安藤勲

A study of resolution enhancement of solid state NMR

by high frequency vibration technique

Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology,

International Research Center of Macromolecular Science,

2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, 152-8552, Japan

○Atsushi Tomeda, Hideaki Kimura, Shigeki Kuroki and Isao Ando

The static spectrum obtained by solid state NMR is much broader than that obtained by conventional NMR due to large dipolar interaction and chemical shift anisotropy. We have successfully studied resolution enhancement of static NMR spectrum of polyethylene by using high frequency vibration technique as developed by us. It is shown that the high frequency vibration technique is a useful means with high possibility for obtaining resolution enhancement for solid-state spectrum.

【はじめに】

固体 NMR では、液体のそれと異なり双極子間相互作用や化学シフトの異方性により広幅化したスペクトルしか得られない。現在、このような相互作用を除く方法のひとつとして、マジック角回転法(MAS法: Magic Angle Spinning)が広く用いられている。化学シフトの異方性はこの方法により除去できるが、双極子間相互作用を除去するためには数百kHz以上という周波数で試料を回転させる必要がある。しかし、機械的な要請から数百kHz以上の周波数を得ることは難しい。そこで我々は、試料を回転させる代わりに、容易に高周波を得ることができる振動を用いることによって、相互作用を除去する手法を開発することを目的として、進めてきた。本報告では、その研究内容とその方法論の可能性を報告する。

キーワード: 固体NMR, 高分解能化, MAS

○とめだあつし, きむらひであき, くろきしげき, あんどういさお

【実験】

低密度ポリエチレンをPZT(チタン酸ジルコン酸鉛)板(圧電振動子)の表面に融着させた。その振動子を20MHz及び300MHzパルス¹H NMRプローブの中に設置し、振動子に交流電圧を印加することにより振動させながら測定した。振動の周波数は印加した交流の周波数と同じである。

【結果・考察】

Fig.1 に各周波数で振動させたときに得られるポリエチレンの20MHz¹H スペクトルの半値幅を示した。この結果から、試料に振動を加えることによりスペクトルの半値幅が減少することがわかった。また、振動の影響は非晶相よりも結晶相でより顕著に表れることが明らかになった。これは、結晶相のほうが非晶相よりも運動性が低いために、振動による効果が大きかったものと考えられる。このことは、本方法の可能性を示したものである。また、詳細は討論会で述べる。

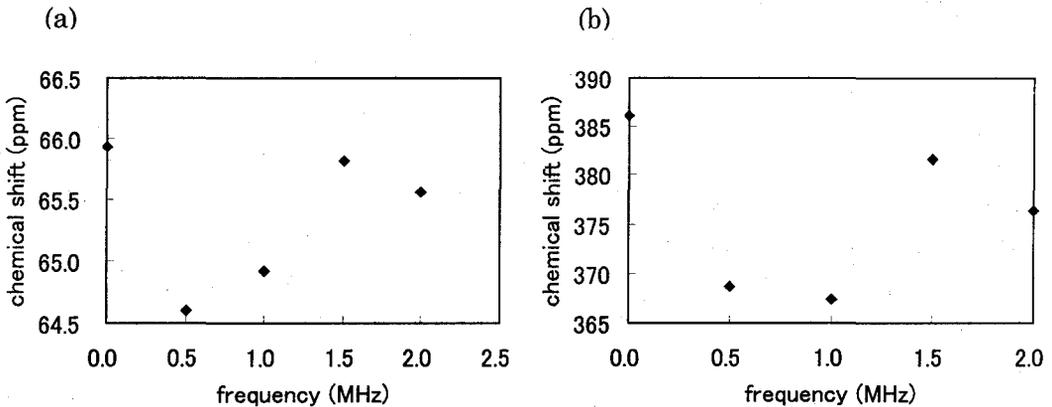


Fig.1 The plots half-width of ¹H spectra of polyethylene as a function of vibration frequency obtained by using high frequency vibration method
(a)amorphous phase and (b)crystalline phase

大阪大学医学部保健学科、
○神谷貴史、若山哲也、木村敦臣、藤原英明

Absorption Properties of Porous Materials as analyzed from the Xe-129 chemical shift
using Hyperpolarized Xe gas

School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University
○Takashi Kamiya, Tetsuya Wakayama, Atsuomi Kimura, Hideaki Fujiwara

Hyperpolarized noble gas has attracted a great interest in various fields. The hyperpolarized Xe gas is an ideal probe for investigation of porous materials because of its high sensitivity as well as its chemical inertness. We measured and analyzed the temperature dependence of Xe-129 chemical shift absorbed on several mesoporous silicates, and estimated the energy of absorption. The pressure dependence was also investigated.

序.

我々は昨年の本討論会で、超偏極 Xe-129 ガスの緩和速度と平均自由行程との間に、拡散の影響を考慮することで良好な直線関係が成立することを報告した。本研究では、シリカ系多孔質微細孔内(mesoporous silicates)における Xe の NMR 挙動についてさらに検討を行った。即ち、吸着した超偏極 Xe の化学シフトの温度依存性と圧力依存性を調べた結果、圧力ゼロに外挿した化学シフト値から吸着のエネルギーを定量的に評価できたので報告する。

実験.

半導体レーザを光源として GaAlAs ダイオードレーザ(コヒーレント社製: FAP システム)を用い、円偏光器を通して円偏光を得た。偏光用の磁場に縦型の分析用 NMR 装置の漏れ磁場を利用することとし、垂直方向に 12mT 程度の漏れ磁場の位置に偏極セルを置いた。昨年の本討論会で報告したものと基本的には同じである。自然存在比の Xe ガスのみを原料として用い、到達偏極率は 1~3%である。Xe-NMR 測定は Varian 社製 INOVA 400WB 装置で行った。測定周波数は 110.6MHz、測定温度は室温(23°C)から 100°Cまで変化させて行った。なお、圧力は 1 気圧から 0.2 気圧までの範囲で測定を行った。サンプルは新規シリカ系メソポーラス微粒子(FSM-16,HMM-3)とシリカ系カラム充填剤(Polygosil60,100,300,500)を用いた。

結果と考察.

常温での様々な多孔質微粒子に吸着した Xe-129 の化学シフトの逆数($1/\delta$)と平均自由行程($\bar{\lambda}$)との関係を図 1 に示す。サンプルは全てシリカ系の多孔質微粒子であるため、全体として直線関係

超偏極 Xe-129、吸着、シリカ系多孔質微粒子、温度依存性、圧力依存性

かみや たかし、わかやま てつや、きむら あつおみ、ふじわら ひであき

にあると言えよう。低温での同じプロットにおいても同様に直線関係が認められた。

ここで、図2のような空孔内のモデルにおいて空孔壁に吸着されているXeと空間部分に存在するXeが平衡状態にあるとき、それぞれの化学シフトを δ_a 、 δ_f とすると測定において求められる化学シフト δ_{obs} について次式が成り立つことが知られている²⁾。

$$\begin{aligned} \delta_a - \delta_{obs} &= \frac{C}{K} & C: A \text{ と } F \text{ の体積比} \\ \delta_{obs} - \delta_f &= \frac{C}{K} & K: \text{Xe 濃度比} = [\text{吸着}]/[\text{空間}] \end{aligned}$$

この式の両辺を微分することにより次式が得られる。

$$\frac{d \ln \{ (\delta_a - \delta_{obs}) / (\delta_{obs} - \delta_f) \}}{d(1/T)} = \frac{\Delta E}{R} \quad R: \text{気体定数}$$

従って、縦軸に $\ln\{(\delta_a - \delta_{obs})/(\delta_{obs} - \delta_f)\}$ をとり横軸に温度の逆数(1/T)をとると、直線の傾きから空孔壁に吸着されているXeと空間部分に存在するXeのエネルギー差 ΔE を求めることができる。実際に $\delta_a = 243 \text{ ppm}$ 、 $\delta_f = 0 \text{ ppm}$ ³⁾として求めた値を表1に示す。

上の式は基本的には圧力ゼロで求められた式であるので化学シフトの圧力依存性がないか調べた。1atm以下ではHMM-3とFSM-16以外のサンプルでは圧力依存性はなく、HMM-3とFSM-16についても圧力依存性は小さかった。これら2つについて圧力補正を行ったが補正量は小さかった。表1の結果より吸着のエネルギー差 ΔE は空孔径、より正確には平均自由行程 $\bar{\ell}$ に依存することがわかる。

結論として、超偏極Xe-129ガスを使って温度依存性を調べることにより、多孔質微粒子についてXeの吸着エネルギーを簡単かつ定量的に評価できることがわかった。

謝辞.

HMM-3とFSM-16をご提供いただいた豊田中央研究所(稲垣博士)に感謝します。

引用文献.

- 1) 神谷、清水、柳川、木村、藤原、第40回NMR討論会講演要旨集 p.26-27 (2001)
- 2) Q. J. Chen and J. Fraissard, *J. Phys. Chem.*, 96, 1809 (1992)
- 3) J. Demarquay et al. *Chem. Phys. Lett.*, 136, 314 (1987)

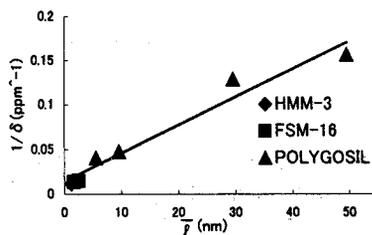


Fig.1 Plots of $1/\delta$ against $\bar{\ell}$ at room temperature

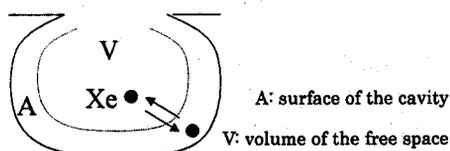


Fig.2 Rapid Exchange Model for Absorbed Xe atom

Table.1 The Energy Difference ΔE between the Xe Atom in the Two States of absorbed and free States

Porous Material	D (nm)	$\bar{\ell}$ (nm)	ΔE (kJ/mol)
HMM-3	2.9	1.23	-2.10
FSM-16 (2.1nm)	2.1	1.66	-2.18
FSM-16 (3.0nm)	3.0	2.56	-2.45
POLYGOSIL60	6.0	5.56	-6.15
POLYGOSIL100	10.0	9.56	-7.25
POLYGOSIL300	30.0	29.56	-9.80
POLYGOSIL500	50.0	49.56	-9.92

D: Pore Diameter, $\bar{\ell}$: Mean Free Path

Negative ΔE means exothermic property in absorbed state

スポーツ障害診断用コンパクトMRI装置の開発

(筑波大学物理工学系, *桐エム・アール・テクノロジー, **筑波大学臨床医学系)
 ○栗本岳明, 白猪亨, 松永吉晴, 松田善正, 拝師智之*, 宇津澤慎*, 巨瀬勝美, 吉岡大**

Development of a Compact MRI for Diagnosis of Sports Injuries

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, *MR Technology Inc.,
 **Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

T. Kurimoto, T. Shirai, Y. Matsunaga, Y. Matsuda, T. Haishi*, S. Utsuzawa*, K. Kose, H. Yoshioka**

MRI is a very useful method for diagnosis of sports injuries but not widely used mainly because of its high imaging cost. To overcome this problem, we have developed a compact MRI system by using a permanent magnet and compact MRI console. Several baseball players which had elbow injuries were imaged and diagnosed by a radiologist. The results have shown the usefulness of the system.

【はじめに】 スポーツ障害は、プロ選手にとっては、職を失う恐れもある深刻な問題である。また、一般の選手にとっても楽しみを失ったり、一生その痛みと付き合っていかななくてはならなくなってしまうような重大な問題である。しかもスポーツ障害は、治療を行っても完全に回復するという保証は無い。そのため、スポーツ障害においては、予防が非常に重要となってくる。ところが、現状では手軽かつ日常的に診断できる装置は存在しない。全身用MRI装置は、大きな病院にしかなく、検査コストも高いため、日常的な診断に用いるのは困難である。現在多くの医療施設で使われているX線診断装置は、放射線被曝のため、日常的に使用するのとは不可能であり、関節などの描出能が劣っている。そこで当研究室では、手軽かつ日常的な診断に使用できるような、コンパクトMRI装置の開発を行っている。特に本発表では、上肢専用コンパクトMRI装置 (Fig.1) について説明する。

【装置】 本研究で開発したMRI装置の全体像 (Fig.1) と、磁石周りの状態 (Fig.2) を示す。本システムは、水平方向に静磁場を発生する0.2T永久磁石磁気回路と当研究室で開発したコンパクトMRIコンソールから構成されている。このコンソールには、上段よりPC (デジタル制御系)、トランシーバー、勾配磁場電源、パワーアンプが収められている。そして、人体でピックアップされる外来ノイズを遮断するための、銅メッシュによるシールドルームを構築し、設置面積約4m²の、非常にコンパクトな上肢専用コンパクトMRI装置を開発した。

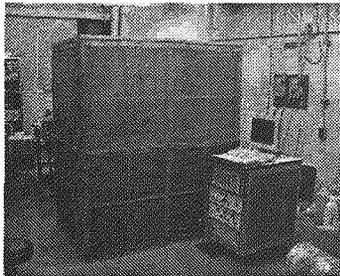


Fig.1 Overview of the compact MRI for diagnosis of sports injuries.

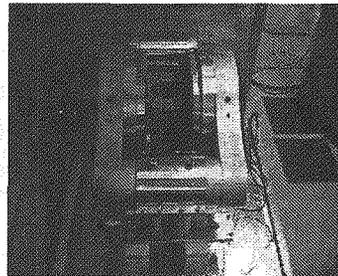


Fig.2 Magnet, probe and gradient coils.

勾配コイルは、計算機で巻き線のピッチを最適化した平面型のものを作成した。またRFプローブは撮像部位ごとに専用で作成した。肘専用RFプローブ (Fig.3) は、直径2mmの銅線を1cm間隔で8ターン巻いたもの。手首専用RFプローブ (Fig.4) は、直径2mmの銅線を1cm間隔で7ターン巻いたものである。肘専用RFプローブの開口部は円形であるが、手首専用RFプローブの開口部は、掌の形状に合わせるために長円形とした。

コンパクトMRI, 永久磁石磁気回路, スポーツ障害, 診断用, 野球肘

くりもとたけあき, しらいとおる, まつながよしはる, まつだよしまさ, はいしともゆき, うつぎわしん, こせかつみ, よしおかひろし

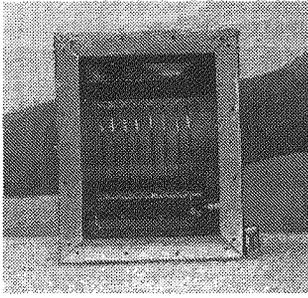


Fig.3 Elbow probe.

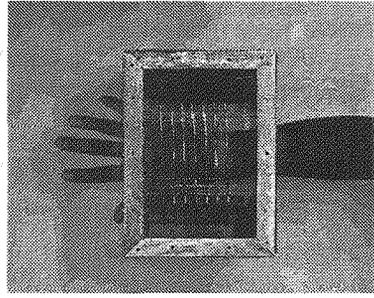


Fig.4 Wrist Probe.

【撮像結果】上記の装置を用いて、肘と手首の撮像を行った。肘の撮像は3Dのスピンエコー法 (TR/TE=100ms/16ms, 画素数 128×128×32) を用いて行った。面内分解能 (1mm)², スライス厚は 4mm, 画像取得時間は約 7 分である。Fig.5 は正常ボランティアの肘の画像, Fig.6 は野球肘患者の肘の画像である。野球肘患者の画像では、骨の形状や関節面の不整がはっきりと確認できた。

手首の撮像は 3D 勾配エコー法 (TR/TE=100ms/15ms) を用いて行った。面内分解能 (1mm)², スライス厚は 4mm, 画像取得時間は約 7 分である。Fig.7 は正常ボランティアの手首を撮像したものであるが、手首も肘と同様に、関節の形態がはっきりと確認できる画像を得ることができた。

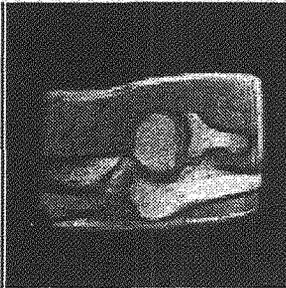


Fig.5 Elbow of a healthy volunteer.

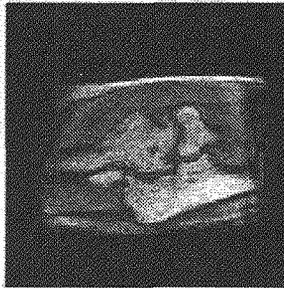


Fig.6 Elbow of a patient with baseball elbow.

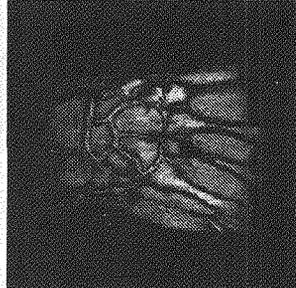


Fig.7 Wrist of a healthy volunteer.

【むすび】スポーツ障害診断用として、上肢専用コンパクト MRI 装置を開発し、上述のように診断に十分用いる事が可能な、T₁ 強調画像を取得する事ができた。現在、病変の描出に有用と思われる、脂肪抑制の T₂ 強調画像の撮像手法を開発中である。

また、以前鮭雌雄判別用 MRI 装置 (Fig.8) に使用した、ギャップ 25cm の永久磁石磁気回路を用いて、膝も含めた四肢用コンパクト MRI 装置を開発中である。Fig.9 はその四肢用システムのために製作中のシールドルームである。

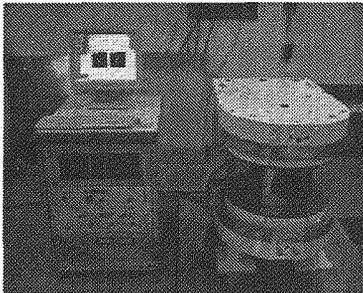


Fig.8 Salmon MRI system with a C shaped permanent magnet.

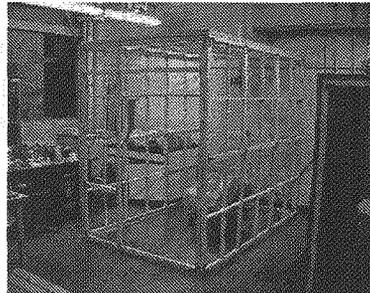


Fig.9 Shield room for the limbs.

P 131 超偏極 ^{129}Xe -MRI/S の生体医用工学への応用

産総研光技術研究部門¹、産総研人間福祉医工学研究部門²、大阪大学大学院歯学研究科³、
大阪市立大学工学部電気工学科⁴、産総研ライフエレクトロニクス研究ラボ⁵、先端医療振興
財団映像医療研究部⁶

〇服部峰之¹、本間一弘²、斎藤もよこ³、高橋信幸²、竹井直行⁴、中井敏晴⁵、村上秀明³、
黒田輝⁶、平賀隆¹

Hyperpolarized ^{129}Xe MRI/S for Biomedical Applications

Photonics R. I. AIST¹, Human Science and Biomedical Engineering R. I. AIST², Osaka University Graduate
School of Dentistry³, Osaka City University Faculty of Engineering⁴, Life Electronics Laboratory AIST⁵,
Institute of Biomedical Research and Innovation⁶

〇Mineyuki Hattori¹, Kazuhiro Homma², Moyoko Saitou³, Nobuyuki Takahashi², Naoyuki Takei⁴, Toshiharu Nakai⁵,
Hideaki Murakami³, Kagayaki Kuroda⁶, Takashi Hiraga¹

An apparatus for hyperpolarization of noble gas nuclear spins using high-power diode laser arrays was constructed. The stray field of the horizontal superconducting magnet was used for the optical pumping processes. The high-power diode laser arrays (795nm, 12W) was applied for effective excitation of Rb vapor. We achieved ~1% polarization of ^{129}Xe for sealed Rb and Xe and N_2 gas mixture and performed magnetic resonance imaging experiments.

【序論】 ^3He , ^{129}Xe の核スピンの 1/2 の希ガスは、アルカリ金属蒸気を光ポンピングして電子スピンを偏極させた後にスピン交換を行って NMR 信号を飛躍的に増強できる[1]。MRI に適用した生体医用工学への応用として、肺、血管、脳などの組織に存在する希ガスが画像化できる[2, 3]。ここでは、小動物を対象として超偏極 Xe ガスを利用した、生体医用工学への応用実験を目的として、横型 MRI (2T) の近傍に発生装置を構築した。撮像シーケンスに EPI, FLASH を用いて、ガラス管中の超偏極 ^{129}Xe ガスの画像化を試みた。

【実験】 Rb 金属は、ガラスアンブルに封入された製品 (フルウチ化学:99.99%) を、ステンレスパイプ内に入れた状態で内部を真空にして配管内部を洗浄した後、外部からステンレスパイプの上からアンブルごとつぶし、拡散ポンプで 10^{-6} Torr にひきながら、先に配置した偏極用ガラス管 (外径 50mm, 容量約 200 ml) へ蒸留した。冷却した後、Xe, N_2 ガス (日本酸素:99.995%高純度ガス) を、800Torr 程度まで導入した。偏極用ガラス管を液体窒素で冷却して、Xe が固体となり減圧の状態になっているところで、Rb と Xe を封じ込んだ。光ポンピング過程は、100G 程度の磁場中で行うと最も効率がよいが、ここでは、MRI 計測に利用した動物用横型磁石 (磁場強度/空芯口径:2.0T/330mm) の漏洩磁場 (~120G) の利用した。ライスター熱風器の先にガラス繊維シートで覆い炉を作り偏極用セルを設置し、~100°C に保った。励起光には、GaAlAs ダイオードレーザー (Optopower:OPC-D012-795-HBHS:794.7nm, 12W) 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-795-08-4-R10) を通して回転偏光にした後、円筒型容器の側面より入射した。MRI 装置は、産総研つくば東事業所の Bruker Biospec (2T/31cm ボア系, Oxford 社製磁石) を使用した。ガラスチューブに封入した、Rb と Xe、窒素混合ガスについて、1%程度の超偏極状態を確認した。

はっとりみねゆき、ほんまかずひろ、さいとうもよこ、たかはしのぶゆき、たけいなおゆき、なかいとしはる、むらかみひであき、くろだかがやき、ひらがたかし

超偏極、光ポンピング、半導体レーザー、MRI、 ^{129}Xe

引き続き、画像収集の動作条件の探索を行った。シム調整は、プロトンコイルの中に Xe コイルを設置し、その中に入れた水ファントムで実行できた。動物実験用に既存のプロトン用バードケイジコイルの内側に、Xe 用表面コイルを設置する配置にし、表面コイルを製作した。ガラスチューブに封入した、Rb と Xe ガスを用いて ^{129}Xe 画像収集の動作条件の探索を行った。動物実験を想定した場合、プロトンの構造画像に動物の肺・血管・脳に取り込まれた Xe の画像を取得することを想定して、シム調整を既存のプロトンコイルの中に入れた水ファントムで実行し、内側に Xe 用コイルを設置する配置とした。スピン偏極ガスは、調整などで時間をとったり、RF パルスを加えすぎたりすることで、容易に消滅してしまうことから、製作した表面コイルの RF 強度分布や、測定条件の決定のための基礎データは、 ^{27}Al 核の信号を用いて行った。シム調整を厳密に行った場合には、偏極 Xe ガスからの信号は、 T_2^* にして 30ms であった。これは、TE を短くとらなくてはならないことを意味していて、水信号などに比べると、EPI などの、単一スキャンの高速画像収集においては、実験的な制約が大きくなることを意味している。

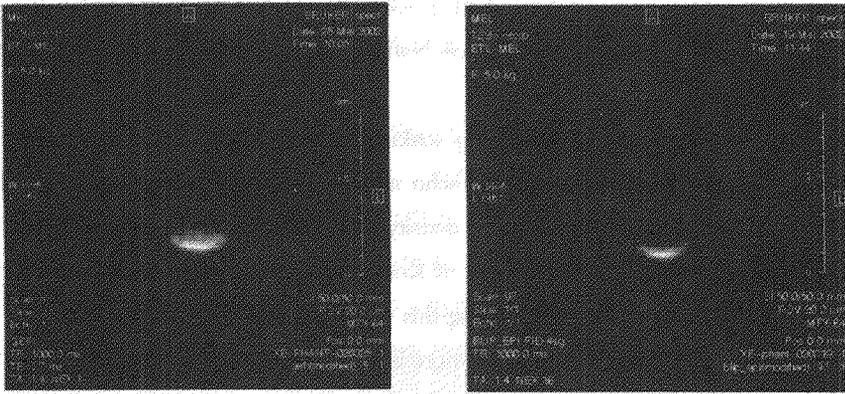


Fig. 1 ^{129}Xe MRI images (right: FLASH (TE=3.7ms, NEX=1, 64X64) ,
left: EPI (TE=9.68ms, NEX=16, 64X64))

【結果】 封じ込み型の光ポンピング装置において、ダイオードレーザーアレイを励起源に用いて Rb の光ポンピングを行い、 ^{129}Xe 核スピンを偏極させたところ、10 分程度で平衡状態の偏極率 1% を得た。このガラスチューブについて MRI 実験により Xe ガスに由来する画像を取得することができた (Fig. 1 参照)。FLASH (TE=3.7ms, NEX=1, 64X64) で行う場合と同程度の画質を、4 セグメントに分けて行った EPI (TE=9.68ms, NEX=16, 64X64) を適用して得られた。これにより、撮像時間間隔は、1 分程度であったものが、500ms 程度まで短縮できる見通しを得ることができた。

【参考文献】

[1] W. Happer, E. Miron, S. Schaefer, D. Schreiber, W. A. van Wijngaarden, X. Zeng, Phys. Rev. **A29**, 3092 (1984).
 [2] M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer, B. Saam, C. S. Springer Jr., A. Wishnia, Nature **370**, 199-201 (1994).
 [3] S. D. Swanson, M. S. Rosen, B. W. Agranoff, K. P. Coulter, R. C. Welsh, T. E. Chupp, Magn. Reson. Med., **38**, 695-698 (1997).

P 132 浸漬過程における米粒内水分分布の Gradient Echo 法による解析

(独法・食総研¹, 秋田総食研², 独法・農研機構作物研³)

○堀金明美¹, 高橋 仁², 丸山幸夫³, 大坪研一¹, 吉田 充¹

A study of moisture distribution in rice grains during soaking by gradient echo method

Akemi K. Horigane¹, Hitoshi Takahashi², Sachio Maruyama³,

Kenichi Otsubo¹, and Mitsuru Yoshida¹

1: National Food Research Institute, 2: Akita Research Institute of Food & Brewing,

3: National Institute of Crop Science, National Agricultural Research Organization.

The penetration of water in rice grains during soaking was observed with high sensitivity and spatial resolution by three-dimensional gradient echo method. Two rice cultivars, cv. Koshihikari and cv. Yamadanishiki, which had different cell density of the starch storage tissues in the core of endosperm, were tested. In the milled rice grain of Koshihikari, water penetrated from the ventral side and the central line of the endosperm. During this process cracks were formed, through which water diffused quickly. Finally water distributed more in the cracks and around the central line than in the other part of the endosperm. In Yamadanishiki, no crack was observed, and the penetrating water spread in the white core. The penetration was slow in brown rice grains of both cultivars, and no water was observed in cracks or in the white core until 8hr. The route and rate of the water penetration reflected the cell density in the endosperm and the morphological structure of the grain.

【はじめに】米飯の食味には、米の主成分であるデンプンの糊化特性や米粒の物性が関与し、水はこれらの性質に影響を与える最も基本的な要因である。したがって、これらの性質の解析には米粒の組織構造を考慮しながら、米粒内部への水の浸透や分布を全粒分析によって明らかにする必要がある。私達はこれまで spin echo 法を用いて登熟過程や炊飯過程における米粒中の水分分布を観察し、報告してきた¹⁻³⁾。今回、浸漬過程における水分分布を明らかにするため、spin echo 法に比べて echo time や測定時間を大幅に短縮することができる gradient echo (GE) 法⁴⁾により、米粒を水に浸漬したままで MR 画像の経時的測定を行った。得られた水分分布の変化から吸水経路を解明し、組織構造との関連を考察した。

キーワード : magnetic resonance imaging, gradient echo, rice grain, soaking, moisture distribution

ほりがねあけみ, たかはしひとし, まるやまさちお, おおつぼけんいち, よしだみつる

【材料および方法】(1) 米：コシヒカリおよび心白が多い酒米用品種ヤマダニシキの玄米とこれらを搗精した白米を用いた。米1粒をプラスチック板に挟み、外径5mmのNMRチューブに入れ、蒸留水を加えた後、直ちに測定に供した。(2) MRI測定：Bruker社製DRX300WB(7.1 T)装置で3次元GE法により測定した。Echo time (Te) はecho positionの移動により1.1msとし、recovery time (Tr) を吸水の速さに応じて85または140msとした。この時、測定時間はそれぞれ3分、5分となった。Trの短縮による水の信号低下はflip angleにより調整した。空間分解能は $65 \times 65 \times 130 \mu\text{m}^3$ とした。(3) MR画像：米粒と浸漬水の境界でregion of interestを設定し、水の信号を削除して米粒の内部だけを表示した。

【結果と考察】TeとTrの短縮により、米粒内部への吸水を追跡するに十分な時間分解能と感度、空間分解能が得られた。コシヒカリの白米 (Fig.1) では、デンプン貯蔵組織の細胞が粗な中心線 (A) や腹側 (B) から吸水が始まり、その後ヒビ割れ (C) が生じた。このヒビ割れを通して水が拡散し、吸水完了時には中心線やヒビ割れ部に水が多く分布した。ヤマダニシキ (Fig.2) もコシヒカリと同じ部位から吸水を開始したが、ヒビ割れは生ぜず、吸水は細胞が粗な心白部分に達すると一気に拡散し、心白部分に貯水した。玄米では両品種とも白米に比べ吸水が遅く、浸漬後8時間までヒビ割れや心白部分への吸水が認められなかった。米粒の吸水経路はこれまで色素等を用いて外観的に観察されてきたが、MRI法による3次元画像から米粒の組織構造と吸水経路との関係が明らかとなった。

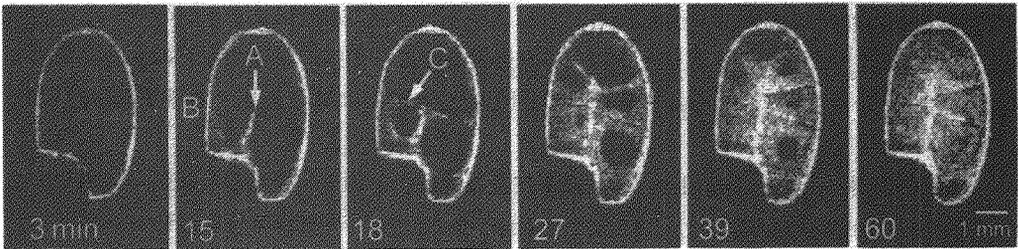


Fig. 1. Longitudinal sections in a central part of a milled rice grain, cv. Koshihikari, during soaking. A, central line; B, ventral side; C, crack.

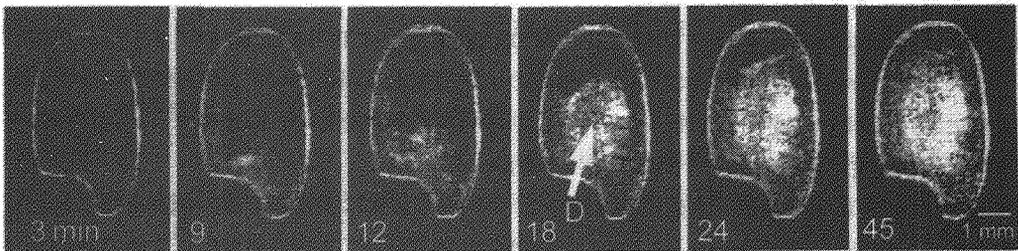


Fig.2. Longitudinal sections in a central part of a milled rice grain cv. Yamadanishiki, with white core during soaking. D, white core.

参考文献

- 1) Horigane A.K. et al, *J. Food Sci.* 64 (1999) 1-5
- 2) Horigane A.K. et al, *J. Food Sci.* 65 (2000) 408-412
- 3) Horigane A.K. et al, *J. Cereal Sci.* 33 (2001) 105-114
- 4) Hasse A. et al, *J. Mag. Res.* 67 (1986) 258-266

(埼玉工技セ北部研¹, 独法・食総研², 筑波大学物理工学系³, 埼玉大学理学部⁴)○小島登貴子¹, 堀金明美², 松田善正³, 巨瀬勝美³, 吉田充², 永澤明⁴**The measurement of the moisture distribution in the boiled Japanese noodles using micro MRI**Tokiko KOJIMA¹, Akemi K. HORIGANE², Yoshimasa MATSUDA³, Katsumi KOSE³,
Mitsuru YOSHIDA², and Akira NAGASAWA⁴¹:Saitama Industrial Technology Center-Northern Lab. ²:National Food Research Institute,³:Institute of Applied Physics, University of Tsukuba,⁴: Department of Chemistry, Faculty of Science, Saitama University

We established a method for estimation of the moisture content in standard wheat gel samples based on the correlation between the moisture content and water proton T_2 on a high field (7T) micro MRI (Bruker DRX300WB). By using this correlation, the moisture distribution in a section of Japanese noodles after boiling was estimated through T_2 mapping. We then tried to measure the boiled Japanese noodles on a compact MRI with a 1.0 T permanent magnet (installation space: less than 1 m²) in order to make this method to be available in small laboratories or factories.

1. はじめに

ゆで麺の適度な水分勾配はよい食感をもたらし、ゆで上げ後の放置による水分の均一化は食感の低下を引き起こす。麺のテクスチャーに大きな影響を与え、従来の乾燥法などの水分測定法では捉えられなかった麺内の水分分布およびその経時変化を、MRI により測定する手法を検討した。

2. 方法

(1)小麦粉糊化試料: 小麦粉(麺用中力粉)に所定量の蒸留水を加え、振とうしながら加熱して水分が均一な小麦粉糊化試料を得た。これを内径 4mm、長さ 25 mm のガラス管に詰めてシリコン栓をして水の蒸散を防いだ。

(2)ゆで麺: 小麦粉に対して加水 36%、食塩添加 4% で製麺し、これを所定の時間蒸留水でゆでた後、水冷して水を切り、測定に供した。

(3)高分解能装置による測定: NMR 装置 (Bruker DRX300WB、7 T) に 25 mm のイメージング用バードケージ型 RF コイルを装着して、各水分含量の小麦粉糊化試料について、マルチエコー法により室温における T_2 を測定した。同条件によりゆで麺の測定を行い、 T_2 値のマッピング画像を得た。1 回の測定時間は約 2 分、面分解能は 195 μ m だった。

(4)Compact MRI による測定: 永久磁石を用いた 1.0 T の装置によりゆで麺の測定を行うとともに小麦粉糊化試料の T_2 を spin echo 法および CPMG 法で測定して高分解能 NMR による測定結果と比較した。

マイクロ MRI, ゆで麺, 水分分布, 緩和時間

こじまときこ, ほりがねあけみ, まつだよしまさ, こせかつみ, よしだみつる, ながさわあきら

3. 結果と考察

乾燥法によって求めた小麦粉糊化試料の乾物あたりの水分(g/g d.m.)とプロトンの T_2 値は高い相関を示した (Fig. 1)。食塩添加の T_2 値への影響はゆで麺中の濃度レベルでは認められなかった。小麦粉の種類により回帰直線の傾きや切片が若干異なったことから、製麺に使用する小麦粉で調製した糊化試料を用いて、 T_2 値—水分検量線を求め、ゆで麺の MRI 測定で得られた各 voxel の T_2 値に適用することで、麺の水分分布を求めた。

ゆで時間の異なる麺の T_2 画像 (Fig. 2) から、ゆで時間の増加に伴い、ゆで水が中心部へ浸透する様子が観察された。この麺の中心を通る垂直線上の各 voxel における T_2 値を、上記のようにして得た検量線により水分値(%)に換算し、垂直線上の line profile を得ることで、水分の浸透する様子が定量的に示された (Fig. 3)。

一方、Compact MRI により、ゆで麺について spin echo 法により T_2 計算画像を取得した (Fig. 4)。小麦粉糊化試料の T_2 値は、CPMG 法よりも spin echo 法で小さな値を示したが、いずれの場合も水分と T_2 値の間に高い相関が認められ (Fig. 5)、高分解能 MRI での測定と同様に、麺の水分分布測定への適用が可能であると考察された。

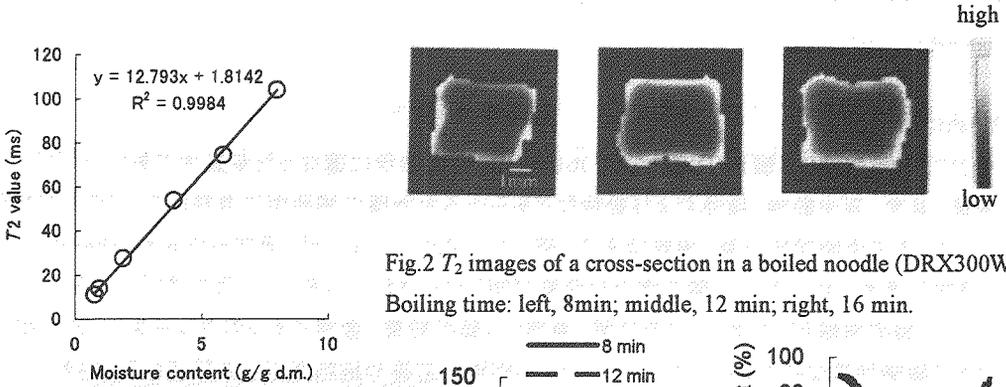


Fig. 2 T_2 images of a cross-section in a boiled noodle (DRX300WB). Boiling time: left, 8min; middle, 12 min; right, 16 min.

