

第 43 回 N M R 討 論 会

講 演 要 旨 集

会 期 2004 年 11 月 10 日(水)～11 月 12 日(金)

会 場 こまばエミナース

主 催

日本核磁気共鳴学会

共 催

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・日本蛋白質科学会
高分子学会・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

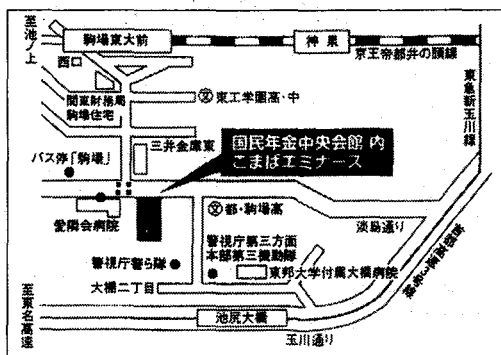
第 43 回 NMR 討論会 会場案内

こまばエミナース

(東京都目黒区大橋 2-19-5)

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

■ 会場案内



■ 交通

京王井の頭線駒場東大前駅 (西口) より徒歩 5 分
東急新玉川線池尻大橋駅 (北口) より徒歩 12 分
渋谷駅 (南口) よりタクシー 5 分

■ 連絡先

東京都立大学大学院理学研究科
〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1
甲斐荘 正恒
TEL/FAX 0426-77-2544
E-mail : nmr43@nmr.chem.metro-u.ac.jp

第 43 回 NMR 討論会 ホームページ
<http://www.ps.toyaku.ac.jp/~nmr43kai/>

<当日連絡先> 03-3485-1416 (ホール直通)

第 43 回 NMR 討論会

会期 11月10日(水)~12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10日(水)

(9:30-9:40)

開会の挨拶

(9:40-10:20)

座長 河野 敬一

- 1L1 イネ赤色光受容体フィトクロム A の PAS1 ドメインの溶液構造 2
○山崎俊正¹、Reay Paul¹、鈴木倫太郎¹、酒井伸也¹、加藤悦子¹、高野 誠¹ (生物研¹)
- 1L2 糖タンパク質の細胞内運命を決定する糖鎖認識タンパク質の NMR 構造生物学 4
○加藤晃一^{1,2,3} (名市大院薬¹、CREST/JST²、グライエンス³)

(10:20-11:00)

座長 片平 正人

- 1L3 NMRによるシトクロム c の構造と機能の相関関係の解明 6
太 虎林¹、高山真一¹、三上真一¹、木村英昭¹、三田 肇¹、長友重紀¹、長谷川淳²、三本木至宏³、
○山本泰彦¹ (筑波大院数物¹、第一製薬²、広島大院生圏³)
- 1L4 SAIL 法による高分子量タンパク質の NMR 解析に向けた取り組みの現状 8
○鳥澤拓也¹、寺内 勉¹、岩下由紀²、杉森 望²、小野 明¹、土屋征司¹、田井真由理¹、Peter Güntert³、
甲斐荘正恒^{1,2} (JST/CREST¹、都立大院理²、理研 GSC³)

—休息—

(11:15-11:55)

座長 藤原 英明

- 1L5 安定同位体標識核酸を利用した hnRNPD タンパク質-テロメア DNA 及び Tat タンパク質-RNA アプ
タマーの構造解析 10
榎園能章¹、小西由紀¹、丸本佳代子¹、大橋 肅¹、松上明正¹、田村裕介¹、工藤倫子¹、徐みんず¹、
上杉晴一¹、石川冬木²、Penmetcha Kumar³、○片平正人¹ (横国大院環境情報¹、京大院理²、
産総研³)
- 1L6 NMR in disease diagnosis and treatment monitoring 12
○C. L. Khetrpal¹ (Sanjay Gandhi Post Graduate Institute of Medical Sciences, India¹)

(13:00-14:40)

ポスターセッション(説明義務ポスター番号: 1P)

(14:40-15:20)

座長 赤坂 一之

- 1L7 難溶性高分子量タンパク質に適用可能な NMR シグナル新規帰属法の開発 16
○河野俊之¹ (三菱化学生命科学研究所¹)

- 1L8 オンラインセル高圧NMR法による球状蛋白質の希な構造揺らぎの検出—HPr *Staphylococcus carnosus* チロシン環フリップ運動の圧力・温度依存測定— 18
 ○服部峰之¹、李華¹、山田博昭²、赤坂一之^{1,3}、W. Hengstenberg⁴、W. Gronwald⁵、H. R. Kalbitzer⁵
 (神戸大院自然¹、神戸大理²、近大生物理工³、Ruhr大Bochum校生物⁴、Regensburg大生化⁵)

(15:20-16:00)

座長 内藤 晶

- 1L9 配向依存的な TROSY シフト変化に基づく分子配向解析法 20
 森内 寛¹、横山貴男¹、笠井信幸¹、○楯 真一¹ (生物分子工研¹)

- 1L10 パイセルに結合した膜作用性抗生物質のNMR構造解析 24
 ○諸岡 篤¹、松森信明¹、村田道雄¹ (阪大院理¹)

—休息—

(16:15-16:5)

座長 神田 大輔

- 1L11 In-Cell NMR を用いた細胞内蛋白質動態の直接解析法 26
 ○吉益雅俊^{1,4}、美川 務^{1,2,3,4}、片岡義朝^{1,2,3,4}、林 宣宏⁵、柴田武彦^{1,2,3,4}、伊藤 隆^{1,2,3,4} (理研・遺伝生化学¹、理研・生体超分子構造・機能研究 G²、横浜市大院・分子生理学³、CREST/JST⁴、藤田保衛大・総医研・医高分⁵)

- 1L12 DPGSE によって選択されたスピン系の SPT スペクトル 30
 ○鵜澤 洵¹、吉田茂男¹ (理研PSC¹)

(16:55-17:35)

座長 池上 貴久

- 1L13 Maximum entropy reconstruction to increase sensitivity and resolution 34
 ○榛葉信久^{1,2} (UCSF¹、味の素(株)²)

- 1L14 折返しピークの新規フィルタリング技術の開発 36
 ○児嶋長次郎¹ (奈良先端大バイオ¹)

第二日 11月11日(木)

Program of the International Session at the 43rd NMR Symposium

(November 11, 2004)

(9:30-10:05)

Chairperson: Fuyuhiko Inagaki

- 2L1 NMR structural biology of protein-nucleic acid recognition 42
 Masahiro Shirakawa (Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, Japan)

(10:05-10:40)

Chairperson: Peter Güntert

- 2L2 On the interpretation of residual dipolar couplings from flexible systems 43
 Arto Annala (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland)

Coffee break (10:40-10:55)

(10 : 55 - 11 : 25)

Chairperson: Yoshifumi Nishimura

- 2L3 NMR strategy for membrane protein-ligand interactions 44
Ichio Shimada (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan)

(11 : 25 - 12 : 00)

Chairperson: Shin-ichi Tate

- 2L4 Recent advances in protein NMR refinement 45
Nico Tjandra (NHLBI, National Institutes of Health, USA)

Lunch break (12 : 00 - 13 : 00)

Poster session (13 : 00 - 14 : 20) (Authors of poster number 2P)

(14 : 20 - 15 : 00)

Chairperson: Hideo Akutsu

- 2L5 Solid-state NMR personal reminiscences 46
Takehiko Terao (Graduate School of Science, Kyoto University, Japan)

(15 : 00 - 15 : 40)

Chairperson: Tetsuo Asakura

- 2L6 NMR spectroscopy in polymer science-my research profile at TIT 47
Isao Ando (Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Japan)

Special lectures by the nominees for the emeritus membership of NSJ

(15 : 40 - 16 : 30)

Chairperson: Masatsune Kainosho

- 2L7 Evolution of isotope-assisted protein NMR spectroscopy: 1968 to the present 50
John L. Markley (Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison, USA)

(16 : 30 - 17 : 20)

Chairperson: Yoji Arata

- 2L8 Brain function which NMR measures 51
Seiji Ogawa (Ogawa Brain Institute, Japan)

(17 : 20 - 17 : 50)

NMR学会総会

Welcome reception (18 : 00 - 20 : 00)

第三日 11月12日(金)

(9 : 30 - 10 : 10)

座長 神藤 平三郎

- 3L1 小麦胚芽抽出物を用いた無細胞合成系によるタンパク質構造機能相関の迅速解析法 54
○森田勇人¹、清水真人¹、小笠原富夫²、遠藤弥重太²、田中利好³、河野俊之³ (愛媛大総科研¹、愛媛大工²、三菱化学生命研³)

- 3L2 高等動植物の構造プロテオミクス 56
 ○木川隆則¹、武藤 裕¹、林 文昌¹、山崎和彦^{1,2}、廣田 洋¹、山崎俊夫¹、Peter Güentert¹、前田秀明¹、好田真由美¹、白水美香子¹、田仲昭子¹、林崎良英¹、篠崎一雄¹、小原 収^{3,4}、菅野純夫⁵、横山茂之^{1,6,7} (理研 GSC¹、産総研 ADRC²、かずさ DNA 研³、理研 RCAI⁴、東大医科研⁵、理研播磨⁶、東大院理⁷)

(10:10-10:50)

座長 三森 文行

- 3L3 7T/400mm 自己シールド型ゼロボイルオフ MRI の開発 58
 ○三木孝史¹、濱田 衛¹、大塚昭弘²、斎藤一功²、林 征治² (神戸製鋼¹、JASTEC²)

- 3L4 タイトジャンクション蛋白質遺伝子操作マウス脳組織の水透過性の研究 62
 ○瀬尾芳輝¹、岩本典子²、新田武弘²、古瀬幹夫²、月田承一郎² (獨協医大¹、京大院医²)

—休息—

(11:05-11:45)

座長 渡部 徳子

- 3L5 局所励起 CT COSY による人脳内の興奮性および抑制性の神経伝達物質の同時計測 66
 ○渡邊英宏¹、高屋展宏¹、三森文行¹ (国立環境研究所¹)

- 3L6 高偏極 Xe129 の脳組織ケミカルシフト 70
 ○中村和浩^{1,2}、若井篤志^{1,2}、Jeff Kershaw^{1,2}、近藤 靖²、David Wright^{1,2}、菅野 巖²
 (あきた産業振興機構¹、秋田県立脳血管研究センター²)

—昼食—

(13:00-14:40)

ポスターセッション (説明義務ポスター番号: 3P)

(14:40-15:20)

座長 堤 耀広

- 3L7 多核固体NMRを利用した電気2重層キャパシタの作用機構解明 74
 ○齋藤公児¹、金橋康二¹、島山盛明²、李 相益³、持田 勲³ (新日鐵 先端研¹、日鐵テクノリサーチ²、九大先導研³)

- 3L8 二次元二量子固体 NMR 法および量子化学計算による有機 EL 材料の非晶構造精密解析 78
 ○梶弘 典^{1,2}、塚本直樹¹、山田知典¹、堀井文敬¹ (京大化研¹、科学技術振興機構さきかけ²)

(15:20-16:00)

座長 堀井 文敬

- 3L9 固体NMRマイクロコイルプローブの開発と繊維状高分子の配向度解析 80
 ○山内一夫¹、今田悌三¹、朝倉哲郎¹ (東京農工大工¹)

- 3L10 NMR 法によるナノスケールの尿素チャンネル内のプローブ物質の拡散及び特異相互作用の評価 82
 ○金 善美¹、黒木重樹^{1,2}、安藤 勲^{1,2} (東工大院理工¹、高分子センター²)

(16:00-16:40)

座長 藤原 敏道

- 3L11 膜蛋白質構造解析のための (^{31}P , ^2H) ^{-1}H 多重接触交差分極による ^1H 消磁化を用いた ^{31}P , ^2H 近傍の固体高分解能 ^{13}C -NMR 84
○原田英里砂^{1,2}、戸所泰人¹、藤原敏道¹、甲斐荘正恒^{3,4}、阿久津秀雄¹(阪大蛋白研¹、JBIC²、都立大院理³、CREST/JST⁴)
- 3L12 Development of duty & amplitude averaged cross polarization: Extension of time averaged nutation 88
○西村勝之¹、内藤 晶¹(横浜国立大学¹)

～ポスターセッション演題～

(★印は“若手ポスター賞”に応募)

(説明義務ポスター番号 1P:1 日目; 2P:2 日目; 3P:3 日目)

【溶液 NMR における新しい測定法の開発】

- 1P001★ 新規 NMR シグナル帰属法の高分子量タンパク質への応用 94
○田中利好¹、小松千江子¹、小林邦子¹、北野実智子¹、田中剛史¹、河野俊之¹(三菱化学生命科学研¹)
- 2P002 タンパク質溶液 NMR 自動測定における測定条件全自動最適化 96
○朝倉克夫¹、栗本智充¹、高杉憲司¹、根本暢明¹(日本電子株式会社¹)
- 3P003 枯草菌由来細胞壁溶解酵素 CwlC の構造解析 98
○矢吹一人¹、三島正規¹、加藤健一¹、金田晃一²、志田敏夫²、関口順一²、児嶋長次郎¹(奈良先端大バイオ¹、信州大繊維²)
- 1P004★ Cu の常磁性緩和効果を用いた生体高分子の立体構造解析法の開発 102
○野村誠¹、小林俊達¹、河野俊之²、藤原健一朗³、天野剛士⁴、白川昌宏³、石崎逸子¹、山本一男⁵、松山俊正⁵、三島正規¹、児嶋長次郎¹(奈良先端大バイオ¹、三菱化学生命科学研²、横浜市立大総合理学³、愛媛大院理工⁴、長崎大医⁵)
- 2P005 DNA 結合蛋白質 NikA の構造解析 106
○吉田均¹、古屋伸久¹、Yi-Jan Lin²、駒野照弥¹、Peter Güntert³、甲斐荘正恒^{1,2}(都立大院理¹、CREST/JST²、理研 GSC³)
- 3P006 多次元 NMR における超高速化: マルチリニアサンプリングによる“折り返し再構成法” 108
○高杉憲司¹(日本電子(株)¹)
- 1P007★ 超偏極 Xe-129 を用いたカリックスアレーンの超分子化学特性に関する研究 110
○安達裕子¹、金子暁里¹、木村敦臣¹、藤原英明¹(阪大医保健¹)

【生体系 NMR I (蛋白質、ペプチド等)】

- 2P008 ヒトミトコンドリア ABC トランスポーター ABCB6 の NMR 解析 112
○倉島かおり^{1,2,3}、千本木裕⁴、柴田武彦^{1,2}、伊藤隆^{1,2,3}(理研遺伝生化学¹、横浜市大院総合理²、CREST/JST³、Mitochondrial Diseases G., MRC Dunn Human Nutrition Unit, UK⁴)
- 3P009 非天然構造をとるリゾチーム変異体における種々の溶媒中での重水素交換反応速度 114
○野田康夫¹、坂本恵子¹、山崎向太¹、岡本邦彦¹、木村雅也¹、瀬川新一¹(関西学院大理工¹)

1P010★	光合成細菌を利用したタンパク質標識法の開発 ○工藤正人 ¹ 、大友征宇 ¹ 、小菅哲 ¹ 、小林正幸 ¹ 、野澤庸則 ¹ (東北大院工 ¹)	118
2P011	新規デザインを利用した小型タンパク質立体構造安定化機構 ○荒木望嗣 ¹ 、田村厚夫 ¹ (神戸大院自然 ¹)	120
3P012	光捕集膜タンパク質の立体構造解析 ○大友征宇 ¹ 、後閑和孝 ¹ 、佐藤和志 ¹ 、小林正幸 ¹ 、野澤庸則 ¹ (東北大院工 ¹)	122
1P013★	NMRによる高度好熱菌 RecO の構造、機能解析 ○井上仁 ^{1,2,3} 、本多賢吉 ^{1,3,4} 、伊藤隆 ^{1,2,3,4} 、美川務 ^{1,2,3,4,5} 、柴田武彦 ^{1,2,3} (横浜市大院総合理学研究科分子生理学 ¹ 、理研生体超分子構造機能研究協力 ² 、理研遺伝生化学 ³ 、CREST/JST ⁴ 、理研播磨ストラクチュローム研究グループ ⁵)	124
2P014	スベルミジン-ATP 複合体の NMR 解析：弱い分子間相互作用解明への新しい試み ○丸吉京介 ¹ 、野中香織 ¹ 、相根岳志 ¹ 、出村哲夫 ¹ 、松森信明 ¹ 、大石徹 ¹ 、村田道雄 ¹ (阪大院理 ¹)	126
3P015	フジツボ接着タンパク質 Mrcp20k の構造解析 ○鈴木倫太郎 ¹ 、森陽一 ² 、紙野圭 ² 、山崎俊正 ¹ (生物研 ¹ 、海洋バイオ研 ²)	128
1P016★	NMR 法を用いた RecR と DNA 間の相互作用解析 ○本多賢吉 ^{1,3,4} 、吉益雅俊 ^{1,4} 、井上仁 ^{2,3} 、美川務 ^{1,2,4,5} 、伊藤隆 ^{1,2,4} 、柴田武彦 ^{1,2,3} (理研・遺伝生化学 ¹ 、理研・生体超分子構造・機能研究 G ² 、横浜市大院・分子生理学 ³ 、CREST/JST ⁴ 、理研播磨ストラクチュローム研究グループ ⁵)	130
2P017	ペプチド結合の歪みを引き起こす水和水と ¹⁵ N ケミカルシフトの相関 ○千葉かおり ^{1,2} 、堤遊 ^{1,3} 、油谷克英 ⁴ 、中西洋志 ¹ (産総研生物情報 ¹ 、原研中性子 ² 、東理大 ³ 、理研播磨 ⁴)	132
3P018	TraR-DNA 結合ドメインの TREbox 認識機構の解析 ○田中剛史 ¹ 、小松千江子 ¹ 、小林邦子 ¹ 、須貝真理子 ¹ 、片岡正和 ² 、河野俊之 ¹ (三菱化学生命科学研 ¹ 、信州大学工学部 ²)	134
1P019★	Super high expression with <i>Corynebacterium glutamicum</i> for NMR sample preparation ○品川麻衣 ¹ 、榛葉信久 ¹ 、水越利巳 ¹ 、菊池慶実 ¹ 、鈴木榮一郎 ¹ (味の素株式会社 ¹)	136
2P020	SUMO リガーゼ Pias1 の N 末端ドメインの構造と相互作用 大久保征治 ¹ 、原太志 ² 、土田有紀 ¹ 、○田代櫻子 ¹ 、鈴木咲良 ³ 、畠中秀樹 ³ 、横山茂之 ^{3,4,5} 、田中弘文 ² 、神藤平三郎 ¹ (東京薬大薬 ¹ 、東京薬大生 ² 、理研 GSC ³ 、理研播磨 ⁴ 、東大理 ⁵)	138
3P021	ヒトおよび酵母リンカーヒストンの球状ドメインの構造と DNA との相互作用 小野克輝 ¹ 、田代櫻子 ² 、清水光弘 ³ 、山崎俊正 ⁴ 、○神藤平三郎 ² (産総研・BIRC ¹ 、東京薬大薬 ² 、明星大・理工 ³ 、農業生物資源研 ⁴)	140
1P022★	固体 NMR による自発磁場配向膜中ポロリチン II の動的構造解析 ○虎谷秀一 ¹ 、西村勝之 ¹ 、内藤晶 ¹ (横浜国立大院・工 ¹)	142
2P023	疑似膜中におけるアミロイドペプチドの構造変化とダイナミクスに関する研究 ○中澤靖元 ¹ 、鈴木悠 ² 、宮内真悟 ² 、Michael Williamson ³ 、朝倉哲郎 ² 、安藤勲 ¹ (東工大院理工 ¹ 、農工大工 ² 、The University of Sheffield ³)	144
3P024	高度好熱菌由来リボソーム蛋白質 L16 の溶液構造解析 ○西村光広 ¹ 、吉田卓也 ¹ 、白水美香子 ^{2,3} 、寺田貴帆 ^{2,3} 、倉光成紀 ³ 、横山茂之 ^{2,3} 、大久保忠恭 ¹ 、小林祐次 ¹ 、(阪大院薬 ¹ 、理研 GSC ² 、理研播磨 ³ 、理研情報伝達 ⁴)	146
1P025★	区分標識と残余双極子相互作用を利用したドメインオリエンテーションの決定 ○辻本拓哉 ¹ 、八木宏昌 ¹ 、山崎俊夫 ² 、吉田賢右 ³ 、阿久津秀雄 ¹ (阪大・蛋白研 ¹ 、理研・GSC ² 、東工大・資源研 ³)	148

2P026	クモ糸モデルペプチドおよび遺伝子組み換え法により作製したクモ糸類似タンパク質の固体 NMR 構造 ○大郷耕輔 ¹ 、川瀬泰司 ¹ 、楊明英 ¹ 、川村純司 ¹ 、朝倉哲郎 ¹ (農工大・工 ¹)	150
3P027	神経選択的サイレンサー結合因子 NRSF/REST と mSin3B の相互作用解析 ○野村充 ¹ 、宇田広子 ² 、村井清人 ³ 、森望 ³ 、西村善文 ¹ (横浜市大・院総理 ¹ 、理研 GSC ² 、長寿研・分子遺伝学 ³)	152
1P028★	固体 NMR によるエラスチンモデルペプチド(VPGVG) ₆ の精密構造解析 ○大郷耕輔 ¹ 、芦田淳 ² 、朝倉哲郎 ¹ (農工大・工 ¹ 、バリアンテクノロジーズジャパン ²)	154
2P029	タンパク質微結晶を用いた固体 NMR によるタンパク質：DNA 相互作用の研究 ○畑中稔 ¹ 、本多賢吉 ^{2,3} 、石部聡子 ³ 、美川務 ^{2,3} 、伊藤隆 ^{2,3} 、柴田武彦 ^{2,3} 、山崎俊夫 ¹ (理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター ¹ 、横浜市立大院・総合理 ² 、理化学研究所・生体超分子構造機能研究グループ ³)	156
3P030	p47phox タンデム SH3 ドメインと p22phox 由来ペプチド複合体の NMR による溶液中での立体構造 ○小椋賢治 ¹ 、鳥飼真之介 ¹ 、湯澤聰 ¹ 、才川和也 ¹ 、住本英樹 ² 、稲垣冬彦 ¹ (北大院薬 ¹ 、九大生医研 ²)	158
1P031★	フッ素化ヘムを導入したヘムタンパク質の ¹⁹ F NMR 緩和の解析 ○長尾聡 ¹ 、平井佑紀 ¹ 、木村英昭 ¹ 、三田肇 ¹ 、長友重紀 ¹ 、山本泰彦 ¹ 、鈴木秋弘 ² (筑波大学院・数理物質科学 ¹ 、長岡工業高専 ²)	162
2P032	サソリ毒ペプチド IsTX の立体構造解析 ○山路奈保子 ¹ 、Li Dai ¹ 、菅瀬謙治 ¹ 、Marta Andriantsiferana ² 、中嶋暉躬 ¹ 、岩下孝 ¹ (サントリー生有研 ¹ 、Univ. of Antananarivo ²)	164
3P033	微小管に結合する新規ドメインの NMR による解析 ○廣明秀一 ¹ 、岩谷奈央子 ¹ 、合田名都子 ¹ 、白川昌宏 ¹ (横浜市大院・総合理 ¹)	166
1P034★	UBA ドメイン類の構造解析と構造-機能相関研究 ○樋口雄一郎 ¹ 、阿部孝政 ² 、大貫裕之 ² 、濱田季之 ^{1,2} 、片山由貴子 ² 、趙晨華 ² 、鎌足雄司 ² 、林文晶 ² 、斉藤講平 ² 、富澤 忠 ² 、小柴生造 ² 、木川隆則 ² 、泉顕也 ² 、好田真由美 ² 、白水美香子 ² 、寺田貴帆 ² 、井上真 ² 、矢吹孝 ² 、青木雅昭 ² 、関英子 ² 、松田真意 ² 、関原明 ² 、柴崎一雄 ² 、横山茂之 ^{2,3,4} 、広田洋 ^{1,2} (横市大院総理 ¹ 、理研 GSC ² 、東大院理 ³ 、理研播磨 ⁴)	168
2P035	ウシβラクトグロブリンの中性条件下における NMR 測定 ○櫻井一正 ¹ 、亀田篤司 ¹ 、星野大 ¹ 、後藤祐児 ¹ (阪大蛋白研 ¹)	170
3P036	フィブリン遺伝子転写制御タンパク質におけるタンデムリピートの立体構造解析 ○八巻健 ¹ 、川口恭輔 ¹ 、相沢智康 ¹ 、熊木康裕 ¹ 、滝谷重治 ² 、出村誠 ¹ 、新田勝利 ¹ (北大院理 ¹ 、北大先端研 ²)	172
1P037★	ヒト脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) の立体構造と相互作用 ○立石幸寛 ¹ 、枋尾豪人 ¹ 、白川昌宏 ¹ (横浜市大・院総理 ¹)	174
2P038	線虫由来抗菌ペプチド ASABF 変異体の抗菌活性と立体構造解析 ○中野学 ¹ 、相沢智康 ¹ 、三浦和紀 ² 、星野宏和 ¹ 、宮澤光博 ³ 、加藤祐輔 ³ 、熊木康裕 ¹ 、出村誠 ¹ 、津田栄 ² 、河野敬一 ¹ 、新田勝利 ¹ (北大院理 ¹ 、産業技術総合研 ² 、農業生物資源研 ³)	176
3P039	ヒト構造プロテオミクス：MAST205 タンパク質の N 末端ドメインと相同性の高いヒト MAST3 タンパク質ドメインの構造解析 ○枋尾尚哉 ¹ 、小柴生造 ¹ 、井上真 ¹ 、好田真由美 ¹ 、廣田洋 ¹ 、白水美香子 ¹ 、寺田貴帆 ¹ 、青木雅昭 ¹ 、梶康子 ¹ 、関英子 ¹ 、藤倉由紀子 ¹ 、矢吹孝 ¹ 、田仲昭子 ¹ 、木川隆則 ¹ 、小原収 ⁴ 、横山茂之 ^{1,2,3} (理研 GSC ¹ 、理研播磨 ² 、東大院・理 ³ 、かずさ DNA 研究所・ヒト遺伝子研究部 ⁴)	178

1P040★	TFIIIEβの Mediator 複合体結合ドメインの動的構造解析 ○笠井信幸 ¹ 、大木出 ¹ 、櫻井博 ² 、楯真一 ¹ (生物分子工研 ¹ 、金沢大医 ³)	180
2P041	イネ赤色光受容体 phytochromeB 核内移行シグナルドメインの溶液構造解析 ○小林俊達 ¹ 、田畑亮 ¹ 、三島正規 ¹ 、赤木香予 ² 、酒井伸也 ² 、加藤悦子 ² 、高野誠 ² 、山崎俊正 ² 、児嶋長次郎 ¹ (奈良先端大バイオ ¹ 、農業生物資源研 ²)	182
3P042	ウシラクトフェリンとリン脂質二重膜との特異的相互作用解析 ○梅山万左子 ¹ 、西村勝之 ¹ 、内藤晶 ¹ (横国大院工 ¹)	184
1P043★	ペルオキシソーム膜形成因子 Pex19p の NMR 解析 ○笹川拓明 ¹ 、山口芳樹 ¹ 、柴田洋之 ² 、加藤博章 ^{2,3} 、加藤晃一 ¹ (名市大院薬 ¹ 、理研播磨 ² 、京大院薬 ³)	186
2P044	マウス構造プロテオミクス：SNARE タンパク質 Vti1a N 末端ドメインの構造と機能 ○阿部孝政 ¹ 、廣田洋 ¹ 、安室憲一 ¹ 、富澤忠 ¹ 、小柴生造 ¹ 、寺田貴帆 ¹ 、白水美香子 ¹ 、井上真 ¹ 、矢吹孝 ¹ 、青木雅昭 ¹ 、松田貴意 ¹ 、関英子 ¹ 、木川隆則 ¹ 、好田真由美 ¹ 、田仲昭子 ¹ 、松尾洋 ¹ 、荒川貴博 ¹ 、P.Carninci ¹ 、河合純 ¹ 、林崎良英 ¹ 、P. Güntert ¹ 、横山茂之 ^{1,2,3} (理研・GSC ¹ 、東大・院理 ² 、理研・播磨 ³)	188
3P045	¹ H NMR による鯨類骨格筋のミオグロビンにおけるヘムの配向の構造解析 ○八巻武 ¹ 、阿部千景 ¹ 、岩波健太郎 ² 、藤瀬良弘 ³ 、山田格 ⁴ 、三田肇 ¹ 、山田格 ⁴ 、鈴木知彦 ² 、山本泰彦 ¹ 、(筑波大院数物 ¹ 、高知大理 ² 、日本鯨類研究所 ³ 、国立科学博物館 ⁴)	190
1P046★	p67 ^{phox} の TPR ドメインを対象とした効率的なグローバルフォールド決定に向けての検討 ○吉田慎一 ¹ 、小椋賢治 ¹ 、稲垣冬彦 ^{1,2} (北大院薬 ¹ 、タンパク 3000 ²)	192
2P047	Photo-CIDNP 法による MAP-LC3 蛋白質の解析 ○河野隆英 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 (富山医薬大薬 ¹ 、順天堂大医 ²)	194
3P048	高圧 NMR 法による蛋白質の構造・ダイナミクス解析：ユビキチン 30-3000 気圧 ○赤坂一之 ^{1,5} 、北原亮 ¹ 、横山茂之 ^{1,2,3,4} (理研横山構造分子生物学 ¹ 、理研ストラクチュローム・HTP ² 、理研 GSC ³ 、東大理 ⁴ 、近大生物理工 ⁵)	196
1P049	テロメア DNA 結合タンパク質 TRF2、TRF1 の DNA との複合体の構造及び DNA 結合活性の評価 ○花岡慎悟 ^{1,2} 、長土居有隆 ¹ 、西村善文 ¹ (横浜市立大 ¹ 、木原財団 ²)	198
2P050	高等動植物構造プロテオミクス：zf-ANI ドメインの網羅的構造解析 ○富澤忠 ¹ 、小柴生造 ¹ 、井上真 ¹ 、斉藤謙平 ¹ 、泉頭也 ¹ 、根本暢明 ² 、朝倉克夫 ² 、高杉憲司 ² 、木吉司 ² 、好田真由美 ¹ 、廣田洋 ¹ 、白水美香子 ¹ 、寺田貴帆 ¹ 、青木雅昭 ¹ 、鞆康子 ¹ 、関英子 ¹ 、藤倉由紀子 ¹ 、矢吹孝 ¹ 、田仲昭子 ¹ 、林崎良英 ¹ 、関原明 ¹ 、篠崎一雄 ¹ 、木川隆則 ¹ 、横山茂之 ^{1,4,5} (理研 GSC ¹ 、日本電子株式会社 ² 、物材機構 ³ 、理研・播磨 ⁴ 、東大院・理 ⁵)	200
3P051	シロイヌナズナ構造プロテオミクス：SWIB ドメインの立体構造解析 ○米山操 ¹ 、行木信一 ¹ 、栃尾尚哉 ¹ 、小柴生造 ¹ 、井上真 ¹ 、好田真由美 ¹ 、廣田洋 ¹ 、白水美香子 ¹ 、寺田貴帆 ¹ 、青木雅昭 ¹ 、鞆康子 ¹ 、関英子 ¹ 、藤倉由紀子 ¹ 、矢吹孝 ¹ 、田仲昭子 ¹ 、関原明 ¹ 、篠崎一雄 ¹ 、木川隆則 ¹ 、横山茂之 ^{1,2,3} (理研 GSC ¹ 、理研播磨 ² 、東大院・理 ³)	202
1P052	スピララベルを用いた膜環境下のペプチドの配向決定 ○細田和男 ¹ 、野口真路 ¹ 、稲岡斉彦 ¹ 、河野俊之 ² 、若松馨 ¹ (群大工 ¹ 、三菱化学生命研 ²)	204
2P053	NDSB の添加による蛋白質の溶液 NMR スペクトルの向上 ○石井毅 ¹ 、小暮広行 ¹ 、飯塚靖子 ¹ 、河野俊之 ² 、窪田健二 ¹ 、若松馨 ¹ (群馬大・工 ¹ 、三菱化学生命研 ²)	206
3P054	イネ由来 NifU 類似タンパク質の立体構造解析 ○久米田博之 ¹ 、小椋賢治 ¹ 、朝山宗彦 ² 、加藤静恵 ³ 、加藤悦子 ³ 、稲垣冬彦 ¹ (北大院薬 ¹ 、茨城大農 ² 、農生資源研 ³)	208

1P055 ホヤ由来バナジウム結合タンパク質 Vanabin2 の構造とバナジウムとの相互作用 に関する研究 210
 ○濱田季之^{1,2}、浅沼三和子¹、植木龍也³、林文晶¹、小林直宏¹、横山茂之¹、道端齊³、廣田洋^{1,2}
 (理研 GSC¹、横浜市大院総理²、広島大院理³)

2P056 ミトコンドリア・プレ配列受容体 Tom20-ALDH プレ配列複合体の結晶構造と緩解析 212
 ○帯田孝之¹、井倉真由美¹、尾瀬農之¹、前仲勝実¹、遠藤斗志也²、神田大輔¹ (九大生医研¹、
 名大院理²)

【生体系 NMR II (核酸,核酸複合体,脂質,多糖等)】

3P057 NMR 法による RNA の立体構造解析における残余双極子相互作用の効果 214
 ○坂本泰一¹、染谷龍彦¹、馬場清喜¹、野口聡子¹、清宮恭子¹、木村友美¹、富士原和也¹、河合剛太¹
 (千葉工業大学工¹)

1P058★ テロメアタンパク質 TRF2 による G-4 重らせん構造への特異的相互作用 216
 ○平尾優佳¹、西川忠輝²、花岡慎悟²、岡村英保²、岩崎了教¹、明石知子¹、佐藤衛¹、西村善文¹ (横
 浜市大・院総理¹、木原財団²)

2P059 酵母ミトコンドリア DNA 組換え蛋白質 Mhr1 に結合した単鎖オリゴ DNA の立体構造解析 218
 ○増田ときは^{1,2}、美川務^{1,2,3,4}、吉益雅俊^{3,4}、凌楓³、柴田武彦^{1,2,3}、伊藤隆^{1,2,3,4} (横浜市大院・総合理¹、
 理研・生体超分子構造・機能研究 G²、理研・遺伝生化学³、CREST/JST⁴)

3P060 DNA 中の Watson-Crick 塩基対における水素結合の安定同位体 NMR 法による研究 220
 ○石川麗¹、川原俊一³、児嶋長次郎⁴、小野晶¹、甲斐荘正恒^{1,2} (都立大院理¹、CREST²、産業技術総
 合研³、奈良先端大学院大学⁴)

1P061 MBD1-MBD とメチル化 DNA における相互作用の動的解析 222
 ○猪股晃介¹、大木出²、下竹敦哉³、藤原健一郎¹、枋尾豪人¹、白川昌宏¹ (横浜市大院・総合理¹、生
 物分子工学研² 奈良先端大・バイオサイエンス³)

2P062 2次元固体¹³C NMR によるクロロゾーム中バクテリオクロロフィル c 会合体の構造解析 224
 ○江川文子¹、秋庭健吾¹、溝口正²、原一公³、柿谷吉則³、小山泰³、藤原敏道¹、阿久津秀雄¹ (阪大
 蛋白研¹、立命館大理工²、関西学院大理工³)

【ゲノム科学への NMR の応用】

3P063 Solution structure of a murine hypothetical protein from RIKEN cDNA 2310057J16 228
 ○長島敏雄¹、林文晶¹、白水美香子¹、寺田貴帆¹、木川隆則¹、井上真¹、矢吹孝¹、青木雅昭¹、松田
 貴意¹、関英子¹、廣田洋¹、好田真由美¹、田仲昭子¹、林崎良英¹、理研遺伝子構造・機能研究グルー
 プ Phase I & II チーム¹、横山茂之^{1,2,3} (RIKEN GSC¹、RIKEN 播磨²、東大院理³)

1P064 マウス構造プロテオミクス：構造解析ハイスループット化の実際-MSP ドメイン、DUF232 を例にして 230
 遠藤弘¹、八田玲子¹、○林文晶¹、好田真由美¹、白水美香子¹、寺田貴帆¹、木川隆則¹、井上真¹、
 矢吹孝¹、青木雅昭¹、関英子¹、松田貴意¹、廣田洋¹、田仲昭子¹、林崎良英^{1,2,3}、横山茂之^{1,2,3} (RIKEN
 GSC¹、RIKEN 播磨²、東大院理³)

2P065 Solution structure of a beta-grasp fold like domain At3g63000 from Arabidopsis thaliana 232
 ○秦旭榮¹、林文晶¹、白水美香子¹、寺田貴帆¹、木川隆則¹、井上真¹、矢吹孝¹、青木雅昭¹、関英
 子¹、松田貴意¹、廣田洋¹、好田真由美¹、田仲昭子¹、関原明¹、篠崎一雄¹、横山茂之^{1,2,3} (RIKEN GSC¹、
 RIKEN 播磨²、東大院理³)

【有機・天然物化学への NMR の応用】

3P066 トリグリセリドの炭化水素鎖間に働く引力的相互作用 234
 ○小林学¹、仁木國雄¹ (電気通信大学¹)

1P067	複素環を持つレチノイン酸誘導体の溶液中でのコンホメーション解析 ○杉浦眞喜子 ¹ 、浅見由美 ¹ 、和田昭盛 ¹ 、伊藤允好 ¹ (神戸薬大 ¹)	238
2P068	2,5-Dicyclopentylcyclopentanone の cyclopentyl 基が香気に及ぼす影響についての考察 ○春日久栄 ¹ 、白井文晴 ¹ (高砂香料 AS 研 ¹)	242
3P069	CAST/CNMR システムの応用：化学シフト帰属と構造の訂正への適用 ○越野広雪 ¹ 、佐藤寛子 ² (理研 ¹ 、国立情報学研 ²)	244
1P070★	単離不可能な化合物の解析に対する DOSY 法の有用性 ○櫻井智司 ¹ 、上田昌史 ² 、内海博明 ¹ 、中越雅道 ² 、宮田興子 ² 、内藤猛章 ² (日本電子(株) ¹ 、神戸薬大 ²)	246
2P071	ポリ(アルキルプロピオレート)の動的溶液構造 ○小日山輝泉 ¹ 、平沖敏文 ¹ 、馬渡康輝 ¹ 、小塚心尋 ¹ 、田畑昌祥 ^{1,2} (北大院工 ¹ 、産総研高分子センター ²)	248
3P072	HMBC 法の新しい応用測定：3D-CT-HMBC 法について ○降旗一夫 ¹ 、瀬戸治男 ² (東大院農 ¹ 、東京農大 ²)	250
1P073★	ペプチド結合を有する分子の溶液中での動的挙動と溶媒効果 ○堤遊 ^{1,3} 、中村和彦 ² 、中西洋志 ^{1,3} 、千葉かおり ^{1,4} (産総研・生物情報センター ¹ 、産総研・生物機能工学部門 ² 、東理大院・基礎工 ³ 、原研・中性子利用センター ⁴)	254
2P074	分枝状アルカンと芳香環との分子間相互作用 ○松野めぐみ ¹ 、初田美砂紀 ¹ 、仁木國雄 ¹ (電気通信大学 ¹)	256
3P075	固体高分解能 ¹ H, ¹³ C NMR を用いたコハクの分子レベルでの構造解析 ○木村英昭 ¹ 、塚田好美 ¹ 、三田肇 ¹ 、山本泰彦 ¹ 、荘司顯 ² 、中條利一郎(筑波大学 ¹ 、群馬大学 ²)	260
1P076	アミド化合物水溶液のケミカルシフトと J(C-H) の濃度依存性：NMF, NMA, NMP の場合 ○水野和子 ¹ 、齋藤隆通 ¹ (福井大工 ¹)	262

【無機・分析化学への NMR の応用】

2P077	磁場勾配 NMR による粘土ゲル中での金属イオンの拡散係数の測定 ○大窪貴洋 ¹ 、池田泰久 ¹ (東工大原子炉 ¹)	264
3P078	抗菌活性錯体を包摂したシリケートゲルの NMR 法による構造解析 ○高山俊夫 ¹ 、篠原和也 ¹ 、小池芳雄 ¹ (神奈川大工 ¹)	266
1P079	ステロイド化合物の溶液構造解析 ○敷井和彰 ^{1,2} 、関宏子 ^{1,4} 、内海博明 ³ 、山口健太郎 ^{4,5} (千葉大分セ ¹ 、日産化学 ² 、日本電子 NM 応研 ³ 、CREST ⁴ 、徳文大香川葉 ⁵)	268
2P080	Al-EDTA 錯体における ¹ H, ¹³ C Dynamic-NMR の研究 ○加藤祐子 ¹ 、立石雄一 ² 、栗崎敏 ³ 、横山拓史 ⁴ 、脇田久伸 ³ (東和大学工 ¹ 、(株)ハイテック千葉研究開発センター ² 、福岡大学理 ³ 、九州大学院理 ⁴)	270
3P081	超偏極 ¹²⁹ Xe NMR による包摂化合物の相互作用評価 ○服部峰之 ¹ 、李映周 ¹ 、早水紀久子 ¹ 、平賀隆 ² 、山野井慶徳 ³ 、倉科昌 ³ 、米澤徹 ³ 、西原寛 ³ (産総研つくば ¹ 、産総研関西 ² 、東大院理 ³)	272
1P082★	核磁気共鳴法による人工メソ空間内溶液の特異挙動の解明 ○塚原剛彦 ¹ 、火原彰秀 ^{1,2} 、北森武彦 ^{1,2} (JST ¹ 、東大工 ²)	274

【液晶、膜、不均一系】

2P083	水溶液中における会合性高分子の構造の NMR による研究 ○福原忠雄 ¹ 、吉田克典 ¹ 、小松一男 ¹ (資生堂リサーチセンター ¹)	276
3P084	磁場勾配 NMR 法による cavity を有するゲル内のプローブ分子の拡散過程 ○山根祐治 ¹ 、大橋淳史 ¹ 、黒木重樹 ^{1,2} 、安藤勲 ^{1,2} (東工大院理工 ¹ 、高分子セ ²)	278
1P085★	磁場勾配 NMR 法を用いたポリメタクリル酸メチルゲル中の線状及び球状ポリスチレンの拡散機構の研究 ○上口憲陽 ¹ 、黒木重樹 ^{1,2} 、安藤勲 ^{1,2} 、佐藤満 ^{1,2} 、石津浩二 ^{1,2} (東工大院理工 ¹ 、高分子センター ²)	280
2P086	超偏極 Xe-129 を用いた拡散係数の測定と多孔質微粒子の特性評価への応用 ○金子暁里 ¹ 、木村敦臣 ¹ 、藤原英明 ¹ (阪大医保健 ¹)	284
3P087	固体 NMR による茶カテキン類と脂質膜との相互作用の解析 ○熊澤茂則 ¹ 、加治屋勝子 ¹ 、内藤晶 ² 、斉藤肇 ³ 、辻暁 ³ 、谷生道一 ³ 、鈴木壮幸 ⁴ 、南条文雄 ⁴ 、中山勉 ¹ (静岡県大食栄 ¹ 、横浜国大院工 ² 、姫路工大理 ³ 、三井農林食総研 ⁴)	286
1P088★	磁場勾配 NMR 法によるチャンネルキャビティを有するポリエステル中のガス分子の拡散過程の研究 ○松井政徳 ¹ 、山根祐治 ¹ 、黒木重樹 ^{1,2} 、安藤勲 ^{1,2} 、付凱 ¹ 、渡辺順次 ¹ (東京工業大学大学院 ¹ 、高分子センター ²)	288
2P089	多孔性コバルト錯体結晶中の水クラスターの構造とダイナミクス ○石丸臣一 ¹ 、中村良平 ² 、田所誠 ² 、長尾祐樹 ³ 、北川宏 ³ 、中筋一弘 ⁴ (筑波大院数理 ¹ 、阪市大院理 ² 、九大院理 ³ 、阪大院理 ⁴)	290

【計算、シミュレーション、データ処理】

3P090	SQ DQ-NMR による膝液成分の in situ スペクトル測定：若年健常女性の日内変動解析 ○高橋政三 ¹ 、井村桂子 ² 、萩野孝史 ² 、山口行治 ³ (日本女子大理 ¹ 、国立清心神経センター ² 、ファイザー(株) ³)	292
1P091	固相における拡散の次元性と局所磁場勾配：超演算子フーリエスペクトル法によるスピネコー強度解析 ○浅川直紀 ¹ 、松原清彦 ¹ 、井上義夫 ¹ (東京工業大院・生命理工学 ¹)	296
2P092	メタボローム解析用 PC ソフトウェアの開発：ALICE2 for Metabolome ○有福和紀 ^{1,3} 、平川慶子 ^{2,1} 、小池薫 ^{3,2} 、植草協子 ^{4,1} 、藤原正子 ^{5,3} 、大野曜吉 ^{6,1} (日本医科大学 ¹ 、東北大院・医学系研究科 ² 、日本電子データム株式会社 ³)	298
3P093	解析的微分による化学シフトの相対論的効果の計算 ○福井洋之 ¹ (北見工業大学 ¹)	300
1P094	FMO 法による蛋白質の電子状態解析：結合ポケットの構造最適化 ○根本直 ¹ 、Dmitri G. Fedorov ¹ 、古明地勇人 ¹ 、金澤健治 ¹ 、上林正己 ¹ 、北浦和夫 ¹ (産総研 ¹)	302
2P095	Full force field implementation for torsion angle dynamics simulation of CYANA program ○松田 知己 ¹ 、Peter Güntert ¹ (理研 GSC 宮澤辰雄記念プログラム ¹)	304
3P096	Implementation of orientation-independent residual dipolar coupling restraints in CYANA ○Kimmo Paakkonen ¹ 、Arto Annala ² 、Peter Güntert ¹ (GSC RIKEN ¹ 、Department of Physical Sciences, University of Helsinki, Finland ²)	306

1P097	Automated protein structure determination from NMR spectra ○Blanca Lopez-Mendez ¹ , Peter Güntert ¹ (GSC RIKEN ¹)	308
-------	--	-----

【医用/in vivo NMR とイメージング】

2P098	Diffusion Tensor Imaging を用いた白質加齢変化の検討 ○藤川昭彦 ¹ , 福永雅喜 ² , 矢嶋一賀 ¹ , 陳偉萍 ¹ , 松成一朗 ¹ , 西村伸太郎 ¹ , 梅田雅宏 ² , 成瀬昭二 ² , 田中忠蔵 ² ((財)先端医学薬学研究センター ¹ , 明治鍼灸大学 ²)	310
1P099★	骨密度計測用コンパクト MRI の開発: 大量被験者の計測 ○富羽貞範 ¹ , 古家健 ¹ , 飯田奈智子 ¹ , 岡田美美 ¹ , 巨瀬勝美 ¹ , 拝師智之 ¹ (筑波大学物理工学系 ¹ , (株) エム・アール・テクノロジー ²)	312
1P100★	超偏極 Xe-129 MRI/MRS を用いたマウスの脳機能評価 ○上山毅 ¹ , 若山哲也 ¹ , 木村敦臣 ¹ , 藤原英明 ¹ (阪大医保健 ¹)	316
2P101	4.7T MRI における多核種局在化スペクトル同時測定法: ヒト脳のアルコール摂取前後の変化 ○三森文行 ¹ , 高屋展宏 ¹ , 渡邊英宏 ¹ (国立環境研究所 ¹)	318
3P102	ポリリン酸レポーターシステムを用いた遺伝子発現のイメージング技術の開発 ○杉原文徳 ¹ , 朽尾豪人 ¹ , 奇世媛 ¹ , 岡田あずさ ¹ , 渡邊清 ¹ , 笠原浩司 ¹ , 古久保哲朗 ¹ , 白川昌宏 ¹ (横浜市大院総理 ¹)	320
1P103★	超並列型 MR マイクロスコープを用いた大量ヒト胚子三次元撮像: 京都プロジェクト ○松田善正 ¹ , 小野真也 ¹ , 半田晋也 ¹ , 大竹陽介 ¹ , 増本秀史 ³ , 拝師智之 ² , 巨瀬勝美 ⁴ , 塩田浩平 ⁵ (筑波大院 ¹ , (株)エム・アール・テクノロジー ² , 筑波大 ³ , 筑波大物工 ⁴ , 京都大医 ⁵)	322
2P104	食品用コンパクト MRI を用いた脂肪分布の測定 ○石田信昭 ¹ , 内藤成弘 ¹ , 拝師智之 ² (食総研 ¹ , エム・アール・テクノロジー ²)	326
3P105	食品用コンパクト MRI の開発 ○拝師智之 ¹ , 宇津澤慎 ^{1,2} , 半田晋也 ² , 巨瀬勝美 ² ((株)MRTechnology ¹ , 筑波大学物理工学系 ²)	328
1P106★	4.7T におけるヒト脳 3 次元 T ₁ 強調画像測定最適化 ○高屋展宏 ¹ , 渡邊英宏 ¹ , 三森文行 ¹ (国立環境研究所 ¹)	332
2P107	300MHzNMR 装置および PC 用処理ソフトウェアを用いた NMR メタボロームによる病態解析 ○平川慶子 ¹ , 小池薫 ² , 有福和紀 ³ , 植草協子 ¹ , 藤原正子 ³ , 大野曜吉 ¹ (日本医科大医 ¹ , 東北大院・医学系研究科 ² , 日本電子データム(株) ³)	334

【固体 NMR における新しい測定法の開発】

1P108★	高磁場高速 MAS および立体整列同位体標識(SAIL)を用いた固体高分解能 ¹ H-NMR とその応用 ○高橋大樹 ¹ , 藤原敏道 ¹ , 寺内勉 ² , 甲斐荘正恒 ^{2,3} , 阿久津秀雄 ¹ (阪大蛋白研 ¹ , CREST/JST ² , 都立大院理 ³)	336
1P109★	固体 NMR における位相強度変調 rf 磁場によるスピン相互作用の選択的 recoupling 法 ○西山裕介 ¹ , 山崎俊夫 ¹ , 亀田恒徳 ² , 宮澤光博 ² , 寺尾武彦 ³ (理研 GSC ¹ , 農業生物資源研 ² , 京大院理 ³)	340
2P110	アミロイドβの構造解析 ○大橋竜太郎 ¹ , 増田裕一 ² , 森本晃 ² , 村上一馬 ² , 竹腰清乃理 ¹ , 入江一浩 ² , 寺尾武彦 ¹ (京大理 ¹ , 京大農 ²)	342

3P111	強磁場化がもたらす NMR の新展開 ○清水禎 ¹ 、丹所正孝 ¹ 、後藤敦 ¹ 、端健二郎 ¹ 、飯島隆広 ¹ 、大木忍 ¹ 、藤部康弘 ¹ 、池田龍一 ¹ (物材機構 ¹)	346
1P112★	¹⁴ N オーバートーン照射による近接 ¹³ C 線幅増大を利用したペプチド二次構造解析 ○深澤隼 ¹ 、竹腰清乃理 ¹ 、莊司顯 ² 、寺尾武彦 ¹ (京大院理 ¹ 、群馬大工 ²)	348
2P113	固体高分解能 NMR 法によるペプチド分子間構造決定法の開発 ○山内一夫 ¹ 、小此木美智 ¹ 、松崎光隆 ¹ 、中澤靖元 ² 、朝倉哲郎 ¹ (東京農工大工 ¹ 、東工大院理工 ²)	352
3P114	半整数スピンのオーバートーン NMR ○桑原大介 ¹ 、古家野宏行 ² 、岡本大 ² (電通大・機器分析セ ¹ 、電通大 量子・物質 ²)	354
1P115	Hadamard 行列を用いた多次元固体 NMR 測定 ○芦田淳 ¹ 、Eriks Kupce ² (バリアンテクノロジーズジャパン ¹ 、Varian UK ²)	356
【固体 NMR I (高分子材料、高分子物性等)】		
2P116	双極子相互作用を用いた高分子結晶ダイナミクス解析 ○三好利一 ¹ (産総研ナノテク ¹)	358
1P117★	バクテリオロドプシンの局所運動性と構造変化の検出 ○川村出 ¹ 、大嶺将人 ¹ 、山口悟 ² 、西村勝之 ¹ 、辻暁 ² 、斉藤肇 ² 、内藤晶 ¹ (横浜国大院工 ¹ 、姫工大院理 ²)	360
1P118★	π 共役系高分子の準秩序構造のダイナミクス ○守誠一朗 ¹ 、浅川直紀 ¹ 、山本隆一 ² 、井上義夫 ¹ (東工大院生命理工 ¹ 、東工大資源科学研 ²)	362
2P119	生体膜表面において誘起される膜脂質結合性蛋白質ドメインの変形と運動 ○辻暁 ¹ 、上釜奈緒子 ¹ 、杉田多喜男 ¹ 、岡田雅司 ¹ 、八木澤仁 ¹ (兵庫県立大院生命理 ¹)	364
3P120	固体 NMR によるセルロース結晶多形の構造解析 ○甲野裕之 ¹ 、沼田ゆかり ² 、加藤悦子 ² (ブルカーバイオスピ (株) ¹ 、農業生物資源研 ²)	366
1P121★	パイ共役系高分子ガラスのダイナミクス ○大平学 ¹ 、浅川直紀 ¹ 、山本隆一 ² 、井上義夫 ¹ (東工大生命理工 ¹ 、東工大資源研 ²)	368
2P122	PAA/水ガラス複合素材の固体高分解能 ¹³ C, ²⁹ Si NMR 法による研究 ○浅野敦志 ¹ 、村田義文 ¹ 、黒津卓三 ¹ (防大応化 ¹)	370
3P123	部位特異的安定同位体ラベルを施した(Ala-Gly) ₁₅ ペプチドの固体 NMR 精密構造解析 ○中澤靖元 ¹ 、茂呂ふみか ² 、木塚三津子 ² 、朝倉哲郎 ² 、安藤勲 ¹ (東工大院理工 ¹ 、農工大工 ²)	372
1P124★	固体 ¹⁹ F MAS 及び ¹ H→ ¹⁹ F CP/MAS NMR 法を用いた PCTFE/PVDF ブレンドの構造解析 ○龍野宏人 ¹ 、相見敬太郎 ¹ 、安藤慎治 ¹ (東工大院理工 ¹)	374
2P125	固体 ¹⁹ F MAS NMR 法を用いた PVDF 及び VDF オリゴマーの結晶構造及び相転移挙動の解析 ○小関佑 ¹ 、相見敬太郎 ¹ 、奥居徳昌 ¹ 、安藤慎治 ¹ (東工大院理工 ¹)	376
3P126	原子間距離測定によるヒトカルシトニンアミロイド線維構造の解析 ○内藤晶 ¹ 、上平美弥 ² 、井上良三 ³ 、遠藤弘史 ¹ 、伊藤有希 ¹ 、大道寺謙悟 ¹ (横国大院工 ¹ 、オックスフォード大生化 ² 、姫路工大院理 ³)	378
1P127★	膜表在性タンパク質 PLC- δ 1 の脂質膜結合に由来する動的な構造変化とドメイン間相互作用の解析 ○上釜奈緒子 ¹ 、岡田雅司 ¹ 、八木澤仁 ¹ 、辻暁 ¹ (兵庫県立大院生命理 ¹)	382

2P128	固体NMRによるポリエチレン単斜晶の生成と消滅に関する研究 ○狩野圭子 ¹ 、上原宏樹 ¹ 、山延健 ¹ 、甲本忠史 ¹ (群馬大工 ¹)	384
3P129	ポリフェニレンエーテルの熱処理による構造変化に関する研究 ○寺尾綱哲 ¹ 、志田裕幸 ¹ 、五十嵐昭 ¹ 、上原宏樹 ¹ 、山延健 ¹ 、甲本忠史 ¹ (群馬大工 ¹)	386
1P130★	マイクロオーダーのチャンネルを有する高磁場配向ゲルの固体 NMR による物性評価 ○大橋淳史 ¹ 、山根祐治 ¹ 、黒木重樹 ¹ 、安藤勲 ¹ (東京工業大学大学院 ¹)	388
2P131	主鎖中に芳香環を有する芳香族ポリアミドの結晶化に関する研究 ○志田裕幸 ¹ 、寺尾綱哲 ¹ 、五十嵐昭 ¹ 、上原宏樹 ¹ 、山延健 ¹ 、甲本忠史 ¹ (群馬大工 ¹)	390
3P132	二次元二量子固体 NMR 法による非晶性材料の精密構造解析 ○嶋田純也 ¹ 、梶弘典 ^{1,2} 、堀井文敬 ¹ (京大化研 ¹ 、科技団さきがけ 21 ³)	392
1P133★	二次元二量子固体 NMR 法による有機 EL 用正孔輸送材料の分子間パッキング ○塚本直樹 ¹ 、梶弘典 ^{1,2} 、堀井文敬 ¹ (京大化研 ¹ 、科学技術振興機構さきがけ ³)	394
2P134	¹ H→ ¹⁹ F CP ダイナミクス解析による含フッ素全芳香族ポリイミドの分子鎖パッキングの評価 ○相見敬太郎 ¹ 、安藤慎治 ¹ (東工大院理工 ¹)	396
3P135	αキチンの水素結合構造とダイナミクス ○亀田恒徳 ¹ 、宮澤光博 ¹ 、前田育子 ² 、小野裕嗣 ² 、吉田充 ² (農業生物資源研 ¹ 、食品総合研究所 ²)	398
1P136★	固体 ¹³ C、 ¹⁵ N NMR ならびに量子化学計算による有機 EL 正孔輸送材料のコンホメーションおよび電子状態解析 ○山田知典 ¹ 、梶弘典 ^{1,2} 、塚本直樹 ¹ 、日下康成 ¹ 、堀井文敬 ¹ (京都大化学研 ¹ 、科学技術振興機構さきがけ ³)	400
2P137	¹²⁹ Xe NMR 化学シフト値から見たゴム状高分子の熱膨張 ○吉水広明 ¹ 、安藤聖子 ¹ 、岡本茂 ¹ 、辻田義治 ¹ (名工大院工 ¹)	402
3P138	微生物産生高分子ポリ(ε-L-リジン) およびその誘導体の分子構造解析 ○前田史郎 ¹ 、村中淳之介 ¹ 、武藤勝紀 ¹ 、佐々木千鶴 ² 、国本浩喜 ² (福井大工 ¹ 、金沢大院自 ²)	404
1P139	固体NMRを用いた多孔性金属錯体の吸着特性の解析 ○堀毛悟史 ¹ 、松田亮太郎 ¹ 、北川進 ¹ (京大院工 ¹)	406
【固体 NMR II (固体物性、固体イメージング等)】		
2P140	常磁性緩和の影響を受けた固体重水素 NMR スペクトルの解析 ○水野元博 ¹ 、板倉直久 ¹ 、青木陽二 ¹ 、遠藤一央 ¹ (金沢大院理 ¹)	408
1P141★	HY ゼオライトにおけるキセノンの吸着挙動の高圧 ¹²⁹ Xe NMR の研究 ○前澤国芳 ¹ 、上田貴洋 ^{1,2} 、宮久保圭祐 ¹ 、江口太郎 ^{1,2} (阪大院理 ¹ 、阪大博物館 ²)	410
1P142★	化合物半導体 InP の固体高分解能 NMR ○飯島隆広 ¹ 、端健二郎 ¹ 、後藤敦 ¹ 、清水禎 ¹ 、大木忍 ² (物材機構 ¹ 、CREST-JST ²)	412
2P143	固体相関 NMR による化学結合および空間を通じた無機化合物中の連鎖構造解析 ○金橋康二 ¹ 、根本貴宏 ² 、齋藤公児 ¹ (新日鐵先端研 ¹ 、日本電子 ²)	414
3P144	固体NMR法による無機化合物中の ²⁵ Mg 測定 ○畠山盛明 ¹ 、金橋康二 ² 、齋藤公児 ² 、根本貴宏 ³ (日鐵テクノロジーサーチ ¹ 、新日鐵・先端研 ² 、日本電子 ³)	416

1P145★	¹¹ B, ¹⁰ B MAS NMR による炭窒化ほう素 (B-C-N) 材料の構造解析 ○藤部康弘 ^{1,2} 、飯島隆広 ² 、丹所正孝 ² 、清水禎 ² 、岸本直樹 ^{1,2} 、谷口尚 ² 、中野智志 ² (筑波大 ¹ 、物材機構 ²)	418
2P146	無機固体硫酸 Cs ₂ (HSO ₄)(H ₂ PO ₄)における ¹ H緩和とプロトン拡散 ○林繁信 ¹ 、水野正城 ¹ (産総研計測フロンティア ¹)	420

【測定装置関連】

1P147★	500MHzNMR 用 4 ケルビン極低温プローブの開発 ○高橋雅人 ^{1,2} 、堀内崇 ^{1,2} 、菊地淳 ^{1,2} 、横山茂之 ^{1,3,4} 、前田秀明 ^{1,2} (理研 GSC ¹ 、横浜市大院総理 ² 、東大院理 ³ 、理研播磨 ⁴)	422
1P148★	寒剤補給不要の NMR 用超電導マグネット ○奥井良夫 ¹ 、大塚昭弘 ¹ 、広瀬量一 ¹ 、福水伸一 ¹ 、林征治 ¹ 、伊藤聡 ² (JASTEC ¹ 、神戸製鋼所 ²)	424
2P149	高磁場内氷結を利用した偏極キセノンガス生成装置 ○若井篤志 ^{1,2} 、中村和浩 ^{1,2} 、カーショウ ジェフ ^{1,2} 、ライト デービッド ^{1,2} 、菅野巖 ¹ (秋田県立脳血管研究センター ¹ 、あきた産業振興機構 ²)	426
3P150	NMR 信号を用いた高温超伝導バルク磁石の評価 ○仲村高志 ¹ 、吉川雅章 ² 、伊藤佳孝 ² 、越野広雪 ¹ ((独) 理化学研究所 ¹ 、(株) イムラ材料開発研究所 ²)	428
1P151★	1GHz 級 CPMAS プローブの開発 ○根本貴宏 ¹ 、長谷川憲一 ¹ 、杉沢寿志 ¹ 、樋岡克哉 ¹ 、志野英雄 ¹ 、下池田勇一 ¹ 、神成さらら ¹ (日本電子(株) ¹)	430
2P152	機能分散、累積型パルスジェネレーターの開発 ○大石 修 ¹ (分子研 ¹)	432
3P153	Palmtop-sized probes for solid-state NMR ○武田和行 ^{1,2} (阪大院基礎工 ¹ 、CREST ²)	434
1P154★	ハイブリッド磁石を用いた強磁場 NMR の開発 ○端健二郎 ¹ 、清水禎 ¹ 、後藤敦 ¹ 、飯島隆広 ¹ 、大木忍 ² (物材機構 ¹ 、JST ²)	436
2P155	有機溶媒中の固体四極子核 NMR 共鳴線と与える溶液試料回転と超音波振動の影響 ○伊藤勲 ¹ 、山崎悠弥 ¹ 、畑中信一 ¹ 、林茂雄 ¹ 、桑原大介 ² (電通大 量子・物質 ¹ 、電通大・機器分析センター ²)	438
3P156	固体 NMR における低周波数核種の測定 ○芦田淳 ¹ (パリアンテクノロジーズジャパン ¹)	440

【その他】

1P157★	930MHz 極低温プローブモデルの Q 値に及ぼすサンプル誘電特性の効果 ○堀内崇 ^{1,2} 、高橋雅人 ^{1,2} 、菊地淳 ^{1,2} 、横山茂之 ^{1,3,4} 、前田秀明 ^{1,2} (理研 GSC ¹ 、横市院総理 ² 、理研播磨 ³ 、東大院理 ⁴)	442
2P158	蛋白質溶液 NMR における超高速化 : HNC(AH)/HACANH/HCCH-COSY の全帰属情報を含んだ 2次元測定 ○高杉憲司 ¹ 、根本暢明 ¹ (日本電子(株) ¹)	444
3P159	パルスレーザの整形による三重項状態への光励起の効率化 ○山村猛 ¹ 、香川晃徳 ¹ 、武田和行 ¹ 、北川勝浩 ¹ (大阪大院基礎工学 ¹)	448

1P160	超偏極 Xe を利用したリグニン誘導体の吸着挙動の研究：多孔性製剤との比較 ○木村敦臣 ¹ 、中野優美 ¹ 、藤原英明 ¹ 、小西和頼 ² (阪大院医 ¹ 、三重県科技セ工研 ²)	450
2P161	NMR による自己拡散係数 (D _{self}) 測定法の高分子混合系への適用 ○木村朋子 ¹ 、福原忠雄 ¹ 、小松一男 ¹ ((株)資生堂 ¹)	452
3P162	NMR データベース BMRB の新しいデータ登録インターフェース ADIT-NMR と蛋白研登録サイトの 設立 ○中谷英一 ^{1,2} 、松木陽 ^{1,2} 、中村春木 ¹ 、阿久津秀雄 ¹ (阪大蛋白研 ¹ 、JST-BIRD ²)	454
1P163	複素データの解析によるパルス幅検出ツールの改良 ○山崎千春 ¹ 、高杉憲司 ¹ 、栗本智充 ¹ (日本電子(株) ¹)	456

第一日

11月10日（水）

一般講演要旨

Three-Dimensional Solution Structure of PAS1 Domain of Phytochrome A from Rice (NIAS) ○Toshimasa Yamazaki, Paul Raey, Rintaro Suzuki, Nobuya Sakai, Etsuko Katoh, and Makoto Takano

Phytochromes are dimeric chromoproteins that regulate various aspects of plant development from seed germination to flowering. The monocot rice plant possesses three phytochromes, PhyA, PhyB and PhyC, which mediate distinct and overlapping responses to light. PhyA is primarily responsible for sensitivity to far-red light, whereas PhyB and PhyC respond mainly to red light. However, the precise mechanism that underlies phytochrome function is not clear because virtually no information about its 3D structure is available. Here we report comprehensive NMR studies on a fragment (S601-H740) containing the PAS1 domain of PhyA from rice.