Fig. 1 Relationship between moisture content (g/g d.m.) and T_2 value (ms) of water proton in standard wheat gel (DRX300WB).

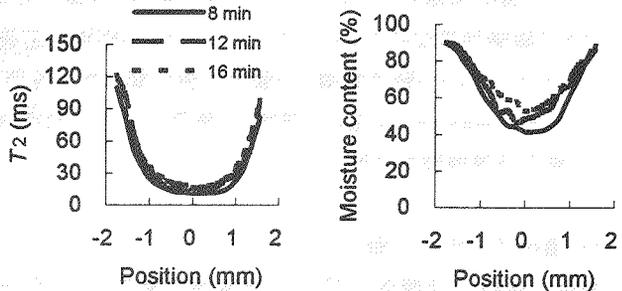


Fig. 3 Line profiles in a cross-section of a noodle. Left, T_2 profile; right, moisture profile (DRX300WB).

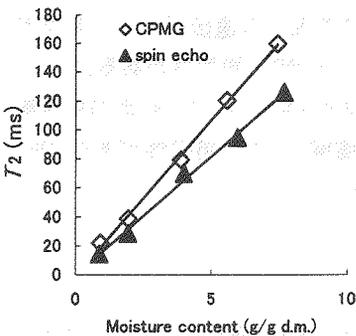


Fig. 5 Relationship between moisture content and T_2 value (Compact MRI).

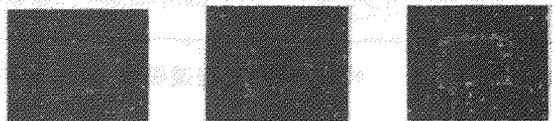


Fig. 4 T_2 images of a cross-section in a boiled noodle (Compact MRI). Boiling time: left, 8min; middle, 12 min; right, 16 min.

In vivo ³¹P NMR を使った酵母ポリリン酸蓄積システムの解析横浜市大・院総合理¹、阪大院・工・応用生物²○ 朽尾豪人¹、森田将史¹、富田節子¹、岡田あずさ¹、奇 世媛¹、Ausunkaree Choowong²、本間誠之²、原島俊²、古久保哲郎¹、白川昌宏¹

Inorganic polyphosphate can be widely found in bacterial, archaeal, fungal, protozoan, plant, and animal cells. While its ubiquitous existence, the biological function has not been well understood. For recent years, its biological function is being investigated by Dr. A. Kornberg and coworkers, and the compound is now implied to be involved in many biological steps, such as ATP related energy production, responding to stress, cell cycle and so on. In this study, with deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*, we have carried out *in vivo* ³¹P NMR to investigate the mechanism of polyphosphate accumulation in yeast cells.

Several yeast strains lacking *phm* genes were prepared, in which polyphosphate accumulation was defected, and the dramatic decrease in polyphosphate content in the yeast strains was clearly depicted by *in vivo* ³¹P NMR experiment. We further analyzed several genetically modified yeast strains to investigate polyphosphate accumulation mechanism.

[はじめに]

ポリリン酸は無機リン酸がリン酸エステル結合により直鎖状に連なった多量体であり、バクテリア、古細菌、真菌、原生動物、植物および動物などあらゆる生物種の細胞中に存在していることが知られている。その生物学的役割、機能はあまり明らかにされていないが、近年Arthur Kornbergらによって研究が進められ、ポリリン酸の様々な役割が明らかにされつつあり、注目を浴びている。

ポリリン酸の機能としては、ATPの代替、無機リン酸の貯蔵、金属イオンのキレーター、アルカリに対する緩衝効果などの他に、ストレスに対する細胞の応答や細胞周期との関連も示唆されている。我々は、ポリリン酸や無機リン酸の代謝に関与する各種遺伝子を破壊した酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を調製し、酵母中のポリリン酸を³¹P NMRで*in vivo*条件下で観測し、ポリリン酸の蓄積機構を解析した。

[*phm* 遺伝子とポリリン酸]

最近 Ogawa らは酵母のポリリン酸蓄積に関与している *phm1-5* の五つの遺伝子 (Fig.1) を同定した(1)。Phm2 は全長で Phm1 と 56%、Phm3 は 489 残基までで Phm1 と 33% の相同性がある。Phm1-3 の N 末端は Pho81 の配列と似ており、C 末端側に膜貫通様のドメインを持つ。Phm4 は 129 残基と短く、ほぼ膜貫通様ドメインのみからなっていて、Phm1 の C 末端領域と 32% の相同性がある。Phm5 は膜貫通様ドメインの他に、sphingomyelinase に類似の領域を持つ。

キーワード ポリリン酸、酵母遺伝学、*in vivo* ³¹P NMR

とちおひでひと、もりたまさひと、とみたせつこ、おかだあずさ、きせいおん、あうさんかりー・ちゅーうおん、ほんまともゆき、はらしまさとし、こくぼてつろう、しらかわまさひろ

まず、各 *phm* を単独で破壊することにより、ポリリン酸蓄積量がどう変化するかを *in vivo* ^{31}P NMR で調べた。*phm1* と *phm2* 破壊株ではポリリン酸の蓄積レベルは減少したのみだったが、*phm3* と *phm4* 破壊株では完全にポリリン酸の NMR シグナルが消失した。また、*phm1* と *phm2* を共に破壊した二重破壊株でもポリリン酸シグナルが消失した。なお *phm5* を破壊してもほとんど影響はなかった。これらの結果は Ogarwa らの報告と一致しており、*in vivo* ^{31}P NMR によってポリリン酸の蓄積機構を簡便に解析できることがわかった。

[*phm* の発現とポリリン酸蓄積レベルの相関]

次に *phm* の発現がポリリン酸蓄積量に反映するまでの時間スケールを調べた。まず、温度感受性酵母株を用い、温度感受的に転写活性が落ちるプロモーターの下流に *phm4* の ORF をつないだ酵母を作成した。この酵母の温度シフト後のポリリン酸蓄積量の経時変化を ^{31}P NMR によって追跡した。野生型酵母では温度シフト後8時間以上ポリリン酸レベルはほぼ一定していたのに対し、温度感受性株では緩やかにポリリン酸の減少が見られた。ただし、mRNA のレベルは2時間程度で急激に落ちるのに対し、ポリリン酸蓄積量への影響はより長い時間スケールで、緩やかに起こる。

[外部リン酸濃度との関連]

ポリリン酸の蓄積量は細胞内外の無機リン酸濃度やリン酸の取り込みシステムと関係があると考えられる。これらの相関を調べるために、無機リン酸のトランスポーターをコードする *pho84* を破壊した酵母を用い、リン酸枯渇条件下でのポリリン酸、細胞内無機リン酸の測定も行っており、これらについても合わせて報告する。

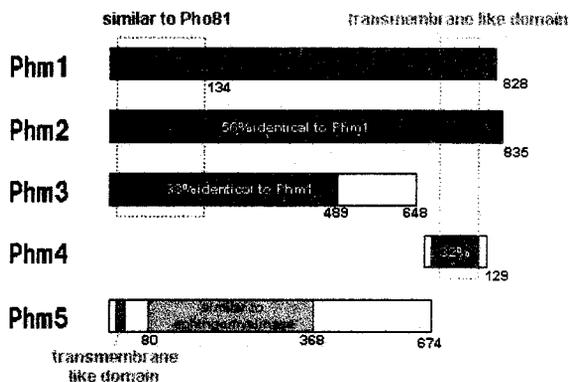


Fig.1 Domain map of Phm.

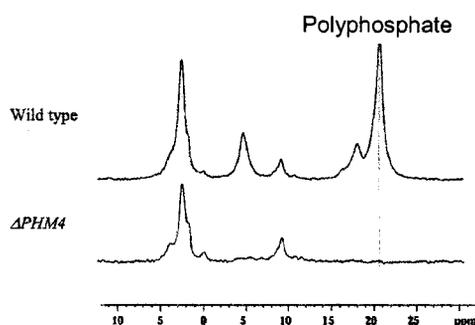


Fig.2. *in vivo* ^{31}P NMR spectra of wild type and *phm4* deleted yeast. Deletion of *phm4* dramatically reduced NMR signal of polyphosphate.

[参考文献]

- (1) Ogawa N. et al, *Mol. Biol. Cell*, 11, 4309-4321 (2000).

超並列型 MR マイクロ스코ープの開発

(筑波大学物理工学系 1、筑波大学臨床医学系 2、(株) エム・アール・テクノロジー 3、(株) 城南電子研究所 4)

○松田善正 1、宇津澤慎 3、栗本岳明 1、拝師智之 3、山崎由香子 1、巨瀬勝美 1、阿武泉 2、丸谷光廣 4

Development of a Super-Parallel MR Microscope

Institute of Applied Physics¹, Institute of Clinical Medicine², University of Tsukuba, MR Technology Inc.³, Jonan Electrical Laboratory Inc.⁴

○Yoshimasa Matsuda¹, Shin Utsuzawa³, Takeaki Kurimoto¹, Tomoyuki Haishi³, Yukako Yamazaki¹, Katsumi Kose¹, Izumi Anno², Mitsuhiro Marutani⁴

The concept of super-parallel MR microscope was proposed and an eight-channel system was constructed. Imaging experiments using a 1.5 T magnetic field of a clinical MRI was performed and 3D MR microscope images of eight chemically fixed mice were simultaneously acquired. Although the SNR varied among the receiver channels, the concept of super-parallel MR microscope was demonstrated to be promising. We are now developing a 4 channel system for a superconducting magnet (2.34 T, 40 cm bore) to acquire 3D MR microscope images of about 5,000 human embryos collected and preserved in Kyoto University.

【はじめに】

ポストゲノム時代を迎え、MR マイクロ스코ープ撮像を効率的に行なう応用が、強く求められている。しかし、現在の MR マイクロ스코ープは、このような要求に対し限界があり、これを克服するには計測の並列化が必要である。本研究では、勾配磁場プローブを多数並べるという超並列型 MR マイクロ스코ープを提案し、8CH のシステムを構築して、本システムの有用性を実証した。現在、大量のヒト胚子の 3D MR Microscopy 撮像プロジェクト(京都プロジェクト)のために、長期的使用に耐える実用的なシステムを開発中である。

【8CH システムの開発】

本システムは、8CH のアレイ型プローブヘッドと、8CH のコンパクト型 MRI コンソールで構成されている。アレイ型勾配磁場プローブは、隣接したプローブに巻いた勾配磁場コイルが、サンプルの位置での勾配磁場をお互いに強めあうような設計となっている。8CH の MRI コンソールにおいては、一人の操作者が容易に操作できるように、8CH の AD コンバータボードを 2 枚使用して、一台の PC でデータ収集系を構築した。また受信系は、増幅器、PSD、フィルタを一枚のプリント板に集約し、10 cm×15 cm×3.2 cm のシールドボックスに収納したものを 1CH のモジュールとした。

【実験と結果】

以上のシステムと、1.5T の臨床用 MRI の静磁場を用いて、8 個のマウス胎児サンプルの同時撮像を行なった(Fig.1)。信号加算なしで 200 μ m 立方の画素サイズの画像が得られたことから、本システムは、大量のサンプルの撮像が可能な MR マイクロ스코ープとして有望であることが示された(Fig.2)。

キーワード：MR マイクロ스코ープ、計測の並列化、超並列型 MR マイクロ스코ープ

まつだよしまさ、うつざわしん、くりもとたけあき、はいしともゆき、やまざきゆかこ、こせかつみ、あんのいずみ、まるたにみつひろ

【大量のヒト胚子の MR Microscopy 撮像プロジェクト (京都プロジェクト)】

このシステムを利用して、京都大学病院附属先天異常標本センター (センター長: 塩田浩平教授) に所蔵の、数万体のヒト胚子の三次元MRマイクロスコップ撮像を計画している。このプロジェクトは、今後二度と収集することができない、世界的遺産とも言うべき貴重な試料をデジタルデータとして保存するという、緊急にしかつ重要なものである。数万体のうち、特に約5,000 体に関しては、解剖学的構造描出の基本となるデータであり、まずこれらに関する撮像を行なう予定である。現在、以下のように、その装置の開発と予備実験を行なっている。

【システム開発計画と予備実験】

このプロジェクトのために、動物実験用 MRI の静磁場強度 2.34T の超伝導磁石 (Brucker 製、ボア径 40cm) を利用する(Fig.3)。この磁石の均一領域は 18 cm dsv であるため、20 mm および 15 mm 試験管に対しては 4CH アレイプローブ、10 mm, 8mm および 5 mm 試験管に対しては 8 CH アレイプローブを開発する。またそれに対応した多チャンネルトランシーバーとしては、基本設計は 1.5T 用 8CH システムと同じであるが、受信系の相互干渉を防ぐため、1 筐体あたり 4CH の受信モジュールを組み込む設計としている。

予備実験として、二種類(妊娠 13 日と 20 日)のマウス胎児を、1%アガロースゲルで試験管内に固定し、1CH 撮像システムを用いて、3D-GE 法で撮像を行なった(Fig.4)。それぞれ、75 μ m 立方、150 μ m 立方の画素サイズの画像が、8 時間以内で取得できており、上記のプロジェクトに使用できる性能を有していることが示された。

【むすび】

8CH の超並列型 MR マイクロスコップを構築し、その有効性を、人体用 MRI の 1.5T の静磁場を利用して実証した。そして、現在、本システムコンセプトによって、大量の生体試料の撮像プロジェクトを実施するために、長期間の安定な撮像に耐えうる、実用的システムを開発中である。

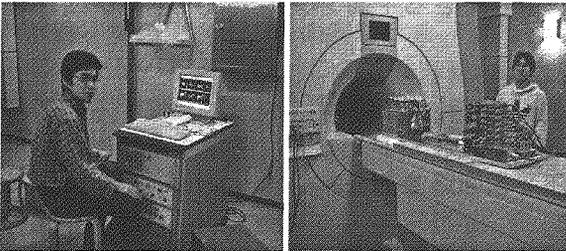


Fig.1 Experimental Set up

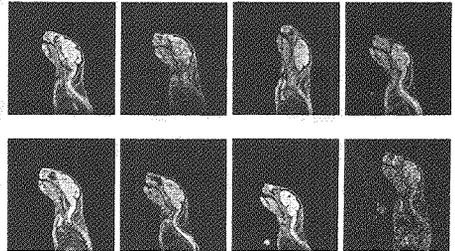


Fig.2 8CH 3D Mouse image

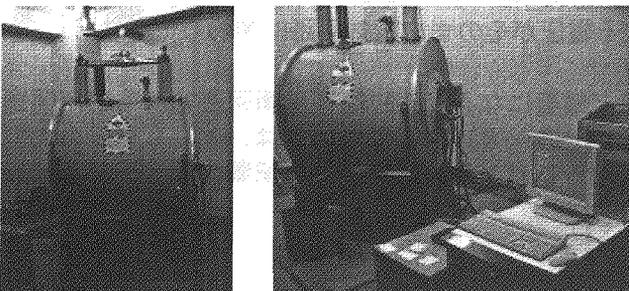


Fig.3 2.34T Super conducting Magnet

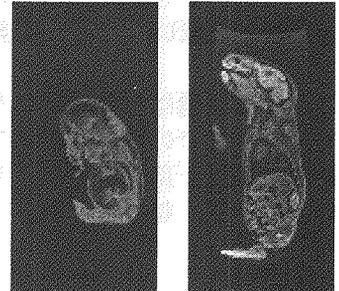


Fig.4 3D Mouse Image

「ナローボア用高磁場固体ダブルチューニングプローブの開発 1」
 (日本電子(株)¹、新日本製鐵(株)先端技術研究所²)
 ○長谷川憲一¹、志野英雄¹、樋岡克哉¹、杉沢寿志¹、齋藤公児²

Development of double-tuned solid-state NMR probe for high magnetic field in a narrow bore superconducting magnet (I)

JEOL Ltd.¹, Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Lab.²
 K.Hasegawa¹, H.Shino¹, K.Hioka¹, H.Sugisawa¹, K.Saito²

A double-tuned solid-state NMR probe was developed for high RF power. The target specifications of this probe are as follows.

1. Balanced double-tuned circuit (HF:¹H, LF:¹³C) for MAS $B_0=700\text{MHz}$ (for ¹H)
2. Sample tube size; 4mm in diameter
3. ¹H:3 μsec (decouple), ¹³C:1.4 μsec (single pulse)

A balanced circuit and a cylindrical frame were adopted to prevent arcing and to improve B_1 homogeneity. This method satisfies those specifications completely.

【はじめに】

高磁場固体測定には、高周波磁場 (B_1) 強度分布の均一性と短いパルス幅が必要であるが、高磁場になるほど電磁波の波長が短くなり、従来の不平衡ダブルチューニング回路では B_1 強度分布が不均一になってしまう。また、ナローボア (NB) ダブルチューニングプローブは高電力を扱えなかった。しかし、より高磁場に対応するには、ワイドボア (WB) よりも、NBのほうがコスト面で有利である。そこで、NBプローブの耐電力と B_1 強度分布を改良できる平衡ダブルチューニング回路を開発したので報告する。

【従来の問題点】

従来の固体ダブルチューニング回路例¹⁾を Fig. 1 に示す。HFに共振する短絡および開放の $1/4$ 波長同軸線路共振器を用いて、HFとLFに共振する検出コイルのどちらか一端がグランド電位となる不平衡回路である。

これには、以下の問題があった。

- 1) B_1 強度分布が不均一: 検出コイル (ソレノイド) 一端で電流が最大になるので、HF共振時に B_1 強度最大の位置が検出コイルの端にあり、LF時はその他端にある。とくにHF時は、電磁波の波長と比較してコイル長が無視できないので、一端が B_1 強度最大となり、他端は大幅に弱くなってしまふ。
- 2) 耐圧が低い: コイルに発生する電圧がそのまま電気回路に加わってしまう。

これらの問題は、高磁場になるほど顕著になる。1) は不平衡回路である事が問題で、同方式での解決は困難である。一方、2) 耐圧については、より高耐圧の大型高周波部品を用いる事により解決できるが、従来回路の部品配置では大型部品はNBプローブに収まらない。

固体、ダブルチューニング、平衡回路

はせがわけんいち、しのひでお、ひおかかつや、すぎさわひさし、さいとうこうじ

【改良】

電気回路は耐圧を向上させた平衡回路とし、さらに円筒フレームを採用した。Fig. 2に回路の概略を示す。検出コイル(Ls)の両端にLF用同調バリコン(Ct1, 2)を接続する。その2個のバリコンに平行2線路(TL1, 2)を直列接続し、他端をコンデンサー(C1, 2)で短絡して、HFに共振する1/4波長共振器を構成している。それにより、HFとLFのそれぞれの共振時に検出コイルの中央で電圧≒0で電流最大、両端で逆電圧となる平衡回路が形成される。円筒フレームを上記1/4波長共振器の外部導体に兼用した。

1) B_z強度分布 均一性向上

HFとLFの両方の共振時に常に検出コイル中央で電流が最大となるので、B_z強度も最大になり、HFとLFともに最良の照射効率が得られる。

2) 耐圧の向上

検出コイルの中央が常に電圧≒0なるので、電気回路に加わる電圧は不平衡回路の半分になる。そのため電気回路部品の耐圧が同じでも、従来の4倍の電力を扱える。

【結果】

700MHz NB SCM用4mm試料管用 ¹H-¹³Cダブルチューニングプローブを試作した。照射時に於て¹Hパルス幅2.75μsec@274W、¹³Cパルス幅2.45μsec@258Wを得た。この条件でCP-MASデータが得られた。さらにシングルパルス時には、¹³Cパルス幅1.4μsec以下のパルス幅が得られており、MQ-MAS用プローブとしても十分な性能が得られている。

【考察】

今回の平衡回路を採用する事によって、NBに適した高磁場用ダブルチューニング回路を実現できた。この回路はB_z強度分布、耐圧の両方の問題に対して有用である事が分かった。今後、この回路方式の改良をすすめて、トリプルチューニング回路と800MHz以上の高磁場などにも適用したい。

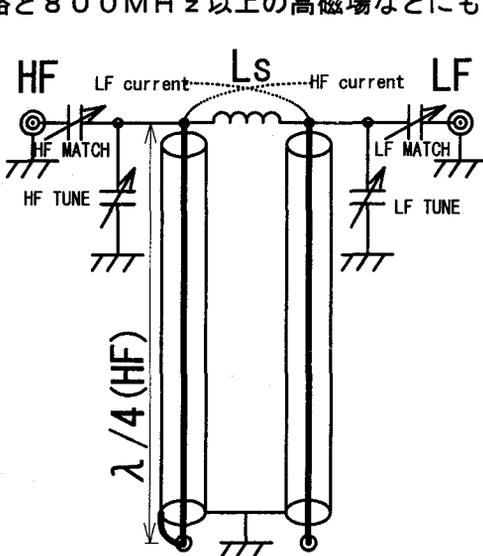


Fig.1 Double-tuned probe circuit using coaxial resonator

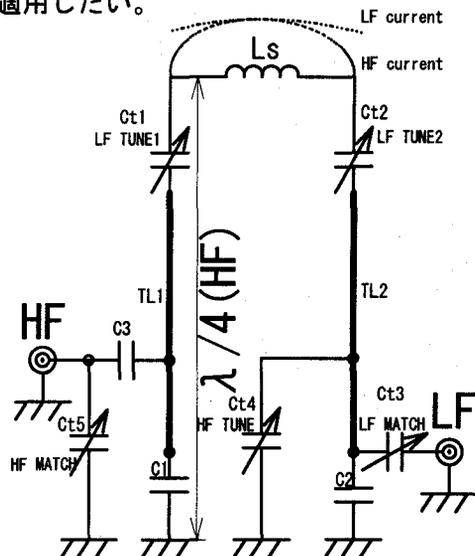


Fig.2 Double-tuned probe circuit using two-wire resonator

文献 1. F.David Doty, Ruth R, Inners, and Paul D. Ellis, J.Mag Reson.43,339-416(1981)

Development of double-tuned solid-state NMR probe for high magnetic field in a narrow bore superconducting magnet (2)

JEOL Ltd.¹, Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Lab.²

H.Shino¹, K.Hasegawa¹, K.Hioka¹, H.Sugisawa¹, K.Saito²

A double-tuned solid-state NMR probe was developed for a narrow bore magnet with high RF power. The target specifications of this probe are as follows.

1. Balanced double-tuned circuit (HF:¹H, LF:¹³C) for MQ-MAS B₀=700MHz(for ¹H)
2. Sample tube size: 4mm in diameter
3. ¹H:2μsec, ¹³C:1.4μsec (single pulse)

A balanced circuit is adopted to prevent arcing. The voltage at each circuit point is calculated with a circuit simulator to find out available space for each electrical component in narrow bore probe space. A successful results has been obtained satisfying the above specifications.

【はじめに】

論者らは本討論会に提出の別稿、「ナローボア用高磁場固体ダブルチューニングプローブの開発 1」において、ナローボア(NB)マグネット用固体プローブの耐電力と B1 強度分布を改良した平衡ダブルチューニング回路を報告している。本稿では、その回路を実現する上で改良・対応した点について報告する。

【従来の問題点】

従来の固体プローブ回路開発では、回路内で高電圧を発生する箇所は耐電圧の高い大型の部品を使用するか、あるいは他部分との空間距離をとってアーキングを防ぐことなどで対応してきている。これらを実現するため、固体プローブではワイドボアマグネット(WB)を使用することが多かった。近年、固体測定は高い磁場でも行われるようになってきたが、高い磁場の WB マグネットは入手が難しく、ナローボア(NB)マグネットの使用が普通である。NB に収めるには平衡回路などの採用だけでなく、回路各点の電圧を詳細に把握して電位差に応じて各点間を配置する必要がある。しかし、回路各点の高周波電圧を計測器などで実測することは困難であり、実際のプローブで放電が起きるか否かを大まかにチェックすることが多かった。したがって従来は NB プローブで高電力を印加することが困難であった。

【改良】

電気回路は平衡回路としてコンデンサを検出コイル(L_s)の両側に配置している。この配置によりコイルセンターが 0V となり、コイル全体にかかる電圧を E とするとコイルの左端と右端ではそれぞれ+E/2 と-E/2 の電圧になる。これによりコイル端から周囲グランドまでの距離を半分に縮めることができる。また平衡回路にすると可変コンデンサ C1, C2 にかかる電圧も半分になるが、それでも 1kW 以上のパワーを印加するとコンデンサに大きな電圧が加わる。コイルの Q 値、コイルおよび各配線のインダクタンスなどのデータを回路シミュレータに入れて各部の電位を計算し

固体、ダブルチューニング、平衡回路、ナローボア、PSPICE

しのひでお、はせがわけんいち、ひおかつや、すぎさわひさし、さいとうこうじ

た。シミュレータは PSPICE などを使用した。Fig1 に PSPICE で計算させた回路の一例を示す。Fig1 において、 R_s はコイル L_s の Q に伴う実効直列抵抗で $R_s = 2 * \pi * f * L_s / Q_u$ 。この式において f は共振周波数(Hz)、 L_s はサンプルコイルのインダクタンス(H)である。 Q_u はコイルの無負荷 Q で、信号源にマッチングさせた場合には $Q_u \approx 2 * Q_l$ となる。また Fig1 において部品 E10、E20 は回路に影響をおよぼさずに各点間の電位差を算出する仮想的な要素である。さらに Fig1 で V1 は信号源であり、R70 はそのインピーダンスである。V1 の出力には印加パワー 1kW を想定した電圧を与えている。回路各部に発生する電圧を回路シミュレータで計算して各点ごとに許される空間距離を算出し、この距離を 3 次元的に各部で確保するように配置を決めた。電圧と距離は概略 1kv/1mm で設定した。電圧計算の検証は、印加パワーを徐々に増やして行き、回路各点に実際にアークが起こる印加パワーから計算した電圧値により行った。

【結果】

回路各部の電圧、各部間の電位差を要点ごとに詳細に計算して配置を決めて 700MHz NB SCM 用 4mm 試料管用 1H-13C ダブルチューニングプローブを試作した。13C 周波数で 1kW 印加しても各部で放電が起きないように構成することができた。Fig2 は実際のプローブの写真を示す。13C 周波数のみの印加測定では 1.4 μ sec 以下(1kW プローブ入力)のパルス幅が得られ、さらにシングル 1H パルス幅(500W プローブ入力)は 2 μ sec 相当であり、MQ-MAS 用プローブとして十分な性能が得られた。

【考察】

平衡回路を採用することと回路シミュレーションによる各部の電圧の詳細計算によって、高電力印加に対応した NB 高磁場用ダブルチューニング回路を実現できた。今後は、シミュレーション計算モデルをより実際に近いものにして、計算精度を向上させる工夫をして行きたい。

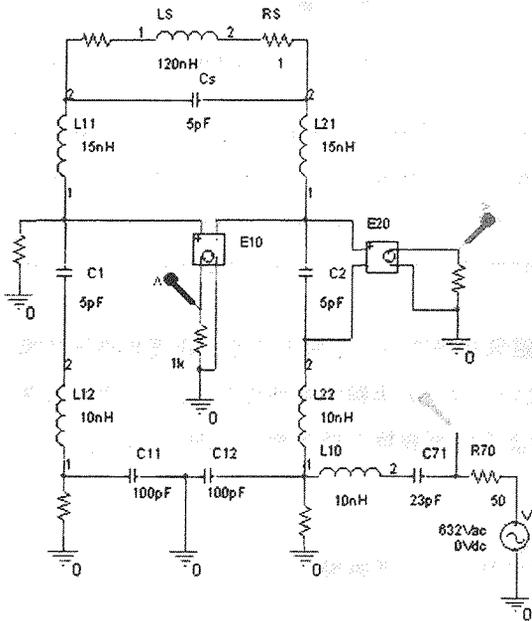


Fig.1 A circuit for PSPICE simulator

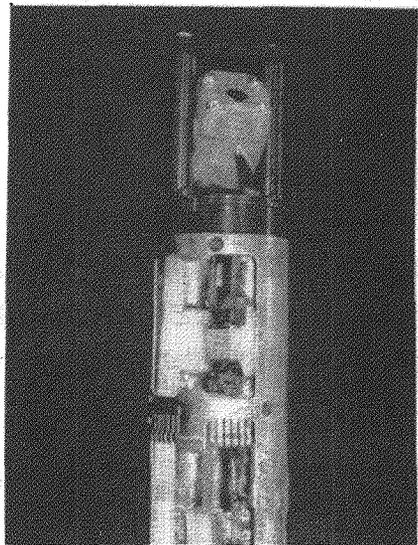


Fig.2 Double-tuned probe circuit

Optically polarized xenon and spin-transferred molecules

Graduate School of Science, Himeji Institute of Technology

Hirohiko Imai, Kiyoshi Ishikawa, and Yoshihiro Takagi

We report the low-frequency NMR and the accumulation of xenon atoms polarized by a spin-exchange optical pumping. We detected the FID signals of polarized xenon in gas, solid, and liquid phases, and obtained the decay time of signal amplitude of liquid xenon to be 270 sec. We are monitoring the resonance lines of polarized xenon dissolved in ethanol in order to transfer the spin-polarization to the proton of ethanol.

レーザー光ポンピングによる希ガス原子の核スピン偏極、あるいは偏極希ガスを用いたイメージングは広く知られるようになったが、偏極希ガスの可能性は、希ガスだけの磁気共鳴や映像化だけにとどまらない。例えば、他分子の核スピンの偏極を移し、磁気共鳴信号を増大させると応用が広がる。最近の報告では、液体どうして混合すると核スピン間で効率よく偏極が移行する。我々は、NMR量子計算用分子に偏極を移すことを念頭に、キセノン核スピン偏極を行っている。今回は、その前段階として、液体偏極キセノン

やエタノールに溶けた偏極キセノンの低周波磁気共鳴について報告する。低周波磁気共鳴は、「振動磁場が金属などによって吸収されない」などの実験的利便性のほか、「周囲の常磁性体による共鳴周波数の変化が少ない」のように周波数の精密測定に向いている。

核スピン偏極移行、高偏極分子液体、光偏極キセノン、低磁場NMR、光ポンピング

いまいひろひこ、いしかわきよし、たかぎよしひろ

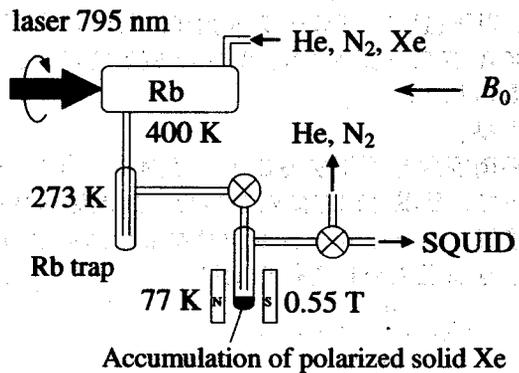


Figure 1: Experimental setup of the flow-type xenon polarization and the accumulation of polarized xenon. After removing the permanent magnet, we detect the FID signals of audio-frequency range.

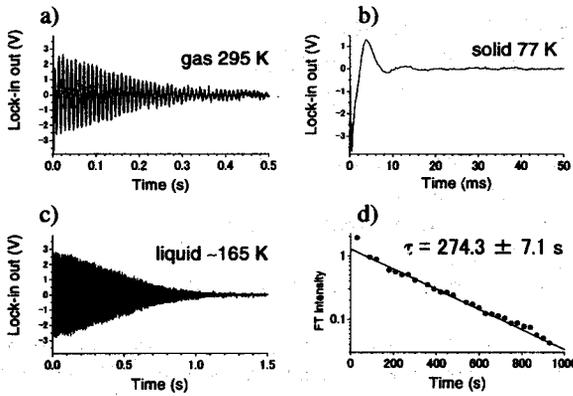


Figure 2: Low-frequency FID signals excited by a $\pi/16$ pulse at 2.7 mT of xenon in (a) gas phase at the temperature of 295 K, (b) solid at 77 K, and (c) liquid about 165 K. (d) The time dependence of the FID amplitude of liquid xenon. The decay time was obtained by compensating the loss of polarization by an audio-frequency pulse.

図2は、磁場 2.7 mT における (a) 気体、(b) 固体、(c) 液体 ^{129}Xe の FID 信号である。これらは平均操作をしていない。振動磁場は、周波数 31.7 kHz、パルス幅 100 μs の $\pi/16$ パルスである。今のところ位相緩和は不均一磁場によっている。図2(d)は、液体 ^{129}Xe の FID 信号の振幅の時間変化である。信号が約 270 秒で減衰しているが、これは主に、液体が蒸発し観測領域から逃げているのが原因である。今後、温度制御し蒸発を抑える予定である。

次にエタノールのプロトンに偏極を移すことを念頭に、エタノールに溶けたキセノンの共鳴線を観測した。実験では図3 (b) に示すように、低磁場のまま混合気体を加圧しながら流している。図3 (a) に示すように、共鳴線は不均一磁場で広がっているものの、気体キセノンと溶解したキセノンは区別できている。今後、磁場の均一度を向上させ原子密度を正確に評価できるようにし、エタノール中の偏極キセノン濃度が高くなるような条件を探す。

実験では、図1のように、狭線幅化した半導体レーザー光 (795 nm, 2.3 W) を Rb 金属蒸気で満たしたガラス容器に照射し、光ポンピングする。その容器に Xe(自然同位体比), N_2 , ^4He ガス (合計 ~ 1.5 気圧) を流し、Rb 原子から Xe 原子へ偏極を移す。容器温度は約 120 $^\circ\text{C}$ 、静磁場は約 3 mT である。励起コイルは広い周波数範囲で使えるよう非共鳴にし、ピックアップには 580 回巻コイルを使用した。現在の Xe ガス流量は 5×10^{-4} mol/min で、約 1% のスピン偏極率である。今後、温度・圧力・ガス混合比やレーザー強度などの実験条件を最適化し、偏極率向上と生成時間の短縮を試みる。

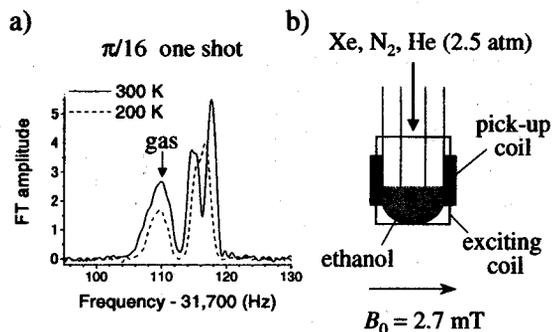


Figure 3: (a) NMR lines of the polarized xenon dissolved in ethanol. The lines are broadened due to the inhomogeneous magnetic field. (b) Schematics of the sample space. The glass tube is 20 mm in outside diameter.

連続フロー型超偏極 ^{129}Xe ガス発生装置の開発
 (産業技術総合研究所光技術研究部門¹、東横化学(株)²)
 ○服部峰之¹、平賀隆¹、大竹紀夫²、村山守男²

Development of Continuous-flow Apparatus for Hyperpolarized ^{129}Xe
 Photonics Research Institute,
 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology¹
 Toyoko Kagaku²
 Mineyuki Hattori¹, Takashi Hiraga¹, Norio Otake² and Morio Murayama²

A specialized flow-through type apparatus for Xe polarization which is installed just before the nuclear magnetic resonance detector, and is free from He buffer gas and cold-trap storage is proposed. The efficiency of hyperpolarization increased by increasing the partial pressure of rubidium vapor that absorbs the light in the flow apparatus. A linear diode laser arrays (794.7nm, 60W) was used as light sources and the arrays are arranged so that all the gas flowing through the cell passes through the region where the pumping light is sufficiently intense. This design enables the device to continuously generate hyperpolarized Xe gas. The prototype of this apparatus was constructed and the performance for the polarization of natural abundant Xe gas was evaluated.

【超偏極希ガス発生装置の開発】

MRI 診断用に大量発生を想定した、出力 100W 以上のダイオードレーザーを励起源とした装置として、 ^4He をバッファースガスに用いて3気圧以上の高圧下で ^{129}Xe を運び偏極させ液体窒素でトラップして貯蔵する装置の開発が進められている。高圧にしている理由は、高圧広幅化によりレーザー励起光を効率よく吸収させるためである[1]。我々は、フローセルを用いて常圧付近で安全にガスを流しながら偏極希ガスを製造し、後方に核磁気共鳴装置を配置することで連続的に偏極希ガスを発生させた後、偏極率を減少させずに短時間で NMR 測定を行える偏極装置を提案した[2]。これまでの円筒状ガラス容器を採用した偏極装置では、励起光強度は入射方向の入射面からの距離に依存して指数関数で減少する。円筒状ガラス容器内での Rb 等の濃度は、励起光が強い部位に最適化して決定するため、入射面からの距離が離れた励起光強度が弱い部分がかかなりの体積を占めることになる。こうした励起効率の低い部位での偏極率の低下は、ガス分子が対流・拡散によって効率の高い部位に移動することにより解消されるが、全体の励起効率を低下させている原因となる。最近、この装置のセル形状を改良した装置を東横化学(株)と共同開発し、常圧で安全にガスを流しながら行う、偏極希ガスの発生方法を最適化する研究について発表する。

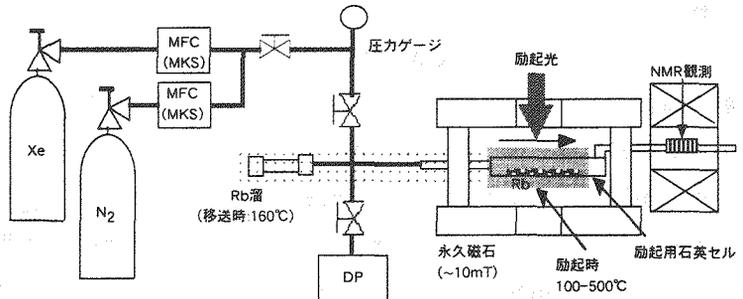
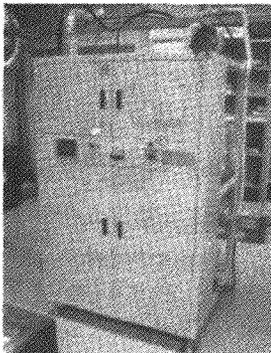


Fig. 1 Developed hyperpolarization Apparatus for Xe gases

超偏極ガス発生装置、 ^{129}Xe 、半導体レーザー、光ポンピング、偏極率

はっとりみねゆき、ひらがたかし、おたけのりお、むらやまもりお

【装置と実験結果】

Fig. 1 に連続フロー型偏極装置の概略を示す。Xe, N₂ ガス(日本酸素:99.995%高純度ガス)は、マスフローコントローラー(MKS:M-100-11C, M-310-01C)で、流量(Xe:~10sccm, N₂:~1sccm)を制御した。その後、ラインで混合され、あらかじめ Rb 金属を薄膜状に蒸着した石英製励起セル(~15mm×70mm×1mm)へ導入される。このセルは、窓付きの炉中に設置し、ライスター熱風機を用いて、室温~500°C程度の温度に保持することが可能である。これまで、希ガス偏極実験には、パイレックス系ガラスが主に用いられており、³He の場合は、GE180 が最適であると報告されている。これは、ガラス壁による緩和効果がいささか小さいことによると考えられる。石英は、一般に常磁性不純物の混入が少ないので、壁緩和に関してもパイレックスより優れている。また、500°C程度の高温度で、Rb 金属を酸化させないで保持できることが確認されている。Rb 濃度を高める[3]ことができれば、励起光を強くして Xe 核と偏極 Rb との衝突回数も増大させられ、偏極効率を効果的に上昇させられることが予想される。光ポンピング過程は、10mT 程度の磁場中で行うと効率が良い。ここでは、Fig.1 中に示した、住友特殊金属製の永久磁石を利用した。4本の支柱を持ち、上下の磁性ステンレス鋼板には励起光を磁束と平行に入射できる開口(80mm φ)を設けた。励起光には、GaAlAs ダイオードレーザー(OptoPower:OPC-A020-795-CSPS;795.11±1nm, 20W)を使用した。ビーム(エミッタサイズ 200μm×1μm)をλ/4 波長板(CVI:QWPO-795-10-4-R15)を通して回転偏光にした後、セルの1mm厚さ方向から入射した。セルを出た後の混合ガスは、炉外の管内に來ると冷却され Rb は除かれる。こうして、生成した偏極 Xe ガスの FID 信号を、永久磁石(0.3T)を利用したパルス方式 NMR 装置(サムウェイ:3.574MHz)を使って、時間をおってモニターした。偏極率の計算は、同一周波数(0.083T)での約 1/4 の体積の硫酸銅水溶液からの ¹H NMR の FID 信号の振幅を基準とした。ガス流量の上昇に伴い偏極率の上昇が観測されたが、さらに流量を増やすと最大を観測し減少した(Fig.2 参照)。今回得られた、超偏極 Xe の偏極率自体は、さほど大きくないが、混合ガスのセルでの滞在時間(10 秒程度)を考慮すると従来のバッチ式偏極装置よりも、格段に発生効率は高いと考えられる。

【まとめ】

今回、連続フロー型での超偏極 Xe ガス発生効率を検討した。連続フロー動作では、壁緩和の効果を避けられるという点で、従来の溜りに基づく偏極ガス発生法の限界を超えるものである。そして、NMR の検出感度を飛躍的に向上させる超偏極技術は、対象原子核周りの、物理化学的なスペクトル情報の実時間取得(いわゆる、Real-time NMR)と時間軸情報解析の新次元開拓の基礎となる技術である。

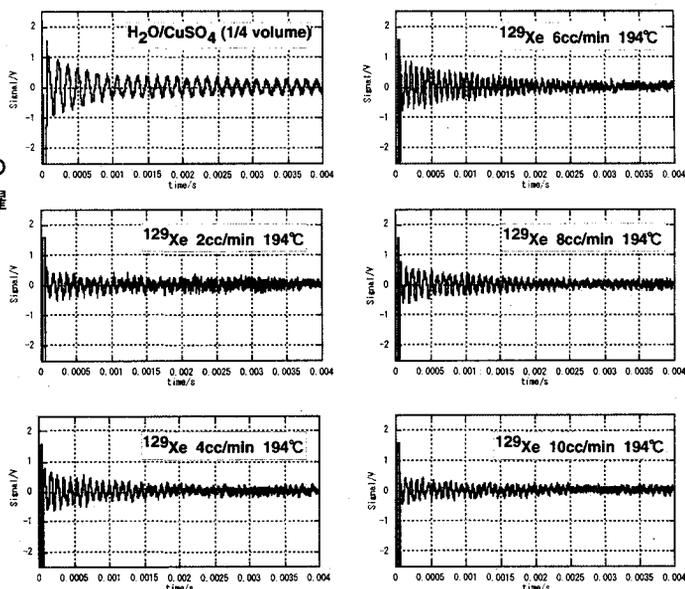


Fig.2 Flow rate dependence of polarization rate of ¹²⁹Xe.

【参考文献】

- [1] B. Driehuys, G. D. Cates, E. Miron, K. Sauer, W. Happer, Appl. Phys. Lett. 69, 1668 (1996).
- [2] 服部峰之、平賀隆、守谷哲郎、第36回NMR討論会講演要旨集, P9, 103 (1997).
- [3] T. J. Killian, Phys. Rev. 27, 578 (1926).

Development of Ultra Broadband NMR Probe; Delay Line Probe

Department of Chemistry, Graduate School of Science,

Kyoto University, 606-8502 JAPAN

Atsushi Kubo, and Shinji Ichikawa

We have investigated the delay line probe proposed by Lowe and his co-workers in 70s, numerically and experimentally. We calculated the electrical characteristics of the probe and found that they were almost the same as those of a cascaded LC low-pass filter, where L was the total inductance of the coil divided by the number of the units. The characteristic impedance of the delay line coil can be calculated by $Z = \sqrt{L/C}$. We also calculated the distribution of RF magnetic field inside the probe. The field strength oscillates along the coil axis, since reflections at the coil ends cause a standing wave. The amplitude of the oscillation was reduced by decreasing the pitch near the both ends and making the impedance near the ends close to that at the center.

通常の NMR プローブは共鳴型の回路を用いている。このため照射できるラジオ波の周波数は共鳴周波数の上下数 100 kHz 程度にかぎられる。金属微粒子、四極子核、強磁性体、静磁場勾配下の NMR 測定等、スペクトル幅が極端に広い場合には、共鳴型の NMR プローブでは都合の悪い点が多くある。1 次元スペクトルの測定は共鳴型のプローブを用いても、磁場スイープを行うことで観測できる。しかしながら磁性体や伝導体のように磁場の強度の関数で物性が変化するような試料では固定磁場で測定を行う必要がある。また、2 次元や選択励起 NMR の実験は高速で磁場をジャンプさせない限り不可能である。非許容遷移を励起する実験ではいちいち多重共鳴プローブを製作するのは大変な手間である。70 年代に Lowe らは超広帯域のラジオ波照射が可能な遅延線 NMR プローブを発表している。⁽¹⁾ 本研究では電磁波シミュレーションとプローブの製作により、遅延線 NMR プローブの性質を明らかにした。

NMR プローブ、広帯域、固体、電磁波シミュレーション、遅延線

くぼ あつし、いちかわ しんじ

遅延線 NMR プローブではコイルに狭い間隔でコンデンサーを配置し、低域通過フィルターに似た構造を形成している。(図1) NMR のプローブとして要求される条件は次の点である；(a)一定入力電圧に対し最大の RF 磁場の強度が得られる；(b)RF 磁場がコイル中で均一になっている。(a)に関してはインピーダンスマッチング条件に左右される。RF 電力は通常 50Ω の同軸ケーブルを通してコイルに加えられるので、

図1

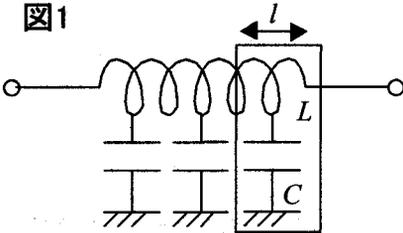
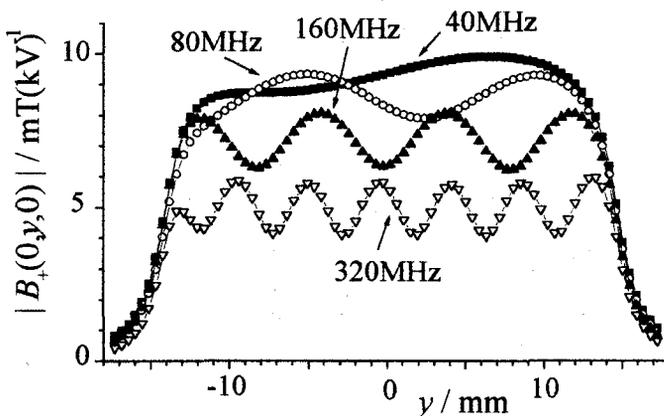


図1の回路の特性インピーダンス Z も 50Ω に合わせる必要がある。図1の回路のコイルを直線のエレメントに分割し、Neuman 公式で相互インダクタンスを求め、Moment 法(2)で Z や各エレメントを流れる電流を計算した。 Z は、コイル長が RF の半波長(ただし自由空間に比べると非常に短縮されている。)の

整数倍となる周波数で分散型の異常を示した。それ以外の周波数ではユニット(図1の点線で囲まれた部分)当たりのインダクタンス L およびキャパシタンス C から $Z = \sqrt{L/C}$ で計算される値に近くなった。また $\nu_c = 1/\pi\sqrt{LC}$ で与えられる遮断周波数を持っている。

またコイル内の RF 磁場の分布を計算した。RF 磁場の強度はコイルの軸 (y 軸) 方向で振動する。(図2)これはコイルの両端で RF の反射が起こり、その結果定在波がコイル内に存在するためであることが判明した。前述の Z の異常も定在波の存在に起因している。シミュレーションでコイルのピッチを両端で小さくしてインダクタンスがより均一になるように変えてやると 100MHz 以下の周波数では、定在波の振幅を減らすことができた。

図2 コイル軸 (y 軸) 方向の RF 磁場の分布
RF distribution along the coil axis



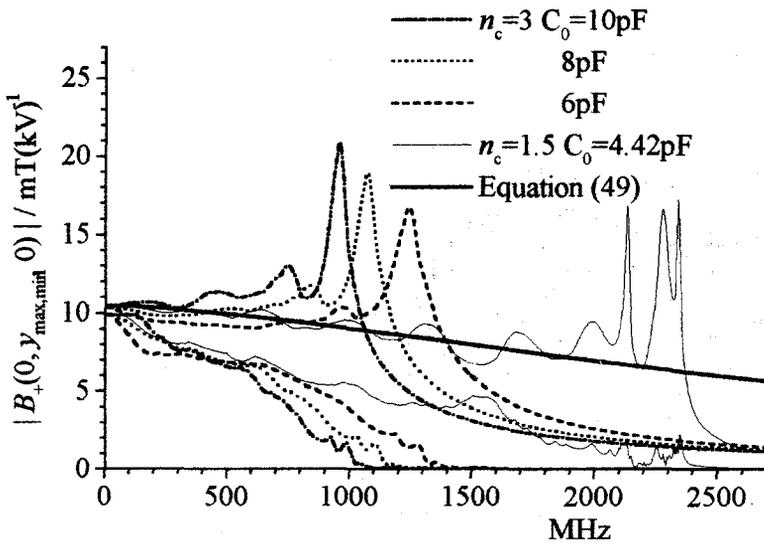
コイル軸状で RF 磁場の最大、最小値を計算したところ、搬送波の周波数の増加とともに単調に減少することがわかった。これは高周波数ではコンデンサーのついている部分を境にして電流の位相がシフトし、異なる部分に由来する RF 磁場が干渉し合うためである。コイル内の RF 磁場は導波管の理論を用いて解析的に解くことが可能である。コイルの径を a 、ピッチを p とすると、コイルの軸上では RF 磁場は次式で与えられる。

$$B_y \approx (\mu_0 V_{in} / 2Zp)(v/v_d) K_1(v/v_d)$$

$$v_d = (Z/\pi^2 \mu_0 a)(p/a)^2$$

ただし V_{in} は入力電圧、 $K_1(x)$ は変形 Bessel 関数である。 $x \approx 0$ で $xK_1(x) \approx 1$ 、 x の大きいところで $xK_1(x) \approx \sqrt{\pi x/2} e^{-x}$ となる。解析的な式はシミュレーションで得られた定在波の山の部分とよく一致することがわかった。(図3) NMR の信号を観測するためには v_d が観測周波数に比べて非常に大きくなくてはならない。 Z 、 v_c および v_d の条件からコイルの径を小さくしないと、極端な低周波数帯域でしかプローブは使用できなくなる。またコイルを流れる電流はほぼ $I = V_{in}/Z$ の条件で決まっている。同じ入力パワーに対し電流はコイルの特性インピーダンスの平方根の逆数 ($1/\sqrt{Z}$) に比例する。

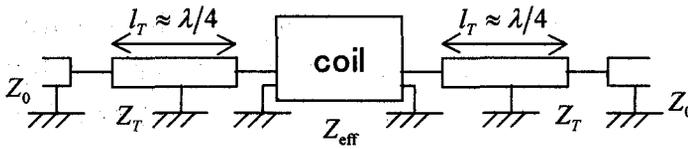
図3 円筒形コイルの軸上での RF 磁場の最大、最小値
Maximum and Minimum RF field in cylindrical delay line coils



径 2.3mm およびピッチ 1.2mm のコイルを作って実験したところ ^1H (400MHz) 観測では $Z = 50\Omega$ のプローブで十分な RF 強度 (60 kHz/100W) が得られた。このプローブで ^{23}Na (106MHz) を観測したところ RF 強度は (11 kHz/100W) で信号も弱かった。 $Z = 12.5\Omega$ のコイルを用い、帯域幅を犠牲にして、図 4 のように $\lambda/4$ ケーブルでインピーダンス変換したところ、 ^{23}Na に対し約 2 倍の RF 強度 (20 kHz/100W) が得られた。

図 4 $\lambda/4$ ケーブルによるインピーダンス変換

整合をとるにはケーブルのインピーダンスを $Z_T = \sqrt{Z_0 Z_{\text{eff}}}$ となるようにする。



本研究は 2000-01 年度分子研流動部門 (分子クラスター部門) で行った。研究費の支給に感謝する。またチップコンデンサーを村田製作所から提供いただいたことを感謝する。

(1) I. J. Lowe, and M. Engelsberg, *Rev. Sci. Instrum.* 45, 631 (1974); I. J. Lowe, and D. W. Whitson, *Rev. Sci. Instrum.* 48, 268 (1977). (2) M. N. O. Sadiku, *Numerical Techniques in Electromagnetics*. Boca Raton, CRC Press, 2001; J. Jin, *Electromagnetic Analysis and Design in Magnetic Resonance Imaging*, Boca Raton, CRC Press, 1999; S. Ramo, J. R. Whinnery, and T. Van Duzer, *Fields and Waves in Communication Electronics*, New York, John Wiley & Sons, Inc. 1994.

P 141

InPの光ポンピングNMR

物質・材料研究機構 ○端 健二郎、後藤 敦、清水 禎
JST-CREST 大木 忍

Optical pumping NMR of InP

National Institute for Materials Science ○K.Hashi, A.Goto, T.Shimizu
JST-CREST S.Ohki

We have developed an optically pumped (OP) NMR system for semiconductors. A circularly polarized laser light pumps up the polarizations of the electron spins, which are transferred to the nuclear spin via hyperfine couplings resulting in a significantly enhanced NMR signal. We have performed OPNMR measurements on InP with several kinds of dopants (S, Sn, Zn and Fe), and confirmed that the efficiency of the signal enhancement of ^{31}P strongly depends on the dopants and temperature. In the presentation, we will discuss the conditions for the effective OPNMR in InP.

NMR信号を劇的に増強させることができる光ポンピングNMRの技術開発を行っている。この技術はNMR量子コンピュータにおける初期化の問題を克服するための有力な候補である。光ポンピングNMRの実験では、半導体のバンドギャップに相当する波長を持つ円偏光レーザーを試料に当てた後に、NMR信号の観測を行なう。これまでにInPに対して低温（4.2K）において光ポンピングによって ^{31}P 核の信号強度を増大することに成功している（図1）。このようなNMR信号の増強はドーパントや温度に強く依存する。今回、この光ポンピングによる信号強度の増大の温度依存性を測定し、その結果、20 K以下の温度で光ポンピングの効果が現れ始め、最低温度の4.2Kまで低温になればなるほど、その効果は大きくなっていくことが明らかにした（図2）。

キーワード：光ポンピングNMR、化合物半導体、技術開発

○はしけんじろう、ごとうあつし、しみずただし、おおきしのぶ

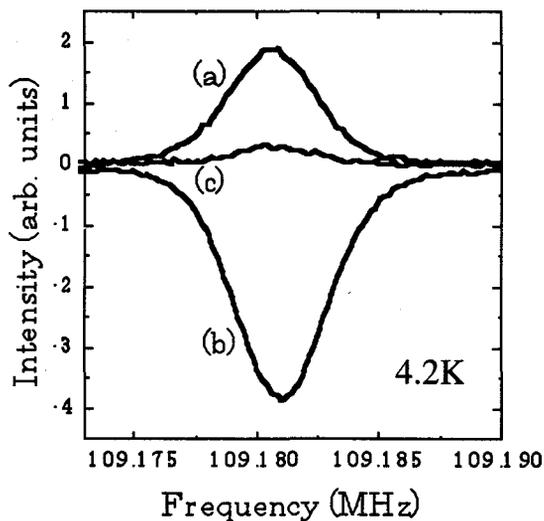


Fig1. OP-NMR spectrum of InP on ^{31}P .
 (a) with σ^- laser, (b) with σ^+ laser and (c) without laser

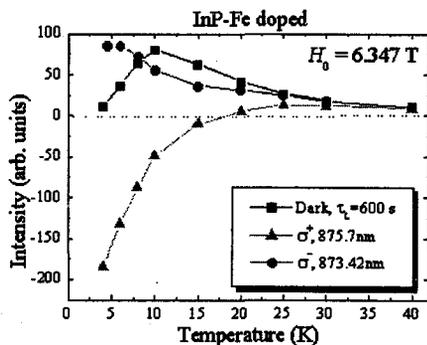


Fig 2. Temperature dependence of the OP-NMR intensity.

なお、本研究は、科学技術振興事業団、戦略的創造研究推進事業「電子・光子等の機能制御」、および、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)「平成14年度産業技術研究助成事業」の一部として行われたものである。

○前田秀明^{1,2}、菊地淳^{1,2}、伊藤隆^{1,2}、廣田洋^{1,2}、横山茂之^{1,3,4}、氣田佳喜、
⁵朝倉克夫⁵、末松浩人⁵、栗原範明⁵、伊藤聡⁶、三木孝史⁶、吉川正敏⁷、
 松本真治、佐藤明男⁷、木吉司⁷、和田仁⁷

(¹理研 GSC、²横浜市大院理、³理研細胞情報、⁴東大院理、

⁵日本電子(株)、⁶(株)神戸製鋼、⁷物・材機構)

Protein research program by ultra high field NMR.

H.Maeda^{1,2}, J.Kikuchi^{1,2}, Y.Ito^{1,2}, S.Yokoyama^{1,3,4}, Y. Kida⁵, K. Asakura⁵, H.Suematsu⁵, N.Kurihara⁵, S.Ito⁶,
 T.Miki⁶, M.Yoshikawa⁷, S. Matsumoto⁷, A.Sato⁷, T.Kiyoshi⁷ and H.Wada⁷,

¹Genomic Sciences Center, RIKEN, ²Grad. Sch. Integ. Sci., Yokohama City Univ., ³Cell. Sign. Lab., RIKEN,

⁴Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo, ⁵JEOL Ltd, ⁶Kobe Steel Ltd and ⁷Tsukuba Magnet Laboratory, NIMS

Tsukuba Magnet Laboratory (TML) of NIMS and RIKEN Genomic Sciences Center are working together on the development of high-resolution NMR spectrometers beyond 900MHz, applicable to protein research. As the first step toward 1 GHz, a 920 MHz NMR magnet was manufactured; after a long-term persistent current mode operation at 920MHz at Kobe Steel, the magnet was transferred to TML. The magnet was equipped with a high-resolution NMR console and a ¹H selective probe, provided by JEOL Ltd. Persistent current mode at 920 MHz restarted in TML in April, 2002. The field stability of 2Hz/h was achieved. The ¹H sensitivity measured on a thin-walled 0.1 % ethyl benzene test tube was as high as 2981. Several ¹H 2D-NMR experiments for 1mM lysozyme were performed, suggesting enhancement of nOe signals. The resolutions bring us more precise restraints in the structure calculation of proteins. The magnet will be equipped with a triple resonant device. Development of novel NMR hardware will give considerable benefits not only for nOe collections but also for studies of medium to large macromolecular complexes by using the TROSY-type experiments.

1. はじめに

タンパク質の構造・機能解析にNMR法を適用する場合、磁石の磁場が高いほど感度と分解能が向上するうえ、TROSY法を用いれば大きな分子量のタンパク質の計測が可能になる。この度、永久電流モードで動作する磁石としては世界最高の磁場を発生する21.6T(920MHz)のNMR磁石が完成した。これに¹H計測用のNMR装置を取り付けて基礎的なNMR計測を行うとともに、リゾチームのNMR計測を行ったので報告する。

2. 920MHzNMR装置

(1) NMR磁石

Fig. 1に超伝導磁石の構成を示す。磁石は文部科学省の超伝導材料研究マルチコアプロジェクト

キーワード: タンパク質、高磁場NMR、感度上昇、リゾチーム

まえだひであき、きくちじゅん、いとうゆたか、ひろたひろし、よこやましげゆき、きだよしき、あさくらかつお、すえまつひろと、くりはらのりあき、いとうさとし、みきたかし、よしかわまさとし、まつもとしんじ、さとうあきお、きよしつかさ、わだひとし

第2期の一環として、物質・材料研究機構と(株)神戸製鋼が開発した¹⁾。高磁場には Ti 添加の Nb₃Sn 超伝導線材、低磁場には NbTi 超伝導線材を巻き、超流動ヘリウムで冷却している。

900MHz級 NMR 磁石では、中心磁場が仕様(約 10Hz/h)を超えて減衰する場合がある。これは主に次の様な理由である。

- ① 最内層コイルが置かれた磁場強度(21.1T)では Nb₃Sn 線材の臨界電流密度が著しく低下し、線材の電流密度のマージンが少ない。そのため、熱処理の不具合や線材に加わるわずかな歪で特性劣化が生じ、中心磁場の減衰が生じ易い。
- ② 中間層部分の Nb₃Sn 線材には大きな電磁応力が加わる。この応力で超伝導線材の特性が劣化すると、中心磁場の減衰が生じる。

本磁石では、①への対策として Nb₃Sn 線材のブロンズマトリクスのスズ濃度を増加し、21T での超伝導特性を約50%向上させたものを開発して、最内層部分に用いた。また、冷媒である超流動ヘリウムの温度を従来(2K)より低い1.55K まで下げることで、超伝導線材全体の電流密度を増加させた。ただし、冷却用の熱交換器の排気容量が増加するので、ヘリウム蒸発量は88 Occ/h と従来に比べて若干多くなった。

②への対策として、Nb₃Sn 線材に剛性の高い Ta 芯を埋め込んだ超伝導線材を新たに開発して、電磁力の高い中間層のコイルに巻き、電磁力に強いコイル構成とした。

本磁石は神戸製鋼が製作し²⁾、昨年12月に物質・材料研究機構強磁場研究センターに設置された。本年4月に、920MHzまで励磁した後、現在まで6ヶ月にわたり永久電流モードで運転している。クライオシム補正後の磁場均一度は113Hz/10mmφ×20mm、磁場安定度は2Hz/hであった(後述)。15トンという磁石の重量(マグネット、クライオ、冷媒込み)を考慮し、15組のエアダンパで分担除振した。振動計測やNMR計測の結果から、除振台は問題なく作動している事を確認した。

(2) 分光計

分光計として日本電子(株)のECAシリーズに準拠したものを試作し、磁石に¹H計測用のプローブを取り付けてNMR計測を行った。本分光計は、マスターパルサの下で、スレーブパルサが独立にRF周波数、オフセット、位相、振幅などを制御する方式である。¹H周波数のパワーアンプは150Wまで発生できるが、計測室から磁石までのケーブル(20m)などの影響で、試料空間では最大約60Wになる。

室温シムは110組の小コイル群からなる。演算でエラー成分を合成する電流を求め、個別の小

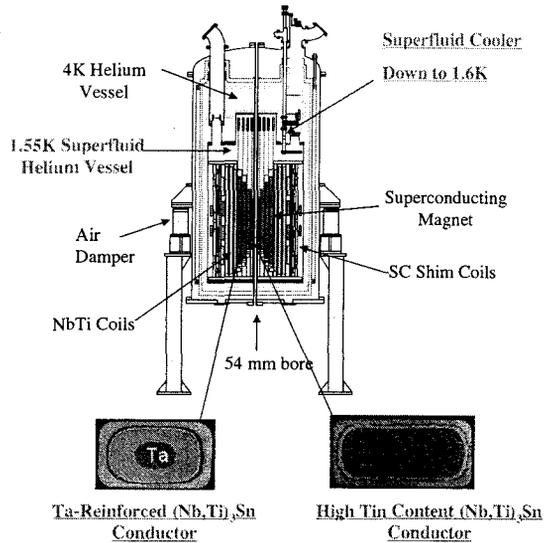


Fig. 1 Cross sectional view of the 920MHz NMR magnet in TML. Cross section of the Nb₃Sn conductors are also shown in the figure.

コイルに通電する。シムチャンネルに応じてコイル数を増やす必要がない上、コイル発熱の最小化設計がなされているので、シムチャンネル数を増加できる。本磁石では44チャンネルの室温シムとした。 Z^0 、 Z^2 、 Z^4 などはメインコイルとカップリングがあるので、これらのシムで補正後メインコイルの電流が安定化するまでに一定の時間が必要であった。

^1H 検出用の920MHzプローブでは、内側RFコイルを ^1H の検出に利用し、外側RFコイルを ^2H ロックに用いた。RFコイルの線材長(～4cm)が、920MHzの電磁波の1/4波長(8cm)に近い値なので、分布定数回路としてRFコイル電流の位相を考慮する必要がある。本プローブでは、位相によるRF磁場の不均一性を抑制する為に、コイルを分割構成とし、チューニングコンデンサで接続した。コイル材料は、高周波表面抵抗、磁化率などに基づいて選択した。プローブ設計にあたり、感度を最も重視した。ポイントは次の通りである。①高効率化の観点からRFコイルはシングルチューニングの内外2コイルとした、②RFコイル長を従来より長くした、③ケーブルロスによるNMR信号の減衰を減らすためにヘッドアンプはプローブ下部に直付けした、④ヘッドアンプ用に低NF(<0.5dB)のFETを選択した。

3. NMR 計測の結果

(1) 基礎的な NMR データ

Fig. 2に、920MHzにおける水の ^1H スペクトルの時間変化を示す(^2H ロックなし)。横軸は相対周波数、縦軸は計測開始後の時間である。図のスペクトルの直線の傾きから磁場の安定度が2Hz/hと求まる。NMR装置の磁場安定度の仕様(約10Hz/h)を考慮すれば、本磁石の磁場安定度は非常に優れていることが分かる。

0.1%エチルベンゼン/クロロホルムの920MHzでの ^1H スペクトルから感度を求めた。通常の肉厚の5mmφ試料チューブでの感度は2581、肉厚の薄い5mmφ試料チューブ(Wilmad 555)での感度は2981であった。これは600MHzの場合の約2倍であるとともに、従来発表されている900MHzでの値より20%高い値である。この意味で、プローブの高感度化設計は成功したといえる。

1%クロロホルム/アセトンの ^1H スペクトルの線形データをFig. 3に示す(試料チューブ5mmφ)。半値幅が0.54Hz、0.55%値が7.07Hz、0.11%値が14.0Hzである。感度を重

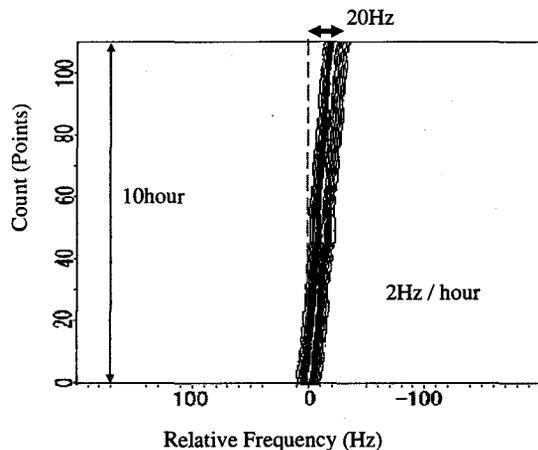


Fig. 2 Contour plots of the ^1H -NMR spectra of doped water observed at 920MHz without ^2H lock.

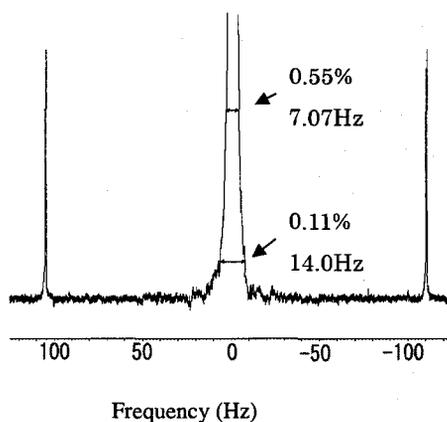


Fig. 3 ^1H NMR line shape for 0.1% CHCl_3 without sample spinning.

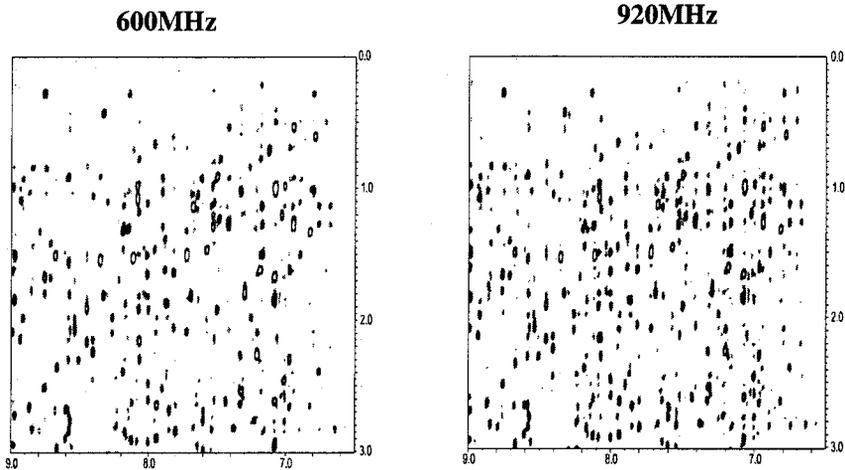


Fig. 4 Comparison of the 2D-NOESY spectra for 1mM Lysozyme with mixing time of 100msec: 2048x256pts by 16 scans..