1. はじめに

植物がエネルギーを生み出す光合成反応をはじめ、受光体勢に関わる形態形成や花芽形成等、植物の基本反応のほとんどが光環境により制御されている。光信号の受容は限られた光受容体により行われており、赤色光・遠赤色光に対してはフィトクロム、青色光に対してはクリプトクロムとフォトトロピンがその役割を担っていることが知られている。

フィトクロムは約 125-kDa のポリペプチド鎖 2 本で構成されるホモダイマーで、各ポリペプチド鎖は大きく 2 つのドメインに分けられる。N 末端ドメインは発色団を有する光センサーとして機能し、C 末端ドメインはシグナル伝達モチーフと想定される 2 つの PAS ドメインとヒスチジンキナーゼ様ドメインで構成されている。イネには 3 種のフィトクロム分子(PhyA, PhyB, PhyC)が存在する。PhyA は遠赤色光を感知して光形態形成反応を誘起する主要なフィトクロム分子種であるのに対して、PhyB と PhyC は赤色光を感知して作用することが報告されているが、作用機構の詳細には不明な点が多い。本研究では、イネ由来 PhyA の分子機能を構造生物学的見地から解明するために、タンパク質-タンパク質相互作用ドメインと想定される PAS1 ドメイン、PhyA(601-740)の溶液構造と分子運動性を NMR 法により解析した。

キーワード：フィトクロム、光センサー、PAS ドメイン、イネ

著者ふりがな：やまざきとしまさ、れいぼ一る、すずきりんたろう、さかいのぶや、かとうえつこ、たかのまこと

2. 実験方法

解析に用いた OsPhyA(601-740)はチオレドキシシン融合タンパク質として大腸菌内で発現した。NMR 測定は、 ^{15}N あるいは $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 OsPhyA(601-740), 150 mM NaCl, 1 mM DTT を 20 mM Tris バッファー(pH 7.2)に溶解した試料について、Bruker 社製 DMX750 を用いて 298 K で行った。立体構造計算は XPLOR3.1 を用いて行った。超遠心分析は Beckman 社製 XL-A を用いて行った。

3. 結果と考察

PhyA については3つのダイマー形成サイトが提案されている。このうちの1つが OsPhyA(601-740)に含まれているので、まず、本タンパク質のダイマー形成のを検討した。沈降平衡法による超遠心分析から得られた溶液中におけるタンパク質の分子量は 16,800 であり、70 μM 溶液ではモノマーで存在することが明らかにされた。さらに、25 μM ~1.6 mM の濃度範囲においては観測された HSQC スペクトルに何ら変化が認められないことから、OsPhyA(601-740)は測定濃度域においてモノマーで存在すると結論される。

NMR シグナルを帰属したところ、3つの領域(L654-V659, E672-Q680, V695-V711)において、P710 の *cis-trans* 異性化に起因する2組のシグナルが観測されることが明らかになった。P710 の C β , C γ 化学シフトと NOE の解析から、メジャーピークはトランス体に由来しマイナーピークはシス体に由来すること、さらには、両者の存在比は 3:2 であることが分かった。NMR 構造情報を用いて、メジャー異性体の立体構造を決定した(図 1)。OsPhyA(601-740)は I635-Q735 に典型的な PAS ドメイン構造を有し、その N 端側の S622-E629 はヘリックスを形成することが明らかにされた。

シグナル伝達に関連する PhyA 変異体の解析から、C 末端ドメイン内にアミノ酸置換が起こることにより、フィトクロムの分光光学的な活性を保ちながらもシグナルを効率的に伝えることの出来ないミスセンス変異体が8つ報告されている。これらのうち6つは本研究で用いたタンパク質フラグメント中に存在する。そこで、これらのミスセンス変異を立体構造上にマップした(図 1)。いずれの残基も β シート構造を核とする特定の分子表面上に位置しており、この領域が下流のフィトクロム結合因子との相互作用において重要な役割を担っているものと考えられる。

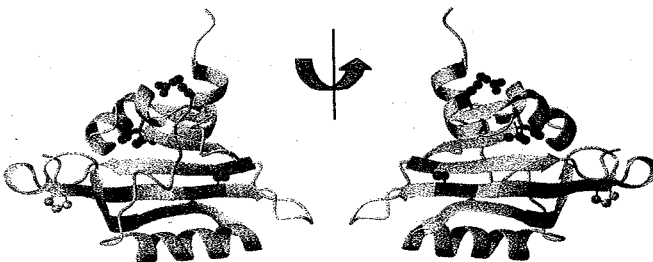


Figure 1. Ribbon representation of NMR solution structure of OsPhyA (601-740). P710, showing *cis-trans* isomerization, is shown in yellow. Residues whose replacements lead to loss of function are shown in magenta.

○加藤 晃一^{1,2,3}

NMR structural biology of sugar-recognizing proteins that determine the fates of glycoproteins in cells

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University¹,
 CREST/JST², GLYENCE Co., Ltd.³)

○Koichi Kato^{1,2,3}

Accumulating evidence shows that carbohydrate moieties covalently linked to proteins contribute to polypeptide folding, transport, and degradation in cells via interactions with a variety of intracellular lectins. To provide structural basis of molecular recognition of glycoproteins in those systems, we performed stable-isotope-assisted NMR analyses of structures, dynamics, and sugar-binding of the intracellular lectins, which include the ER chaperones calreticulin, the cargo receptors VIP36, and the ubiquitin ligase SCF^{Fbs1}. On the basis of NMR data, the amino acid and sugar residues involved in the carbohydrate-protein interactions were identified. Especially, inspection of NOE data allowed us to determine conformations of oligosaccharides or glycopeptides in association with the lectins and to characterize ligand-lectin contacts at atomic resolution. In those analyses, stable isotope labeling of the lectins as well as their cognate ligands plays key roles.

1. はじめに

糖タンパク質が、細胞内で固有の立体構造を形成し、機能発現の舞台に輸送され、あるいは不要となった場合に分解されるといった運命決定のプロセスは、糖タンパク質上に発現されている糖鎖とそれらを認識する細胞内レクチンとの相互作用によって決定されていることが明らかとなりつつある。私たちは、多次元 HPLC 法によって構築した糖鎖ライブラリーを活用して NMR 構造生物学研究を展開し、糖タンパク質の細胞内運命を決定するレクチンによる分子認識の構造的基盤を明らかにすることを目指している。ここでは、小胞体シャペロン calreticulin、カーゴレセプター-VIP36、ユビキチンリガーゼの糖鎖認識ユニット Fbs1 を取り上げ、これらの細胞内レクチンの分子認識機構について NMR 構造生物学がもたらした知見を紹介する。

キーワード: 糖タンパク質、レクチン、糖鎖、NMR、品質管理

かとう こういち

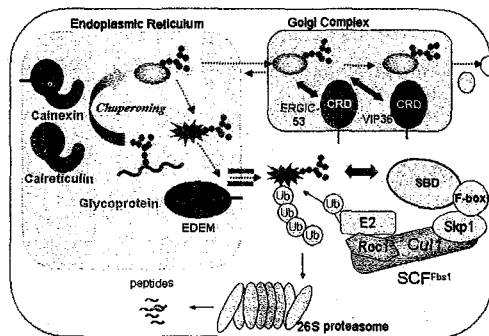


Fig.1 The intracellular lectins that determine the fates of glycoproteins in cells

2. ユビキチンリガーゼ SCF^{Fbs1} による糖鎖認識

SCF^{Fbs1} は細胞質において、N 結合型糖鎖を有するタンパク質を認識して分解マーカであるユビキチン鎖を連結するユビキチンリガーゼであり、プロテアソームによる糖タンパク質の分解において重要な役割を担っている。私たちは、SCF^{Fbs1} の基質認識ユニットである Fbs1 の糖タンパク質認識様式を解明するため、Fbs1 の糖鎖認識ドメイン(CRD)を用いて NMR による相互作用解析を行った。安定同位体で標識した糖ペプチドをリガンドとして

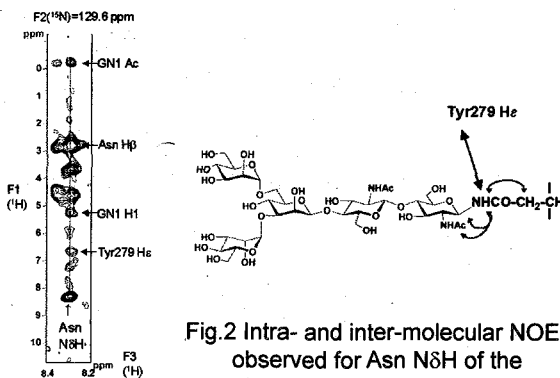


Fig.2 Intra- and inter-molecular NOEs observed for Asn NδH of the glycopeptide interacting with Fbs1-CRD

用いて Fbs1 の CRD との複合体の ¹⁵N-edited NOESY スペクトルを測定した結果、このレクチンは標的糖タンパク質の糖鎖部分のみならず糖鎖結合部位にあたるアスパラギン残基ともコンタクトを形成していることが明らかとなった。PNGase はプロテアソームの分解標的となる糖タンパク質の糖鎖結合部位のアスパラギン残基側鎖を攻撃して糖鎖を遊離すると考えられているが、Fbs1 存在下ではリボヌクレアーゼ B に対する PNGase の作用が阻害されることが示された。以上の結果より、Fbs1 は糖鎖還元末端近傍を認識することにより変性状態にある糖タンパク質と特異的に相互作用しており、さらに基質上にポリユビキチン鎖を形成している間、基質の糖鎖を PNGase から保護しているものと考察した。

3. カーゴレセプターVIP36 による糖鎖認識

カーゴレセプターVIP36 は糖タンパク質を輸送する際に高マンノース型糖鎖を認識することが知られているが、糖タンパク質に対する結合メカニズムに関しては依然として不明な点が多い。本研究ではフロントアルフィニティークロマトグラフィー法と NMR 法を用いて、VIP36 の糖鎖認識ドメイン(VIP36-CRD)と様々な構造を持つ高マンノース型糖鎖との相互作用解析を行った。その結果、VIP36-CRD は高マンノース型糖鎖内の Manα1-2Manα1-2Man 部分(D1 アーム)を主に認識していることが明らかとなった。D1 アームはシスゴルジにおいてマンノシダーゼにより切除されることに注目し、細胞内小器官の示す様々な pH 条件下における VIP36-CRD の構造と糖鎖結合性を解析した。その結果、トランスゴルジの pH (pH5.5)では VIP36-CRD は部分的に変性し疎水性領域が分子表面上に露出することが明らかとなった。また表面プラズモン共鳴法により、pH5.5 では VIP36-CRD とチログロブリンのみかけの親和性が上昇することが判明した。以上の結果より、VIP36 はトランスゴルジで疎水性領域を介した多量体を形成して D1 アームを保持した高マンノース型糖鎖を担う糖タンパク質に対する多価結合を実現していると考えられる。

【謝辞】本研究は東京大学大学院新領域創成科学研究科・山本一夫博士、帝京大学薬学部・笠井献一博士、荒田洋一郎博士、理化学研究所・伊藤幸成博士、松尾一郎博士、東京都臨床医学総合研究所・田中啓二博士、吉田雪子博士と共同で行われました。また、本研究は演者のグループの山口芳樹、高橋禮子、神谷由紀子、平尾武士の諸氏により推進されたものです。ここに謝意を表します。

(筑波大院数物¹、第一製薬²、広島大院生圏³)太 虎林¹、高山 真一¹、三上 真一¹、木村 英昭¹、三田 肇¹、長友 重紀¹、長谷川 淳²、
三本木 至宏³、○ 山本 泰彦¹**Structure-Function Relationship in Cytochrome c**H. Tai¹, S. J. Takayama¹, S. Mikami¹, H. Kimura¹, H. Mita¹, S. Nagatomo¹, J. Hasegawa², Y. Sambongi³ and
○Y. Yamamoto¹¹Graduate School of Pure and Applied Sci., Univ. of Tsukuba, ²Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.,³Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ.

Pseudomonas aeruginosa cytochrome *c*₅₅₁ and a series of its mutants exhibiting various thermostabilities have been studied by paramagnetic ¹H NMR and cyclic voltammetry in order to elucidate the structure-function relationship of cytochrome *c*. The study revealed that the nature of Fe-Met coordination bond in the protein is crucial for not only determining the heme electronic structure, but also regulating the redox function. The stability of the Fe-Met bond was found to be vital to prevent the protein from being non-native coordination forms to maintain its complete folding.

序 論

電子伝達タンパク質は、生体高分子の構造と機能との相関関係を解明する研究において理想的な研究対象である。なぜなら、機能の指標として利用される酸化還元電位が系統的に異なる一連の電子伝達タンパク質の研究から得られる知見を基盤とする帰納法により、生体高分子における機能調節のメカニズムの解明が行えるからである。また、これらのタンパク質は電子移動という比較的早いタイムスケールで起こる化学反応に関与するため反応前後での立体構造の変化がほとんどないことが実証されている(タンパク質の立体構造が電子の授受に伴い変化するようであれば、タンパク質の構造変化が電子移動の律速になるため電子伝達タンパク質としての機能を果たすことができないと考えられる)。したがって、タンパク質のコンフォメーションの大きな変化を伴わない機能調節のメカニズムの解明が可能となる。

私共は、電子伝達タンパク質シトクロム *c* (cyt *c*) における構造と機能との相関関係を解明する研究を行っている。アミノ酸側鎖は一般に電子の授受には適していないので、電子伝達タンパク質は補欠分子族をもっている。cyt *c* はヘムを補欠分子族としてもつヘムタンパク質であり、電子の授受はヘム鉄の酸化数の変化を利用して行われる。ヘムタンパク質中のヘム鉄は通常 His 側鎖のイミダゾール窒素に配位しているが、cyt *c* のヘム鉄はさらに Met 側鎖のイオウをもう一つの軸配位子としてもつ。構造化学的構成要素の類似性とは対照的に様々なヘムタンパク質が示す機能の多様性を考慮すると、cyt *c* の構造と機能との相関関係を解明する研究において、この Fe-Met 配位結合の構造化学的性質の理解が不可欠であることがわかる。本研究では、cyt *c* における Fe-Met 結合がタンパク質の立体構造やヘムの電子構造に及ぼす影響を NMR により解析した。

結果と考察

Fe-Met 結合の解裂に伴い出現する非天然配位状態のキャラクタリゼーション 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の酸化型シトクロム *c*₅₅₁ (PA) の塩酸グアニジン添加による変性実験より得られた一連の NMR スペクトルを Fig. 1 に示す。酸化型 cyt *c* のヘム鉄は低スピンフェリ型 ($S = 1/2$) なので不対電子を 1 つもつため、シグナルは約 -40 ~ +40 ppm の範囲で常磁性シフトして観測される。Fig. 1 に示すように、塩酸グアニジンの添加により、酸化型 PA の常磁性シフトしたシグナルの強度が減少するのに伴い、非天然配位状態に由来するシグナルが +55 ~ +80 ppm に出現し、それらの強度が増大する。新たに観測されたシグナルのシフト値から、非天然配位状態は高スピンフェリ型 ($S = 5/2$) であることがわかる。また、ヘム側鎖プロトンシグナルの常磁性シフトの溶媒同位体組成依存性の解析か

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

たい こりん、たかやま しんいち、みかみ しんいち、きむら ひであき、みた はじめ、ながとも しげのり、はせがわ じゅん、さんぼんぎ よしひろ、やまもと やすひこ

ら、非天然配位状態では、Met がヘム鉄から解離した5配位構造とMetに代わり溶媒のH₂Oが配位した6配位構造との間で早い相互変換反応が起きていることが明らかとなった。このように、酸化型PAではタンパク質の変性に伴い、Fe-Met結合が解裂して、特徴的な非天然配位状態が生じることが明らかとなった。塩酸グアニジン変性により生じる非天然配位状態に関するこの結果は、吸収スペクトルや共鳴ラマンによる研究結果からも支持されている。

Fe-Met 結合とヘム電子構造 酸化型 cyt *c* の NMR スペクトルで観測されるシグナルの常磁性シフトをタンパク質の立体構造を基に解析することにより、常磁性磁化率テンソルを求めることができる。この磁化率テンソルは、ヘムの電子構造をヘム側鎖メチルプロトンシグナルの常磁性シフトから求める際に不可欠である。PAの人工変異体、好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*) シトクロム *c*₅₅₂ (HT) それぞれで求められた磁化率テンソルを利用してヘムの電子構造を決定し、報告されているPAおよびウマ心筋 cyt *c* のものと比較した。Fig. 2には、ヘムの電子構造を反映するヘム側鎖メチルプロトンに由来する4つのシグナルのコンタクトシフトを、ヘムに関してMet側鎖のイオウの孤立電子対の配向を規定する二面角に対してプロットして示す。Fig. 2にあるように、両者は、理論的に予想される関係となっている。この結果は、Fe-Met結合が cyt *c* のヘムの電子構造を決定する主因の一つであることを示している。言い換えれば、ヘム側鎖メチルプロトンのコンタクトシフトの解析をヘム鉄に対するMetの配位構造決定の精密化に役立てることができることになる。一方、タンパク質工学的手法によりMetの配位構造を調節すれば cyt *c* の機能に重要なヘムの電子構造を調節することが可能となることが明らかとなった。

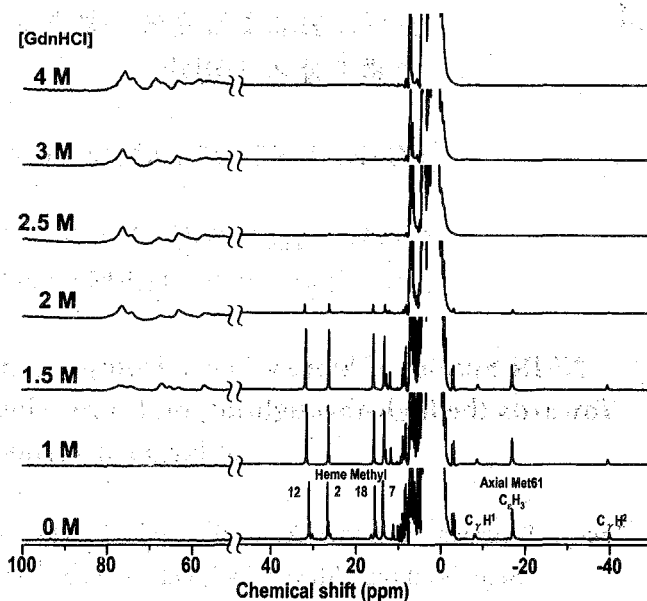


Fig.1. 600 MHz ¹H NMR spectra of the oxidized form of *Pseudomonas aeruginosa* cyt *c* in the presence of a series of guanidine hydrochloric acid concentrations at pH 5.00 and 25°C. New signals due to a non-native coordination form were emerging at about 50 ppm upon unfolding of the protein.

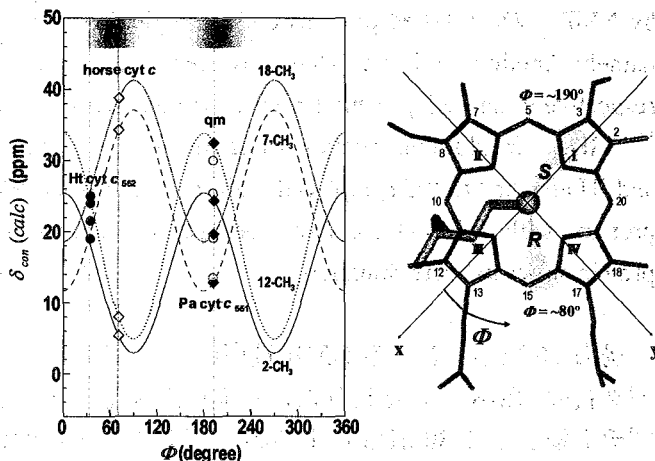


Fig.2. Plots of four heme peripheral methyl proton contact shifts, which reflect the heme electronic structure, against the dihedral angle, ϕ , which defines the orientation of the lone electron-pair of Fe-coordinated Met sulfur atom relative to the heme (left) and the definition of the ϕ value (right). **S** and **R** represent two typical ϕ values found in native cyts *c*.

謝辞 NMR測定で御助言戴いた逸見光博士(食総研)に感謝します。PA変異体とHTの常磁性磁化率テンソルは、立入直紀(筑波大)により求められた値を用いた。本研究をまとめるに当たって、高橋陽太(筑波大)により得られたPA人工変異体の実験結果も利用した。

参考文献 Yamamoto, Y.; Terui, N.; Tachiiri, N.; Minakawa, K.; Matsuo, H.; Kameda, T.; Hasegawa, J.; Sambongi, Y.; Uchiyama, S.; Kobayashi, Y.; Igarashi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 11574-11575. Terui, N.; Tachiiri, N.; Matsuo, H.; Hasegawa, J.; Uchiyama, S.; Kobayashi, Y.; Igarashi, Y.; Sambongi, Y.; and Yamamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 2003 125, 13650-13651.

SAIL 法による高分子量タンパク質の NMR 解析に向けた取り組みの現状

(¹CREST/JST, ²都立大院理, ³理研 GSC)

○鳥澤 拓也¹, 寺内 勉¹, 岩下 由紀², 杉森 望², 小野 明¹,
土屋 征司¹, 田井 真由理¹, Peter Güntert³, 甲斐荘 正恒^{1,2}

NMR Studies of Stereo-Array Isotope-Labeled (SAILed) Proteins: Towards the high-throughput, high-precision structural determinations of larger proteins

Takuya Torizawa¹, Tsutomu Terauchi¹, Yuki Iwashita², Nozomi Sugimori², Akira M. Ono¹,
Seiji Tsuchiya¹, Mayuri Tai¹, Peter Güntert³ and Masatsune Kainosho^{1,2}
(¹CREST/JST, ²Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, ³RIKEN GSC)

We have recently developed the SAIL (Stereo-Array Isotope-Labeling) method for proteins, which allows us to extend the accessible molecular weight limit for structural determinations by NMR. On SAILed proteins only a single proton is left to be observed on each carbon: namely, methyl and methylene are replaced by ¹³C¹HD₂ and chiral ¹³C¹HD groups, respectively, and all prochiral methyl groups are stereoselectively replaced with ¹²CD₃ and ¹³C¹HD₂. In addition, aromatic rings are labeled so that ¹²C and ¹³C can be placed alternately, and ¹H attached to ¹²C is replaced with ²H. The latest NMR data collected for some SAILed proteins with different sizes will be used to illustrate the advantages of this approach in protein structural determination.

過去 10 数年における NMR 技術の進歩は著しく、現在では分子量 40 k 程度のタンパク質の NMR による折りたたみ構造の決定が報告されている。しかしながら単一ペプチド鎖として 30 kDa 以上の高分子量タンパク質に関する、側鎖迄を含んだ正確な構造情報を得ることは、NMR シグナルの縮重や緩和特性から未だに困難である。

キーワード：SAIL、立体整列同位体標識、重水素標識、立体構造決定、無細胞タンパク質合成

とりざわ たくや, てらうち つとむ, いわた ゆき, すぎもり のぞみ, おの あ
きら, つちや せいじ, たい まゆり, ペーたー ぎゅんたーと, かいのしょう ま
さつね

従来の NMR 技術においては、分子量制限の拡大は、一般に得られる立体構造精度の犠牲を伴うものと考えられてきた。しかしながら、構造ゲノム科学においてはこれらの課題を同時に解決する、しかも迅速な NMR 構造解析技術が必要となる。我々は技術開発の中心を、これまで見過ごされてきた NMR 解析に特化したタンパク質試料の調製技術の抜本的改良に据えた。新たな安定同位体標識法を中核とする“SAIL”技術はこのような観点から誕生した独自技術であり、次世代の世界標準として大きな期待が寄せられている。SAIL 技術に用いるアミノ酸を、一般に“SAIL アミノ酸”と呼んでいるが、それらは次の項目を満たすように設計されている：

- (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) プロキラルメチル基 (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。)
- (iv) 芳香族アミノ酸の六員環： ^{12}C と ^{13}C を交互に配置し、CH を $^{12}\text{C}^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}^1\text{H}$ となるように標識する。

本標識パターン狙いは、立体構造決定に必要な情報を損失することなく NMR スペクトルを簡略化し、さらに測定感度の大幅な改善を達成することにある。我々は有機化学合成・酵素合成を併用することにより、SAIL アミノ酸をタンパク質の構成アミノ酸全てについて合成することに成功した。SAIL アミノ酸を効率良く、また代謝拡散を伴わずタンパク質に取り込ませるために、大腸菌の無細胞タンパク質合成系を採用し、タンパク質合成収率、安定同位体標識率の上昇と作業の効率化を図った。これによって現在までにいくつかの SAIL タンパク質の調製を行うことが可能となった。SAIL カルモジュリン (M.W.; 17 k) では、通常の ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識カルモジュリンと比べ、側鎖非交換性 ^1H の内の 44 %が ^2H に置換されており、シグナル数も 40 %が削減される。実際に測定したスペクトル群の側鎖領域におけるシグナルの縮重はこれによって大幅に軽減され、さらにメチル基、メチレン基と芳香環の ^1H 、 ^{13}C は共に大幅な緩和時間の延長を獲得していることも確認された。この従来法から大きく改善されたスペクトルを用いて側鎖の非交換性シグナルも全て帰属した。その過程において芳香環はスピン系が従来とは異なるため、新たに帰属用のパルスシーケンスを開発した。これらの帰属を元に CYANA による精密な立体構造の決定に成功した。

またカルモジュリンのみならず、これまでの NMR 法では立体構造決定が非常に難しかった分子量領域のタンパク質にも SAIL 法の適用を行っている。At3g16450 (M.W.; 32 k)、MBP (M.W.; 41 k) の SAIL 法による解析例も併せて示し、高分子量タンパク質の立体構造決定に向けた我々の取り組みと展望を紹介したい。

安定同位体標識核酸を利用した hnRNP D タンパク質-テロメア DNA
及び Tat タンパク質-RNA アプタマーの構造解析

(¹横浜国大・院環境情報、²京大・院理、³産総研) 榎園能章¹、小西由紀¹、
丸本佳代子¹、大橋肅¹、松上明正¹、田村裕介¹、工藤倫子¹、徐みんす¹、
上杉晴一¹、石川冬木²、Penmetcha Kumar³、〇片平正人¹

Structural analyses of the hnRNP D protein-telomere DNA complex and the Tat protein-RNA aptamer complex with isotope-labeling of nucleic acids

(¹Yokohama Natl. Univ., ²Kyoto Univ., and ³Natl. Inst. Adv. Indust. Sci. & Tech.) Enokizono, Y.,
Konishi, Y., Marumoto, K., Ouhashi, K., Matsugami, A., Tamura, Y., Kudo, M., So, M., Uesugi,
S., Ishikawa, F., Kumar, P. and Katahira, M.

We have determined the structure of hnRNP D protein-telomere DNA complex with the assist of isotope-labeling of DNA. The structure has revealed that each residue of the d(TAG) segment is recognized by hnRNP D in a base-specific manner. It is revealed that hnRNP D unfolds the quadruplex of telomere DNA upon binding. We have also analyzed the structure of the RNA aptamer for HIV Tat complexed with a partial peptide of Tat. The mechanism of the extremely high affinity of the RNA aptamer has been suggested.

安定同位体標識した DNA 及び RNA を有効に利用する事で、以下の2つのタンパク質-核酸複合体に関する構造解析を行った。

①hnRNP D タンパク質-テロメア DNA

hnRNP D(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D)は一本鎖テロメア配列 DNA 及び RNA に結合するタンパク質で、二つの核酸結合ドメイン (BD1 及び BD2) を有している。我々はこれまでに両ドメイン及び関連ドメインの構造解析を報告してきた(1-3)。今回はテロメア配列 DNA d(TTAGGG)と BD2 の複合体の構造を NMR により決定した(4)。

解析当初、複合体における DNA のシグナルが帰属できず解析が難航した。そこで安定同位体標識した DNA を用いて解析したところ、核酸残基の共鳴線が、タンパク質と相互作用している部位で選択的に消失している事が判明した。核酸の HSQC シグナルを指標にして複合体の溶液条件を検討した結果、すべての核酸シグナルを観測できるようになり、解析が進行するようになった。またテロメア DNA は複合体を形成すると伸びた構造をとる為、らせん状の核酸構造に適用される通常の連鎖帰属法はうまく機能しなかった。一方フリーのテロメア DNA の帰属は通常の連鎖帰属法によって行う事ができる事が分かった。そこで DNA を少しだけ過剰に加えてフリーの DNA を溶液中に存在させ、フリーの共鳴線と複合体の共鳴線の間の交換ピークを利用する事で、複合体におけるテロメア DNA の帰属を行った。

テロメア、hnRNP、Tat、アプタマー、水素結合

えのきぞのよしあき、こにしゆき、まるもとかよこ、おおはしきよし、まつがみあきまさ、
たむらゆうすけ、くどうみちこ、そみんす、うえすぎせいいち、いしかわふゆき、Penmetcha
Kumar、かたひらまさと

BD2 は d(TTAGGG) の T2, A3, G4 の 3 残基と主に相互作用していることが分かった。T2 の塩基は Y244, E253 及び K255 の側鎖と水素結合を形成していた。A3 及び G4 の塩基は各々 F185 及び F227 とスタッキング相互作用をしていた。また A3 の塩基は A257 及び M258 と疎水相互作用を、一方 G4 の塩基は K183 の側鎖及び M258 の主鎖と水素結合を形成していた。G4 に関しては、リン酸基との静電相互作用も見られた。結合に関与することが構造学的に分かったアミノ酸残基をアラニン残基等に置換した変異 BD2 を作製し、d(TTAGGG) との結合をゲルシフト法で解析した。また d(TTAGGG) の A3 及び G4 を各々 G と A に置換した変異テロメア配列 DNA と野生型 BD2 の結合も同様に解析した。その結果、いずれの変異体も野生型に比べ結合力が低下し、同定された相互作用様式が検証・確認された。

テロメア配列の DNA は生理的なイオン環境下で、容易に 4 重鎖構造を形成する。hnRNP D は複合体形成に伴ってこの 4 重鎖をアンフォールドする事が滴定実験より分かった。この活性を利用して DNA に対する分子シャペロンとして働く事で、hnRNP D はテロメア伸長を制御している可能性がある(4, 5)。

② HIV Tat タンパク質-RNA アプタマー

HIV の調節タンパク質である Tat は、ウィルス遺伝子の転写の初期に合成される TAR と呼ばれる RNA 領域に結合することで、その後の転写伸長反応を促進する。試験管内分子進化法により Tat タンパク質に対する RNA アプタマーが得られた。この RNA アプタマーは天然のウィルスの TAR RNA に比べ、Tat タンパク質に対する結合能が 100 倍大きい。この性質を利用して Tat タンパク質をこの RNA アプタマーによって捕捉すると、Tat タンパク質は TAR RNA に結合することができず、結果的にウィルスの遺伝子の発現が抑制されることが分かった。我々はこれまでに Tat の最も単純なアナログであるアルギニンアミドと RNA アプタマーとの複合体の構造を決定してきた(6, 7)。今回はより実際的なアナログとして、Tat タンパク質の RNA 結合部位の部分ペプチドである RKKRR を用い RNA アプタマーとの複合体の解析を行った。

RNA の安定同位体標識を生かした水素結合の解析等から(7-9)、RKKRR の添加によって RNA アプタマーに大きな構造変化が生じることが分かった。またアルギニンアミドは RNA 1 分子あたり 2 分子結合したのに対し、RKKRR は RNA アプタマー 1 分子あたり 1 分子のみ結合することが分かった。RNA アプタマーには上下 2 つのタンパク質結合ドメインがある。RNA と RKKRR 間の分子間 NOE に基づき、上側の結合ドメインには RKKRR の N 末端側が、一方の下側の結合ドメインには RKKRR の C 末端側が結合していることがわかった。上下の結合ドメインで Tat タンパク質の異なる 2 つのアルギニン残基と同時に結合することで、RNA アプタマーは高い親和性を発揮していると考えられる。詳細な相互作用様式を現在決定しているところである。

- (1) Nagata *et al.* *J. Mol. Biol.* **287**, 221-237 (1999). (2) Katahira *et al.* *J. Mol. Biol.*, **311**, 973-988 (2001). (3) Miyanoiri *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 41309-41315 (2003). (4) Enokizono *et al.* *EMBO J.*, submitted (2004). (5) Fukuda *et al.*, *PNAS*, **99**, 12685-12690 (2002). (6) Yamamoto *et al.*, *Genes to Cells*, **5**, 371-388 (2000). (7) Matsugami *et al.*, *Structure*, **11**, 533-545 (2003). (8) Matsugami *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 28147-28153 (2003). (9) Sotoya *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, in press (2004).

NMR IN DISEASE DIAGNOSIS AND TREATMENT MONITORING

C.L. Khetrpal and G.A. Nagana Gowda

Center of Biomedical Magnetic Resonance
Sanjay Gandhi Post Graduate Institute of Medical Sciences
Lucknow-226 014, India

The use of High Resolution NMR for the diagnosis of Bacterial Urinary Tract Infection (UTI), diagnosis and patho-physiology of Malabsorption Syndrome (MS) and assessment of liver function will be illustrated. Detection of the P. aeruginosa bacteria in UTI qualitatively as well as quantitatively is shown from nicotinic acid metabolism using ¹H NMR. In the diagnosis of MS, estimation of D-Xylose by colorimetric method is normally employed. However, such a method is non-specific and requires various chemical steps and they account for possible large errors. For such cases, the use of high resolution NMR is proposed and its definite advantages demonstrated. The utility of proton NMR spectroscopy in the assessment of liver function will be presented by monitoring serum and urine glutamine and urine urea. The studies demonstrate the potential of NMR as a future tool for the routine diagnosis of diseases and treatment monitoring.

Introduction

Applications of NMR in biomedicine have grown exponentially during the past nearly over two decades as Magnetic Resonance Imaging (MRI). MRI as a disease diagnostic modality has surpassed conventional methodologies in many aspects. Although NMR spectroscopy, unlike MRI, has the potential of providing information on a wide range of biological processes at molecular levels, its potentials in biomedicine have not been fully exploited. While *in vivo* spectroscopy applications to humans are still constrained by the problems associated with sensitivity, resolution and shorter T₂ relaxation times, *in vitro* applications to human specimens such as body fluids do not suffer from such constraints and hence it is possible to study them in high and more homogenous magnetic fields. With this in mind, application of high resolution NMR spectroscopy to body fluids in the diagnosis of diseases has been undertaken and the results are presented here in.

METHODS**Bacterial infection**

Nicotinic acid metabolism experiments were performed on the common bacterial strains causing UTI. Bacterial growth media were prepared by addition of nicotinic acid in sterile urine and bacteria. The media were divided into two parts. One part was used for counting bacterial cells by growing them on MacConkey agar medium on culture plates and counting the colonies grown after incubation. The other part was kept for incubation at 37° C with shaking at a speed of 150 rpm, for 6 hours. Subsequently, the bacterial suspensions were removed and the supernatant parts were subjected to NMR experiments.

For quantification purposes, NMR experiments were performed on the bacterial media of *P. aeruginosa* varying from about 10^3 to 10^7 cfu/ml. Control samples in triplicate (without bacteria) were also made under similar conditions and subjected to NMR experiments. Experiments on the urine samples from 30 patients of *P. aeruginosa* infection were also performed. Nicotinic acid was added to the urine, incubated at 37°C and the supernatant was taken for the NMR experiments as explained above in the case of standard bacterial strains.

Malabsorption syndrome

Thirty-five patients with suspected malabsorption syndrome underwent conventional medical tests such as total serum protein, albumin, blood hemoglobin, upper gastrointestinal endoscopy and duodenal or jejunal biopsy. Pre-test urine specimens were collected from patients after overnight fast. The post-xylose test urine samples (after oral injection of xylose) were collected for the first five hours after administration of D-xylose. The post-xylose specimens were used to estimate excreted xylose using colorimetric and NMR methods, independently. The ^1H NMR experiments on post-xylose test urine were performed with water suppression by presaturation. In vitro experiments were also performed on standard solutions of xylose in the presence and absence of glucose using colorimetry and NMR under identical conditions for comparison of the results.

Assessment of liver function

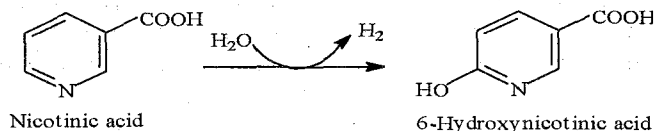
The Serum and urine samples of the seven patients undergoing liver graft were collected on one day before and at every 24 hrs after the transplant till the patients were discharged. The samples were subjected ^1H NMR experiments. Assessment of liver graft was based on biochemical parameters obtained from conventional method.

Results and Discussion

Bacterial infection

In the spectra of *P. aeruginosa* media, Nicotinic Acid (NA) signals were totally absent and, simultaneously, new set of signals were seen. Using two-dimensional experiments, DQF-COSY and HMBC, the new set of signals in the media of *P. aeruginosa* were assigned to 6-hydroxynicotinic acid (6-OHNA).

Pseudomonas group of bacteria metabolize NA giving rise to 6-OHNA as follows:



Therefore, addition of small quantity (about 1 mg/ml) of nicotinic acid to the urine specimen containing the microorganism *P. aeruginosa* yields 6-OHNA after incubation for about 6 hours.

Analyses of the NMR spectra of the bacterial media with variable cell count of *P. aeruginosa* strain showed that the intensity of nicotinic acid signals gradually decreased, while, the intensity of the signals of the 6-OHNA increased with increasing number of

bacterial cells. The spectra of the other bacterial media showed that they do not metabolize nicotinic acid. This suggests that only *P. aeruginosa* metabolises nicotinic acid among the bacteria causing UTI and thus nicotinic acid metabolism is specific to *P. aeruginosa*. Twenty nine out of 30 patients of UTI showed metabolism of nicotinic acid to 6-OHNA as observed by the reduction of the intensity of nicotinic acid signals with concomitant appearance of 6-OHNA signals. However, in one of the samples, 6-OHNA could not be detected under similar conditions owing to its less concentration. The concentrations of 6-OHNA determined from the NMR spectra for 29 patients were in good agreement with that obtained from conventional method. Thus from a single NMR experiment, the identity of the bacteria as well as the viable bacterial count could be obtained.

Malabsorption syndrome

A comparison of the clinical parameters and the values of D-xylose from colorimetry and NMR estimated in urine excreted after ingestion of 5 g D-xylose with or without a definite diagnosis of malabsorption syndrome showed that the Quantity of D-xylose estimated in same urine specimens was higher with NMR than colorimetric method. The colorimetric method showed errors up to 20 % compared to the NMR technique which showed errors up to 7 % only. The large errors from colorimetry are attributed to temperature, time and photo stability of the colored complex employed for the test. The results also explain why colorimetry significantly underestimates quantity of D-xylose excreted as compared with NMR in the same urine specimens.

D-Xylose estimation was also carried out in presence of glucose using both colorimetric as well as NMR methods. There was no significant difference between the xylose estimated in the presence of glucose using NMR method. On the other hand, in the colorimetric method, the presence of glucose interferes with the quantification of the xylose concentration leading to misleading results. Thus colorimetric method may pose a serious problem in uncontrolled diabetic patients.

Assessment of liver graft function

Seven cases of liver transplant were studied. In cases with liver graft dysfunction; serum glutamine increased to abnormal levels along with simultaneous abnormal excretion of urinary glutamine post-transplantation. High levels of glutamine in both blood and urine and concomitant reduced urea levels in urine were found to be evidence of impairment in urea cycle and compatible with persistently abnormal graft dysfunction. Thus glutamine levels in serum and urine and urea in urine as observed by proton NMR spectroscopy highlight their important roles in monitoring liver graft function; increased glutamine levels lead to brain damage, if untreated.

Conclusion:

The studies demonstrate the potential of NMR in the diagnosis of diseases and monitoring of the treatment. During the next few years, it appears that NMR may establish itself as a routine technique for such purposes.

難溶性高分子量タンパク質に適用可能な
NMRシグナル新規帰属法の開発
(三菱化学生命科学研究所)
○河野俊之

Development of a Novel Signal Assignment Method for
Large and Less Soluble Proteins
Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)
Toshiyuki Kohno

NMR methods have been developed rapidly, and we can now automatically assign NMR signals for small soluble proteins. However, it is still difficult to assign NMR signals of large, less soluble, and unstable proteins. To overcome these drawbacks, we have developed a novel assignment method. With this method, we can now assign all the NMR signals of large proteins at 100 – 200 μM concentration, only with 2D NMR measurements. Furthermore, this method may be applied to proteins which are not stable to be analyzed by long 3D NMR measurements.

様々な多次元 NMR 測定法、NMR 装置、解析プログラムの進歩により、アミノ酸 100 残基程度のタンパク質については、各 NMR シグナルの帰属がほぼ自動でできるようになった。しかし、このような自動帰属が可能なタンパク質は、低分子量でかつ高濃度で溶解し、しかも長時間の測定に耐える安定なものに限られているのが現状である。我々は、目的タンパク質を、アミノ酸の種類ごとに $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識アミノ酸と ^{15}N 標識アミノ酸、および標識されていないアミノ酸を系統的に組み合わせて合成する方法を考案した。そして、この標識タンパク質を用いることにより、従来法の必要条件を大幅に緩和し、100–200 μM 程度の低濃度で 1 日程度安定に保てるタンパク質であれば、300 残基以上のタンパク質であっても 2 次元 NMR 測定のみを用いて簡単にシグナルの完全帰属が可能な方法を開発した。本会では、この新規帰属法について報告する。

無細胞タンパク質合成 低濃度 タンパク質安定性 高分子量タンパク質 シグナル
完全帰属法

こうのとしゆき

新規帰属方法

ここでは、 ^1H - ^{15}N HSQC の各シグナルの帰属方法について簡単に述べる。

(1) 一種類のアミノ酸残基（プロリンを除く）を選択的に ^{15}N 標識したタンパク質の 19 種類（必ずしも必須ではない）、及び、一種類のアミノ酸残基のみを選択的に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識し、その他の 19 種類のアミノ酸を ^{15}N のみで標識した目的タンパク質を 20 種類調製する。

(2) 一種類のアミノ酸残基（プロリンを除く）を選択的に ^{15}N 標識したタンパク質の 19 種類の HSQC スペクトルから、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルにおける各シグナルが、どのアミノ酸の種類に属するかを決定する。あるいは、一種類のアミノ酸残基のみを $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識し、その他の 19 種類のアミノ酸を ^{15}N のみで標識した目的タンパク質の 2 次元 HN(CO) 及び 2 次元 HN(CA) スペクトルを比較し、HN(CA) スペクトルに存在し、かつ HN(CO) スペクトルに存在しないシグナルを得ることによって、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルにおける各シグナルが、どのアミノ酸の種類に属するかを決定する。

(3) 一種類のアミノ酸残基のみを $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識し、その他の 19 種類のアミノ酸を ^{15}N のみで標識化した目的タンパク質の HN(CO) スペクトルから、それぞれのシグナルがどの種類のアミノ酸残基の後ろにある残基かを決定する。

(4) (2) (3) の結果とアミノ酸配列表から、アミノ酸の並びを利用してシグナルの帰属を行う。

(5) 連続するアミノ酸の並び方が同一のものが 2 ヶ所以上あるものについては、2 次元 H(N)CA と 2 次元 H(NCO)CA スペクトルを用いて、さらに手前の帰属済みの残基から帰属を決定する。手前の残基が同様の状況により帰属が不確定である場合は、さらに手前の残基から順次帰属を行う。

上記の新規方法を大腸菌チオレドキシタンパク質(108 残基)へ適用した。500 MHz、non cryogenic probe の装置の条件下において、100 μM 程度の濃度のサンプルを用いることによって、帰属に必要な全ての測定を十分な感度と適切な時間で行うことが可能であった。また、測定の後、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの全てのシグナルを帰属するのに要した時間は、手動でも 1 時間強であった。

今回開発した新規手法は、(a)低濃度でも十分な感度でシグナルの取得が可能、(b)選択的標識を用いることによりスペクトルあたりのシグナルが減り、高分子量タンパク質で 2 次元の NMR スペクトルでもシグナルの重なりが少ない、(c)それぞれのサンプルの測定時間が長くても 1-2 日なので不安定なタンパク質でも解析可能、(d)帰属が非常に簡単である、(e)帰属の曖昧さがほとんど無い、といった優れた特徴を持っており、今までの方法では解析が困難であったタンパク質を解析対象にし得る画期的なものであると考えている。

(神戸大院自然¹、神戸大理²、近大生物理工³、Ruhr大Bochum校生物⁴、Regensburg大生化⁵)
 ○服部峰之¹、李華¹、山田博昭²、赤坂一之^{1,3}、W. Hengstenberg⁴、W. Gronwald⁵、H. R. Kalbitzer⁵

Infrequent cavity-forming fluctuations in HPr from *Staphylococcus carnosus* revealed by pressure and temperature-dependent tyrosine ring-flips.

Mineyuki Hattori¹, Hua Li¹, Hiroaki Yamada², Kazuyuki Akasaka^{1,3}, Wolfgang Hengstenberg⁴, Wolfram Gronwald⁵, Hans Robert Kalbitzer⁵

¹Department of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, ²Department of Chemistry, Faculty of Science, Kobe University, Kobe, Japan. ³School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama, Japan. ⁴Ruhr-University Bochum, Dept. of Biology, Bochum, Germany. ⁵University of Regensburg, Institute of Biophysics und Physical Biochemistry, Regensburg, Germany.

Infrequent structural fluctuations of a globular protein is seldom detected and studied in detail. One tyrosine ring of HPr from *Staphylococcus carnosus*, an 88-residue phosphocarrier protein with no disulfide bonds, undergoes a very slow ring flip, the pressure and temperature dependence of which is studied in detail using the on-line cell high pressure nuclear magnetic resonance technique in the pressure range from 3 MPa to 200 MPa and in the temperature range from 257 K to 313 K. The ring of Tyr6 is buried sandwiched between a β -sheet and α -helices (the water accessible area is less than 0.26 nm²), its hydroxyl proton being involved in an internal hydrogen bond. The ring flip rates $10^1 \sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ were determined from the line shape analysis of H^{81,82} and H^{1,62} of Tyr6, giving an activation volume ΔV^\ddagger of $0.044 \pm 0.008 \text{ nm}^3$ (27 ml mol⁻¹), an activation enthalpy ΔH^\ddagger of $89 \pm 10 \text{ kJ mol}^{-1}$ and an activation entropy ΔS^\ddagger of $16 \pm 2 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. These ΔV^\ddagger and ΔH^\ddagger values for HPr and others found previously for Tyr and Phe ring flips of BPTI and Cytochrome c fall within the range of ΔV^\ddagger of 28 to 51 ml mol⁻¹ and ΔH^\ddagger of 71 to 155 kJ mol⁻¹. The fairly common ΔV^\ddagger and ΔH^\ddagger values are considered to represent the extra space or cavity required for the ring flip and the extra energy required to create a cavity, respectively, in the core part of a globular protein. Nearly complete cold denaturation was found to take place at 200 MPa independently from the ring reorientation process.

【序論】近年、タンパク質における構造の動的揺らぎが、中心的研究課題となっている。タンパク質の体積揺らぎをよく表現する物理量として、圧縮率が利用されている。これは、通常、熱力学的または巨視的な物理量として定義されるが、実験的にはタンパク質分子の平均値として、超音波速度と密度測定、および、ホール-バーニング法などの蛍光測定により得られる。しかし、高圧下のX線構造解析や、分子動力学計算の結果が示しているように、圧縮率は圧力による原子間距離の変化という微視的な起源を持っており、フォールドしたタンパク質の構造中においては、均一に起こるものではないと思われる。一方で、溶液中の高分解能NMRは、タンパク質の構造とダイナミックスの圧力効果の微視的研究に有効である。タンパク質の構造と化学シフトの関係は、単純な式では記述できないが、原子間距離の定性的または半定量的目安となる。これまでに、BPTIにおける個々の水素結合距離の見積もりを行うため、アミド基の圧力誘起¹H化学シフトが利用されている。さらに、¹⁵Nの圧力シフトは水素結合の幾何学的効果に加えて、ポリペプチド鎖骨格のコンフォメーションを反映している。これらの加圧によるコンフォメーションの変化は、局所的なコンフォメーションの揺らぎに何らかの形で関連づけられると考えられる。さらに、タンパク質の揺らぎには、早い[ピコ秒からナノ秒]ものから遅い[マイクロ秒からミリ秒]ものと、時間スケールに幅があり、これらの情報は、スピン緩和の面からも検討されている[1]。また、BPTIにおける2次元TOCSY (¹H-¹H 相関) スライススペクトルの Tyr, Phe 残基の芳香族環フリップ運動の頻度の圧力依存性から活性化体積が得られているが、この値は、平均的な体積揺らぎの振幅よりも3倍程度大きい。この結果は、平均を遙かに逸脱した大きな振幅の揺らぎが存在することを示唆する[2]。本研究の目的は、遅い時間スケールの運動モードの一つに分類される、アミノ酸側鎖のうちで最もかさ高い、Tyr, Phe 残基の芳香族環フリップ運動の頻度の温度、圧力依存性を調べることに、このような平均を遙かに外れた大きな振幅の揺らぎに関する情報を得ることである。

【HPrにおける高圧下(200MPa)での低温変性と芳香環フリップ運動の温度・圧力依存性】

HPrは、バクテリアの phosphoenolpyruvate 依存 phosphotransferase system (carbohydrates 輸送システム) の必須の要素である。この過程では、Enzyme I [EI] から Enzyme IIA [EIIA] へ、phosphoryl 基を輸送する。この間に、phosphoryl 基は、瞬間的に活性中心の histidine [His15] N δ 1 原子に結合する。最終的に phosphoryl 基は、Enzyme IIA の histidine 残基から、Enzyme IIB [EIIB] の cysteine 残基へ移される、この phosphorylates と同時に、細胞膜を通して carbohydrate を輸送する[3]。S. carnosus 由来の HPr は、S-S 結合を持たない、小さな球状タンパク質 (88 アミノ酸残基) で、¹H, ¹⁵N NMR スペクトルは、全帰属が行われ、溶液中での3次元構造が、決定された。一般にすべての HPr タンパク質は、4本の反平行の β シートと、この β プリーツシートに向かい合って、3本の α ヘリックスを含んでいる[Fig.1 参照][4,5,6]。

オンラインセル高圧NMR、球状蛋白質、フリップ運動、線形解析、構造揺らぎ

はっとりみねゆき、りふあ、やまだひろあき、あかさかかずゆき、Hengstenberg, W., Gronwald, W., Kalbitzer, H.R.

【実験】*S. carnosus* 由来 HPr 試料は、Regensburg 大学 Kalbitzer のグループより調整されたものを用いた。濃度約 1.5mM の重水溶液で、今回の測定では、バッファーは加えず、常温常圧で、pH=7.571 であった。内部参照物質として、3-(trimethylsilyl)[3,3,2,2-H] propionate-d4 (TSP) と dioxane を微量を加えた。NMR スペクトルの温度、圧力依存性の測定は、Bruker DMX-750 (¹H 周波数、750.13 MHz) において、外径 3.5mm、内径約 1mm の高圧セルを用いて行った。1 次元スペクトルは、32,768 点、スペクトル幅 10kHz で、3072 回の積算を行って得た。また、4096×512 の 2 次元 TOCSY スペクトルでは、スペクトル幅 10kHz で、256 複素ポイントの t1 ドメインと 1024 複素ポイントの t2 ドメインで行い、t1 ドメインの位相敏感検出には TPPI を適用した。水信号の除去には緩和待ち時間の間に飽和パルスを加えて行った。内部参照物質として微量を加えた、TSP (0ppm) または、dioxane (3.75ppm) のメチル基の信号を化学シフト基準とした。

【結果】3MPa、298K における芳香環領域の 1 次元スペクトル 6.53ppm、6.84ppm のピークは、それぞれ、Tyr6 の 3,5-H 及び 2,6-H に帰属されているが、313K から 275K までの温度の低下に伴い、広幅化が観測された。この変化は、他の芳香環のものとは比べて著しい。他の Tyr よりも少し広幅化していた Tyr6 のピークは、200MPa までの加圧により消失した。また、275K、3MPa では、Tyr6 のピークは、消失していたが、200MPa までの加圧により、6.24ppm 付近と 6.47ppm 付近にブロードなピークが現れてきた。200MPa における温度変化からは、308K から 283K の温度の低下に伴い、芳香環族の信号全体に広幅化が観測された。Tyr6 の少しブロードな信号は、283K 付近で、消失した。さらに温度の低い領域では、信号の先鋭化と移動がみられた。芳香環領域の 1 次元スペクトルの圧力・温度依存性から、Tyr6 の 3,5-H 及び 2,6-H に帰属されている (6.53ppm, 6.84ppm, 3MPa, 298K) のピークが、降温および加圧により、広幅化が観測された。Fig.2 に示すように WinDNMR[7]を利用して、線形解析を行い、各温度・各圧力での、 τ から、速度定数 $k(s^{-1})=(2/\tau)$ を計算し、圧力、温度に対する、プロットから活性化体積、活性化エネルギーなどの熱力学パラメーターを求めた。

【結論】球状蛋白質の希な構造揺らぎを検出し詳細な研究をおこなった。ジスルフィド結合をもたない、残基数 88 の phosphocarrier 蛋白質、HPr *S. carnosus* の一個のチロシン環が非常にゆっくりとしたフリップ運動を行っており、オンラインセル高圧 NMR 法を用いて、3MPa から 200MPa の圧力範囲と 257K から 313K の温度範囲について、圧力と温度依存の詳細な解析を行った。Tyr6 の芳香環は、 β -シートと α -ヘリックスに挟まれているが、フリップ運動の頻度が、線形解析により 10^1 - $10^5 s^{-1}$ と計算され、活性化体積が $26.7 ml mol^{-1}$ 、活性化エンタルピー $87 \pm 20 kJ mol^{-1}$ 、活性化エントロピー $16 \pm 3 J K^{-1} mol^{-1}$ と決定された。既に決定されている、BPTI や Cytochrome c の芳香環のフリップでの値と同程度で、この結果は、リングフリップの際に、球状蛋白質のコアにおいて余分な空間と余分なエネルギーを必要としていることを表している。この結果を一般化するならば、多くの球状蛋白質のコア中心部において、非常に大きな体積がときどき出現するという驚くべき事実を示しているのである。

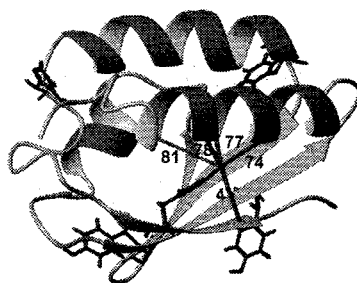


Figure 1. The three-dimensional structure of HPr from *S. carnosus*. The lowest energy structure of HPr from *S. carnosus* [5] is depicted, the aromatic residues are highlighted. In addition, NOE-contacts of the hydroxyl proton of Tyr6 are indicated.

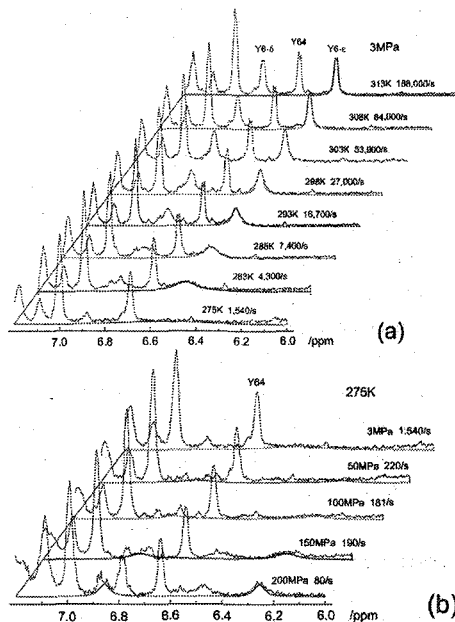


Figure 2. Simulation of the ring dynamics of Tyr6. The line shape of the ¹H^{1,2}-resonance(s) of Tyr6 were fitted with the program WinDNMR. (a) fit of the experimental data recorded at 3 MPa at various temperatures and (b) at 275 K and various pressures.

[References]

- [1] Akasaka K. and Yamada H. 2001. On-Line Cell High Pressure Nuclear Magnetic Resonance Technique: Application to Protein Studies. in *Methods in Enzymology 338: Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules Part A* (T. L. James et al., eds.), Academic Press, 134-158.
- [2] Li H, Yamada H and Akasaka K. 1999. *Biophys J.* 77: 2801-2812.
- [3] Postma PW, Lengeler JW and Jacobson GR. 1993. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.
- [4] Kruse R, Hengstenberg W, Benicke W, and Kalbitzer HR. 1993. *Protein Eng.* 6: 417-423.
- [5] Görler A, Hengstenberg W, Kravanja M, Benicke W, Maurer T and Kalbitzer HR. 1999a. *Appl. Magn. Reson.* 17: 465-480.
- [6] Kalbitzer HR, Görler A, Li H, Dubovskii P, Hengstenberg W, Kowolik C, Yamada H and Akasaka K. 2000. *Prot. Sci.* 9: 693-703.
- [7] Reich JP. 1995. WinDNMR: Dynamic spectra for Windows. *J. Chem. Educ.* 72: 1086.