視した影響で、線形については少し劣る結果であった。タンパク質の計測の一部では、サンプル長を調整して実質的な線形を向上させた。

(2)タンパク質の NMR データ

Fig. 4に1mMの卵白リゾチームについて測定したNOESYの結果を示す。側鎖の β プロトンやメチル基に対応する脂肪族領域を f_2 軸(縦軸)に、アミドプロトンに対応する周波数領域を f_1 軸(横軸)に表示した。図には併せて600MHzで得られたNOESYを示した。600MHzでは243個の ^1H - ^1H 位置情報が得られるが、920MHzではこれが1.5倍の368個に増加しており、高磁場による感度上昇の効果が明らかである。

以上のほかに、DQF-COSY、TOCSYなどの2次元 ^1H 計測についても感度の高いデータが得られたが、ここでは具体的なデータは省略する³⁾。

4. おわりに

世界最高の磁場を持つ920MHz磁石に ^1H 検出のNMR分光計を取り付けNMR計測を行った結果を報告した。今後、タンパク質構造・機能解析に必要な3核プローブを開発し、活用していく。磁石については、物質材料研究機構を中心として、更に高磁場の940MHzを目標とした磁石開発に着手する予定である。

参考文献

- 1) T. Kiyoshi et al.(2002) IEEE Trans. Appl. Supercond.12,p711
- 2) K. Hashi et al. (2002) J. Magn. Reson., 156, p318.
- 3) T. Kiyoshi et al.. (2002) presented at the XXth ICMRBS in Toronto.

(産総研生物情報解析研究センター)○根本直、金澤健治、石塚靖子、
中西洋志

(国立医薬品食品衛生研) 中野達也、

(富士総研) 福澤薫

(産総研分子細胞工学研究部門) 古明地勇人、上林正己

(産総研計算科学研究部門)北浦和夫

Molecular orbital calculations for proteins by FMO.

(AIST/BIRC) Tadashi Nemoto, Yasuko Ishizuka, Kenji Kanazawa, Hiroshi Nakanishi

(NIHS) Tatsuya Nakano

(Fuji RIC) Kaori Fukuzawa

(AIST/IMCB) Yuto Komeiji, Masami Uebayashi

(AIST/RICS) Kazuo Kitaura

Non-empirical molecular orbital calculations have been familiar for small molecules to analyze electronic and energy status. After 'structured' by NMR, molecular orbital calculations can offer analysis for charge-dependent inter-molecular interaction by electronic order.

An application to a pheromone binding protein from silkworm (*Bombyx mori*) will be presented and discussed.

はじめに 蛋白質の構造の取得は近年、ますますルーチン化しつつあり、構造取得後にいかにしてさらなる情報を導出するかが一つの課題となっている。低分子量分子の分野では Gaussian 等の非経験的分子軌道法による電子状態解析が常識的におこなわれているが、蛋白質等の大きな生体分子への活用は電算機的能力から現実的に不可能とされてきた。今回、フラグメント分割に基づく非経験的分子軌道計算を蛋白質に応用したのでその一例を報告する。

方法 カイコガ性フェロモン結合蛋白質の構造ファイルを Protein Data Bank より取得した。リガンドを含めた構造は X 線結晶構造解析のデータのみであったので、今回はそれを利用した (PDB:1DQE)。InsightII ソフトウェアにより PDB ファイルに水素を発生させ CHARMM 力場によりその位置を最適化した。リガンド-結合蛋白質間の水素結合を考慮して Gaussian98 により水酸基水素の方向をさらに最適化した。その後フラグメント分子軌道 (FMO) 法にて Hitachi SR8000 スーパーコンピュータの 256CPU を利用して 1 点計算を行な

PDB ファイル AB INITIO 分子軌道法 相互作用 結合エネルギー コンピュータシミュレーション

ねもとただし、かなざわけんじ、いしづかやすこ、なかにしひろし、なかのたつや、ふくざわかおり、こめいじゆうと、うえばやしまさみ、きたうらかずお

った。

結果 カイコガ性フェロモン結合蛋白質構造ファイル(1DQE)は137残基と性フェロモン分子(ボンビコール)を含んでいる。FMO計算はリガンド無し、リガンドを含んだ複合体の状態とも単量体で2時間前後の計算時間で終了した。その結果、フェロモン結合蛋白質はリガンドの結合によって、リガンド周囲のチャージがわずかに変化するのみであった。また、リガンドあり、リガンド単体、リガンド無しの系のそれぞれの計算結果の差分から結合エネルギーを見積もると、FMO法の持つ誤差とほとんど同一であったことから、結合エネルギーは非常に弱いと判明した。

フェロモン結合蛋白質はオス成虫触角の化学受容器内の体液成分の98%ほどを占め、かつ、その濃度は10mMにまで達することが知られている。計算結果は、実際にカイコガオス成虫のコーリング中のメス成虫発見の行動に際し、結合エネルギーが低いことが有利に働くことを示唆している。

以上のような解析から、NMR法では水素の向きまで決定できるので、本手法を適用すれば分子間相互作用を精密に解析することができると考えている。

今後は、Linuxクラスタ並列計算機を用いて、既存のPDBファイルや新たに取得したNMR溶液構造に対して本手法を適用して電子状態の精密解析し、それをアプリオリに利用できるルーチン化していきたいと考えている。

The signal calculations for REDOR experiments with overtone radio-frequency pulses

(The University of Electro-Communications) Daisuke Kuwahara

We performed computer simulations to calculate the intensity reductions of ^{13}C NMR resonance lines observed in REDOR experiments employing a ^{14}N overtone radio-frequency (RF) pulse. In the present study, we took two kinds of ^{14}N overtone pulses into account. The one is a normal overtone RF pulse with a constant carrier frequency, and the other is an adiabatic overtone RF pulse with frequency sweep. It turned out that the REDOR experiments employing the latter RF pulse had much less dependence on the offsets of RF carrier frequencies. In addition, the effects of B_1 inhomogeneity on these REDOR experiments were also calculated. The details will be presented in the conference.

<はじめに>

固体状態の蛋白質の構造決定に広く用いられている Rotational Echo Double Resonance (REDOR) NMR 法は、測定対象となるスピン系を ^{13}C と ^{15}N で同位体置換してから用いられる場合が圧倒的に多い。近年これに対して ^{15}N の同位体置換を行わずに 99%の天然存在比をもった ^{14}N をそのまま用いて 異種核間双極子相互作用を測定する試みも幾つか行われている。我々もここ3年にわたって 通常の RF NMR パルスの代わりに overtone RF パルスを用いて REDOR 現象を観測する試みを行ってきた。そして その overtone RF パルスを、断熱的に周波数をスイープする adiabatic overtone RF パルスにしてやると、 ^{14}N overtone 分極の反転効率がかなり向上することを見出した¹⁾。

今回 我々は、overtone RF パルスを用いた REDOR 実験で得られる ^{13}C 信号強度の減衰量を精確に計算することができるシミュレーションプログラムを作成した。本研究ではそのプログラムを使った様々な計算機シミュレーションの結果を発表する。

Key Words: REDOR, overtone

著者ふりがな：くわはらだいすけ

<シミュレーション>

本研究でシミュレーションを行った実験は、

^{13}C : CP - $[-T_r/2 - (\pi) - T_r/2 -]_n$ - (no pulse) - $[-T_r/2 - (\pi) - T_r/2 -]_n$ - acquisition

^{14}N : (pulse)

である。試料に関するパラメータには *N*-acetyl-*D,L*-valine (NAV) のものを用いた。

シミュレーションプログラムはマジック角試料回転を行っている同種核 2 スピン系のプログラムを基にして作成した。(化学シフト主軸系, 双極子相互作用主軸系) → 分子内(固定)座標系 → ロータ系 → 実験室系という座標変換を考慮に入れた計算ができるようなプログラムとした。Figure 1 は、NAV の ^{13}C 信号強度の減衰量のオフセット依存性を計算した結果である (RF carrier frequency に対する依存性)。静磁場は 7T、試料回転周波数を 2kHz、パルスの強さを 100kHz、 $n=1$ として計算した。(a) は普通の ^{14}N overtone RF パルスに対する結果で、(b) は周波数スイープを行う adiabatic な overtone RF パルスに対応する結果である。(b) では実験結果がオフセットに依存しない領域が 25kHz 以上も存在する。

B_1 の不均一性に対する性能評価も合わせて詳細については会場にて報告する。

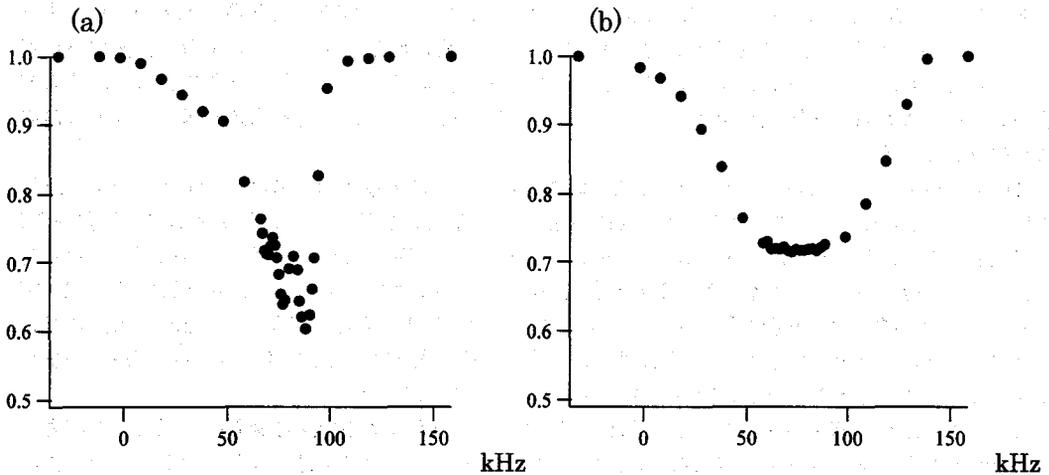


Figure 1. The offset dependence of the intensity reductions of an NMR resonance line for powdered NAV. Figure 1(a) is the simulations for the REDOR experiments with a normal overtone RF pulse. Figure 1(b) is the simulations for the REDOR experiments with an adiabatic overtone RF pulse.

<参考文献>

1) 第 40 回 NMR 討論会 P127

プログラム JUBAKO と UNAJU による NOE 不在情報を利用した蛋白質立体構造決定過程の改良

(¹都臨床研、²現・理研 GSC) °畠中秀樹^{1, 2}

Improvement of Protein Structure Determination Processes Using Information from Missing NOEs by the Programs JUBAKO and UNAJU

(¹ Tokyo Metro. Inst. Med. Sci., ² Present: RIKEN GSC) Hideki Hatanaka ^{1, 2}

In general, a large quantity of information is lost during peakpicking of NOESY spectra, in contrast with the data reduction step in crystallography. This often reduces data redundancy in the NOE peak assignment process, which would lead to errors in the global and local structures. Here I introduce the programs JUBAKO and UNAJU, which use explicitly the information of missing NOEs in order to extract much more information from three-dimensional NOESY spectra.

【はじめに】

残念ながら NOESY スペクトルのピークピッキングでは、結晶解析の場合に比べ、情報量が大きく減少する。このため NOE ピークの帰属作業に余裕がなくなることが多く、それが全体構造や部分構造の誤りを生む原因になっていると考えられる。3次元 NOESY スペクトルから情報を最大限に引き出すための一案として、NOE 不在情報を積極的に利用するプログラムを考案したので紹介したい。

【JUBAKO : 構造を予測 NOE の有無で評価・修正する】

プログラム JUBAKO (Judge of Unsupportableness of BAcK-calculated nOes) は、構造 (座標)、化学シフト表、NOESY スペクトルの 3 種のファイルを入力として、構造から予測される NOE が実際の NOESY スペクトル上に存在するかどうかを判断し、予測に反して存在しない NOE に関する情報を出力する。判断は、ピークピッキングを介することなく、直接データマトリックスを調べ、予想位置のデータが決められた閾値を超えているかどうかを見て行っている。閾値はノイズレベルの 3 倍の値を推奨している。

JUBAKO の用途は大きく 2 つに分けることができる。一つの用途は構造の評価である。予測に反して存在しない NOE はそのプロトン対が不当に近接していることを示す。また、残基対単位で予測 NOE と不在 NOE の数を distance map 様のバブルプロットとして表現したマップは、不当に近づいた残基対を示す (問題のある残基は不在 NOE が十字状のパターンを示す)。さらに、予測 NOE と不在 NOE の分子内での総数の比は構造の質の 1 つの指標となる (但し予測 NOE が通常の distance map に見えるほど十分な数ある場合に限り)。さらには、残基内 NOE に関する JUBAKO の結果は構造にあまり依存しないので、化学シフト表の誤りを見つけるのにも非常に役立つ。

もう一つの用途は構造の修正である。JUBAKO は不在 NOE の情報を距離制限の下限として出力でき、それを X-PLOR や DYANA の追加入力として構造計算することで構造を修正できる。ホモログの結晶構造が存在する例では、マニュアル帰属で解いた NMR 構造が JUBAKO の適用により結晶構造との RMSD が低下するとともに、NMR では表現しにくいと思われる大きな分子内疎水ポケットの存在も表現できるようになった。一般に JUBAKO の結果では、Ramachandran plot が改善され、2 次構造が各種ソフトウェアにより自動認識されやすくなった。さらには、計算後に得られた violation のリストから、通常の距離制限 (上限) ファイルの誤りを見つけることもできた。

キーワード: NOESY スペクトル、構造の評価、距離制限の下限

はたなかひでき

【UNAJU : NOE の帰属を対称性の有無で評価・修正する】

プログラム UNAJU (Unsymmetrical NOE Assignment Judging Utility) は、NOE の帰属リスト (距離制限リストや帰属候補リスト)、化学シフト表、3次元 NOESY スペクトルの3種のファイルを入力として、いわゆる *transposed signal* が実際の NOESY スペクトル上に存在するかどうかを判断し、*transposed signal* が存在しない (つまり非対称な) 帰属を排除する。なお *Transposed signal* とは、シグナル(α 、 β 、 $h(\alpha)$) ($h(\alpha)$ はプロトン α に共有結合したヘテロ原子) に対する(β 、 α 、 $h(\beta)$)のことである。ピークリストに *transposed peak* が存在するかどうかを見て対称性を評価することは例えば CANDID でも行われているが、UNAJU では JUBAKO 同様、直接データマトリックスを調べて閾値を越えているかどうかを見ている。

UNAJU は、複数の帰属候補を絞り込んだり、誤った距離制限を排除したりするのに役に立つ。いわゆる NOESY サイクルの初期に用いた例では、化学シフト情報のみで一意帰属できる NOE ピークの数に比して、UNAJU では3倍ものピークを一意帰属することができ、初期構造の構築に役立った。また、既にマニュアル帰属で構造決定されていた蛋白質に対し、距離制限リストに UNAJU を適用して再計算することで、RMSD と目的関数の値が共に減少した。

【JUBAKO/UNAJU と NOE 自動帰属ソフトウェアとの連携】

最近現れた CANDID は NOE の帰属と構造計算の繰り返し (NOESY サイクル) を自動で行う優れたソフトウェアで、*network anchoring* や *constraint combination* などの工夫を初期段階に盛り込むことでより確実に正しい構造を生成できるようになっている。JUBAKO/UNAJU は CANDID に組み込んで、結果の最終構造と最終距離制限リストに対して上に述べた効果を与えることができる。時に大きく構造が変わることもある。

【考察】

ピークリストに基づく構造情報が化学シフト表の不完全さやスペクトル上の *artifact* により大きな影響を受けるのに対して、JUBAKO/UNAJU では大量の構造情報のうちのごく一部を失うだけで影響が小さい。これはスペクトル上の各点から発生する複数の情報が *or* ではなく *and* で結ばれていることによると言えよう。

一方で、化学シフトの誤りやずれ、あるいは運動性・化学交換・溶媒消去などによるシグナルの消失の影響は直接的である。しかし通常の距離制限 (上限) が少数で全体構造に影響を与えるのに対し、JUBAKO の下限情報の影響は穏やかである。また問題の原子を化学シフト表から除けば影響を完全になくすことも可能である。

残念ながら NOE シグナルは有限の線幅を持ち、ヘテロ原子の化学シフトは共有結合したプロトンの化学シフトとまるで独立ではないので、実在しないのに不在と判断されない NOE は大量にある。元々これらは構造情報として用いないようになっているので直接の影響はない。ただ、この情報量の低下を防ぐ目的で、JUBAKO/UNAJU にはいくつかのオプション (例えば *deconvolution* の併用など) を用意してあるが、使用法については検討すべき点が残っている。

JUBAKO/UNAJU の応用として、2次構造を仮定した場合に予想される NOE が実際にスペクトル上に存在するかどうかを確認することで、2次構造を判断するためのマップを生成できる。これにより α -helix や 3_{10} -helix を検出・弁別したり、 β -strand 間の隣接関係を探して β -sheet を組んだりする作業に用いることができる。予備的なデータではあるが、TALOS のような化学シフトによる予測よりも最終構造に近い判断ができるようである。

【謝辞】

JUBAKO/UNAJU を使ってくださいありがとうございます方々、特にフィードバックをいただいた葛西卓磨氏、小林直宏氏、林文晶氏、鈴木咲良氏に感謝します。

P 146

帰属支援システム(Olivia)における汎用自動解析アルゴリズムに関する考察
CREST/JST¹, 北海道大学薬学部² ○横地政志¹, 稲垣冬彦^{1,2}

Scalable architectures for generic NMR assignment automating system on Olivia
CREST/JST¹, Pharmaceutical Sciences of Hokkaido University^{1,2}

<<Abstract>>

We had a chance to release Olivia system publicly on last 40th NMR meeting. The system was originally developed as an integrated system for manual assignment and analysis of multiple and multidimensional NMR spectra. Together with this stable foundation, which relied on NMR Assignment Process Description Language (NMR APDL), the system could provide sufficient environment that promotes development of automatic assignment sub system. After that we have completed several automatic assignment sub systems on main chain, aliphatic side chain (either NH or HCCH detection) and aromatic side chain respectively. All these automated sub systems are commonly developed by same architecture represented as random pattern sampling method. In the nature of the method, it promises minimal limitation to use and maximal flexibility to develop itself.

<<NMR APDL と自動帰属>>

NMR APDL は帰属プロセスをすべて記録するためのログスクリプトである。NMR APDL は手動帰属すなわちグラフィカルユーザーインターフェイスからの入力と帰属テーブル等の各変数の変更出力を制御している。システムに組み込まれた NMR APDL 関数群を使用すると、帰属テーブルの不一致や化学シフト統計情報 (BMRB) との不整合等の問題なしに帰属を進めることができる。入出力と自動帰属のロジックを完全に分けることで開発時間の短縮と自動帰属プログラムが間違った箇所を手動によって修正することができる。本システムの構成基盤は自動帰属システム開発プラットフォームとして適切である。

キーワード：自動帰属

著者ふりがな：よこちまさし、いながきふゆひこ

<<汎用自動帰属処理>>

汎用自動帰属処理によって解析される実験の種類やそれらの任意の組み合わせには制限がほとんどない。その代わり手動により決定される典型的な帰属パターンが要求される。テンプレートとなる帰属パターンから情報が抽出され一次プロファイルに変換される。この一次プロファイルから各アミノ酸の型に合わせて二次プロファイルを生成する。さらに pseudo atom を扱う場合には二次プロファイルを多重生成するサイクルを繰り返す。

汎用帰属自動化処理のながれ

- Pattern Recognition (Primary Profiling)
- Profile Matching (Secondary Profiling)
- Peak Picking
- Partition Sorting of Candidates
- Random Pattern Generation
- Pattern Filtration
- Assessment
- NMR APDL Functions (Output)

<<拡張性>>

Random Sampling Methodによる自動帰属の精度は、ほとんどPattern FiltrationとAssessmentの両ステージで決定されると言ってよい。主鎖帰属、側鎖帰属にはそれぞれ10段以上の用途の異なるパターンフィルタが用意されている。これらは何度も試験されてはいるが、将来の改訂により精度向上を目指すことができる。(最新のソースコードはOliviaホームページ上で入手可)

<<自動帰属エラー公正>>

さらにRandom Sampling Methodのよって回避できない帰属エラーは、本システムに統合されているReal-Time Assessment Service機能と組み合わせることで大局の見地から自動帰属エラー検出、修正が可能になりつつある。現在主鎖帰属だけが自動帰属エラー公正が可能である。標準サンプルデータ (Grb2-SH2+SHCpYpeptide complex, 104aa+13aa) では帰属エラーの発生率を0%に押さえることに成功した。今後側鎖帰属にも適応される予定である。

Olivia Home Page: <http://fermi.pharm.hokudai.ac.jp/olivia/>

(大阪大学蛋白質研究所¹、科学技術振興事業団²)○中谷英一²、中村春木¹、阿久津秀雄¹

Establishment of a mirror site of BMRB, the NMR database for protein and nucleic acid
(Institute for Protein Research, Osaka University¹, Japan Science and Technology Corporation (JST)²)
○E.Nakatani², H.Nakamura¹, H.Akutsu¹

A mirror site of Wisconsin University Madison BioMagResBank (BMRB) which is a NMR data bank for peptide, protein and nucleic acid, was established at Institute for Protein Research, Osaka University in March, 2002. BMRB provides reference information and maintains a collection of NMR pulse sequences and computer software for biomolecular NMR. Access to data in BMRB is free quickly from BMRB mirror site (Fig 1., URL:<http://bmrprotein.osaka-u.ac.jp>). Here, an informational introduction and the statistics about BMRB which BMRB offers are reported.

ポストゲノム時代を迎え、タンパク 3000 プロジェクトなど、構造プロテオミクスの取り組みが強められている。こうした中で大量の NMR データが生み出されることが予想される。今後は構造データばかりではなく、NMR データをより有効に活用することが求められる。従って、ペプチドやタンパク質、核酸の NMR データバンクである Wisconsin 大学 Madison 校 BioMagResBank(BMRB) への NMR データのデポジットが奨励されている。しかし日本ではそれが充分普及していない。急速に増加が予想される NMR データの収集を進める第一歩として BMRB のミラーサイト(Fig 1.)を本年 3 月大阪大学蛋白質研究所に開設した。ケミカルシフトやスピン結合定数、T1・T2 値や NOE 値など、生体高分子 NMR データベースへの素早いアクセスが可能となった。ここでは BMRB が提供する情報の紹介と BMRB についての統計を報告する。

提供する情報

BMRB はタンパク質や核酸、ペプチドの特定原子ベースに帰属された定量的な NMR データや、そのようなデータの分析から導出されたデータを受け、提供している(Table 1.)。Table 2.はデータのタイプと生体高分子別の BMRB データ(カッコ内は登録)の延べ数のリストであり、2002 年 8 月 31 日の時点で 2329 件が登録されている。目的の生体分子 NMR 情報へのアクセスは分子名や登録番号、残基配列の相同などから検索でき、関係する PDB(Protein Data Bank) データへのアプローチも容易である。全てのデータは NMR-STAR(NMR Self-defining Text Archival and Retrieval)フォーマットでデータベース化されており、その中に記述されている情報の内容は

データベース、BMRB、情報、タンパク質、核酸

○なかたにいいち、なかむらはるき、あくつひでお

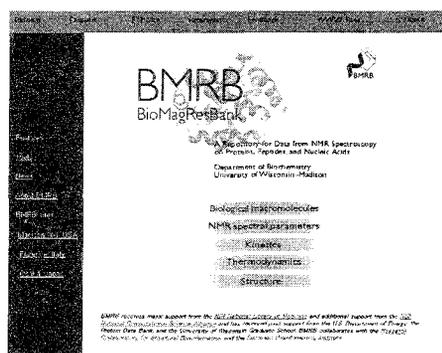


Fig 1. The top page of BMRB Web site.

Mirror site URL : <http://bmrprotein.osaka-u.ac.jp>

Table 1. Data classification.

- NMR spectral data
- Kinetic parameters
- Thermodynamic parameters
- Secondary structure features
- Three-dimensional structures

Table 2. List of NMR Data type and classified biopolymer.

The total number of the entry data and entry number in parenthesis are presented.

Data Type	Polymer Class		
	Proteins/Peptides (2260)	DNA (68)	RNA (25)
All Chemical Shifts	895897 (2229)	9528 (56)	6507 (24)
1H Chemical Shifts	553746 (2078)	8640 (56)	4207 (24)
13C Chemical Shifts	252432 (811)	562 (6)	1908 (13)
15N Chemical Shifts	90306 (836)	45 (2)	324 (11)
31P Chemical Shifts	-	281 (18)	69 (5)
Other Chemical Shifts	-	-	-
Coupling Constants	6733 (120)	102 (3)	-
Dipolar Couplings	859 (7)	-	-
T1 Values	2731 (16)	-	-
T2 Values	2628 (14)	-	-
Heteronuclear NOE Values	2208 (14)	-	-
S2 Values	1190 (9)	-	-
H-Exchange Rates	135 (3)	-	-
H-Exchange Protection Factors	82 (1)	-	-
D/H-Fractionation Factors	-	-	-
pKa Values	-	-	-
3D Structure Entries	(1)	-	-

Table 3.に示される。これらの情報は一つの登録に対して一組のセットで存在しており、NMR 結果の導出についての一連の情報を知ることができる。No.9~13 は NMR 実験の内容に基づき、一つまたは複数登録されている。ウェブページ上部のメニューバー内にある“FTP Site”からは、登録された NMR 情報のファイルやそれに関連するツールソフトウェアを入手することができる。“Reference”では NMR ソフトウェアやパルスシーケンスライブラリ、参照情報が提供される。

データのデポジット

NMR データの預け入れは WWW ウェブサイト経由で行われる。預け主は BMRB サイトのソフトウェアを使用して、NMR 結果のデータテーブルファイルを作成した後に、Wisconsin 大学の BMRB 登録サーバへこのファイルと他の重要な情報を対話形式で提供する。一般にデータは著者による論文の発表の時点で公開される。今後は本ミラーサイトにアジアの拠点として情報登録の機能を備えていく予定である。

BMRB と BMRB-mirror 間のデータ更新

本ミラーサイトは毎朝 4:20 に BMRB プールサーバにアクセスして、データやソフトウェアの更新を行っている。更新は CVS(Current Version System)を用いて変更差分だけ行ない、10 分程度で完了する。

BMRB の登録総数推移

1996 年 3 月に NMR-STAR フォーマットで BMRB の登録がリリースされて以来、登録数は順調に増加している。総登録数における日本からの寄与を NMR-STAR ファイル中の引用情報に基づいて調査し、結果をグラフにしたものを Fig 3.に示す。1997 年 1 月では総数 1207 件に対して 91 件と 7.5%あった寄与度は 2000 年 1 月には 1708 件中 119 件と 7.0%に低下した。現在は 2329 件中 163 件と寄与度は 7.0%と変化していない。2000 年時点で日本および米国、ヨーロッパで稼働している NMR 分光器の数は Fig 4.が示す通りおおよそ 9100 台と報告*されており、その中で日本の占める割合は 23%である。この数からすると現在の 7.0%は低い数字であると言える。タンパク 3000 プロジェクトでは約 1 万種と言われるタンパク質の解析のうち日本からの寄与目標を

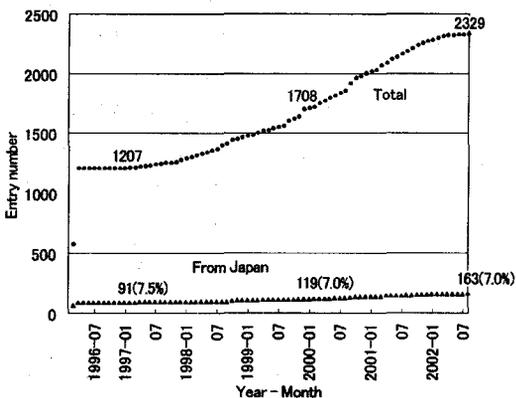


Fig 3. The BMRB entry Growth.

Table 3. The NMR Data contents in a BMRB Entry.

1. Entry information
2. Contact persons
3. Citation for this entry
4. Molecular system description
5. Sample contents and methodology
6. Computer software used
7. Experimental detail
8. Sample conditions
9. NMR parameters
10. Kinetic parameters
11. Thermodynamic parameters
12. Secondary structure features
13. Atomic coordinates
in three dimensional space
14. Cited references within the entry

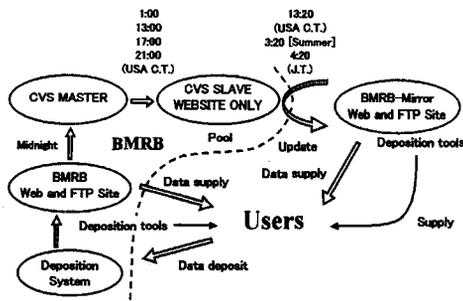


Fig 2. The current updating and deposition system between BMRB and BMRB mirror.

3分の1としており、今後の NMR による生体巨大分子の解析研究の活発化により日本からの登録数の増加が期待される。

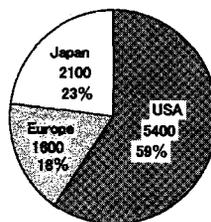


Fig 4. Round numbers of the operating NMR spectrometers in USA, Europe and Japan in 2000.

* 超伝導 Web21 2001 年 7 月号

計測: NMR 物理探査のための基礎実験

(産総研) 中島善人

PGSE NMR study on the water self-diffusivity in clay gels: laboratory experiments for NMR logging.

(AIST) NAKASHIMA, Yoshito

Abstract: Montmorillonite clays expand definitely in volume by incorporating water molecules into the silicate sheets to form porous gels. H₂O self-diffusion in water-rich montmorillonite gels were measured by pulsed-gradient spin-echo nuclear magnetic resonance. The obtained diffusion data were explained by a model that free or unbound H₂O molecules diffuse in the porous gel by avoiding the randomly placed obstacles (clay platelets sandwiched by bound or immobilized H₂O layers).

1. はじめに

NMR 物理探査とは、地下水や石油のプロトンなどをターゲットにして野外で NMR 計測を行う、地球物理学の一分野である¹⁾。例えば NMR 検層(well logging)では、ボーリング坑に永久磁石と rf コイルのセットを降ろし、坑壁から数 cm 奥にある多孔質地層中の間隙水のプロトンから CPMG データを取得して、地層の含水量や透水係数をリアルタイムスキャンしている。著者も、秋田県の澄川地熱発電所で深度 100m までの NMR 検層を実施し¹⁾、溶岩中の地下水の分布を調べた (Fig. 1)。その時、ボーリングの掘削泥として、粘土濃度が数 wt% のモンモリロナイト(粘土鉱物の一種)のゲルを使用した。NMR センサーの感度領域にこの泥が侵入したので、得られた CPMG データを正しく解釈するには粘土ゲルの自己拡散係数や緩和時間などの NMR 物性を知る必要がある。本講演では、粘土ゲル中の水の自己拡散プロセスに的を絞って、自己拡散係数の温度依存性と粘土濃度依存性を発表する。また、ゲルの微細構造モデルを立てて、粘土表面付近の結合水(拡散係数がバルクの水より低下している水)の厚さを推定したので²⁻³⁾それも報告する。



Fig. 1 Photo of NMR well logging in Akita.

キーワード: PGSE NMR, 地層の NMR 計測, 地下水探査, 粘土ゲル, 水の自己拡散係数

なかしまよしと

2. PGSE NMR 実験

粘土試料は、米国粘土学会が頒布している ワイオミング州産のNa型モンモリロナイト(SWy-2)を使用した。粘土粉末に脱イオン水を加えて作成した約1gの粘土のゲルについて、水分子の自己拡散係数(D)をpulsed-gradient spin-echo NMR法で計測した。使用した

proton NMR分光計は、Bruker社製

NMS120である(20 MHz)。典型的なパルス条件は以下のとおり。磁場勾配パルス幅は0.7 ms, エコー時間は28 ms, 磁場勾配パルスの間隔は14 ms, エコーシグナルの積算回数16。パルスシーケンスの繰り返し間隔は、プロトンの縦緩和時間の5倍程度にした。空隙サイズがサブミクロンである多孔質粘土ゲル中の水の拡散は、拡散距離が $(6D\Delta)^{1/2} \approx 10 \mu\text{m}$ もあるので完全に制限拡散状態に入っているはずである。このことをチェックするために、 Δ の値を5-100 ms程度の範囲で変化させても D の値には有意な変化がないことをいくつかの試料で確認した。ゲル中の粘土の重量分率(w)を0-35.4 wt.%, 試料温度を30.1, 39.8, 50.5, 60.8°C と系統的に変えて、自己拡散係数を計測した。

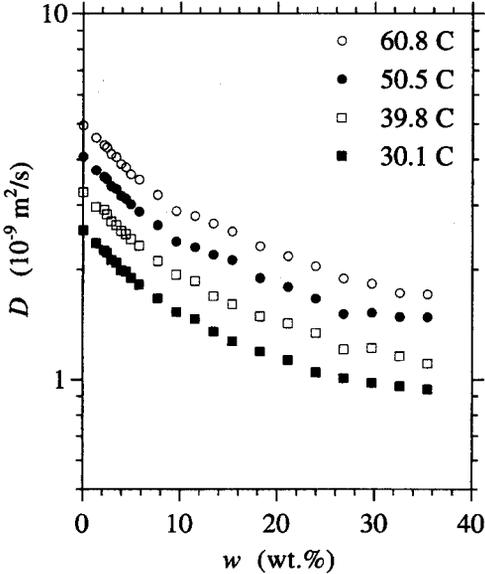


Fig. 2 Water self-diffusivity in clay gels.

3. 結果と考察

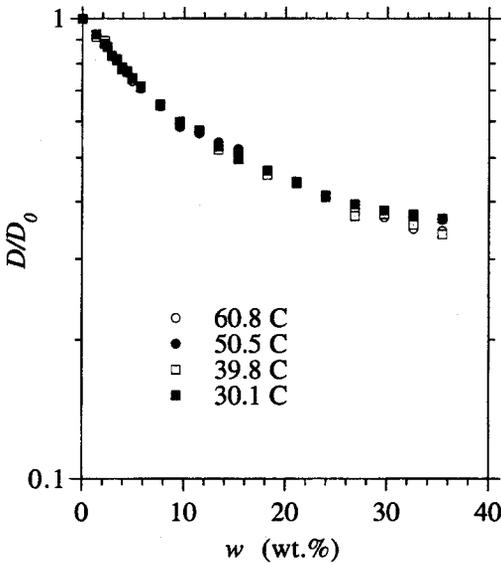


Fig. 3 Normalized water self-diffusivity.

粘土ゲル中の水の自己拡散係数(D)の温度依存性をFig. 2に示す。また、 D をその温度のバルクの水の自己拡散係数(D_0)で規格化したものを、Fig. 3に示す。 D の値は温度に依存するが、Fig. 3のように D/D_0 は温度に依存しないことがわかった。これは、ゲル中の水の拡散に関する活性化エネルギーが粘土濃度に依存せず、バルクの水のそれと同じ値をとることを意味する。モンモリロナイトに限らず、ヘクトライト、スチーブンサイト、膨潤性雲母のwater-richゲルにおいても、 D/D_0 は、温度に依存せず、 w に関する単純な関数(たとえば指数関数)に従うことがわかっている²⁻³⁾。本来、粘土のごく近傍(数nm)の水分子は、負に帯電したシリケート層によって強く拘束されており、その結果、拡散移動プロセスに関する活性化エ

エネルギーはバルクの水より多少大きいと予想される。しかし、今回計測したwater-richゲルについては、拘束された水のモル数に比べて自由水のモル数が桁違いに大きいために、拘束水(結合水)の寄与が実験的に確認できなかったと著者は解釈した。

Figs. 2-3では、粘土濃度(w)の増加とともに、拡散係数が低下している。これは、障害物(粘土粒子)が増えるとランダムウォーカー(水分子)が遠距離に移動しにくくなるからである。この挙動を、ランダム媒体モデルで定量的に解釈してみよう。Fig. 4のように、粘土鉱物(厚さ 1nm、直径約100 nmの円盤)がランダムにばら撒かれているゲル構造を仮定する。

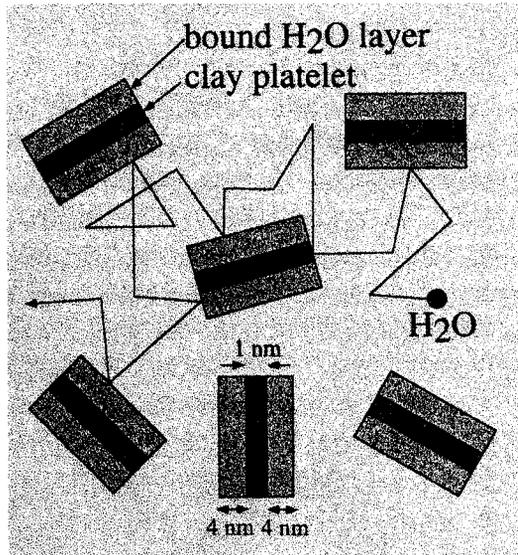


Fig. 4 Microstructure model of clay gels. Unbound water molecules (solid circle) diffuse by avoiding obstacles (hydrated platelets).

スメクタイト系粘土に関するMolecular Dynamicsシミュレーション結果と、ほぼ同じである。このことは、ランダム媒体モデルの正しさを示唆している。ところで、Fig. 5では、 $w \geq 7.66$ wt.%のデータポイントはモデルから乖離している。粘土濃度が上昇すると個々のplatelet粒子は接触による相互作用が大きくなるのでランダムに存在できず、card-house(トランプの家)構造のような規則的なゲル構造をとることが推測できる。ランダム配置なら空隙のパーコレーションクラスター(水分子が長距離拡散できるスペース)は障害物の数密度が上昇するとすぐ消滅するが、card-house構造ならば粘土濃度が上昇してもパーコレーションクラスターは生き残りやすい。このことが、 $w \geq 7.66$ wt.%でのランダム媒体モデルの過小評価の原因であると著者は推定している。

NMR検層では、地層の間隙水のCPMGデータを取得して、空隙サイズを推定している。そこには、 T_2 値の大小が間隙水の岩石固体表面への衝突頻度で決定されるという前提条件がある。これは、空隙サイズが、間隙水が T_2 のタイムスケールで拡散移動できる距離 $(6DT_2)^{1/2}$ より小さい場合のみ成立する。ところがFig. 5のように、数%の粘土ゲルでは、水の自己拡散係数がバルクの水にくらべて数10%低下する(たとえば 2×10^{-9} m²/s)。さらに、今回は発表していないが、粘土ゲルの水の T_2 は、粘土粒子との衝突によってバルクの水にく

簡単のため、clay platelet (1層のAl-O八面体シートと2層のSi-O四面体シートの基本セット)がゲル中で完全に分散していると仮定する。clay plateletは、Al³⁺の一部がMg²⁺で置換されているので負に帯電している。その結果、極性分子である水分子をひきつけ、ある厚さの結合水(拡散係数をゼロと近似する)の層を両側に形成している。その結果、障害物としてのサイズは、(clay platelet + 結合水)に増大する。バルクの水と同じ自己拡散係数をもった水分子が、この増大した障害物を避けながらランダムウォークするというモデルである。ランダム媒体中の3次元拡散シミュレーションを行って、障害物の体積分率と D/D_0 との定量的関係を求めた³⁾。そのランダム媒体モデルをFig. 3のNMRデータ($w \leq 11.0$ wt.%)にフィッティングさせた結果、clay plateletの比重が2.7ならば、結合水の厚さは4 nmという推定値を得た(Fig. 5)。この結合水の層厚の数値は、

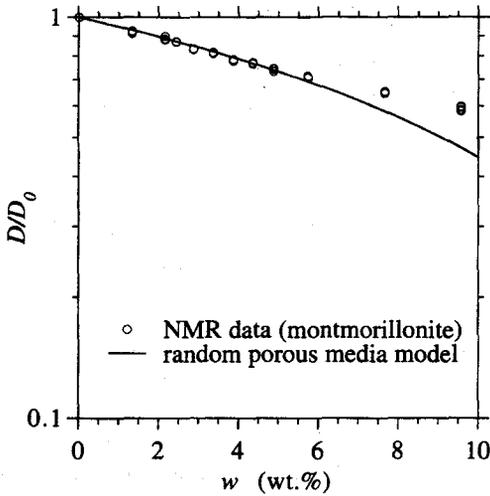


Fig. 5 Normalized diffusivity of dilute gels fitted by a random porous media model.

引用文献

- 1) 中島善人 (2002) NMR物理探査の原理、物理探査, 55, 105-126.
- 2) 中島善人 (2002)パルス磁場勾配NMRを用いた水の自己拡散係数の計測:原理と粘土ゲルへの応用例、粘土科学 42, 37-50.
- 3) Nakashima, Y. (2002) Diffusion of H₂O in smectite gels: Obstruction effects of bound H₂O layers, Clays and Clay Minerals (in press).

らべて約一桁低下することがわかっている (たとえば100 ms)。したがって、多孔質岩石の空隙を粘土ゲルが充填している場合、CPMGデータから空隙サイズを推定する場合は、清水の場合にくらべて計測可能範囲がせまくなると言える。たとえば上記の数値例を代入すれば、 $(6DT_2)^{1/2} \approx 30 \mu\text{m}$ 以下の空隙サイズのみ正しく推定できる。粘土をふくむ掘削泥は、掘削坑の崩落防止・岩片の地上への運搬・ダイヤモンドビットの冷却という重要な役割を持っているが、NMR検層の立場からはその使用は望ましくないといえる。

SDBS-NMR-NP システムの作成 天然物の NMR スペクトルデータベース

(NMRDBTech) ○早水紀久子、(東大農) 降旗 一夫、(理研) 鶴沢 洵、
(日本電子データム) 有福 和紀

Building an NMR database for natural products and related compounds,"SDBS-NMR-NP", K. Hayamizu (NMRDBTech), K. Furihata (Tokyo Univ.), J. Uzawa (Riken), and K. Arifuku (JEOL Datum)

An NMR spectral database for natural products, SDBS-NMR-NP, has been built as the development of the SDBS-NMR for general organic compounds. The NMR data and the spectral assignments have been compiled from the literatures (*Tetrahedron*, *Tetrahedron Letts.*, *Magn. Reson. Chem.*, *J. Antibiotics*, *J. Org. Chem.*, *Eur. J. Org. Chem.* and others). The input of chemical information is made by a ISIS/Base and the spectral information such as the shifts and J are compiled by an Excel. The data are displayed on the web system where ^{13}C NMR spectral patterns were shown by a Java applet. The intensities are expressed by the number of the carbons for each line. The system to accept original FID patterns has been prepared for JEOL, Varian and Bruker spectral patterns.

1. 緒言 現在インターネットで公開サービスを行なっている SDBS-NMR は大型汎用計算機で作成された。大型計算機終了時にテキストファイルで保管したマスターファイルの PC 化が進行中であり、その方式についてはすでに発表した[1]。その経験とノウハウを活かして天然物並びに関連化合物の NMR データベースの作成を開始した。天然物は結晶化すれば X 線回折が可能だが、結晶化しないものも多く二次元 NMR 法を駆使して立体構造を含めた化学構造が決定されている。天然物の化学構造決定までに多大な労力が投入されており、既知化合物の場合直ちに解析をやめている。天然物は構造的に多様性を持っており、データベース (DB) 化の価値は高い。文献発表されている NMR スペクトルは完全解析され信頼性の高い。天然物の NMR は成熟した研究分野に到達しているので、データベース (DB) を作成すれば完成度の高いデータ収録ができる。

2. データベース項目 PC で稼動する化学系データベース管理システム (DBMS) は各種市販されているが、NMR の帰属を化学構造式に論理的に書きこむ機能がある ISIS/Base を化学用 DBMS として SDBS-NMR から継続して用いた。化合物名、化学構造式、分子式 (化学構造式から自動発生)、分子量 (自動発生)、NP 番号、溶媒、シフト基準、NMR 装置あるいは ^1H NMR 測定周波数、文献、正式な化学名 (IUPAC 名)、コメント等を ISIS/Base で入力することにした。文献から引用するので、化学構造式は必須データであるが、他のデータ項目の欠落は許容することにした。 ^1H と ^{13}C NMR のシフト値並びに ^1H NMR の分裂パターンや結合定数を数値データは Microsoft Excel で入力する。

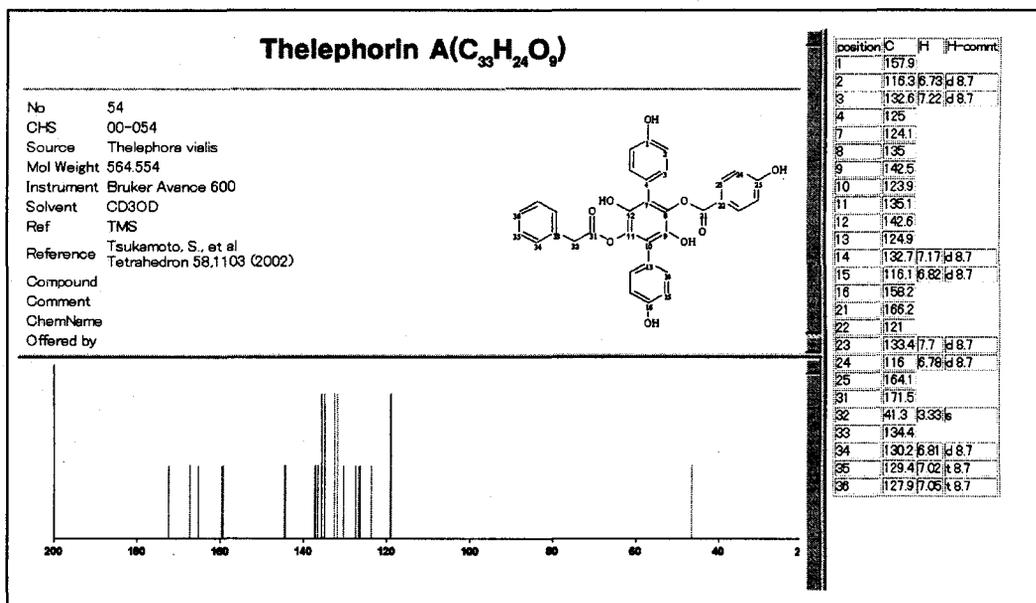
NMR, database, natural products, web system, Java applet

はやみず きくこ、ふりはた かずお、うざわ じゅん、ありふく かずのり

3. 文献からのデータ入力 文献としては、*Tetrahedron*, *Tetrahedron Letts.*, *Magn. Reson. Chem.*, *J. Antibiotics*, *J. Org. Chem.*, *Eur. J. Org. Chem.* および *J. Natural Products* を対象にしている。DB 化対象にする化合物は天然物あるいは関連する化合物で ^1H と ^{13}C のシフト値が帰属を含めて表形式で発表されているものに限定した。2002 年 1 号から文献収集を行ない、現在データ数約 230 件、分子量は 206 から 1728 の範囲である。最新号からのデータ採取とともに、2001 年、2000 年と過去へさかのぼってデータ入力を行ない、実用的に有効なデータベースに発展させる予定である。

4. 検索と表示 Web システムでの表示方式を採用し、ISIS/Base で入力した帰属付き化学構造式はイメージデータ、化学情報はテキストデータで表示する。Excel で入力したスペクトル情報から ^{13}C NMR を棒グラフで Java 表示 (拡大可能) し、同時に表形式で表示することにした。(例図 1) 生スペクトルの提供があれば、機能追加した Alice2 (日本電子データム製) でスペクトルパターンのフォーマット変換した後に Java 表示する。インターネットのホームページでの公開では、検索はテキストデータ (化合物名、分子式、分子量等) とする。部分化学構造検索は CD-ROM ベースのシステムで可能にしたいと考えている。

SDBS-NMR-NP は低分子量の有機化合物を対象にした SDBS-NMR の延長上に位置する。SDBS-NMR は市販薬品を中心にありふれた有機化合物の精度高い NMR スペクトルの集積であるが、SDBS-NMR-NP は微量かつ稀有な天然物の NMRDB であり、文献から収録するのが最も相応しい。また貴重なスペクトルは論文の著者が大切に保管している場合が多いものの、記憶媒体等の更新で、貴重なデータが破棄されてしまう場合も多いので、それらを収録、DB 化して長期保存、公開することに意義がある。例を示す。



(文献) 早水 *Journal of Computer Aided Chemistry*, 2, 1-10 (2001)

物質・材料研究機構 ナノマテリアル研究所
○後藤 敦、清水 禎、端健二郎、北澤英明

Technical developments for the realizations of multiqubit and initialization
in solid-state NMR quantum computers
Nanomaterials Laboratory, National Institute for Materials Science
Atsushi Goto, Tadashi Shimizu, Kenjiro Hashi, Hideaki Kitazawa

We discuss technical requirements and practical methods to implement an NMR quantum computer in solids. There are two main issues known for the implementation. One is how to initialize qubits effectively. We show that an optical pumping qubit initializer (OPQI) is promising for this purpose, where an optical pumping and a polarization transfer methods are combined. The scheme is effective to separate the initialization scheme from the computation scheme. The other issue is how to provide a practical interqubit coupling for a controlled-NOT (c-NOT) gate. We propose a switchable c-NOT gate realized by magnon-mediated internuclear couplings (SN-gate) in a quantum electron spin chain placed in a magnetic field gradient and a low temperature. This scheme provides us with a decoupling-free quantum computer.

近年、量子計算機の実現を目指し、様々な物理系での量子計算機の提案、実験が活発化してきている。中でもキュビットとして核スピン系を用いるNMR量子計算機は、「制御性」と外界との「隔離性」において特に優れた特徴を有し、最も実現性が高い物理系であるとされており、実際、溶液NMRで7ビットまでの量子計算機がすでに実現されている。しかし、残念ながら溶液を用いた方法ではこれ以上の多ビット化は困難であり、多ビット化に向けた大きなブレークスルーが期待される。これを克服する一つの方法として、スタンフォード大の山口らは磁場勾配を用いた「固体」NMR量子計算機を提案した。この方法は原理的にキュビット数に制限がなく、多ビット化には大変有望であるが、核磁気双極子によるキュビット間結合を用いているため、巨大な磁場勾配を必要とする、莫大な数の核スピン間結合のデカップリングを必要とするなどの実際的な困難が存在すると想像される。

我々は、「固体」のメリットを最大限に生かしつつ、これら問題点を克服するため、1次元反強磁性体上のマグノンによる「スール・中村相互作用」をキュビット間相互作用として用いる方法(SN-gate)を提案する。この相互作用は核双極子相互作用に比べ相互作用が長距離に及ぶため、キュビット間の間隔を広く取ることが可能であり、磁場勾配に対する制限を大幅に緩和できる。また、量子多体現象である「スピンギャップ」を用いることにより、相互作用のスイッチング、即ち、必要などころに必要な大きさのキュビット間相互作用を作り出すことが可能であり、これにより複雑で厄介なデカップリング操作が不要となる。これらの特徴を利用すれば、より現実的な固体NMR量子計算 CPU が実現可能である[参考文献: A.Goto et al. J. Phys. Soc. Jpn 71 (2002) No. 9, A. Goto et al. quant-ph:0205135]。

キーワード: NMR 量子計算機、一次元磁性体、SN ゲート法、光ポンピング法、量子スピン初期化器

ごとうあつし、しみずただし、はしけんじろう、きたざわひであき

NMR量子計算機のもう一つの重要課題は量子ビットの「初期化」の実現である。「初期化」に利用可能な技術としては光ポンピング法が知られているが、残念ながら、この技術は利用できる物質群が限られている。このため、「初期化」と「量子計算」の同時最適化を同一物質で行うという制限が量子計算機の物質探索において大きなネックとなっている。そこで、より現実的な方法として、我々は「光ポンピングによる量子ビット初期化器 (Optical pumping nuclear polarizer: OPQI)」による初期化法を提案する。これは、光ポンピングによってスピン偏極器 (Nuclear polarizer: SP) 内にスピン偏極を発生させ、このスピン偏極を CPU である外部物質に転写することにより CPU の初期化を実現するという方法で、これにより、初期化部分と量子計算部分を独立に最適化でき、量子計算機の CPU 部分の選択支を格段に広げることが可能になる[参考文献:A. Goto et al. quant-ph:0205135]。OPQI の概念図を図1に、また、この目的のために設計した半導体用光ポンピングシステム の概念図を図2に示す。この装置による予備的な実験の結果は、本討論会の P141「InP の光ポンピング NMR」(端健二郎他)を参照。

なお、本研究は、科学技術振興事業団戦略的創造研究推進事業(JST-CREST)「電子・光子等の機能制御」、および、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)「平成14年度産業技術研究助成事業」の一部として行った。

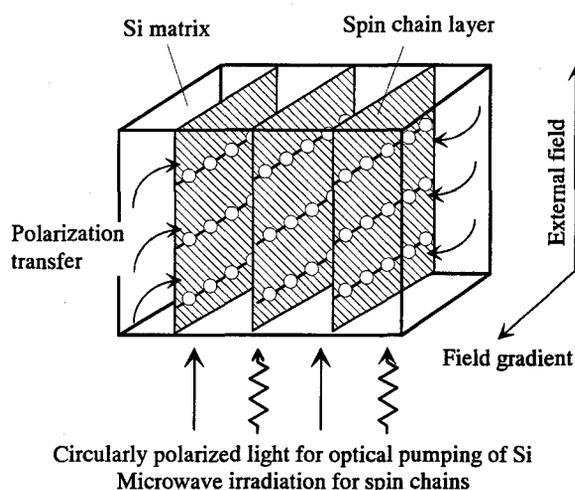


Fig. 1. A possible configuration of the OPQI for an integrated NMR-QC. Small balls represent qubit nuclei in the spin chains. Laser lights for the optical pumping of electrons in Si are delivered from both the top and the bottom (Faraday configuration).

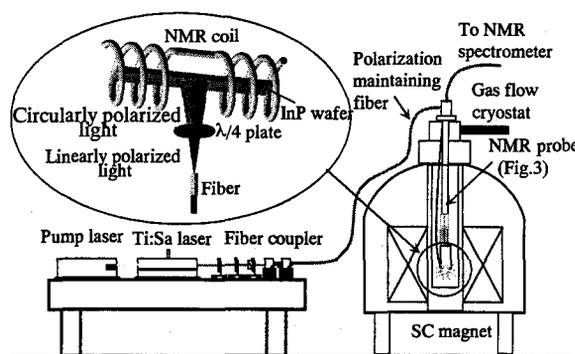


Fig. 2. Overview of the experimental setup for optical pumping experiments.

固体 NMR 量子コンピュータの開発：化合物半導体の同位体超格子

物質・材料研究機構、ナノマテリアル研究所、○清水禎、後藤敦、端健二郎、北沢英明

Toward a Solid-state NMR Quantum Computer: Isotope Superlattice of Compound Semiconductors

National Institute for Materials Science, T. Shimizu, K. Hashi, A. Goto, H. Kitazawa

Solution NMR studies have been making significant achievements including a factoring demonstration by a 7-qubits computer (Nature 404 (2002) 368). Many researchers, however, suspect performance limitation of solution NMR quantum computer to be about 10 qubits. We expect a solid-state NMR quantum computer to be a possible candidate for a more practical quantum computer more than 10 qubits. In this study we present a proposal of solid-state quantum computer by a isotope superlattice of CdTe.

1. 序論

現在までのところ、溶液 NMR で7量子ビットの量子計算機が実現されているが (Phys.Rev.Lett.85(2000)5452, Nature 404(2000)368)、専門家の間では溶液 NMR では10量子ビット程度が限界であろうと推測されている(例えば、数理科学 424(1998)43、数理科学 195(2001)56)。量子計算機の当面の目標値は量子現象のシミュレーションに役立つ数十量子ビットにあるので、いずれ固体の開発が必ず中心的課題になると予想される。現在のところ、固体ではまだ2量子ビットすら実現されていないが、課題抽出は既に始まっており各開発要素で必要とされる技術革新のための方法論の検討作業と基礎実験が進められている。

量子計算機を実現するために原理的に最も重要な課題は、第一に量子ビット間の良好な「量子もつれ状態」を形成する方法の開発、第二に各量子ビットを「初期化」する方法の開発、第三に量子ビット数を増大させる方法である。これらの技術的課題を克服するには既存の NMR 技術だけでは原理的に不十分であることが自明で、新規技術開発が不可欠である。

2. 第一の課題:「量子もつれ」

NMR 量子計算機では「量子もつれ状態」を形成させるために核スピン間相互作用を使う。固体 NMR における第一の課題は、コヒーレントな量子状態の寿命が短すぎて計算時間の余裕がないことである。寿命が短くなる原因は核双極子相互作用、金属におけるルーダーマン-キッテル相互作用、磁性不純物等の磁氣的欠陥に起因する長距離で量子効果の強い相互作用などにある。これらを「量子もつれ」に積極的に利用する案もあり、詳しく研究もされているが、不特定多数の粒子による量子効果であるためにゼーマン・ハミルトニアンと交換しないなど本質的に制御性が悪く、何か特殊な工夫を開発する必要があり、ここに大きな開発課題を抱えている。

別の手法として、これらの好ましくない相互作用よりも大きさが強くしかも制御性も良好な核ス

ピン間相互作用を探索する研究も行われている。例えば、本提案のように J 結合は共有結合した原子間でのみ有効な核スピン間相互作用であるため遠距離まで届かないことと、ゼーマン・ハミルトニアンと交換するので固有状態を壊さないなどの理由から好ましい候補である。J結合は共有結合電子が媒介するので、材料探索としては共有結合性の強い物質が有力な候補対象となる。実際、溶液で成功した NMR 量子計算機は全て、分子内の J結合を利用して「量子もつれ」状態を実現し、量子計算に利用している。

本提案の化合物半導体 CdTe では、核双極子相互作用と J結合の二種類の相互作用が働いている。後述するように同位体超格子の構築などによる結晶格子の3次元的配列に対して最適化を行う結果、J結合の方が核双極子相互作用よりも4倍以上大きくできるので J結合による「量子もつれ」を固体において実現可能となる。

3. 第二の課題:「初期化」

初期化技術は計算機のレジスターを初期状態にリセットするために必要なだけでなく、良好な「量子もつれ」状態すなわち量子純粋状態を形成するためにも必要である。この課題を克服することは NMR にとって大きな夢と冒険である。核スピンは偏極率が極めて低く、通常の実験条件では 1ppm 規模の微弱な核スピン偏極しか与えないので、量子純粋状態からは天文学的に遠い。

これを解決する有力な方法が、本提案の光ポンピング技術による核スピンの超偏極法を応用した OPNMR (Optical Pumping NMR) である。これによって 50%規模もの巨大な核スピン偏極を得ることができる(久保・鹿取著「スピンと偏極」倍風館 1994 年、補編3)ので、良い近似で量子純粋状態となる。円偏光によって励起された半導体中の電子(荷電子帯から伝導帯に励起された電子)は選択則によりスピンの向きが一方向に揃うので、超微細相互作用(一般に電子と原子核との磁氣的・電氣的相互作用を超微細相互作用 Hyperfine Interaction と呼ぶ。総合解説として例えば、C. P. スリクター著、益田義賀訳「磁気共鳴の原理」シュプリンガー・フェアラーク東京、1997 年)を介して、結果的に核スピンの超偏極を引き起こす(半導体での OPNMR の原理と応用については総評として、R. Tycko and J. A. Reimer, J. Phys. Chem. **100**(1996)13240)。

核スピンを観測したり向きを制御したりするのは通常の NMR 装置の RF パルスによって可能なので、量子計算機の OS やプログラムは RF パルス系列で構成されることになる。

4. 第三の課題:多量子ビット化

量子ビットを増やすということは、即ち、異なる NMR サイトを増やすことである。そのために様々な手法が提案されている。例えば、(1)高分子中の異なるサイトを用いる。(2)特殊な極微小磁石を作り込んで素子中に原子サイズの磁場勾配を発生させ、サイト毎に共鳴磁場をずらす。(3)量子ドットや分子設計などナノテクノロジーの新技术を駆使してサイトを増やす。(4)パケツリレー法(解説として、北川勝浩「数理科学」2001 年6月号サイエンス社)などソフトの開発要素などが並行して研究されている。これらはいずれも、基礎研究の段階であり、まだ実現はしていない。

5. 課題の克服:化合物半導体 CdTe

本提案で CdTe を選んだ理由は、(1)結晶格子の3次元配列を最適化することによって、J結合を支配的相互作用とすることができるので、それを「量子もつれ」状態を形成する相互作用として利用できる。(2)1.6eV という可視光域のバンドギャップを持つのでレーザー光による初期化(CdとTeの核スピンを同時に超偏極)が実現できる。CdとTeのOPNMRも可能である。(3)CdとTeはともに核スピンの同位体を2核種ずつ持ち、磁気回転比の違いからこれら4核種は十分に離れた共鳴周波数を持つので、磁場勾配の作り込みなど特殊技術の開発を待たなくても4量子ビットを構築できる。(4)CdとTeはともにスピン1/2の同位体を2核種ずつ持つ。スピンの1よりも大きい核種が含まれると今日の量子計算機理論では取り扱い困難なので、スピン1/2の核種だけで構築できる材料が好ましい。

技術的な理由から実現困難と予想されている「磁場勾配」を導入する必要がない点と、双極子相互作用よりも操作性の良いJ結合を量子ゲートに利用している点、および、光ポンピングにより初期化問題を解決できる等の点が、他の固体 NMR 量子計算機の提案と比べたときの利点である。

6. 同位体超格子による最適化

[111]方向に特殊な順番で積層させた同位体超格子、例えば $^{111}\text{Cd} - ^{123}\text{Te} - ^{113}\text{Cd} - ^{125}\text{Te}$ 、を作ると(図1参照)、各[111]面は単一の同位体だけで構成されている。4種の同位体なので、この系は4量子ビットとなる。等価層内の核スピンは、光ポンピングおよび rf パルスを用いて同時に制御することができる。

例えば $^{111}\text{Cd} - ^{123}\text{Te} - ^{113}\text{Cd} - ^{125}\text{Te}$ のような同位体超格子を作るメリットは、核双極子相互作用のうちフリップ・フロップ成分(量子コヒーレンスを壊す原因)の占める割合を劇的に小さくできることにある。一般に(参考文献として例えば、A. Abragam, "Principles of Nuclear Magnetism" Oxford University Press, 1961, 第4章)双極子相互作用は静的成分($I_z I_z$ を含む項、共鳴磁場の大きさを一定の値だけずらす効果)とフリップ・フロップ成分($I_+ I_+$ を含む項、2スピン間の向きを交換する効果)の和であるが、このうち量子状態のコヒーレンスをこわす(量子純粋状態をこわす)原因はフリップ・フロップ成分である。フリップ・フロップ成分は同種核間でのみ作用するため、量子コヒーレンスを長く保つためには、同種核をできるだけ遠ざけると効果的である。そこで、同位体超格子を、例えば、 $^{111}\text{Cd} - ^{123}\text{Te} - ^{113}\text{Cd} - ^{125}\text{Te}$ という特殊な順番で積層させると Cd 同種核間のフリップ・フロップ成分と Te 同種核間のフリップ・フロップ成分は通常よりも著しく軽減できる。

軽減の割合は以下のように見積もることができる。最も近い同種核までの距離は2倍になるので、双極子相互作用が距離の3乗に反比例することから、線幅(および緩和時間)への寄与は1/8になる。結局、双極子相互作用は静的成分が主になるので共鳴磁場をシフトさせる効果の主になり、量子コヒーレンスへの影響は最小限に抑えることができる。

核双極子相互作用には角度(磁場と結晶軸との角度)依存性があり、CdTe の場合には[100]方向の磁場で核双極子相互作用が最小になる。核双極子相互作用は理論と実験の一致が確立さ

れており(参考文献として例えば、A. Abragam, “Principles of Nuclear Magnetism” Oxford University Press, 1961、第4章)、角度依存性や絶対値を算出できる。実際に計算を行った結果、ともに[100]方向で、Cd サイトに約 80 Hz、Te サイトに約 120 Hz の核双極子相互作用が発生する(しかもその大部分が静的成分)ことが分かった。ちなみに[111]方向ではこの約2倍に達する。J結合は実験から 500 Hz と報告されており(Phys.Rev.B44(1991)5343)、[100]方向の核双極子相互作用よりもJ結合は4倍以上大きいので、「量子もつれ」状態を作るために十分である。

なお、同位体超格子を作らずに通常の結晶格子を作った場合の核双極子相互作用は約2倍大きくなる上に、フリップ・フロップ成分の占める割合も大きくなるので不利である。

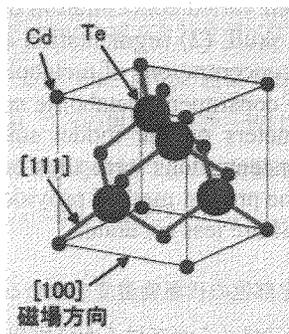


図1. CdTe のユニットセル。小さい球は Cd、大きい球は Te。

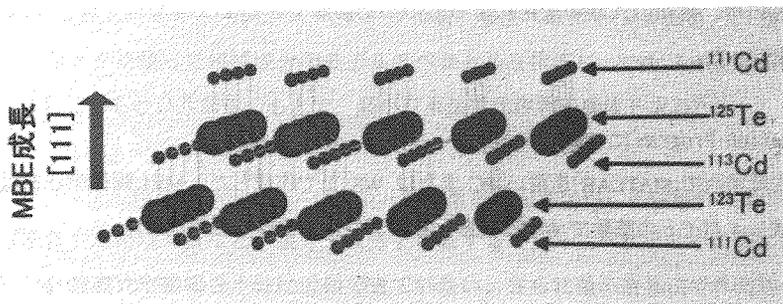


図2. 小さい球は Cd、大きい球は Te。上方が[111]方向。[111]方向に垂直な面が[111]面。[111]面は単一の同位体で構成されている。下から順に $^{111}\text{Cd} - ^{123}\text{Te} - ^{113}\text{Cd} - ^{125}\text{Te}$ と積層した同位体超格子を構築している。

キーワード: 固体 NMR、量子計算機

著者ふりがな: 清水禎(しみずただし)、後藤敦(ごとうあつし)、端健二郎(はしけんじろう)、北沢英明(きたざわひであき)

ヒト脳内組織の分画と代謝物の定量

(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、
東京大学医科学研究所³)

○高橋 征三¹、荻野 孝史²、吉川 宏起³、川上 綾¹

Tissue Segmentation and Quantitative Analysis of Metabolites in Human Brain
Seizo Takahashi¹, Takashi Ogino², Hiroki Yoshikawa³, Aya Kawakami¹
(Fac. Sci., Japan Women's Univ.¹, Inst. Neurosciences, NCNP²,
Inst. Med. Sci., Tokyo Univ.³.)

Tissue segmentation program was written aimed at a clinical application of MRI and CSI. The program was written by MATLAB to disclose whether the change of tissue metabolism or of tissue contents for the observed varied concentration of metabolites. It was constituted of 3 steps; namely (1) removal of skull, (2) segmentation of tissues, (3) output the segment ratio for each voxel of CSI. The concentrations of metabolites were analyzed by SAGE/IDL based on the linear combination of constituent metabolite spectrum. The basis spectra were constructed from the fitted parameters on the model solutions of metabolites of known concentration. The calculated concentrations were then correlated to the ratio of segments and distributed to each segment. The present method provided reasonably reproducible results although the peripheral fields of CSI are less accurate.

CSI(Cheical Shift Imaging)は、測定部位の代謝物濃度を求めることができるので豊富な情報を与えるが、MRI(Magnetic Resonance Imaging)にくらべてはるかに画像解像度が低いという欠点を免れることができない。そこで本研究では両者の特徴を生かし、観測される代謝物濃度の変動が、組織組成の変化によるものか、組織の代謝の変化によるものかを診断できるような解析プログラムを作成して基礎的な検討を行った。

(1) Segmentation Program について

プログラムはすべて MATLAB を使い PC または WS 上で作成した。MRI 画像データは、GE の臨床用装置で作成し 4 バイトの整数で WS に転送して以下の 3 ステップで処理した。

ステップ 1

スライスごとに信号強度が一定範囲の画素を選択し、強度 1 または 0 の画像(マスクイメージ)を作成した。つぎにそのマスクイメージについて 2 次元の極座標展開画像を作成した。そして動径方向の信号の最大値つまり頭皮から一定の厚みを不要部分として除き、残りの部分について脳と頭蓋の境界の探索範囲を設定し、境界を滑らかな曲線でつないだ。そしてその境界の内側すべてを脳実質とするマスクイメージを作成し、もとのデカルト座標系に戻した。

脳 組織 分画 代謝物 NMR

たかはしせいぞう、おぎのたかし、よしかわひろき、かわかみあや

ステップ2

マスクイメージをもとの画像データと画素ごとの積をとり脳実質の画像が得る、つぎに T2W 画像で強度が一定値以上の画素を脳脊髄液(CFS)に対応するとしてマスクイメージを作成する。その成分をのぞいた T1W 画像から CFS を取り除いた画像を作成し、灰白質、白質、CFS に分ける。ここで強度の分配はヒストグラムを作成しマニュアルで行った。

ステップ3

MRI 画像の各画素は灰白質、白質、CFS、その他のいずれかに割り当てられたので、つぎに CSI の情報と対応させるために、CSI の各画素における灰白質、白質、CFS の存在比率を計算する。このとき隣接画素からの信号の滲み出しについて考慮した。

結果

Segmentation に用いる画像は T1W と T2W の組み合わせがベストであった。臨床的には CSI と MRI の測定方向が必ずしも同一でない。そこで MRI 画像の回転プログラムを作成して、同一方向で測定した場合と比較した。その結果、voxel ごとの組織分布の一致は中心部分にくらべて周辺部分が低下していた。臨床的には患者によって信号強度を単純に3つに分画するだけでは不十分な場合があった。そういう意味で完全な自動化プログラムは難しいと思われる。

(2) CSI の解析

CSI スペクトル情報の解析は GE から提供されている MRI/MRS 測定・解析用のソフト SAGE/IDL を用いた。まず脳内で観測される主要成分のファントムデータを CSI 測定と同一条件で測定して得た。これらの frequency domain スペクトルについてピーク位置、強度、線幅を Marquardt 法で解析した。そして得られたパラメータを使って組成成分のモデルスペクトルを作成し、CSI スペクトルは代謝物モデルスペクトルの和であるという前提のもとで、最小自乗法で代謝物の濃度を求めた。

結果

ファントムサンプルで正確に in vivo のスペクトル状態を再現できないことは解析精度の制約要因となる。たとえば脂質やたんぱく質などの高分子成分を代表するモデルスペクトルを作成したが、脳内で観測されるピーク強度比や線幅を十分に近似できていない。さらに最小自乗法で代謝物の濃度を求めるときに、一成分内のピークの強度比は固定して fitting できたが、ピーク位置や線幅の相対的大きさを固定したときはうまく fitting できなかった。組織によって細胞内 pH や緩和速度が違ったりするので、一成分内のピークごとにパラメータを最適化する必要があるようである。

(3) 代謝物濃度の灰白質や白質への割り当て

CSI 画素ごとに代謝物濃度は変動するが、同時に画素ごとに組織の組成も変動する。したがって2つの数値の間の相関をとれば、組成ごとの平均の代謝物濃度が推定できる。この計算は PC の表計算ソフトで行った。

Use of residual dipolar couplings without explicit specification of the alignment tensor in NMR structure calculations in torsion angle space with the program CYANA

○ Yuichi Hirata and Peter Güntert
RIKEN Genomic Sciences Center,
W505, 1-7-22 Suehiro, Tsurumi, Yokohama, 230-0045, Japan

Abstract

The program CYANA for the automated calculation of the three-dimensional protein structures has been extended for the use of residual dipolar couplings. A novel implementation of a hybrid linear/non-linear least squares minimization technique enables protein structure calculation by the fast DYANA torsion angle dynamics algorithm using residual dipolar couplings without need to explicitly specify the alignment tensor.