1L9 配向依存的な TROSY シフト変化に基づく分子配向解析

(1 生物分子工学研究所)

森内 寛¹、横山貴男¹、笠井信幸¹、○楯 真一¹

Molecular alignment tensor determination by orientation-induced TROSY shift changes

Hiroshi Moriuchi, Takao Yokoyama, Nobuyuki Kasai, and Shin-ichi Tate¹

Biomolecular Engineering Research Institute (BERI)

Abstract

We present a new NMR technique for determining the alignment tensor of a weakly aligned protein using only alignment-induced ¹⁵N transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) chemical shift changes. Alignment-induced TROSY chemical shift changes reflect the combined contributions from two different anisotropic spin interactions including the residual dipolar couplings (RDCs) and the residual chemical shift anisotropy effects (RCSAs). We show here that these two residual anisotropic spin interactions' values, encoded in the TROSY chemical shift changes, can be used to determine a weakly aligned protein's alignment tensor. To prove the significance of this method, we show that our TROSY-based analysis gives the consistent alignment angles with those determined using RDCs for ¹⁵N-labeled ubiquitin (8.6kDa) in an aligned medium, within an uncertainty range estimated by considering experimental and structural noises, being 5 degrees at most. Its application to larger proteins will be presented.

Introduction

The inclusion of anisotropic spin interactions, particularly residual dipolar coupling (RDC), in macromolecular solution NMR experiments provides useful techniques for protein structure analysis. A notable RDC application, which gives global structural information by incorporating all bond vectors into a single alignment axis system, is the determination of the relative orientation of domains or subunits in a protein. For this application, starting with the X-ray coordinates of a protein, the RDCs are then used to reorient domains or subunits and, by doing so, the technique provides a rapid means of establishing an average solution structure of a multi-domain or multi-subunit protein. This RDC-based approach is useful when determining the solution structures of large proteins composed of domains or subunits, and especially when the quantitative elucidation of a structural change caused by, for example, ligand binding is sought. However, the presently available experiments to measure the RDC, which are all basically F₁-coupled HSQC spectroscopy, should not be applied to multiple-domain proteins or proteins composed of subunits that have a molecular weight of typically more than 40 kDa. This molecular weight limitation

¹ *Keywords* : NMR, residual dipolar coupling, chemical shift anisotropy, bicelle
もりうち ひろし、よこやま たかお、かさい のぶゆき、たて しんいち

is the practical drawback for RDC experiments when attempting to assess the relative orientations of a protein's domains or subunits.

For large proteins, the upfield ^{15}N - ^1H doublet component in an F_1 -coupled HSQC spectrum is broadened to reduce spectral resolution and its intensity is concomitantly weakened as a result of interference between ^1H - ^{15}N dipolar coupling and ^{15}N chemical shift anisotropy relaxation mechanism. On the other hand, the downfield ^{15}N - ^1H doublet component remains sharp and intense even in the spectra of large proteins. This downfield component is the ^1H -coupled analogue, along ^1H dimension, to that which is observed in TROSY experiments, where the narrowest of the four possible heteronuclear-multiplet components is selected. Because the RDC is measured by the alignment induced modulation to $^1J_{NH}$ appearing as difference in frequency between the doublet components in a F_1 -coupled HSQC spectrum, the rapid transverse relaxation of the upfield doublet component severely limits the accuracy of the RDCs for large proteins. In our approach, you need only to measure the orientation induced TROSY shift changes along ^{15}N axis, which contain two contributions from the RDC and residual chemical shift anisotropy effect (RCSA). Therefore, you can take full advantages of the TROSY in measuring ^1H - ^{15}N correlation spectra for high molecular weigh proteins. In this presentation, we are going to evaluate the significance of this method using ubiquitin. We will also present its application to larger proteins to determine their relative domain orientation in solution.

Method

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

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

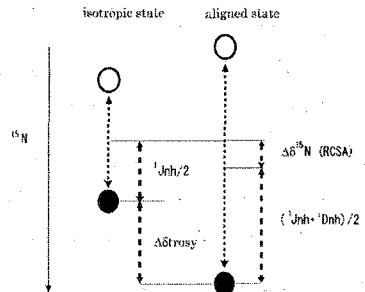


Figure 1: Relation of the RDC and $\Delta\delta^{15}\text{N}(\text{trosty})$

where ϕ_i^{nh} is the angle of the NH bond vector 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 alignment relative to the magnetic field.

The above equation can relate the experimentally obtained $\Delta\delta^{15}N_{(trosy)}$ 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.

Result

In the present work, we compared the alignment tensor values determined under various assumptions to address the following questions in using this approach. 1) How effective is the quality of the reference coordinate in the TROSY based alignment tensor analysis; RDC based refinement is essential to obtain the accurate alignment tensor? 2) The consideration of the RCSA contribution to the TROSY is essential? 3) How dependent are the resultant alignment tensor angles on the variation of input ^{15}N CSA tensors.

The compared data are listed in Table I. We shortly summarize the results below.

- Considering the experimental noises in measuring peak positions and the structural noises representing local fluctuation of NH bond vector, which are assumed to be in random precession in a cone with tilted angle by 5 degrees, from its original orientation, these noises essentially, determine the uncertainties. In terms of the alignment angles, the uncertainties are 5 degree at most.
- The RDC refinement is not essential to determine the alignment angles within the intrinsic uncertainties, although the direct use of the X-ray coordinate with proton attached showed significant reduction in the quality-factor of the resultant tensor.
- Although the contribution of RCSA is less than that from RDC to TROSY, it can not be ignored in determining the alignment tensors. The resultant alignment tensor angles, with ignoring the RCSA terms, were out of the uncertainties.

We are now working on the application of the method to proteins with multiple domains to determine their relative domain orientation in solution. The results will also be mentioned in the presentation.

References

1. Kurita, J., Shimahara, H., Utsunomiya-Tate, N., Tate, S., Measurement of ^{15}N chemical shift anisotropy in a protein dissolved in a dilute liquid crystalline medium with the application of magic angle sample spinning, *J. Magn. Reson.*, 163, 163-173 (2003).
2. Tate, S., Shimahara, H., Utsunomiya-Tate, N., Molecular-orientation analysis based on alignment-induced TROSY chemical shift changes, submitted

Table 1 : Alignment tensor magnitudes and orientations in ^{15}N labeled ubiquitin determined from $\Delta\delta_{\text{TROSY}}$ values with various ^{15}N CSA tensors.

Results [ref.]	$\Delta\sigma/\text{ppm}^{1)}$	$\eta^{2)}$	$\beta/\text{deg.}^{3)}$	$A_{zz}^{4)}/10^{-4}$	$A_{yy}/10^{-4}$	$A_{xx}/10^{-4}$	Euler angles / deg. ⁵⁾			Q-factor ⁶⁾
							α	β	γ	
$\Delta\delta_{\text{TROSY}}(1.02\text{\AA})$	-168.1 \pm 4.3	0.19 \pm 0.02	17.7 \pm 0.5	-9.48 \pm 1.89	7.79 \pm 1.56	1.69 \pm 0.40	82.1 \pm 4.9	74.0 \pm 2.4	72.9 \pm 2.9	0.43 \pm 0.04
$\Delta\delta_{\text{TROSY}} 1.04 \text{\AA})$	-158.5 \pm 4.1	0.19 \pm 0.02	17.7 \pm 0.5	-10.10 \pm 1.90	8.30 \pm 1.57	1.80 \pm 0.41	82.0 \pm 4.5	73.9 \pm 2.3	72.8 \pm 2.8	0.43 \pm 0.04
RDC-str.(1.02 \AA)	-166.9	0.19	17.7	-10.66	8.82	1.85	80.9	73.2	73.0	0.29
RDC-str.(1.04 \AA)	-157.5	0.19	17.7	-11.30	9.35	1.96	80.9	73.2	73.0	0.29
X-ray-str.(1.02 \AA)	-166.9	0.19	17.7	-10.77	8.67	2.10	79.0	75.7	71.3	0.38
X-ray-str.(1.04 \AA)	-157.5	0.19	17.7	-11.42	9.19	2.23	79.0	75.7	71.3	0.38
Liq.NMR-1	-162.5	0.19	20.0	-10.98	9.03	1.95	81.4	73.3	72.8	0.27
Liq.NMR-2	-174.4	0.15	18.7	-11.70	9.56	2.14	82.2	73.3	72.7	0.27
Solid NMR-1	-168.8	0.22	24.5	-10.07	8.22	1.84	82.0	73.4	72.5	0.27
Solid NMR-2	-151.5	0.02	18.6	-10.83	9.03	1.80	80.8	73.6	73.8	0.31
Solid NMR-3	-164.4	0.06	22.0	-10.53	8.68	1.85	81.8	73.6	73.3	0.29
Average	-164.3 \pm 8.5	0.13 \pm 0.09	20.8 \pm 2.5	-10.82 \pm 0.60	8.90 \pm 0.50	1.92 \pm 0.14	81.6 \pm 0.6	73.4 \pm 0.1	73.0 \pm 0.5	0.28 \pm 0.02
RDC derived				-13.28 \pm 0.27	10.98 \pm 0.27	2.29 \pm 0.15	82.5 \pm 1.3	74.9 \pm 1.0	74.9 \pm 1.0	0.14 \pm 0.01
RCSA ingored				-5.98 \pm 0.15	5.20 \pm 0.14	0.78 \pm 0.08	75.8 \pm 1.5	74.8 \pm 1.2	73.3 \pm 1.3	0.55 \pm 0.02

1) $\Delta\sigma = \sigma_{11} - (\sigma_{22} + \sigma_{33})/2$. σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} values are the ^{15}N CSA tensor components.

2) $\eta = [(\sigma_{\text{int}} - \sigma_{\text{min}})/\sigma_{\text{max}}]$, where the subscripts maximum (max), minimum (min), and intermediate (int) refer to the absolute magnitudes of σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} .

3) The angle β is defined as the angle between the σ_{11} axis and the NH bond in a peptide plane.

**Conformational study of membrane-active antibiotics in bicelle
 using high-resolution NMR**

(Department of Chemistry, Gradient School of Science, Osaka University)

○Atsushi Morooka, Nobuaki Matsumori, Michio Murata

Although there are many membrane active compounds targeting at biological membrane and membrane proteins, the general way to define the conformations of the membrane-active compounds binding to biological membrane is not yet established. In order to develop a method for the conformational studies in membranes using solution NMR, we employed phospholipid bicelles as a membrane bilayer model. The compounds in small, unoriented bicelles gave high-resolution NMR spectra allowing measurements of the coupling constants ($^3J_{H-H}$) and NOEs. Here we present the conformations, orientations, and locations of erythromycin A and salinomycin-Na complex in bicelles

【序】

生体膜や膜蛋白質をターゲットとした膜作用性物質が多数あるにもかかわらず、生体膜等に結合した状態での三次元構造解析法は未だ確立されていない。そこで我々は、リン脂質二重膜モデルとしてバイセル (Fig.1) に着目し、溶液NMRを用いた高分解能二次元測定による立体構造解析法の開発を目的とした。今回、磁場配向性バイセルは用いず、小型のバイセルが磁場に対して等方的に存在することを利用した¹。この磁場非配向性バイセルに膜作用性物質を含有させる事で、脂質二重膜に結合した状態でも高分解能のスペクトルが測定可能となる。膜作用性物質としてエリスロマイシン A 及びサリノマイシン-ナトリウム塩 (Fig.2) について検討を行い、膜中での配座および膜中での存在状態の解明を試みたので報告する。

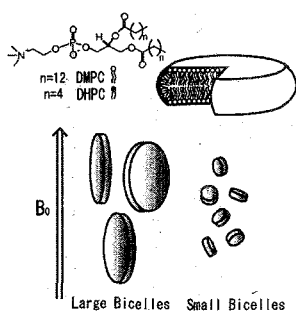
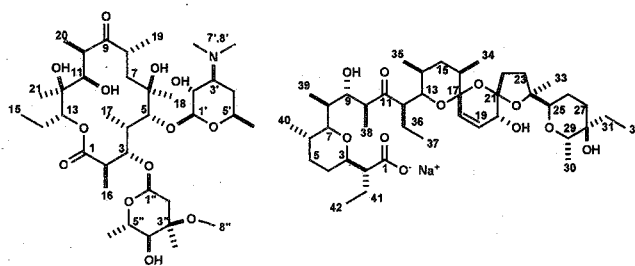


Fig. 1 Oriented and unoriented bicelles.



Erythromycin A

Salinomycin-Na

Fig. 2 Structures of erythromycin-A and Salinomycin-Na⁺ salt.

【試料調製】

磁場非配向性の小型バイセルは、膜作用性物質由来ピークの観測を容易にするために、アシル鎖が重水素化されたリン脂質を用いて調製した。混合比率は長鎖脂質 [d₅₄-dimyristoyl-sn-phosphatidylcholine (d₅₄-DMPC)] : 短鎖脂質 [d₂₂-dihexanoyl-sn-phosphatidylcholine (d₂₂-DHPC)] をモル比で1:2とした。エリスロマイシン A は酸性リン脂質と強く相互作用するので、エリスロマイシン A 含有バイセルには、長鎖脂質の 10 mol % の割合で d₅₄-dimyristoyl-sn-phosphatidylglycerol (d₅₄-DMPG) を混合させた。全脂質に対しエリスロマイシン A

キーワード: バイセル エリスロマイシン サリノマイシン スピン結合定数 配座解析

もろおか あつし、まつもり のぶあき、むらた みちお

は 10 mol%、サリノマイシン-ナトリウム塩は 5 mol% とした。

【結果と考察】

エリスロマイシン A は 14 員環マクロライド系抗生物質で、副作用として酸性リン脂質と結合して脂質分解酵素 PLA1 を阻害し、リン脂質症を引き起こすことが報告されている²。この分子は、すでに CDCl_3 および D_2O 溶液中での配座が報告されている事から^{3,4}、脂質二重膜中での配座との比較が可能である。

本研究では、主に NOESY と DQF-COSY を用いて解析を行った。DQF-COSY によるアグリコンの各 $^3J_{\text{H-H}}$ の値は、溶液中 (CDCl_3 ³, D_2O ⁴) の値と比較して、大幅な違いは見られなかった。そこで、得られた制限情報を基に MacroModel による制限付き分子動力学計算を行うことで、バイセル中のエリスロマイシン A の三次元立体構造を溶液中と同程度の精度で求めることに成功した (Fig.3)。

次に、常磁性物質をサンプルに添加することで、エリスロマイシン A の脂質二重膜中での存在位置を決定した。分子中の各水素原子の縦緩和時間 (T1) は、常磁性部位からの距離に近いほど大きく減少する⁵。今回、常磁性物質として Mn^{2+} 、5-DOXYL-PSPC、12-DOXYL-PSPC をそれぞれ添加し、エリスロマイシン A の各水素原子の中で、より強く減衰を受ける部位を特定した (Fig.4)。ジメチルアミノ基近傍の水素原子の T1 は、 Mn^{2+} を添加した時に大きく減衰したため、膜表面付近に存在していると考えられる。これに対し、アグリコンの水素原子の T1 は各 DOXYL-PSPC を添加した時に減衰したため、疎水部付近に存在していると考えられる。これらの結果より、全体としてエリスロマイシン A は膜の親水部と疎水部の界面付近に存在していると考えられる。このことは、エリスロマイシン A がリン脂質のエステルと相互作用を有し、脂質分解酵素 PLA1 の接近を立体的に阻害していることを示唆している。

現在、イオノフォア分子であるサリノマイシンについても同様の実験を行っており、発表ではこれらの結果を合わせて報告する予定である。

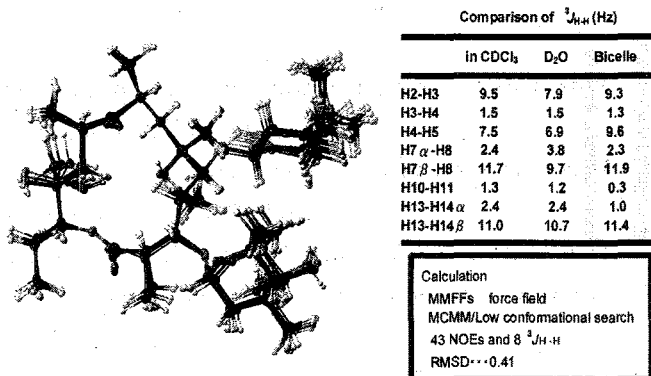


Fig.3 A superposition of 14 conformations of erythromycin-A in bicelles.

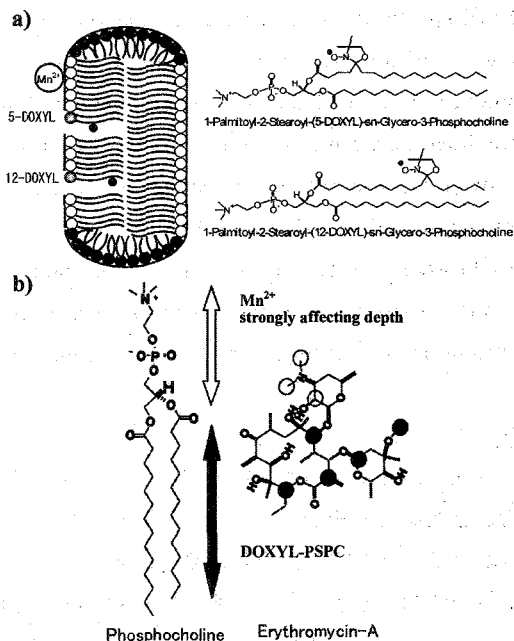


Fig.4 a) Schematic representations of positions of the paramagnetic agents in bicelles, b) the depth along phosphocholine and erythromycin-A molecules affected by each paramagnetic probe.

- Reference [1] J. Guo et al. (2003) *J. Medicinal Chem.* **46**, 4838-4846
- [2] J. P. Montenez et al. (1999) *Toxicology and Applied Pharmacology* **156**, 129-140
- [3] J. R. Everett, J. W. Tyler (1987) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1659-1667
- [4] F. Commodari et al. (1998) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1947-1956
- [5] J. Villalain et al. (1996) *Eur. J. Biochem.* **241**, 586-593

(¹理研・遺伝生化学, ²理研・生体超分子構造・機能研究G, ³横浜市大院・分子生理学,

⁴CREST/JST, ⁵藤田保衛大・総医研・医高分子)

○吉益雅俊^{1,4}, 美川 務^{1,2,3,4}, 片岡義朝^{1,2,3,4}, 林 宣宏⁵, 柴田武彦^{1,2,3},

伊藤 隆^{1,2,3,4}

Direct analysis for the conformation and dynamics of proteins in living cells using In-Cell NMR spectroscopy.

○Masatoshi Yoshimasu^{1,4}, Tsutomu Mikawa^{1,2,3,4}, Yoshitomo Kataoka^{1,2,3,4}, Nobuhiro Hayashi⁵
Takehiko Shibata^{1,2,3,4} and Yutaka Ito^{1,2,3,4}

¹Cell. & Mol. Biol. Lab., RIKEN; ²Res. Gp. Bio-supramol., RIKEN; ³Grad. Schl. Integ. Sci.,
Yokohama-City Univ.; ⁴CREST/JST (Japan Science and Technology); ⁵Fujita Hlth. Univ.

In vivo detection of structural information of proteins is strongly required for the explicit understanding of structural basis of their functions in living systems. Recent developments of NMR spectroscopy allowed us to observe high resolution heteronuclear multi-dimensional NMR spectra of an overexpressed protein inside living cells. This "In-Cell NMR" method can be potentially applied for detecting a variety of structural information including posttranslational modifications, conformational changes, and interactions in living systems.

In this presentation, we report our recent applications of In-Cell NMR to several proteins overexpressed in *E. coli* cells. We also describe the evaluation of conditions for sample preparation and the optimisation of parameters for In-Cell NMR measurements. Furthermore, future perspectives on the methodological developments for resonance assignments, detection of protein-protein interactions, etc. will be discussed.

序

現在、核磁気共鳴(NMR)や X 線結晶構造解析により様々な蛋白質の高次構造が決定され、その構造と機能との相関が明らかにされつつある。生体内において、蛋白質は複数の蛋白質・核酸・補助因子などと相互作用し複雑な機能の担い手となる。このため、蛋白質の機能を理解する上で、生体内における蛋白質の動態、経時的な構造変化、基質や他の蛋白質との相互作用などを解析することは非常に重要な意味を持つ。従来の NMR 分光法は、試験管内における蛋白質の状態変化および基質や他の蛋白質との相互作用について高分解能で解析することが可能である。また、他の生化学的な手法に比べて弱い相互作用を高感度に検出することができる。しかし、従来法では

Key Words : In-Cell NMR, 蛋白質, 細胞, *in vivo*, 蛋白質間相互作用

よしますまさとし, みかわつとむ, かたおかよしとも, はやしのがひろ, しばたけひこ, いうゆたか

安定同位体標識した高濃度の蛋白質試料を調製して測定を行なう必要があり、そのまま生体内の蛋白質の解析に適用することは困難であった。そこで本研究では、蛋白質を発現させた細胞を試料とし、生体内蛋白質の NMR シグナルを直接観測する In-Cell NMR 法を用いて、生細胞中での蛋白質の動態やその相互作用をより短時間で簡便に検出・解析可能にする NMR 測定法の検討を行ったので報告する。

試料調製および NMR 測定の概要

測定対象とする生細胞として既に安定した蛋白質の発現系が確立されている大腸菌を使用し、大腸菌の細胞質中にある蛋白質の NMR スペクトルの観測を試みた。大腸菌は安定同位体標識化合物を含まない M9 培地中で培養し、菌体数が約 4×10^8 cells/ml になったところで低速遠心により菌体を回収し、安定同位体標識化合物を含む M9 培地に再懸濁した。そして、T7 プロモータを利用した蛋白質の発現誘導を行ない、数時間後の菌体を遠心により回収して NMR 試料管に充填し、NMR スペクトルの測定を行なった。In-Cell NMR 測定には理化学研究所和光研究所の Bruker 社製 DRX600 スペクトロメータおよび低温 3 重共鳴プローブ (1 軸グラジエント) を用い、測定温度は大腸菌の生育温度にあたる 37°C とした。 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトルについては、 $512 ({}^1\text{H}_N, t_2) \times 64 ({}^{15}\text{N}, t_1)$ ポイントの complex data を約 20 分間で、あるいは $512 ({}^1\text{H}_N, t_2) \times 128 ({}^{15}\text{N}, t_1)$ ポイントの complex data を約 40 分間で観測し、AZARA v2.7 [Wayne Boucher (Cambridge Univ.), unpublished] を用いて Linux PC 上でデータ処理を行なった。

試料調製条件の検討

In-Cell NMR の測定条件は大腸菌にとって必ずしも適した環境ではない。高密度に濃縮され、酸素濃度が著しく低い条件下では、大腸菌試料は多大なストレスに晒されており経時的に菌体が生命活動を停止し死に至る。そして、死菌からは徐々に標的となる蛋白質を含む細胞質成分が懸濁液に流出し、得られるスペクトル上に非常にシャープな線形を持つシグナルとして観測される。そこで、測定中の大腸菌の経時的な変化を観測するため、まず恒温層を用いて実際の測定を模した環境を構築し、20 分ごとに試料から一部をサンプリングして、顕微鏡下での菌の状態と SDS-PAGE による死菌からの標的蛋白質の流出について観察した。そして、使用する大腸菌株の系統や発現誘導条件、発現誘導を行なってから回収するまでの時間、測定時に菌体を懸濁する溶液などの In-Cell NMR 測定に必要な種々の条件検討を行ない、実際に In-Cell NMR 測定を行ないながら最適な条件を模索した。その結果、Fig.1 にあるように測定に十分な蛋白質量を発現させ、かつ試料調製から最低 1 時間後

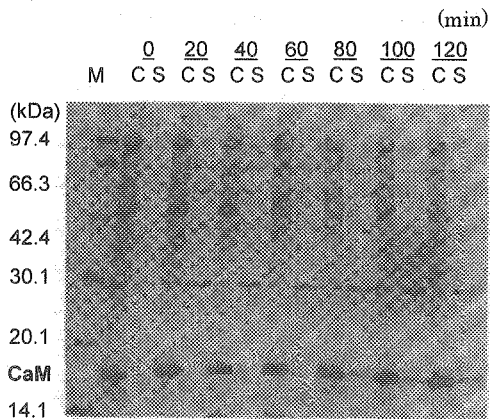


figure 1.
SDS-PAGE (15-25%) of NMR sample. The letters "M", "C" and "S" correspond to "Molecular weight marker", "2 μl of Cell lysate dissolved in 100 μl BugbusterTM (Novagen) with lysozyme" and "2 μl of Supernatant of Cell suspension solution", respectively. And numbers above the "C,S" symbol meant times after sample preparation.

までは標的となる蛋白質が懸濁液側に流出しないような試料の調製条件を決定した。しかし、この条件については汎用的なものではなく発現誘導を行なう蛋白質の性質により変化するため、試料ごとに条件を設定しなおす必要がある。発表に用いている全ての蛋白質発現系については、それぞれ条件検討を行ない最適な条件を設定した上で測定を行なった。また、全ての測定において測定終了後速やかに試料の一部を回収し、SDS-PAGEによる菌体外への標的蛋白質の流出について分析を行なった。

In-Cell NMR スペクトル

In-Cell NMR 測定では、試料となる大腸菌が生きた状態で維持されている必要があり、測定には時間的な制約があるため、限られた積算回数とポイント数の内で可能な限り高分解能のデータをとらなくてはならない。また、大腸菌の細胞質には非常に雑多な物質が高密度に存在し、蛋白質の運動性が明らかに低下するような条件になっているため、得られるスペクトルは緩衝液中のものに比べてブロードになる。その上、発現した蛋白質の性質により、二量体以上の複合体を形成する場合や、大腸菌由来の蛋白質・染色体・菌体内膜などと強く相互作用し複合体を形成する場合は、蛋白質のシグナルは極度にブロードニングしてしまい観測することはできなくなってしまふ可能性が高い。このため、SDS-PAGEなどで得られた蛋白質の発現量と NMR シグナルの強度は必ずしも一致しておらず、標的とする蛋白質によって測定感度が大きく変わることがわかった。Fig.2には、最も感度の高いスペクトルが得られた、*S. cerevisiae* の Mre11 蛋白質の C 末端ドメイン (scMre11-C) について、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を含む M9 培地中で蛋白質の発現誘導を行なった菌体と未誘導の菌体で In-Cell NMR 測定を行なった際の $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトルを示す。

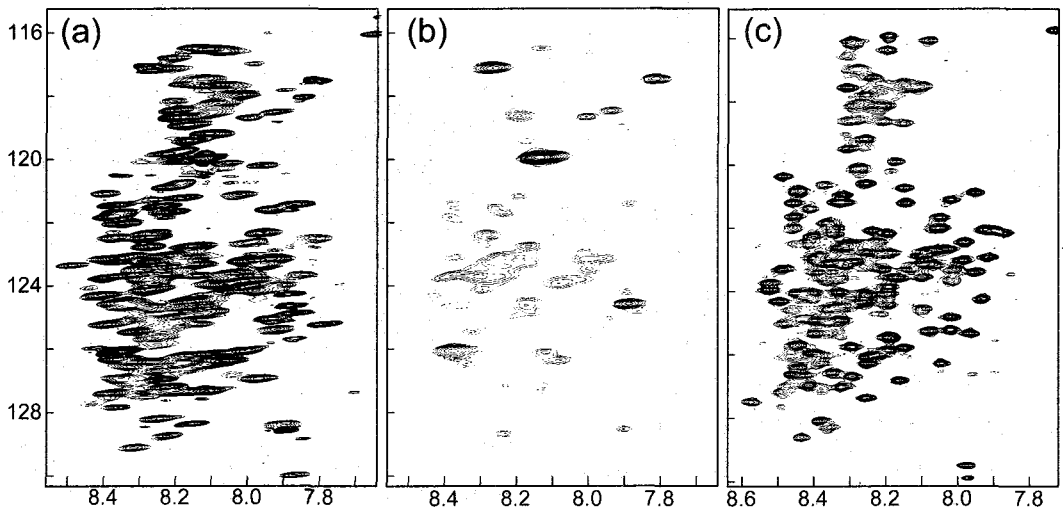


figure 2

$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of scMre11-C. (a,b,c) *E. coli* cells grown in M9 medium including $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and 1 mM IPTG (scMre11-C expressed cells) (a), *E. coli* cells grown in M9 medium including $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (no protein expressed cells) (b) and 0.1 mM of ^{15}N -scMre11-C containing 50 mM potassium phosphate, pH 6.5 (c). The total acquisition times for two In-Cell NMR spectra (a) and (b) were approximately 20 min each, collecting 64×512 complex points along t_1 and t_2 , respectively. All of In-Cell NMR spectra were acquired at 310K on a Bruker DRX600 spectrometer with CryoProbeTM.

Fig.2(a)(b)に示すように、蛋白質の発現誘導を行なうことで強発現された蛋白質に由来するクロスピークを観測することができ、標的蛋白質に由来すると考えられる Fig.2 (a)で観測されているクロスピークのパターンと、(c)で示した溶液中の蛋白質スペクトルのパターンを比較すると、全領域にわたり非常に類似性の高いスペクトルが得られていることがわかった。さらに、菌体懸濁液に 0.1U の Proteinase K を加えて測定を行なった場合に、SDS-PAGE 上ではまったく蛋白質由来のバンドを検出することができないにも関わらず、Fig.2(a)と変わらないスペクトルが得られたことから、得られたスペクトルは大腸菌内に存在する *scMre11-C* に由来するものであると考えられる。

また、上図 2(b)に示すように蛋白質の未発現誘導時であっても、 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトル上にはいくつかのピークが現れる。これは大腸菌を構成する窒素原子を含む要素も標的蛋白質と同様に ^{15}N で標識されてしまったためであると考えられ、発現誘導にかかる時間に比例して強度が増えることがわかった。さらに、この *scMre11-C* については、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ に加えて $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -標識アミノ酸を加えた M9 培地中で培養し、標的蛋白質のアミノ酸選択標識を行なった試料で 3 重共鳴 NMR 測定を行ない、菌体内に存在する蛋白質について主鎖シグナルの帰属の可能性を見出した。

今後の展望

今後は、大腸菌試料の調製法・標的蛋白質の発現条件にさらなる検討を加え、より簡便に高感度・高解像度の In-Cell NMR 測定を行なうための汎用的な実験系の構築を試みる。さらに、大腸菌に標的蛋白質の基質を添加した際の蛋白質シグナルの経時的な変化、標的蛋白質と結合する特定の金属イオンを多く含む緩衝液や大腸菌に対して低張性あるいは高張性の緩衝液を用いた条件下での蛋白質シグナルの変化の観測を試みる。

また、複製起点の異なる 2 種の発現ベクターを利用して複数蛋白質の共発現系を作成し、2 種以上の蛋白質を共発現させた際の蛋白質の NMR シグナルについて 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトル上で比較し、前述した主鎖シグナルの帰属と併せて蛋白質間相互作用のアミノ酸残基のレベルでの検出・解析を試みる。

1L12 DPGFSE によって選択されたスピン系の SPT スペクトル
○鷗澤 洵、吉田茂男(理研 植物科学研究センター)

Selective Population Transfer Spectrum of spin systems chosen by DPGFSE

Jun UZAWA and Shigeo YOSHIDA

Plant Science Center, RIKEN(The Institute of Physical and Chemical Research)

A new pulse sequence is proposed for the determination of scalar coupling correlation in small- or medium-size organic compounds. The method is uses a combination of the double pulsed field gradient spin echo (DPFGSE) and the selective population transfer (SPT) techniques and is shown to be useful in the analysis of complex spectra with many overlapped signals. The usefulness of this method in the structural elucidation of natural substances is demonstrated using strychnine and other sample¹⁾.

1 緒言

演者らは生理活性物質など自然界に微量に存在する天然有機化合物の構造決定や同定に用いる NMR 測定法の開発を行っている²⁾。これらの化合物は、¹³C や ¹⁵N をラベルできるタンパク質と違い、ほとんどの場合、天然存在比率のまま研究する必要がある。そこで、COSY、HSQC(HMQC)、HMBC 法などの二次元 NMR が使われているが、一次元の Selective-COSY や TOCSY(HOHAHA)も部分構造を知る上で重要な役割をになっており、短時間で必要な情報が得られる測定法の開発が望まれている。

演者らは、優れたプロトン選択照射法である Double Pulsed Field Gradient Spin Echo (DPFGSE) 法^{3,4)}に Selective Population Transfer(SPT)^{5,6)}法を組み合わせる方法について検討し、複雑な微量試料においても有効と思われる結果を得た。SPT 法はスピン結合定数の符号を決定する手段として古くから知られているが、スペクトルの帰属法としても使われている。SPT 法は分裂した 1 本の信号を反転させる程の弱いパワーで実験できるため、特定のプロトンの選択性が勝っている⁷⁾。この両者の特長を活かして、混み合ったスペクトルの解析法として、基本的な動作例に応用例も含めて報告する。

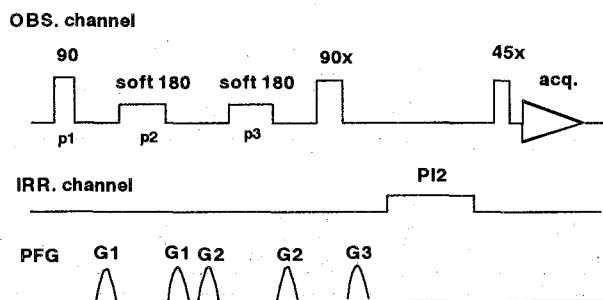
KEYWORDS:DPFGSE; SPT; scalar coupling constant; strychnine; natural products

うざわ じゅん、 よしだ しげお

2 実験条件

装置 JNM- α 400 を使用した。パルス系列は第 1 図(A)に示すように、NOE 観測用パルス系列の前段の部分をそのまま使い、NOE を観測するための mixing time に SPT 観測を照射するように変えた。DPFGSE 照射は観測チャンネルを用い、選択性のポイントを決める SPT 照射を照射チャンネルと使い分けた。これによって、DPFGSE と SPT の照射パワーの最適値を独立して求めることができる。ソフト 180° パルスにはガウスパルスを用いたが、矩形波パルスでも使える。観測パルスは 45° とした。

(A)



(B)

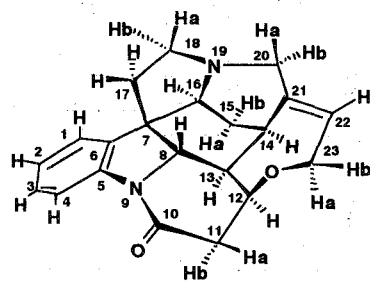


Figure 1 (A) DPGFSE-SPT pulse sequence. The phases are cycled as follows: $p1 = (x, -x)$, $p2 = \{2(x), 2(y), 2(-x), 2(-y)\}$, $p3 = \{8(x), 8(y), 8(-x), 8(-y)\}$, $acq = 2(x, -x, -x, x), 2(-x, x, x, -x)$. The phase cycle provides a difference mode. The PFGs are Z-axis gradients, all 1 ms in duration and with the following levels: $G1 = 32$, $G2 = 28$, $G3 = 14$ gauss/cm. The soft 180° pulses are Gaussian shaped, between 15 and 33 ms in length, the duration depending on the target region being selected. The selective excitation period time (PI2) was between 50 and 200 ms. The RF field strength ($\gamma B_2/2\pi$) is between 1.4 and 5.0 Hz.

(B) Structure of strychnine. Ha are higher field signals and Hb are lower field signals.

2 結果と考察

良く知られている strychnine(第 1 図 B) を例に説明する。SPT の一般的な法則に従って、複数に分裂した信号の低磁場側を照射すればこれとスピン結合した相手側の低磁場側が下向きになり、高磁場側を照射すれば相手側の高磁場側が下向きになる。第 2 図(a)は通常の一次元スペクトルを示し、(a')には H-11b の 4 本に分裂した信号と H-14 が重なっている状態を拡大して示す。この部分を DPGFSE により選択的に照射した後に(b)のように、H-11b の一番高磁場側を照射すると H-11a の高磁場側が下向きになり、H-12 との小さな spin coupling を通した結合で、高磁場側が下向きになる。

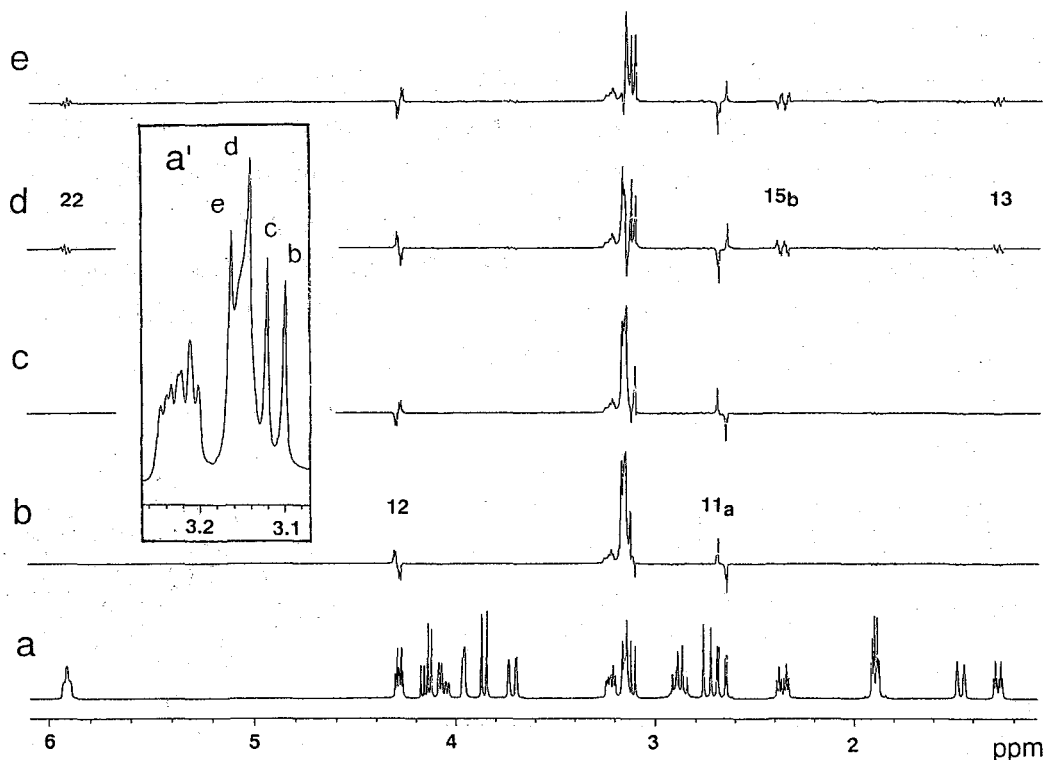


Figure 2 (a) 400MHz ^1H spectrum of strychnine. (a') represents enlargement of region 3.06-3.38 ppm. The label b, c, d, and e indicate the SPT-irradiated positions. (b) Result of the DPFGE-SPT-irradiation at position b. (c) Result of the DPFGE-SPT-irradiation at position c. (d) Result of the DPFGE-SPT-irradiation at position d. (e) Result of the DPFGE-SPT-irradiation at position e. The gauss pulse width, SPT RF irradiation strength and PI2 are 25ms, 3.8Hz($\gamma B_2/2\pi$) and 150ms, respectively.

次に(c)では、高磁場側から2本目を照射すると、H-11aは同様に高磁場側が下向きになるが、H-12は逆に低磁場側が下向きになっている。この二つのピークはH-14との重なりがないので、結合相手はH-11aとH-12だけである。つぎの(d)と(e)では、それぞれH-11の3本目はH-14の高磁場側の肩、H-11の4本目はH-14の低磁場側の肩と重なり合っている。(d)と(e)ではH-11aは大きな変わりがあるが、H-22、H-12、H-15bとH-13はそれぞれ反転している。これらはH-14を取り巻くスピン結合のネットワークを示している。これらの例は、分裂した一本のピークを照射することによって、結合相手が複数の信号に埋もれていても、結合相手の信号を読み取ることができるということと、それぞれのスピン結合によって、分裂したピークが上下に反転するので、他の実験では得られない詳細な情報が得られること

を示している。

通常の SPT では、少し大きな化合物になると、分子運動の影響などで、SPT が成功する条件が厳しくなり、実用的でなかった。このような場合の例として、digitoxin⁸⁾を用いて、DPFGSE-SPT 実験を行った¹⁾。digitoxin は重クロロホルム、ピリジン、ピリジンと重メタノールの混合溶媒中でいずれも糖の 1 位 (アノメリックプロトン) の信号が 3 個とも重なり、他の信号も他と重なっている場合が多く、帰属に時間を要す。3 位が比較的離れているのでこれを手がかりに、DPFGSE-SPT を行い、2 位の帰属を短時間で行った。

照射側も観測側も重なりあったさらに複雑な例を講演で紹介する。

4 結語

DPFGSE-SPT は従来 の SPT に比べると、あらかじめ選択された特定の部分のみを最初に取り出しているのので、溶媒やメチル基など大きな信号を消しているのので圧倒的に S/N がよくなる。DPFGSE-SPT における SPT 条件の設定は従来 の SPT よりも楽に行え、しかも良質のスペクトルが得られる。これまで SPT 法は、少し大きな化合物では非常に難しく、応用例を見なかったが、digitoxin は NOE ではなく ROE を適用する化合物である。この例から、DPFGSE-SPT 法はより広い範囲に適用できることを示唆している。

昨年度の本討論会で報告した一次元の NOE、ROE、TOCSY にホモスピンドカップリングや SPT を組み合わせる測定法²⁾と共に必要に応じて使えば、少ない試料でも有益な構造情報が得られるであろう。もちろん、従来 の COSY、TOCSY、HSQC、HMBC、INADEQUATE など否定する立場ではなく、数ある測定法の必要な場面での使い分けの重要性を強調したい。

参考文献

1. J.Uzawa and S.Yoshida, *Magn.Reson. Chem.*, in press.
2. 鵜澤 洵、藤本康雄、吉田茂男、第 42 回 NMR 討論会要旨集、大阪、11 月、2003.
3. T.L.Hwang, A.J.Shaka, *J. Magn. Reson. A* 1995; **112**: 275.
4. K.Stott, J.Stonehouse, J.Keeler, T.L.Hawang, A.J.Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* 1995; **117**: 4199.
5. R.A.Hoffman and S.Forsen, *Progress in NMR Spectroscopy*. 1966; **1**: 15.
6. S.Braun, H.O.Kalinowski, S.Berger, *150 and More Basic NMR Experiments*, 1998.
7. J.K.M.Sanders and B.Hunter, *Modern NMR spectroscopy* 1987; p.76 and 143.
8. T.Drakenberg, P.Brodelius, D.D.McIntyre and H.Vogel, *Can. J. Chem.* 1990; **68**: 272.

1L13 Maximum Entropy reconstruction to increase sensitivity and resolution

(¹University of California, San Francisco, ²味の素(株) ○榑葉信久^{1,2})

(¹University of California, San Francisco, ²Ajinomoto Co.) ○Nobuhisa Shimba^{1,2})

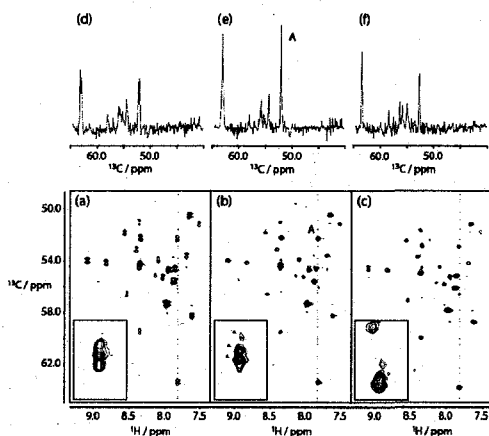
ABSTRACT : Homonuclear ^{13}C - ^{13}C couplings can significantly reduce the sensitivity and resolution of multidimensional NMR experiments. In this presentation, we will show that post-acquisition deconvolution of the spectra with a Maximum Entropy algorithm can be superior to experimental decoupling. The method is very robust, does not introduce shifts of the resonance positions and simplifies the measurement of NMR experiments, such as HNCA¹ and ^{13}C direct detection².

NMR studies of protein structure, dynamics, or intermolecular interactions require the assignment of the polypeptide backbone resonances. Scalar couplings between backbone nuclei provide the information necessary for sequential assignment, but they also present experimental difficulties by splitting resonances, decreasing both resolution and sensitivity. A number of methods, including composite pulse decoupling^{3,4} and adiabatic decoupling^{5,6}, can be used to eliminate this splitting, while retaining the scalar coupling when it is needed to effect coherence transfer. However, decoupling resonances spanning a broad frequency range can be difficult, especially for homonuclear decoupling: Bloch-Siegert effects can perturb resonance frequencies (rendering frequency correlations ambiguous) and the additional RF radiation can lead to unwanted sample heating.

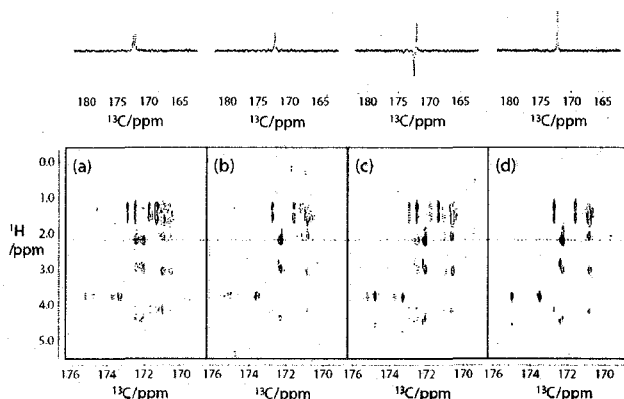
Attempts to use post-acquisition data processing to simplify multiplets in NMR spectra began nearly contemporaneously with the first Fourier transform (FT) NMR experiments⁷. The application of nonlinear methods⁸ beginning in the 1980's provided the basis for robust deconvolution without noise amplification. Nevertheless these methods are not widely used, and continued development and application of experimental approaches attest to a general lack of knowledge concerning the capabilities of nonlinear deconvolution, and/or the dearth of appropriate software. The aim of this presentation is to demonstrate that post-acquisition deconvolution is a viable and sometimes preferable alternative.

Keywords : Maximum Entropy reconstruction, deconvolution, homonuclear coupling, ^{13}C detection

しんば のぶひさ



^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ planes from 3D HNCA experiments with a 0.8 mM sample of a 14-kDa fragment of the transcription factor Cdc5. Data sets of 170 (^{13}C) \times 50 (^{15}N) \times 512 (^1H) complex points were recorded for spectral widths of 3125 (^{13}C), 1370 (^{15}N), and 6410 Hz (^1H) in each experimental time of 21 h. The regions enclosed in dashed boxes are expanded below left. (a) A ^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ plane, taken from a standard HNCA experiment. The $^{13}\text{C}\alpha$ dimension was processed using Fourier transformation, showing the \sim 35 Hz coupling between $^{13}\text{C}\alpha$ and $^{13}\text{C}\beta$. (b) The $^{13}\text{C}\alpha$ dimension was transformed and the coupling was deconvolved with MaxEnt reconstruction. The J value for deconvolution was 36 Hz. (c) A ^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ plane, taken from a Cbd-HNCA experiment. The $^{13}\text{C}\beta$ decoupling was achieved by using a WURST profile. (d) - (f) The 1D cross-sections on top of each section are taken along the ^{13}C dimension at the position indicated by the dashed lines.



^1H - $^{13}\text{C}'$ planes from 3D H(CC)CACO experiments with a 0.5 mM sample of a 25-kDa protein of the ^{13}C labeled KSHV Pr M197D variant. Contour levels are shown just above the noise levels. For the H(CC)CACO experiments, data sets of 33 (^1H) \times 20 ($^{13}\text{C}\alpha$) \times 1024 ($^{13}\text{C}'$) complex points were recorded with spectral widths of 3000 (^1H), 5000 ($^{13}\text{C}\alpha$), and 2520 Hz ($^{13}\text{C}'$). The 1D cross-sections on top of each section are taken along the ^{13}C dimension at the position indicated by the dashed lines. The spectral width of the 1D cross-section is larger than that of the 2D plane, to allow a better representation of the noise level. (a) A ^1H - $^{13}\text{C}'$ plane, taken from the H(CC)CACO experiment with $^{13}\text{C}'$ inphase detection. The $^{13}\text{C}'$ dimension was processed using Fourier transformation, showing the \sim 55 Hz coupling between $^{13}\text{C}'$ and $^{13}\text{C}\alpha$. (b) The $^{13}\text{C}'$ dimension was transformed and the coupling was deconvolved with MaxEnt reconstruction. (c) A ^1H - $^{13}\text{C}'$ plane, taken from the H(CC)CACO experiment with $^{13}\text{C}'$ antiphase detection. (d) The antiphase $^{13}\text{C}'$ - $^{13}\text{C}\alpha$ coupling was deconvolved with MaxEnt reconstruction.

References

- (1) Shimba, N.; Stern, A. S.; Craik, C. S.; Hoch, J. C.; Dötsch, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2382-2383.
- (2) Shimba, N.; Kovacs, H.; Stern, A. S.; Nomura, A. M.; Shimada, I.; Hoch, J. C.; Craik, C. S.; Dötsch, V. *J. Biomol. NMR* **2004**, in press.
- (3) Shaka, A. J.; Keeler, J.; Frenkiel, T.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1983**, *52*, 335-338.
- (4) Shaka, A. J.; Barker, P. B.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1985**, *64*, 547-552.
- (5) Kupce, E.; Wagner, G. *J. Magn. Reson. B* **1996**, *110*, 309-312.
- (6) Kupce, E. *Methods Enzymol.* **2001**, *338*, 82-111.
- (7) Ernst, R. R.; Freeman, R.; Gestblom, B.; Lusebrink, T. R. *Mol Phys.* **1967**, *13*, 283-285.
- (8) Delsuc, M.-A.; Levy, G. *J. Magn. Reson.* **1988**, *76*, 306-315.

A Novel Filtering Technique Utilized for Aliased Peaks*(Graduate School of Biological Science, Nara Institute for Science and Technology)*

○ Chojiro Kojima

Frequency components above the Nyquist frequency are aliased into the chosen spectral width. These aliased peaks are efficiently eliminated by the digital or analog filter in the directly observed dimension. However, no efficient filter is available in indirect dimension of the multi-dimensional NMR spectra. Here the aliased peak phase was arithmetically described by the initial sampling delay time and the folding times. This led a simple filtering technique, the appropriate summation and subtraction of the spectrum recorded with the different initial delay time, to eliminate the aliased peaks in indirect dimension. This filter is theoretically applicable to all sampling schemes for quadrature detection. Experimentally, the elimination (or selection) of the aliased peaks is demonstrated in the gradient sensitivity enhanced ^1H - ^{13}C HSQC spectra of a $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled protein.

はじめに

サンプリング周波数（ナイキスト周波数）より高い周波数をもつ成分は折返しピークとして観測される。折返しピークの消去には高性能な帯域フィルタが必要であるが、従来のバターースフィルタなどのアナログフィルタは遷移幅が広く、折返しピークの消去には有効ではなかった。近年の NMR 装置の性能の向上に伴い遷移幅の狭いデジタルフィルタの使用が可能となり、折返しピークの無い帯域選択的な信号の観測が現実的に可能となってきた。しかし、多次元 NMR において間接測定する周波数軸（間接次元）については、この様な有効なフィルタは知られていない。今回、折返しピークの位相を定式化する過程で、初期サンプリング遅延時間に依存した折返しピークに特徴的な位相差が生じることが分かった。そこでこの性質を利用して、折返しピークのみを消去・選択するフィルタ技術を開発した。このフィルタは理論的に全ての位相検波法に適用可能であり、間接次元において現実的かつ有効に働く。本発表では、折返しピークの位相の定式化とこのフィルタの原理、ユビキチンをサンプルとした ^1H - ^{13}C HSQC への適用例を報告する。

フィルタ、折返しピーク、位相、サンプリング遅延時間、多次元 NMR

こじまちょうじろう

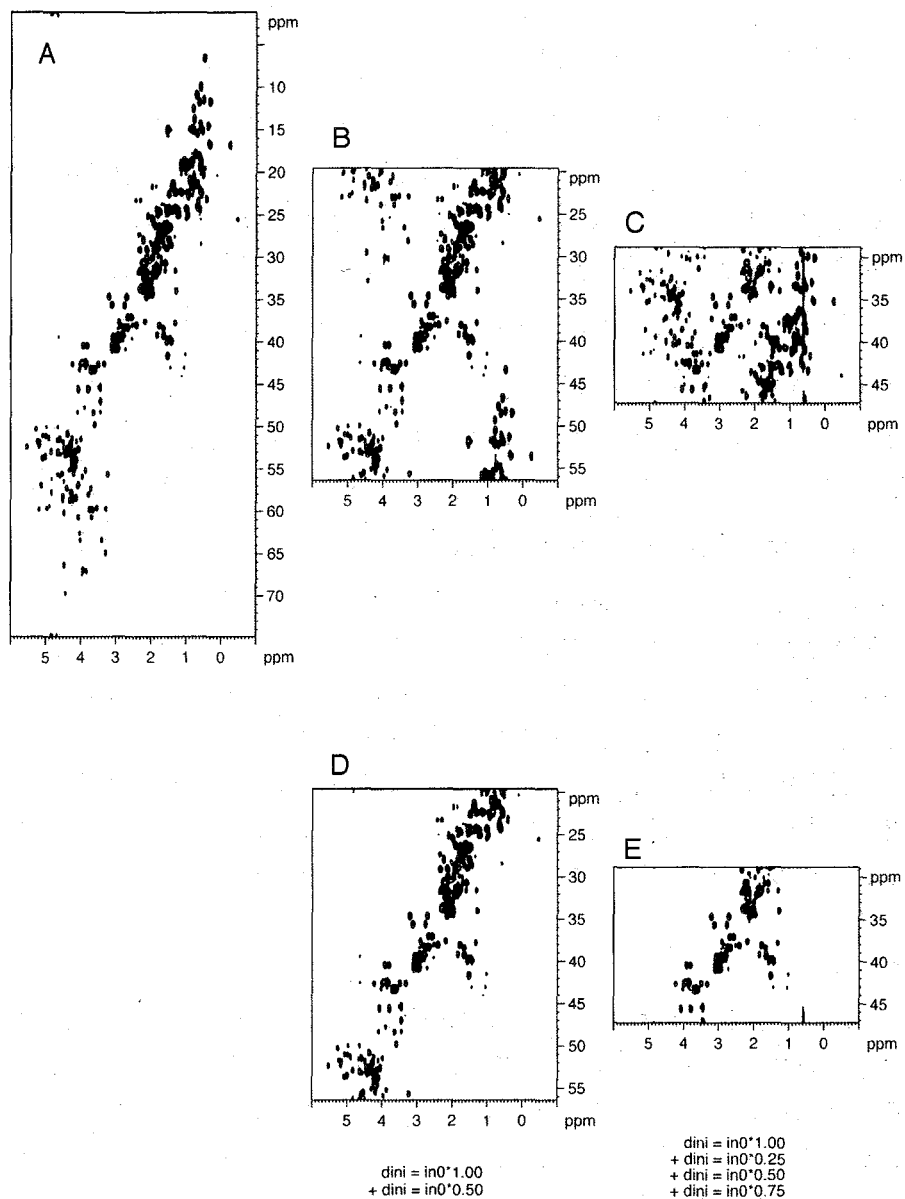


Figure 1. ^1H - ^{13}C gradient sensitivity enhanced HSQC spectra of ubiquitin. Spectral widths for left (A) and center (B, D) spectra are 4 and 2 times of right spectra (C, E), respectively. Top (A-C) spectra are recorded with the initial sampling delay of one full dwell time, and thus the both real and aliased peaks are positive and in-phase. The bottom (D, E) spectra are the results of the summation of the 2 and 4 spectra with the different initial delay times, respectively, and the aliased peaks are completely eliminated.

理論

Quadrature 検波によって観測された NMR 信号は複素表記できる。

$$S = S_0 \exp(i(n\Delta t + d_{ini})\omega) = S_0 \exp(i n\Delta t\omega) \exp(i d_{ini}\omega) \quad [1]$$

ここで d_{ini} は初期サンプリング遅延時間であり、 Δt はサンプリング間隔である。Quadrature 検波法では、 m 回折返したピークは、観測される周波数 ω とスペクトル幅 $2\omega_{max}$ の m 倍だけ異なる周波数を持つ。 $\omega = \omega + 2m\omega_{max}$ の関係式より

$$\begin{aligned} S &= S_0 \exp(i(n\pi / \omega_{max})(\omega + 2m\omega_{max})) \exp(i d_{ini} (\omega + 2m\omega_{max})) \\ &= S_0 \exp(i n\pi\omega / \omega_{max}) \exp(i d_{ini} (\omega + 2m\omega_{max})) \end{aligned} \quad [2]$$

ここでサンプリング間隔とスペクトル幅の関係式 $\Delta t = \pi / \omega_{max}$ を用いた。初期サンプリング遅延時間とサンプリング間隔との比 $R_{ini} = d_{ini} / \Delta t = d_{ini} \omega_{max} / \pi$ を導入すると

$$S = S_0 \exp(i n\pi\omega / \omega_{max}) \exp(i \pi\omega R_{ini} / \omega_{max}) \exp(i 2m\pi R_{ini}) \quad [3]$$

この式から、折返しピークは $2m\pi R_{ini}$ ラジアン位相シフトすることが分かる。すなわち、 R_{ini} を変化させてスペクトルを測定することで折返しピークの位相を自在にコントロールすることが可能であり、得られたスペクトルを加算もしくは減算することで折返しピークのみを選択的に消去・選択することが可能である。例えば、 R_{ini} として 0.5 と 1 を選択すれば、1 回折返しピークについて位相が 180° 異なるスペクトルを測定できる。真のピークには位相差が生じないので、この2つのスペクトルの和により折返しピークの消去が、差により折返しピークを選択が可能となる。

結果と考察

図 1 に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識したタンパク質ユビキチンの $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC を示す。間接次元のスペクトル幅を $1/2$ および $1/4$ とすることで、1 回および 2 回折返しピークが観測される (スペクトル A-C)。 R_{ini} として 0.5 と 1 を選択し、それぞれのスペクトルを加算したものがスペクトル D、 R_{ini} として 0.25、0.5、0.75 と 1 を選択し、それぞれのスペクトルを加算したものがスペクトル E である。スペクトル D-E では折返しピークが完全に消去されている。図 2 では同条件で折返しピークを選択を行った。

近年の多次元 NMR 法では R_{ini} として 0.5 を使い、折返しピークを上手く利用しながらデジタル分解能の向上と測定時間の短縮を図っている。しかし従来法では真のピークとの重なりを避けるためにスペクトル幅と観測中心を最適化する必要がある。ここで報告した手法では、観測後のスペクトル処理により折返しピークを完全なスペクトルとして分離出来るため、スペクトル幅や観測中心を機械的に設定できる。またここで導入したフィルタの原理は、多くの FT 測定法において有効だと考えられる。

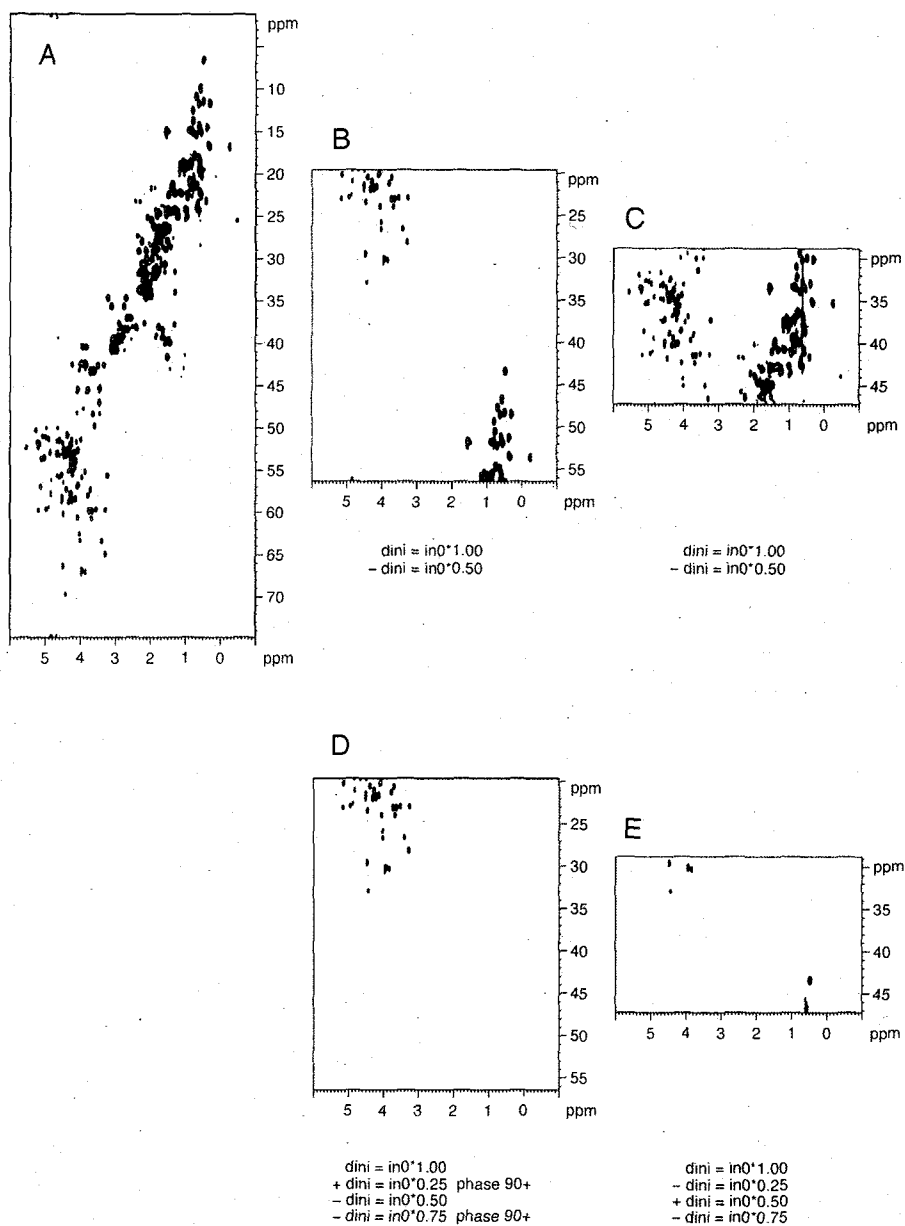


Figure 2. ^1H - ^{13}C HSQC spectra. The observed spectra are identical to those in Figure 1. The top (B, C) spectra are the results of the subtraction of 2 spectra, and the one time aliased peaks are selected. The bottom (D, E) spectra are the results of the summation/subtraction of 4 spectra. The one time (positive higher frequency) and two times aliased peaks are selected in the spectra D and E, respectively.

第二日

11月11日(木)

November 11(Thu)

**Abstracts of International Session
at the 43rd NMR Symposium**

2L1

NMR structural biology of protein-nucleic acid recognition

Masahiro Shirakawa

Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, Yokohama, Japan

Cytosine methylation of CpG dinucleotides of genomic DNA plays crucial role for the regulation of gene activity, chromatin structure and genomic stability in vertebrates. Differences in the DNA-methylation patterns are often correlated with genome imprinting, embryonic development and tumorigenesis. The methylation signals are often interpreted by protein factors containing methyl-CpG-binding domains (MBDs). We have determined structure of the MBD of the human methylation-dependent transcriptional regulator MBD1 bound to methylated DNA. DNA binding causes folding of a otherwise flexible loop of the MBD, which contributes a major DNA interface. The methyl groups at the methylation site are recognized through hydrophobic contacts with five residues that are highly conserved among the MBD family. Dynamic property of the MBD-DNA complex will also be discussed. Structure of the complex between a ubiquitin-interacting motif of proteasomal subunit S5a and the ubiquitin-like domain of hHR23B, and the structural properties of polyubiquitin chains will also be reported.

On the interpretation of residual dipolar couplings from flexible systems

Martti Louhivuori¹, Kai Fredriksson², Perttu Permi², and Arto Annala^{1,2}

¹*Department of Physical Sciences, POB 64, FIN-00014 University of Helsinki,*

²*Institute of Biotechnology, POB 65, FIN-00014 University of Helsinki*

Wealth of evidence is accumulating that not only folded proteins but also weakly structured segments and flexible peptides convey biological functions. In many cases the biological activity is understood to depend on protein's dynamic and marginally stable nature. These stimulating findings question the classical notion that a function arises from a specific three-dimensional molecular structure.

Recently it has been demonstrated that conformations of weakly structured molecules can be probed by residual dipolar couplings (RDCs). Remarkably it has also been observed that completely denatured proteins give non-vanishing RDCs to cause a puzzle what RDCs are really reporting from. Furthermore, the use of RDCs has been extended to explore molecular dynamics, however the interpretation of data has been subject to a debate.

To clarify what is being measured from flexible and dynamics systems we have examined how RDCs rise from steric obstruction in the case of an ensemble of conformations. It turns out that the results are also relevant for the interpretation of RDCs as reporters of molecular motions from high-mobility systems. Moreover we will show how charges affect the RDC data from a flexible system. With this understanding that is derived from measurements of simple systems, analytical models and simulations it becomes possible to interpret correctly information contained in averaged RDCs from a family of conformations and to learn how nature makes use of flexibility.

NMR strategy for membrane proteins-ligands interactions

Ichio Shimada^{1,2}

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, and ²Biological Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Aomi, Koto-ku, Tokyo, Japan

Membrane proteins play crucial roles in many biological events, such as signal transduction processes, immune systems, and cellular recognition, and also are main target proteins in drug developments. Therefore, the identification of the interfaces of ligands-membrane proteins complexes provides deep insights into these research areas.

However, the lack of the appropriate NMR strategy and measurements for larger proteins complex hampers the investigation of ligands-membrane proteins interactions. To address the issue, we proposed the NMR method, cross-saturation measurement¹, which utilizes the TROSY detection and deuteration to a high degree for proteins, for a more rigorous determination of the contact residues of large protein complexes than the conventional approaches, involving chemical shift perturbation and hydrogen-deuterium exchange experiments. Furthermore, we modified the method to overcome the limitations that the cross-saturation method is difficult to apply to protein complexes with a molecular weight over 150 kD.² Sample preparation is also crucial for investigation of ligands-membrane proteins interaction. In general, sufficient expression and purification of membrane proteins for NMR study is difficult. To overcome the difficulties, we extensively use membrane protein trapped beads and budded virus systems.

In the present paper, we will show some examples of the application of the transferred cross saturation method to the membrane proteins system.^{3,4,5}

References

1. Takahashi, H., et al. *Nature Struct. Biol.* (2000) 7, 220-223.
2. Nakanishi T., et al., *J. Mol. Biol.* (2002) 318, 245-249.
3. Takeuchi, K., et al., *Structure* (2003) 11, 1381-1392.
4. Takeda, M., et al., *J. Biol. Chem.* (2003) 278, 43550-43555.
5. Takeuchi, K., et al., *J. Biol. Chem.* (2004) 279, 4981-4987.

Recent advances in protein NMR refinement

Nico Tjandra, Ph.D.

Laboratory of Biophysical Chemistry, National Heart, Lung, and Blood Institute

National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-8013. U. S. A.

Recent initiative in structural genomics, in which large number of structures will have to be solved, on one hand and attempt to answer more detailed biological questions on the other have put a stronger demand on the increased efficiency and accuracy of NMR structure determination. New methodologies have been developed to achieve both of these aspects. A reliable method to automatically analyze NOE data to get the initial fold of the structures in a consistent manner is now available. It is robust and error tolerant. This approach has reduced the time that it would take to solve NMR structures. Similarly a lot of methods have been introduced in refining protein structures to achieve much higher precisions as well as accuracies. This includes the introduction of alignment media to obtain residual dipolar couplings (RDCs) and residual chemical shift anisotropy, anisotropic diffusion approach, as well as other empirical methods. We have shown that inclusion of chemical shift, ^{15}N relaxation, and hydrogen bond data not only increase the precision of the structures but also their convergence rates. We have expanded these approaches to include carbonyl relaxation data as well as hydrogen bond restraint that involve H^{α} . These new methodologies and their evaluation will be presented.

Solid-state NMR: Personal reminiscences

Takehiko Terao

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Japan

With the mandatory retirement near at hand, I would like to talk about personal reminiscences of my research life on solid-state NMR.

I was introduced to NMR by Professor Tsuneo Hashi at Department of Physics in Kyoto University in the middle 1960s. I first studied a well-known ferroelectric compound KH_2PO_4 by measuring the ^{39}K electric-field gradient tensor in a single crystal using double resonance in the rotating frame. This method proposed by Hartmann and Hahn in 1962, which is the predecessor of today's cross polarization, was by far the most sophisticated technique at that time. I did it with a homebuilt spectrometer constructed using a few hundred vacuum tubes. I think that I have become not to be reluctant to built equipment and perform sophisticated experiments owing to this experience. For my Ph.D. work, I measured the ^1H chemical shift tensor in a single crystal of KH_2PO_4 by developing my own approach. That was the first determination of ^1H chemical shift in rigid solids. After completing the Ph.D. course requirements, I tried to excite and detect coherence of forbidden transitions, and succeeded in it. That was the beginning of multiple-quantum NMR spectroscopy, which is widely used today. In 1975, I could get a position as a lecturer at Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University. I built a solid-state NMR spectrometer based on a 60 MHz magnet, and started investigations in the field of high-resolution solid-state NMR. Only a very limited number of laboratories in the world were involved in this field at that time, and I could never imagine its later popularization. Nevertheless, I felt a potential and an interest in high-resolution solid-state NMR, and was devoted to this field. Since then, I have been developing new techniques of high-resolution solid-state NMR, and their applications to the chemistry of materials: the former includes observation of J_{CH} -split spectra, switching-angle sample spinning (SASS) for ^2D separation of anisotropic interactions, observation of ^2D powder patterns in rotating solids, determination of dihedral angles in peptides, dipolar recoupling techniques under MAS, nuclear Overhauser polarization (NOP), etc., and the latter does inclusion compounds, organic conductors, synthetic polymers, hydrogen-bonded crystals, biosystems, etc.

2L6

NMR spectroscopy in polymer science: My research profile at TIT

Isao Ando

Department of Chemistry and Materials Science, International Research Center of Macromolecular Science, Tokyo Institute of Technology(TIT), Ookayama, Meguro-ku, Tokyo

Polymer science and technology have been greatly developed. It comes from great diversity of properties and functions of polymers, which comes from a variety of their micro- and macro- structures. A polymer chain has an enormous number of chemical bonds, and thus takes various conformations. Further, assembly of polymer chains leads to a variety of three-dimensional nano-scale structures. Thus, it can be said that polymers have multi-dimensional aspects for structure and dynamics in various phases such as liquid, solution, liquid crystalline, amorphous, crystalline, gel, and blend phases. In polymer science and technology, advanced development of various polymer materials with excellent properties and functions is desired. To achieve this, the close relationship between physical properties and molecular structure-dynamics must be clarified with high precision. Thus, powerful techniques are required for the elucidation of this relationship.

Polymers as materials are almost always used as "hard and soft solids". It is necessary for structural and dynamic characterization of the polymers employed in order to understand the relations between properties and structure and, on the basis of these relations, to design new polymer materials. As is well-known, the X-ray diffraction method has contributed to the structural determination of polymers with high crystallinity. However, most polymers have low crystallinity and so structural information about the non-crystalline region, which is the major component, cannot be obtained by X-ray studies. Therefore, the X-ray diffraction method has a limitation for the structural analysis for such systems. Further, it can be said that chain segments in the non-crystalline region are sometimes in a mobile state and so X-ray diffraction method provides no structural or dynamical information.

Since the first observation of a high resolution ^1H NMR spectrum of uncured Heva rubber in CS_2 solution in 1957 by Gutowsky *et al.*, and the discovery of the signal splitting in the ^1H NMR spectrum of poly(methyl methacrylate) in chloroform solution by A.Nishioka *et al.*, F.A.Bovey *et al.*, and U.Johnson *et al.* in 1960, which comes from the different stereochemical structures, high resolution NMR spectroscopy has developed to become the most powerful method available for characterizing structures of polymers. Under such a

background, my research work on polymer NMR spectroscopy started as graduate students at Tokyo Institute of Technology under supervisor, Prof. A.Nishioka, in 1967. After graduated, until now I have worked in field of polymer NMR spectroscopy at TIT. I had good experience of studying basic NMR spectroscopy as research associate in Prof. H.S.Gutowsky lab in 1976-77. Also, Prof. G.A.Webb is my longstanding co-worker in field of theoretical work on NMR chemical shift. In my research history I had a lot of very excellent colleagues who have contributed to my research work to be introduced here.

My research work from 1967 to present consists of 4 parts such as 1) theoretical development of NMR chemical shift of polymers and structural characterization, 2) solid state NMR chemical shift and structure of polymers and biopolymers, 3) solid state NMR chemical shift and hydrogen bonded structure of peptides and polypeptides, 4) development of high field gradient NMR and its application to polymer gels and liquid crystals. Here, for convenience, key words for each of 4 parts are given by limit of pages as follows.

- 1) Theoretical development of NMR chemical shift of polymers and structural characterization: NMR chemical shift theory of polymers with a combination of quantum chemistry and statistical mechanics/NMR chemical shift-band theory of one-dimensional polymers and polymer crystals/NMR chemical shift map of biopolymers/
- 2) Solid state NMR chemical shift and structure of polymers and biopolymers: structural characterization of polymers in solid, amorphous and liquid crystalline phase/ solid state NMR chemical shift and conformation of biopolymers/ polypeptide blends/
- 3) Solid state NMR chemical shift and hydrogen bonded structure of peptides and polypeptides: ^1H , ^{13}C , ^{15}N and ^{17}O NMR chemical shift tensors and hydrogen-bonded structure/ peptides and polypeptides/ chemical shift calculation/
- 4) Development of high field gradient NMR and its application to polymer gels and liquid crystals/ high field gradient system/ diffusion coefficient/ polymer gels/ polymer liquid crystals/

References

- 1) a. I.Ando and T.Asakura, *Ann.Repts.NMR Spectroscopy*, 10A, 81-132 (1979). "NMR chemical shift calculations and stereochemical structure in synthetic polymers"; b. I.Ando and G.A.Webb, "*Theory of NMR Parameters*", Academic Press, London, (1983); c. I.Ando, S.Kuroki, H.Kurosu and T.Yamanobe, *Prog. NMR Spectroscopy*, 39, 79-133(2001). "NMR chemical shift calculations and structural characterizations of polymers"; d. I.Ando, T.Yamanobe and H.Kurosu, *Ann.Repts.NMR Spectroscopy*, 22, 205-248(1990). "NMR nuclear shielding and the electronic and structures of macromolecules".
- 2) a. H.Saito, R.Tabeta, A.Shoji, T.Ozaki, I.Ando and T.Asakura, "*Magnetic Resonance in Biology and Medicine*", ed. Govil, Khetrpal and Sarau, Tata McGraw-Hill, New Dehli

(1985) p.195.; b. H.Saito and I.Ando, *Ann.Repts.NMR Spectroscopy*, 21, 209-290(1989). "High resolution solid state NMR studies of synthetic and biological macromolecules"; c. A.Shoji, S.Ando, S.Kuroki, I.Ando and G.A.Webb, *Ann.Rept.NMR Spectroscopy*, 26, 55-98(1993). "Structural studies of peptides and polypeptides in the solid state by nitrogen-15 NMR spectroscopy"; d. H.Kurosu, S.Ando, H.Yoshimizu and I.Ando, *Ann.Rept.NMR Spectroscopy*, 28, 189-275(1994). "NMR studies of higher-order structures of solid polymers"; e. I.Ando and S.Kuroki, *Encyclopedia of NMR*, John Wiley & Sons, New York, 4458-4468(1995). "Solid biopolymers"; f. S.Kuroki, K.Yamauchi, I.Ando, A.Shoji and T.Ozaki, *Current Organic Chemistry*, 5, 1001-1016(2001). "¹⁷O-isotope labeling and hydrogen-bonded structure investigation in peptides and polypeptides by solid state ¹⁷O NMR"; g. I.Ando and T.Asakura, *Solid State NMR of Polymers*, Elsevier Science, Amsterdam, pp.1-1012, 1998.; h. K.Murata, S.Kuroki, E.Katoh and I.Ando, *Ann. Repts. NMR Spectroscopy*, 51,1-57(2003). "A Study of conformational stability of polypeptide blends by solid state NMR spectroscopy"

3) a. N.Asakawa, T.Kameda, S.Kuroki, H.Kurosu, S.Ando, I.Ando and A.Shoji, *Ann.Rept.NMR Spectroscopy*, 35, 55-137(1998). "Structural studies of hydrogen-bonded peptides and polypeptides by solid-state NMR"; b. I.Ando, S.Kuroki, H.Kurosu and T.Yamanobe, *Prog. NMR Spectroscopy*, 39, 79-133(2001). "NMR chemical shift calculations and structural characterizations of polymers";

4) a. S.Matsukawa, H.Yasunaga, C.Zhao, S.Kuroki, H.Kurosu and I.Ando, *Progress in Polymer Science*, 44, 995-1044(1999). "Diffusion processes in polymer gels as studied by pulse field gradient spin echo NMR spectroscopy"; b. I. Ando, M.Kobayashi, C.Zhao, S.Matsukawa and S. Kuroki, *Polymer Gels and Networks*, ed. Y.Osada and A.R.Khokhlov, Marcel Dekker, Inc., New York, Chapter 6, p. 235-308(2002). "Structural and dynamic behavior of polymer gels elucidated by NMR spectroscopy"; c. I.Ando, M. Kobayashi, C.Zhao, Y.Yin and S.Kuroki, *Encyclopedia of NMR*, Interscience, New York, Vol.9 (Advance in NMR), p. 770-787, 2002. "Structural and dynamic characterization of soft polymers by solid state NMR and field gradient NMR"

2L7

**Evolution of isotope-assisted protein NMR spectroscopy:
1968 to the present**

John L. Markley

*National Magnetic Resonance Facility at Madison, Biochemistry Department, University
of Wisconsin-Madison, Madison WI 53706, USA. markley@nmrfam.wisc.edu*

This lecture traces the history of isotope-assisted NMR spectroscopy from the early proposal for selective deuteration by Oleg Jardetzky, through the several pioneering studies of proteins labeled with ^2H , ^{13}C , and ^{15}N , and into the age of multinuclear correlations and multidimensional NMR spectroscopy. In a few years, stable-isotope assisted NMR investigations of proteins moved from a novelty into a mainstream approach for structural biology. I will outline approaches to current challenges, including structural proteomics, larger proteins, paramagnetic proteins, and protein complexes. I will discuss recent results from my laboratory on the preparation and analysis of uniform labeled and stereo array isotope labeled (SAIL) proteins from a wheat germ cell-free system. I will present novel methods being developed at the National Magnetic Resonance Facility at Madison for application to stable isotope labeled proteins: fast data collection with peak recognition, improved resolution of crowded spectral regions, automated backbone and sidechain assignments, determination of secondary structure from chemical shifts and amino acid sequences, and rapid structure calculations.

[Supported by National Institutes of Health Grants P41RR02301, R01GM58667, P50GM64598, and P41 GM66326.]

Brain function which NMR measures

Seiji Ogawa

Hamano Life Science research Foundation, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

There are many aspects in the brain function. The most important part of it, individual and collective firing activities of neurons, is not measurable with non-invasive methods so far known. Nor any of the neural output signal patterns from a functional unit of the brain is detected by those methods other than invasive single- or multi- unit recording electrodes. These electro-chemical activities of neurons do not seem to produce signals in EEG, MEG nor in fMRI.

fMRI, based on BOLD (blood oxygenation Level dependent) and CBF or CBV, depends on the secondary physiological reaction triggered by synaptic activity such as glutamate release. The excess glutamate release induces Ca^{2+} increase in the neighboring glia cells (astrocytes) where the Ca increase triggers further to produce vasodilator at the contact site with vascular system. The MRI signal can be modified by such hemodynamic/metabolic changes that in turn are induced by dendritic neuro-activity, and fMRI of the brain is then realized.

Question remains though on which processes fMRI signal represents in the functional activity of some localized area in the brain. It appears fMRI signal is in major part representing the processing of the input to the neural area, not necessarily the neuro-computation or output forming processes.

One of de-merits of fMRI signal based on hemodynamics is the slow response time of seconds instead of 10's msec. Combination of fMRI and EEG or MEG would provide information either methodology needs. On the other hand, there is an approach that may give fast dynamic information of functional system activation by fMRI signal alone.

fMRI based on non-hemodynamics could be those on electric current induced local magnetic field or on cellular swelling associated with neural activity. These are very attractive if easily accessible in MRI measurements, but so far appear still long way away from us.

第三日

11月12日（金）

一般講演要旨

3L1

小麦胚芽抽出物を用いた無細胞合成系によるタンパク質構造機能相関の迅速解析法

○ 森田 勇人¹、清水 真人¹、小笠原 富夫²、遠藤 弥重太²、田中 利好³、河野 俊之³ (愛媛大総科研¹、愛媛大工²、三菱化学生命研³)

High-throughput analysis of the relationship between structure and function of proteins with wheat germ cell-free protein synthesis system

○ Eugene Hayato Morita¹, Masato Shimizu¹, Tomio Ogasawara², Yaeta Endo², Rikou Tanaka³, Toshiyuki Kohno³ (INCS, Ehime Univ., ²Fac. Eng., Ehime Univ., ³MITILS)

For high-throughput protein structural analysis, it is indispensable to develop a reliable protein overexpression system. Although many protein overexpression systems utilizing *E. coli* cells have been developed, a lot of proteins functioning in solution still were synthesized as insoluble forms. Recently, a novel wheat germ cell-free protein synthesis system was developed, and many of such proteins were synthesized as soluble forms. Synthesizing ¹⁵N-labelled proteins with this wheat germ cell-free system, we confirmed that these proteins are functionally active, and further developed a convenient and reliable method for amino acid selective labeling technique. We also showed that this technique is a powerful way to monitor the molecular recognition of proteins in atomic resolution.

【序】タンパク質は基質と相互作用することで生命活動の制御や病気の発症の鍵となっている。タンパク質の基質認識に非常に高い選択性を有しており、また、その選択性がタンパク質自身の立体構造に由来することが実証されている。このため、生命現象に対する理解、病気の発症機構解明・治療法開発の最適な手段として、タンパク質研究に、産業・社会的・学術的に強い期待が持たれている。現在タンパク質研究は、タンパク質立体構造解析に続けて、詳細な相互作用解析へ深く踏み込むべき段階となっている。一方、解析対象であるタンパク質の高純度品を大量に手にするために、大腸菌を利用したタンパク質大量発現技術が無細胞技術も含め数多く開発されてきたが、可溶性タンパク質が不溶性になってしまう場合がある、膜結合タンパク質の合成が困難である等の問題点を抱えている。そのため、これらの技術的問題点を克服した、さらに安定なタンパク質合成系の開発の必要性が高まっている。

このような現状のもと、我々は、近年安定したタンパク質発現が可能になった小麦胚芽抽出物を用いた無細胞タンパク質合成技術を利用することによる、タンパク質の構造機能相関解析手法開発を試みた。特に、タンパク質の活性部位による分子認識機構解析手法としての応用が期待されるアミノ酸選択的ラベル化技術に着目して開発を行った。

キーワード： 無細胞、タンパク質合成、アミノ酸選択的標識、小麦胚芽抽出物

○もりたはやと、しみずまさと、おがさわらとみお、えんどうやえた、たなかりこう、こうのとしゆき

【実験】 標的タンパク質をコードするプラスミドを用いて *in vitro* 転写系により作製した mRNA を、小麦胚芽抽出物を含むタンパク質合成系に加え 26 度で 24~48 時間連続で合成を行うことで、目的とするタンパク質の発現を行った。大量発現を行う際には、最も効率よく発現が進む塩強度、pH 条件の検討を、発現を試みるタンパク質ごとに行った。アミノ酸選択的標識には、セルフリーグレード安定同位体標識アミノ酸セット (^{15}N -標識、 ^{15}N , ^{13}C -二重標識; 日本酸素) を使用した。

【結果と考察】 すべてのアミノ酸に ^{15}N 標識体を用いてタンパク質を合成し、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定することで、小麦胚芽系により合成されたタンパク質の立体構造を評価したところ、他の手法で合成され、その生理活性が保証されている数種類のタンパク質について、これまでど等価なスペクトルが得られた。このことから、小麦胚芽抽出物を用いた無細胞タンパク質合成系を用いることで、生理活性を保持した構造を持つタンパク質を合成することが可能であることがわかった。また、(1)合成するタンパク質によって、塩強度や合成 pH 条件などを最適化する必要があること、(2)最適化することにより合成液 1ml あたり 1mg 以上の標的タンパク質を合成できること、(3)タンパク質によっては大腸菌の無細胞合成系より単位合成液量あたりの合成量が多い場合もあることなどがわかった。

次に、分子認識の過程においてタンパク質の活性部位周辺の構造変化をモニターする手段としてのアミノ酸選択的標識化技術開発を行った。

20 種類のアミノ酸のうちどれか 1 種類のアミノ酸にのみ ^{15}N -標識アミノ酸もしくは ^{15}N , ^{13}C -二重標識アミノ酸を用い、合成したタンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定することで、選択的標識の可否を判断した。また、相互転移が観測されたアミノ酸については、アミノ酸の代謝経路から想定されるトランスアミナーゼの阻害剤をタンパク質合成系に加え、タンパク質合成量を減少させず、選択的標識化を可能とする阻害剤濃度の検討を行った。その結果、アスパラギン酸トランスアミナーゼとアラニントランスアミナーゼの 2 種類のトランスアミナーゼが小麦胚芽抽出物中では主として活性化されていることがわかった。また、これらの阻害剤として、アミノオキシ酢酸とベータクロロアラニンが有効であることがわかった。この技術を用いることで、ラン藻の亜鉛イオン濃度センサータンパク質を構成するヒスチジン残基のうち、亜鉛イオンとの結合サイトを構成しているものとそれ以外との区別を容易に行うことができた。

現在、4 塩基コドンの導入などによる部位特異的標識化技術開発を行い、立体選択的標識化アミノ酸 (SAIL アミノ酸) の導入による、より詳細なタンパク質構造機能相関解析技術開発を進めている。

【参考文献】

- [1] "A wheat germ cell-free system is a novel way to screen protein folding and function." E.H. Morita, T. Sawasaki, R. Tanka, Y. Endo, T. Kohno, *Protein Sci.* 12, 1216-1221 (2003).
- [2] "A novel way of amino acid-specific assignment in ^1H - ^{15}N HSQC spectra with a wheat germ cell-free protein synthesis system." E.H. Morita, M. Shimizu, T. Ogasawara, Y. Endo, R. Tanaka, T. Kohno, *J. Biomol. NMR* in press.

高等動植物の構造プロテオミクス

(¹理研・GSC, ²産総研・ADRC, ³かずさ DNA 研, ⁴理研・RCAL,
⁵東大・医科研, ⁶理研・播磨, ⁷東大・院理)

○木川隆則¹, 武藤裕¹, 林文昌¹, 山崎和彦^{1,2}, 廣田洋¹, 山崎俊夫¹,
 Peter Güntert¹, 前田秀明¹, 好田真由美¹, 白水美香子¹, 田仲昭子¹,
 林崎良英¹, 篠崎一雄¹, 小原収^{3,4}, 菅野純夫⁵, 横山茂之^{1,6,7}

Structural proteomics of animals and a plant

(¹RIKEN Genomic Sciences Center, ²Age Dimension Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ³Kazusa DNA Research Institute, ⁴RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, ⁵Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ⁶RIKEN Harima Institute at SPring-8, ⁷Graduate School of Science, The University of Tokyo)

RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI) (<http://www.rsgi.riken.jp>) was organized by RIKEN Genomics Sciences Center and Harima Institute at SPring-8 in 2001. RSGI has been integrated into the National Project on Protein Structural and Functional Analyses ("Protein 3000"), organized by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, as one center of the program for comprehensive studies. We are now focusing on proteins involved in phenomena of biological and medical importance. Both NMR spectroscopy and X-ray crystallography are used for protein structure determination. To accelerate the NMR analyses, we have developed a high-yield cell-free protein synthesis system for high-throughput production and a software package, KUJIRA, for the systematic and interactive NMR data analysis, and are now using the program-CYANA for automated structure calculation. We determined 75 structures in 2002 fiscal year, and 207 structures in 2003 fiscal year, respectively, by NMR spectroscopy.

構造プロテオミクス, 無細胞タンパク質合成, タンパク 3000 プロジェクト, 完全長 cDNA, 機能ドメイン

きがわ たかのり, むとう ゆたか, はやし ふみあき, やまさき かずひこ, ひろた ひろし, やまざき としお, Guentert Peter, まえだ ひであき, よしだ まゆみ, しろう ず みかこ, たなか あきこ, はやしざき よしひで, しのざき かずお, こはら おさむ, すがの すみお, よこやま しげゆき

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.jp>) は、ゲノム科学総合研究センターと播磨研究所によって組織され、2002 年度より開始された文部科学省「タンパク 3000 プロジェクト」の網羅的解析プログラムを担当している。ヒト、マウス、シロイヌナズナなどの高等動植物や、高度好熱菌などの微生物において、生物学的、医学的に重要なタンパク質を、解析のターゲットとして選択している。構造解析の手法としては NMR 法と X 線結晶解析法を併用しているが、本講演では、NMR 法を用いて進めている高等動植物の構造プロテオミクス研究の進捗状況を報告する。

NMR 法による構造解析を加速するために、まず、無細胞タンパク質合成系を核としたハイスループットなタンパク質調製系を確立して、構造解析に適した試料の選択作業から安定同位体標識試料の調製に至るまで、全ての試料調製過程で利用することにより、迅速で効率の良い試料調製が可能になった。また、強力な化学シフト帰属機能などを備えた、NMR データ解析用の統合的ソフトウェアパッケージ“KUJIRA”を開発して利用している。さらに、KUJIRA と連携させて、立体構造計算プログラム CYANA の自動 NOE 帰属機能を積極的に利用することにより、構造解析に要する時間は飛躍的に短縮された。これらの技術開発の成果と理研 GSC の大規模 NMR 施設の整備により、NMR 法を用いて、2002 年度には 75 種類、2003 年度には 207 種類のタンパク質の構造決定に成功した。

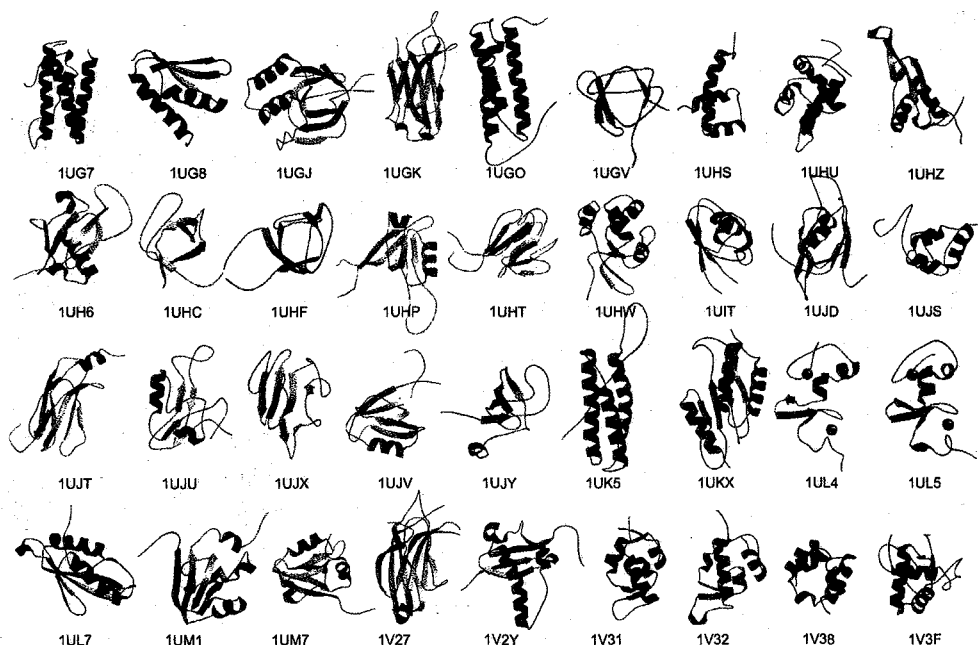


Figure. A part of structures that we have determined and deposited to PDB.

3L3 7T/400mm 自己シールド型ゼロボイルオフ MRI の開発

(神戸製鋼所)三木孝史○、濱田衛
(JASTEC)大塚昭弘、斎藤一功、林征治

Development of 7T/400mm Self-shielded Zero Boil-off MRI

(1) Electronics Laboratory, Kobe Steel Ltd.
(2) Japan Superconductor Technology

(1)Takashi Miki, (1)Mamoru Hamada
(2)Akihiro Otsuka, (2)Kazuyoshi Saito, (2)Seiji Hayashi

As a milestone for high field functional MRI, we have successfully developed 7T/400 horizontal magnet system. The magnet is self shielded to minimize the stray field and operated in 4.2K. The adaptation of a two-stage G-M cycle refrigerator eliminated the need for a big liquid nitrogen tank and enabled us to realize a zero boil-off system for liquid helium. Here we review several features and works we incorporated in the system.

1. はじめに

測定時間の短縮化、画像の高解像度化、fMRI あるいは代謝挙動の解明を目的とした動物用 7T/400mm ボア MRI を開発したので報告する。システム外観を Fig.1 に、マグネットおよびクライオスタットの主な仕様をそれぞれ Table 1,2 に示す。

2. マグネット

本マグネットは NbTi のみで巻線され、4.2K 付近で運転される。ボア径が大きく、蓄積エネルギーは 9.3MJ に達する。このエネルギーは超電導線材に NbTi のみを使用した従来低磁場機の 3 倍(当社比)であり、6.6kg の鉄塊を融解させるエネルギーである。このためマグネット設計には細心のクエンチ保護対策が必要であった。

メインコイルは 14 分割した。設計の最終決定にあたっては、特定コイルからクエンチが発生した場合の各部温度、コイル両端電圧、電流値、フープストレスを時系列にシミュレートすることで、クエンチ時でも超電導線材にダメージを与えないことを確認し、安全性を確保した。シミュレーション結果の例を Fig.2 に示す。

メインコイルは漏れ磁場を最小限にするため、自己シールド型となっている。磁場中心から 0.5mT ラインまでの距離は、軸方向 5.8m、径方向 4.4m である。径方向の漏れ磁場分布を Fig.3 に示す。自己シールド型マグネットは、一般に巻線応力が増すことで設計が困難となり、磁場均一度が犠牲になる傾向にあるが、本マグネットでは仕様値 15ppm p-p (180mm dsv)、5ppm p-p

キーワード: MRI、漏洩磁場、コールドシップ、ゼロボイルオフ

著者ふりがな: みきたかし、はまだまもる、おおつかあきひろ、さいとうかずよし、はやしせいじ

(50mm dsv)に対し、実測値 2.41ppm p-p (180mm dsv)、1.28ppm p-p (50mm dsv) を達成している。また磁場安定度は仕様値 0.05ppm/h に対し、実測値 0.001ppm/h と in-vivo spectroscopy のために十分な値を達成する事ができたと考えている。

3. クライオスタット

本マグネットは液体ヘリウムで浸漬冷却されているが、ヘリウム消費量を押さえるため、2 段極低温冷凍機を搭載した。冷凍機の 2 段目の冷凍能力は最大 1W@4.2K であるが、液体ヘリウム槽への熱侵入量は遥かに小さく、液体ヘリウムの蒸発ガスは完全に再液化される。液体窒素槽は熱シールドに置き換えられ、極低温冷凍機の 1 段目で冷却している。このため一切寒剤補充の必要のないゼロボイルオフ・クライオスタットを実現することができた。

寒剤を意識せずに済むという点で、本システムは産業界でさかんに利用されつつある無冷媒マグネットのような使い勝手を持ったと言える。しかし、極低温冷凍機は停電時に無力となる。そのため本システムでは、完全な無冷媒システムではなく、液体ヘリウム浸漬冷却を採用している。液体ヘリウムが大きな熱容量を持つため、停電時でもマグネット温度が突発的に上昇する事がなく、システムの安全性が確保される。計画停電等、日単位の停電時には、上述した冷凍機の余力を利用してマグネット温度を更に下げること、停電中の熱侵入を吸収することができ、寒剤消費量を極力減らすことが可能である。

さらに本システムはコールドシップが可能である。つまり、マグネットを工場で液体ヘリウム温度に予冷した後、液体ヘリウムを保持したまま国内各所に運搬が可能である。このため立上げサイトでは搬入直後から励磁が可能であり、立上げ費用と時間の大幅削減が可能となった。

通常コールドシップと、ヘリウム槽への低熱侵入量は相反するスペックである。これは前者が強力なマグネット支持構造を必要とし、概して熱侵入量を増加させるためである。したがってマグネットが大型化するに従い、コールドシップは困難となる。本システムでは、支持構造を再検討し、新しい支持構造と、極低温での単位強度当り熱伝導率が従来より低い材料を採用する事で問題を同時に解決した。

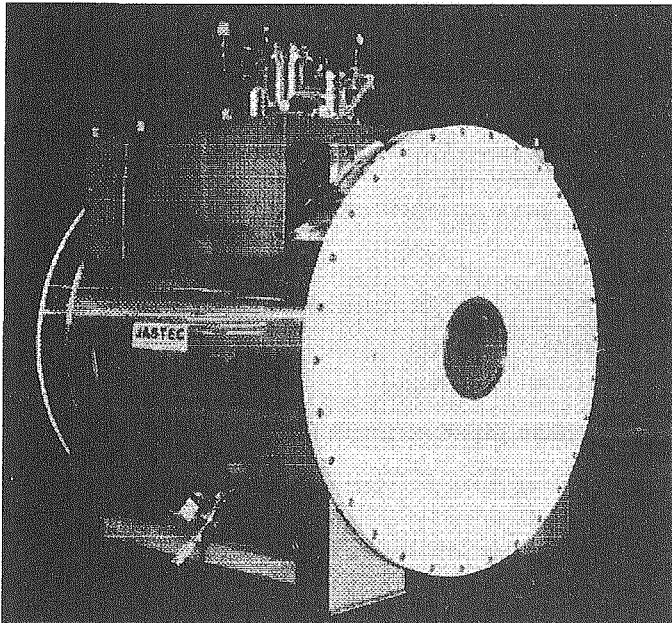


Fig1. An overview of the magnet

		Specifications
Operating Field [T]		7.0
Main Coil		self shielded multi coil
0.5mT Fringe Field Position from Magnet Center	radially [m]	4.4
	axially [m]	5.8
Field stability [ppm/hour]		≤ 0.05
Field homogeneity [ppm p-p]		≤ 15 (180mm dsv) ≤ 5 (50mmdsv)
Axial Shim Coils (4ch)		Z1, Z2, Z3, Z4
Radial Shim Coils (10ch)		X, Y, ZX, ZY, X2-Y2, XY, Z2X, Z2Y, Z(X2-Y2), ZXY
Operating Current [A]		≤ 250
Maximum Shim Coil Current [\pm A]		25

Table 1 Specifications for 7T/400 horizontal magnet system

System Height [mm]	~ 2600
System Diameter [mm]	2000
System Length [mm]	1800
System Weight [kg]	9800 (with Cryogen, Refrigerator)
Bore Size without Gradient Coils [mm]	400
Refrigerator Power Consumption [kW]	7.5
Refrigerator Cooling Power [W]	1.0 @4.2K
Liquid Helium Container [L]	1250
Liquid Helium Refill Interval [days]	Not measured (> 360)
Liquid Nitrogen Refill Interval [days]	N/A
Maint. Interval [hours]	10000

Table 2 Specifications for 7T/400 horizontal magnet system

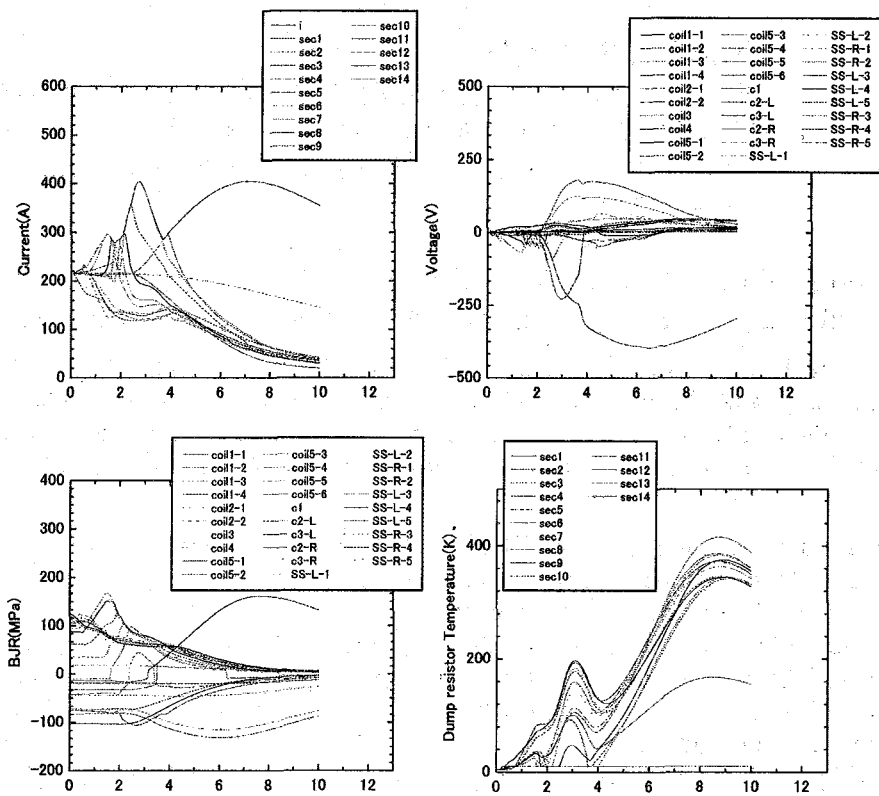


Fig.2 An example of quench analysis

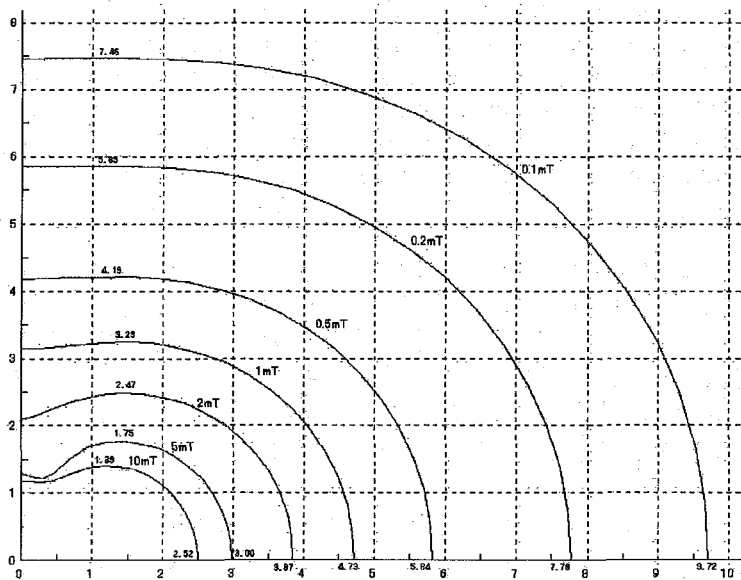


Fig.3 Field distribution in radial direction

脳組織の水透過性

(獨協医科大学・生理(生体制御)¹、京都大学大学院・医学研究科・分子細胞情報²、精神・神経センター神経研究所³)

○瀬尾 芳輝¹、岩本 典子²、新田 武弘²、古瀬 幹夫²、荻野 孝史³、月田 承一郎²

Water permeability of brain capillaries in claudin-5 knocked out mice determined by T_1 relaxation time measured by ^1H magnetic resonance imaging.

(¹Dept. of Regulatory Physiology, Dokkyo University School of Medicine, ²Dept. of Cell Biology, Faculty of Medicine, Kyoto University, ³Dept. of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry) Yoshiteru Seo¹, Noriko Iwamoto², Takehiro Nitta², Mikio Furuse², Takashi Ogino³, Shoichiro Tsukita²

The anatomic basis for blood-brain barrier (BBB) resides in tight junctions (TJs) of brain endothelial cells in addition to their limited transcytosis. The claudin-5 was identified as a major TJ cell adhesion molecule in brain endothelial cells. Three relaxation reagents (gadolinium-diethylene triamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid (Gd-DTPA²⁻), NMS60, polylysine-DTPA-gadolinium (PL-DTPA-Gd)) were applied to estimate water permeability of the neurons/glia cells and BBB in mice. In the intact mice, the longitudinal relaxation rates ($1/T_1$) showed minimal changes ($< 0.1 \text{ s}^{-1}$) even the $1/T_1$ of blood water was accelerated more than 40 s^{-1} by using the 3 reagents. It is suggested that the normal BBB have very low water permeability. In the claudin-5 knocked out mice, Gd-DTPA²⁻ can pass through the modified BBB. From the dose-dependency of Gd-DTPA, a water efflux rate from the neurons/glia cells ($k_n = 3.82 \pm 0.58 \text{ s}^{-1}$) was detected which is corresponding to a diffusional water permeability of $1.5 - 1.0 \text{ cm s}^{-1}$. The NMS60 and PL-DTPA-Gd could not pass through the modified BBB. From the dose-dependency of NMS60, a water efflux rate from the BBB ($k_n = 2.24 \pm 0.74 \text{ s}^{-1}$) was detected which is corresponding to a diffusional water permeability of $3.4 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$. A larger reagent, PL-DTPA-Gd, represented a smaller efflux rate compared with that of NMS60. It is suggested the smaller NMS60 can penetrate into smaller gaps between the endothelial cells. These findings provide a new insight on the molecular biology of BBB, and also represent usefulness of this method to monitor physiological parameters of genetically modified animals.

【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。この BBB の本体は、タイトジャンクション(TJ)蛋白質であり、脳血管においては Claudin-5 が TJ を構成している。今回、Claudin-5 遺伝子をノックアウトしたマウスについて、分子量の異なる 3 種類の緩和試薬と T_1 緩和時間測定法を用い、脳実質細胞および Claudin-5 の欠如した BBB の水透過性を測定することができたので報告する。

キーワード： 水分子、脳血液関門、Claudin-5、緩和試薬、 T_1 緩和時間

せおよしてる、いわもとのりこ、にったたけひろ、ふるせみきお、おぎのたかし、つきたしょういちろう

【方法】 Claudin-5 ノックアウトマウスは C57BL/6 を基に作製したものをを用いた。Gd-DTPA は Magnevist (Shering) を、NMS60 は日本メジフィックスから提供を受けたものを、また PL-DTPA-Gd は、分子量 15 kDa の Polylysine (Sigma) を用い定法により合成したものをを用いた。胎生 18.5 日の胎児を帝切により取り出し蘇生後、ペントバルビタール(50 ug/g)で麻酔し、心室内に Gd-DTPA, NMS-60, PL-DTPA を投与した。同腹のヘテロあるいはワイルドのマウスをコントロールとして用いた。15 mm 径の NMR 試料管内に固定し、34°C に温調した 15 mm 径のバードケージコイル内に置いた。測定には AMX-300wb (7.05 T)、micro2.5 磁場勾配コイルと ParaVision2.1 (Bruker) を用いた。高速磁場反転エコー法(GEFI) を用い、FOV 2.0 x 2.0 cm、データサイズ 256 x 256、スライス 0.75 mm、パルス繰り返し時間(TR) 100 msec、エコー時間(TE) 4.4 msec、フリップ角 45°、5 スライス、4 回積算、積算時間 100 sec で T_1 強調 MR 画像を測定し、解剖学的構造を確認した。その後、高速磁場反転 T_1 画像法(Fast-T1MRI)で、 T_1 緩和時間を測定した。FOV 2.0 x 2.0 cm、データサイズ 128 x 128、スライス 0.75 mm、RARE factor 16、2 回積算、10 個の recovery delay を約 12 分間で測定した。大脳皮質、小脳、視床、視床下部、橋に ROI (310 x 310 um) を取り、 T_1 緩和時間を求めた。

【結果および考察】

T_1 強調画像の強度変化と T_1 緩和速度 コントロールマウスに Gd-DTPA、NMS60、または PL-DTPA-Gd を注入すると、血管および脳室周囲器官部位の T_1 緩和速度は増加し、高信号領域として検出された。脳実質のほとんどの部位の信号強度は変化しなかった (Fig. 1: Wild mice)。血液内の水緩和速度を 40 s^{-1} (投与量 2 mmol/kg に相当) にまで増加させても、脳実質の $1/T_1$ はわずかに増加しかなかった ($< 0.1 \text{ s}^{-1}$)。

Claudin-5 ノックアウトマウス (Claud5^{-/-} mice) においては、Gd-DTPA の投与により、脳実質の信号強度はほぼ均等に増加した。また、この時、脳実質の $1/T_1$ は顕著に増加したが、その増加は 1.5 - 2.0 mmol/kg ではほぼ頭打ちとなった。NMS60、PL-DTPA-Gd においても、同様の $1/T_1$ の増加が見られたが、その大きさは Gd-DTPA に比べて小さかった。血液内の水緩和速度が 35 s^{-1} 以上での、脳組織の水緩和速度の平均値を Table 1 にまとめて示す。

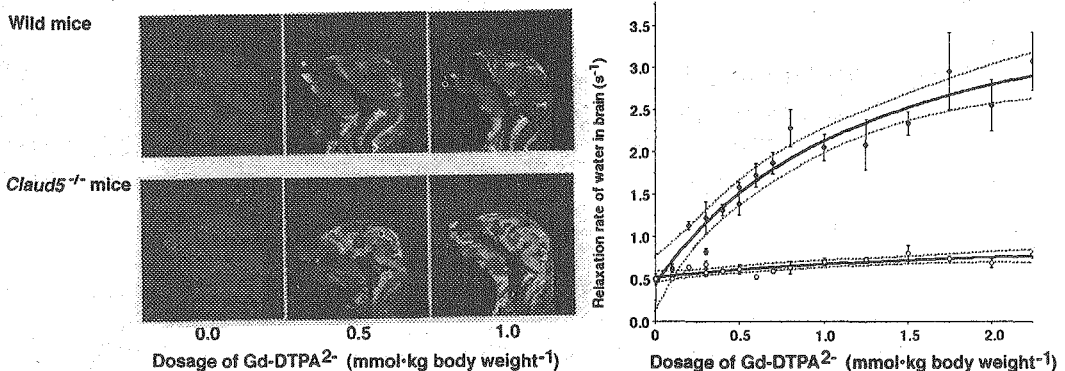


Fig. 1 Midsagittal T_1 -weighted images of wild-type and claud5^{-/-} brain and the relationship between the $1/T_1$ of water in brain and the dosage of injected Gd-DTPA. Filled and open circles represent $1/T_1$ of the wild and claud5^{-/-} brain, respectively. The bold and dotted lines are the results of fitting and 95% confidence limits, respectively, based on a simple two-compartment exchange model.

Table 1 Means and SEM of T_1 relaxation rate constants (sec^{-1}) of water in the brain due to injection of relaxation reagents.

Relaxation reagent	Without relaxation reagents		With relaxation reagents	
	Wild & Claud5 ^{-/-}		Wild	Claud5 ^{-/-}
Gd-DTPA	0.661 ± 0.065 (n=15)		0.739 ± 0.024 (n=15)	2.73 ± 0.15 (n=20)
NMS60	0.487 ± 0.009 (n=17)		0.537 ± 0.020 (n=15)	1.85 ± 0.08 (n=48)
PL-DTPA-Gd *	-		0.520 ± 0.011 (n=20)	0.851 ± 0.041 (n=44)

Note: n is number of ROI from cortex, thalamus, hypothalamus, cerebellum, and pons.

(* Values of cortex were omitted due to wide scattering of data.)

水透過性の推定 $1/T_1$ 値の緩和試薬量依存性から水の拡散透過係数を、Farby & Eisenstadt (1975, 1978)、Schwarzbauer et al. (1997)らの方法により、以下の条件の下に求めた (Fig. 2)。

- 1) 生体内を緩和試薬が存在する区域と存在しない区域の2区画に分け、その間では水分子の交換が行われているとする。血管内に注入した Gd-DTPA は全細胞外液中に、NMS60 と PL-DTPA-Gd は血管内の血液中に分布するとした。
- 2) 緩和試薬により緩和速度の大きくなった水分子が交換することにより、緩和試薬が存在しない区域の水の緩和速度が加速される。組織の緩和速度は2成分(R_s , R_f)になる。
- 3) 遅い緩和速度 R_s は、

$$R_s = 0.5 ((R_g + R_n + k_n/f) - [\{R_g - R_n + k_n \cdot (1 - 2 \cdot f)/f\}^2 + 4 \cdot k_n^2 \cdot (1 - f)/f]^{0.5})$$

と表される。ここで、 R_n は緩和試薬が存在しない区域の水の緩和速度、 R_g は緩和試薬により緩和が加速された区域の水の緩和速度、 k_n は緩和試薬の存在しない区域から存在する区域への水の交換速度、 f は緩和試薬の存在する区画の体積率である。

- 4) 拡散水透過係数(P_d)は、 $P_d = k_n \cdot V_n / A_v$ と求められる。ここで、 V_n 、 A_v は、緩和試薬の存在しない区画の体積と水交換にあたる表面積である。Gd-DTPA については、神経細胞とグリアの平均的な値として A_v/V_n を $3 - 5 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$ とした。また、NMS60 と PL-DTPA-Gd に対しては、 V_n/A_v は血管外組織の体積と毛細血管内皮の表面積となり、解剖学的知見から A_v/V_n は、 100 cm^{-1} とした。

Fig. 2 Schema of the two-compartment model with water exchange.

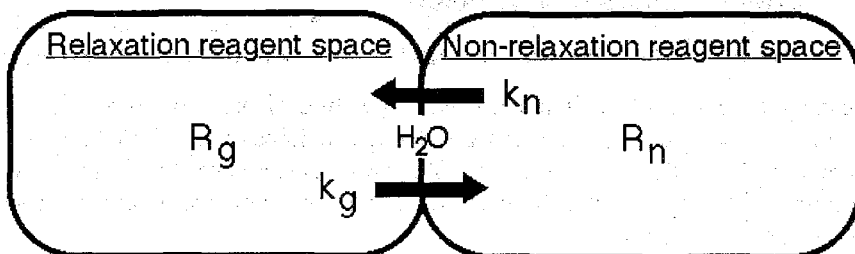


Table 2 Results of fitting data to the two-compartment model and estimated diffusive water permeability.

	k_n (s ⁻¹)	f	R_n (s ⁻¹)	P_d (cm ³ ·s ⁻¹)
Gd-DTPA	3.82 ± 0.58	0.141 ± 0.035	0.50 ± 0.17	0.8 - 1.3 · 10 ⁻³
NMS60	2.24 ± 0.74	0.058 ± 0.027	0.54 ± 0.15	2.2 · 10 ⁻²

Note: Means and SD of constants of the two-compartment model.

Gd-DTPA投与によって得られたfittingの結果をFig. 1に、また、Gd-DTPAおよびNMS60について得られた値をTable 2に示す。両緩和試薬について得られた水透過係数(k_n)は同程度であるが、その緩和試薬の存在分画の体積率(f)は大きく異なっている。Gd-DTPAの14%は、脳組織における全細胞外液体積率と良く一致した。また、NMS60の約6%という値は、脳実質における解剖学的な血管区画の大きさ2-3%に比べ、やや大きい。Claudin-5ノックアウトマウスにおいても、おそらくNMS60が毛細血管組織内に留まっていると考えられる。各々、細胞膜の水透過性と毛細血管の水透過性を測定できたものと考えられる。

NMS60によって求められた毛細血管の水拡散透過係数(2.2 · 10⁻² cm³·sec⁻¹)は、以前ラット脳弓下器官について得られた3.7 x 10⁻³ cm³·sec⁻¹よりも一桁大きい値である。脳弓下器官は脳室周囲器官であり、通常のBBBよりも約100倍高い水透過性を持つ。よって、Claudin-5の欠損した血管内皮タイトジャンクションが高い水透過性を持つことを示している。ただ、i) 分子量15 kDaのPL-DTPA-Gdでは k_n 値がNMS60の半分程度に留まった事、ii) NMS60で求めたNMS60が分布する区画の体積率が解剖学的に予測される値よりも大きめに出来た事を考慮すると、分子量2 kDaのNMS60は、1) 血管内に留まってはいるが、血管内皮間隙のより狭隘なスペースにまで分布している、2) Claudin-5の無い血管内皮タイトジャンクションを通過して、血管周囲のアストログリア細胞のフットが第二のバリアーになっている可能性がある。さらには、3) PL-DTPA-Gdの肝臓細網内皮系細胞への取り込みが、予想よりも大きい可能性もあり、見かけ上低値を得たことも考えられなくもない。今後の検討課題としたい。

今回、三種類の分子量の磁気緩和試薬を用いることにより、Claudin-5ノックアウトマウスのBBBの水透過性の変化を定量化することができた。さらに適切な分子量の磁気緩和試薬を用いれば、従来の方法では測定できなかったin situでの脳組織毛細血管内皮や脳神経/グリアの水透過性を定量的に評価でき、生理学的病理学的に応用できると考えられる。

謝辞： NMS60を本研究用に提供していただいた日本メジフィジクス(株)に感謝します。また、本研究経費の一部は、科学研究費・基盤研究(C)[課題番号16590167]によります。

参考文献：

1. Seo, Y., Takamata, A., Ogino, T., Morita, H., Nakamura, S., Murakami, M., Water permeability of capillaries in the subfornical organ of rats determined by Gd-DTPA²⁺ enhanced ¹H magnetic resonance imaging. *J. Physiol.* 545: 217-228, 2002
2. Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto N., Furuse, M., Tsukita, S., Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 161: 653-660, 2003

局所励起 CT-COSY による人脳内の興奮性 および抑制性の神経伝達物質の同時計測

国立環境研究所

○渡邊英宏, 高屋展宏, 三森文行

Simultaneous detection of excitatory and inhibitory neurotransmitters *in vivo* in the human brain by using a localized CT-COSY sequence

National Institute for Environmental Studies
H. Watanabe, N. Takaya, F. Mitsumori

While glutamate is a major excitatory neurotransmitter, γ -aminobutyric acid (GABA) is a major inhibitory neurotransmitter. However, it is difficult to resolve glutamate and GABA *in vivo* by using the conventional ^1H MRS. Since CT-COSY can perform ^1H decoupling in F_1 direction, this method can improve peak resolution *in vivo*. A brain phantom which contains NAA, Cr, Glu, Gln and GABA was measured for evaluation of a localized version of CT-COSY. Diagonal peaks of Glu-4, Gln-4 and GABA-2 were able to be resolved even on a magnitude mode. Cross peaks between Glu-3 and Glu-4, and between Gln-3 and Gln-4 could also be resolved. In human studies, diagonal peaks of Glu-4, Gln-4 and GABA-2 could be resolved. The measurement time was 30 min.

1. はじめに

グルタミン酸は人脳内の主要な興奮性の神経伝達物質であり、 γ -アミノ酪酸 (GABA) は主要な抑制性の神経伝達物質である。例えば、グルタミン酸はアルツハイマー病や統合失調症との関連が、GABA は統合失調症、アルコール依存症との関連が指摘されている。このため、これ等の代謝物を *in vivo* で計測する意義は大きい。しかしながら、臨床 MR 装置の磁場強度である 1.5 T では、グルタミン酸は、化学構造の類似と J_{HH} の影響によりグルタミンとのオーバーラップしたピークとして観測される。一方、GABA はクレアチン (Cr) 等の代謝物ピークに埋もれており、通常観測することはできない。

これに対して、昨年、我々は、 F_1 方向の ^1H デカップリングが可能な CT-COSY を 4.7 T 上で実施することによりグルタミン酸とグルタミンを分離、検出できることを、模擬試料を用いた実験で示した [1]。そして、部位の限定が可能な局所励起 CT-COSY を 4.7 T 人体用 MRI 装置上で開発し、これによって人脳内のグルタミン酸を検出する

キーワード: CT COSY, *in vivo* NMR, ^1H MRS, 神経伝達物質, 同時計測

わたなべひでひろ, たかやのぶひろ, みつもりふみゆき

ことが可能であることを報告した。今回、この方法を発展させ、加えて渦電流磁場による F_2 方向のスペクトル歪み補正、 F_2 方向の周波数補正、および F_1 ノイズ補正を実施し、人脳内のグルタミン酸、グルタミン、GABA を検出することが可能となったので報告する。

2. 方法

実験は、4.7 T 人体用 MRI 装置 (Varian 社製、*INOVA*) を用いて行った。RF コイルには、体積コイルである TEM コイルを用いた。実験としては、まず、人脳内の代謝物濃度を模擬した脳模擬ファントムを用いて、局所励起 CT-COSY によるスペクトル分解能の評価を行った。つづいて、ボランティア測定を実施し、人脳の CT-COSY スペクトルを取得した。

局所励起 CT-COSY シーケンス

局所励起 CT-COSY シーケンスは、 90° パルス、 180° パルス、 90° パルスで構成される (Fig. 1)。空間 3 次元の局所励起のために、それぞれのパルスのスライスパルスとして利用している。水信号抑圧には、7 ケの CHESSE パルスを用いる VAPOR [2] を利用している。関心領域 (VOI) 外からの信号混入を低減するため、領域外飽和パルス (OVS パルス) も利用している。

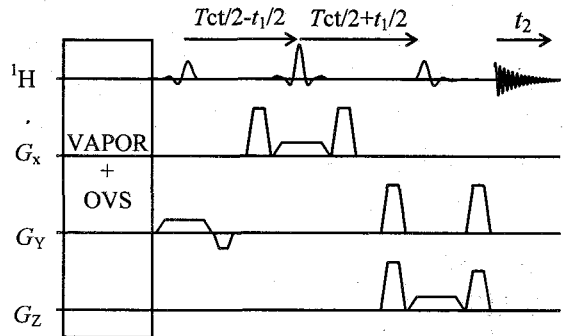


Fig. 1. A localized CT-COSY sequence.