A new version of the software package CYANA (“Combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications”) for the automated calculation of the three-dimensional structures of biological macromolecules will be presented that has been extended for the use of residual dipolar couplings. The new version of CYANA is able to calculate or optimize protein structures by the fast DYANA torsion angle dynamics algorithm [1] using conformational constraints derived from residual dipolar couplings without need to explicitly specify the alignment tensor. The traditional way of incorporating residual dipolar coupling data into an NMR structure calculation requires some knowledge of the alignment tensor as a prerequisite. In contrast, with the algorithm in CYANA residual dipolar coupling data can be incorporated into the structure calculation by providing only the residual dipolar coupling values, in a manner that is completely analogous to the input of other types of structural constraints, e.g. NOEs. The implementation of the treatment of residual dipolar couplings in CYANA is based on the fact that the alignment tensor, when expressed by the five parameters corresponding to the irreducible representation of a second rank tensor, enters the target function in a linear form. Using an algorithm of Golub and Pereyra [2] that has been adapted by Moltke and Grzesiek [3] for use with residual dipolar couplings, it is possible to simultaneously optimize the alignment tensor \vec{S} and the other, non-linear parameters $\vec{\alpha}$ that describe the three-dimensional structure of the protein, i.e. the torsion angles.

Key Words: CYANA, structure calculation, residual dipolar couplings, alignment tensor

In this method, we assume that the n internal degrees of freedom of a protein are represented by the vector $\vec{\alpha} = (\alpha_1, \dots, \alpha_n)$. The problem of finding a best structure of the protein compatible with a set of N measured residual dipolar couplings D_λ corresponds to finding a set of parameters $\vec{\alpha}$ and \vec{S} that minimizes the function

$$r(\vec{\alpha}, \vec{S}) = \sum_{\lambda=1}^N \left[D_\lambda - \sum_{m=-2}^2 S_m^* \Phi(\vec{\alpha})_{\lambda,m} \right]^2 \quad (1)$$

where $\vec{S} = (S_{-2}, S_{-1}, S_0, S_1, S_2)$ describes the alignment tensor and $\Phi(\vec{\alpha})_{\lambda,m}$ includes a second rank, irreducible tensor representing the spatial degrees of freedom of the λ -th interaction. According to the theory of non-linear least-squares minimization, the optimal set of parameters $\vec{S}(\vec{\alpha}) = \Phi^+(\vec{\alpha})\vec{D}$ minimizes $r(\vec{\alpha}, \vec{S})$ at the point $\vec{\alpha}$, where $\Phi^+(\vec{\alpha})$ is the Moore-Penrose generalized inverse of $\Phi(\vec{\alpha})$. Therefore, the problem of minimizing Eq. 1 is reduced to minimizing $r_2(\vec{\alpha}) = \|\vec{D} - \Phi(\vec{\alpha})\Phi^+(\vec{\alpha})\vec{D}\|^2$ with respect to the non-linear parameters $\vec{\alpha}$ alone. The optimal set of order parameters \hat{S}_m for a given choice of $\vec{\alpha}$ can be automatically derived from the relation $\vec{S}(\vec{\alpha}) = \Phi^+(\vec{\alpha})\vec{D}$.

In order to calculate the gradient of the penalty function $r_2(\vec{\alpha})$ with respect to the torsion angles, we derived a factorization of the partial derivative of the function $\Phi_{\lambda,m}$ with respect to a dihedral angle that allows for a rapid calculation of the derivative analogous to the fast recursive algorithm of Abe *et al.* [4].

References

- [1] Güntert, P., Mumenthaler, C., Wüthrich, K. (1997). Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* **273**, 283-298.
- [2] Goulub, G. H., Pereyra, P. P. (1973). The differentiation of pseudo-inverses and nonlinear least squares problems whose variables separate. *SIAM J. Numer. Anal.* **10**, 413-432.
- [3] Moltke, S., Grzesiek, S. (1999). Structural constraints from residual dipolar couplings in high resolution NMR without explicit term for the alignment tensor. *J. Biomol. NMR* **15**, 77-82.
- [4] Abe, H., Braun, W., Nouguti, T., Go, N. (1983). Rapid calculation of first and second derivatives of conformational energy with respect to dihedral angles for proteins. general recurrent equations. *Comput. Chem.* **8**, 239-247.

キーワード索引

(数字・アルファベット)

¹¹ B	P74	4次構造変化	1L11	DECONVOLUTION	P16
¹²⁹ Xe	P139	⁶⁷ Zn	P81	depolarization	P109
¹²⁹ Xe	P131	8チャンネル	P135	Determination of distance	P94
¹²⁹ Xe NMR	3L6	α-シクロデキストリン	P18	deuteration	P43
¹²⁹ Xe NMR	P84	A : A ミスマッチ	P26	diffusion	3L7
¹²⁹ Xe NMR 化学シフト値	P82	<i>ab initio</i> calculation	P93	dihedral angle	P93
¹²⁹ Xe NMR 化学シフト値	P105	AB INITIO 分子軌道法	P143	DinI	P32
¹³ C-CP/MAS	P89	α-helix	P79	DNA repair	P28
¹³ C-NMR	P24	alignment tensor	P153	DnaJ	P56
¹³ C 核磁気共鳴	P110	ALUMINIUM	P13	DNA 結合ドメイン	P31
¹³ C 二次元スピン拡散 NMR	P79	anitmony	P104	DNA 結合ドメイン	P33
¹³ C 標識アミノ酸	P121	aromatic amino acids	P43	DNA 結合ドメイン	P50
¹⁵ N NMR	P93	Ascidia cyclamide 誘導体	P25	DNA 修復蛋白質 Ada	P60
¹⁵ N- CP/MAS	P89	at-PMMA	P96	DNMR	P25
¹⁹ F CP/MAS	P91	bicelle	1L9	DOSY	P15
¹⁹ F NMR	P34	BIRD-J-resolved HMBC	P6	ENTROPY	P16
¹ H MAS NMR	P83	BMRB	P147	ε-ポリリジン	P109
¹ H NMR	P18	βシクロデキストリン	P80	fibronectin type III domain	P48
¹ H-NMR	P11	βバレル構造	P62	FixJ の C 末端ドメイン	P1
¹ H スピン拡散	P121	β-分散	P96	Flavoproteins	P28
¹ H スペクトル	3L11	CAST/CNMR	P24	FSLG-HETCOR	P75
¹ H 間距離測定	P121	CCQM	P20	Gel-phase NMR	1L8
¹ H 選択 HMBC	P14	Cellulose	P75	Gel-phase NMR	P4
1 次元磁性体	P150	chemical shift anisotropy	1L9	Gel 担体への固定化	1L8
²³ Na	P77	chemical shift tensor	P93	gradient echo	P132
²⁷ Al	P81	chitinase	P48	GST-fusion protein	P4
²⁷ Al	P74	CODEX	3L4	H ⁺ -ATP 合成酵素βサブユニット	
²⁹ Si	P74	COMPLEX	P13		1L12
²⁹ Si-NMR	P69	complex	P102	HETCOR	P111
²⁹ Si-固体高分解能 NMR 法		COMPLEX	P16	Homonuclear dipolar decoupling	
	P86	complex systems	3L7		P97
2D NMR in solids	P94	conformation	P93	horizontal gene transfer	P48
2D selective-TOCSY-HSQC	P9	Conformation	P75	HPLC 用逆相系充填剤	P86
2D 相関 NMR	P123	CP/MAS NMR	P104	HR-MAS	P3
2D 相関 NMR	1L13	CPI-17	P41	HSQC	P4
² H NMR	P103	CPI-17	P42	HSQC	1L8
2 次モーメントイメージング		CP-INADEQUATE	P75	HSQC-TOCSY	P19
	P117	CRAMPS	P67	hydrogen bond	P111
³¹ P スペクトル	3L11	Cross polarization	P97	inorganic-organic composites	
³³ S	P81	Cross porlarization	P124		P104
3 重共鳴 NMR	1L10	CSA	1L9	Isotctic-	
4 重鎖	1L7	CYANA	P153	Poly(4-Methyl-1-Pentene)	3L4
		Cymarose	P14	Jeener-Broekaert パルス系列	
		DADAS90	P19		P117
		DECONVOLUTION	P13	J-ドメイン	P56

KH フォールド	P55	NMR 交叉緩和	P96	SASS プローブ	P100
Langmuir モデル	P84	NMR 相関時間スペクトル	P96	SEA ドメイン	P58
large proteins	P43	NMR 量子計算機	P150	Selective protonation	P43
LC-NMR	P20	NOESY スペクトル	P145	semicrystalline polymer	3L4
Magic angle spinning	P124	NOP	P122	SH3	1L6
magnetic resonance imaging	P132	Nuclear Magnetic Resonance	P48	SI 単位系	P20
MAP-LC3	P36	nucleotidyltransferase	P54	SNPs	P26
MAS	P121	Oleandrose	P14	SN ゲート法	P150
MAS	P123	oligosaccharide	P9	soaking	P132
MAS	1L13	overtone	P144	solid state	P122
MAS	P128	P(VDF/TrFE)	P91	solid state NMR	3L4
MAS NMR	P74	p22 ^{phox}	1L6	Solid State NMR	P111
MAT 法	P107	p47 ^{phox}	1L6	Solid state NMR	P97
moisture distribution	P132	paralytic peptide	P47	spin diffusion	P90
molecular cavity	P102	Paramagnetic Proteins	P28	structural analysis	
molecular mobility	P102	Parkin	P40	structure calculation	P153
MQMAS	P78	PDB ファイル	P143	syndiotactic polystyrene	P102
MQ-MAS	P77	PGSE 拡散測定	3L7	T ₁	P99
MQ-MAS	P67	PGSE NMR	P71	T _{1ρ}	P99
MRI	3L12	pH titration	P38	T ₁ 緩和時間	3L13
MRI	P131	PHOSHPATE	P13	TFIIE	P51
MR マイクロスコープ	P135	PHOSPHATE	P16	TMPC/PS 系ポリマーブレンド	P105
MR マイクロスコープ撮像	P135	Photolyase	P28	Transferred NOE	P44
MR マイクロスコープ装置	P135	PH ドメイン	3L9	TraR	P33
MULTINUCLEAR NMR	P13	Polymer Blend	P111	triad	P11
MULTINUCLEAR NMR	P16	polymer electrolyte	3L7	TROSY	1L10
Multiple ¹³ C-labeled peptide	P94	polyoxometalate	P104	TROSY	1L12
nanocomposites	P104	Polypeptide	P111	ubiquitin proteasome system	P29
NMR	1L9	Power reduction	P97	ubiquitinligase	P29
NMR	P62	protein	P122	ubiquitin-conjugating enzyme	P29
NMR	P88	Protein-DNA interaction	P28	winged-helix ドメイン	P57
NMR	P35	pulsed-gradient spin-echo NMR	P148	XiX decoupling	P125
NMR	P60	PVDF	P91	X 型ゼオライト	P84
NMR	P39	RecA	P32	ylene 構造	P12
NMR	P152	REDOR	P90	ylide 構造	P12
NMR titration	P29	REDOR	P144	ZnS:Ag, Al	P81
NMR イメージング	P118	REDOR	P79	π 共役系高分子	P73
NMR イメージング法	P119	residual dipolar coupling	1L9	(あ行)	
NMR スペクトルデータベース	P149	residual dipolar couplings	P153	アイソタクチックポリプロピレン	P95
NMR による構造解析	P31	rice grain	P132	青色蛍光体	P81
NMR プローブ	P23	RING-H2 finger motif	P29		
NMR 緩和	P30	ROESY	P19		
		SAIL	1L5		

アグリゲーション	P27	化学シフト予測	P24	局所構造解析	P108
アクリル酸	P76	核酸	1L8	局所磁場勾配	P88
アクリル酸エステル	P76	核酸	P147	極性溶媒	P12
アクリロニトリル-ブタジエン共		拡散過程	P119	距離制限の下限	P145
重合体ゴム	P82	拡散係数	3L2	キラル液晶	P66
圧力	2SL1	拡散係数	P17	金属配位	P54
圧力依存性	P129	拡散係数	P61	区分安定同位体標識	1L12
アプタマー	1L7	核酸結合タンパク質	P55	クロレラユビキチン	P38
アミノ酸	P64	拡散測定	P73	ゲスト	P87
アミロイドペプチド	P39	核磁気緩和時間	P92	結合エネルギー	P143
アモルファストランス	3L3	核スピン偏極移行	P138	結合活性	P36
アルツハイマー病	P39	化合物半導体	P141	結晶	P77
安定同位体ラベル	P59	家蚕絹	P90	結晶構造	P92
安定同位体ラベル	P116	加水分解	P69	ケミカルシフトの温度依存性	
安定同位体ラベル	P79	活性化構造	1L2		P5
安定同位体標識	P35	カルボキシメチルセルロース		ケミカルシフトの比較	P5
安定同位体利用NMR	1L3		P112	高圧 ^{129}Xe NMR	P85
イオン性液体	P71	カルボニル酸素	3L8	高圧 NMR	P53
遺伝子組み換え法	P116	環境ホルモン	P83	高圧 NMR	P84
異方的 2 次モーメント	P117	環状ペプチド	P25	高圧 NMR 法	P10
インタカレート	P72	緩和時間	3L2	高温・高圧	P23
インテン	1L12	緩和時間	P61	高温高圧	P2
宇宙用 MRI	3L12	緩和時間	P101	光学異性体	P66
運動性	P62	緩和時間	P110	交換	P85
永久磁石磁気回路	P130	緩和時間	P98	抗菌活性	P27
液晶性高分子	P107	緩和時間	P10	抗菌性ペプチド	P68
液体	P17	緩和時間	P27	交差飽和	P45
遠距離情報	P22	緩和時間	P34	高磁場	P78
温度依存性	P129	緩和時間	P91	高磁場 MRI	3L11
温度可変	P25	緩和時間測定	P73	高周波振動	P128
		緩和試薬	3L13	合成中間体	P24
(か行)		技術開発	P141	構造解析	2SL1
蚕	P47	気体吸着特性	3L6	構造解析	P52
塊重合	P76	気体収着特性	P82	構造間平衡	2SL1
解析	P46	気体収着特性	P105	構造決定	P1
回転相関時間	P10	キチン結合	P27	構造ゲノム科学	P35
回転相関時間	P17	キトサン	P112	構造とダイナミクス	2SL2
外部複基準法	P5	絹フィブロイン	P79	構造ドメイン	P51
化学交換	3L2	機能性絹様物質	P116	構造の評価	P145
化学シフト	P53	基本原理設計	P151	構造プロテオミクス	P52
化学シフト	3L1	吸着	P129	構造プロテオミクス	1L4
化学シフト異方性	P100	吸着	P85	構造プロテオミクス	P55
化学シフト試薬	P119	凝集状態	P8	構造プロテオミクス	P56
化学シフト振動	3L10	局所緩和モード	P96	構造プロテオミクス	P58
化学シフト値	3L6	局所構造	P38	構造プロテオミクス	P57

構造プロテオミクス	P35	固体 ^{17}O NMR	3L8	自動帰属	P146
構造変化	P127	固体 ^{29}Si -NMR	P72	シトクロム <i>c</i>	P37
酵素活性	P49	固体 NMR 構造解析	P115	磁場勾配	3L2
高速 MAS	P126	固体高分解能 NMR	P87	磁場配向	P7
広帯域 NMR	P140	固体高分解能 NMR	3L9	磁場配向	P142
広帯域リカップリング	P100	固体分散体	P101	磁場勾配 NMR	P64
高電力	P137	固体無機材料	P78	自発磁場配向膜	3L10
高度好熱菌	P54	骨粗鬆症	3L12	自発磁場配向膜	P106
高分解能化	P125	骨密度	3L12	重水素化	1L10
高分子	P89	五糖鎖アレルゲン	P19	重水素化	1L12
高分子ゲル	P119	五糖鎖の立体構造	P19	重水素標識	1L5
高分子電解質	3L7	ゴム状高分子	P82	自由体積	P82
高分子電解質ゲル	P118	コラーゲン	1L1	自由体積	3L6
高分子溶液	P30	コラーゲン受容体	1L5	柔粘性結晶	P88
高分子量蛋白質	1L10	混合物	P15	縮合度	P69
光偏極キセノン	P138	コンゴレッド	P8	重合パウダー	P95
高偏極分子液体	P138	昆虫	P47	重縮合高分子	P11
酵母遺伝学	P134	コンパクト MRI	P130	準秩序構造	P73
酵母ヒストン HHO1	P31	コンピュータシミュレーション	P143	常磁性 NMR	P34
固体	P136			常磁性金属	P22
固体	P137	コンホメーション	3L3	常磁性金属イオン	P119
固体	P140	コンホメーション	P127	常磁性効果	P142
固体 2 次元交換 ^{13}C NMR 法	P115	コンホメーション平衡	P25	常磁性効果	P7
固体 NMR	P70			常磁性シフト	P37
固体 NMR	P89	(さ行)		情報	P147
固体 NMR	P92	細孔	3L5	触媒活性	P72
固体 NMR	P112	細胞外	P58	植物から得られる薬効成分	P14
固体 NMR	P113	残基削除	P49	植物細胞	P65
固体 NMR	P114	残余化学シフト異方性	P7	シリカゲル表面	P86
固体 NMR	P100	残余双極子カップリング	P7	シリカ系多孔性粒子	P129
固体 NMR	P123	残余双極子カップリング	P142	診断用	P130
固体 NMR	1L13	残余双極子相互作用	P40	水素核間距離	P120
固体 NMR	P127	磁化率テンソル	P37	水素結合	1L7
固体 NMR	P128	時間に依存する自己拡散係数		水素結合	2SL2
固体 NMR	P80		3L7	水素結合	3L8
固体 NMR	P121	自己会合	P8	水溶性高分子	P30
固体 NMR	P125	自己拡散	P142	水和	P77
固体 NMR	P106	自己拡散係数	P63	数値シミュレーション	P103
固体 NMR	P68	自己拡散係数	P65	ステロイド配棟体	P14
固体 NMR	P95	自己拡散係数	P71	スピニング	3L2
固体 NMR	P120	脂質二重膜	P68	スピン-スピン緩和時間	P76
固体 ^2H NMR	P102	脂質二重膜	3L9	スピン拡散	P101
固体 ^{13}C NMR	P109	脂質膜	P7	スピン拡散	P100
固体 ^{13}C -NMR	P72	脂質二分子膜	3L10	スペクトル表示システム	P149
固体 ^{15}N NMR	P109	ジスルフィド結合	P27	スポーツ障害	P130

制限拡散	3L7	蛋白質間相互作用	P32	凍結乾燥製剤	P99
制限拡散	P64	蛋白質間相互作用	1L1	糖鎖	P44
制限空間	P65	蛋白質構造	2SL1	同種核二量子双極子相互作用	
生分解	P92	蛋白質複合体	P45		P120
生分解性高分子	P109	たんぱく質複合体	1L11	糖タンパク質	1L3
ゼオライト	P85	蛋白質立体構造解析	P36	動的膜結合構造	P106
ゼラチン	P61	タンパク質	P22	ドラッグデザイン	P26
関連時間	P110	タンパク質	1L5	トランスグルタミナーゼ	P49
双極子信号	P117	タンパク質	P51	トリアゾール系化合物	P66
相互作用	1L1	タンパク質	1L8	トリプレットリビート	1L7
相互作用	P44	タンパク質	P147	トロポニン	P46
相互作用	P143	たんぱく質-たんぱく質相互作用		食食	P36
相互作用解析	P4		1L11		
層状化合物	P67	タンパク質-タンパク質相互作用		(な行)	
相対論的効果	3L1		P3	ナノ空間	P70
相溶性	P115	タンパク質の高次構造	P37	ナローポーアプローブ	P137
相溶性ポリマーブレンド	P105	遅延線 NMR プローブ	P140	二酸化炭素	P17
組織	P152	地下水探査	P148	二酸化炭素	P10
疎水性低分子結合	P62	地層の NMR 計測	P148	二次元 MAT 法	P108
ゾルーゲル転移	P98	超高磁場マグネット	P142	二次元結晶	P114
ゾルーゲル転移	P61	長鎖脂肪酸	P88	二次元交換 NMR	P73
ゾルゲル法	P69			二次元固体 NMR	P107
		超並列型 MR マイクロスコープ		ニトロアニリン	P70
(た行)			P135	熱処理	P108
代謝物	P152	超偏極	P131	ネットワーク	P64
体積磁化率	P5	超偏極 Xe	3L5	粘土ゲル	P148
タイトレーション	P1	超偏極 Xe-129 ガス	P129	脳	P152
ダイナミクス	P98	超偏極ガス発生装置	P139	脳弓下器官	3L13
ダイナミクス・モデル	1L2	張力印加 NMR	P127	脳血液関門	3L13
ダイナミクス	P107	超臨界水	P2		
多核種 NMR	3L11	超臨界水	P23	(は行)	
多核多次元 NMR	P46	超臨界流体	P10	パーキンソン病	P40
多孔性錯体	P87	超臨界流体	P17	廃ガラス	P74
多次元 NMR	P33	直接結合定数	P66	配向	P68
多次元 NMR	P52	低磁場 NMR	P138	配向パラメーター	P66
多次元 NMR 法	P51	ディップコーティング	P69	バイコンティニューアス相	P63
多次元多重共鳴法	P50	定量 NMR	P20	バインダー	P84
多チャンネル測定	3L11	データベース	P147	パッキング	3L3
ダブルチューニング	P136	データ入出力システム	P149	発現	P59
ダブルチューニング	P137	転移交差飽和法	P3	パルス NMR	P76
多量子遷移	3L3	転移交差飽和法	1L1	パルス磁場勾配	P65
炭素系材料	3L5	電解質	P71	半導体	P151
蛋白質	P50	転写制御因子	P60	半導体レーザー	P131
蛋白質-DNA 間の相互作用	P1	天然物	P149	半導体レーザー	P139
蛋白質核酸相互作用	P32	電場印加	P118	光特性	P110

光ポンピング	P141	ペプチド主鎖二面角	1L13	ミオシンフォスファターゼ	P42
光ポンピング	P131	ヘムタンパク質	P34	マイクロボイド	3L6
光ポンピング	P139	ヘムの配位構造	P37	マイクロボイド	P105
光ポンピング	P138	ヘリックス構造	3L10	水の自己拡散係数	P148
光ポンピング法	P150	変異体	P38	水分子	3L13
ヒスチジンタグ	P22	偏極率	P139	水分分布	P133
ヒストン H5	P31	変調構造	P103	ミリ秒揺らぎ	1L2
ヒト cDNA	P56	棒状高分子	P98	無細胞タンパク質合成	1L4
ヒト cDNA	1L4	包接	P39	無細胞タンパク質合成	P55
非等価性	P12	包接化合物	P80	無細胞タンパク質合成	P56
品質管理	1L3	方法論の開発	P118	無細胞タンパク質合成	P58
部位特異的置換	P49	ホスホリパーゼ C	3L9	無細胞タンパク質合成	P57
複合体	P8	ポリ (L-グルタミン)	P110	無細胞タンパク質合成	P35
複合体	P50	ポリアクリル酸	P112	無細胞タンパク質合成	P52
不斉中心	P12	ポリアクリロニトリル	P108	メソポーラス	P70
不確かさ	P20	ポリエステル	P11	メソポーラスシリカ層状組織体	
フッ素置換ヘム	P34	ポリエチレンテレフタレート			P72
部分モル体積	2SL1		3L3	メチル化修復	P60
プリオン	1L2	ポリスチレンゲル	P64	メチル基	P45
フレキシビリティ	P49	ポリペプチド	P30	モデル・フリー・アプローチ	
プロテアソーム	P40	ポリマーブレンド	P115		1L2
プロテオミクス研究	P4	ポリメタクリル酸	P115	モノマー連鎖分布	P11
分画	P152	ポリユビキチン	1L11		
分岐シクロデキストリン	P18	ポリリン酸	P134	(や行)	
分子運動	P92	ポリ酢酸ビニル	P115	野球肘	P130
分子運動	P103			誘起円二色性	P8
分子運動	P80	(ま行)		ゆで麵	P133
分子運動	P30	マイクロ MRI	P133	ユニット選択ラベル	1L11
分子運動性	P99	マウス cDNA	P55	ユビキチンリガーゼ	P57
分子運動性	P91	マウス cDNA	P58	ユビキチン様ドメイン	P40
分子間	P90	マウス cDNA	P57	溶液 NMR	P47
分子間相互作用	P39	マウス cDNA	1L4	溶液構造	P46
分子軌道計算	P127	マウス cDNA	P52	横緩和時間	P88
分子挙動	P70	マガイニン 2	P59	横緩和時間	P133
分子構造解析システム	P21	膜圧依存性	P106		
分子シャペロン	1L3	膜および不均一系	1L1	(ら行)	
分子内	P90	膜蛋白質	P113	ランダムコイル鎖	P53
分子認識	P26	膜蛋白質	P114	リカップリング	P120
平衡回路	P136	膜タンパク質	2SL2	リチウム二次電池	P71
平衡回路	P137	膜表在性蛋白質	3L9	立体化学	P24
ペプチド	P59	膜融合・分断	P106	立体構造	P41
ペプチド	3L8	マジックエコー	P117	立体構造	P42
ペプチド構造	1L13	マジック角試料回転	P120	立体構造	P22
ペプチド主鎖構造	P123	麻痺性ペプチド	P47	立体構造	P51
ペプチド主鎖二面角	P123	ミオシンフォスファターゼ	P41	立体構造	1L7

立体構造	3L10	リボカリン型プロスタグランジン	量子スピン初期化器	P150
立体構造解析	P50	D 合成酵素	リン酸化	P41
立体構造解析	P33	流通型 NMR	リン酸化型変異体	P42
立体構造決定	1L5	量子コンピュータ	レクチン	P44
立体構造決定	P60			

著者索引

(数字 アルファベット)

Anne S. Ulrich 2SL5
 Ausunkaree Choowong P134
 Daniel Nietlispach 1L10
 David L. Brautigam P41
 David L. Brautigam P42
 Detlef Reichert 3L4
 Emmanuelle Raekelboom P71
 Ernest Laue 1L10
 Gan Zhihua P92
 Hans. W. Spiess 2SL6
 Jun-Goo Jee P48
 Klaus Schmidt-Rohr 3L3
 Lao Ai-na P14
 M.Pruski 3L8
 Michael Overduin 2SL4
 Ovidiu Pascui 3L4
 Peter Guentert 1L4
 Peter Guntert P153
 Sundaresan Rajesh 1L10
 Sundaresan Rajesh P43
 Tara N. Niraula P53
 Thomas L. James 2SL3
 Timothy A Cross P97
 William S. Price 3L7
 Xia Zeng-nua P14

(あ行)

相澤崇史 P17
 相澤崇史 P23
 相沢智康 P27
 Yuichi Aihara 3L7
 相原雄一 P71
 相見敬太郎 P93
 相見敬太郎 P91
 青木雅昭 P35
 青木雅昭 P55
 青木雅昭 P56
 青木雅昭 P58
 青木雅昭 P57
 青木雅昭 3L12

赤井智子 P74
 赤坂一之 1L2
 赤坂一之 2SL1
 赤坂一之 P53
 Etsuo Akiba 3L7
 秋葉悦男 P71
 阿久津秀雄 1L12
 阿久津秀雄 P120
 阿久津秀雄 P121
 阿久津秀雄 P147
 浅川直紀 P93
 浅川直紀 P73
 浅川直紀 P88
 朝倉哲郎 P11
 朝倉哲郎 P68
 朝倉哲郎 P79
 朝倉哲郎 P116
 朝倉哲郎 P90
 朝倉哲郎 P127
 浅野晶子 P25
 浅野敦志 P115
 浅野敦志 P76
 芹田淳 P90
 芹田淳 P125
 阿曾幸男 P99
 阿曾幸男 P101
 足立恭子 P46
 阿部絹子 P61
 阿部英喜 P92
 阿部寛志 P39
 網田富士嗣 P2
 荒川規 P113
 荒川規 P114
 有福和紀 P149
 安嬰 P47
 安藤勲 P64
 安藤勲 3L8
 安藤勲 P111
 安藤勲 P118
 安藤勲 P119
 安藤勲 P128
 安藤慎治 P93
 安藤慎治 P91
 阿武泉 P135
 飯島孝 3L5

飯島隆広 P103
 飯塚靖子 P59
 飯田貴之 P8
 五十嵐泰夫 P37
 生島豊 P10
 生島豊 P17
 生島豊 P23
 Takahisa Ikegami P48
 Mitsunori Ikeguchi P48
 池田哲郎 1L7
 池田泰久 P67
 石井文明 P96
 石川潔 P138
 石川弘紀 P49
 石田宏之 P107
 石塚靖子 P18
 石塚靖子 P143
 石部聡子 P32
 伊勢本潤 P84
 市川真史 P140
 伊藤聡 P142
 伊藤允好 P25
 伊藤允好 P66
 伊藤 隆 1L10
 伊藤隆 P1
 伊藤隆 P32
 伊藤隆 P43
 伊藤隆 P142
 稲岡斉彦 P59
 稲垣冬彦 1L6
 稲垣冬彦 P146
 伊奈康夫 P45
 乾隆 P62
 乾正樹 P62
 井上多門 P117
 井上真 P35
 井上真 P55
 井上真 P56
 井上真 P58
 井上真 P57
 井上義夫 P73
 井上義夫 P88
 井上頼直 P54
 猪瀬達徳 P34
 井原俊英 P20

今井宏彦	P138	大田悟史	3L6	梶弘典	P107
岩井成憲	P28	太田雅也	P19	梶弘典	3L3
岩澤良子	P20	大槻馨男	P46	梶弘典	P108
岩下孝	P19	大坪研一	P132	梶本興亜	P2
植垣隆浩	P77	大野真希	P82	柏木立己	P49
上釜奈緒子	3L9	大野真希	3L6	片岡正和	P33
植木克典	P95	大橋肅	1L7	片平正人	1L7
上杉晴一	1L7	大橋竜太郎	P94	加藤暁	P28
上田貴洋	P85	大橋竜太郎	P123	加藤悦子	P29
上田卓見	P28	大橋竜太郎	P124	加藤悦子	P94
上野隆	P36	大橋竜太郎	1L13	加藤悦子	P122
上林正己	P143	大橋若奈	P52	加藤晃一	P40
上原宏樹	P95	岡田重益	3L12	加藤晃一	1L3
鵜沢洵	P149	岡田雅司	3L9	加藤静恵	P29
鵜澤洵	P14	岡博之	P2	加藤貴子	P25
卯辰直也	P12	岡村英保	P50	加藤範子	P85
内野新一	P30	小川敬二	P114	加藤祐子	P19
内山進	P37	荻野孝史	3L13	金久保光央	P10
宇津澤慎	P130	荻野孝史	P152	金久保光央	P17
宇津澤慎	3L12	奥田昌彦	P51	金久保光央	P23
宇津澤慎	P135	奥村亜子	P54	金澤健治	P18
梅木辰也	P10	小椋賢治	1L6	金澤健治	P44
梅木辰也	P17	尾崎拓男	3L8	金澤健治	P143
梅木辰也	P23	尾崎司	P27	金橋康二	P67
梅本公子	P68	尾島孝男	P46	金橋康二	P78
浦崎洋平	P2	尾辻雅	P12	金橋康二	P89
裏出良博,	P62	小野晶	1L8	鎌足雄司	1L2
江口太郎	P84	小野明	1L5	鎌足雄司	P53
江口太郎	P85	小野克輝	P31	神谷貴史	P129
江島大輔	P49	小野山吾郎	P108	亀田恒徳	P116
江藤真澄	P41	小原收	1L4	亀田恒徳	P90
江藤真澄	P42	小原收	P56	亀田恒徳	P127
恵良田知樹	P75	尾身洋典	P84	狩谷英里	P41
遠藤政治	3L12	尾身洋典	P85	河合真由美	P95
大石修	P65	尾張洋史	P110	川上綾	P152
大木忍	P141			川口恭輔	P47
大木進野	P38	(か行)		川口謙	P68
大木進野	P41	甲斐莊正恒	1L5	河野敬一	P27
大木進野	P42	甲斐莊正恒	P38	河野敬一	P36
大窪貴洋	P67	甲斐莊正恒	P41	川畑俊一郎	P27
大久保忠恭	P60	甲斐莊正恒	P42	Takeshi Kawabata	P48
大久保忠恭	P62	嘉数あや	P116	川原裕之	P40
大熊芳明	P51	葛西卓磨	P55	川原美香	P8
大竹恵介	1L3	梶原康宏	P9	川村純司	P116
大竹紀夫	P139	梶弘典	P104	木川隆則	P35

木川隆則	P52	黒木重樹	P128	小林直宏	P56
木川隆則	1L4	黒田輝	P131	小林祐次	P37
木川隆則	P55	黒田裕	P54	小林祐次	P60
木川隆則	P56	黒津卓三	P76	小林祐次	P62
木川隆則	P58	桑田一夫	1L2	小松一男	P63
木川隆則	P57	桑原和弘	P92	小松一男	P86
菊地淳	P7	桑原大介	P144	木南英紀	P36
菊地淳	P142	河野隆英	P36	小宮山孝	P93
菊池淳	P40	河野俊之	P4	古明地勇人	P143
岸真弘	P102	河野俊之	1L8	小森佳彦	P70
北浦和夫	P143	河野俊之	P33		
北浦良	P87	河野俊之	P59	(さ行)	
北川進	P87	甲野裕之	P75	齋藤烈	P26
北澤英明	P150	甲野裕之	P83	斎藤公児	P89
北澤英明	P151	甲野裕之	P111	齋藤公児	P78
衣笠晋一	P20	甲本忠史	P95	齋藤公児	3L5
木村教臣	P66	小金沢望	P27	齋藤公児	P136
木村教臣	3L5	小神将	P38	齋藤公児	P137
木村教臣	P129	古久保哲郎	P134	齊藤公児	P67
木村朋子	P63	越野広雪	P24	斎藤誠治	P117
木村朋子	P86	小柴生造	P52	齋藤剛	P20
木村英昭	P64	小柴生造	P55	斎藤肇	3L9
木村英昭	3L8	小柴生造	P56	斎藤肇	P113
木村英昭	P128	小柴生造	P58	斎藤肇	P114
木本博喜	P76	小柴生造	P57	斎藤肇	2SL2
木吉司	P142	小嶋茂雄	P99	斎藤よよこ	P131
日下康成	P104	小嶋茂雄	P101	坂倉正義	P3
草野修	P31	児嶋長次郎	P4	坂田絵理	P40
国本浩喜	P109	児嶋長次郎	1L8	坂田育幸	P77
久保厚	P140	児嶋長次郎	P26	櫻井愛子	P21
窪田健二	P59	児嶋長次郎	P22	櫻井謙資	P112
熊木康裕	P47	小島登貴子	P133	佐々木曉嗣	P119
倉島かおり	P1	巨瀬勝美	P130	佐々木千鶴	P109
倉光成紀	P28	巨瀬勝美	3L12	佐藤明男	P142
倉光成紀	P54	巨瀬勝美	P133	佐藤耕平	P88
栗原範明	P142	巨瀬勝美	P135	佐藤信二	P7
栗本英治	P40	小関佑	P91	佐藤一	P9
栗本英治	1L3	後藤敦	P141	佐藤寛子	P24
栗本岳明	P130	後藤敦	P150	佐藤真奈美	P51
栗本岳明	3L12	後藤敦	P151	三本木至宏	P37
栗本岳明	P135	小橋川敬博	P27	池求	1L11
黒木重樹	P64	小林邦子	P33	篠原正法	P8
黒木重樹	3L8	小林俊達	P4	篠原美奈	P49
黒木重樹	P111	小林俊達	1L8	志野英雄	P136
黒木重樹	P119	小林直宏	P52	志野英雄	P137