脳模擬ファントムによる評価

脳模擬ファントムは、N-アセチルアスパラギン酸 (10 mM)、クレアチン (8 mM)、グルタミン酸 (9 mM)、グルタミン (3 mM)、GABA (2 mM) で構成した。pH は、7.2 となるように調整した。調整した溶液を円筒容器に封入後、0.9 %の NaCl を溶かした水溶液で満たした容器内に挿入した。局所励起 CT-COSY の評価は、VOI を脳模擬ファントム内に設定して実施した。

シーケンス条件は以下の様にした。すなわち、 $T_{ct} = 110\text{ms}$ 、 $TR = 3\text{ s}$ 、 $np = 2048$ 、 $ni = 150$ である。データは、積算回数 4 回 ($nt = 4$) の 4 位相サイクルで収集した。測定時間は 30 分であった。

実験のプロトコルは以下の様にした。まず、ファントムを磁石内に設定後、Gradient Echo 画像をもとに VOI を設定し、FASTMAP [3] により VOI 内での shimming を実施した。shimming の評価には、局所励起 CT-COSY シーケンスから VAPOR と OVS パルスを除き、10 ms の $t_1/2$ で固定した 1D 局所励起シーケンスを用いた。この結果、得られた水スペクトルの半値幅は 3.5 Hz であった。次に、化学シフトによる位置ずれを防ぐためにスライスパルスの搬送周波数を 3 ppm に設定後、スライスパルス、CHESSE パルスの RF パワーを調整した。この後、局所励起 CT-COSY 信号を取得した。データ収集後、shimming 評価に用いた水信号の位相を用い、2D 時間領域データの t_2 方向に対して渦電流磁場補正を施した。この結果得られた時間領域データに対して窓関数を施した。窓関数としては、 t_2 方向には $lb = -1\text{ Hz}$ 、 $gf = 0.15\text{ s}$ の Lorentz-Gauss 変換を、 t_1 方向には $gf1 = 0.1\text{ s}$ 、 $gfs1 = 0.075\text{ s}$ の shifted Gauss 関数を適用した。続いて zero-filling を施し、 t_1 方向に 1024 ポイント、 t_2 方向に 4096 ポイントの 2D 時間領域デ

ータを得た。この時間領域データに対して2D フーリエ変換を施し、2D スペクトルを得た。得られたスペクトルデータの表示には、絶対値表示を用いた。

ボランティア測定

ボランティア測定では、VOI を頭頂-後頭葉領域の 27 ml に設定した。それ以外のシーケンス条件は、脳模擬ファントム実験の場合と同様に設定した。測定プロトコルに関しても、脳模擬ファントムの場合と同様とした。VOI 内の FASTMAP の結果、shimming 評価シーケンスで得られた水信号の半値幅は 7 Hz であった。RF パワー調整等の条件調整後、局所励起 CT-COSY 信号を取得した。得られたデータに対し、脳模擬ファントムと同様、渦電流磁場補正、窓関数、zerofilling を施した。窓関数は、 t_2 方向には $gf = 0.15$ s の Gauss 関数を、 t_1 方向には $gf1 = 0.1$ s、 $gfs1 = 0.075$ s の shifted Gauss 関数を施した。ボランティア測定の場合、これ等に加えて、 F_2 方向の周波数補正、 F_1 ノイズ補正を施した。すなわち、上記で得られた時間領域データに対して t_2 方向の 1D フーリエ変換を施し、 t_1 - F_2 領域データを得た。次に、N-アセチルアスパラギン酸(NAA) ピークを利用して F_2 方向の周波数補正を施した。続いて、 F_1 ノイズ補正として、NAA ピークの位相が各々の t_1 において等しくなるように F_2 方向の 0 次位相補正を実施した。以上によって得られた t_1 - F_2 領域データに対して、 t_1 方向の 1D フーリエ変換を施し、2D スペクトルを得た。

3. 結果

脳模擬ファントムによる評価

得られた局所励起 2D スペクトルを Fig. 2 に示す。 F_1 方向のデカップリングの効果により、グルタミン酸 4 位 (Glu-4, $\delta_H \sim 2.34$ ppm)、グルタミン 4 位 (Gln-4, $\delta_H \sim 2.43$ ppm) の対角ピークが分離、検出できている。一方、交差ピークに関して、Glu-3 ($\delta_H \sim 2.12$ ppm) と Glu-4、Gln-3 ($\delta_H \sim 2.13$ ppm) と Gln-4 のピークが分離、検出されている。GABA に関しては、GABA-4 ($\delta_H \sim 3.01$ ppm) の対角ピークは、Cr ピークに埋もれているものの、GABA-2 ($\delta_H \sim 2.28$ ppm)、GABA-3 ($\delta_H \sim 1.89$ ppm) の対角ピークが、認められる。また、GABA の交差ピークは、GABA-3 ($\delta_H \sim 1.89$ ppm) と GABA-4、GABA-2 ($\delta_H \sim 2.28$ ppm) と GABA-3 のそれぞれが検出できている。以上より、局所励起 CT-COSY により、グルタミン酸、GABA およびグルタミンを分離、検出できることが実証できた。

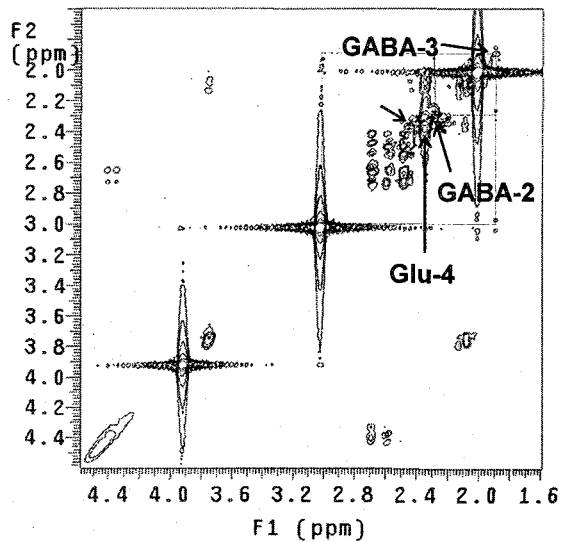


Fig. 2. A CT-COSY spectrum of the brain phantom.

ボランティア測定

得られた人脳の局所励起2Dスペクトルを Fig. 3 に示す。脳模擬ファントムの場合と同様に、Glu-4、Gln-4、GABA-2 の対角ピークが認められる。交差ピークに関しては、Glu-3 と Glu-4 のそれが認められる。Fig. 4 には、脳模擬ファントムスペクトルと人脳スペクトルの対角ピークのプロファイル、すなわち対角スペクトルを示す。2.3 ppm 近辺のスペクトル形状が人脳スペクトルと脳模擬ファントムとで類似しており、グルタミン酸、グルタミン、GABA が人脳においても検出できることが実証できた。

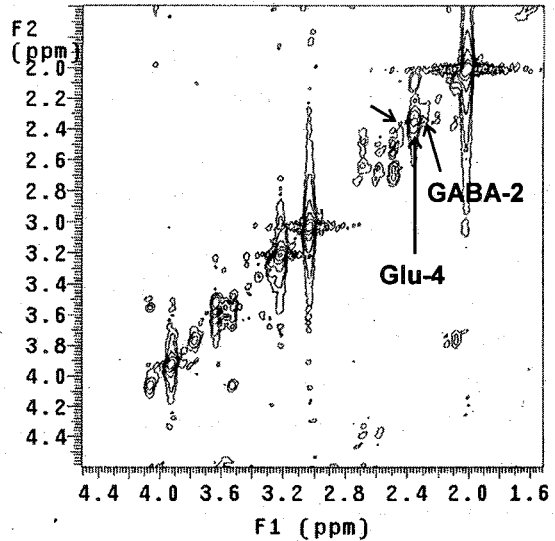


Fig. 3. A CT-COSY spectrum of the human brain.

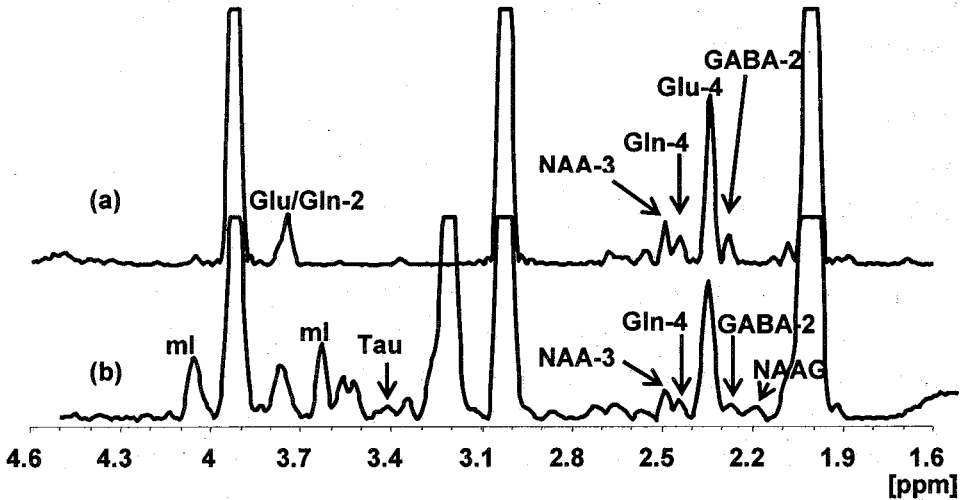


Fig. 4. A diagonal trace for 2D spectrum obtained from the brain phantom (a) and that from the human brain (b).

4. 結語

4.7 Tでの局所励起 CT-COSY は、人脳でのグルタミン酸、グルタミン、GABA の検出に有用である。

参考文献

1. 渡邊英宏, 高屋展宏, 三森文行, 第 42 回 NMR 討論会要旨集, 2003, 398-401
2. Tkac I. et. al., Magn. Reson. Med., 1999,41:649-656
3. Gruetter R. et al., Magn. Reson. Med., 1993;29:80-811

(あきた産業振興機構) ○中村和浩、若井篤志、
Jeff Kershaw、David Wright、(秋田県立脳血管研究センター) 近藤靖、菅野巖

Chemical shift properties in brain tissue using hyperpolarized Xe-129
K.Nakamura, A.Wakai, J. Kershaw, D. Wright (Akita Industry Promotion Foundation) Y.
Kondoh, I. Kanno (Akita Research Institute for Brain and Blood Vessels)

After inhalation of hyperpolarized ^{129}Xe gas, in vivo spectra from the rat head revealed a dominant peak around 195ppm (Peak A) and another easily resolvable peak near 189ppm (Peak B), a broad peak around 210 ppm and two minor peaks around 198 ppm and 192 ppm. By ligating the main feeding blood vessels of non-brain tissue (external carotid arteries; ECA and pterygopalatine arteries; PPA), we found that the amplitude of the Peak B was greatly reduced in the ECA/PPA ligated rats, while Peak A persisted. And also a comparison is made of the washout times of Peak A and Peak B by using a strict two-pulse measurement protocol. The washout time of peak B was consistently longer than that of peak A. These results strongly suggest that ^{129}Xe signal originating from rat brain is overwhelmingly dominated by the single resonance at 195 ppm.

1. はじめに

核磁気共鳴(NMR)において信号強度は、ゼーマン準位間の配分比である偏極率に比例した値である磁化量に基づいており、熱平衡状態での偏極率を高め、強い信号強度を得るために高磁場環境下で測定をおこなうことが一般的である。一方、アルカリ金属原子を用いた光ポンピング法により、キセノン原子やヘリウム原子の偏極率を熱平衡状態の1万倍以上である数%~数10%に偏極させる手法が知られており、近年さかんに研究が進められている。1994年にはAlbertらにより、高偏極核種を用いた核磁気共鳴画像(MRI)が発表されており、高偏極ヘリウムを用いた肺の画像診断手法は確立されつつあるといえる。光ポンピング法は限られた核種にしか適用できないため、現在広く用いられているプロトン NMR の信号強度を向上するために利用することは困難であるが、この手法により生成された高偏極核種をトレーサーとして利用する可能性が検討されている。溶解した ^{129}Xe が周囲の磁場環境の変化を受けガス成分とは異なる核磁気共鳴周波数(ケミカルシフト)を示すことが知られており、脂溶性であるため生体組織内に取り込まれ易い性質を利用すれば、ケミカルシフト周波数における信号減衰特性から血流計測が、組織内縦緩和時間の推定から酸素飽和度が測定できると考えている。

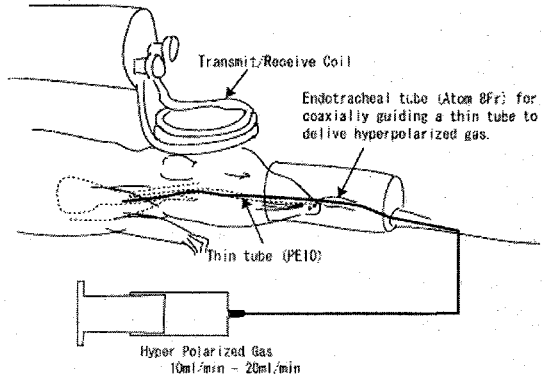
キーワード：高偏極 Xe, 脳スペクトラム、ケミカルシフト、組織内縦緩和時間

著者：なかむら かずひろ、わかい あつし、じえふ かーしょう、でーびつど らいと、
こんどう やすし、かんの いわお

こうした実験を進める上で大事な事は、第一にそのケミカルシフトの帰属を明らかにすることであり、第二に、その動態を詳細に解析することである。ケミカルシフトの帰属を明らかにするため、我々は、脳実質以外の頭部への血流を遮断する実験を行ない、脳組織から得られるスペクトラムの位置について、195ppm 付近のピーク(Peak A)が脳組織由来であり、189ppm 付近のピーク(Peak B)は脳実質以外の組織由来であることを見出した。また、その動態を解析するため、 ^{129}Xe 吸入後の減衰時間を、Peak A, Peak B それぞれについて算出し、血流量の観点からその帰属の確認をおこなった。

2. キセノン吸入、測定方法

オスのSD ラットにはあらかじめハロセン麻酔下において、気管チューブ(Atom 8Fr;内径 3mm)を挿管しておく。これは、キセノン投与用の細管を同軸状に挿入し、キセノンガスを効率良く肺に吸入させたためである。NMR 計測は、4.7T の Varian 製 MRI 計測装置でおこない、3cm のプロトン・キセノン両方に同調可能な自作の表面コイルを利用した。MRI 計測中においては持続麻酔下にあり、血液酸素飽和度と心拍数をパルスオキシメータ(NONIN 8600V)で測定することで麻酔深度を一定の状態に保持している。キセノン投与用のラインは、およそ 1m ほどの細径チューブからなり、3 活栓を介してディスポーザブルシリンジに接続される。このラインを挿管した気管チューブの内側に挿入し、その先端を肺の極近傍に配置した。高偏極キセノンガスはアルカリ金属を利用する光ポンピング法を利用した自作の偏極装置により生成され、高偏極ガス(91%濃縮エンリッチ ^{129}Xe 80%, N_2 20%)の偏極率は、およそ 2-8%であった。実験毎に、25cc の高偏極 ^{129}Xe ガスを 20ml の偏極装置のポンピングセルからディスポーザブルシリンジに移し換えた後マグネットの外部で、ラインに接続し、シリンジを手動で 20~40 秒にわたり押し出すことにより肺に吸入させた。NMR 計測時の測定構成を Fig. 1 に示す。NMR 信号取得のための高周波パルス送受信周波数はガスピークから 150ppm 程度離れた周波数に設定し、測定周波数幅は 30kHz であり、測定時間は 0.4 秒であった。測定されたガスピークの半値幅の中央値を 0ppm と定義し、測定周波数と帯域幅からケミカルシフトの値を定義した。スペクトラムはフーリエ変換する前に、指数関数による重み付け乗算(バンド幅 20Hz 増相当)を行なった後、位相補正をおこなっている。



3. ラット頭部スペクトラム

実験動物(雄 SD-Rat, 8W, 320g)から得られた典型的なスペクトラムを Fig.2 に示す。およそ、5%の高偏極 Xe ガスを 40 秒間吸入させ、

吸入開始のおよそ 3 秒前から、1.25sec 毎に 60 回(約 70 秒)の間 ハードパルス(パルス幅 24us、パルス強度約 10W)を印加したデータである。195.4ppm に大きいピーク(Peak A)が観測され、189.8ppm に 2 番目に大きいピーク(Peak B)があり、198.7ppm, 192.4ppm にも小さいながらピーク

Fig. 1 : Schematic of the experiment setup. ^{129}Xe was delivered almost directly into the lungs through the coaxial insertion of a thinner tube to endotracheal tube.

クが観測されている。又、210ppm 近辺に非常に幅の広いピークが観測されている。

4. ECA/PPA 遮断実験

Fig.2 で観測された各々のピークの帰属について、頭部・胸部肺部位・胸部心臓部位それぞれの断面に局限したスペクトラムから、192ppm が脂肪組織、199ppm が組織、210ppm が血液由来の信号としている報告や、ヒト脳において観測されるピークの動態解析から 197ppm が脳灰白質、194ppm が脳白質由来の信号と推測している報告がある。我々は、ラット頭部においてよく発達している側頭筋からの信号が、ピークを構成している可能性を考慮し、側頭筋といった脳実質以外への頭部への血流を遮断する実験を行なうため、外頸動脈 (Extra Carotid Arteries;ECA) と翼口蓋動脈 (Pterygopalatine Arteries;PPA) を結紮する実験を行なった。この結果、PPA/ECA を遮断したラットから得られたスペクトラムでは 195ppm 付近の Peak A だけが残り、189ppm 付近の Peak B は観測されなかった (Fig.3)。

哺乳動物において、脳に栄養を供給している血管は左右の椎骨動脈及び、内頸動脈から構成されており、頭表面の筋肉及び皮膚組織に対する血管支配は、内頸動脈から分岐した ECA と PPA が大部分を占めることを考慮すると、Peak A が脳組織由来であり、Peak B は脳組織以外の筋肉や皮膚組織に帰属することになる。

5. ケミカルシフトピークの動態解析

ケミカルシフトの各々のピークについてその減衰時間の解析を試みた。高偏極キセノンでは NMR 信号を取得する際の高周波パルスの照射による $\cos \theta$ 減衰と呼ばれる特有の減衰が存在する。これは、プロトンでは充分な時間が経過すれば縦磁化成分が熱平衡状態の大きさに戻るのに対し、高偏極キセノンでは縦磁化成分が、パルス強度に依存したフリップ角に相当する分だけ減少

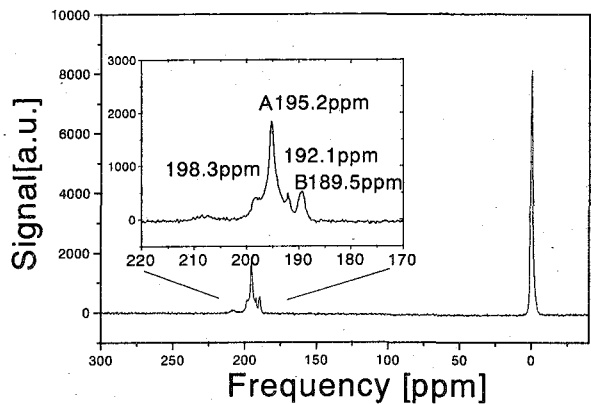


Fig.2: Typical ^{129}Xe spectrum obtained from a rat head. All chemical shifts are quoted with respect to the gas resonance.

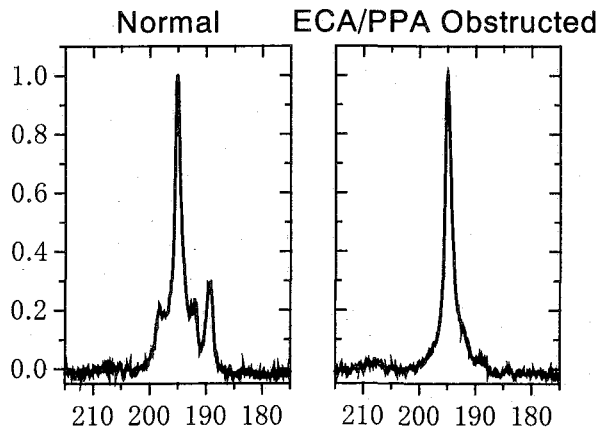


Fig.3: Typical ^{129}Xe spectrum obtained from normal and ECA/PPA ligated rats. The amplitude of the Peak B (189ppm) was greatly reduced in the ECA/PPA ligated rats, while Peak A (195ppm) persisted.

する一方だからである。一般に用いられる一定時間(TR)毎に複数回のパルスを加える手法では、減衰時間特性と、 $\cos \theta$ 減衰を分離することができない。信号の減衰時間を推定するために、異なる繰り返し時間若しくは、異なるフリップ角を組み合わせた手法が必要となる。我々はこの目的のため、信号強度が減衰する区間に 2 回のパルスをかける方法で、減衰時間を推定する手法を提案している。この推定手法は、RF パルス強度一定の条件で、異なる TR 時間のピークの大きさ $S1, S2$ をそれぞれもとめ、その対数比である $\ln(S2/S1)$ を求めれば、そのグラフの傾きから減衰時間の逆数を推定することが可能な手法である。この手法は、減衰時間推定にあたってフリップ角を仮定する必要が無いため、RF 磁場が不均一であり、フリップ角の仮定が難しい表面コイルによる測定例にも適用できる。Fig.4 に異なる間隔時間(TR)における一番目の RF パルスと 2 番目の RF パルスの信号強度の対数比の変化を示す。最小 2 乗法により求めた信号減衰時間の推定値は Peak A において 14.7 ± 1.0 sec、Peak B において 25.4 ± 10.4 sec であった。誤差は 95%信頼区間により求めた値であり、Peak B の信号減衰時間は、Peak A の信号減衰時間に比べて、明らかに長い値であった。Peak A, Peak B の信号強度は 2 つのローレンツ関数を用いた近似関により求めており、各点における誤差は、 $420\text{ppm} \cdot 244\text{ppm}$ におけるスペクトラムの標準偏差を雑音として、Peak A, Peak B の信号強度における 信号/雑音比を考慮して計算された。又、2 番目の RF パルスを与えた時の Peak B の信号/雑音比が 3 以下のものは、有為な信号を測定していないと判断し、解析から除外した。偏極キセノンにおいて、信号の減衰時間は、組織内血流量と組織内縦緩和時間に依存した値となることが知られており、減衰時間の違いは、組織内血流量若しくは生体内縦緩和時間あるいは組織間の分配定数の違いによって生じていると考えられる。ラットにおいて脳組織の血流量はおよそ、 $70 \sim 100 \text{ ml}/100\text{g} \cdot \text{min}$ であり、脳組織以外の頭部の筋肉組織においては $4 \sim 10 \text{ ml}/100\text{g} \cdot \text{min}$ であることが知られている。キセノンの脳組織内縦緩和時間を 30 秒として、信号減衰時間からそれぞれのピークの血流量を推定すると、Peak A から推定した血流量 ($100\text{ml}/100\text{g} \cdot \text{min}$) は脳組織の血流量と良く一致しており、Peak B から推定した血流量 ($20\text{ml}/100\text{g} \cdot \text{min}$) は信号推定誤差を考慮すると、頭部筋肉組織の血流量とほぼ同程度となる。Peak A, Peak B の帰属が減衰時間の違いからも確かめられたことになる。

謝辞

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構地域結集型共同研究事業、「次世代磁気記録技術と脳医療応用技術開発」によるものであり、ここに感謝いたします。

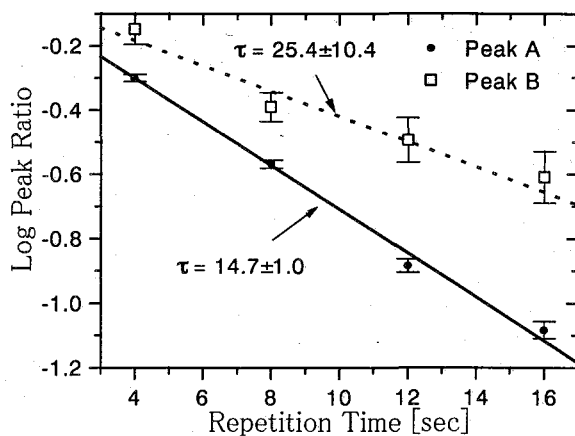


Fig.4: The washout estimation of Peak A and Peak B from the relationship between log signal ratio and interpulse delay using four different TRs. The washout time of the peak B was consistently longer than the washout of the peak A.

多核固体NMRを利用した電気2重層キャパシタの作用機構解明
 1;新日鐵 先端研、2;日鐵テクノリサーチ、3;九大先導研
 ○齋藤公兎1、金橋康二1、畠山盛明2、李 相益3、持田 勲3

Multi Nuclear NMR Study on Behaviors of an Organic Electrolyte in Charged and Discharged States on Activated Carbon Electrode of Medium Surface Area in EDLC

1;Advanced Research Labo. Nippon Steel Corp. 2;Nippon Steel Techno Rearch 3;Kyushu University

○ Koji Saito, Koji Knehashi, Moriaki htakeyama, Lee-Shoeki and Isao Mochida

< Abstracts >

In the present study, activated carbon was obtained from optically anisotropic spherical carbon by NaOH activation to follow the physical and chemical behaviors of an organic electrolyte Et_4NBF_4 in PC on the activated carbon since such an activated carbon was reported to show and excellent performances in EDLC. Behaviors of electrolytes in the negative and positive electrodes of the electric double layer capacitor were observed under the impregnated, charged and discharged conditions by ^{11}B and ^{13}C solid state NMR with PC solvent. Solid state NMR is a sole and powerful method to solve the chemical and dynamic behaviors of the electrolyte ions and polar solvent present in the pore or adsorbed on the pore wall of the electrode carbon. Hence several states of the electrolyte or its ions must be present in the charged as well as impregnated stages. Such image-able states of the electrolyte and their inter-transformation can be detected by in situ solid state NMR on B and C nuclei of the electrolyte as attempted in the present study.

1. INTRODUCTION

The electric double-layer capacitor (EDLC) using activated carbon as electrodes has been recognized as an efficient storage device for the electric power because of its better rate capability and longer cycle life as compared to secondary batteries in spite of its low energy density [1,2]. Recently new applications utilizing such performances have been attempted as an energy storage device for electric vehicle or pulse-current supply. In order to meet the specification for new application, it is necessary for a particular activated carbon to have much higher energy densities per both weight and volume than those of the conventional ones. In the present study, activated carbon was obtained from optically anisotropic spherical carbon by NaOH activation to follow the physical and chemical behaviors of an organic electrolyte Et_4NBF_4 in PC on the activated carbon since such an activated carbon was reported to show and excellent performances in EDLC [3]. Behaviors of electrolytes in the negative and positive electrodes of the electric double layer capacitor were observed under the impregnated, charged and discharged conditions by ^{11}B and ^{13}C solid state NMR with PC solvent. Solid state NMR is a sole and powerful method to solve the chemical and dynamic behaviors of the electrolyte ions and polar solvent present in the pore or adsorbed on the pore wall of the electrode carbon [3-5].

2. EXPERIMENTAL

Hyper-polarized ^{129}Xe gas was prepared through laser-aided polarization apparatus (Toyoko Kagaku Co., Japan) which contacted Rb vapor with Xe gas under the irradiation of laser near the external magnet. The polarized ^{129}Xe gas (10mL) was introduced by plastic syringe into a 10mm-size glass NMR tube containing 1g of porous standard materials with the well-defined average pore size. The ^{129}Xe -NMR spectrum was obtained on the JEOL alpha-400 spectrometer of 400MHz. The Xe-NMR shift was referred to that of the ^{129}Xe gas without any adsorbent (0 ppm) as the external standard. M500 was degassed overnight at 150 centi-degree under vacuum before ^{129}Xe -NMR measurement.

Samples for ^{11}B -magic angle spin (MAS), ^{11}B -multiple quantum magic angle spin (MQMAS) and ^{13}C -MAS NMR measurements were prepared at 25 centi-degree in a two-electrode galvanostatic system using 1M Et_4NBF_4 in PC as an electrolyte. The disc-type electrode (about 25mg) was composed of M500 (80wt%), PTFE as a binder (10%), and carbon black as a conductive (10%). The electrode was impregnated (No.1) in the electrolyte solution under vacuum for 3h. The test cell was charged to 2.7V at a current density of 200mA/g to measure the cathode (No.2) and anode (No.3), and then discharged to 0V at the same current density to measure the respective electrodes (No.4, No.5) separately.

キーワード; MQMAS、多核固体NMR、超偏極 Xe、キャパシタ、多孔体

○さいとうこうじ、かねはしこうじ、はたけやまもりあき、りそうえき、もちだいさお

Disc-type electrodes at the impregnated, charged and discharged states were cut into pieces, loaded in the tightly sealed NMR sample tube of 4mm in diameter, and spun at 12 kHz. All ^{11}B -MAS NMR spectra were obtained at 96.423MHz by a Chemagnetics CMX-300, and referenced to saturated aqueous boric acid (19.5ppm).

3. RESULTS

^{129}Xe -NMR spectrum of M500 with specific surface area of $500\text{m}^2/\text{g}$ is shown in Figure 1. The spectrum showed a sharp peak at 0ppm and a broad one at the higher chemical shift. A sharp and a broad peaks can be assigned to the non-adsorbed ^{129}Xe and the adsorbed ^{129}Xe on the pore walls of M500, respectively. Chemical shift of the adsorbed ^{129}Xe on the pore wall of M500 was found to be 100ppm. Average pore size was obtained by comparing the chemical shift on the maser curve. Average pore size of M500 was noted as 0.97nm.

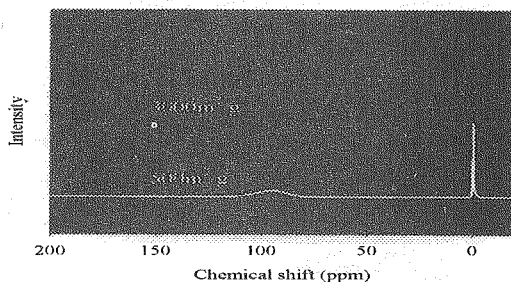


Fig.1 ^{129}Xe -NMR spectrum of M500 and M3000

(1) Behaviors of the anion

Figure 2 shows ^{11}B -MAS NMR spectra of BF $_4^-$ on electrodes in various states. All spectra showed a sharp peak (peak A) at -3ppm and broad one (peak B) ranging from 0ppm to -11ppm, although the broad peaks of No.2 and 3 were rather sharper than those of other samples. The resonance of the particular species present in pore of activated carbon has been reported to shift to low field by π -electron shielding on the graphene planes of activated carbon. Also adsorption of anion, BF $_4^-$, restricted its mobility, resulting in broadening the peak. Therefore, the sharp and broad peaks are assigned to the non-adsorbed anion present freely in the pore and the adsorbed one on the pore of activated carbon, respectively, since the major electrolyte over the outer surface of the carbon surface were wiped out before the measurement. Although it is difficult to conduct the quantitative analyses in NMR, optimal 90o pulse for each sample was performed to attempt the quantification among the samples in the present study. Also flip angle of 18 degree was examined to reduce the difference in sensitivity between the sharp and broad peaks. Signal to noise (S/N) ratio of each spectrum enables us to suggest that the total amount of anion (A+B) is in the following order; No.2>>No.4=No.5>No.3>No.1. ^{11}B -MAS NMR spectra were smoothed to deconvolute into two peaks and the integrated ratios (peak B/peak A) are summarized. The ratios were in the same order as that of the total amount of anion. This means that the more amount of anions was adsorbed on the pore wall of the positive electrode when the electrode was electrochemically charged.

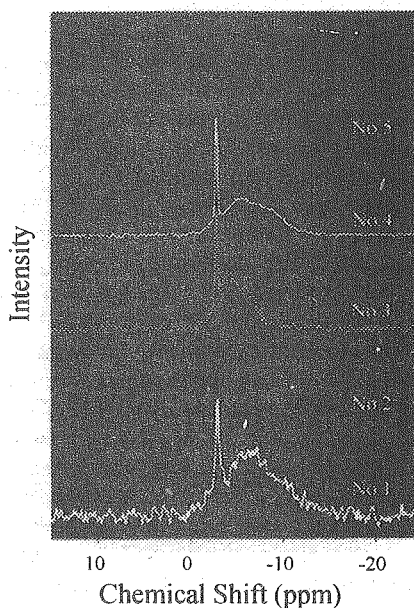


Fig.2 ^{11}B -MAS NMR spectra for 5 samples

^{11}B is a quadrupolar nucleus with half-integer spin number ($I=3/2$). Line broadening and splitting of the central transition ($-1/2, 1/2$) in ^{11}B -MAS spectrum can result from the second-order interaction of the nuclear quadrupolar moment surrounded by the local electric field gradient [6]. It is often difficult to characterize chemically nonequivalent boron sites, when distinct boron sites are overlapped each other under the regular MAS conditions. One among the techniques overcoming the second-order quadrupolar interaction is multiple quantum magic-angle spinning (MQMAS) NMR. Figure 3 show ^{11}B -MQMAS NMR spectra of the charged positive (No.2) and discharged positive (No.4) electrodes, respectively. Although there were two peaks (sharp and broad peaks) in MAS spectrum of Figure 3, MQMAS spectra showed that the broad peak (B) in MAS spectrum consisted of two distinct sites. This is the

first direct indication on the states of ^{11}B ion present in activated carbon electrode treated electrochemically.

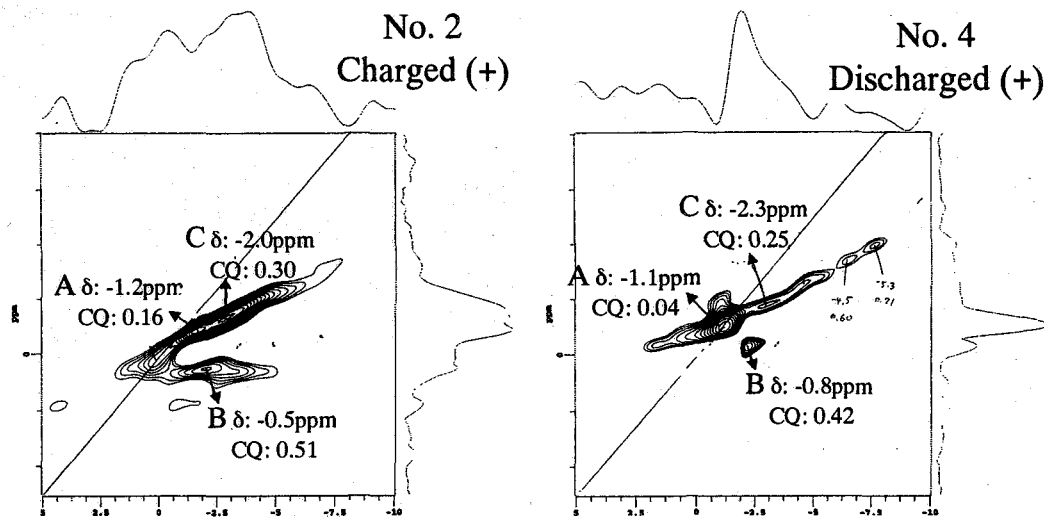


Fig.3 ^{11}B -MQMAS NMR spectra of the charged positive and discharged positive electrodes

Chemical shift and quadrupolar constant (CQ) of sites C, D and E are summarized. From chemical shift and quadrupolar constant, the site C is assigned to be the anion present freely in the pore (peak A in ^{11}B -MAS), whereas the sites D and E reflect the adsorbed anions on the pore wall of activated carbon (peak B in ^{11}B -MAS). The CQ of site E was larger than that of site D, implying higher extent of deformation in B nucleus on the site E. Although there were no significant changes in both chemical shift and quadrupolar constant according to discharge, the intensities of the peaks were certainly changed. Site E kept its intensity of peak after discharge, although site D lost its intensity in the state of charge. This indicates that anion of site D changes the amount by charge-discharge by its coming and going from the pore.

T_1 relaxation time was determined by the saturation recovery method on the basis of chemical shifts of three sites in MQMAS spectrum to be summarized in Table 1. In the impregnated states, sites C, D and E provided the T_1 values of 2.00, 0.90 and 0.90s, respectively. The anions on the wall were certainly restricted in their motion compared with those in the free space of the pore (site C).

The charge decreased T_1 s very significantly regardless of the locations of the anions on the positive electrode, although those on the sites D and E were fixed slightly more strongly. In contrast, the values of the negative electrode increased significantly again regardless of the sites, suggesting their increased mobility. The discharge recovered the values (No.4 and 5) similar to those of the impregnated states regardless of the sites (No.1), although the recovery of the positive electrode was certainly slow, especially on the site C. It must be noted that T_1 values of the anions in the pore (site C) were definitely influenced by charge and discharge, even if they did not definitely appear to be adsorbed. Their contribution to the capacitance is suggested.

Table 1 NMR relaxation time of M500 and M3000

No.	T_1 (s)			No.	T_1 (s)	
	A	B	C		A	B
1 (Impregnated)	2.00	0.90	0.90	1 (Impregnated)	0.98	0.63
2 (Charge +)	0.09	0.05	0.03	2 (Charge +)	0.65	0.61
3 (Charge -)	4.40	2.10	1.70	3 (Charge -)	0.72	0.71
4 (Discharge +)	0.78	0.35	0.26	4 (Discharge +)	0.33	0.58
5 (Discharge -)	2.10	0.40	0.30	5 (Discharge -)	0.44	0.86

(2) Behaviors of the cation

The cation (TEA), the anion (TfB) and solvent (PC) are used. Cation and solvent have two (C1 and C3) and four (C2, C4, C5 and C6) nonequivalent carbon nuclei, respectively. ^{13}C -MAS NMR spectra of the cation and the solvent at the various states are shown in Figure 4. All spectra had the broad baselines showing their maxima at 125ppm regardless of the samples. Carbon species of the cation (C1 and C2) were much lower in their intensity than those of the solvent (C2, C4, C5 and C6) because the salt is dissolved in the solvent at the concentration of 1M. All carbon species from C1 to C6 consisted of two peaks, the sharp and broad peaks at their respective lower and higher magnetic fields. The sharp and broad peaks are assigned to the free and adsorbed carbon species in the pore. The impregnated electrode (No.1) carried already the adsorbed ion and solvent without any electrochemical manipulation as observed with the anion. After charging (No.2 and 3), the amount of the adsorbed ion and solvent increased significantly over that of the impregnated one (No. 1). On discharging (No.4 and 5), the amount of the adsorbed ion and solvent decreased slightly. The cathode (No.3) showing the best S/N ratio showed much smaller changes by electrochemical manipulation, when compared with those observed with the anion.

4. DISCUSSION

The electrolyte dissolved in the polar solvent penetrates into the pore of the activated carbon electrode with the solvent molecule in the capacitor when the electrode is impregnated with the electrolyte solution. The cation and anion of the electrolyte can behave separately or in their ion-pair form to penetrate into the pore. A portion of electrolyte can be adsorbed in forms ion pair or dissociated cation and anion on the wall of the pore. The polar solvent can be also adsorbed on the wall.

The electric field under the charge enhances the adsorption of the electrolytes or its dissociated ions in the more polarized states to form the electric double layer on the surface of the pore wall, storing the electric energy as the capacitor. In this stage, electrolyte or its ions move into or out of the pore to enhance the polarized adsorption for the double layer in the electric field. There are electrolytes present at the outer surface, in pores and on the surface of the pore wall. There are also several kinds of pores. The discharge desorbs the adsorbed species to reduce the thickness of the double layer, releasing the electric energy. Hence several states of the electrolyte or its ions must be present in the charged as well as impregnated stages. Such image-able states of the electrolyte and their inter-transformation can be detected by in situ solid state NMR on B and C nuclei of the electrolyte as attempted in the present study.

5. CONCLUSION

Multi nuclear Solid state NMR is a sole and powerful method to solve the chemical and dynamic behaviors of the electrolyte ions and polar solvent present in the pore or adsorbed on the pore wall of the electrode carbon.

REFERENCES

- [1] Nishino, A. J. Power Sources 1996, 60, 137.
- [2] Christen, T.; Carlen M. W. J. Power Sources 2000, 91, 210.
- [3] Takeuchi, M.; Koike, K.; Maruyama, T.; Mogami, A.; Okamura, M. Denki Kagaku 1998, 66, 1311.
- [4] Min, K. H.; Takimoto, Y.; Yamada, K.; Simoyana, T.; Yamamoto, K.; Yonemori, S.; Hiratsuka, K. Fall Meeting of ECS, San Francisco, 2001, Abstract No.283.
- [5] Harris, R. K.; Thompson, T. V.; Forshaw, P.; Foley, N.; Thomas, K. M.; Norman, P. R.; Pottage, C. Carbon 1996, 34, 1275.
- [6] Massiot D., Touzo B., Trumeau D., Coutures J.P., Virlet J., Florian P., Grandinetti P.J. Solid State NMR 1996, 6, 73.

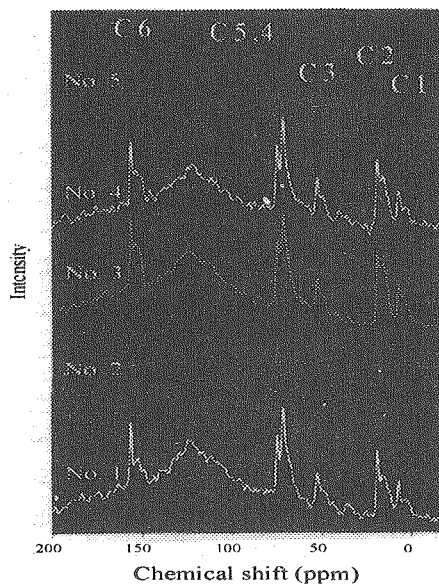


Fig.4 ^{13}C -MAS NMR spectra of the cation and the solvent at the various states

¹京大化研・²科学技術振興機構さきがけ 21
○梶 弘典^{1,2}・塚本直樹¹・山田知典¹・堀井文敬¹

Precise Analysis of Amorphous Structures of Organic EL Materials by Two-Dimensional
Double-Quantum Solid-State NMR and Quantum Chemical Calculations

Hironori Kaji^{1,2}, Naoki Tsukamoto¹, Tomonori Yamada¹, and Fumitaka Horii¹

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

²Structural Ordering and Physical Properties, PRESTO, JST

Isomeric states of tris(8-hydroxyquinoline) aluminum (III) (Alq₃), which is one of the most widely used light-emitting and electron-transport materials in organic electroluminescent devices, have been investigated by ²⁷Al and ¹³C solid-state NMR combined with density functional theory calculations. It is found that Alq₃ in the crystal form α and in the amorphous state are composed of the meridional isomer, whereas those in the crystal forms γ and δ are composed of the facial isomer. The blue-shifted fluorescences are observed for γ - and δ -Alq₃ compared to α - and amorphous Alq₃, indicating a close relation between the isomeric states and the light-emitting properties. We will discuss the results of two-dimensional double-quantum (2D DOQSY) ¹³C NMR experiments on a hole transport material, 4,4'-bis(phenyl-*m*-tolylamino)biphenyl (TPD), aiming at the analysis of molecular packing in the amorphous state. The results of cationic and dicationic states of TPD are also shown.

緒言

有機電界発光(EL)材料の様々な階層における構造は EL 特性に大きく影響すると考えられるが、素子が非晶状態で用いられるため、その詳細は明確にされていない。本研究では、種々の固体 NMR 測定と密度汎関数(DFT)計算により、発光・電子輸送材料である tris(8-hydroxyquinoline) aluminum (III) (Alq₃)と正孔輸送材料である 4,4'-bis(phenyl-*m*-tolylamino)biphenyl (TPD)の構造に関し、検討を行った。

Alq₃ 多形の構造と発光特性

図 1 に、 α -, γ -, δ -, 非晶 Alq₃ の ²⁷Al MAS スペクトルを示す。 α -Alq₃ と非晶 Alq₃ が幅広いスペクトルであるのに対し、 γ -, δ -Alq₃ はシャープなスペクトルを示し、これらの構造の類似性が示唆される。シミュレーション解析から、 γ -, δ -Alq₃ に対する電場勾配非対称パラメータ η がそれぞれ 0、および 0.24 と決定された。3 つの配位子が等価な環境にある facial 体の Alq₃ 一分子の DFT 計算を行ったところ $\eta = 0$ となり、したがって、 γ -Alq₃ は facial 体であることが明らかとなった。一方、 δ -Alq₃ に関しては、facial 体であると仮定した場合の結晶構造に基づいた DFT 計算により $\eta = 0.26$ と得られており、今回の実験値との良好な一致を示した。したがって、 δ -Alq₃ で $\eta \neq 0$ であるのは、結晶パッキングによることが明らかである。一方で、 γ -Alq₃ のスペクトルに結晶パッキングによる影響がないことは興味深い。 α -および非晶 Alq₃ に関しては、シミュレーションスペクトルでの

キーワード: 有機 EL、非晶構造、固体 NMR、電荷輸送材料、発光材料

かじ ひろのり、つかもと なおき、やまだ ともりのり、ほりい ふみたか

再現はあまりよくないが 大雑把には $\eta \approx 1$ であり、3つの配位子が異なる環境にある meridional 体であることがわかる。実測スペクトルとの違いは構造の局所的な乱れ等によるものと推察される。CP/MAS ^{13}C NMR スペクトルにおいても、上述の結論を確認する結果が得られた。蛍光測定の結果、 α -および非晶 Alq_3 ではそれぞれ 510 および 509 nm で蛍光強度が最大となったが、 γ -, δ - Alq_3 ではブルーシフトし、それぞれ 468 および 466 nm となった。この結果は、 Alq_3 分子の構造と発光特性の相関を明確に示している。

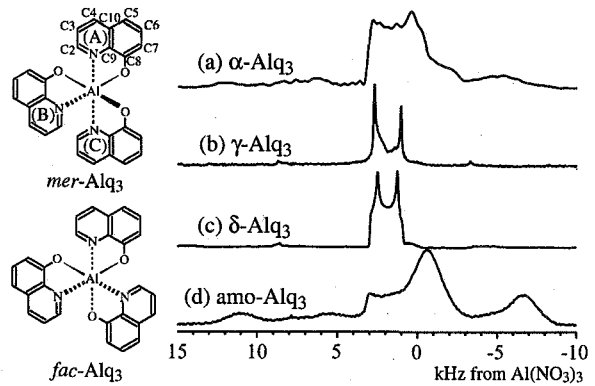
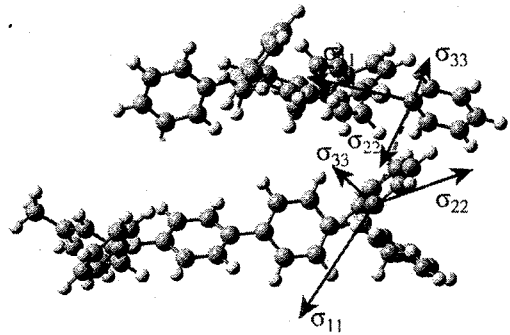


Fig. 1. ^{27}Al MAS NMR spectra of (a) α -, (b) γ -, (c) δ -, and (d) amorphous Alq_3 .

非晶 TPD の分子間パッキング

低分子有機材料における電荷輸送は分子間ホッピング伝導により起こると考えられる。したがって、分子間配向相関および分子間距離の解明は電荷輸送過程の解明に重要である。特に、Bässler の Gaussian Disorder Model によると、非晶状態におけるこれらの"分布"が重要であると示唆される。ここでは、フェニル基の四級炭素を ^{13}C 同位体ラベルした非晶 TPD (^{13}CQ -aTPD) に対して ^{13}C 二次元二量子 (2D DOQSY) 固体 NMR 測定を行い、分子間パッキングの精密解析を試みた。この測定では同位体ラベル部位の CSA



とその二量子の相関を観測する。図2に二量子励起時間(τ_{DQ})が 0.5 および 3 ms の場合の 2D DOQSY スペクトルを、完全にランダムな分子間パッキングを考えた場合のシミュレーションスペクトルとともに示す。特に、 $\tau_{\text{DQ}} = 0.5$ ms のスペクトルから、局所的な(~4 Å 以内の)パッキングに関し、特定の分子間相関の存在が明らかである。今後、精密なシミュレーション解析により、分子間パッキングの詳細を明らかにする予定である。

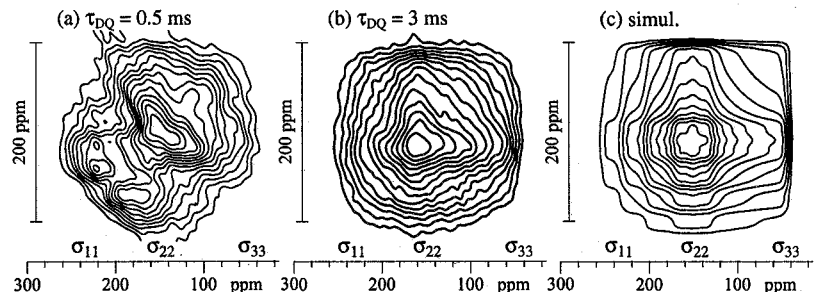


Fig. 2. Sheared ^{13}C 2D DOQSY NMR spectra of ^{13}CQ -aTPD. Experimental spectra with $\tau_{\text{DQ}} = 0.5$ ms (a), 3 ms (b); simulation with random orientation (c).

TPD のカチオン状態

また、固体 NMR、DFT 計算による TPD のカチオン、ジカチオン状態の構造に関する研究に関しても報告する。

以上に関連する研究を、ポスター発表(3P132, 1P133, 1P136)においても報告する。

Development of Microcoil NMR Probehead and Analysis of orientated Fibrous Polymers

(Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology¹)○Kazuo Yamauchi¹, Teizo Imada¹, and Tetsuo Asakura¹

Solid-state NMR probehead using solenoid coil with an inner diameter of 1mm were developed for the studies of mass-limited solid samples. The probehead was designed with two RF channels in order to perform CP experiments. The S/N ratio of 1mm solenoid coil probehead was about ten times better compared with conventional probehead. The applications using this probehead were performed for structure determinations of silk fiber with ¹³C CP experiments and hydroxyl apatite with ³¹P CP experiments.

緒言

他の分析機器と比較した場合 NMR の弱点のひとつは、その感度の低さにある。従って、極微量しか得られない物質については、固体 NMR の測定が困難であった。このような微量サンプルの系を固体 NMR の測定対象にするためには、微量サンプルにターゲットを絞った、感度の高い NMR 測定技術の開発が必要となる。本研究ではマイクロコイルを用いて高感度化を得る方法[1]を行い、特に応用性と汎用性に注目し、現在用いられている 9.4T マグネットを用い、CP 法を行うことのできるプローブを製作し、繊維状高分子やハイドロキシアパタイトを用いてその有用性を検討した。

プローブヘッドデザイン

汎用的な応用研究に対応できるマイクロコイルプローブとして固体で一般的な CP の測定ができるように 2 チャンネルのプローブを設計・製作を行った。コイルは(1)式よりコイル径が小さく、巻き数が多くなることによって信号強度は増大することが分かっている。これを基にして、シミュレーションをソフトウェア"FEEMM"[2]で行い、巻き数 14 回、直径 1mm、長さ 5.4mm(コイル内サンプル量:約 4μL)のソレノイドタイプのコイルを設計し、マイクロコイルを作成した。これを用いて、固体 ¹³C、³¹P CP NMR 測定を行いプローブ性能のチェックと応用実験を行った。

$$(\text{signal to noise (volts)}) \propto \frac{\omega_0^2 n / (r^2 + l^2)}{\sqrt{R_{\text{noise}}}} \quad \text{--- (1)}$$

ω_0 = 外部磁場 (s⁻¹)
 n = コイルの巻き数
 r = コイルの半径 (m)
 l = コイルの長さ (m)
 R_{noise} = 回路抵抗 (Ω)

サンプルとしては標準物質のほかに、カイコに経口投与することにより得られた[1-¹³C] グリシンラベル家蚕絹フィブロイン繊維を用い繊維配向軸と化学シフトテンソルの方向を検討し、また微量生体物質を想定して、焼結温度の異なるハイドロキシアパタイトの ³¹P NMR スペクトルを測定した。各スペクトル

のシミュレーションは、数値解析ソフト MATLAB を用いて行った。

結果・考察

感度比較のために、今回作成したコイル市販プローブを用い、約 4mm^3 のアダマンタンの固体 ^{13}C CP NMR 測定を行った。1Φ コイルで測定したスペクトルは 64 回の積算で Fig.1(a) のような、S/N 比が 47.3 のピークが得られるのに対し、10Φ コイルで測定したスペクトルは 16 倍の積算時間をかけてもピークが観測できなかった。これは、今回測定したサンプル量は 10Φ コイルでは検出限界を下回る量で観測不可能となったと考えられ、1Φ の検出限界が通常より優れていることを示している。

作成したマイクロコイルを用いて繊維状高分子である絹フィブロインの固体 NMR 構造解析を行った。測定サンプルは、 $[1-^{13}\text{C}]$ グリシンラベル家蚕絹フィブロイン繊維を約 $70\mu\text{g}$ 用い、ガラス管内繊維軸をそろえて入れ、配向させた状態で静磁場方向に対して 90° に配置し、固体 ^{13}C CP NMR 測定を行った (Fig. 2)。この結果得られたスペクトルは、以前、10Φ のプローブを用いて報告されてきた同一試料の実測ならびにシミュレーション結果 [4] と一致した。このように、微量のサンプル量で生体高分子の配向情報を与えるスペクトルを得ることができた。マイクロコイルの利用法として微量に得られない物質を高感度に観測するだけでなく、このように、微量なサンプルであればマクロ的に配向した測定試料を作成することができる。

発表では同様に微量でも測定が行うことができる ^{31}P 核の測定およびハイドロキシアパタイトへの応用を含めた報告を行う予定である。

まとめ

今回製作したマイクロコイルプローブにより高感度化と CP 法を用いることによって高感度化が実現され、これまでに固体 NMR での測定が困難であった量の繊維状高分子から、繊維の性質を特徴づける配向構造情報が得られる事がわかった。なお本研究は「先端分析技術・機器開発事業」のプロジェクトに採択され今後マイクロコイルをさらに改良し同時に微小な生体サンプルの測定を進めていく予定である。

参考文献

- [1] K.Yamauchi, J.W.G.Janessen, A.P.M.Kentgens, *J.Magn.Reson.* **167**, 87-96 (2004).
- [2] D.Meeker, Finite Element Method Magnetics, <http://femm.foster-miller.com/> (2003).
- [3] D.I.Hoult, R.E.Richards, *J.Magn.Reson.* **24**, 71-85 (1976).
- [4] T.Asakura, M.Demura, N.Nishikawa, *Ann. Rept. NMR Spec.* **34**, 301-346 (1997).

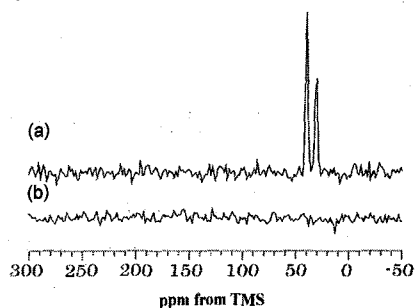


Fig.1 ^{13}C CP NMR spectra of adamantane. (a) 1Φ probe with 64 scans and (b) 10Φ probe with 1024 scans.

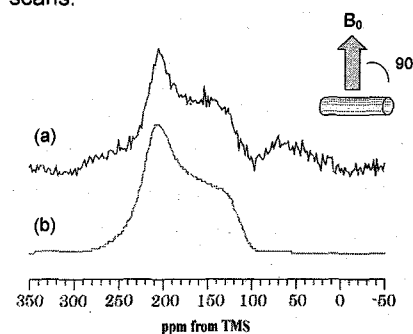


Fig.2 (a) ^{13}C CP NMR spectrum of $[1-^{13}\text{C}]$ glycine silk fibroin fiber with 1Φ probe (The fiber axis is set perpendicular to the magnetic field) and (b) simulated spectrum [4].

(東工大院理工・²高分子センター) ○金善美¹, 黒木重樹^{1,2}, 安藤 勲^{1,2}**Diffusional behavior of probe molecules in urea adduct channels
by field-gradient spin-echo NMR spectroscopy**Sunmi Kim¹, Shigeki Kuroki^{1,2} and Isao Ando^{1,2}¹Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology²International Research Center of Macromolecular Science, Tokyo Institute of Technology

The diffusion coefficients (D) of n -paraffin molecules (n -C_nH_{2n+2}) with various chain-lengths ($n=8, 12, 21, 26, 28$ and 32) in long channels of deuterated urea- d_4 adduct have been measured at 25°C by means of field-gradient spin-echo (PGSE) ¹H NMR method, in order to clarify diffusional behavior of the n -paraffins in the channels. From these experimental results, it is found that n -paraffin molecules are diffusing in the long channels and have two kinds of diffusion components such as the fast diffusion component ($D \approx 10^{-6}$ cm²/s) and the slow diffusion component ($D \approx 10^{-7}$ cm²/s). Further, it is found that the chain-length dependence of D for n -paraffins in urea- d_4 adduct is abruptly changed at the carbon number of 26. The diffusion coefficients in the fast and slow diffusion components are decreased as the carbon number is increased from 8 to 26, and are increased as the carbon number is increased from 26 to 32.

【緒言】

1940年 Bengen による尿素包接化合物の発見以来、様々な系についての研究が活発に行われてきた。ナノスケールの特定形状のキャビティーを形成し、その中にある特定のプローブ分子のみを取込むことができる尿素包接化合物は直鎖炭化水素と分岐かれの異性体を分離する非常に簡単な方法として用いられた。尿素包接化合物に関する研究は X 線回折による構造解析を主に固体 NMR、中性子散乱など様々な方法によりその結果が報告されている。本研究では尿素チャンネル中の n -パラフィン¹の運動性に注目し、高磁場勾配拡散 NMR システムを用い、 n -パラフィン分子の拡散係数を高精度に計測し、結晶内に存在するナノスケールサイズのチャンネル場とプローブ物質²の間の特異的相互作用の解明及びチャンネルに関する情報が得ることを目的した。

【実験】

尿素のメタノール飽和溶液に n -パラフィン(n -C₈H₁₈、 n -C₁₂H₂₆、 n -C₂₁H₄₄、 n -C₂₆H₅₄、 n -C₂₈H₅₆ 及び n -C₃₂H₆₆)を溶かした後、溶媒を除去することによって六方系の伸長結晶の尿素アダクトを調製した。

ナノ尿素チャンネル、磁場勾配 NMR、拡散係数、拡散距離

きむそんみ、くろきしげき、あんどう いさお

拡散係数の測定は、BRUKER DSX-300 NMR 分光器を用いて、磁場勾配により行った。すべてのサンプルの測定は粉末状態で行った。測定温度は室温で、 $\Delta=5\text{ms}$ 、 $\delta=1\text{ms}$ で磁場勾配の強さ(g : 0~1000 G/cm)を変化させながら測定した。尿素包接中の n -パラフィンの拡散係数 D は次の式(1)から決定した。

$$A(g)/A(0) = f_1 \exp[-D_1 K_1] + f_2 \exp[-D_2 K_2] \quad (1)$$

$$K = \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$$

ここで、 $A(0)$ は $g=0$ の時のエコー信号強度で、 δ 、 g また Δ はそれぞれ磁場勾配パルスの幅、強度およびパルス間の間隔である。 γ は核磁気回転比、 f_1 と f_2 は拡散係数が D_1 と D_2 有する 2 つの拡散成分分率である。ただし $f_1 + f_2 = 1$ である。

【結果と考察】

1. n -パラフィンの拡散係数の炭素数依存性

磁場勾配 NMR 法を用いて 25°C における尿素/ n - $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ アダクト中の n - $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ ($n=8, 12, 26, 28, 32$) の拡散係数を測定した。すべてのパラフィンに対して二つの拡散成分が観測された。Fig. 1(a)と(b)は、式(1)を用いて得られた 2 成分の拡散係数の炭素数依存性を示している。炭素数が 8 から 26 に

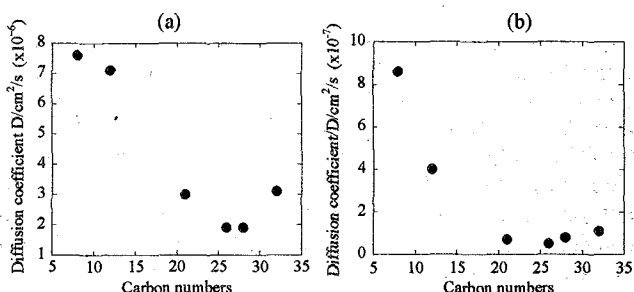


Fig. 1 Diffusing-time dependences of the diffusion coefficients of the fast diffusion component (a) and the slow diffusion component (b) of n - $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ and n - $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$ in urea- d_4 adduct

まで増加すると拡散係数は増加している。尿素チャンネル中の n -パラフィンの拡散係数は鎖長とともに n -パラフィン分子間の距離に影響されることが考えられる。つまり、炭素数 32 の場合、鎖長の増加にもかかわらず拡散係数が大きくなったのは、チャンネル中のパラフィン分子同士の CH_3 末端間の距離が増加しチャンネルの崩壊を防ぐために速く拡散しているためと考えられる。

2. 拡散係数の拡散時間依存性

尿素チャンネル中の n -パラフィンの拡散はパラフィン分子間の相互作用とともに尿素チャンネルとの相互作用に影響される。そこで本研究では拡散時間(Δ)を変えながら拡散係数を計測した。Fig. 2 には得られた尿素アダクト中の n - $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ と n - $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$ の拡散係数の Δ 依存性を示した。 Δ が大きくなるにしたがって二つの n -パラフィンの両成分の拡散係数が小さくなった。それは n -パラフィン分子はお互いに衝突しながらチャンネル内を拡散していることを意味する。

また、 n - $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ と n - $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$ の拡散係数が一定になるところの Δ が異なっている。つまり、 n - $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$ は n - $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ より

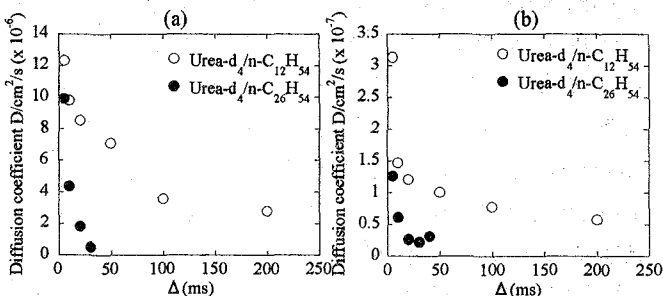


Fig. 2 Diffusing-time dependences of the diffusion coefficients of the fast diffusion component (a) and the slow diffusion component (b) of n - $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ and n - $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$ in urea- d_4 adduct

短い時間で拡散係数が一定になるのは n - $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ より CH_3 末端間距離が短いことによると考えられる。

膜蛋白質構造解析のための $(^{31}\text{P}, ^2\text{H})-^1\text{H}$ 多重接触交差分極による
 ^1H 消磁化を用いた $^{31}\text{P}, ^2\text{H}$ 近傍の固体高分解能 ^{13}C -NMR
 (阪大蛋白研, $^2\text{JBIC}$, 3 都立大院理, $^4\text{CREST/JST}$)
 ○原田英里砂 1,2 、戸所泰人 1 、藤原敏道 1 、甲斐荘正恒 3,4 、阿久津秀雄 1,4

High-resolution ^{13}C solid-state NMR observation of ^1H demagnetization by multiple-contact ($^{31}\text{P}, ^2\text{H}$) $-^1\text{H}$ cross polarization for the structural analysis of membrane protein in close vicinity to $^{31}\text{P}, ^2\text{H}$ spins

1 Institute for Protein Research, Osaka University, $^2\text{JBIC}$, 3 Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, $^4\text{CREST/JST}$
 Erisa Harada 1,2 , Yasuto Todokoro 1 , Toshimichi Fujiwara 1 , Masatsune Kainosho 3,4 and Hideo Akutsu 1,4

We observed ^{13}C spins of a peptide in the neighborhood of ^{31}P and ^2H in deuterated phospholipids. The ^{13}C NMR intensities directly indicate the depolarization of attached ^1H under cross-polarization with $^{31}\text{P}/^2\text{H}$. This method was applied to fully ^{13}C , ^{15}N labeled 14-residue peptide, mastoparan-X, bound to phospholipid bilayers. The ^{13}C spectra monitoring $^{31}\text{P}-^1\text{H}$ and $^2\text{H}-^1\text{H}$ depolarization process, respectively, can be used for identifying the peptide segments in close proximity of ^{31}P in the head group and of ^2H in fatty acyl chains. The chemical shifts and structure previously determined were used for the analysis. The current analysis indicates that α -helix of mastoparan-X is located in the interface between the water layer and hydrophobic domain of the lipids with non-polar residues facing the phosphorus and alkyl chains of the lipid. A structural model calculation is underway.

[序] タンパク質・リン脂質二重膜系において、距離情報を利用して両者の相対的な位置関係を知り構造を決めることは、タンパク質の機能を調べる上で重要である。この方法の基礎研究として、昨年度は ^{31}P 周辺の ^1H の磁化を $^{31}\text{P}-^1\text{H}$ 双極子相互作用を通じて飽和あるいは反転させ、これを高分解能 ^{13}C -NMRまたは ^1H -MAS NMRスペクトルを通じてモニターする方法を開発し、小さな有機化合物に適用した。この方法の利点は: 1) ^1H に関する強い双極子相互作用を利用して、 ^{13}C 間スピ結合の影響を受けないので完全 ^{13}C 標識試料に適用して、多数の部位からの距離情報を得られること。この点は選択標識試料を用いるREDOR法と対照的である。2) ^1H の分極を ^{31}P あるいは ^2H との双極子相互作用で繰り返し消磁しているので、単なる磁化移動法よりも感度が良いこと。3) ^1H の分極減少を高速MAS条件で ^{13}C でモニターしているので分解能が高いことなどである。

今回はこの手法を膜蛋白質の構造解析に応用することを目的とし、モデルとして脂質に結合した14残基のペプチド(^{13}C - ^{15}N ラベル)マストパランXに適用した。まず初めにそのパルス系列をFig. 1に示す。ここで最初の 90° パルスで ^{31}P (^2H)スピンを ^1H と反平行にし、より多くの ^1H の磁化移動を起こさせる。さらに、一定時間後 ^{31}P (^2H)スピンを反転することで、 ^{31}P (^2H)近傍の ^1H の磁化を効率よく減少させる。これを複数回繰り返し(多重接触CP)、磁化移動の総和時間を消分極時間(τ_{dp})とする。最後に $80\ \mu\text{s}$ の短い時間のLGCP(Lee-Golgburg Cross Polarization)を用いることで、 ^1H と共有結合した ^{13}C を通じ高い分解能で観測できる。

キーワード: 固体高分解能 NMR, $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ 交差分極, ^1H スピン拡散, ^1H 脱分極

はらだえりさ、とどころやすと、ふじわらとしみち、かいのしょうまさつね、あくつひでお

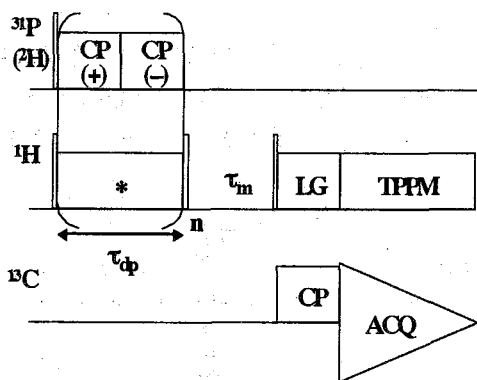


Fig. 1. Pulse scheme for high-resolution ^{13}C solid-state NMR observation of ^1H demagnetization by multiple-contact ^{31}P (^2H)- ^1H CP. The asterisk indicates CP or LGCP. τ_{dp} : depolarization time.

[実験]

今回用いた試料は、脂肪鎖が重水素化された脂質(D62-DPPC : D62-DPPG = 4 : 1)に ^{13}C , ^{15}N ラベルマストパンX(INWKGIAAMAKLL-NH₂)を重量比 10 : 1(脂質:ペプチドモル比 20 : 1)で結合させ、相対湿度 32%に調製したものである。用いた装置は ^1H 共鳴周波数 500 MHz の Varian 社 CMX-500 Infinity-plus である。

[結果]

(1) ^2H - ^1H - ^{13}C の測定条件の検討

初めに今回作成したパルス系列が ^2H 核にも適用できるか、SAIL (stereo-array isotope labeled) バリン(Fig. 2)を用いて、 ^2H - ^1H - ^{13}C 測定の条件を検討した。Fig. 3 に ^{13}C -LGCP スペクトルに対する ^2H - ^1H LGCP による分極減少で得られた信号強度の割合を示す。約 2 ms で最大消分極強度の 8 割に達しており、実験を行うにはこのあたりが適当である。ここで、 ^2H と ^1H の平均距離を考えると、 $\text{H}\alpha\text{-H}\gamma$ 3.5 Å, $\text{H}\beta\text{-H}\gamma$ 2.8 Å, $\text{H}\gamma\text{-H}\gamma$ 2.2 Å である。 $\text{C}\gamma$ のシグナル強度がもっとも大きく、次に $\text{C}\beta$, $\text{C}\alpha$ となっており、2 ms での分極減少は ^2H との距離と相関がある。分極減少が双極子結合と比例するとすれば、5 Å からの寄与は 2.5 Å の約 1/8 になり、ほとんどの減少は 5 Å 以内のスピンのよると考えられる。また、 ^{31}P - ^1H - ^{13}C での実験と比較すると、磁気回転比の大きい ^{31}P による ^1H の消分極速度は ^2H によるものより速く、約 1 ms で 5 Å 以内の主要な消分極が生じていた。

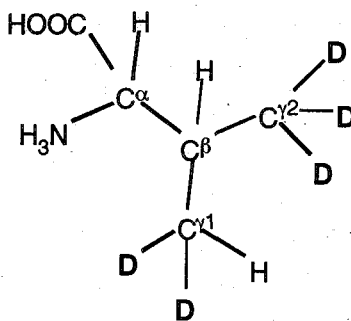


Fig. 2. Structure of SAIL-valine.

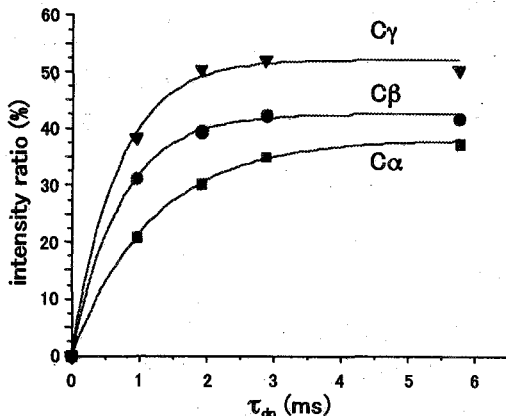


Fig. 3. Depolarization time (τ_{dp}) dependence of ^{13}C signal intensities obtained with the pulse scheme shown in Fig.1. ^1H was depolarized with LGCP.

(2) 脂質結合型マストパンXの構造解析

今回開発した方法をリン脂質頭部の ^{31}P と脂肪鎖の ^2H に用いることで、タンパク質・リン脂質二重膜系における構造解析への応用が可能となる。その系のモデルとして脂質膜結合型マストパンXの測定を行った。その際、 ^{13}C 観測を行う前に、 ^{31}P - ^1H 、 ^2H - ^1H 間の消分極をそれぞれ ^1H 観測することにより、消分極の飽和・反転時間を最適化した。ここで、 ^{31}P - ^1H - ^{13}C (τ_{cp} 0.96 ms) および、 ^2H - ^1H - ^{13}C (τ_{cp} 2.88 ms)での測定結果を示す。マストパンX-Glyの固体NMRにおけるシグナルの帰属がすでに報告されており¹⁾、また、脂質膜結合型のマストパンXのシグナル帰属及び構造決定がなされ、W3-L14まで α ヘリックスを取ることが明らかになっている。それらに基づき得られたシグナルの帰属を試みた。(Fig. 4)

これらのスペクトルから分かるように、 ^2H - ^1H 間の方が ^{31}P - ^1H より5倍感度良く測定できた。これはペプチドのまわりにある ^{31}P と ^2H の密度が影響するからである。両者のスペクトルでともに観測できた残基はI1, W3, I6, L13, L14といった疎水性残基であり、 ^2H - ^1H による測定ではさらにM9, A7, A10といった残基が観測された。そこで、固体NMRから得られた構造にマッピングすると次のような結果が得られた。(Fig. 5 (a))丸で囲った残基が今回シグナルが観測された残基であり、シグナルが観測されなかった残基は主に親水基であった。

溶液NMRでDPPCリポソーム存在中でのTRNOEから、マストパンの構造が決定されW3-L14まで α ヘリックスを取ると報告されている²⁾。このとき、TRNOEでは距離情報が得られるが、この場合のNOEは主としてタンパク自身の情報であり、脂質膜結合状態におけるタンパクとの相対的な位置は分からない。相対的な情報を得る手段として配向試料を用いる方法があり、この場合脂質二重膜やバイセルに対するタンパク質(α ヘリックス)の角度情報が得ることが出来るが距離に関する情報は得られない。それに対し、今回の測定では角度情報を得ることは出来ないが、 ^{31}P / ^2H と ^1H の距離に基づいた情報が得られ、両者の方法で得られる構造情報はそれぞれ異なる。

配向試料を用いた実験で、Whilesらは両親媒性(DMPC)のバイセルでは膜に対してヘリックス軸が平行に近いカーペットモデルを示し、陰イオン性(DPPS)では垂直になるポア形成モデルになると報告している³⁾。また、DMPC/DMPG = 7 : 3の脂質二重膜の系では膜平面内と膜貫通成分が9 : 1になり、ヘリックス軸が膜平面と平行なマストパンは $\pm 30^\circ$ のばらつきがあると報告がある⁴⁾。

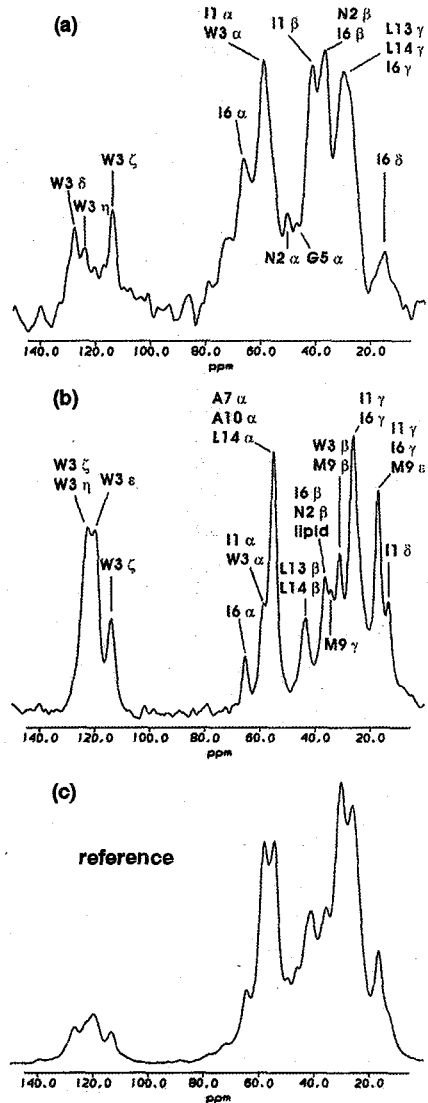


Fig. 4. ^{13}C spectra obtained by the pulse scheme shown in Fig.1 depolarized with (a) ^{31}P - ^1H and (b) ^2H - ^1H LGCP. (c) ^{13}C reference LGCP spectrum.

そこで Matsuzaki らの蛍光試料を用いた実験⁵⁾を基に、本実験では脂質とマストパランが強く結合して、しかもポア形成を起こさない脂質・タンパクのモル比で試料調製を行っている。²H, ³¹P ともにシグナルが見える 5 Å 以内に位置すると考えると、実験結果からマストパラン X は疎水性残基が膜と、親水性残基が水と接するように膜表面に位置していることが分かる。(Fig.5 (b)) これはスピンドラベルした脂質二重膜中で TRNOE の強度変化を調べた実験から得られた結果とも一致する⁶⁾。一般的に膜タンパク質において Trp は脂質の境界面に位置し、側鎖が脂肪鎖に入り込むことが多いといわれている。今回 Fig.4 (b)に示すように W3 のインドール環と脂肪鎖の間には特に大きな分極移動が観測されており、マストパランにおいても W3 の側鎖が脂質内部に入り込んでいると考えられる。今後は定量的なスペクトル解析を通じてマストパランとリン脂質との相対的な位置関係を明らかにするために、ペプチドと脂質のモデリングを行う予定である。

[まとめ]

今回開発した方法は ³¹P だけでなく、²H 核にも応用できることを SAIL バリンを用いて検証した。この方法は ¹³C, ¹⁵N 完全標識したペプチドを脂肪鎖が ²H ラベルされた脂質に結合させた試料を作製することで、単一の試料から、ペプチドの信号帰属、構造解析のみならず、脂質相互作用の解析までを行うことが出来る。このように限られた試料から多様な情報を取り出すことが出来る点で有用である。今回用いた脂質結合型マストパランの系では、³¹P/²H-¹H-¹³C の実験から得られたシグナルの帰属結果と試料調製条件から、マストパランは Fig.5 (b)のように膜表面に存在するという構造モデルを示すことができた。感度が許すならば分解能向上には多次元分解を用いることが可能であり、さらに大きな系や膜タンパク質への応用が期待される。

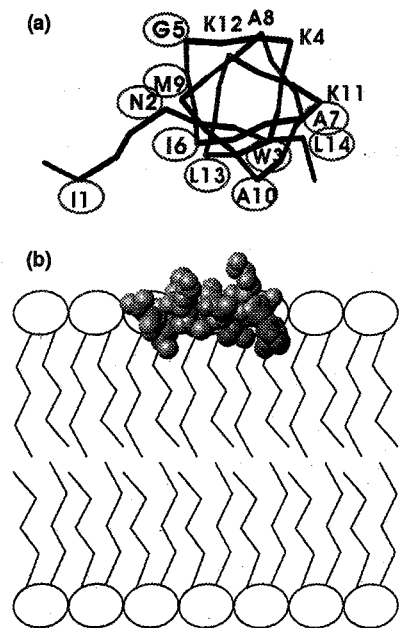


Fig. 5. Structure of membrane bound mastoparan-X. (a): A helix wheel diagram of membrane bound mastoparan-X. Residues for which ¹H depolarization was observed are circled. (b): Mastoparan-X bound to lipid bilayer membrane.

[Reference]

- 1) Fujiwara, T. et al, *J. Biomol. NMR*, (2004) 42, 291-300
- 2) Wakamatsu, K. et al, *Biochemistry*, (1992) 31, 5654-5660
- 3) Whiles, J. A. et al, *Biophys. J.*, (2001) 80, 280-293
- 4) Hori, Y. et al. *Eur. J. Biochem.*, (2001) 268. 302-309
- 5) Matsuzaki, K. et al, *Biochemistry*, (1996) 35, 8450-8456
- 6) 若松馨他、第 42 回 NMR 討論会要旨集、(2003) pp 378-389

横浜国立大学大学院 工学研究院 ○西村勝之、内藤 晶

○ Katsuyuki Nishimura and Akira Naito

Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, 240-8501

Development of Duty & Amplitude Averaged Cross Polarization
:Extension of Time Averaged Nutation.

We have developed cross polarization and 2D separated local field NMR techniques with low rf power for observed nuclei as referred to TANMA-CP and TANSEMA, respectively. In this study, we will show that the concept of "time averaging of nutation frequency", which is used in above two techniques, can be generalized to "duration and amplitude time averaged nutation frequency". Thus time averaging can be achieved by changing either pulse duration and/or amplitude, simultaneously. In this study, we will show the preliminary results for application of duration and amplitude time averaged cross polarization and 2D-SLF experiments.

<序論>

我々はこれまで含水生体試料で試料発熱を抑制することを目的に、観測核に必要なラジオ波強度を任意に減少させる¹H同種核間磁気双極子相互作用デカップル交差分極法(TANMA-CP)¹および2次元双極子磁場分離法(TANSEMA)²を開発し、その有効性を立証した。これらの測定法で用いた"Time Averaged Nutation"の原理は、任意の方向へスピンロックしたラジオ波の有効磁場方向を非等価な短い時間間隔で反転させることにより、異種核間双極子結合する観測核に、時間平均された¹H歳差周波数を感じさせる手法である。今回ラジオ波照射の時間と有効磁場強度の双方を変化させることにより、この概念を拡張し異種核間磁気双極子相互作用の復活に必要な Hartmann-Hahn 条件を無限の組み合わせに拡張することが可能であることを示す。本測定法はオン、オフレゾナンスのどちらの交差分極条件でも同様な扱いで、観測核に必要なラジオ波の強度を任意の値に設定可能である。パルス durationのみを変化させた"Duration Time Averaged Nutation"(これまで time averaged Nutation と呼称)、ラジオ波強度のみを変化させた"Amplitude Time Averaged Nutation"、およびそれら双方を変化させた"Duration and Amplitude Time Averaged Nutation"の各々の場合について実験を行い、理論上では同一の結果を与えるこれらのシーケンスが実際の測定で生じる違いを検証した。

<理論>

図1に(a)オフレゾナンスCP法の一般的なシーケンスとそれらに適用可能な時間-強度平均章動 モジュール(c)DTAN (Duration Time Averaged Nutation)、(d) ATAN

時間強度平均 交差分極 固体NMR ハートマンハーン条件
にしむら かつゆき ないとう あきら

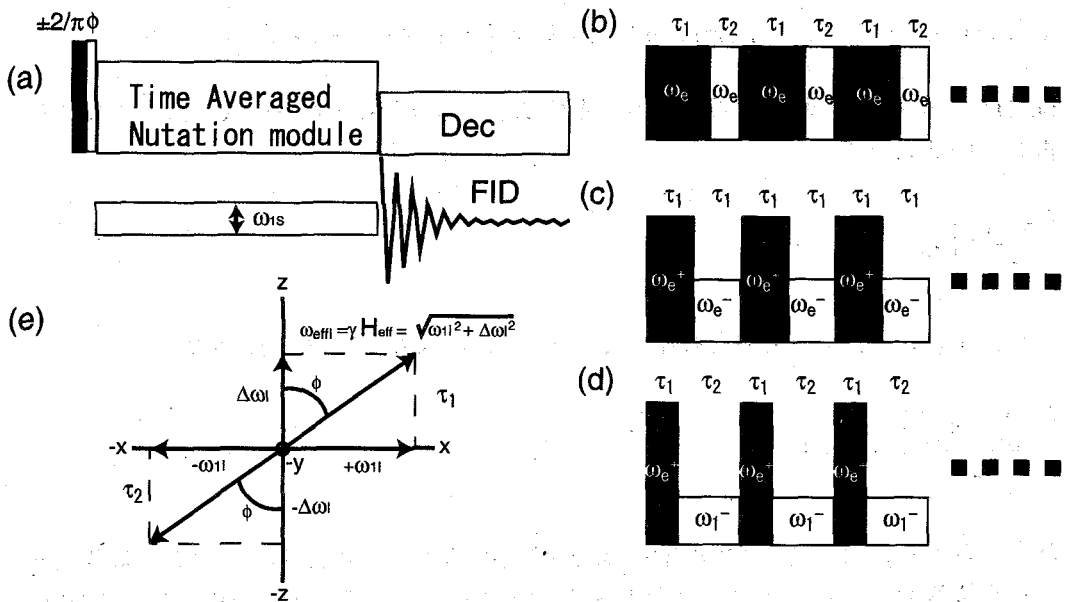


Figure 1. (a) A off resonance CP pulse sequence at arbitrary tilted rotating frame, (b)-(d) time averaged nutation modules. (b) DTAN-CP, (c) ATAN-CP, (d) DATAN-CP. Black and white blocks indicate + and - off resonance irradiations for ^1H nuclei with opposite effective field directions. (e) Schematic representation of the effective fields on rotating frame during τ_1 and τ_2 . Tilted angle ϕ can be set arbitrary.

(Amplitude Time Averaged Nutation)、(e) Duration and Amplitude Time Averaged Nutation (DATAN)を示す。(b): 一定の有効磁場強度でラジオ波を照射し、非等価な間隔 τ_1 、 τ_2 で有効磁場方向を反転させる。(d):ラジオ波照射間隔は等価 $\tau_1=\tau_2$ に設定し、異なる有効磁場強度でラジオ波を照射し、有効磁場方向を反転させる。(d):(b)と(c)のラジオ波照射効果を同時に行う。すなわち非等価間隔、非等価有効磁場強度でラジオ波を照射し、有効磁場方向を反転させる。(d)は全ての効果を含んでいるため、(d)について0次の平均ハミルトニアンを計算し、(b)および(c)の場合について議論を行う。 ^1H 核へ τ_1 時間(強度:位相:オフレゾナンス) $=(\omega_{\text{eff}}^{(+)}, X, +\Delta\omega)$ 、 τ_2 時間(強度:位相:オフレゾナンス) $=(\omega_{\text{eff}}^{(-)}, -X, -\Delta\omega)$ 、ラジオ波の照射でスピロックし、観測核へはラジオ波強度 ω_{1S} で連続的にラジオ波を照射した場合の m 回サイクル周期 $\tau_c = \tau_1 + \tau_2$ に対する DATAN-CP の 0 次の平均ハミルトニアンを explicit に計算すると以下のように求められる。

$$\bar{H}_{\text{int}}^{(0)}(m\tau_c) = \frac{D \sin \phi_I}{i(\omega_{\text{eff}}^{(+)} - \omega_{1S})(\omega_{\text{eff}}^{(-)} + \omega_{1S})m\tau_c} \left[I^+ S^- * Q^+ + I^- S^+ * Q^- \right] \quad \dots (1)$$

$$Q^\pm = \mp(\omega_{\text{eff}}^{(+)} - \omega_{1S})[\exp\{\pm i\Delta\omega_{1S}m\tau_c\} - 1] \pm (\omega_{\text{eff}}^{(+)} + \omega_{\text{eff}}^{(-)})[\exp\{\pm i(\omega_{\text{eff}}^{(+)} - \omega_{1S})t_1\} - 1] \sum_{n=0}^{m-1} \exp\{\pm i\Delta\omega_{1S}n\tau_c\} \quad \dots (2)$$

$$\text{ただし} \quad \Delta\omega_{1S} = \left(\frac{\omega_{\text{eff}}^{(+)}\tau_1 - \omega_{\text{eff}}^{(-)}\tau_2}{\tau_c} \right) - \omega_{1S}, \quad \tan \phi_I = \frac{\omega_{1I}}{\Delta\omega_I} \quad \dots (3)$$

すなわち DATAN-CP の Hartmann-Hahn(HH)³⁾条件は $\Delta\omega_{IS} = 0$ と求められる。

Eq. (1)に $\omega_{eff}^{(+)} = \omega_{eff}^{(-)}$ の条件を適用することにより、DTAN-CP の HH 条件はこれまで報告しているように¹⁾

$$\left(\frac{\tau_1 - \tau_2}{\tau_C} \right) \omega_{eff} - \omega_{IS} = 0, \quad \dots (4)$$

また、eq.(1)に $\tau_1 = \tau_2$ の条件を適用することにより ATAN-CP の HH 条件は

$$\left(\frac{\omega_{eff}^{(+)} - \omega_{eff}^{(-)}}{2} \right) - \omega_{IS} = 0, \quad \dots (5)$$

と求められる。よって任意の時間周期 τ_C に対する τ_1 、 τ_2 の比率、および各時間でのラジオ波強度のどちらかまたは双方を変化させることにより HH 条件を任意に調整することが可能であることが分かる。さらに、これまで開発した TANMA-CP と同じくオフレゾナンス条件を $\pm LG^{4,5)}$ になる $\phi_1 = 54.7^\circ$ に設定すると、¹H 同種核双極子相互作用デカップル交差分極法となる。以下の実験では全てこの LG デカップリング条件下で実験を行った。

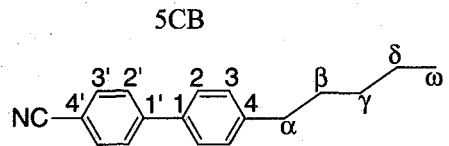
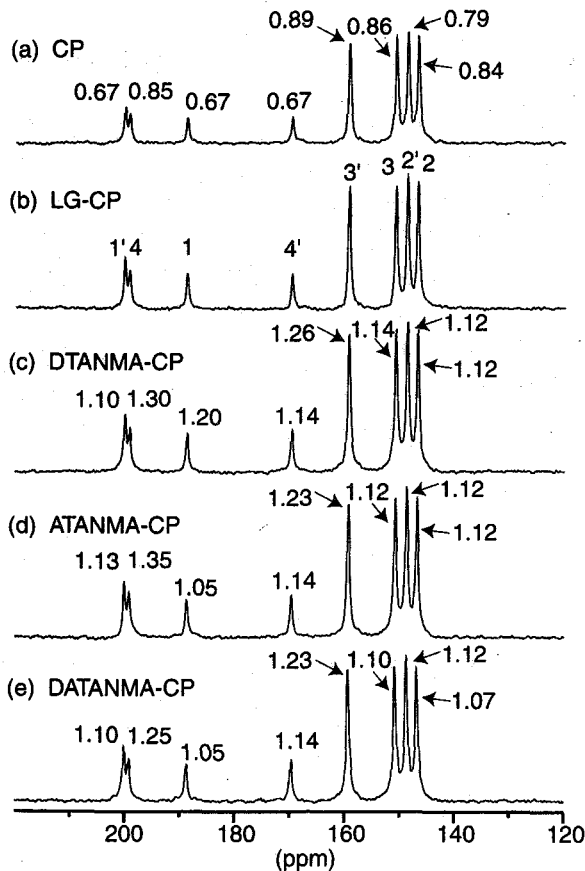


Figure 2. ¹³C-NMR spectra of Aromatic region for 5CB acquired by various methods (a) HH-CP, (b) LG-CP, (c) DTANMA-CP, (d) ATANMA-CP, and (e) DATANMA - CP. Contact time was set to about 300 μ s except for HH-CP (CT = 3.0ms). (c) $\tau_1 = 6.366$ μ s, $\tau_2 = 3.033$ μ s, $\omega_{eff} = 50$ kHz. (d) $\tau_1 = 4.700$ μ s, $\tau_2 = 4.700$ μ s, $\omega_{eff}^{(+)}$ = 50 kHz, $\omega_{eff}^{(-)}$ = 16.6 kHz. (e) $\tau_1 = 4.497$ μ s, $\tau_2 = 4.903$ μ s, $\omega_{eff}^{(+)}$ = 50 kHz, $\omega_{eff}^{(-)}$ = 12.0 kHz. Assignments of signals are indicated in (b). Normalized signal intensities for each site with respective to those of LG-CP are indicated at each site.

<実験>

Chemagnetics CMX Infinity 400 固体 NMR 分光器を用いて 5mm O.D. の 2 重共鳴 MAS プローブ静止状態で測定した。液晶試料 5CB をガラス管に封入して試料管中央 5mm のところへ設置し、温度 20°C に設定した。 ^1H -Decoupling は SPINAL-64⁶⁾を用いてラジオ波強度 20 kHz で行った。 ^1H 核の LG spin locking 強度および $\omega_{\text{eff}}^{(+)}$ は 50 kHz。 $\tau_c = 10.0\mu\text{s}$ とし、 τ_1 と τ_2 は各測定法で ^1H nutation 周波数が最大有効磁場強度の 1/3 にスケールリングするよう時間、強度の設定を行った。各々の測定法の HH 条件から観測核に必要なラジオ波強度は、CP: 41 kHz、LG-CP: 50 kHz、DTANMA-、ATANMA-、および DATANMA-CP: 16.6 kHz。詳細は図 3 参照。周波数、位相同時切り替えは 300ns で行った。

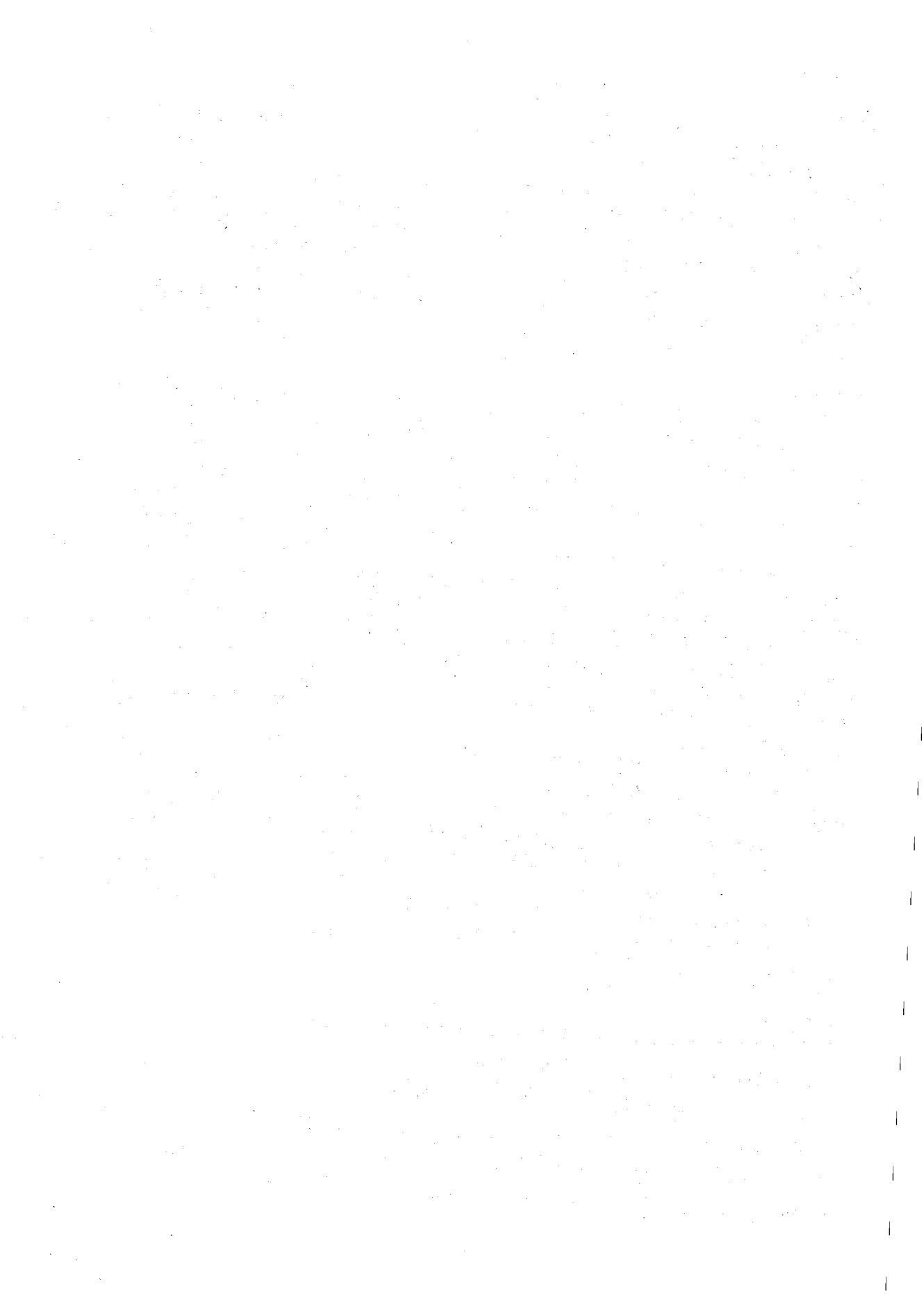
<結果>

図 2 に各測定法で最大信号強度を示す接触時間でのスペクトルを示した。CP のみ接触時間を 3.0 ms、その他は約 300 us の接触時間付近で最大強度を示した。Time averaged nutation シーケンスを用いた実験では全て、 ^1H 核の $\omega_{\text{eff}}^{(+)}$ を 50 kHz の有効磁場強度に対して HH 条件を満たすために必要なラジオ波の nutation 周波数を 1/3 にスケールする設定で実験を行っているため、観測核に必要なラジオ波はわずか 16.6 kHz である。これまで TANMA-CP で MBBA 液晶を用いて報告している結果と同様に、ATANMA-CP および DATANMA-CP でも LG-CP に対して平均約 20% の信号増強が観測された。LG-CP では観測核にも同様に 50 kHz のラジオ波を出力する必要があり、観測核側の出力が 96.0 w 必要であるのに対して、一連の time averaged nutation シーケンスでは観測核のラジオ波強度 16.6 kHz に 11.0 w の出力が必要であった。すなわち観測核側のラジオ波出力を 1/9 に抑制できたことを示している。これはラジオ波のもつエネルギーが H_1 強度の 2 乗に比例する事実と極めてよく一致している。またスペクトル線形および強度は DTANMA-、ATANMA-、および DATANMA-CP 間では大きな違いが観測されなかった。また ATANMA-CP および DATANMA-CP では、 $\omega_{\text{eff}}^{(-)}$ に 16.6 または 12.0 kHz ラジオ波強度での LG スピンロック時間を ^1H 核へ適用しており、この間の信号強度の著しい減衰が予測されたが、実験結果から、今回の短い接触時間では、弱い LG スピンロック中に著しいスピン拡散は生じないことが判明した。またこれから DTANMA-CP に比較し、ATANMA-、DATANMA-CP では、観測核に加えて ^1H 核側のラジオ波強度も $\text{CT}^*(\tau_2/\tau_c)$ 時間抑制可能であることも判明した。

Duration Time and/or Amplitude Averaged Nutation 交差分極はこれまで開発を行った Time Averaged Nutation 交差分極法と同等の性能を持つことが実験的に証明された。講演では TANSEMA にこの原理を適用した場合の結果についても報告する予定である。

<参考文献>

- 1) K. Nishimura, and A. Naito, C. P. Letters, 380, 569 (2003).
- 2) K. Nishimura, and A. Naito, submitted (2004).
- 3) S. R. Hartmann and E. L. Hahn, Phys. Rev. 128, 2042, (1962).
- 4) M. Lee, and W. I. Goldberg, Phys. Rev. A. Lett. 140, 1261, (1965).
- 5) A. Bielecki, A. C. Kolbert, and M. H. Levitt, Chem. Phys. Lett., 155, 341, (1989).
- 6) Fung, B. M.; Khitrin, A.K.; Ermolaev, K.J. Magn. Reson., 142, 97 (2000).



11月10日(水)～11月12日(金)

ポスター発表要旨

説明義務

ポスター番号 1P: 1日目

2P: 2日目

3P: 3日目

★印は“若手ポスター賞”に応募

Application of a Novel Signal Assignment Method to Large Proteins

Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)

Rikou Tanaka, Chieko Komatsu, Kuniko Kobayashi, Michiko Kitano, Takeshi Tanaka, and Toshiyuki Kohno

We have developed a novel NMR signal assignment method applicable to larger, less soluble, and unstable proteins. With this method, we can obtain enough information to assign all the NMR signals with diluted sample, even in the case of larger proteins such as 40 kDa. This method does not need complicated analyses, resulting in the unambiguous assignments. Here, we demonstrate the application of this method to large proteins, such as maltose binding protein (MBP).

我々は、従来のタンパク質のNMRシグナル帰属法では必須だった、低分子量、高濃度、安定性といった厳しい制限事項を大幅に緩和することが可能な、新しいNMRシグナルの帰属方法を開発した。この方法を用いると、分子量4万程度のタンパク質においても、従来法よりはるかに低濃度の試料で必要な情報が全て得られ、複雑な解析も不要で、容易にNMRシグナルの完全な帰属が可能となる。本研究では、この新規の帰属法をマルトース結合タンパク質(MBP)などの高分子量タンパク質に適用した。

新規帰属方法

新規方法による ^1H - ^{15}N HSQCの各シグナルの帰属の仕方は以下の通りである。

- (1) 一種類のアミノ酸残基を選択的に ^{15}N 標識したタンパク質の19種類(必ずしも必須ではない)、及び、一種類のアミノ酸残基のみを選択的に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識し、その他の19種類のアミノ酸を ^{15}N のみで標識した目的タンパク質を20種類調製する。
- (2) 一種類のアミノ酸残基を選択的に ^{15}N 標識したタンパク質の19種類のHSQCスペクトルから、 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルにおける各シグナルが、どのアミノ酸の種類に属するかを決定する。あるいは、一種類のアミノ酸残基のみを $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識し、その他の19種類のアミノ酸を ^{15}N のみで標識した目的タンパク質の2次元HN(CO)及び2次元HN(CA)スペクトルを比較し、HN(CA)スペクトルに存在し、かつHN(CO)スペクトルに存在しないシグナルを得ることで、 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルにおける各シグナルが、どのアミノ酸の種類に属するかを決定する。
- (3) 一種類のアミノ酸残基のみを $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識し、その他の19種類のアミノ酸を ^{15}N のみで標識化した目的タンパク質のHN(CO)スペクトルから、それぞれのシグナルがどの種類のアミノ酸残基の後ろにある残基かを決定する。
- (4) (2)(3)の結果とアミノ酸配列表から、アミノ酸の並びを利用してシグナルの帰属を行う。
- (5) 連続するアミノ酸の並び方が同一のものが2ヶ所以上あるものについては、2次元H(N)CAと2次元H(NCO)CAスペクトルを用いて、さらに手前の帰属済みの残基から帰属を決定する。手前の残基が同様の状況により帰属が不確定である場合は、さらに手前の残基から順次帰属を行う。

無細胞タンパク質合成 2次元NMR シグナル完全帰属 難溶性タンパク質 高分子量タンパク質

たなかりこう、こまつちえこ、こばやしくにこ、きたのみちこ、たなかたけし、こうのとしゆき

以下に、大腸菌チオレドキシタンパク質における帰属例を示す。大腸菌チオレドキシンは、以下の配列 (Fig. 1) のようにフェニルアラニン残基を4つ持ち、Fig. 2(a)に示すように、フェニルアラニン残基だけを ^{15}N 標識したものの HSQC スペクトルでは4つのシグナルが観測される。また、Fig. 2(b)に示すように、セリン残基を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識し、他のアミノ酸を ^{15}N 標識したものの HN(CO) スペクトルにおいては、3つあるセリン残基の後ろの残基の HN シグナルが観測される。(a)と(b)のスペクトルで一致するシグナルは、セリン残基の後ろにあるフェニルアラニン残基であるから、アミノ酸配列から判断して、図中に矢印で示したシグナルは、F12 であると決定される。同様にしてアミノ酸の並びかたが一通りである残基については、同様の方法ですべて一意的な帰属ができる。I72 と I75 のように手前の残基が両方ともグリシンであるような場合には、H(N)CA と H(NCO)CA のスペクトルを用い、Ca の化学シフトを介することにより、残基番号を特定できる。

SDKIIHLTDD SFDTDVLKAD GAILVDFWAE WCGPCKMIAP ILDEIADEYQ 50
 GKLTVAKLN I DQNPGTAPKY GIRGIPTLLL FKNGEVAATK VGALSKGQLK 100
 EFLDANLA 108

Fig.1 Amino acid sequence of *E. coli* thioredoxin.

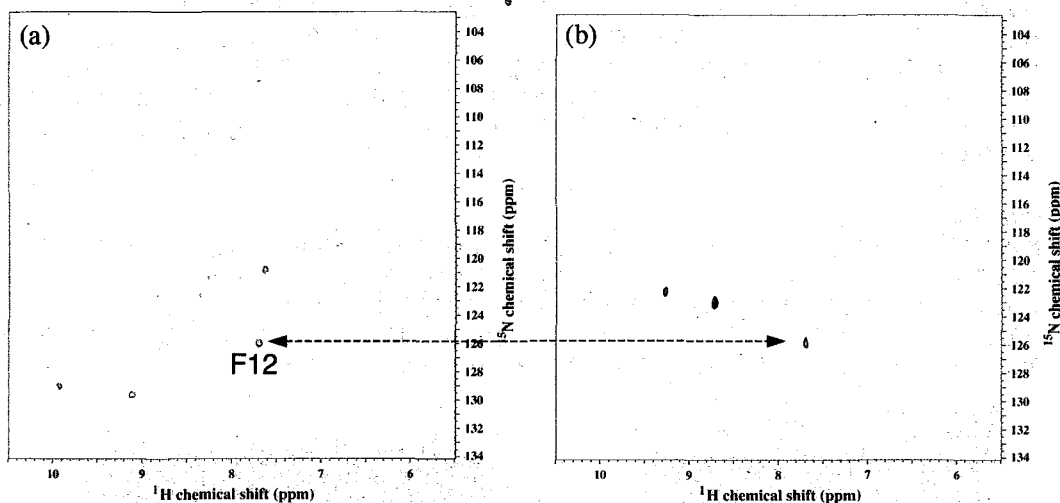


Fig. 2 HSQC spectrum of ^{15}N Phe labeled thioredoxin (a) and HN(CO) spectrum of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ Ser labeled and ^{15}N the other amino acids labeled thioredoxin.

この方法を MBP のような高分子量タンパク質に適用するためには、重水素化したアミノ酸を用い、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識のアミノ酸を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$ の三重標識に、 ^{15}N 標識のアミノ酸を $^{15}\text{N}/\text{D}$ の二重標識に変えて他は同様にしてタンパク質を合成し、測定を行えば良い。また、HN(CO)、HN(CA)、H(N)CA、H(NCO)CA の測定を全て TROSY タイプの測定に変更することも分子量増大によるシグナルの線幅の増大や感度低下を抑えるのに有効である。このような工夫により、MBP のような分子量4万程度のタンパク質においても、低濃度のサンプルを用い、簡便にシグナルの帰属を行うことが可能になった。MBP の NMR シグナルの帰属の詳細については、本学会で発表する予定である。

(日本電子株式会社)

○朝倉克夫、栗本智充、高杉憲司、根本暢明

Full Automatic Parameter Calibration for Protein NMR in solution

(JEOL Ltd.)

○ Katsuo Asakura, Tomomitsu Kurimoto, Kenji Takasugi and Nobuaki Nemoto

It is very important for FT-NMR to optimize each parameter such as 90 degree pulse width correctly. Especially in the multi pulse experiments, inaccurate parameters reduce signal intensity drastically. In general, automation of the NMR measurements tends to have a trade-off between easy setting and data quality. We have developed a full automatic parameter optimization system for proteins in solution without any sacrifice of data quality. We here report details.

タンパク質溶液 NMR に代表される、非常に多くのパルスからなる多核多次元 NMR 測定において、適切に調整されていない測定パラメータの使用は、最終的に得られる信号強度に対して重大な悪影響を及ぼす。このため多くの場合、個々の測定パラメータの設定には、熟練した測定者による注意深い最適化が必要とされる。自動測定においては、この測定パラメータの最適化も自動でおこなう必要があり、これまでは簡便さとデータの質との間に少なからずトレードオフが避けられなかった。我々は、パラメータ最適化用の標準サンプルによる事前測定によらず、本測定に供するサンプルそのものを用いてすべてのパラメータの最適化をおこない、効率よくかつ精度よいパラメータの自動最適化を実現した。本発表では、測定に必要な観測中心及び各チャンネルのパルス長の自動最適化についての詳細を報告する。

【観測中心】

軽水溶媒中での測定では、溶媒信号消去の効率化を図るために観測中心を軽水信号の共鳴周波数に最適化する必要がある。ここでは一般的に利用されている pre saturation 法による軽水信号の suppression を用いる。具体的には、連続的に変化させた観測中心に対する弱い pre saturation により軽水信号を減衰させ、最も効率よく減衰する周波数から、軽水信号の共鳴位置を探索する。自動測定においては、軽水信号の信号強度が最も小さくなる条件を求めれば良い。

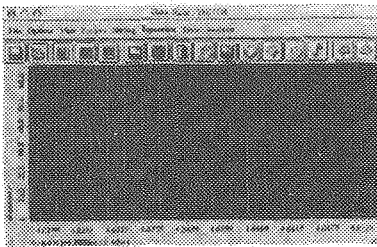


Fig 1. The intensity change of the water signal depending on the irradiation offset.

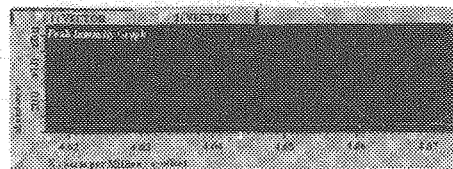


Fig 2. A detection of the optimum ^1H offset.

【 ^1H の 90 度パルス長】

90 度パルス長は最適化が極めて重要なパラメータである。パルス幅の不正確さは、核スピンの励起を不完全にし、感度の低下を引き起こす。特に、多数のパルスからなるマルチパルス NMR 実験においては、個々のパルス長の不正確さが微小であったとしても、それらが蓄積されることによって最終的に得ら

タンパク質溶液 NMR、測定パラメータ、測定条件最適化、自動測定

○あさくらかつお、くりもとともみつ、たかすぎけんじ、ねもとのぶあき

れる信号の強度を大きく低下させるため、正確な 90 度パルス長を決定する必要がある。90 度パルス長を決定するには、緩和時間や radiation damping の影響を取り除くために 360 度パルス長を決定し、その 1/4 を 90 度パルス長とするのが一般的であり、自動測定においても同様の手法を用いる。360 度パルス長の決定には、第 42 回 NMR 討論会において報告し、本討論会ポスター発表 1P163 で報告する改良を施した非線形最小自乗フィッティングを使用した。非線形最小自乗フィッティングによる最適化では、正弦関数を基本としたモデル式に対応させるため、信号の強度変化がモデル式に則った正弦曲線を描く必要がある。ところが観測が容易な軽水信号では、激しい radiation damping のために正弦曲線を描かないため、この手法が適用できない。そこで、Fig 3 に示すパルスシーケンスを用いて ^1H の excitation 軽水信号の消去と同時にサンプルの信号で Nutation 実験を行い、360 度パルス長を決定する。軽水信号の消去には WATERGATE を用いた。WATERGATE に使用する W5 composite pulse は、別サンプルで使用したパルス長等のおおよその 90 度パルス長を基に自動生成される。

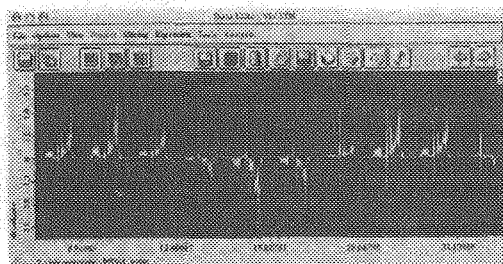


Fig 4. The intensity change of the ^1H signals of protein.

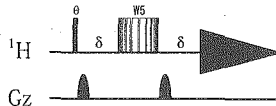


Fig 3. A pulse sequence for the optimization for the ^1H 90 degree pulse.

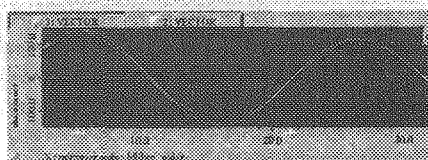


Fig 5. A fitting result of the ^1H nutation.

【 ^{13}C 及び ^{15}N の 90 度パルス長】

^{13}C 及び ^{15}N の 90 度パルス長の決定には、Fig 6 に示すパルスシーケンスを用いる。 ^1H 観測による HMQC タイプの実験を WATERGATE と組み合わせたもので、 $1/2J$ の間に生じた $^{13}\text{C}(^{15}\text{N})$ の磁化は $^{13}\text{C}(^{15}\text{N})$ のパルス長が 90 度パルスになった際に multi quantum となって消失する。従って、 $^{13}\text{C}(^{15}\text{N})$ のパルス長を変化させていくと、 $^{13}\text{C}(^{15}\text{N})$ と結合した ^1H の信号強度は余弦曲線を描くことになる。 ^1H の場合と同様軽水信号の消去には WATERGATE を使用している。この場合も標準サンプルでなく実サンプルでの測定をおこなうが、サンプルの濃度が低い等の理由で信号の消失する条件が判別しづらい系であっても、モデル式に対するフィッティングによる最適化においては、0 度パルス付近や 180 度パルス付近などの S/N の良いデータを有効に活用するため、決定されるパルス長の精度が損なわれない。

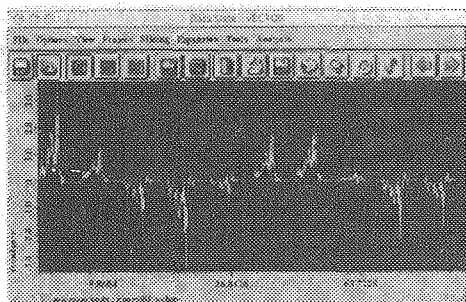


Fig 7. The intensity change by the indirect ^{13}C nutation.

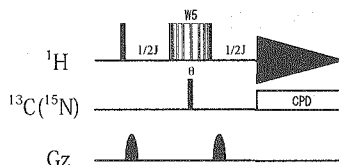


Fig 6. A pulse sequence for the optimization for the $^{13}\text{C}(^{15}\text{N})$ 90 degree pulse. The delays $1/2J$ are 6.9 ms for ^{13}C (10.5 ms for ^{15}N).

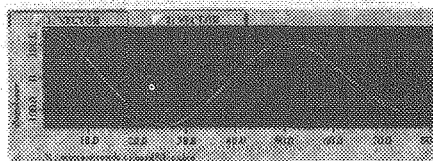


Fig 8. A fitting result of the ^{13}C nutation.

【まとめ】

以上のように、観測中心やパルス長を自動検出する方法を開発した。また、CBCA(CO)NH などに代表される三重共鳴実験に必要な多種多様なパワーレベルの RF パルスは、最適化された特定の 90 度パルス長から出力の直線性を仮定して算出することが可能である。しかし、RF 出力の直線性が十分でなければ、パルス長の算出が不正確になるため、RF の精度と直線性が良い NMR 分光計が必須である。そのような高精度の NMR 分光計上で、90 度パルス長や観測中心を精度良く求めることで、結果として測定に必要なパラメータをすべて自動的に取得することができ、全自動タンパク質溶液 NMR 測定が可能となった。

NMR studies of *B. subtilis* cell wall lytic amidase CwICKazuto Yabuki¹, Masaki Mishima¹, Ken-ichi Kato¹, Koichi Kaneda², Toshio Shida²,
Junichi Sekiguchi², Chojiro Kojima¹¹Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology²Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University

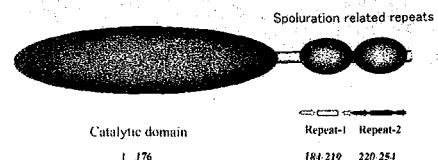
The *B. subtilis* CwIC is a cell wall lytic N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, plays an important role in mother-cell lysis in sporulation, consists of a N-terminal catalytic domain and C-terminal tandem repeats. The repeats (repeat-1:184-219 and repeat-2:220-254), named as CwICr, can bind specifically to peptidoglycan. We report solution structure of the CwICr determined by multidimensional NMR, which adopts a remarkable pseudo two fold symmetric structure, consists of $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -fold, by numerous contacts between the repeats. Inspection of the molecular surface of the CwICr and biochemical analysis suggested that CwICr may bind to peptidoglycan at least two sites. We also present that NMR studies of the intact CwIC(1-255).

【緒言】

細菌の細胞壁は細胞の構造を維持し、また浸透圧変化等の外的要因から内容物を保護する役割を担っている。グラム陽性菌の細胞壁の主成分はペプチドグリカンであり、枯草菌の場合、N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸が交互に β -1,4 結合したグリカン鎖が、四残基からなるペプチド鎖(L-Ala-D-Glu-meso-DAP-D-Ala)で多数架橋した網状構造を形成している。

細胞壁は細胞分裂、孢子形成期、発芽等の過程において溶解される必要があり、様々な細胞壁溶解酵素が働いている。CwIC は細胞壁溶解酵素の一つであり、孢子形成期の最終段階である母細胞溶解に重要な役割を果たしていることが知られている。CwIC はN末端側の触媒活性ドメインとC末端側のペプチドグリカン結合ドメイン(CwICr)から形成され、CwICr は互いにホモロジーの高い二つのタンデムリピート配列から構成されている(Fig. 1)。

本研究では、
最初に、【1】ペプチドグリカン認識ドメインである CwICr(残基：184・255)に注目し、構造解析を行った。
次に、【2】CwIC 全長(残基：1・255)の構造解析を目指した。

**Fig.1 Domain structure of CwIC.**

Key words: タンパク質、立体構造、ペプチドグリカン、細胞壁溶解酵素、多次元 NMR

やぶきかずと、みしままさき、かとうけんいち、かねだこういち、しだとしお、せきぐちじゅんいち、こじまちょうじろう

【1. ペプチドグリカン結合ドメイン CwlCr の解析】

〈試料調製〉

大腸菌 M15 株を用いて、M9 最小培地で ^{15}N 均一ラベル、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 均一ラベルした CwlCr を His-tag 融合タンパク質として発現させ、破碎後可溶性画分を回収した。Ni-chelating カラムを用いて His-tag 融合タンパク質を精製し、enterokinase 処理により His-tag を切断し、その後ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行った。NMR 測定は Bruker AVANCE 500, DRX 800 spectrometer を用いて、50 mM phosphate buffer (pH 6.8), 20 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 303 K の条件下で行った。

〈立体構造解析〉

HNCACB, HN(CO)CACB, HN(CA)CO, HNCO 測定により主鎖の帰属を行った。さらにアミド $^{15}\text{N}(i)$, $^1\text{H}(i)$ に対して隣接するアミド $^{15}\text{N}(i-1)$, $^{15}\text{N}(i+1)$ 核の相関が得られる (H)N(CO-TOCSY)NH 測定により連鎖帰属の確認を行った。アミド (^{15}N , ^1H) は信号の分離が良いので、帰属が不明確であった Ala192, Ala228 についても帰属を確定することができた。側鎖の帰属は 3D C(CO)NH, H(CCO)NH, HCCH-TOCSY, 4D HC(CO)NH 測定により行った。

帰属に基づき、最初に CANDID を用いた CYANA (ver. 1.01) により構造計算を行った。CANDID の使用により効率よく NOE 距離制限を収集することができた。次に C12E5/hexanol ($r > 0.96$) によって配向させた CwlCr の IPAP を測定し、N-H 間の residual dipolar coupling (RDC) を収集した。CANDID により得られていた立体構造から PALES を用いて Da と R を求め、CANDID により得られた距離制限と RDC を合わせて CNS (ver. 1.1) を用いて構造計算を行った。最終的に 64 個の RDC, NOE から 1136 個の距離制限、TALOS から 116 個の ϕ , ψ 角情報、HNHB, HN(CO)HB から 18 個の χ_1 角情報、さらに $^3\text{J}_{\text{NC}}$ から 34 個の水素結合情報を構造計算に使用した。得られた 30 個の構造の r.m.s.d は主鎖で 0.16\AA 、 ^1H を除くすべての原子で 0.52\AA であった。

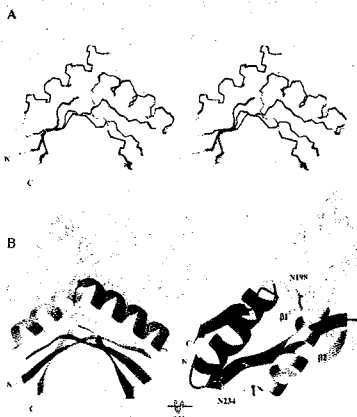


Fig.2 Solution structure of CwlCr.

A, stereo view of the best-fit backbone superpositions of the final 30 simulated annealing structures of CwlCr.

B, ribbon drawings of the representative structure of in two different views.

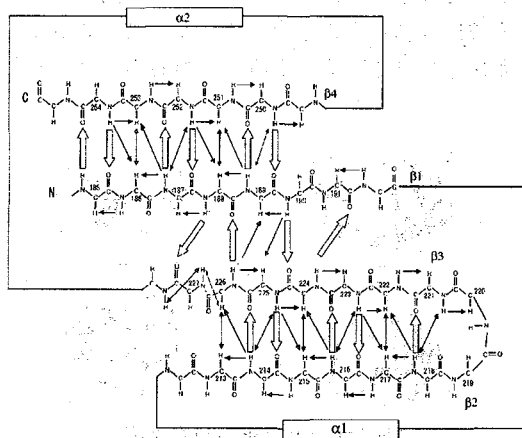


Fig. 3 Schematic diagram of the CwlCr β -sheets.

The hydrogen bonds identified through scalar couplings across hydrogen bonds ($^3\text{J}_{\text{NC}}$) are displayed as open arrows. The observed NOEs are indicated as solid arrows. The β -strands are labeled on the left. The β -bulge structures on the $\beta 1$ (Gly-190/Val-191) and $\beta 3$ (Gly-227/Ile226) strands are indicated.

Total number of distance constraints	1204
long range ($ i-j > 4$)	361
middle range ($ i-j = 2, 3, 4$)	232
short range ($ i-j = 1$)	276
intra residue	267
Hydrogen bond constraints	34 × 2
Dihedral constraints	
ϕ, ψ	58, 58
χ_1	18
R.m.s deviation from experimental constraints ^b	
Distance (Å)	0.0291 ± 0.0005
Angle (°)	0.78 ± 0.03
RDC (Hz)	0.63 ± 0.01
R.m.s deviation from idealized covalent geometry	
Bonds (Å)	0.0023 ± 5 × 10 ⁻⁴
Angle (°)	0.434 ± 0.004
Impropers (°)	0.330 ± 0.006
CNS energy terms (kcal/mol) ^c	
Ebond	6.1 ± 0.2
Eangle	62 ± 1
Eimp	9.7 ± 0.4
Evdw (LJ)	-193 ± 8
PROCHECK Ramachandran plot (185 - 254)	
Residues in most favoured regions (%)	95.4
Residues in additional allowed regions (%)	4.2
Residues in generously allowed regions (%)	0.1
Residues in disallowed regions (%)	0.4
R.m.s deviations to mean structure of the calculated 30 structures	
Back bone (185 - 254) (Å)	0.16
All heavy (185 - 254) (Å)	0.52

Table 1 Structural statistics for the CwlCr^a.

^aThese statistics comprise the ensemble of the 30 structures of lowest energy obtained from 100 starting structures. Structure calculations were performed using CNS ver 1.1.

^bNone of these structure exhibited distance violations > 0.4 Å or dihedral angle violations > 5° and RDC violations > 2 Hz.

^cE_{vdw} is Lennard-Jones energy of CNS energy terms.