柴田武彦	P1	鈴木榮一郎	P49	立入直紀	P37
柴田武彦	1L10	鈴木幸一	P47	橘秀樹	P53
柴田武彦	P32	鈴木咲良	P54	龍宮尚史	P12
柴田武彦	P43	鈴木智幸	P82	楯真一	1L9
柴田武彦	P54	鈴木智幸	P105	田所健一	3L5
嶋田一夫	P28	鈴木智幸	3L6	田中亜紀	P51
嶋田一夫	1L1	鈴木悠	P68	田仲昭子	1L4
嶋田一夫,	P3	住本英樹	1L6	田仲昭子	P56
嶋田一夫,	P45	瀬尾芳輝	3L13	田中啓二	P40
島原秀登	1L9	関英子	P35	田中剛史	P33
清水禎	P141	関英子	P55	田邊靖博	P69
清水禎	P150	関英子	P56	谷田以誠	P36
清水禎	P151	関英子	P58	田之倉優	P46
清水真人	P42	関英子	P57	田畑祥生	P77
清水光弘	P31	瀬戸治男	P6	田宮由香	P5
莊司顯	3L8	外谷英嗣	1L7	田村浩二	P1
莊司長三	P110			陳丹平	P74
白石彩	P113	(た行)		崔紅	P29
白石泰子	3L1	高井光男	P75	津崎剛	3L12
白猪亨	P130	高井亮太	P29	辻暁	3L9
白川昌宏	P22	高木達也	P25	辻暁	P113
白川昌宏	1L11	高木芳弘	P138	辻暁	P114
白川昌宏	P134	高田馨	P42	辻田義治	P102
白水美香子	P52	高橋征三	P152	辻田義治	P82
白水美香子	1L4	高橋信幸	P131	辻田義治	P105
白水美香子	P55	高橋禮子	1L3	辻田義治	3L6
白水美香子	P56	高橋栄夫	P3	津田栄	P27
白水美香子	P58	高橋栄夫	P45	土田隆浩	P114
白水美香子	P57	高橋仁	P132	堤耀廣	P30
城宜嗣	P1	高橋大樹	P121	堤耀廣	P98
秦旭栄	P39	鷹股亮	3L13	堤耀廣	P110
神藤平三郎	P31	高屋展宏	3L11	角田由紀	P29
榛葉信久	P49	高山真一	P37	出村誠	P27
吹田宏英	P68	高山俊夫	P72	出村誠	P47
末武徹也	P27	瀧之脇浩人	P60	寺内勉	1L5
末松浩人	P142	竹井直行	P131	寺尾武彦	P2
須貝真理子	P33	竹腰清乃理	P2	寺尾武彦	P80
菅向志郎	P38	竹腰清乃理	P80	寺尾武彦	P94
菅澤薫	1L11	竹腰清乃理	P94	寺尾武彦	P122
杉浦眞喜子	P25	竹腰清乃理	P122	寺尾武彦	P100
杉浦眞喜子	P66	竹腰清乃理	P100	寺尾武彦	P123
杉沢寿志	P136	竹腰清乃理	P123	寺尾武彦	P124
杉沢寿志	P137	竹腰清乃理	P124	寺尾武彦	1L13
鈴木秋弘	P34	竹腰清乃理	1L13	寺沢宏明	P3
鈴木淳司	P110	田代桜子	P31	寺沢宏明	P28

寺田貴帆	P52	中野達也	P143	端健二郎	P150
寺田貴帆	P55	中野路子	1L3	端健二郎	P151
寺田貴帆	P56	中平隆幸	P110	橋本征太郎	3L12
寺田貴帆	P58	中村新治	P80	橋本雄幸	P117
寺田貴帆	P57	仲村高志	P92	Masayuki Hashimoto	P48
照井教文	P34	仲村高志	P126	長谷川憲一	P136
照井教文	P37	中村春木	P147	長谷川憲一	P137
天野剛志	P22	中村春木	P45	長谷川淳	P37
天野剛志	1L11	中村寛夫	P1	畠山盛明	P67
土井光暢	P25	中村義之	P12	畠山盛明	P89
土肥義治	P92	中村義之	P69	畠中秀樹	P54
徳永幸男	P81	中山智香子	P12	畠中秀樹	P145
枳尾豪人	1L11	中山学	1L4	八田智久	P29
枳尾豪人	P134	中山学	P56	服部信孝	P40
富田節子	P134	成相裕之	P13	服部峰之	P131
留田篤志	P128	成相裕之	P16	服部峰之	P139
虎谷秀一	3L10	西田清義	P46	花岡文雄	1L11
虎谷秀一	P106	西田紀貴	P3	花岡文雄	P51
鳥飼真之介	1L6	西村勝之	3L10	馬場雄久	3L1
鳥澤拓也	1L5	西村勝之	P97	濱田 季之	P52
鳥澤拓也	P28	西村勝之	P106	林崎良英	P52
		西村善文	P50	林崎良英	1L4
(な行)		西村善文	P51	林崎良英	P55
内藤晶	3L10	新田勝利	P27	林崎良英	P58
内藤晶	P106	新田勝利	P47	林崎良英	P57
内藤晶	P97	布川絵未	P35	林繁信	P70
中井敏晴	P131	布川絵未	P55	林文晶	P52
長尾聡	P34	布川絵未	P56	林雄一郎	P41
中川裕江	P71	布川絵未	P58	早野俊哉	P41
永阪文惣	P11	布川絵未	P57	Kikuko Hayamizu	3L7
永阪文惣	P84	根本直	P18	早水紀久子	P71
永澤明	P133	根本直	P44	早水紀久子	P149
中澤靖元	P79	根本直	P143	原島俊	P134
中澤靖元	P90	根本暢明	P46	原園としえ	P81
中島善人	P148	野村明	P20	原田拓志	1L3
永田宏次	P46	野村薫	P38	Toshinori Bando	3L7
中谷英一	P147	野村誠	P26	樋岡克哉	P136
中谷和彦	P26	野村誠	P22	樋岡克哉	P137
中西昭男	3L12			平井佑紀	P34
中西民二	P3	(は行)		平沖敏文	P98
中西洋志	P18	拝師智之	P130	平賀隆	P131
中西洋志	P44	拝師智之	3L12	平賀隆	P139
中西洋志	P143	拝師智之	P135	平田雄一	P153
中西洋志	P39	灰野裕美	P66	平山裕子	P117
中西康哲	P87	端健二郎	P141	廣明秀一	1L11

廣田洋	P52	牧秀志	P16	水口峰之	P36
廣田洋	1L4	Masahiro Shirakawa	P48	水野和子	P5
福井洋之	3L1	増井大二	P74	水野敬	P94
福澤薫	P143	増田憲二	P104	水野敬	P100
福島学	P69	松井茂	P117	水野敬	P123
福田敦子	P76	松井政徳	P64	水野敬	1L13
福西快文	P45	松浦史登	P19	水野美邦	P40
福山貴士	P19	松尾瞳	P37	水野元博	P103
藤本康雄	P14	松尾洋	P35	溝上潤	P123
藤原健一朗	P22	松尾洋	P52	溝上潤	1L13
藤原健一朗	1L11	松尾洋	1L4	三井崇裕	1L9
藤原敏道	P120	松尾洋	P55	三森文行	3L11
藤原敏道	P121	松尾洋	P56	皆川和久	P37
藤原英明	P66	松尾洋	P58	南栄一	P29
藤原英明	3L5	松尾洋	P57	宮久保圭祐	P85
藤原英明	P129	松上明正	1L7	宮崎千穂	1L3
藤原正子	P19	松川真吾	P61	宮沢真由美	P3
降旗一夫	P6	松川真吾	3L2	宮沢真由美	P45
降旗一夫	P149	松木陽	P120	三好利一	3L4
堀田芳生	P118	松田貴意	P35	向出政伸	P2
堀田芳生	P119	松田貴意	P55	武藤勝紀	P112
堀井文敬	P104	松田貴意	P56	武藤裕	P52
堀井文敬	P107	松田貴意	P58	武藤裕	1L4
堀井文敬	3L3	松田貴意	P57	宗像達夫	P19
堀井文敬	P108	松田裕生	P11	村上隆史	P105
堀金明美	P132	松田安弘	P60	村上隆史	3L6
堀金明美	P133	松田善正	P130	村上秀明	P131
堀毛悟史	P87	松田善正	3L12	村上政隆	3L13
本田航司	P72	松田善正	P133	村上美和	P107
本多尚	P83	松田善正	P135	村木三智郎	P44
本多賢吉	P32	松永吉晴	P130	村瀬八重子	1L9
本藤隆亨	P54	松林恒夫	P38	村田勝義	P111
本間一弘	P131	松原清彦	P73	村山守男	P139
本間誠之	P134	松原康史	P15	守誠一朗	P73
		松原康史	P21	森貴志	P109
(ま行)		松本聖	P80	森田啓之	3L13
前田史郎	P8	丸谷光廣	P135	森田将史	P134
前田史郎	P109	丸山幸夫	P132		
前田史郎	P112	美川 務	1L10	(や行)	
前田健	P58	美川務	P32	姚菊明	P116
前田秀明	P7	三木孝史	P142	八木澤仁	3L9
前田秀明	1L4	三島正規	P4	八木宏昌	1L12
前田秀明	P142	三島正規	1L8	矢澤哲夫	P74
牧野耕三	P50	三島正規	P26	矢沢道生	P41
牧秀志	P13	三島正規	P22	安田榮一	P69

八名順三	P23	山本行晴	P36	吉田賢右	1L12
矢吹一人	P90	湯沢聰	1L6	好田真由美	P52
矢吹孝	P35	湯本史明,	P46	好田真由美	1L4
矢吹孝	P55	横井恵理子	P116	吉田充	P132
矢吹孝	P56	横沢英良	P40	吉田充	P133
矢吹孝	P58	横田里美	P119	吉益雅俊	P32
矢吹孝	P57	横田達夫	P13	吉水広明	P102
山内一夫	3L8	横田達夫	P16	吉水広明	P82
山口悟	P113	横地政志	P146	吉水広明	P105
山口悟	P114	横山敬一	P49	吉水広明	3L6
山口芳樹	P40	横山茂之	1L4		
山口芳樹	1L3	横山茂之	P7	(ら行)	
山崎俊夫	1L12	横山茂之	P40	理研ゲノムセンター遺伝子グル	
山崎俊夫	P52	横山茂之	P35	ープ Phase&チーム	P52
山崎俊夫	1L4	横山茂之	P53	理研ゲノムセンター遺伝子グル	
山崎俊正	P31	横山茂之	P54	ープ Phase&チーム	P55
山崎俊正	P29	横山茂之	P52	理研ゲノムセンター遺伝子グル	
山崎博実	P23	横山茂之	P55	ープ Phase&チーム	P58
山崎由香子	3L12	横山茂之	P56	理研ゲノムセンター遺伝子グル	
山崎由香子	P135	横山茂之	P58	ープ Phase&チーム	P57
山下伸一郎	P112	横山茂之	P57		
山田博昭	P53	横山茂之	P142	(わ行)	
山田幸生	P8	吉岡澄江	P99	若松馨	P59
山中佐和子	P26	吉岡澄江	P101	若山哲也	P129
山根祐治	P64	吉岡大	P130	渡辺啓	P63
山延健	P95	吉岡大	3L12	Takeshi Watanabe	P48
山本隆一	P73	吉川宏起	P152	渡部徳子	P61
山本保	P12	吉川正敏	P142	渡部徳子	P81
山本泰彦	P34	吉田茂男	P14	渡部徳子	3L2
山本泰彦	P37	吉田卓也	P60	和田仁	P142
山本裕輔	P102	吉田卓也	P62		

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
Anne S. Ulrich	Institute of Molecular Biology University of Jena Winzerlaser Str. 10, 07708 Jena, Germany	+49-3641-6575-72 +49-3641-6575-20 Ulrich@molebio.uni-jena.de
Guentert Peter	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9345 045-503-9343 guentert@gsc.riken.go.jp
Hans. W. Spiess	Max-Planck-Institut fuer Polymerforschung D-55021 Mainz, Germany	+49-6131-379120 +49-6131-379320 spiess@mpip-mainz.mpg.de
Micheal Overduin	Dept. of Pharmacology Univ. of Colorado Health Sciences 4200 East Ninth Avenue Denver, Colorado 80262, USA	303-315-8774 303- 315-1667 Michael.Overduin@UCHSC.edu
Price William	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	0426-77-2555 0426-77-2525 wprice@comp.metro-u.ac.jp
Raekelboom Emmanuelle	産業技術総合研究所 電力エネルギー研究部門 305-8565 つくば市東 1-1 つくば中央第 5	0298-61-6295 0298-61-6295 e-raeckeleboom@aist.go.jp
Sundaresan Rajesh	理化学研究所 生体超分子構造・機能研究協力グループ 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7224 045-508-7364 rajesh@louise.riken.go.jp
Thomas L. James	Dept. of Pharmaceutical Chem., Univ. of California, San 926 Medical Science Building San Francisco, CA 94143-0446	415-476-1916 415-502-4690 james@picasso.ucsf.edu
Waelchli Markus	ブルカー・バイオスピン株式会社 NMRアプリケーション部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1235 内212 0298-58-0322 mrw@bruker.co.jp
相沢 智康 あいざわ ともやす	北海道大学 理学部生物科学解析3 060-0810 北海道札幌市北区北10西8	011-706-3806 011-706-3806 aizawa@sci.hokudai.ac.jp
相見 敬太郎 あいみ けいたろう	東京工業大学 大学院理工学研究科有機・高分子物質専攻 152-8552 目黒区大岡山2-12-1 東京工業大学大学院	03-5734-2889 03-5734-2889 kaimi@polymer.titech.ac.jp
赤井 智子 あかい ともこ	独立行政法人産業技術総合研究所 生活環境系特別研究体 563-8577 大阪府池田市緑ヶ丘1-8-31	0727-51-9648 0727-51-9627 t-akai@aist.go.jp
赤坂 一之 あかさか かずゆき	近畿大学 生物理工学部・生物工学科 649-6493 和歌山県那賀郡打田町西三谷930	0736-77-0345 内4110 0736-77-4754 akasaka8@spring8.or.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
阿久津 秀雄 あくつ ひでお	大阪大学 蛋白質研究所 物性部門 565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2	06-6879-8597 06-6879-8599 akutsu@protein.osaka-u.ac.jp
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 042-383-7733 asakura@cc.tuat.ac.jp
浅野 敦志 あさの あつし	防衛大学校 応用科学群応用化学科 239-8686 横須賀市走水1-10-20	0468-41-3810 内3596 0468-44-5901 asanoa@nda.ac.jp
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 住友芝浦ビル	03-5232-1238 03-5232-1264 jun.ashida@varianinc.com
阿曾 幸男 あそ ゆきお	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	03-3700-1141 内227 03-3707-6950 aso@nihs.go.jp
阿部 絹子 あべ きぬこ	東京水産大学 水産学部食品生産学科渡部研究室 108-8477 東京都港区港南4-5-7	03-5463-0643 03-5463-0643 tokuko@tokyo-u-fish.ac.jp
阿部 悟 あべ さとる	日本曹達(株) 高機能材料研究所材料探索研究室 290-0045 千葉県市原市五井南海岸12-54	0436-23-2103 0436-23-4937 s.abe@nippon-soda.co.jp
阿部 孝政 あべ たかまさ	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	045-503-9212 045-503-9210 tabe@gsc.riken.go.jp
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 230-0046 横浜市鶴見区小野町61-1 NKP小野町ビル1F	045-507-2510 045-507-2512 arata@postman.riken.go.jp
安藤 慎治 あんどう しんじ	東京工業大学 理工学研究科有機・高分子物質専攻 152-8552 目黒区大岡山2-12-1 東京工業大学	03-5734-2137 03-5734-2889 sando@polymer.titech.ac.jp
安藤 勲 あんどう いさお	東京工業大学 工学部物質科学専攻 152-5882 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2139 03-5734-2889 iando@polymer.titech.ac.jp
飯島 隆広 いじまたかひろ	物質・材料研究機構 ナノマテリアル研究所ナノ物性グループ 305-0003 茨城県つくば市桜3-13	0298-59-5017 0298-59-5010 ijima.takahiro@nims.go.jp
飯田 貴之 いいだ たかゆき	福井大学 工学部生物応用化学科物理化学研究室 910-8507 福井県福井市文京3-9-1	0776-27-8635 0776-27-8747 takayuki@acbio2.acbio.fukui-u.

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
飯塚 靖子 いづか やすこ	群馬大学 工学部生物化学工学科生物機能第3研究室 376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1 群馬大学工学部	0277-30-1441 0277-30-1441 yizuka@bce.gunma-u.ac.jp
池田 博 いけだ ひろし	東京工業大学 大学院生命理工学研究科生物プロセス専攻 226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町4259	045-924-5758 045-924-5833 hikeda@bio.titech.ac.jp
池田 龍一 いけだ りゅういち	筑波大学 化学系 305-8571 つくば市天王台1-1-1	0298-53-4250 0298-53-4250 ikedac@chem.tsukuba.ac.jp
石井 毅 いしい たけし	群馬大学 工学部生物化学工学科若松研究室 376-0034 群馬県桐生市天神町1-5-1	0277-44-1439 内1439 b8b002@ug.eng.gunma-u.ac.jp
石田 哲平 いしだ てっぺい	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 042-383-7733 ishidatp@cc.tuat.ac.jp
石塚 靖子 いしづか やすこ	産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター 305-8566 茨城県つくば市東1-1 産総研中央第6	0298-61-6125 0298-61-6135 ishizuka.yasuko@aist.go.jp
伊藤 隆 いとう ゆたか	理化学研究所 生体超分子構造・機能研究協力グループ 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7224 045-508-7364 ito@louise.riken.go.jp
稲岡 斉彦 いなおか よしひこ	群馬大学 工学部生物機能工学科若松研究室 376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	0277-30-1439 0277-30-1439 a9b012@ug.eng.gunma-u.ac.jp
稲垣 冬彦 いながき ふゆひこ	北海道大学 薬学部 060-0812 札幌市北区北12条西6丁目	011-706-3976 011-706-4979 finagaki@pharm.hokudai.ac.jp
乾 正樹 いぬい まさき	大阪大学大学院 薬学研究科 530-0044 大阪市吹田市山田丘1-6	06-6879-8222 mi_modano@hotmail.com
井上 匡子 いのうえ きょうこ	理化学研究所 横浜研究所 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	045-503-9229 045-503-9228 kyokoino@gsc.riken.go.jp
井上 雄平 いのうえ ゆうへい	東京工業大学 工学部高分子工学科 152-8522 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2880 03-5734-2889 yinoue@polymer.titech.ac.jp
井上 真 いのうえ まこと	理研 ゲノム科学総合研究センター 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9203 045-503-9201 inoue@jota.gsc.riken.go.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
井ノ岡 博 いのおか ひろし	武田薬品工業(株) 医薬品化学第一研究所 532-8686 大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85	06-6300-6401 06-6300-6086 Inooka_Hiroshi@takeda.co.jp
今井 宏彦 いまい ひろひこ	姫路工業大学大学院 理学研究科 物質科学専攻 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1	0791-58-0138 0791-58-0137 h.imai@sci.himeji-tech.ac.jp
井町 美佐子 いまち みさこ	ブルカー・バイオスピン株式会社 NMRアプリケーション部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1235 内220 0298-58-0322 mi@bruker.co.jp
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 福岡市城南区七隈8-19-1	092-871-6631 内6651 092-863-0389 wase@fukuoka-u.ac.jp
植木 定雄 うえき さだお	ブルカー・バイオスピン株式会社 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 内443 0298-58-0322 su@bruker.co.jp
上田 貴洋 うえだ たかひろ	大阪大学 総合学術博物館/理学研究科化学専攻 560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-16	06-6850-5779 06-6850-5785 ueda@ch.wani.osaka-u.ac.jp
上田 卓見 うえだ たくみ	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	03-5841-4813 03-5841-4811 ueda@nmrlab.f.u-tokyo.ac.jp
鶴澤 洵 うざわ じゅん	理化学研究所 植物科学研究センター 生長制御物質研究チーム 351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	048-467-4174 048-467-4324 juzawa@postman.riken.go.jp
臼井 和孝 うすい かずたか	東京理科大学 理工学研究科応用生物科学専攻菅原研究室 278-8510 千葉県野田市山崎2641	04-7124-1501 内3420 04-7123-9767 j6402611@ed.noda.tus.ac.jp
内田 裕 うちだ ひろし	帝国臓器製薬株式会社 有機化学研究部 213-8522 神奈川県川崎市高津区下作延1604	044-812-8638 044-833-5310 uchida-h@kw.teikoku-hormone
内野 新一 うちの しんいち	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 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6642 011-716-6175 schwarz@eng.hokudai.ac.jp
梅木 辰也 うめき たつや	産業技術総合研究所 超臨界流体研究センター 983-0047 仙台市宮城野区苦竹4-2-1	022-237-5211 022-237-5224 t-umeki@aist.go.jp
梅本 公子 うめもと きみこ	国際基督教大学 理学科化学 181-8585 東京都三鷹市大沢3-10-2	0422-33-3256 0422-33-1449 umemoto@icu.ac.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
江口 太郎 えぐち たろう	大阪大学 総合学術博物館 560-0043 豊中市待兼山町1-16	06-6850-5778 06-6850-5785 eguchi@museum.osaka-u.ac.jp
恵良 聖一 えら せいいち	岐阜大学 医学部蛋白高次機能学 500-8705 岐阜市司町40	058-267-2225 058-267-2962 era@cc.gifu-u.ac.jp
大石 修 おおいし おさむ	分子科学研究所 分子集団動力学部門 444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38番地	0564-55-7427 0564-54-2254 oishi@ims.ac.jp
大木 進野 おおき しんや	東京都立大学 理学部化学科 有機第一研究室 192-0397 東京都八王子市南大沢1の1	0426-77-1111 内3552 0426-77-3539 ohki@nmr.chem.metro-u.ac.jp
大窪 貴洋 おおくぼ たかひろ	東京工業大学 原子炉工学研究所池田研究室 152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-3061 03-5734-3061 tohkubo@nr.titech.ac.jp
大郷 耕輔 おおごう こうすけ	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 042-383-7733 ohgo@cc.tuat.ac.jp
大島 曜子 おおしま ようこ	東邦大学薬学部 NMR 274-8510 千葉県船橋市三山2-2-1	047-472-1282 047-472-1282 sakamoto@phar.toho-u.ac.jp
大西 充洋 おおにし みつひろ	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 0776-27-8747 mitsu@acbio2.acbio.fukui-u.ac.jp
大橋 若奈 おおはし わかな	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	045-503-9212 045-503-9210 wohashi@gsc.riken.go.jp
大橋 竜太郎 おおはし りゅうたろ	京都大学 理学部化学教室寺尾研究室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4014 075-753-4000 ryu@kuchem.kyoyo-u.ac.jp
大山 真 おおやま まこと	明治製菓株式会社 感染症研究所 222-8567 神奈川県横浜市港北区師岡町760	045-545-3136 045-545-3120 makoto_oyama@meiji.co.jp
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 内5252 042-342-7521 ogino@ncnp.go.jp
小椋 賢治 おぐら けんじ	北海道大学 薬学部構造生物学分野 060-0812 札幌市北区北1 2条西6丁目	011-706-3750 011-706-4979 ogura@pharm.hokudai.ac.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
小澤 慶児 おざわ けいじ	三菱ウェルファーマ株式会社 製薬研究所物性分析Bグループ 314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14	0479-46-4620 0479-46-6113 Ozawa.Keiji@ma.m-pharma.co.
小野 克輝 おの かつき	東京薬科大学 生命科学部神農研究室 192-0392 東京都八王子堀之内1432-1	0426-76-4542 0426-76-4542 s957028@educ.ls.toyaku.ac.jp
尾身 洋典 おみ ひろのり	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 共通教育化学物理棟	06-6850-5779 06-6850-5785 omi@ch.wani.osaka-u.ac.jp
甲斐荘 正恒 かいのしょうまさつ	東京都立大学 大学院理学研究科有機構造生物学研究室 192-0397 東京都八王子市南大沢1-1	0426-77-2544 0426-77-2544 kainosho@nmr.chem.metro-u.a
嘉数 あや かかず あや	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 042-383-7733 kakazu@cc.tuat.ac.jp
垣田 信吾 かきた しんご	協和発酵工業(株) 東京研究所 分析G 194- 東京都町田市旭町3-6-6	042-725-2555 内2220 042-726-8330 skakita@kyowa.co.jp
葛西 卓磨 かさい たくま	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	045-503-9317 045-503-9201 ss16321@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
笠井 信幸 かさい のぶゆき	東京理科大学 理工学部応用生物科学科菅原研究室 278-8510 千葉県野田市山崎2641	04-7124-1501 内3420 04-7123-9767 j6401609@ed.noda.sut.ac.jp
梶 紀裕 かじ のりひろ	日本メジフィジックス(株) 創薬研究所分析グループ 299-0266 千葉県袖ヶ浦市北袖3-1	0438-62-7611 0438-62-5911 norihiro_kaji@nmp.co.jp
梶 弘典 かじ ひろのり	京都大学 化学研究所 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3149 0774-38-3148 kaji@scl.kyoto-u.ac.jp
春日 久栄 かすが ひさえ	高砂香料工業(株) アロマサイエンス&テクノロジー研究所第2部 254-0073 神奈川県平塚市西八幡1-4-11	0463-25-2049 0463-25-2090 hisae_kasuga@takasago.com
片平 正人 かたひら まさと	横浜国立大学 大学院環境情報研究院 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-7	045-339-4264 045-339-4264 masakata@ynu.ac.jp
片平 律子 かたひら りつこ	協和発酵工業(株) 東京研究所分析G 194-8533 東京都町田市旭町3-6-6	042-725-2555 内2211 042-726-8330 rkatahira@kyowa.co.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
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 京都市北区上賀茂本山	075 - 805 - 1634 075 - 705 - 1640 kador@cc.kyoto-su.ac.jp
加藤 貴子 かとう たかこ	神戸薬科大学 薬品分析学研究室 658-8558 神戸市東灘区本山北町4-19-1	078-441-7592 078-441-7592 gk015032@st.kobepharma-u.ac
加藤 範子 かとう のりこ	大阪大学大学院 理学研究科 560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-16	06-6850-5779 06-6850-5785 kato@ch.wani.osaka-u.ac.jp
加藤 晃一 かとう こういち	名古屋市立大学 大学院薬学研究科 467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1	052-836-3447 052-836-3447 kkato@phar.nagoya-cu.ac.jp
門原 寛 かどはら ひろし	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	06-6394-8989 06-6394-9559 hiroshi.kadohara@bruker-biosp
金久保 光央 かなくぼ みつひろ	産業技術総合研究所 超臨界流体研究センター 983-8551 仙台市宮城野区苦竹4-2-1	022-273-5211 022-273-5224 m-kanakubo@aist.go.jp
金坂 将 かねさか しょう	東京工業大学 理工学部物質化学専攻安藤勲研究室 152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2880 03-5734-2889 skanesak@polymer.titech.ac.jp
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 0439-80-2746 kanehasi@re.nsc.co.jp
神谷 貴史 かみや たかし	大阪大学 医学部保健学科藤原研究室 565-0871 吹田市山田丘1-7	06-6879-2577 06-6879-2577 ka38@sahs.med.osaka-u.ac.jp
亀井 裕孟 かめい ひろたけ	濱野生命科学研究所 小川脳機能研究所 160-0015 東京都新宿区文京町12	03-5919-3991 03-5919-3993 kamei@medess.m.u-tokyo.ac.jp
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	042-388-7026 042-383-7733 kamedat@cc.tuat.ac.jp
河合 剛太 かわい ごうた	千葉工業大学 工学部工業化学科 275-0016 千葉県習志野市津田沼2-17-1	047-478-0425 047-478-0425 gkawai@ic.it-chiba.ac.jp
川口 恭輔 かわぐち きょうすけ	北海道大学 大学院理学研究科生物科学専攻 060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	011-706-2985 011-706-2771 kawa@sci.hokudai.ac.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
川口 哲朗 かわぐち てつろう	ブルカー・バイオスピン株式会社 技術サービス部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	06-6394-8989 06-6394-9559 twk@bruker.co.jp
川島 裕之 かわしま ひろゆき	産業技術総合研究所 エネルギー利用研究部門 305-8569 茨城県つくば市小野川16-1	0298-61-8413 0298-61-8408 h.kawashima@aist.go.jp
川瀬 泰司 かわせ たいじ	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 042-383-7733 kawaset@cc.tuat.ac.jp
河野 敬一 かわの けいいち	富山医科薬科大学 薬学部薬科学科 930-0194 富山県富山市杉谷2630	076-434-5061 076-434-5061 kawano@ms.toyama-mpu.ac.jp
川村 茂 かわむら しげる	東京エレクトロン株式会社 技術開発センター 407-0192 山梨県韮崎市穂坂町三ツ沢650	0551-23-4228 0551-23-4454 kawamura.nm094@ex.tel.co.jp
川村 純司 かわむら じゅんじ	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 042-383-7733 jun2@cc.tuat.ac.jp
木川 隆則 きがわ たかのり	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	045-503-9203 045-503-9201 kigawa@jota.gsc.riken.go.jp
菊地 淳 きくち じゅん	横浜市立大学連携大学院総合理学研究科 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-9	045-508-7207 045-508-7360 kikuchi@gsc.riken.go.jp
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 554-8558 大阪市此花区春日出中3-1-98	06-6466-5171 06-6466-5459 kimuram5@sc.sumitomo-chem.
木村 敦臣 きむら あつおみ	大阪大学 医学部保健学科医用物理学講座 565-0871 大阪府吹田市山田丘1-7	06-6879-2577 06-6879-2577 kimura@sahs.med.osaka-u.ac.jp
木村 朋子 きむら ともこ	(株)資生堂 安全性・分析センター 分析研究室 224-8558 横浜市都筑区早渕2-2-1	045-590-6057 045-590-6089 tomoko.kimura@to.shiseido.co.j
京極 好正 きょうごく よしまさ	産業技術総合研究所 生物情報解析センター 135-0064 東京都江東区青海2-41-6	03-3599-8106 03-5530-2064 kyogoku@jbirc.aist.go.jp
清谷 多美子 きよたに たみこ	昭和薬科大学 中央機器室 194-8543 東京都町田市東玉川学園3-3165	042-721-1543 042-721-1543 kiyotani@ac.shoyaku.ac.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
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リミテッド NMR応用部 108-0023 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	03-5232-1238 03-5232-1264 katsuhiko.kushida@varianinc.co
久保 厚 くぼ あつし	京都大学 理学部化学教室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4014 075-753-4000 a.kubo@kuchem.kyoto-u.ac.jp
倉島 かおり くらしま かおり	横浜市立大学大学院 総合理学研究科分子生理学研究室 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7224 045-508-7364 kurasima@postman.riken.go.jp
栗原 範明 くりはら のりあき	日本電子株式会社 分析機器技術本部第1グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2236 042-546-8068 kurihara@jeol.co.jp
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グループ 196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2235 042-546-7225 kurimoto@jeol.co.jp
栗本 岳明 くりもと たけあき	筑波大学 物理工学系 巨瀬研究室 305-0821 茨城県つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 0298-53-5145 kurimoto@mrlab.bk.tsukuba.ac.j
黒木 重樹 くろき しげき	東京工業大学 大学院理工学研究科物質科学専攻 152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2880 03-5734-2889 skuroki@polymer.titech.ac.jp
黒子 弘道 くろす ひろみち	奈良女子大学 人間文化研究科 630-8506 奈良県奈良市北魚屋西町	0742-20-3461 0742-20-3461 kurosu@cc.nara-wu.ac.jp
黒田 義弘 くろだ よしひろ	京都大学大学院薬学研究科 製剤機能解析学分野 606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町46-29	075-753-4530 075-753-4578 yokuroda@pharm.kyoto-u.ac.jp
黒田 幸夫 くろだ ゆきお	ブルカー・バイオスピン株式会社 技術サービス部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1234 内333 0298-58-0322 yk@bruker.co.jp
桑田 一夫 くわた かずお	岐阜大学 高次情報統御学講座 500-8705 岐阜市司町40	058-267-2227 058-267-2962 kuwata@cc.gifu-u.ac.jp
桑原 和弘 くわばら かずひろ	理化学研究所 高分子化学研究室 351-0198 和光市広沢2-1	048-467-9404 048-462-4667 kkuwa@postman.riken.go.jp
河野 俊之 こうの としゆき	三菱化学生命科学研究所 構造生物学研究ユニット 194-8511 東京都町田市南大谷11号	042-724-6285 042-724-6296 tkohno@libra.ls.m-kagaku.co.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
甲野 裕之 こうの ひろゆき	ブルカー・バイオスピン株式会社 NMRアプリケーション部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1235 内229 0298-58-0322 hk@bruker.co.jp
河野 隆英 こうの たかひで	富山医科薬科大学 大学院薬学研究科構造生物学研究室 930-0194 富山県富山市杉谷2630	076-434-7574 076-434-5061 pd029003@st.toyama-mpu.ac.jp
小神 将 こがみ まさる	東京都立大学大学院 理学研究科化学専攻甲斐荘研究室 192-0397 東京都八王子市南大沢1-1	0426-77-1111 内3552 0426-77-4873 kogami@nmr.chem.metro-u.ac.
小久保 州洋 こくぼ くにひろ	花王株式会社 構造解析センター 321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606	0285-68-7425 0285-68-7418 kokubo.kunihiro@kao.co.jp
越野 広雪 こしの ひろゆき	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	048-467-9361 048-462-4627 koshino@postman.riken.go.jp
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 内56 048-525-6052 tkojima@tech-lab.pref.saitama.j
児嶋 長次郎 こじま ちょうじろう	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 630-0192 奈良県生駒市高山町8916-5	0743-72-5571 0743-72-5579 kojima@bs.aist-nara.ac.jp
巨瀬 勝美 こせ かつみ	筑波大学 物理工学系 305-8573 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5335 0298-53-5335 kose@bk.tsukuba.ac.jp
後藤 敦 ごとう あつし	物質・材料研究機構 ナノマテリアル研究所ナノ物性グループ 305-0003 茨城県つくば市桜3-13	0298-59-5075 0298-59-5010 GOTO.Atsushi@nims.go.jp
小林 邦子 こばやし くにこ	(株)三菱化学生命科学研究所 構造生物学研究ユニット 194-8511 東京都町田市南大谷11号	042-724-6285 042-724-6296 kuniko@libra.ls.m-kagaku.co.jp
小林 直宏 こばやし なおひろ	理化学研究所横浜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丁目7-22	045-503-9317 045-503-9146 naohiro@gsc.riken.go.jp
小林 俊達 こばやし としたつ	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 630-0192 奈良県生駒市高山町8916-5	0743-72-5577 0743-72-5579 t-kobaya@bs.aist-nara.ac.jp
小林 祐次 こばやし ゆうじ	大阪大学大学院 薬学研究科 565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6	06-6879-8220 06-6879-8224 yujik@protein.osaka-u.ac.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
小林 潤弘 こばやし みつひろ	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 042-383-7733 kobayasm@cc.tuat.ac.jp
小宮山 孝 こみやま たかし	東京工業大学大学院 理工学研究科有機・高分子物質専攻 152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2889 03-5734-2889 tkomiyam@polymer.titech.ac.jp
小森 佳彦 こもり よしひこ	産業技術総合研究所 物質プロセス研究部門物性解析グループ 305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5	0298-61-4515 0298-61-4515 y.komori@aist.go.jp
齋藤 公児 さいとう こうじ	新日本製鐵(株) 先端技術研究所 解析科学研究所 293-8511 富津市新富20-1	0439-80-2270 0439-80-2746 saito@re.nsc.co.jp
齋藤 剛 さいとう たけし	産業技術総合研究所 計測標準研究部門 305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 中央5-2	0298-61-4618 0298-61-4487 takeshi.saito@aist.go.jp
斉藤 肇 さいとう はじめ	姫路工業大学 大学院理学研究科生命科学専攻 678-1297 姫路市船橋町5-1-4 204	0791-58-0181 0791-58-0182 saito@sci.himeji-tech.ac.jp
坂田 絵理 さかた えり	名古屋市立大学・大学院 生命分子構造学分野 467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1	052-836-3450 052-836-3450 p982524@phar.nagoya-cu.ac.jp
櫻井 愛子 さくらい あいこ	シーエーシーズ(株) 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 045-963-4261 1800929@cc.m-kagaku.co.jp
佐々木 香織 ささき かおり	大正製薬株式会社 医薬研究所 リード探索研究室 330-8530 埼玉県さいたま市吉野町1-403	048-669-3061 048-652-7254 kaori.sasaki@po.rd.taisho.co.jp
佐藤 一 さとう はじめ	ブルカー・バイオスピン株式会社 NMRアプリケーション部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	0298-52-1235 内211 0298-58-0322 one@bruker.co.jp
沢辺 紀子 さわべ のりこ	東京理科大学 薬学部 162-0826 東京都新宿区市ヶ谷船河原町12	03-3260-6725 内5050 FAX無 bunkouns@ps.kagu.tus.ac.jp
篠原 正法 しのはら まさのり	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 0776-27-8747 t370341@icpc00.icpc.fukui-u.ac
嶋田 一夫 しまだ いちお	東京大学 大学院薬学系研究科 113-0033 東京都文京区本郷7-3-1	03-5841-4810 03-3815-6540 shimada@iw-nmr.f.u-tokyou.ac