〈CwlCr の立体構造〉

CwlCr は一つの anti-parallel β -sheet と二本の α -helix からなる $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 構造を形成しており、二つのタンデムリピート配列 ($\beta 1\alpha 1\beta 2, \beta 3\alpha 2\beta 4$) が対称的な構造を形成していることが明らかになった (Fig. 2)。

水素結合を介した ³H₃Nc の観測により、 β -sheet における水素結合ネットワークの詳細を解明し、中心部の $\beta 1, \beta 3$ 間で二箇所 β -bulge 構造を同定した (Fig. 3)。

〈ペプチドグリカン結合部位〉

細胞壁溶解酵素のリピータ配列間で保存された残基を分子表面にプロットしたところ、Asn198, Asn234 を中心とした二つの保存残基のクラスターがパッチ状に存在することが明らかとなった (Fig. 4)。Asn198, Asn234 は立体構造上対称な分子表面に存在し (Fig. 4)、 β -methylene 基がそれぞれ Phe193, Phe229 の芳香環と相互作用していた (Fig. 5)。Asn198 及び Asn234 を Asp に置換した変異体はペプチドグリカン結合能を完全に失い、一方のみを Asp に置換した変異体ではおよそ 75 % 結合活性を有していた。このことから、少なくともこれら二残基が独立にペプチドグリカンとの結合に関与することが明らかとなった。

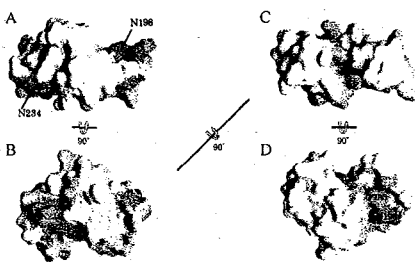


Fig.4 Surface diagram of CwlCr.

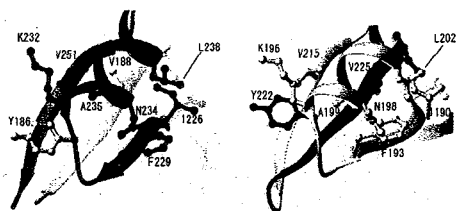


Fig.5 The hydrophobic interactions mediated by conserved residues at the edges of the protein.

The ribbon representation and ball and stick models of the side-chains at the protein core.

【2. CwlC 全長の解析】

〈試料調製〉

80% ²H ランダム/¹⁵N 均一ラベル, 80% ²H ランダム/¹³C/¹⁵N 均一ラベルした CwlC 全長を CwlCr と同様のプロトコールにて His-tag 融合タンパク質として精製し、その後ゲルろ過により

精製を行った。NMR 測定は Bruker AVANCE 500, DRX 800 spectrometer を用いて、10 mM citrate buffer (pH 5.0), 200 mM KCl, 20 μ M ZnSO₄, 310 K の条件下で行った。

〈Cw1C と Cw1Cr の比較〉

Cw1C 全長(残基: 1 - 255)のスペクトルを Fig.6 に示した。分離の良いスペクトルが得られ、Cw1C 全長が安定した構造を形成していることが示唆された。Cw1C 全長と Cw1Cr の同一条件下で測定した ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを比較したところ、両者の信号の位置は一致しなかった。このことから、Cw1C において Cw1Cr と触媒活性ドメイン間で、何らかの相互作用が存在することが示唆された。

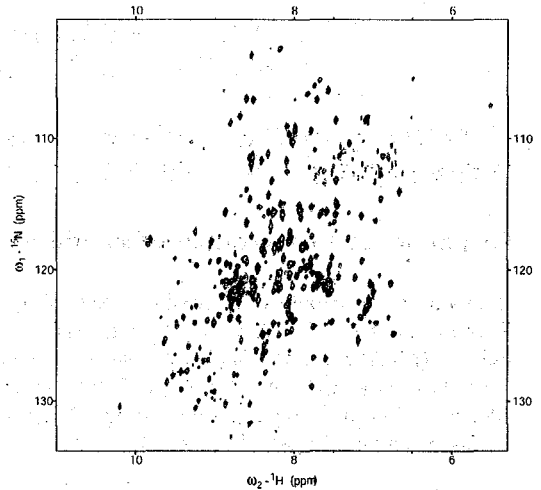


Fig.6 ¹⁵N TROSY spectrum of Cw1C.

The spectrum obtained with 0.4 mM Cw1C at pH 5.0 and 37°C on a Bruker DRX 800.

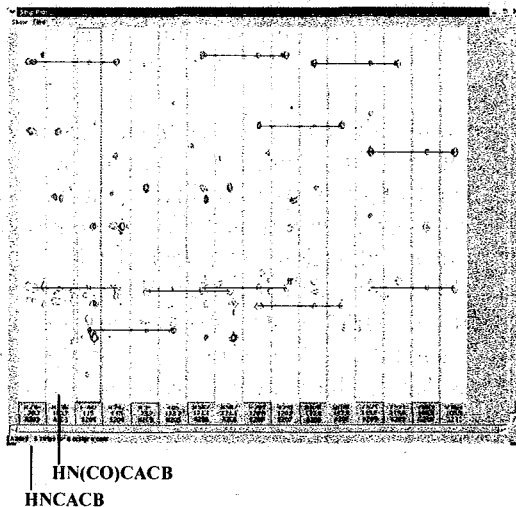


Fig.7 Selected w3(1H)/w1(15N) strips from ²H-de-HNCACB and ²H-de-HN(CO)CACB spectra of Cw1C.

The spectra were acquired on a Bruker AVANCE500 spectrometer equipped with a Cryogenic probe. The strips are taken from slices at the backbone amide ¹⁵N (F2) frequency of each residue ranging from A203 to G210.

〈NMR 測定〉

両者ドメイン間に相互作用が予想され、各ドメイン独立な解析では全体の情報を得るには不十分であると判断し、全長での NMR による解析を行った。塩濃度、pH、測定温度等の検討を行い、上述の最適な測定条件を決定し、現在、²H decoupled HNCACB, HN(CO)CACB 等の測定を行い、主鎖の帰属を行っている (Fig.7)。

〈今後〉

Cw1C 全長での主鎖の帰属を完成させ、本討論会では Cw1C 全長でのペプチドグリカン相互作用メカニズムを議論する予定である。また、緩和測定から Cw1C の二つのドメインの運動性がどのように制限されているか調べる予定である。

1P004★ Cu の常磁性緩和効果を用いた生体高分子の立体構造解析法の開発

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科¹、三菱化学生命科学研究科²、横浜市立大学総合理学研究科³、長崎大学医学部⁴)

○ 野村誠¹、小林俊達¹、河野俊之²、藤原健一朗³、天野剛志³、白川昌宏³、石崎逸子¹、山本一男⁴、松山俊文⁴、三島正規¹、児嶋長次郎¹

Cu paramagnetic relaxation effect utilized for the bio-polymer structure determination

¹Laboratory of Biophysics, Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan, ²Mitsubishi Kagaku Institute of Life Science (MITILS), Machida, Tokyo 194-8511, Japan, ³Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, Tsurumi, Yokohama 230-0054, Japan, ⁴Division of Cytokine Signaling, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan

Makoto Nomura¹, Toshitatsu Kobayashi¹, Toshiyuki Kohno², Kenichiro Fujiwara³, Takeshi Tenno³, Masahiro Shirakawa³, Itsuko Ishizaki¹, Kazuo Yamamoto⁴, Toshifumi Matsuyama⁴, Masaki Mishima¹, Chojiro Kojima¹

The paramagnetic metal chelate complex Cu²⁺-iminodiacetic acid (Cu²⁺-IDA) was mixed with ubiquitin. Quantitative analyses of ¹H and ¹⁵N chemical shift changes and line broadenings induced by the paramagnetic effects indicated that Cu²⁺-IDA was localized to a histidine residue (His68). The distances between the backbone amide proton and the Cu²⁺ relaxation center were evaluated from the proton transverse relaxation rates enhanced by the paramagnetic effect. These correlated well with the distances calculated from the crystal structure up to 20 Å. Titration experiments of EPR and ¹H-¹³C HSQC spectra suggested that the stoichiometry was about 1:1. Here, we show that a Cu²⁺-IDA is the first paramagnetic reagent that specifically localized to a histidine residue on the protein surface and gives the long-range distance information.

序論

NMR による立体構造解析においては、5 Å を超える遠位の距離情報取得のための方法論の開発が望まれている。常磁性金属は常磁性緩和および偽コンタクトシフトのように 5 Å を超える磁気効果を及ぼす点で上記の目的に適している。しかし、非金属タンパク質においては、タンパク質上に常磁性金属を局在させることは困難であった(野村ら 第41回 NMR 討論会要旨)。我々は、常磁性金属キレート複合体を用いるシステムを検討した結果、タンパク質表面のヒスチジンに結合する Cu²⁺-IDA を用いることにより有効範囲 20 Å、誤差 3.6 Å の遠位の距離情報取得の方法論

タンパク質、立体構造、常磁性金属、ヒスチジン、遠距離情報

のむらまこと、こばやしとしだつ、こうのとしゆき、ふじわらけんいちろう、てんのたけし、しらかわまさひろ、いじざきいつこ、やまもとかずお、まつやまとしふみ、みしままさき、こじまちょうじろう

の開発に成功した(野村ら 第42回 NMR 討論会要旨, Nomura *et. al.* (2004) *FEBS Letters* **566**, 157-161)。今回、 Cu^{2+} -IDA とタンパク質との結合の詳細と poly histidine tag 付のタンパク質への応用について報告する。

実験材料および方法

モデルタンパク質として ^{15}N 核の実験に関しては ubiquitin、IRF4 DNA binding domain (DBD)、HR23B ubiquitin like domain (Ubl) (すべて *E. coli* による ^{15}N ラベル体) を用い、 ^{13}C 核の実験に関しては ubiquitin(sigma)および lysozyme (Funakoshi)を用いた。IRF4 DBD に関しては Cys79 を *N*-ethylmaleimide (NEM) 化学修飾により保護した。1 mM ^{15}N ラベル体 ubiquitin に対して 0.4 mM Cu^{2+} -IDA を導入し、 ^1H - ^{15}N ベースのスピンエコー実験を行った。ubiquitin 単体との比較により得られた緩和時間変化を Mathematica の非線形フィッティング機能を用いてフィッティングし、 Cu^{2+} -IDA の局在位置を決定した。IRF4 DBD および HR23B に関しては ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上で、ピークハイトより計算した Cu^{2+} -IDA による広幅化率を計算し評価を行った。 ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルによる滴定実験には、10 mM ubiquitin を用い、これに対して Cu^{2+} -IDA を 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14 mM まで加え、Aromatic および Methyl それぞれの領域で delay を最適化して天然存在比の ^{13}C 核を利用して測定を行った。対照実験としてアミノ酸単体の 10 mM histidine に対して、0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mM まで Cu^{2+} -IDA を加え、同様に測定した。5 mM lysozyme に対しても同様の実験を 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mM まで Cu^{2+} -IDA を加えて測定した。すべての NMR 実験は Bruker DRX 800 NMR 装置を用いて行った。

EPR による滴定実験は、2.5 mM Cu^{2+} -IDA に対して 0, 0.625, 1.25, 1.875, 2.5, 5 mM まで ubiquitin を加え、液体窒素により 77 K で測定を行った。対照実験として 2.5 mM Cu -IDA, 10 % glycerol に対して 0, 0.625, 1.25, 1.875, 2.5, 5 mM まで histidine を加え、同様に測定した。すべての EPR 実験は JEOL JES-TE300 X-band spectrometer によって行われた。可視紫外分光光度計による滴定実験は、2.5 mM Cu^{2+} -IDA に対して 0, 0.625, 1.25, 1.875, 2.5, 5 mM まで ubiquitin を加え、測定した。

Cu^{2+} -IDA とタンパク質の結合様式

常磁性金属キレート複合体 Cu^{2+} -IDA はタンパク質表面の histidine 残基に結合し、距離依存性の常磁性緩和効果を及ぼす。 ^1H - ^{15}N HSQC ベースの横緩和測定を理論式に適用することにより Cu^{2+} は、His68 の近傍に局在することが確認され、(Figure 1 (left)), RMSD=1.3 Å 有効範囲 20 Å までの距離情報が得られた(Figure 1 (right))。しかしながら、His68 上のイミダゾール環において金属の配位子となる N^{δ} および N^{ϵ} と Cu^{2+} 間での距離は、それぞれ 5.6 ± 0.6 および 4.5 ± 1.0 Å となり、通常の配位結合距離よりも大きな値となった。結晶構造中の N^{δ} および N^{ϵ} の B-factor は 27 および 28 Å² であり高い運動性を持っている点、 Cu^{2+} の緩和中心となる電子がイミダゾール環上に非局在

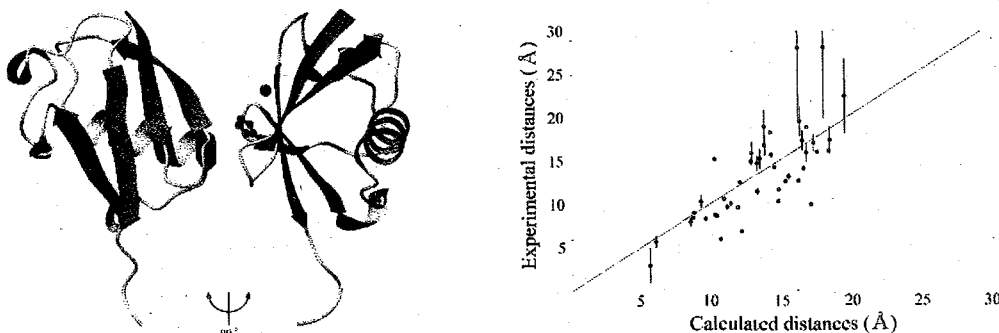


Figure 1. The ribbon structure of ubiquitin with Cu^{2+} relaxation center of Cu^{2+} -IDA (left). Side chain of His68 is drawn as a ball-stick model. Cu^{2+} is shown as the sphere. Correlation plot between calculated and experimental distances (right).

化する可能性が高いことなどから、結合位置の精密な決定は困難であると考えられた。そこで今回 ^1H - ^{13}C HSQC、電子スピン共鳴法 (EPR)、可視紫外分光光度計を用いて Cu^{2+} -IDA とタンパク質との結合様式の解明を行った。

a) ^1H - ^{13}C HSQC: アミノ酸単体としての 10 mM histidine の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルにおいて観測可能な核は、イミダゾール環上の H-C^δ と H-C^ϵ 、炭素鎖中の H-C^β および H-C^α である。これに対して Cu^{2+} -IDA を滴定したところ、 Cu^{2+} -IDA:His=0.1:1 において、イミダゾール環上の H-C^δ と H-C^ϵ のピークが消失した。 Cu^{2+} -IDA:His=0.2:1 において、炭素鎖中の H-C^β のピークが顕著な幅広化を示した。これらの結果より Cu^{2+} -IDA は、histidine と直接相互作用し、 Cu^{2+} の結合位置はイミダゾール環近傍であることが示唆された。10 mM ubiquitin の Aromatic 領域の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルにおいても Cu^{2+} -IDA:Ub=0.05:1 というきわめて低い濃度において His68 の H-C^δ および H-C^ϵ のピークでのみ唯一顕著な幅広化が見られた (Figure 2)。 Cu^{2+} -IDA:Ub=0.1:1 の時点で H-C^ϵ のピークは消失し、 Cu^{2+} -IDA:Ub=0.2:1 の時点で H-C^δ のピークは消失した。よって ubiquitin においても His68 上のイミダゾール環近傍に Cu^{2+} -IDA が結合していることが示唆される。

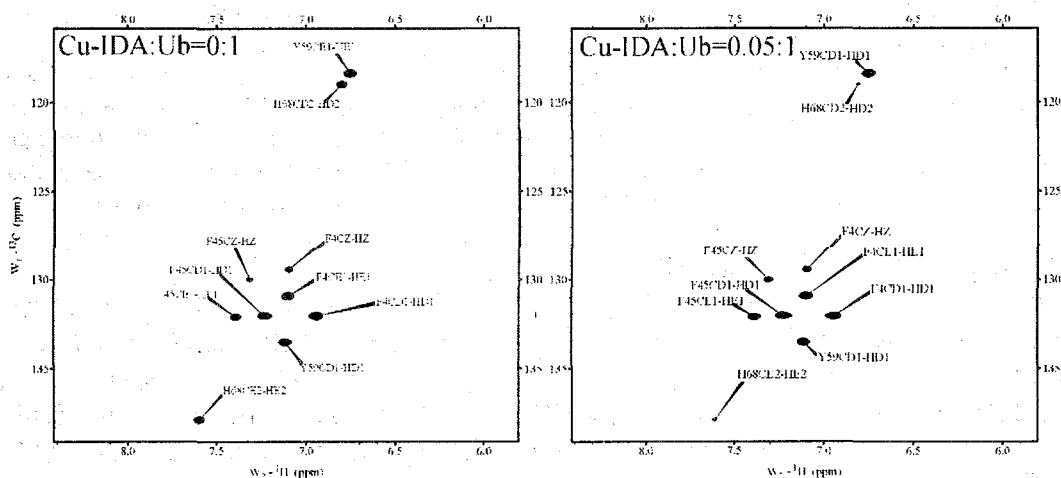


Figure 2. ^1H - ^{13}C HSQC spectra of aromatic region for ubiquitin (left) and ubiquitin with Cu^{2+} -IDA (right).

b) EPR: Cu^{2+} 核の電子スピン共鳴スペクトルによって、配位結合の有無を検討した。 Cu^{2+} は $(3d)^9$ の電子配置であり対電子を1つ持つ。 Cu^{2+} -IDAの対電子のEPRスペクトルでのubiquitin滴定による変化を調べた。液体窒素温度である77 Kにおいて、EPRスペクトルは、2状態で遷移し、 Cu^{2+} -IDA:Ub=1:1で変化はプラトーに達した (Figure 4)。これは Cu^{2+} -IDA と ubiquitin の化学量論比が 1:1 であることを示唆する。磁場方向と平行な g 値は ubiquitin 導入前で $g_{\parallel}=2.27$ 、導入後で $g_{\parallel}=2.32$ であり、配位状態が変化していることを示す。また、この対電子は Cu 核 ($I=3/2$) とカップリングし 4 つの遷移状態に分裂する。このカップリングの大きさ A_{\parallel} は ubiquitin 導入前で $A_{\parallel}=15.8$ mT、導入後で $A_{\parallel}=15.9$ mT であり、タイプ II 銅であると分類される。したがって Cu^{2+} -IDA 単体および Cu^{2+} -IDA-ubiquitin 双方で平面的な 4 配位構造を保っている可能性が高い。アミノ酸単体としての histidine での同様の実験においても類似のスペクトルが得られた。したがってこれらの結果より Cu^{2+} -IDA と ubiquitin の His68 は化学量論比 1:1 で平面 4 配位の配位結合によって結合していると考えられる。

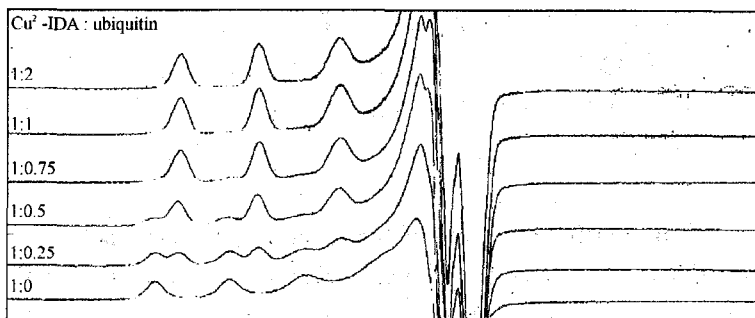


Figure 3. EPR spectra of Cu^{2+} -IDA. The ratio of Cu^{2+} -IDA was changed from 1:0 to 1:2.

His-Tag タンパク質への応用

His-Tag 付タンパク質への応用として HR23B UbL (+6xHis-Tag)および IRF4 DBD (+6xHis-Tag)へ適用した。緩和時間測定や線幅測定が困難な低 S/N 比のサンプルを想定し、ピークハイトから Broadening ratio を計算し評価した。表面に histidine の存在しない HR23B UbL に関しては His-Tag 付近にのみ顕著な広幅化が見られた(Figure 4 (left))。IRF4 DBD に関してはタンパク質表面の His36 および空間的に近い 79-92 番目のアミノ酸付近および His-Tag 付近で顕著な広幅化が起こった (Figure 4 (right))。IRF4 DBD に関しては cysteine を持ち凝集傾向にあるため通常還元剤である DTT を用いる。しかし Cu^{2+} -IDA と DTT では Cu^{1+} -DTT を形成し沈殿するため、IRF4 DBD 側を *N*-ethylmaleimide (NEM)を用いて化学修飾し保護した。cysteine 含有サンプルや DTT 利用では注意を要する。

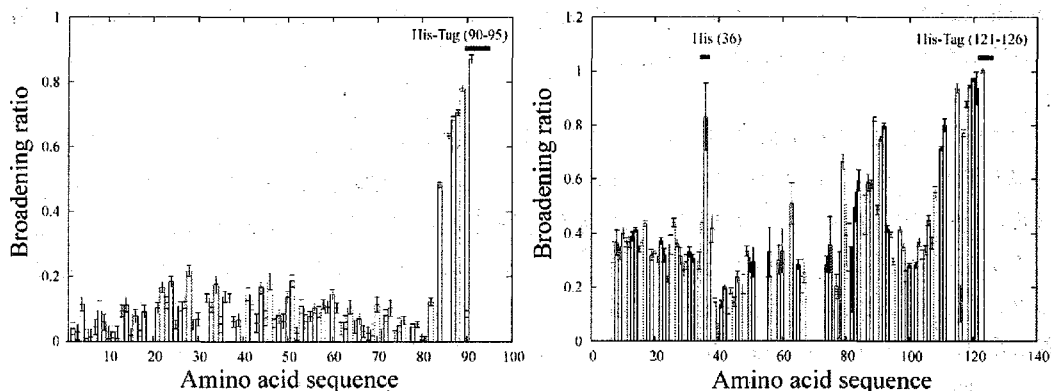


Figure 4. The broadening ratios of HR23B UbL (left) and IRF4DBD (right) were plotted against the amino acid sequence. The 79th to 92th residues of IRF4 DBD were spatially close to His36 in the modeled structure.

Cu^{2+} -IDA 法の結論

常磁性金属キレート複合体 Cu^{2+} -IDA は配位結合によってタンパク質表面の histidine に化学量論比 1:1 にて結合する。表面に 1 つのみ histidine を持つ ubiquitin および lysozyme、His-tag を持つ HR23B、IRF4DBD および ppR (7 回膜貫通型蛋白質) においても Cu^{2+} -IDA の histidine 残基への特異的な結合が確認された。このことから Cu^{2+} -IDA を用いることで多くのタンパク質で 20 Å 程度の遠位の距離情報が得られると期待される。

2P005

DNA 結合蛋白質 NikA の構造解析

都立大院・理¹、CREST/JST²、理研・GSC³

○吉田均¹、古屋信久¹、Yi-Jan Lin³、駒野照弥¹、Peter Güntert³、
甲斐荘正恒^{1,2}

The solution structure of DNA binding protein NikA

Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University¹, CREST/JST², RIKEN Genomic
Sciences Center³

○Hitoshi Yoshida¹, Furuya Nobuhisa¹, Yi-Jan Lin³, Komano Teruya¹, Peter Güntert³ and
Masatsune Kaninosho^{1,2}

NikA protein is an important factor for initiating the intercellular transfer of the R64 plasmid during bacterial conjugation. NikA protein binds and bends in the proximity of the nick site of the R64 origin of transfer. Many NMR parameters and cross-linking experiments have revealed that the NikA¹⁻⁵¹ construct, which includes DNA binding site, is a homodimer. The structure of NikA¹⁻⁵¹ was determined without measuring filtered NOESY experiments, which are typically used for distinguishing between intra- and inter-molecular NOEs, and also without assuming any prior knowledge of the approximate folds of protein. The assignment of the intra- and inter-molecular NOEs was obtained by fully automated NOE assignment using the CYANA module. The NMR structure reveals that NikA¹⁻⁵¹ is a homo-dimer, which adopts a ribbon-helix-helix (RHH) fold common to the Arc/MetJ family of transcriptional repressors.

バクテリアにおける情報伝達系の一つに、F 因子などの接合伝達性プラスミドによる遺伝子交換があり、例えば抗生物質に対する耐性の伝播、ひいては院内感染の原因となっている。接合伝達機構の解明が、バクテリアの情報伝達機構として重要視される理由がここにある。この接合伝達性プラスミドの一種である R64 の DNA 伝達の開始において重要な働きをしているタンパク質が NikA である。NikA は雄細胞中で R64 プラスミド伝達基点 (oriT) 中の 17 塩基対の配列 (repeatA) に特異的に結合し、oriT を曲げることが明らかにされている。NikA が oriT を曲げることで始めて、relaxase (NikB) が oriT 領域 DNA の一方の鎖を特異的に切断し、一本鎖になったプラスミドの雌細胞への移動がおこるため、NikA は接合伝達の開始に欠かすことのできないタンパク質である。本研究の目標は、NikA の立体構造を明らかにし、その DNA の特異的分子認識機構を解明することにある。NikA 全長、及び幾つかのアミノ酸変異体の構造解析を試みた結果、repeatA を特異的に認識するに必須である領域を含む N 末端 51 残基の

キーワード : NikA、接合伝達、DNA 結合タンパク質、溶液 NMR

よしだひとし、ふるやのぶひさ、いーじゃんりー、こまのてるや、ペーたーぎゅんたーと、
かいのしょうまさつね

コンストラクト (NikA¹⁻⁵¹) が比較的良好な NMR スペクトルを与えたことから、先ず、この部分の立体構造解析を実施した。

【実験】

大腸菌を用いた大量発現系により ¹⁵N-及び ¹³C/¹⁵N-標識 NikA¹⁻⁵¹ を調製した。NMR 測定は Bruker DRX 800, DRX 600, AV 500 を用いて測定した。種々の 3次元 NMR スペクトルを測定し、定法に従い、NikA¹⁻⁵¹ の主鎖及び側鎖の帰属を行った。次に ¹H 間距離情報を得るために 3D ¹⁵N separated-NOESY 及び 3D ¹³C separated-NOESY の測定を行った。また水素結合を観測するために ³H_{NC} を測定し、モノマーユニット間に形成されるβシートにおける水素結合対を決定した。

【結果ならびに考察】

様々な条件下で分子量約 50 k の NikA 全長の構造決定を試みたが、NikA は溶液中において多量体、おそらく 4 量体、を形成しており、迅速な構造決定は極めて困難であることが明らかになった。一方、DNA 結合能を持つ N 末端ドメイン、NikA¹⁻⁵¹、は比較的良好な NMR スペクトルを与えることからその立体構造解析を行った。NikA¹⁻⁵¹ の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを詳細に検討したところ、各クロスピークの線幅は 2 量体相当 (分子量 11.2 kDa) であることが分かった。また ¹³C_α、¹³C_β、¹H_α核の Chemical Shift Index から NikA¹⁻⁵¹ にはβストランドが一本のみ存在することが判明し、NikA¹⁻⁵¹ が多量体であることを示した。これらの NMR の構造情報同様、dimethylpimelidate を用いた架橋実験結果においても、NikA¹⁻⁵¹ が少なくとも 2 量体を形成していることが明らかとなった。

通常、多量体 (2 量体) の立体構造決定においては同位体フィルター-NOESY の測定を行い、分子内と分子間の NOE を区別するか、ホモロジーの高いタンパク質の構造を参考にして分子内と分子間の NOE を解釈するか、いずれかの方法を選択する。本研究では、水素結合の直接観測により得られたβシートの水素結合情報を唯一の分子間の束縛条件として CYANA により NOE の自動帰属と構造計算を行ったところ、よく収束された構造が得られた。得られた NikA¹⁻⁵¹ の 16 から 51 残基の主鎖の原子は Arc リプレッサーの構造と非常によく重なり、NikA には Arc/MetJ リプレッサースーパーファミリーに見られる ribbon-helix-helix (RHH) 型の DNA 結合モチーフ構造が存在することが分かった。今回、我々は接合伝達の開始に関わる NikA に、転写調整因子という機能の異なったファミリーに見られる RHH 型の DNA 結合モチーフが存在するという興味深い知見を得た。なを、CYANA により分子内と分子間の NOE を完全に自動帰属する手法はホモダイマーの構造決定に有用であることが示された。

Ultra-fast measurement in multi-dimensional NMR: Spectrum reconstruction from folded spectra with multi-linear sampling
JEOL Ltd. OKenji Takasugi

For multi-dimensional NMR measurements, one of the factors to increase measurement time is point resolution in indirect axis. Namely, total measurement time is proportional to the number of points in indirect axis and long time measurements are required to get sufficient resolution in multi-dimensional NMR measurement. I developed a technique to decrease the total measurement time with reconstruction methods from folded spectra. By this technique, I successfully shortened the total measurement time to half for two-dimensional measurements. This technique is applicable for three-dimensional and four-dimensional measurements, and their total measurement time can be shortened to less than quarter.

FT-NMRスペクトルの測定において、観測帯域は観測しているFIDのサンプリング間隔に、ポイント分解能は観測しているFIDの観測時間(長さ)によって決まる。また、通常の多次元NMR測定では、積算回数と間接観測軸点数の増加に伴い測定時間が増加する。ここで間接観測軸は一般に化学シフト等の展開を観測するために、間接観測軸のポイント分解能を十分あげる必要がある。従って、高分解のスペクトルを得るためには、長時間の測定時間が必要である。本発表では、高分解能な多次元NMRスペクトルを時間短縮して測定できる、折り返し再構成法を開発したので、実例を使って報告する。

一般にFT-NMR 測定のサンプリング条件はナイキスト定理により決まり、サンプリング帯域外の信号はエイリアス現象により、ナイキスト周波数より低い周波数に折り返った信号として観測される。実例として、 $\pm 0.5\text{kHz}$ のサンプリング帯域の測定において、 3.2kHz の周波数を持つ信号はサンプリング帯域外の信号である。従って、この信号は折り返った信号として観測され、あたかも 0.2kHz ($3.2\text{kHz} - 1\text{kHz} \times 3 = 0.2\text{kHz}$) の周波数を持つ信号かのように観測される。ただし、この信号と実際に 0.2kHz の周波数を持つ信号との区別は不可能である。ここで、サンプリング帯域を $\pm 0.55\text{kHz}$ として同様の測定を行うと、 3.2kHz の周波数を持つ信号は -0.1kHz ($3.2\text{kHz} - 1.1\text{kHz} \times 3 = -0.1\text{kHz}$) の周波数を持つ信号として観測される。つまり、2つ以上の異なるサンプリング条件で測定

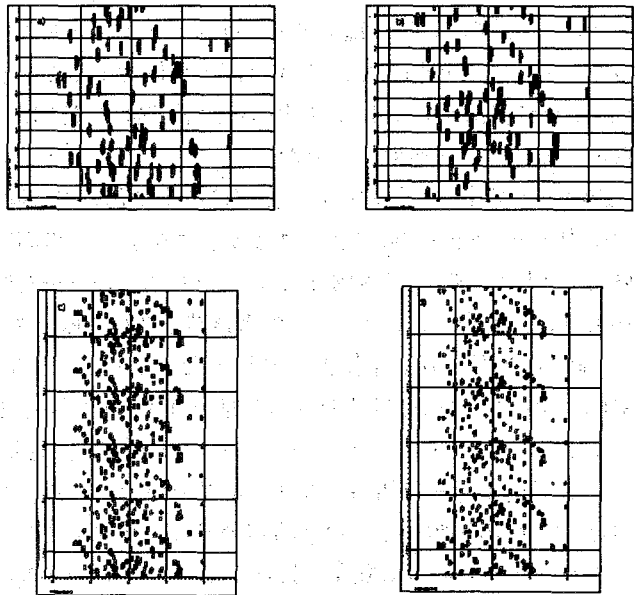


Fig.1 two-Dimensional ^1H - ^{15}N HSQC spectra of chlorella ubiquitin acquired with narrow spectrum width.
a) Acquired with 1kHz (20points) for ^{15}N spectrum width. Measurement time is 17 minutes.
b) Acquired with 1.1kHz (22points) for ^{15}N spectrum width. Measurement time is 18minutes.
c) Stacked plot of a).
d) Stacked plot of b).

キーワード：多次元 NMR、超高速測定、スペクトルの折り返し

たかすぎけんじ

を行うことで、観測された信号が折り返った信号かどうかを判別することが可能である。また、折り返った信号のピーク位置の違いから複数回(上記例では3回)折り返った場合でも、折り返し回数を特定することができ、広帯域のスペクトルの再構成が可能になる。このスペクトルから広帯域スペクトルを再構成するには、次のような方法がある。

- (1) 折り返ったピークの周波数の違いから折り返し回数を特定し、広帯域スペクトル上にマッピングする。
- (2) 得られた狭帯域スペクトルを積み上げ(スタックし)、スタックされたスペクトルを比較し、各ポイントについて強度の大きいデータを捨て、小さい方を抽出する(Lowest Value 法)。
但し、サンプリング帯域とピーク位置の差によってゴーストピークが残る場合がある、サンプリング帯域の選択によりこれを避けている。

さらにこのようなサンプリング条件では広帯域の測定に比べてサンプリング間隔が長く、同じ観測時間(長さ)のFIDを得た場合でもポイント数は少ない。例えば、観測時間(長さ)1秒のFIDを得るために、サンプリング帯域が $\pm 1\text{kHz}$ (サンプリング間隔が0.5msec)で2000点のサンプリングを行った場合と、サンプリング帯域が $\pm 0.5\text{kHz}$ (サンプリング間隔が1msec)で1000点のサンプリングを行った場合とでは、FIDの観測時間(長さ)が同じなのでポイント分解能は等しくなる。従って、このサンプリング点が多次元スペクトルにおける間接観測軸のサンプリング点である場合は、ポイント数に応じて測定時間を短縮することができる。

この手法は、狭帯域条件のサンプリングを複数回行うことに対応し、それぞれのサンプリングがリニアなサンプリングポイントで行われるので、マルチリニアサンプリングでFIDをサンプリングしたことになる。マルチリニアサンプリングで測定されたFIDは、折り返し再構成法処理により、正しいスペクトルに変換される。

実際の適用例として、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル蛋白質の2次元 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQCスペクトルの間接観測軸に応用した例を示す。図1は間接観測軸(^{15}N 核)のサンプリング帯域を1kHzと1.1kHzの条件で測定を行った例で、ポイント分解能は図1a)、図1b)とも50Hz/pointになっている。図1a)、図1b)に上記

(2)の方法を適用して、間接観測軸方向に積み上げた(スタックした)ものが図1c)、図1d)である。次に、この図1c)と図1d)の各ポイントについて、強度の小さい方を抽出することで、図2a)のスペクトルを得ることができる。この図2a)の結果は、通常のサンプリング帯域を5kHz(100点/5kHz)として測定を行ったスペクトル(図2b)と同じポイント分解能のスペクトルであり、全測定時間を半分以下に短縮することができた。

この例は2次元測定への適用例だが、3次元、4次元測定に対してそれぞれの間接観測軸に適用した場合は、さらに測定時間を短縮する事ができる。

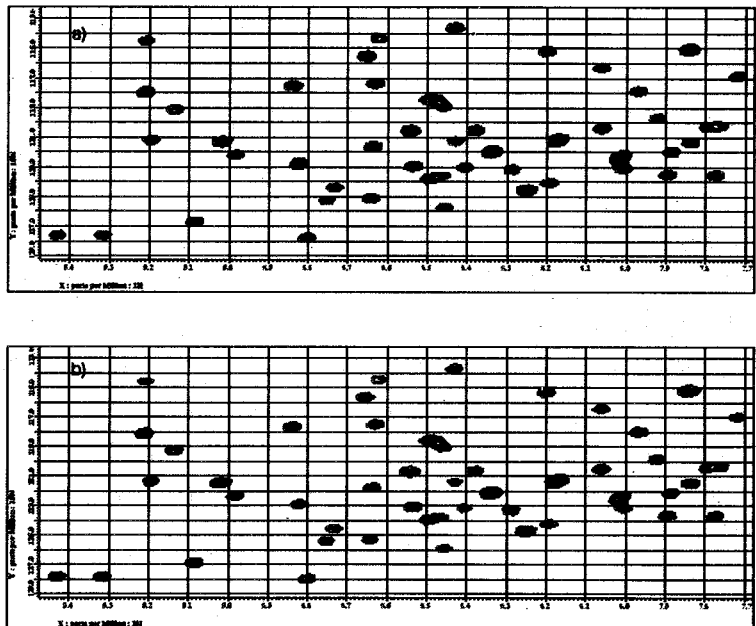


Fig.2 two-Dimensional $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC spectrum for chlorella ubiquitin.
a) Reconstructed from two narrow width (1kHz/1.1kHz) spectra.
Total measurement times are 35minutes.
b) Acquired with conventional method with spectrum width 5kHz/100points.
Measurement time is 85minutes.

超偏極 Xe-129 を用いたカリックスアレーンの
超分子化学特性に関する研究
(阪大医) ○安達裕子、金子暁里、木村敦臣、藤原英明

Study of Supramolecular chemistry properties of Calixarene using
hyperpolarized Xe-129

○Yuko Adachi, Akari Kaneko, Atsuomi Kimura, and Hideaki Fujiwara

The Department of Health Science, Faculty of Medicine, Osaka University

The complexation phenomenon of Xe-129 with calixarene (CA) (Fig.1) has been studied by hyperpolarized Xe-129 NMR spectroscopy. The chemical shifts of Xe-129 dissolved in the CA-D₂O solution strongly depended on the concentration of CA. By analyzing this concentration-dependency, the association constant is quantitatively evaluated as $12.6 \pm 2.2 \text{ M}^{-1}$. The versatile utility of this method is discussed in the present study.

【はじめに】

超偏極 Xe-129 を用いて NMR 分光法が cryptophaneA- Xe-129 の錯体形成反応の観察に適応されて以来、この手法は包接現象の解明に有効であることが判明し、構造研究への応用など様々な用途が期待されている。そこで、本研究では新規包接化合物であるチアカリックスアレーン (CA) に着目し、このものと Xe-129 との錯体形成反応を調べることとした。

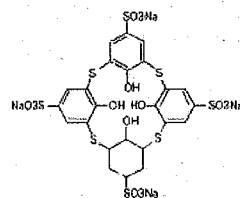


Fig.1 The structure of 4-Sulfothiacalix[4]arene Sodium Salt

【実験】

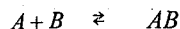
半導体レーザー (Ga-Al-As ダイオード : コヒーレント社製 FAP システム) を $\lambda/4$ 板に通し円偏光とした。偏極セル内の Rb にこれを照射し、光ポンピング法により Xe-129 ガスを超偏極状態にした。Xe-129 ガスは自然存在比で偏極率は約 2% である。NMR の漏洩磁場を静磁場を用い約 12mT である。NMR 装置は Varian 社製 INOVA-400WB 装置 (9.4T) を使用し、測定周波数は 110.6MHz、測定温度は室温で行った。サンプルには 4-Sulfothiacalix(4)arene Sodium Salt を使い、溶媒は D₂O を用いた。測定は CA 濃度を 0~0.3M まで変えて行った。重水に溶けた Xe-129 の信号と CA に包接された Xe-129 のスペクトルを測定した。

キーワード : 超偏極 Xe-129 カリックスアレーン 平衡定数 アミノ酸

あだちゆうこ かねこあかり きむらあつおみ ふじわらひであき

【結果と考察】

得られたスペクトルは1本でこのスペクトルは濃度を高くしていくと高磁場側にシフトした (Fig. 2)。これより CA に Xe-129 が包接されており、重水に溶けた Xe-129 の信号と CA に包接された Xe-129 の信号は交換速度が速いため一本になったと考えられる。そして以下の式④に測定値をいれて作図法で平衡定数 K を求めた。A を Xe-129、B を CA、AB を Xe-129 と CA の包接体、[B] を Free、[B]₀ を加えた濃度とする。



交換が速いと考えられるので K と δ_{obs} は以下のように表される。

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad \dots \textcircled{1} \quad \delta_{obs} = \frac{[AB]\delta_{AB} + [A]\delta_A}{[A] + [AB]} \quad \dots \textcircled{2}$$

Xe-129 ガスを吹き込み続けるので Xe-129 はサンプル中に常に飽和しているのが一定である。Xe-129 の飽和濃度は 4.37mM¹⁾ である。

$$[B] = [B]_0 - [AB] \quad \dots \textcircled{3}$$

①、②、③式より

$$\frac{1}{\delta_{obs} - \delta_A} = \left(\frac{1}{K} + [A] \right) \frac{1}{\delta_{AB} - \delta_A} \frac{1}{[B]_0} + \frac{1}{\delta_{AB} - \delta_A} \quad \dots \textcircled{4}$$

測定した値を④式にいれ、横軸に 1/[B]₀、縦軸に 1/($\delta_{obs} - \delta_A$) をとり、作図法により平衡定数、 δ_{AB} を求めた (Fig. 3)。

作図法により平衡定数 K は $12.6 \pm 2.2 \text{ M}^{-1}$ 、 δ_{AB} は $112.8 \pm 2.9 \text{ ppm}$ になり、作図法により K と δ_{AB} を正確に評価できることが分かった。今後、温度可変実験により、相互作用の熱力学パラメータとして ΔH 、 ΔS を評価し、他の包接体と比較する予定である。CA はチロシンのようなアミノ酸を包含することも観察された。Xe-129 包接体に及ぼすアミノ酸の影響も検討中である。

引用文献

- 1) K. Bartik, M. Luhmer, S. J. Heyes, R. Ottinger, and J. Reisse, J. Magn. Reson. B 109, 164-168 (1995)

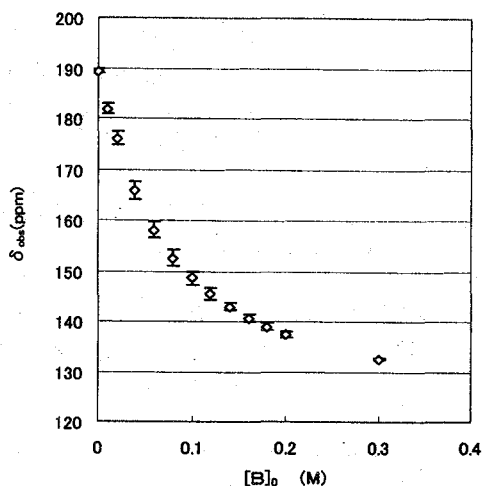


Fig.2 Plots of δ_{obs} against $[B]_0$ at room temperature

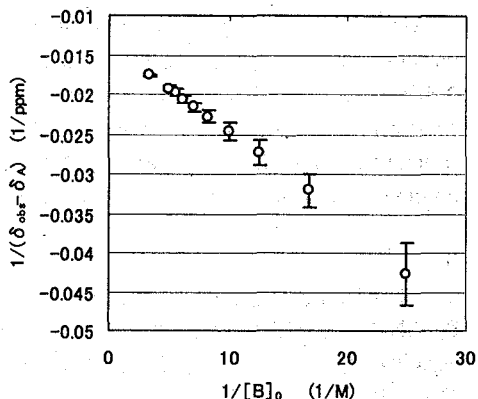


Fig.3 Plots of $1/(\delta_{obs} - \delta_A)$ against $1/[B]_0$

(¹理研・遺伝生化学, ²横浜市大院・総合理, ³理研・生体超分子構造・機能研究 G, ⁴CREST/JST, ⁵Mitochondrial Diseases Group, MRC Dunn Human Nutrition Unit, UK)

○倉島かおり^{1,2,3,4}, 千本木裕⁵, 柴田武彦^{1,2,3}, 伊藤隆^{1,2,3,4}

NMR analysis of human mitochondrial ABC transporter, ABCB6
Kaori Kurashima^{1,2,3,4}, Hiroshi Senbongi⁵, Takehiko Shibata^{1,2,3}, Yutaka Ito^{1,2,3,4}

¹Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN; ²Graduate school of Integrated Science, Yokohama City University; ³Research Group for Bio-supramolecule Structure-function, RIKEN; ⁴CREST/JST; ⁵Mitochondrial Diseases Group, MRC Dunn Human Nutrition Unit, UK

Human ABCB6 (MTABC3) is a mitochondrial half-type ATP-binding cassette (ABC) transporter protein. Like its *Saccharomyces cerevisiae* homologue, Atm1p, ABCB6 is proposed to be responsible for transporting a precursor of the iron-sulfur (Fe/S) cluster from mitochondria to cytosol. Aiming at understanding the molecular basis of ligand recognition and transportation mechanisms, we initiated the heteronuclear multidimensional NMR studies on the C-terminal soluble domain (558–842, 285 a.a.) of ABCB6 (ABCB6-CSD). Stable isotope-labelled ABCB6-CSD was overexpressed as a GST-fusion protein in *E. coli* using M9 minimal medium. The N-terminal GST-tag was cleaved during the purification. By optimizing the purification procedure, we succeeded to obtain enough amount of ABCB6-CSD samples for NMR measurements. The ¹H-¹⁵N HSQC spectra showed well resolved cross-peaks, suggesting that ABCB6-CSD possesses proper fold on its own. Backbone resonance assignment using ²H/¹³C/¹⁵N-labelled ABCB6-CSD is in progress, which will be utilized for the future titration experiments with ADP/ATP or ligands.

[序]

ヒト ABCB6 (MTABC3) は、ミトコンドリア内膜に存在するハーフタイプの ABC 輸送体蛋白質である。ABCB6 が輸送する基質については明らかにはなっていないが、鉄・硫黄クラスター前駆体を基質とする出芽酵母 Atm1p と相同性を持つことから、同様な役割をヒト・ミトコンドリア内で果たしていると考えられている。

今までの ABC 輸送体蛋白質に関する知見によると、ABC 輸送体蛋白質は、基質認識と膜透過の機能を持つ膜貫通 (TM) ドメインと、基質輸送のエネルギー源である ATP と結合し、ATPase 活性を持つ ATP-binding cassette (ABC) ドメインの 2 種のドメインから構成されている。我々は特に、ABC ドメインを含む C 末端側の可溶領域 (ABCB6-CSD : 285 残基) の詳細な分子機構の解明を目指し、NMR を用いた解析を開始した。

キーワード ABC 輸送体蛋白質 膜蛋白質 ミトコンドリア内膜 鉄の恒常性

ふりがな くらしまかおり せんぼんぎひろし しばたけひこ いうゆたか

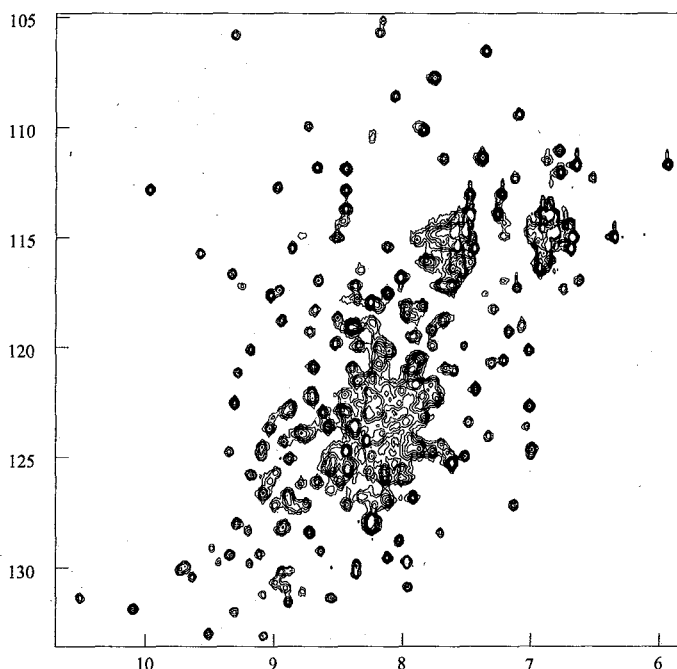
[実験・結果]

ABCB6-CSD の大量調製のために、GST 融合 ABCB6-CSD の大腸菌における大量発現系を確立した。次いで、GST 親和性カラムクロマトグラフィー、Thrombin による GST-tag 切除、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製法を確立し、NMR 測定に十分な量の ABCB6-CSD 単体を得ることができた。

上記調製法を用いて ^{15}N 標識試料を調製し、NMR 用緩衝液 [20 mM sodium phosphate (pH 8.5), 50 mM Na_2SO_4 , 10 mM DTT] 中で 2D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ、図のような良好なスペクトルを得ることができた。このことから、ABCB6-CSD は安定な高次構造を保持していることが判明した。つづいて 95% 重水培地における培養条件の検討を行い、 $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識試料の調製を行った。現在、この試料を用いて異種核多次元 NMR 法による主鎖 NMR シグナルの帰属を試みている。また、 $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ 標識試料について ADP や種々の ATP 非水解アナログを用いたタイトレーション実験を行うことで ABCB6-CSD の機能解析も進めている。なお、全ての NMR 測定は、理研・和光研究所の Bruker 社 DRX600 および低温 3 重共鳴プローブを用い、測定温度 298K で行っている。データ処理とスペクトルの解析はそれぞれ AZARA, ANSIG-for-OpenGL ソフトウェアを用いている。

[今後の展望]

今後は、選択的プロトン標識試料を調製し、側鎖 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ シグナルの帰属と NOE 解析を行うことでグローバル・フォールドの決定を行う予定である。同時に主として生化学的アプローチを用いて ABCB6 の基質の同定を行い、同定できた際には NMR タイトレーション実験を行うことで、基質認識のメカニズムの解析を進めていきたいと考えている。



Figure

2D ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of uniformly ^{15}N -labelled ABCB6-CSD dissolved in NMR buffer [20 mM sodium phosphate (pH 8.5), 50 mM Na_2SO_4 , 10 mM DTT].

3P009

非天然構造をとるリゾチーム変異体における種々の溶媒中での
重水素交換反応速度

(関西学院大学 理工学部)

○野田康夫,坂本恵子,山崎向太,岡本邦彦,木村雅也,瀬川新一

H-D Exchange Rates of Lysozyme Variants in a Non-native State in a Solution
Containing Various Solvent Additives

School of Science and Technology, Kwansai Gakuin Univ.

○ Yasuo Noda, Keiko Sakamoto, Kouta Yamasaki, Kunihiko Okamoto,
Masaya Kimura, Shin-ichi Segawa

Lysozyme variants lacking disulfide bridges have non-native structures in an equilibrium state. In order to analyze early processes of protein folding, it is important to understand nature of a protein structure in a non-native state at the resolution of atomic level. Protection factors, which are defined as retardation for hydrogen exchange rates of polypeptide NHs, are available data for such a purpose. But it was difficult to measure the H-D exchange rate of each residue by means of the conventional method with 2D-NMR measurements, because exchange reactions of protein in a non-native state progress during the measurement of 2D-NMR spectra. We solved the problem by measuring the NMR spectra in DMSO(Dimethyl Sulfoxide)/D₂O mixtures, where the exchange rate is greatly retarded. HD exchange reactions of protein were carried out under various solvent conditions (pH, temperature and solvent additives such as glycerol), then partly deuterated proteins were freeze-dried and dissolved into the DMSO/D₂O solvent for NMR measurements. We will discuss the effect of glycerol on proteins in a non-native state in a residue-specific manner.

【序論】

天然リゾチームにはそれぞれ SS1(C6-C127)、SS2(C30-C115)、SS3(C64-C80)、SS4(C76-C94)という4本のSS結合が存在する。これまで我々はそれらが1本欠損した3SS中間体の立体構造を知るため、NMRによる構造解析を行った¹⁾。さらに2本のSS結合が存在する2SS体(2SS[6-127,30-115])についても解析を行った²⁾。その結果、残基88-99のCヘリックスと残基1-39のN末端αドメイ

リゾチーム、重水素交換、プロテクション因子、フォールディング

○ののだやすお,さかもとけいこ,やまさきこうた,おかもとくにひこ,きむらまさや,
せがわしんいち

ンが特定残基間の特異的結合によって α ドメインの中心核を形成することと、 β ドメインの両端(残基40と87)と、残基40-56の半平行 β シート的一端(残基55,56)の3カ所をヒンジとよばれる部分に固定して β ドメインの基本骨格が構築されていることが分かってきた³⁾。そこでタンパク質フォールディング反応の初期過程を解析するために、現在我々は非天然状態にあるタンパク質の構造の特徴を原子レベルの分解能で解明する研究を行っている。卵白リゾチームの2SS変異体(2SS[64-80,76-94]; C64-C80とC76-C94の2本のSS結合を保持するもの)と0SS変異体(0SS; 4本すべてのSS結合が欠損しているもの)は天然状態と違ったピークの分散が少ないNMRスペクトルを呈する。これらの非天然状態にあるタンパク質は完全なランダムコイルではなく、ポリペプチド鎖の一部に秩序構造が残留していると考えられる。その様な情報を得るため、ポリペプチド主鎖のNH基がHD交換反応からどのくらい保護されているかというプロテクション因子を各アミノ酸残基について求めた。また4M グアニジン塩酸塩及び、30%グリセロールが共存している条件下で同じようにプロテクション因子を求め、プロテクション因子の違いから、非天然状態にあるタンパク質の構造の特性について考察した。

【方法】

2SS変異体と0SS変異体の¹⁵N置換試料を作製し、70 μ Mと10 μ Mのタンパク質濃度でHD交換反応を行った。HD交換反応時の溶媒は20mMギ酸バッファ(pH3.0)を用い、4M グアニジン塩酸塩及び、30%グリセロールを共存させて反応させた。HD交換反応時間終了後、凍結乾燥することによって交換反応を停止させた。4M グアニジン塩酸塩及び、30%グリセロールが共存しているサンプルに関してはそれらを取り除くため、4 $^{\circ}$ Cの条件下で逆相SepPacカラムに注入し、脱グアニジン、脱グリセロール作業を行った後、凍結乾燥を行った(作業時間約3.5分)。凍結乾燥後のサンプルをNMR測定用DMSO溶媒(95%DMSO & 5%D₂O: pH5.4)で溶解し、25 $^{\circ}$ CでNMR測定を行った。この溶媒中では、HD交換反応は非常に遅くなり(交換速度が平均して約200分程度)、HSQCスペクトル測定中のHD交換反応はほとんど無視することが可能であった。Bruker社製Avance DRX600 NMR分光器を用いて、¹⁵N-¹H-HSQCスペクトルを測定し、Felixを用いてそのスペクトルの各残基のピーク体積の時間変化を求めることにより、HD交換反応速度を決定した。さらにその時の交換速度の時定数をアミノ酸残基固有の時定数(Bai et al., 1993)で割ることによって、プロテクション因子を求めた。

【結果】

2SS変異体において、pH3、4 $^{\circ}$ Cの条件下で、奇妙なことにほとんどの残基のプロテクション因子は1以下になった(Fig.1)。特にABループ(残基17~26)、

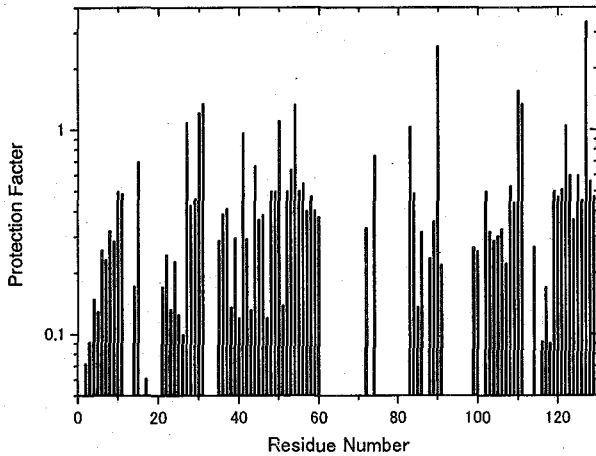


Fig.1
Protection factors of amide hydrogen exchange in the 2SS[64-80,76-94] at pH 3.0 (20mM formate buffer) and 4°C.

ヒンジ領域(残基 1~4、38~40、85~88)、D ヘリックスと C 末端 3_{10} ヘリックスの継目(残基 116~118)には、顕著にプロテクション因子の小さなものが集中していた。これらは 2 次構造の継目に相当し、タンパク質表面に露出するループ部分に位置する親水性残基に富む領域である。その部位が親水性残基のクラスターを作り、HD 交換反応がランダムコイル状態よりもかえって速くなっているということが明らかになった。このことは 0SS 変異体に対してほぼ同様の実験結果が得られており、 β ドメインに 2 本の S-S 結合が存在することによる影響はほとんど見られなかった。

HD 交換速度がアミノ酸固有の交換速度より速くなる理由として、近接する電荷の影響が考えられるので、0.1M の KCl を添加して実験を行ったが顕著な変化は見られなかった。そこで、変性剤であるグアニジン塩酸塩(GuHCl)を 4.0M まで添加して実験を行うと、2SS[64-80,76-94]変異体の場合 4.0M GuHCl 中で HD 交換速度はアミノ酸固有のデータに近い値が得られた (Fig.2)。すなわち、20mM ギ酸バッファー中で異常に速く HD 交換する NH 基は近接する電荷の影響が解消されてアミノ酸固有の値に戻ったと考えられる。つまり、非天然状態にあるポリ

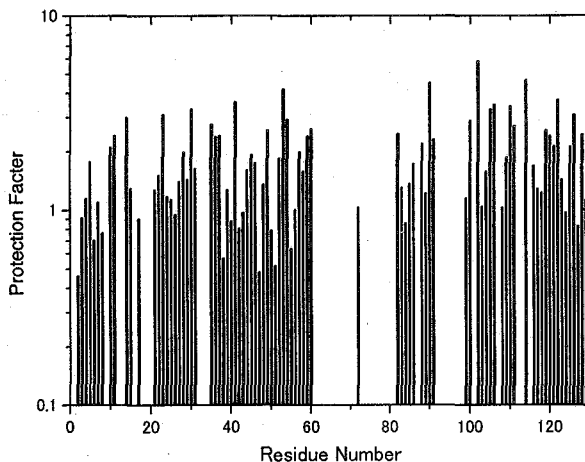


Fig.2
Protection factors of amide hydrogen exchange in the 2SS[64-80,76-94] at pH 3.0, 4°C in the presence of 4M GuHCl.

ペプチド鎖は、疎水性の残基の部分では HD 交換反応という測定値で判断するとランダムコイルに近いが、むしろ親水性の残基の部分で近傍の電荷などの影響を強く受けて異常な環境におかれているように見えることが分かった。

他方、グリセロールはタンパク質の立体構造を安定化する試薬として用いられている。2SS[64-80,76-94]変異体にグリセロールを添加させていくと 222nm 領域における CD スペクトルの構造回復が見られた。そこで、30%グリセロール共存下でのプロテクション因子を決定し、グリセロールが非天然構造にどのような影響を与えるのかを考察した。その結果、2SS[64-80,76-94]変異体における主鎖アミドのプロテクション因子を顕著に増大する部分が α と β ドメインの接合部(残基 55-60 の部分と B-, C-, 3_{10} -ヘリックスの一部で Ile55、Leu56 部分に近接する部位)であった (Fig.3)。一方 0SS 変異体においては、グリセロール添加の影響が非常に小さいことが判明した。このことは、アミノ酸配列という 1 次構造にのみに依存する現象ではなく、非天然状態にあるタンパク質においても、 β ドメインに存在する 2 本の S-S 結合が α ドメインの B-, C-ヘリックスのプロテクション因子に大きな影響を及ぼしていることを示唆している。

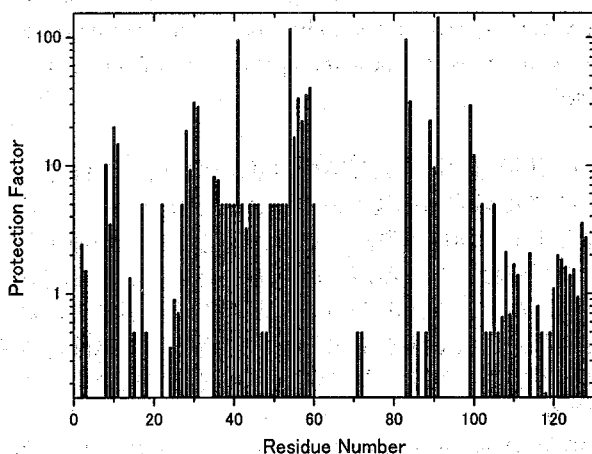


Fig.3
Protection factor of amide hydrogen exchange in the 2SS[64-80,76-94] at pH 3.0, 4 °C in the presence of 30% glycerol.

【参考文献】

- 1) Yokota, A., Hirai, K., Miyuchi, H., Iimura, S., Noda, Y., Inoue, K., Akasaka, K., Tachibana, H. and Segawa, S.
“NMR Characterization of Three-Disulfide Variants of Lysozyme, C64A/C80A, C76A/C94A, and C30A/C115A - A Marginally Stable State in Folded Proteins” *Biochemistry*, 43, (2004), 6663-6669
- 2) Noda, Y., Yokota, A., Horii, D., Tominaga, T., Tanisaka, Y., Tachibana, H., and Segawa, S.
“NMR Structural Study of Two-Disulfide Variant of hen Lysozyme : 2SS[6-127, 30-115]-A Disulfide Intermediate with a Partly Unfolded Structure” *Biochemistry*, 41, (2002) 2130-2139
- 3) 瀬川新一、横田篤、野田康夫、橘秀樹
「NMRによるリゾチームS-S結合再生中間体の構造—解析蛋白質折りたたみ機構の解明に向けて」
蛋白質核酸酵素 Vol.47 No.2 (2002) 145-151

(東北大学・工学研究科・バイオ工学専攻)

○工藤正人、大友征宇、小菅 哲、小林正幸、野澤庸則

A Novel Method for Isotopically Labeling Proteins by Utilizing Photosynthetic Bacteria
Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering,
Tohoku University

M. Kudo, S. Otomo, S. Kosuge, M. Kobayashi, T. Nozawa

We describe here a simple and efficient method of utilizing photosynthetic bacteria to produce isotopically labeled cultures for *E. coli* expression system. Photosynthetic bacteria are known to contain a large proportion of proteins (> 60%w/w in dry cells) and can be grown in media with simple combination of carbon and nitrogen sources. Hydrolysates of non-sulfur photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* cells that can grow in a medium with NH_4Cl as sole nitrogen source have been shown to be most efficient for ^{15}N labeling of proteins expressed in *E. coli*. Sulfur photosynthetic bacteria *Allochromatium vinosum* and *Chlorobium tepidum*, both can grow in media with Na_2CO_3 and NH_4Cl as the sole carbon and nitrogen sources, have been proved to be most suitable for producing ^{13}C and ^{15}N doubly labeled proteins. Examples are given to show the applicability of this method and optimal experimental conditions are discussed.