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
清水 禎 しみず ただし	物質・材料研究機構 ナノマテリアル研究所 305-0003 茨城県つくば市桜3-1-3	0298-59-5000 内5076 0298-59-5010 shimizu.tadashi@nims.go.jp
清水 弘樹 しみず ひろき	東北大学 大学院生命科学研究所 981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町1-1	022-717-8804 022-717-8806 hiroki@biochem.tohoku.ac.jp
白猪 亨 しらい とおる	筑波大学大学院 理工学研究科巨瀬研究室 305-8577 つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 FAX無 shirai@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp
白川 昌宏 しらかわ まさひろ	横浜市立大学 総合理学研究所 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番2-9	045-508-7213 045-5028-7361 shira@tsurumi.yokohama-cu.ac
神藤 平三郎 しんどう へいさぶろ	東京薬科大学 薬学部 192-0392 東京都八王子市堀之内	0426-76-4537 0426-76-4537 shindo@ps.toyaku.ac.jp
吹田 宏英 すいた こうえい	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 042-383-7733 koei@cc.tuat.ac.jp
杉浦 眞喜子 すぎうら まきこ	神戸薬科大学 中央分析室 658-8558 神戸市東灘区本山北町4-19-1	078-441-7591 078-441-7591 makiko-s@kobepharma-u.ac.jp
鈴木 浩一 すずき こういち	日本大学 文理学部化学科物理化学第一研究室 156-8550 東京都世田谷区桜上水3-25-40	03-3329-1151 内5720 03-5317-9433 suzuki_k@chs.nihon-u.ac.jp
鈴木 淳司 すずき あつし	北海道大学大学院 工学研究科量子物理工学専攻 060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6642 011-716-6175 a-suzuki@eng.hokudai.ac.jp
鈴木 悠 すずき ゆう	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 042-383-7733 suzuyu@cc.tuat.ac.jp
瀬尾 芳輝 せお よしてる	京都府立医科大学 第一生理学 602-0841 京都市上京区河原町広小路の梶井町465	075-251-5311 075-251-0295 yseo@basic.kpu-m.ac.jp
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 内651 0298-47-8313 shigehiro_takase@po.fujisawa.c
高田 零 たかだ れい	東京都立大学 理学部化学科 192-0397 東京都八王子市南大沢1-1	0426-77-1111 内3552 0426-77-3539 takada@nmr.chem.metro-u.ac.j

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
高橋 大樹 たかはし ひろき	大阪大学 蛋白質研究所阿久津研究室 565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2	06-6879-8598 06-6879-8599 daiki@protein.osaka-u.ac.jp
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 112-8681 東京都文京区目白台2-8-1	03-5981-3670 03-5981-3656 t_seizo@fc.jwu.ac.jp
高屋 展宏 たかや のぶひろ	国立環境研究所 環境ホルモンプロジェクト 305-0053 茨城県つくば市小野川16-2	0298-50-2352 0298-50-2880 takaya.nobuhiro@nies.go.jp
高山 俊夫 たかやま としお	神奈川大学 工学部応用化学科 221-8686 横浜市神奈川区六角橋3-27-1	045-481-5661 内3889 045-413-9770 takayt01@kanagawa-u.ac.jp
高山 陽子 たかやま ようこ	塩野義製薬(株) 創薬研究所 553-0002 大阪市福島区鷺洲5-12-4	06-6458-5861 内5278 06-6458-0987 yohko.takayama@shionogi.co.jp
瀧之脇 浩人 たきのわき ひろと	大阪大学大学院 薬学研究科 565-0871 大阪府吹田市山田丘1番6号	06-6879-8222 06-6879-8221 hiroto@phs.osaka-u.ac.jp
竹内 敦子 たけうち あつこ	神戸薬科大学 中央分析室 658-8558 神戸市東灘区本山北町4-19-1	078-441-7592 078-441-7591 takeuchi@kobepharma-u.ac.jp
竹腰 清乃理 たけごし きよのり	京都大学 大学院理学研究科 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 075-753-4000 takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp
田代 櫻子 たしろ さくらこ	東京薬科大学 第一分析化学 192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1	0426-76-4542 0426-76-4542 tashiro@ps.toyaku.ac.jp
楯 真一 たて しんいち	生物分子工学研究所 構造解析研究部 565-0874 大阪府吹田市古江台6-2-3	06-6872-8218 06-6872-8210 tate@beri.or.jp
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	0298-53-6706 0298-53-6065 ttanaka@tara.tsukuba.ac.jp
田中 有紀 たなか ゆき	東京エレクトロン株式会社 技術開発センター 407-0192 山梨県韮崎市穂坂町三ツ沢650	0551-23-4228 0551-23-4454 tanaka.au025@ex.tel.co.jp
田中 剛史 たなか たけし	三菱化学生命科学研究所 構造生物学研究ユニット 194-8511 東京都町田市南大谷11号	042-724-6285 042-724-6296 takeshi@libra.ls.m-kagaku.co.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
田中 彬嗣 たなか よしつぐ	九州大学 薬学部NMR測定室 812-8582 福岡市東区馬出3-1-1	092-642-6551 092-642-6551 y.tanaka@adm.phar.kyushu-u.a
田辺 雅代 たなべ まさよ	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 042-383-7733 masayo@cc.tuat.ac.jp
田之倉 優 たのくら まさる	東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 113-8657 東京都文京区弥生1-1-1	03-5841-5165 03-5841-8023 amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.j
田畑 祥生 たばた さちお	シーエーシーズ株式会社 横浜分析センター 194-0044 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地	045-963-3166 045-963-4261 2100502@cc.m-kagaku.co.jp
田村 友美 たむら ともみ	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	06-6394-8989 06-6394-9559 tot@bruker.co.jp
張 秋瑾 ちよう しゅうきん	東京水産大学 水産学部食品生産学科渡部研究室 108-8477 東京都港区港南4-5-7	03-5463-0643 03-5463-0643 tokuko@tokyo-u-fish.ac.jp
趙 晨華 ちよう しんか	理化学研究所ゲノム総合研究センター 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9317 045-503-9201 zhao@gsc.riken.go.jp
辻 暁 つじ さとる	姫路工業大学大学院 理学研究科 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1	0791-58-0180 0791-58-0182 tuzi@sci.himeji-tech.ac.jp
堤 耀廣 つみ あきひろ	北海道大学大学院 工学研究科 060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	011-706-6639 011-716-6175 atsutsu@eng.hokudai.ac.jp
津野 慎治 つの しんじ	富士写真フィルム(株) 富士宮研究所 418-8666 静岡県富士宮市大中里200	0544-26-7642 0544-26-7691 shinji_tsuno@fujifilm.co.jp
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 札幌市北区北10条西8丁目	011-706-2771 011-706-2771 demura@sci.hokudai.ac.jp
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 分子構造化学研究室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4011 075-753-4000 terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp
土江 松美 どえ まつみ	大阪市立大学 理学研究科 有機第2研究室 558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138	06-6605-2597 06-6605-2597 matsumi@sci.osaka-cu.ac.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
徳永 達裕 とくなが たつひろ	山之内製薬株式会社分析代謝研究所 分析研究室 305-8585 つくば市御幸が丘21番地	0298-63-6483 0298-52-9585 tokunaga@yamanouchi.co.jp
留田 篤志 とめだ あつし	東京工業大学大学院 理工学研究科 物質科学専攻 152-0033 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2880 内2880 03-5734-2889 atomeda@polymer.titech.ac.jp
虎谷 秀一 とらや しゅういち	横浜国立大学大学院 工学府機能発現工学専攻内藤研究室 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4231 FAX無 toraya@ynu.ac.jp
鳥澤 拓也 とりざわ たくや	科学技術振興事業団 CREST 192-0397 八王子市南大沢1-1 東京都立大学大学院理学研究科	0426-77-1111 内3551 0426-77-4873 torizawa@nmr.chem.metro-u.a
内藤 晶 ないとう あきら	横浜国立大学 大学院工学研究院 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4232 045-339-4251 naito@ynu.ac.jp
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リミテッド NMR応用部 108-0023 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	03-5232-1238 03-5232-1264 katsuhiko.kushida@varianinc.co
長尾 聡 ながお さとし	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 筑波大学化学系	0298-53-7369 0298-53-7369 s_nagao@dmb.chem.tsukuba.ac
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 042-586-8123 bunsow@hino.teijin.co.jp
中澤 靖元 なかざわ やすもと	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 042-383-7733 yasumoto@cc.tuat.ac.jp
中島 善人 なかしま よしと	産総研 地圏資源環境研究部門 305-8567 茨城県つくば市東1-1-1 中央第7	0298-61-3960 0298-61-3618 nakashima.yoshito@aist.go.jp
中島 光一 なかしま こういち	京都大学大学院 人間・環境学研究科 山内研究室 606-8501 京都市左京区吉田二本松町	075-753-2888 075-753-2999 kouichi@fermi.jinkan.kyoto-u.a
中谷 英一 なかたに えいいち	大阪大学蛋白質研究所 物性部門阿久津研究室 565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2	06-6879-8598 06-6879-8599 n-eiichi@protein.osaka-u.ac.jp
中村 昭正 なかむら あきまさ	協和発酵工業(株) 医薬総合研究所薬物動態研究所 411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188	055-989-2020 055-989-2073 akimasa.nakamura@kyowa.co.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
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 048-462-4627 nakamura@rikennmr.riken.go.jp
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 横浜市緑区長津田町4 2 5 9	045-924-5110 045-924-5109 ynakamur@res.titech.ac.jp
名川 吉信 ながわ よしのぶ	産業技術総合研究所 界面ナノアーキテクトニクス研究センター 305-8562 茨城県つくば市東1-1-1中央第4	0298-61-3021 0298-61-3029 y-nagawa@aist.go.jp
西川 紀恵 にしかわ のりえ	明治製菓(株) 薬品総合研究所化学研究所 222-8567 神奈川県横浜市港北区師岡町760	045-545-3125 045-543-9771 norie_nishikawa@meiji.co.jp
西村 勝之 にしむら かつゆき	横浜国立大学 工学研究院 内藤研 240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台79番5号	045-339-4224 045-339-4251 nishimur@ynu.ac.jp
西村 善文 にしむら よしふみ	横浜市立大学 大学院総合理学研究科 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-26	045-508-7216 045-508-7362 nismura@tsurumi.yokohama-c
西山 大介 にしやま だいすけ	東京水産大学 水産学部食品生産学科渡部研究室 108-8477 東京都港区港南4-5-7	03-5463-0643 03-5463-0643 tokuko@tokyo-u-fish.ac.jp
西山 裕介 にしやま ゆうすけ	理研GSC タンパクグループ 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9231 045-503-9228 nishi@gsc.riken.go.jp
西山 隆司 にしやま たかし	帝国臓器製薬株式会社 代謝・分析研究部 213-8522 神奈川県川崎市高津区下作延1604	044-812-8649 044-811-6898 nishiyama-t@kw.teikoku-horm
根本 直 ねもと ただし	産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター 305-8566 茨城県つくば市東1-1中央第六	0298-61-6126 0298-61-6135 tadashi.nemoto@aist.go.jp
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 内3203 03-5696-8339 noguczow@daiichipharm.co.jp
野村 誠 のむら まこと	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 630-0101 奈良県生駒市高山町8 9 1 6 - 5 学生宿舎 2 - 2 1 7	0743-72-5572 0743-72-5579 m-nomura@bs.aist-nara.ac.jp
端 健二郎 はし けんじろう	(独) 物質・材料研究機構 ナノマテリアル研究所 305-0003 茨城県つくば市桜 3 - 1 3	0298-59-5082 0298-59-5010 hashi.kenjiro@nims.go.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
長谷川 憲一 はせがわ けんいち	日本電子株式会社 開発本部 196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2244 042-546-8068 hasegawa@jeol.co.jp
長谷川 淳 はせがわ じゅん	第一製薬株式会社 創薬開拓研究所 134-8630 東京都江戸川区北葛西1-16-13	03-3680-0151 内3466 03-5696-4266 haseg7li@daiichipharm.co.jp
畠山 盛明 はたけや ありあき	(株)日鐵テクノロジー 解析センター 293-0011 千葉県富津市新富20-1	0439-80-2691 内3215 0439-80-2767 moriaki@re.nsc.co.jp
服部 峰之 はっとり みねゆき	独立行政法人 産業技術総合研究所 光技術研究部門 305-8568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第2	0298-61-5537 0298-61-5540 mhattori@ni.aist.go.jp
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 内363 0594-82-0072 h_hamajima@mb4.skk-net.com
濱田 季之 はまだ としゆき	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	045-503-9212 045-503-9210 thamada@gsc.riken.go.jp
濱田 めぐみ はまだ めぐみ	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 042-383-7733 hamame@cc.tuat.ac.jp
林 由康 はやし よしやす	筑波大学 理工学研究科巨瀬研究室 305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 FAX無 hayashi@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp
林 繁信 はやし しげのぶ	産業技術総合研究所 物質プロセス研究部門物性解析グループ 305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5	0298-61-4515 0298-61-4515 hayashi.s@aist.go.jp
早水 紀久子 はやみず きくこ	産業技術総合研究所 電力エネルギー研究部門 305-8565 つくば市東1-1 つくば中央第5	0298-61-6295 0298-61-6295 hayamizu.k@aist.go.jp
原 英二 はら えいじ	富山化学工業株式会社 創薬基盤研究所 930-8508 富山県富山市下奥井2-4-1	076-431-8218 076-431-8208 EIJI_HARA@toyama-chemical.
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 606-8501 京都市左京区吉田本町	075-753-5937 075-751-7611 haruyuki@mds.moleng.kyoto-u.
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 042-546-7225 hyakuna@jeol.co.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
平冲 敏文 ひらおき としふみ	北海道工学部工学研究科 量子物理工学専攻 060-8628 札幌市北区北13西8	011-706-6640 011-716-6175 hiraoki@eng.hokudai.ac.jp
平田 雄一 ひらた ゆういち	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 W505	045-503-9344 045-503-9343 hirata@gsc.riken.go.jp
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 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9211 045-503-9210 hirota@gsc.riken.go.jp
福井 洋之 ふくい ひろゆき	北見工業大学 工学部化学システム工学科 090-8507 北海道北見市公園町165	0157-26-9402 0157-24-7719 fukui@gaea.chem.kitami-it.ac.jp
福島 学 ふくしま まなぶ	東京工業大学 応用セラミックス研究所 安田・田邊研究室 226-0003 横浜市緑区長津田町4529	045-924-5346 045-924-5345 mana1@mssl.titech.ac.jp
福田 敦子 ふくだ あつこ	防衛大学校 応用化学科黒津研究室 239-8686 神奈川県横須賀市走水1-10-20	0468-41-3810 内2117 FAX無 g40033@nda.ac.jp
藤川 昭彦 ふじかわ あきひこ	藤沢薬品工業(株) 創薬先端技術研究室 300-2698 茨城県つくば市東光台5-2-3	0298-47-8611 内418 0298-47-1535 akihiko_fujikawa@po.fujisawa.c
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リミテッド NMR応用部 108-0023 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	03-5232-1238 03-5232-1264 katsuhiko.kushida@varianinc.co
藤田 春雄 ふじた はるお	京都大学 工学部研究科合成・生物化学専攻 606-8501 京都市左京区吉田本町	075-753-5643 FAX無 fujita@sbchem.kyoto-u.ac.jp
藤原 敏道 ふじわら としみち	大阪大学 蛋白質研究所 565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2	06-6879-8598 06-6879-8599 tfjwr@protein.osaka-u.ac.jp
藤原 英明 ふじわら ひであき	大阪大学 医学部医用工学講座 565-0871 吹田市山田丘1-7	06-6879-2573 06-6879-2573 fujiwara@sahs.med.osaka-u.ac.j
降旗 一夫 ふりはた かずお	東京大学 大学院農学応用生命科学部研究科応用生命化学専攻 113-8657 東京都文京区弥生1-1-1	03-5841-5460 03-5841-8485 furihata@iam.u-tokyo.ac.jp
古田 浩祐 ふるた ひろすけ	杏林製薬(株) 創薬研究所 研究管理課 329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木2399-1	0280-56-2201 内302 0280-57-1293 hirosuke.furuta@mb2.kyorin-ph

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
逸見 光 へんみ ひかる	独立行政法人食品総合研究所 状態分析研究室 305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12	0298-38-8033 0298-38-7996 hemmi@nfri.affrc.go.jp
細田 和男 ほそだ かずお	独立行政法人 農業生物資源研究所 生体高分子研究グループ 305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2	0298-38-7072 0298-38-8399 khos@affrc.go.jp
堀井 文敬 ほりい ふみたか	京都大学 化学研究所 611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3150 0774-38-3148 horii@scl.kyoto-u.ac.jp
堀金 明美 ほりがね あけみ	独立行政法人・食品総合研究所 分析科学部状態分析研究室 305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12	0298-38-8033 0298-38-7996 akhorii@nfri.affrc.go.jp
堀毛 悟史 ほりけ さとし	京都大学大学院 工学研究科合成・生物化学専攻機能化学講座 606-8501 京都府京都市左京区吉田本町	075-753-5658 075-753-4979 horike@molrec2.synchem.kyot
前田 健 まえだ たけし	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	045-503-9317 045-503-9201 tmaeda@gsc.riken.go.jp
前田 能崇 まえだ よしたか	京都大学大学院薬学研究科 薬品機能解析学分野 606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町46-29	075-753-4531 075-753-4578 f60y0060@ip.media.kyoto-u.ac.j
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 福井市文京3-9-1	0776-27-8635 0776-27-8747 maeda@acbio.fukui-u.ac.jp
牧 秀志 まき ひでし	神戸大学 工学部応用化学科 657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1	078-803-6187 078-803-7643 maki@cx.kobe-u.ac.jp
松川 真吾 まつかわ しんご	東京水産大学 食品生産学科食品化学科 108-8477 東京都港区港南4-5-7	03-5463-0591 03-5463-0581 matsukaw@tokyo-u-fish.ac.jp
松田 裕生 まつだ ひろのり	帝人株式会社 構造解析研究所 191-8512 東京都日野市旭が丘4-3-2 帝人東京研究センター	042-586-8121 042-586-8123 h.matsuda@teijin.co.jp
松田 善正 まつだ よしまさ	筑波大学 理工学系巨瀬研究室 305-0821 茨城県つくば市天王台1-1-1	0298-53-5214 0298-53-5205 matsuda@mrlab.bk.tsukuba.ac.j
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鴨志田町1000番地	045-963-3166 045-963-4261 3709437@cc.m-kagaku.co.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
松本 佳子 まつもと よしこ	協和発酵工業株式会社 医薬総合研究所 薬物動態研究所 411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188	055-989-2020 055-989-2073 masayuki.abe@kyowa.co.jp
三浦 隆昭 みうら たかあき	日本ロシュ株式会社 化学部機器分析グループ 247-8530 神奈川県鎌倉市梶原200	0467-47-2280 内3321 0467-45-6824 takaaki.miura.tm2@roche.com
三島 正規 みしま まさき	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 630-0101 奈良県生駒市高山町8916-5	0743-72-5576 0743-72-5579 misima@bs.aist-nara.ac.jp
水野 敬 みずの たかし	京都大学 大学院理学研究科 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 075-753-4000 mizuno@kuchem.kyoto-u.ac.jp
水野 和子 みずの かずこ	福井大学 機器分析センター 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8580 0776-27-8882 mizuno@acbio2.acbio.fukui-u.a
溝上 潤 みぞかみ じゅん	京都大学大学院 理学研究科化学専攻 分子構造化学研究室 606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4015 075-753-4000 mizokami@kuchem.kyoto-u.ac.
三森 文行 みつもり ふみゆき	国立環境研究所 環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクト 305-0053 茨城県つくば市小野川16-2	0298-50-2862 0298-50-2880 mitumori@nies.go.jp
皆川 美由紀 みながわ みゆき	株式会社 科学技術研究所 分析化学部 NMR測定グループ 140-0001 東京都品川区北品川3-10-2	03-3474-6629 03-3474-6650 minagawa@ist.sankyo.co.jp
宮内 康次 みやうち こうじ	株式会社UBE科学分析センター 有機材料分析研究室 290-0045 千葉県市原市五井南海岸8番の1	0436-23-5997 0436-23-5449 29687u@ube-ind.co.jp
宮沢 真由美 みやざわ まゆみ	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	03-5841-4812 03-5841-4811 mayutti12@hotmail.com
宮ノ入 洋平 みやのいり ようへい	横浜国立大学 大学院環境情報学府 上杉・片平研究室 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-7	045-339-4271 045-339-4264 d02ta011@ynu.ac.jp
宮本 和英 みやもと かずひで	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9340 内8136 045-503-9201 miyamoto@gsc.riken.go.jp
三好 利一 みよし としかず	産業総合技術研究所 高分子基盤技術センター 高次構造制御チーム 305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5	0298-61-9392 0298-61-6243 t-miyoshi@aist.go.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
三由 洋 みよし ひろし	産業技術総合研究所 関西センター 生活環境系特別研究体 563-8577 大阪府池田市緑ヶ丘1丁目8番31号	0727-51-9648 0727-51-9627 miyoshi-hiroshi@aist.go.jp
武藤 勝紀 むとう かつのり	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 0776-34-4740 t370618@icpc00.icpc.fukui-u.ac
村上 健次 むらかみ けんじ	東京大学 理学部物理学科桑島研究室 113-0033 文京区本郷7-3-1	090-1795-2423 FAX無 murakami@nasu.bio.teikyo-u.a
村上 美和 むらかみ みわ	京都大学 化学研究所 材料物性基礎3 堀井研究室 611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 0774-38-3148 t60x1381@ip.media.kyoto-u.ac.j
村田 勝義 むらた かつよし	東京工業大学 院理工物質科学専攻安藤勲研究室 152-8552 東京都目黒区大岡山2-1-2-1	03-5734-2880 03-5734-2889 kmurata@polymer.titech.ac.jp
森 貴志 もり たかし	福井大学 工学部生物応用化学科物理化学研究室 910-8507 福井県福井市文京3-9-1	0776-27-8635 0776-27-8747 takashi@acbio.fukui-u.ac.jp
森島 績 もりしま いさお	京都大学大学院 工学研究科分子工学専攻 606-8501 京都市左京区吉田本町	075-753-5921 075-751-7611 morisima@mds.moleng.kyoto-u
森山 祥彦 もりやま よしひこ	京都府立医科大学 化学教室 603-8334 京都市北区大將軍西鷹司町13	075-465-7659 075-465-7651 moriyama@koto.kpu-m.ac.jp
八木 宏昌 やぎ ひろまさ	大阪大学 蛋白質研究所 565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2	06-6871-8598 06-6871-8599 hyagi@protein.osaka-u.ac.jp
山口 徹 やまぐち とおる	塩野義製薬株式会社 創薬研究所 553-0002 大阪市福島区鷺洲5-12-4	06-6458-5861 内5273 06-6458-0987 tohru.yamaguchi@shionogi.co.jp
山下 伸一郎 やました しんいちろ	福井大学 工学部生物応用化学科 910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8487 FAX無 shin@acbio2.acbio.fukui-u.ac.jp
山根 祐治 やまね ゆうじ	東京工業大学大学院 理工学研究科物質科学専攻 152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2880 03-5734-2889 yyamane@polymer.titech.ac.jp
山延 健 やまのべ たけし	群馬大学 工学部材料工学科 376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	0277-30-1331 0277-30-1333 yamanobe@eng.gunma-u.ac.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
山本 泰彦 やまもと やすひこ	筑波大学 化学系 305-8571 つくば市天王台1-1-1	0298-53-6521 0298-53-6521 yamamoto@staff.chem.tsukuba.
湯本 史明 ゆもと ふみあき	東京大学 農学生命科学研究科応用生命化学専攻田之倉研究室 113-8657 東京都文京区弥生1-1-1 東大農学部2号館別館263室	03-5841-5166 03-5841-8023 aa07045@mail.ecc.u-tokyo.ac.j
横井 貴子 よこい たかこ	山之内製薬(株) 分析研究室 305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21	0298-63-6487 0298-52-9585 yokoit@yamanouchi.co.jp
横田 達夫 よこた たつお	神戸大学大学院 自然科学研究科応用化学専攻第五講座 657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1	078-803-6187 FAX無 yokota@fmc.cx.kobe-u.ac.jp
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 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7-22	045-507-2515 045-507-2509 yokoyama@biochem.s.u-tokyo.
横山 貴男 よこやま たかお	東京理科大学 理工学部応用生物科学科菅原研究室 278-8510 千葉県野田市山崎2641	0471-24-1501 内3420 0471-23-9767 j6499113@ed.noda.tus.ac.jp
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 03-3707-6950 yoshioka@nihns.go.jp
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 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9229 045-503-9228 myoshida@gsc.riken.go.jp
吉田 充 よしだ みつる	独立行政法人食品総合研究所 分析科学部状態分析研究室 305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12	0298-38-8033 0298-38-8033 mitsuru@affrc.go.jp
吉益 雅俊 よします まさとし	理化学研究所 生体超分子構造機能研究協カグループ 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7224 045-508-7364 yosimasu@louis.riken.go.jp
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 466-8555 名古屋市昭和区御器所町	052-735-5272 052-735-5272 yosimizu@mse.nitech.ac.jp
李 華 り か	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	045-503-9317 045-503-9201 lihua@gsc.riken.go.jp
和田 武 わだ たけし	ブルカー・バイオスピン株式会社 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 内448 0298-58-0322 wad@bruker.co.jp

参加者名簿 名前	所属 〒 住所	Tel FAX E-mail
渡部 徳子 わたなべ とくこ	東京水産大学 水産学部食品生産学科 108-8477 東京都港区港南4-5-7	03-5463-0643 03-5463-0643 tokuko@tokyo-u-fish.ac.jp
渡邊 永治 わたなべ えいじ	順天堂大学 医学部化学研究室 270-1695 千葉県印旛郡印旛村平賀学園台1-1	0476-98-1001 内392 0476-98-1036 eiji-jun@umin.ac.jp
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リミテッド NMR応用部 108-0023 東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル	03-5232-1238 03-5232-1264 katsuhiko.kushida@varianinc.co

日本核磁気共鳴学会理事

会長

荒田 洋治

〒230-0046 神奈川県横浜市鶴見区小野町 61-1 NKP 小野町ビル1F
理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター
(Tel) 045-507-2510 (FAX) 045-507-2512 arata@postman.riken.go.jp

副会長

甲斐荘 正恒

〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1
東京都立大学 大学院理学研究科有機構造生物学研究室
(Tel) 0426-77-2544 (FAX) 0426-77-2544 kainosho@nmr.chem.metro-u.ac.jp

阿久津 秀雄

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2
大阪大学蛋白質研究所 物性部門
(Tel) 06-6879-8597 (FAX) 06-6879-8599 akutsu@protein.osaka-u.ac.jp

朝倉 哲郎

〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16
東京農工大学 工学部生命工学科
(Tel) 042-388-7025 (FAX) 042-383-7733 asakura@cc.tuat.ac.jp

安藤 勲

〒152-5882 東京都目黒区大岡山 2-12-1
東京工業大学 工学部物質科学専攻
(Tel) 03-5734-2139 (FAX) 03-5734-2889 iando@polymer.titech.ac.jp

京極 好正

〒135-0064 東京都江東区青海 2-41-6
産業技術総合研究所 生物情報解析センター
(Tel) 03-3599-8106 (FAX) 03-5530-2064 ykyogoku@birc.aist.go.jp

斉藤 肇

〒678-1297 兵庫県姫路市船橋町 5-1-4 204
姫路工業大学 大学院理学研究科生命科学専攻
(Tel) 0791-58-0181 (FAX) 0791-58-0182 saito@sci.himeji-tech.ac.jp

嶋田 一夫

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
東京大学 大学院薬学系研究科
(Tel) 03-5841-4810 (FAX) 03-3815-6540 shimada@iw-nmr.f.u-tokyou.ac.jp

堤 耀廣

〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目
北海道大学大学院 工学研究科量子物理工学専攻物質物理工学講座
(Tel) 011-706-6639 (FAX) 011-716-6175 atsutsu@eng.hokudai.ac.jp

寺尾 武彦

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町
京都大学 大学院理学研究科 化学教室 分子構造化学研究室
(Tel) 075-753-4011 (FAX) 075-753-4000 terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp

日本核磁気共鳴学会評議員

赤坂 一之

〒649-6493 和歌山県那賀郡打田町西三谷 930
近畿大学 生物理工学部・生物工学科
(Tel) 0736-77-0345(4110) (FAX) 0736-77-4754 akasaka8@spring8.or.jp

池田 龍一

〒305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1
筑波大学 化学系
(Tel) 0298-53-4250 (FAX) 0298-53-4250 ikeda@chem.tsukuba.ac.jp

稲垣 冬彦

〒060-0812 北海道札幌市北区北12条西6丁目
北海道大学 薬学部
(Tel) 011-706-3976 (FAX) 011-706-4979 finagaki@pharm.hokudai.ac.jp

鵜澤 洵

〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
理化学研究所 植物科学研究センター 生長制御物質研究チーム
(Tel) 048-467-4174 (FAX) 048-467-4324 juzawa@postman.riken.go.jp

梅本 公子

〒181-8585 東京都三鷹市大沢 3-10-2
国際基督教大学 理学科化学教室
(Tel) 0422-33-3256 (FAX) 0422-33-1449 umemoto@icu.ac.jp

亀井 裕孟

〒160-0015 東京都新宿区文京町 12
濱野生命科学研究所 小川脳機能研究所
(Tel) 03-5919-3991 (FAX) 03-5919-3993 kamei@medess.m.u-tokyo.ac.jp

河野 敬一

〒930-0194 富山県富山市杉谷 2630
富山医科薬科大学 薬学部薬科学科
(Tel) 076-434-5061 (FAX) 076-434-5061 kawano@ms.toyama-mpu.ac.jp

黒田 義弘

〒606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町 46-29
京都大学大学院薬学研究科 製剤機能解析学分野
(Tel) 075-753-4530 (FAX) 075-753-4578 yokuroda@pharm.kyoto-u.ac.jp

巨瀬 勝美

〒305-8573 茨城県つくば市天王台 1-1-1
筑波大学 物理工学科
(Tel) 0298-53-5335 (FAX) 0298-53-5335 kose@bk.tsukuba.ac.jp

小林 祐次

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6
大阪大学大学院 薬学研究科
(Tel) 06-6879-8220 (FAX) 06-6879-8224 yujik@protein.osaka-u.ac.jp

白川 昌宏

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番29
横浜市立大学 総合理学研究科
(Tel) 045-508-7213 (FAX) 045-5028-7361 shira@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

神藤 平三郎

〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1
東京薬科大学 薬学部
(Tel) 0426-76-4537 (FAX) 0426-76-4537 shindo@ps.toyaku.ac.jp

瀬尾 芳輝

〒602-0841 京都府京都市上京区河原町広小路梶井町465
京都府立医科大学 第一生理学
(Tel) 075-251-5311 (FAX) 075-251-0295 yseo@basic.kpu-m.ac.jp

田之倉 優

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1
東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻
(Tel) 03-5841-5165 (FAX) 03-5841-8023 amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

内藤 晶

〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5
横浜国立大学 大学院工学研究院
(Tel) 045-339-4232 (FAX) 045-339-4251 naito@ynu.ac.jp

西村 善文

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-26
横浜市立大学 大学院総合理学研究科
(Tel) 045-508-7216 (FAX) 045-508-7362 nisimura@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

福井 洋之

〒090-8507 北海道北見市公園町165
北見工業大学 工学部化学システム工学科
(Tel) 0157-26-9402 (FAX) 0157-24-7719 fukui@gaea.chem.kitami-it.ac.jp

藤原 英明

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-7
大阪大学 医学部医用工学講座
(Tel) 06-6879-2573 (FAX) 06-6879-2573 fujiwara@sahs.med.osaka-u.ac.jp

降旗 一夫

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1
東京大学 大学院農学応用生命科学研究科 応用生命化学専攻
(Tel) 03-5841-5460 (FAX) 03-5841-8485 furihata@iam.u-tokyo.ac.jp

堀井 文敬

〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄
京都大学 化学研究所材料物性基礎3
(Tel) 0774-38-3150 (FAX) 0774-38-3148 horii@scl.kyoto-u.ac.jp

三森 文行

〒305-0053 茨城県つくば市小野川16-2
国立環境研究所 環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクト生体機能評価研究チーム
(Tel) 0298-50-2862 (FAX) 0298-50-2880 mitumori@nies.go.jp

森島 績

〒606-8501 京都府京都市左京区吉田本町
京都大学大学院 工学研究科分子工学専攻
(Tel) 075-753-5921 (FAX) 075-751-7611 morisima@mds.moleng.kyoto-u.ac.jp

山本 泰彦

〒305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1
筑波大学 化学系
(Tel) 0298-53-6521 (FAX) 0298-53-6521 yamamoto@staff.chem.tsukuba.ac.jp

横山 茂之

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
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
(Tel) 045-507-2515 (FAX) 045-507-2509 yokoyama@biochem.s.u-tokyo.ac.jp

渡部 徳子

〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7
東京水産大学 水産学部食品生産学科
(Tel) 03-5463-0643 (FAX) 03-5463-0643 tokuko@tokyo-u-fish.ac.jp