【緒言】現在NMRによるタンパク質の立体構造解析に大腸菌発現系が広く用いられている。通常、発現するタンパク質を ^{15}N と ^{13}C で標識する必要があり、さらに数ミリグラムから数十ミリグラム程度のタンパク質を必要とする。同位体標識のために、通常M9培地または市販の藻類加水分解物を主成分としたものが使われているが、前者では発現量がLB培地に比べて大幅に下がり、また後者の場合標識にかかるコストが高いなどの問題点がある。本研究では、単純な炭素源と窒素源で生育可能な光合成細菌を加水分解で処理し、大腸菌発現系の培地として利用することにより、実験室規模で目的タンパク質をより安価で標識する簡便な方法の開発を試みた結果について報告する。

【実験】本研究では、非硫黄光合成細菌 *Rhodospirillum (R.) rubrum* 及び硫黄光合成細菌 *Allochromatium (A.) vinosum* と *Chlorobium (C.) tepidum* を用いた。これらの菌体は、酢酸、リンゴ酸、 Na_2CO_3 を炭素源、 NH_4Cl を窒素源として培養が可能であり、また単位体積培地当たりの集菌量も比較的多いため、コストの低い安定同位体試薬からより多くのタンパク質試料を得ることができると考えられる。まず、これらの菌体を 6N 塩酸で 110°C、24 時間反応させ、得られた加水分解物を中和し、固形物を除去した後 M9 培地の窒素源と炭素源に置き換え、大腸菌(BL21)を培養した。大腸菌の生育度は、600nm での吸光度(O.D.₆₀₀)を測定することにより評価した。本手法の実用性を確認するために、標識目的タンパク質には本研究室ですでに立体構造を決定した *R. rubrum* 由来の光捕集膜タンパク質である LH1βポリペプチドを用いた。LH1βの構造遺伝子 *pufB* と His₆-Tag を有する発現ベクターを構築した後、大腸菌

同位体標識、光合成細菌、加水分解

くどうまさと、おおともせいう、こすげさとし、こばやしまさゆき、のぎわつねのり

BL21(DE3)pLysS 株に導入し、目的タンパク質の誘導発現を行った。

【結果と考察】 Table 1に、各種光合成細菌(10g, wet)の加水分解物で調製した培地で大腸菌を11時間培養した時のO.D.₆₀₀値、1L当たりの培地から得られる光合成細菌の量及び培養に用いた標識試薬の量を示す。これより、*A. vinosum*のコストパフォーマンスがこれらの菌体の中で最大であり、*A. vinosum*は¹³Cおよび¹⁵N二重標識に適していることが示めされた。一方、*R. rubrum*はリンゴ酸を単一炭素源にして生育することができる。この場合、1L培地当たり約10g(wet)の菌体を得られるため、収量が3種の菌体の中で最も高い。したがって、*R. rubrum*は、¹⁵Nのみでの標識に適していると考えられる。

Fig. 1に、*R. rubrum* 加水分解培地を使用した時の大腸菌増殖曲線を示す。グルコースを加えた*R. rubrum*加水分解培地では、飛躍的に成長速度が増加し、20 [(g wet)/(L medium)]の濃度でLB培地と同じレベルまで大腸菌を生育させることができた。従って、¹⁵Nのみでの標識を目的とした場合、グルコース添加の培地がより低コスト、高収率で大腸菌を標識させることができる。

Fig. 2に、実際に¹⁵Nで標識した*R. rubrum*の加水分解培地を使用して、大腸菌発現系で*R. rubrum*由来光捕集複合体1の構成タンパク質 LH1βポリペプチドを¹⁵Nで標識した時の¹H-¹⁵N 相関スペクトル(HSQC)を示す。主鎖アミドプロトンとアミド窒素との相関シグナルが良好に観測されたことから、本標識法の有効性を実証した。

【結論】数種類の光合成細菌の加水分解物を大腸菌の培地としての利用を試みた結果、¹³Cおよび¹⁵N二重標識には*A. vinosum*加水分解物培地、¹⁵Nのみでの標識には*R. rubrum*加水分解培地をそれぞれ使用することにより、低コストで大腸菌を標識させることが可能であると示された。今後、本研究で確立した手法が大腸菌発現系を用いた様々なタンパク質試料の標識に広く利用されていくことが期待できる。

Table 1 Comparison of the performance among the cultures derived from various photosynthetic bacteria.

	<i>R. rubrum</i>	<i>A. vinosum</i>	<i>C. tepidum</i>
O.D. ₆₀₀ (11h)	0.5	1.063	0.777
Cells [(g wet)/(L medium)]	2.5	1.6	1.4
NH ₄ Cl [g]	0.8	0.5	0.4
NaHCO ₃ [g]	—	1.5	1
CH ₃ COONa [g]	0.8	—	0.3

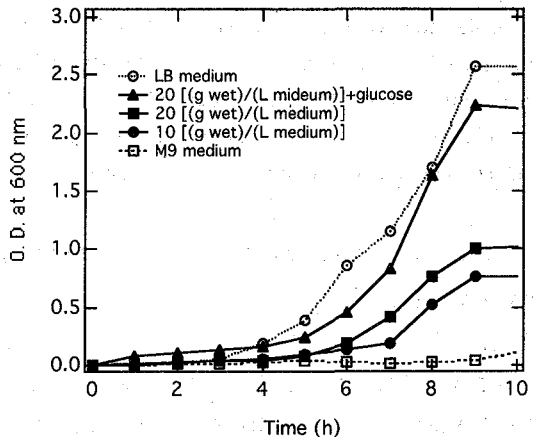


Fig. 1 Comparison of the growth rates using LB, M9 and various cultures derived from *R. rubrum*.

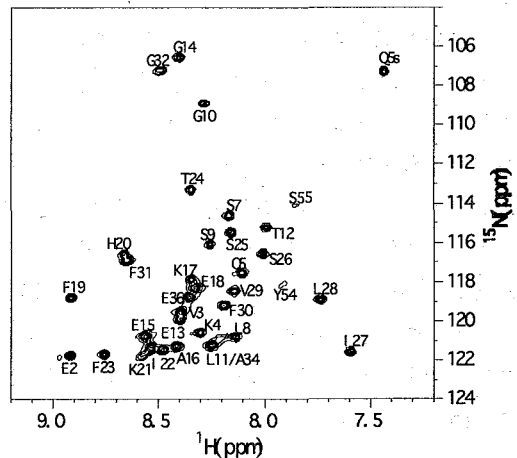


Fig. 2 ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of LH1 β polypeptide using the ¹⁵N-labeled culture derived from *R. rubrum*.

Stabilizing mechanism of a protein structure revealed by *de novo* design

Grad. Sch. of Sci. and Tech., Kobe Univ. ○Mitsugu Araki, Atsuo Tamura

We added several residues to the C terminus of an 11 residue-peptide (Target Peptide) that has helical structure, anticipating that the peptide might fully have β -hairpin structure consisting of two antiparallel β -strands (Design Peptide). As a result of analysis of NOESY and ROESY of the structure and stability, some Design Peptides were turned out to be equilibrium mixture of β -hairpin and α helix throughout the length of a molecule. Additionally, it was indicated that the α helical structure of the Design Peptides were more stable than that of the Target Peptide, showing that stabilizing one conformation does not result in destabilizing the other conformation. We thus successfully elucidated the mechanism of protein stabilization, to which the physicochemical factor contributing can be represented as nonlinear combination, using the method of evaluation of protein stability we have developed.

【序】自然界に存在するタンパク質は、主鎖2面角の自由度およびアミノ酸側鎖の多様性から独自の立体構造をとっている。ところが今までに非常に多くのタンパク質の一次配列とその立体構造が明らかにされてきたにもかかわらず、各タンパク質の立体構造がどのように安定化されているかについては未解明のままである。従ってタンパク質立体構造安定性の決定因子を解明するためには、それを困難にさせている箇所にメスを入れる実験を行わなければならないと考えた。その箇所とはタンパク質立体構造の安定化を決定する物理化学的因子（自由エネルギー）が線形結合で表せない点である。そこで本研究では非線形項である分子内の遠距離で働く相互作用エネルギーに注目し、相互作用エネルギーがどのような法則に従って決定されるのかを解明する事を目的とした。

【実験】系の単純化をはかる為取り扱うタンパク質はペプチドレベルの短いものとした。ターゲットの前段階となるペプチドとして、水溶液中（酸性条件下）で α helix構造をとっている事が報告されている、human α -lactalbumin 由来の11残基のペプチドを選択した。このペプチドに対して数箇所アミノ酸置換を行ったものをターゲットペプチドとし、C末端側に数残基追加することで、全体的に2ストランドからなる β -hairpin構造を形成するペプチドをデザインした。実際にデザインされたペプチドが目的の立体構造をとっているかについての選別は核磁気共鳴(NMR)法を用いて行い、目的に達したペプチドを得るまで“デザイン⇄立体構造の検証”を繰り返した。目的の立体構造をとっているペプチドを得た後は、ターゲットペプチドおよびデザインペプチドの立体構造、およびその安定性をNMR、CD(円二色性)スペクトルを用いて評価する事で、タンパク質立体構造の安定化を決定する因子を求めた。

Key words: デザイン, NOE, ペプチド, フォールディング

著者ふりがな: あらきみつぐ, たむらあつお

【結果と考察】 まずターゲットペプチドに対して、その2次元NMRスペクトルを元に立体構造計算した結果、得られた立体構造は 3_{10} helixであった(Figure 1)。次いでターゲットペプチドのC末端に、ある特定の7残基のアミノ酸配列を付加した結果、2ストランドからなる β -hairpin構造を持ったペプチドを得る事に成功した。これらのNOESYスペクトルにおいて、 β -hairpin構造を示すNOEが全体的に観測された事に加えて、helix構造を示すNOEも全体的に観測された事から、これらのデザインペプチドは β -hairpin構造と、helix構造の混合物である事が示唆された。そこで最もNOEの多かったデザインペプチド (DP5)について、NOESYから得られた493個の距離情報に対して、① helix構造に矛盾しない距離情報、② β -hairpin構造に矛盾しない距離情報、の2種類に分類してそれぞれ立体構造計算を行ったところ、 α helix構造(Figure 2A)と、 β -hairpin likeな構造(Figure 2B)が得られた。更にmixing timeを変化させて得られたNOESYスペクトルから、特定の立体構造に特徴的なNOEについて初期速度領域での積分強度を見積もり、各立体構造の安定性を評価した。その結果、DP5の helix構造は、ターゲットペプチドの helix構造よりも安定化されていることが分かった。これらの結果は、ある立体構造を形成しているアミノ酸配列のC末端に別のアミノ酸配列を付加する過程において、別の立体構造を安定化させる事は元の立体構造を不安定化させる事と等価でない事を示すものである。これより導かれるタンパク質立体構造安定化機構を推測した。



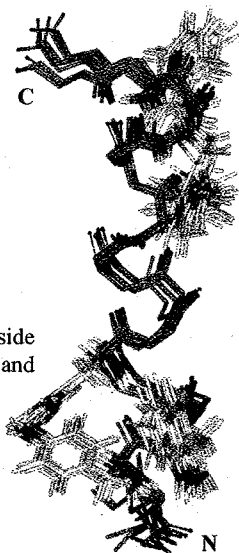
Figure 1) NMR structures of Target Peptide.
Residues drawn in white are side chains of Y3, W4, and H7.

Figure 2) NMR structures of DP5.

(A): α helix structures

(B): β -hairpin like structures

Residues drawn in white are side chains of Y3, W4, H7, Y12, H15, and W16.



A



B

Solution Structures of the Photosynthetic Light-Harvesting Membrane Polypeptides*Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering,
Tohoku University*

S. Otomo, K. Gokan, K. Sato, M. Kobayashi, T. Nozawa

We have determined the solution structures of core light-harvesting membrane polypeptides (LH1 α and β) from wild-type purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum (R.) rubrum* using multidimensional NMR spectroscopy. All backbone and most side chain NMR resonances were assigned using the ^{13}C and ^{15}N doubly labeled samples. Total of 400 and 456 NOEs were collected for the α and β polypeptides, respectively. Combining with the backbone torsion angle information and amide hydrogen-bonding restraints, ten lowest-energy structures were calculated and refined for each of the polypeptide. In contrast to a bent structure previously reported for the LH1 β polypeptide of *Rhodobacter sphaeroides*, both the α and β polypeptides of *R. rubrum* exhibit a long α helical structure in the transmembrane domain. The overall structural features of these polypeptides are very similar to those of the corresponding LH2 α and β polypeptides determined by X-ray crystallography.

【緒言】緑色植物を含む光生物は太陽の光エネルギーを効率的に集めるため、多数の光合成色素(クロロフィル)と膜タンパク質からなる光捕集アンテナという精巧な分子集合体を用いている。光合成細菌のアンテナ器官である光捕集複合体(LH)は、光エネルギーを吸収し、光合成反応中心(RC)へと伝達する役割を担う色素-膜タンパク質複合体である。光捕集機能は色素とタンパク質が互いに巧妙な配置をとるにより発現され、その詳細な構造の解明は光合成明反応の機構解明および工学的応用を考える上で非常に重要な意義を持つ。近年、数種の光合成細菌において周辺光捕集複合体 LH2 の X 線結晶解析がなされ、三次元構造が明らかになった。これに対し、RC のすぐ周囲に存在するコア光捕集複合体 LH1 は RC との強い相互作用や構成する膜タンパク質の疎水の性質のため、単離・精製および三次元結晶化が難しく、構造解析が大きく遅れている。これまでに LH1-RC 複合体の二次元結晶解析から、LH1 は 2 種類の膜貫通型タンパク質(α,β)およびバクテリオクロロフィル *a* (BChl*a*) の二量体から構成される複数のサブユニットがリング状の会合体を形成していると推定されているが、いまだ原子レベルの構造解明には至っていない。本研究では、多次元溶液 NMR を用いて、混合有機溶媒中における紅色光合成細菌 *Rhodospirillum (R.) rubrum* 由来の光捕集膜タンパク質 LH1 α と β (約 6.5kDa) の立体構造解析を行い、配列特異的シグナルの帰属結果及び膜貫通ドメインと色素配位部位の構造的特徴を報告する。

【NMR測定と構造決定】*R. rubrum* の光合成膜から界面活性剤処理により LH1 を可溶化し、DEAE 陰イオン交換カラムを用いて精製を行った。色素を除去した LH1 から逆相 HPLC を

膜タンパク質、光合成、溶液NMR、色素配位

おおもせいう、ごかんかずたか、さとうかずし、こばやしまさゆき、のざわつねのり

用いて α , β タンパク質を分離し、それぞれクロロホルム/メタノール(1:1,v/v)混合溶液に溶解させ、各種 NMR 測定のためのサンプルとした。測定はまず、 ^{13}C , ^{15}N で均一に標識した試料を用いて三重共鳴法(3D HNCA, CBCANH, HBHANH 等)を行い、配列特異的にアミノ酸主鎖のシグナルを帰属した。側鎖のシグナルは 3D ^{15}N TOCSY-HSQC スペクトル等から帰属した。続いて、メタノール- d_4 中において 2D ^1H - ^{15}N 相関(HSQC)を測定し、溶媒の重水素との交換速度から各残基のアミドプロトンの水素結合を同定した。次に 3D HNHA スペクトルの測定から、ペプチド結合の二面角 ϕ に依存したスピン結合定数 $^3J_{\text{HN}\alpha}$ を算出した。さらに、3D ^{15}N NOESY-HSQC スペクトルの測定から、各残基のアミドプロトンと空間的に近接したプロトンとの間の NOE を観測し、水素原子間距離を見積もった。以上の測定より得られた水素原子間距離制限、二面角制限、水素結合間距離制限を基に、タンパク質立体構造計算プログラム CNS によるディスタンス・ジオメトリー計算を行った。

【結果と考察】多次元 NMR の解析から、 α と β 膜タンパク質のすべてのシグナルが帰属できた。3D HNHA スペクトルから各残基の $^3J_{\text{HN}\alpha}$ を算出したところ、両膜タンパク質とも α ヘリックス構造に特徴的な 4 Hz 前後の値を示す部分が見られた。メタノール- d_4 中における ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルでは、 α , β タンパク質共に多くのアミドプロトンのシグナルが測定開始から 10 日間経過後も保持されていたことから、有機溶媒中において *R. rubrum* 由来 LH1 α , β タンパク質の大部分が長時間にわたって安定な二次構造を保持していることが示唆された。また、NOESY-HSQC スペクトルの解析から、 α では 400 個、 β では 456 個の NOE がそれぞれ観測された。構造計算プログラム CNS を用いて、それぞれ 300 個の構造計算を行い、Total エネルギーの低い上位 10 個の構造を選び最終構造とした。Fig. 1 に示すように、両タンパク質とも膜貫通領域に対応する部分は高度に保存されたシングルヘリックス構造を示すことが明らかとなった。 α タンパク質において色素 BChl *a* 分子に配位結合している His29 がヘリックスのほぼ中央に位置しているのに対し、 β では His38 はヘリックス領域の C 末端付近に存在していることがわかった。一方、紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas acidophila* 由来 LH2 β タンパク質は結晶構造から色素に配位結合している His(H35) がヘリックスの C 末端付近に存在することが明らかとなっている。本研究より得られた構造から、*R. rubrum* 由来 LH1 β タンパク質はヘリックス領域の長さが LH2 の結晶構造とほぼ同程度であることがわ

かった。LH2 結晶構造では、 β タンパク質の H35 から C 末端側 9 残基目に位置する Trp(W44) のインドール基と BChl *a* の C3 カルボニル基との間で水素結合を形成していることが知られている。NMR による立体構造解析から LH1 β タンパク質の H38 とそれより C 末端側 9 残基目に位置する Trp(W47) が互いに近接していることから、BChl *a* との複合体形成時には *R. rubrum* LH1 β タンパク質でも同様に W47 のインドール基と BChl *a* の C3 カルボニル基との間で水素結合を形成すると予想される。さらに、LH1 α タンパク質の N 末端には短いヘリックスセグメントとそれに続く短いループ領域が存在していることが見出された。この helix-loop-helix モチーフは LH2 α タンパク質にも見られ、 β タンパク質の N 末端領域と相互作用している重要な部位であると考えられる。以上のことから、*R. rubrum* 由来 LH1 タンパク質と *Rhodospseudomonas acidophila* 由来 LH2 タンパク質は全体のコンフォメーションから色素結合部位周辺までの構造が非常に類似していることがわかった。

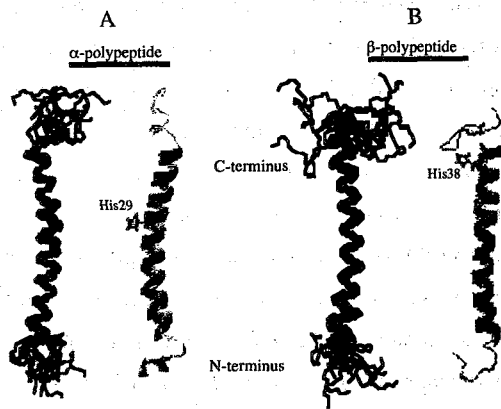


Fig. 1 Solution structures of the LH1 α -polypeptide (A) and β -polypeptide (B).

(¹横浜市大院・総合理学、²理研・構造機能研究 G、³理研・遺伝生化学、⁴CREST/JST、⁵理研播磨・ストラクチュローム研究 G)

○井上 仁^{1,2,3}、本多 賢吉^{1,3,4}、伊藤 隆^{1,2,3,4}、美川 務^{1,2,3,4,5}、
柴田 武彦^{1,2,3}

NMR structural and functional analyses of *Thermus thermophilus* RecO

Jin Inoue^{1,2,3}, Masayoshi Honda^{1,3,4}, Yutaka Ito^{1,2,3,4}, Tsutomu Mikawa^{1,2,3,4,5},
and Takehiko Shibata^{1,2,3}

(¹Grad. Sch. of Integrated Sci., Yokohama City Univ., ²Bio-supermol. Struct. Func. Group, RIKEN, ³Cellular and Molecular Biol. Lab. RIKEN, ⁴CREST/JST, ⁵Structurome Res. Group, RIKEN/Harima Institute)

RecF pathway is one of the eubacterial recombinational DNA repair pathways, and responsible for DNA gap repair and restart of the stalled replication fork. In particular, RecO forms complex with RecR, and assists the loading of RecA onto single-stranded (ss) DNA binding protein (SSB) coated ssDNA. Direct association of RecO and SSB has also been reported.

In order to delineate the structural basis of the biological functions of RecO, we initiated the NMR studies of *Thermus thermophilus* (tt) HB8 RecO (229 a. a, 24.7 kDa). Backbone ¹H^N, ¹³C^α, ¹³C', ¹⁵N and side chain ¹³C^β resonances were assigned for 163 out of 212 (77%) non-proline residues in RecO. The incompleteness in the assignments was presumably caused by line broadening of ¹H-¹⁵N HSQC correlation cross peaks for the residues localized in the N-terminal region. Chemical Shift Index-based secondary structure prediction showed that the N-terminal region consists of β-strands or extended structures, whereas C-terminal region is constructed by all α-helices.

[序]

RecO 蛋白質は、真正細菌の DNA 相同組換えを利用した組換え修復経路 (RecFOR 経路) において、DNA 損傷により生じた DNA ギャップの一本鎖 DNA (ssDNA) 部分に結合した ssDNA 結合蛋白質 (SSB) を DNA 上から除去する働きを持つと考えられている。また同じ組換え修復経路に関与する RecR と複合体を形成し、最終的に相同組換え反応を行う RecA 蛋白質の活性補助にも関与している。生化学的解析によって、RecO は ssDNA および二本鎖 DNA (dsDNA) と結合し、これらの対合反応を触媒すること

キーワード： 高度好熱菌, DNA 相同組換え

著者ふりがな： いのうえ じん, ほんだ まさよし, いとう ゆたか, みかわ つとむ,
しばた たけひこ

が報告されている。RecO の複雑な機能について詳細に解明するには、生化学的手法に加え、構造生物学的的手法による解析を行う必要がある。そこで我々は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* (tt) HB8 由来の RecO 蛋白質 (ttRecO, 229 残基, 24.7 kDa) を研究対象とし、NMR 解析を開始した。

今回は ttRecO の主鎖の帰属と、Chemical Shift Index 法を用いた二次構造解析を行ったのでその結果について報告する。

[結果・考察]

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 2 重標識の ttRecO 試料を調製し、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ、プロリンを除く 212 アミノ酸残基のうちおよそ 160 残基に相当するクロスピークが観測された。次に異種核多次元 NMR 法を用いて主鎖 NMR シグナルの帰属を行ったところ、163 残基について主鎖の $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}^{\beta}$, 側鎖の $^{13}\text{C}^{\beta}$ の帰属を行うことができた。得られた化学シフトの値から、Chemical Shift Index 法を用いて二次構造解析を行った結果、ttRecO は N 末端からおよそ 90 残基までは β -strand もしくはエクステンドした領域であり、それ以降はほとんどが α -helix で構成されていることがわかった。HSQC ピークが観測されなかった残基は、ほとんど N 末端領域に分布していた。

プロテアーゼによる限定分解の結果から、ttRecO の C 末端領域は安定なドメインを形成しており、N 末端側は切断されやすいループなどが多いことが示唆されている。このことから、HSQC ピークが観測されなかった残基は二次構造の間のループ部などに存在しており、その部分では構造多型が存在するなどの理由から化学交換による HSQC ピークの著しいブロードニングが起こっている可能性が考えられる。

現在、安定な C 末端ドメインの発現系の構築し、精製を行っている。この試料を用いて NMR による立体構造解析を試みる。また今回得られた帰属を用い、現在 ssDNA/dsDNA, RecR, SSB との NMR タイトレーション実験を進めており、RecO 上のこれらの分子との相互作用部位の特定を目指している。これらの結果と、生化学実験の結果を合わせ、RecO による SSB の除去機構、また RecO 自身が持つ ssDNA/dsDNA 対合反応機構などを解明していきたい。

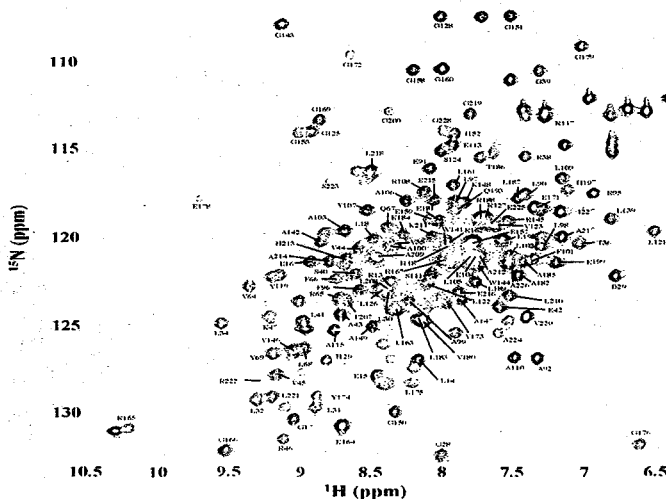


Figure: The ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled *Thermus thermophilus* HB8 RecO. Cross peaks are annotated according to the backbone resonance assignments.

スperlミジン-ATP 複合体の NMR 解析
 -弱い分子間相互作用解明への新しい試み-

(阪大院理) ○丸吉 京介、野中 香織、相根 岳志、出村 哲夫、松森 信明、
 大石 徹、村田 道雄

**Bimolecular Interaction between Major Cellular Constituents:
 Conformation of Spermidine upon Complexation with ATP**

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University

○Keisuke Maruyoshi, Kaori Nonaka, Takeshi Sagane, Tetsuo Demura, Nobuaki Matsumori,
 Tohru Oishi and Michio Murata

Spermidine is known to form a complex with ATP in the physiological conditions, which should play a role in ATP-related cellular events. Its conformation analysis based on spin-spin coupling is, however, hampered by its acyclic structure, in which the absence of asymmetric center causes unresolved ^1H NMR methylene signals. This problem was solved by the diastereospecific labeling of each one of two geminal proton pairs with deuterium, leading to some new findings in the pH-dependent conformation change of the spermidine-ATP complex.

【序】

分子内に複数のアミノ基を有するポリアミンは、多種多様な生物に広く分布し、核酸やタンパク質などの酸性高分子と相互作用することによって細胞増殖をはじめ多岐にわたる生理活性を担っている¹⁾。しかし、ポリアミンはこのような生理的重要性が認識されているにもかかわらず、その相互作用が弱い (Table 1) ために、生体内における存在形態や生理活性発現機構に関する研究は大きく遅れている。そこで我々は、NMR を用いた弱い相互作用の構造解析法を確立することに加えて、ポリアミンの生理作用を分子レベルで理解するために、生体内においても存在が予想されるスperlミジン (SPD)-ATP 複合体 (Fig. 1) に着目し、SPD の立体配座解析を行なった。

前回の発表より、SPD は ATP と相互作用するために、ゴーシュ配座を増やすことでその構造を屈曲させていることが一部の C-C 回転配座について分かっていた。そこで、今回は SPD の未解析の C-C および C-N 結合における配座分布を求めることで、複合体形成時における SPD の全体像の解明を試みた。

Table 1. Dissociation constant of spermidine with various anions (*for each phosphate ester of DNA or RNA)¹⁾

Anion	K_d (mM)
DNA*	15.63
RNA*	2.66
Phospholipid	5.56
ATP	2.24

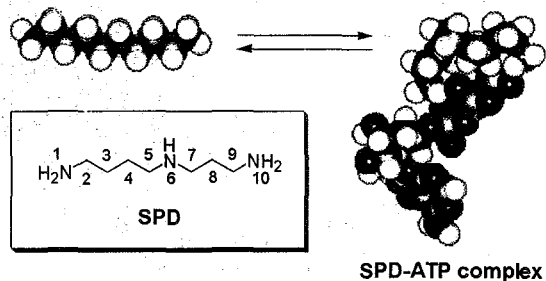


Figure 1. A hypothetical picture for spermidine-ATP complex.

Keywords: スperlミジン、ATP、弱い相互作用、スピン結合定数、立体配座解析

まるよしいけいすけ、のなかかおり、さがねたけし、でむらてつお、まつもりのぶあき、おおいしとおる、むらたまちお

【結果と考察】

前回の報告^{2,3)}では、C2-C3、C4-C5、C7-C8、C8-C9 結合に関して立体配座解析を行なった。SPD 三塩酸塩と SPD-ATP 複合体の二つのサンプルを比較すると、いずれの結合においても ATP を添加することで³J_{HH}は減少し、さらに SPD-ATP 水溶液を酸性から中性(pH 7.3)へと変化させると³J_{HH}はさらに小さくなった。その傾向として、プロパニレン側(C7-C9)よりもブタニレン側(C2-C5)の方が、また分子中央よりも分子末端が屈曲しやすいことが分かっている。

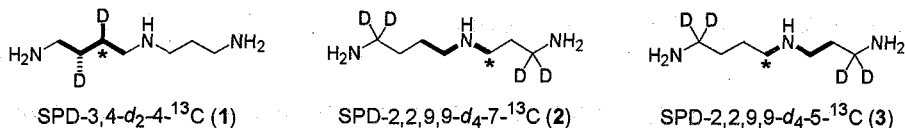


Figure 2. Labeled spermidines.

今回は未解析の部分について、同位体標識体 SPD1、2、3 (Fig.2) を調製し、得られたスピン結合定数から配座分布を見積もることで SPD が ATP と複合体を形成した時の立体配座変化を評価した。1、2 の¹H NMR スペクトルを Fig.3、4 に示す。1 に関しては、ATP の添加によりスピン結合定数はわずかに減少したものの他の C-C 結合でみられたような顕著なものではなかった。また、C-N 結合の回転配座解析用の 2 に関しては、ATP の添加による³J_{CH}の減少は見られず、また pH を中性にまで上げて³J_{CH}に変化はなかった。3 についても同様の結果が得られた。これらの結果は、C3-C4、C5-N6、N6-C7 結合において SPD が ATP と複合体を形成しても、その回転配座分布の変化はごくわずかであることを示している。さらに、アンチ形とゴーシュ形の割合を見積もったところ、SPD 三塩酸塩に関して、他の結合の配座分布(アンチ 80%、ゴーシュ 20%)に比べて、分子中央 C-N 結合の配座ではゴーシュ形が多く、その割合は *n*-ブタン(アンチ 70%、ゴーシュ 30%)に類似していた。他の結合では、アンモニウム基同士の静電反発により伸張形配座を取る方がエネルギー的に有利であるためにアンチ配座が優位に存在するが、分子中央 C-N 結合では配座にかかわらずアンモニウム基間(N₁とN₆もしくはN₆とN₁₀)の距離には影響がないので、*n*-ブタンに近い配座分布を取ると考えられる。今回得られた結果及び以前の結果より、スペルミジンのような弱い相互作用を有する分子の時間的平均像をある程度解明することができた。

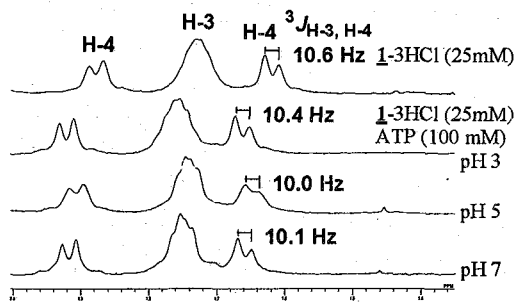


Figure 3. ¹H NMR signals for H-4 of **1** upon complexation with ATP in various pH (H-5 decouple)

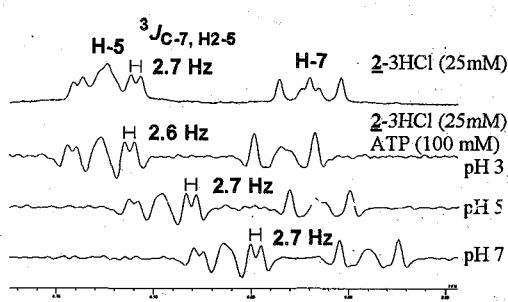


Figure 4. ¹H NMR signals for H-5 of **2** upon complexation with ATP in various pH (Window function: SinBell2)

【参考文献】

- 1) Watanabe, S.; Kusama-Eguchi, K.; Kobayashi, H.; Igarashi, K. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20803-20809.
- 2) Maruyoshi, K.; Demura, T.; Sagane, T.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5163-5170.
- 3) 第 42 回 NMR 討論会講演要旨集, P.140-141, 2003

3P015

フジツボ接着タンパク質 Mrcp20k の構造解析

¹農業生物資源研究所、²海洋バイオテクノロジー研究所

○鈴木倫太郎¹、森陽一²、紙野圭²、山崎俊正¹

Solution Structure Determination of Barnacle Cement Protein, Mrcp20k

¹National Institute of Agrobiological Sciences, ²Marine Biotechnology Institute.
Rintaro Suzuki¹, Youichi Mori², Kei Kamino², Toshimasa Yamazaki¹

Barnacles secrete a family of proteins for their permanent attachment to rocks and other surfaces. Mrcp20k is one of such proteins produced by *Megabalanus rosa*. Mrcp20k is highly hydrophilic and cysteine-rich protein. The alignments of the cysteine residues indicate six degenerated repeats in the primary structure of this protein and each repeat contains 6 or 4 cysteine residues. Mrcp20k is a soluble protein and aggregates by increasing concentration of NaCl. The molecular structures and functions of proteins involved in attachment in the water have been unknown. We are investigating the solution structure of Mrcp20k to reveal its role in attachment. From the chemical shift and NOE analyses, the 6 repeats were shown to be structural units of Mrcp20k.

[はじめに]

フジツボ幼生は浮遊性、底生性の期間を経て付着生活に入る。底生性のキプリス幼生は着底場所を探る探索行動を繰り返し、場所を決定すると付着器官の先から接着物質を分泌し体を固定する。付着した幼生は変態を繰り返し、成体となる。成体となっても接着物質は分泌され続ける。着底は幼生が変態し、成体になるための重要なステップである。着底時およびその後の成長を通じてフジツボは基盤に固着するために一群のタンパク質を分泌することが知られており、直接接着に関ると考えられるタンパク質もこれまでに数種明らかになっているが、それぞれの機能および性質の詳細は明らかになっていない。我々はフジツボの接着タンパク質の機能、特に接着機構を明らかにするために、接着部位に存在することが知られているタンパク質のうちアカフジツボ(*Megabalanus rosa*)由来の Mrcp20k [1]の NMR による立体構造解析を行っている。Mrcp20k はシステインに富み、またアスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジンなどの親水性残基が多く、疎水性残基が非常に少ないタンパク質である。アミノ酸配列には6回の繰り返し構造が認められ、一つの繰り返し単位に6ないし4個のシステイン残基を含む。また Mrcp20k は NaCl 濃度依存的に不可逆的な凝集を起こ

キーワード：フジツボ、水中接着タンパク質、立体構造

著者ふりがな：すずきりんたろう、もりよういち、かみのけい、やまざきとしまさ

すことが知られている。海洋には海底や岩に付着して生活する生物が多種存在するが、それらの着底の分子機構は全く未知であり、水中接着に関わるタンパク質の立体構造も知られていない。Mrcep20kをはじめ接着タンパク質として考えられているタンパク質の多くはそれらと相同なタンパク質をデータベース中から見出すことができないため、タンパク質レベルの解析が必要である。

[方法]

大腸菌で大量発現させたりコンビナント Mrcep20k (rMrcep20k)とフジツボから採集した Mrcep20k の CD スペクトルは一致しており、また逆相クロマトグラフィーにおける溶出時間も一致したことから、rMrcep20k は Mrcep20k と同じ構造をとっていることが確認できた。そこで ^{15}N -Mrcep20k および $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Mrcep20k を作成し、主鎖および側鎖の帰属のための NMR スペクトルを測定した。

[結果]

rMrcep20k は 186 残基からなるタンパク質であり、プロリン残基が 11 残基含まれている。プロリン残基および N 末端の 1 残基を除いた 174 残基のうち、これまでに 153 残基の主鎖の化学シフトを帰属することができた。帰属できていない 21 残基の NMR シグナルは検出できなかった。本タンパク質の 1D NMR スペクトルには ^1H の 50-80 ppm の領域にシグナルが認められ、常磁性の金属原子が結合している可能性が高い。検出できない残基のシグナルは常磁性シフトあるいは広幅化のために観測できないものと考えている。

Mrcep20k の ^{15}N -HSQC スペクトルにはアルギニン残基の $\text{H}^{\epsilon}\text{-N}^{\epsilon}$ およびヒスチジン残基の $\text{H}^{\epsilon 2}\text{-N}^{\epsilon 2}$ 由来のシグナルが認められ、これらの水素原子が水素結合によって水分子との交換から保護されていることが明らかになった。また、Mrcep20k には 32 個のシステイン残基があり、ジスルフィド結合の組み合わせは未だ不明である。DTT 存在下では ^{15}N -HSQC スペクトルがランダムコイルの特徴を示したため、立体構造形成にジスルフィド結合が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

帰属した C^{α} 、 C^{β} 、CO の化学シフト値を用いて CSI による二次構造予測を行ったところ、R157-E159 および V162-S164 の領域に β スtrand が予測されたものの、他には二次構造を予測できなかった。これは、Mrcep20k に多く含まれているシステイン残基の C^{α} 、 C^{β} の化学シフト値に対するジスルフィド結合の形成の効果が大きく、予測の障害になったものと考えられる。これらの原子の化学シフト値には 6 回の繰り返し配列に対応する規則的な繰り返し認められ、繰り返し配列中の対応するシステイン残基周辺の局所的な環境が互いに似ていることが示された。また、アミドプロトンの交換から保護された残基の位置も繰り返し配列に対応する規則性を示した。さらに NOE の解析から個々の繰り返し配列の前半が α ヘリックス、後半が β ヘアピン構造をとることが示唆されている。以上のことから Mrcep20k の繰り返し配列は立体構造上も互いに類似しており、本タンパク質の構造単位となっていると考えられる。

[1] Kamino, K. (2001) *Biochem. J.* **356**, 503-507.

1P016★ NMRを用いた RecR と DNA 間の相互作用解析

(¹理研・遺伝生化学, ²理研・生体超分子構造・機能研究 G,
³横浜市大院・総合理, ⁴CREST/JST, ⁵理研播磨ストラクチュローム研究
グループ)
○本多 賢吉^{1,3,4}, 吉益雅俊^{1,4}, 井上 仁^{2,3}, 美川 務^{1,2,4,5}, 伊藤 隆
^{1,2,4}, 柴田 武彦^{1,2,3}

NMR studies of the interaction of RecR with DNA molecules

Masayoshi Honda^{1,3,4}, Yoshimasu Masatoshi^{1,4}, Jin Inoue^{2,3}, Tsutomu Mikawa^{1,2,4,5},
Yutaka Ito^{1,2,4}, and Takehiko Shibata^{1,2,3}

¹Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN; ²Research Group for Bio-supramolecule Structure-Function, RIKEN; ³Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University; ⁴CREST/JST; ⁵Structurome Research Group, RIKEN/Harima Institute

RecR, a highly conserved protein in eubacteria, is reported to be involved in the junction DNA recognition process within the RecFOR recombinational repair pathway. We have initiated NMR studies of *Thermus thermophilus* HB8 RecR (ttRecR) in order to delineate the structural bases of the biological functions of RecR. We previously reported the nearly complete backbone NMR assignments of RecR symmetric homodimer obtained by analysis of six TROSY-based 3D NMR spectra.

In this presentation, we report NMR titration studies of ttRecR with various DNA molecules. Chemical shift perturbation data were analysed by mapping onto the recently determined crystal structure of *Deinococcus radiodurans* RecR. Significant chemical shift changes were observed for the residues in the hairpin region (residue 16-21) of helix-hairpin-helix motif during the titration with both ssDNA and dsDNA, suggesting this region as the prime DNA binding site. In addition, ssDNA caused small chemical shift perturbation around the Toprim domain. No specific chemical shift changes was observed when titrated with DNA molecules containing ssDNA/dsDNA junctions, suggesting that ttRecR may not be able to recognize junction DNA on its own. The dimerization interface of ttRecR was also analysed by NMR.

【序】

RecR 蛋白質は真性細菌の DNA 組換え修復において、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA のジャンクション領域の認識に関わっていると考えられている。今年になって、放射線耐性菌 *Deinococcus radiodurans* 由来の RecR (drRecR) の結晶構造が報告された(参考文献1)が、RecR 上の DNA 相互作用部位や、DNA 認識のメカニズムについては、ほとんど明らかになっていない。

我々はこれまで、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の RecR (ttRecR) について NMR を用いた解析を行ってきており、既に主鎖 NMR シグナルの帰属を完了している(前回の本討論会にて発表、参考文献2)。そこで、この帰属を基に、RecR の DNA 認識における分子基盤を明らかにするために、一本鎖 DNA、二本鎖 DNA、またジャンクションを含む DNA を用いて NMR タイトレーション実験を行った。また、drRecR は結晶構造中において N 端・C 端同士でそれぞれ隣の RecR 分子と配位した四量体を形成していたが、ttRecR (や、大腸菌および枯草菌 RecR) は水溶液中で二量体である。そこで ttRecR 二量体の相互作用面を同定するため、H/D 交換実験、および 3D ¹⁵N-separated NOESY スペクトルにおける交換クロスピークの解析から考察を行ったのでこれを報告する。

【結果・考察】

キーワード: H/D 交換, 相互作用, 相同組換え, DNA

著者ふりがな: ほんだ まさよし, よしまた まさとし, いのうえ じん, みかわ つとむ, いたう ゆたか, しばた たけひこ

$^2\text{H}/^{15}\text{N}$ 標識 ttRecR 試料と各種 DNA 基質との NMR タイトレーション実験

はじめに、二本鎖 DNA (5'CCGGTGATAGACTTG / 3'GGCCACTATCTGAAC) を基質として $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ 標識 RecR 試料溶液に加え $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY-HSQC 測定を行った。その結果、主として R16, L17, G19, I20, G21 残基由来の HSQC ピークに顕著な化学シフト変化が観測された(図1A)。この領域は RecR の N 端に存在する Helix-hairpin-helix モチーフのヘアピン部位にあたる。また化学シフトが一定量以上、変化した残基を drRecR 構造上に表示した結果、drRecR ダイマーのくぼみに沿って配位していることがわかった(図1B)。このことから、RecR は二本鎖 DNA を抱え込むように結合する可能性が示唆された。

次に一本鎖 DNA (3'GGCCACTATCTGAAC) を基質として同様の実験を行った結果、上述した Helix-hairpin-helix 領域以外にも、Toprimドメイン内の T92, L94, F100, T104, V145 残基由来の HSQC ピークに (10Hz 前後の) 小さな化学シフト変化が観察された。Toprimドメインとは、primase と topoisomerase に共通して見つかったドメインであり、DNA 鎖の切断や再結合; RNA プライマーの付加反応等の活性を持つことが知られている。しかし RecR 内の Toprimドメインについては、機能がまったくわかっていない。今回、この Toprimドメインが一本鎖 DNA と相互作用する可能性が示された。また、primase や topoisomerase における Toprimドメインは Mg^{2+} を補助因子として DNA と結合しその活性を発揮することが報告されていることから、現在 Mg^{2+} 存在下で同様の実験と解析を行っている。

さらにジャンクション DNA を基質として同様の実験を行った。その結果、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の影響を平均したような化学シフト変化が観察された。しかしジャンクション DNA 特異的に化学シフトが変化する残基は観測されなかったことから、RecR 単体ではジャンクション DNA を認識する可能性は低いことが示された。

ttRecR の二量体相互作用面の同定

$^2\text{H}/^{15}\text{N}$ -RecR を用いて H/D 交換実験を行ったところ、結晶構造中で相互作用面となっている N 末端の helix-hairpin-helix 領域に、表面に露出しているにも関わらず重水に交換されていないアミドプロトンが存在した。一方、同じく結晶構造中で相互作用面となっている C 端領域のアミドプロトンは全て重水に交換されて観測されなかった。よって ttRecR は N 端の helix-hairpin-helix 領域において二量体相互作用面を形成している可能性が高い。また、3D ^{15}N -separated NOESY スペクトルを測定し、RecR の各残基に対して水とアミドプロトンの交換ピークをその強度に応じて drRecR 構造上に表示した。その結果、N 端の helix-hairpin-helix 部位に表面にありながら水のアクセシビリティが低い領域が多く、H/D 交換実験の結果を裏付ける内容となった。現在、ユニフォーム標識された $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ -RecR を調製し、これと非標識 RecR によるダイマーを用いて CrossSaturation 実験を行うことによる相互作用面の同定を試みている。

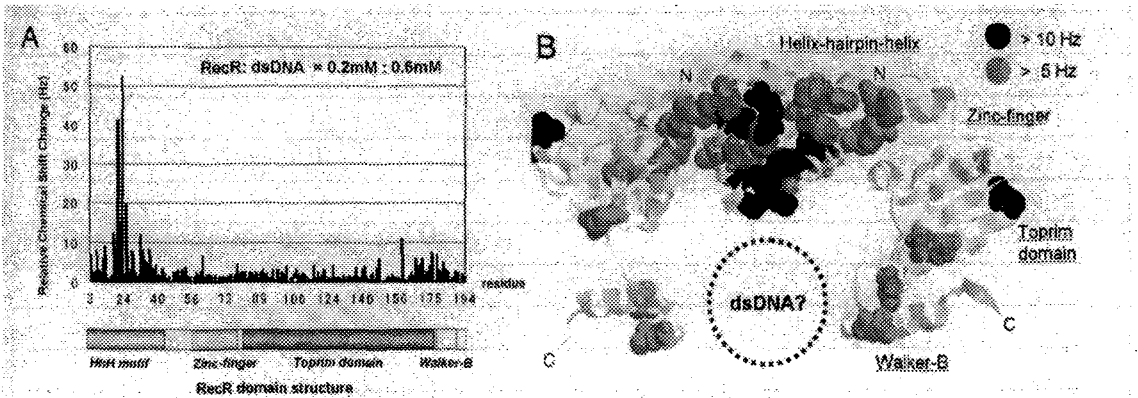


Fig.1. Chemical Shift mapping on the dsDNA binding sites of RecR. A, graph of the chemical shift changes/residue for ttRecR. B Ribbon diagram of ttRecR dimer with residue coloured and spacefilled to show the DNA binding sites.

【参考文献】

1. Lee BI, Kim KH, Park SJ, Eom SH, Song HK, Suh SW., *EMBO. J.* **23**, 2029-38 (2004)
2. Honda M, Rajesh S, Nietlisbach, D, Mikawa T, Shibata T., & Ito Y., *J. Biomol. NMR* **28**, 199-200 (2004)

2P017

ペプチド結合の歪みを引き起こす水和水と ^{15}N ケミカルシフトの相関

(¹産総研・生物情報センター、²原研・中性子利用センター、

³東理大院・基礎工、⁴理研、播磨)

○千葉かおり ^{1,2}、堤遊 ^{1,3}、油谷克英 ⁴、中西洋志 ^{1,3}

**Relationship between hydration water leading to a peptide bond twist and
 ^{15}N chemical shift**

(¹AIIST・BIRC, ²JAERI・Neutron Science Research, ³Tokyo University of Science,
⁴RIKEN Harima)

○Kaori Chiba^{1,2}, Yu Tsutsumi^{1,3}, Katsuhide Yutani⁴, Hiroshi Nakanishi^{1,3}

【Abstract】

Peptide bond planarity is utilized for protein structure refinements in NMR spectroscopy and X-ray crystallography. Recently, neutron crystallography of human lysozyme has suggested existence of a potential proton around the carbonyl oxygen of Glu35 known to be an important residue for the enzyme activity. X-ray crystallography indicated that the peptide bond linking Glu35 and Ser36 twists more than 10° . In order to examine the relationship between the potential proton and the twist in the peptide bond, we checked the ^{15}N chemical shift of amide nitrogens in the peptide bonds. As a result, we have found an obvious high field shift of the amide nitrogen of Ser36. Similar relationship was also proposed for the hydrogen assigned in hydration waters.

【要旨】

多くの NMR や X 線を用いたタンパク質の立体構造解析において、ペプチド結合の平面性は構造最適化の過程で最も基本的な restrain の一つとして利用されている。中性子結晶構造解析は、NMR 同様室温で蛋白質分子中の水素を観測できる手法であるが、最近行われたヒトリゾチームの中性子結晶構造解析によると、ヒトリゾチームの活性に重要なアミノ酸の一つである Glu35 の主鎖カルボニル酸素付近に、これまで蛋白質の構造中に予測されたことのない水素の局在が示唆された。さらに X 線結晶構造解析データとの比較から、この水素によって蛋白質分子の中のペプチド結合が局所的に歪んでいる可能性が示唆された。ペプチド結合の平面性は、主鎖カルボニルの π 電子と、これと隣り合うアミド窒素の孤立電子対の共鳴によって形成されている。我々

キーワード : ^{15}N ケミカルシフト、ペプチド結合、ヒトリゾチーム、中性子結晶構造解析、

水和水

著者ふりがな : ちばかおり、つつみゆう、ゆたにかつひで、なかにしひろし

は、カルボニル酸素付近に水素が局在した場合、これがペプチド結合で繋がっている、隣の残基のアミド窒素のケミカルシフトに与えるであろう影響について検討した。その結果、中性子結晶構造解析の実験条件に近い pH で観測された主鎖アミド窒素のケミカルシフトデータの中で、Glu35 の隣りの Ser36 の窒素のケミカルシフト値が顕著に高磁場に観測されることがわかった。一方この付加的な水素が中性子結晶構造解析で水と水分子中にアサインされた場合にも、対応するペプチド結合が 15° 以上回転している部位があった。このペプチド結合中に含まれるアミド窒素でも、ケミカルシフトが高磁場方向に観測される傾向があることがわかった。これらの結果は、Glu35 と Ser36 を結ぶペプチド結合では、(1)Glu35 付近の低い静電ポテンシャルによって Glu35 の主鎖カルボニル酸素付近に溶媒の水由来のプロトンが存在しやすくなり、(2)これがカルボニル酸素を介してペプチド結合の共鳴構造を崩し、(3)このペプチド結合の平面構造の束縛が局所的に緩み、(4)ペプチド結合が歪む、という仮説(文献 1)を支持すると思われた。

ペプチド結合の平面性は、低分子有機化合物の結晶構造解析と、その化合物の量子化学的な考察をもとにポーリングらによって提唱され、現在も蛋白質の基本骨格構造として広く認知されている。しかし高分解能結晶構造解析が行われるようになった近年、低分子化合物と蛋白質各々の構造データベースである CSD と PDB に登録された有機化合物及び蛋白質の高分解能 X 線結晶構造解析データから、ペプチド結合が必ずしも平面構造をとっている訳ではないことが示唆されている(文献 2)。本発表では、中性子結晶構造解析による水素の分布及び高分解能 X 線結晶構造解析による原子位置の情報と、NMR による個々の化学結合の情報を総合することによって、蛋白質の骨格構造であるペプチド結合が、個々のペプチド結合周りの環境によって影響を受け、結果としてペプチド結合の平面性が局所的に弱められるという新たなモデルを提案し、ここに水と水由来の水素が強く関係しうる可能性を示す。尚、ペプチド結合が、それを取り囲む環境によってどのように変化するかをモデル化合物であるラクタム類を用いて詳細に調べ、1P073 (ペプチド結合を有する分子の溶液中での動的挙動と溶媒効果: 堤、中村、中西、千葉)に発表する。

ペプチド結合に含まれるアミド窒素の ^{15}N ケミカルシフトに関して 1970 年代に势力的な研究が行われた(文献 3)。本報告では周囲の環境の影響に敏感に反応して変化するアミド窒素のケミカルシフトを蛋白質の水和構造をモニターする一つのプローブとして利用できる可能性についても議論する。

【参考文献】

- 1、Chiba-Kamoshida K. *et al.* 投稿準備中
- 2、MacArthur M. W. and Thornton J. M., *J. Mol. Biol.* (1996) 264, 1180-1195
- 3、N-15 NMR の応用 G.C. レビー、R.L. リヒター著、荒田洋治、甲斐荘正恒訳、培風館

¹三菱化学生命科学研究所²信州大学・工学部○田中剛史¹、小松千江子¹、小林邦子¹、須貝真理子¹、
片岡正和²、河野俊之¹**TRE box Recognition by *Streptomyces* Transcriptional Repressor TraR**Takeshi Tanaka¹, Chieko Komatsu¹, Kuniko Kobayashi¹, Mariko Sugai¹, Masakazu Kataoka²
and Toshiyuki Kohno¹¹Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS), 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 binds to the DNA including 12 bp consensus 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 have HTH motifs, their primary structures exhibit little similarity. Thus, it is significant work to determine structure-function relationships of such regulators. Previously, we determined the solution structure of TraR DNA binding domain (TraR100), that consisted of winged-HTH motif. In this study, we identified the DNA binding sites of TraR100 by NMR chemical shift changes upon DNA-complex formation. In addition, we analyzed the critical DNA sequence recognized by TraR100.

*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27 kDaのリプレッサータンパク質であり、*tra*オペロン (*traA-traB-spdBs*) 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12 bpの特異的配列 (TRE box 1-4) を含むDNAと結合する。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の負の調節を行っている。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 (TraA/B/R、SpdA/B) はヘリックス・ターン・ヘリックス (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・機能相関を比較することは遺伝子接合機構を明らかにする上で重要である。これまでに我々はTraRのHTHモチーフを含むアミノ酸100残基のDNA結合ドメイン (TraR100) がWinged-HTH構造を持つことを明らかとした。今回、我々はTraR100のDNA結合部位の同定およびTraR100が認識するTRE boxを含むDNAの探索を行った。

TraR、多次元NMR、立体構造解析、DNA結合ドメイン、HTHモチーフ

たなか たけし、こまつ ちえこ、こばやし くにこ、すがい まりこ、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したTraR100を大腸菌を用いた発現系により調製した。NMR測定は90% H_2O - 10% D_2O 、250 mM NaCl、10 mM DTT-d8、50 mMリン酸バッファー (pH 6.5) を用い25°Cもしくは15°Cで行った。NMRによるDNA滴定実験は $[\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQC法により行った (TraR100 : dsDNA=1 : 0.125~2)。

<結果・考察>

TraR100のDNA結合部位を同定するために、TRE box 4を含むDNA (TRED1 Δ 2) の滴定実験を行った。TRED1 Δ 2との複合体形成に伴う大きな化学シフト変化を示す残基は α 1ヘリックスのN末端領域およびHTHモチーフを形成する α 2- α 3ヘリックス領域に分布している (Fig.1)。特に、塩基性残基が多くHTHモチーフの第2ヘリックスに相当する α 3ヘリックスで顕著であることから、 α 3ヘリックスがDNA認識ヘリックスであることが示唆される (Fig.2)。更に、 β シートを形成する β 1および β 2- β 3領域で大きな化学シフト変化を起こすことからWing構造がTraR100のDNA結合に直接関与していると考えられる。TRED1 Δ 2とTraR100の複合体形成比は1 : 2であり、TRED1 Δ 3 (TRED1 Δ 2の3'側3bp削除) では1 : 1であることからTRED1 Δ 2には2ヶ所のTraR認識配列がタンデムに存在することが分かった。また、TraR100のTRED1 Δ 3およびTRED1 Δ 4 (TRED1 Δ 2の3'側13bp) へのアフィニティーが異なることから、タンデムに並んだ認識配列がin vivoでホモダイマーを形成するTraRの機能発現に関与していることが示唆される。

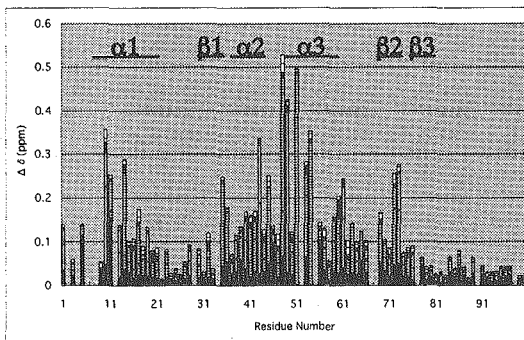
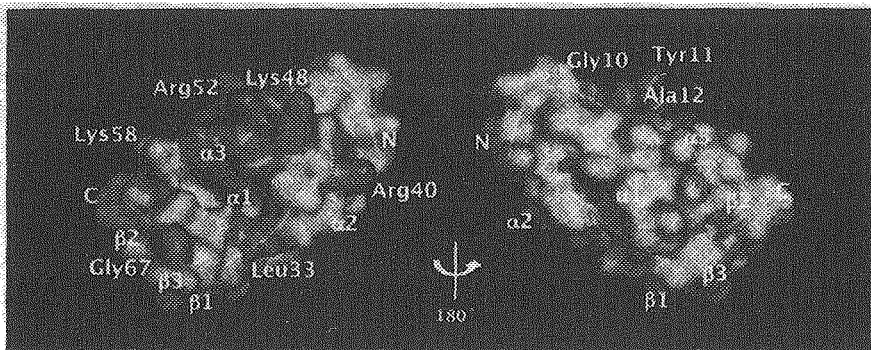


Fig.1 NMR chemical shift changes of TraR100 upon complex formation with TRED1 Δ 2 double stranded DNA (5'-AAGGTACGTTAAGTACCT-3').

Fig.2 NMR structures of TraR100. Shaded areas indicate the residues displaying large chemical shift changes (> 0.2 ppm) upon DNA-complex formation.



1P019★

Super High Expression with *Corynebacterium glutamicum*
for NMR Sample Preparation

(味の素㈱) ○品川麻衣、榛葉信久、水越利巳、菊池慶実、鈴木榮一郎

(Ajinomoto Co.) ○Mai Shinagawa、Nobuhisa Shimba、Toshimi Mizukoshi、
Yoshimi Kikuchi、Ei-ichiro Suzuki

Abstract : Expression with *E. coli* is a common system to produce labeled proteins, however, labeling is still time-consuming and expensive. We have constructed the expression system for *S. mobaraense* transglutaminase (MTG), using *Corynebacterium glutamicum*, which efficiently secrete proteins. In this presentation, we will show the optimized condition to produce the labeled proteins with *C. glutamicum*, and propose the easier and cost-effective expression system.

タンパク質の NMR 研究を行う上で、安定同位体標識タンパク質を短時間で安価に調製することがボトルネックのひとつとなっている。安定同位体標識タンパク質の製造には様々な方法があり、各々一長一短がある。その中で、コリネホルム細菌は菌体外に分泌される目的外タンパク質が極めて少なく、異種タンパク質を分泌生産した場合に精製過程が簡略化、省力化出来るという特徴を持っている。また、菌体の高密度での培養が可能であり、少量で且つ標識率の高い安定同位体標識タンパク質を分泌生産することが可能となる。従って、安定同位体標識を含む培地にかかる費用や培養条件の設定、生産性の点で優れている。そこで、本研究ではコリネホルム細菌の優れた特徴に着目し、トランスグルタミナーゼ (MTG) を題材として安定同位体標識タンパク質の製造法の確立を目指し、検討を行った。

MTG を題材として標識を行い、NMR 測定を実施した(Fig.1(a))。その結果、20mL 培養で解析可能なスペクトルを得ることが出来た。これにより、コリネホルム細菌を用いた系では、小スケールで NMR 解析可能な安定同位体標識試料の調製が可能であることが示された。また、菌体の生育状況と発現量を調べたところ、15 時間で MTG の発現が極めて多くなり、20 時間前後で発現量が最大となることが判明した(Fig.2)。さらに、アミノ酸 (Met、Lys) の選択的標識が可能であることが明らかとなった(Fig.1(b),(c))。

Keywords : *Corynebacterium glutamicum*, labeling, high expression, small scale culture

しながわ まい、しんば のぶひさ、みずこし としみ、きくち よしみ、
すずき えいいちろう

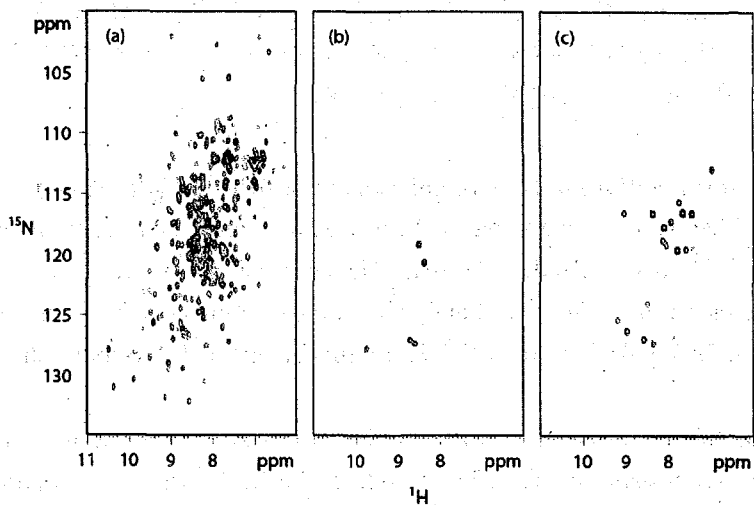


Figure 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of MTG uniformly labeled with ^{15}N (a), selectively labeled with ^{15}N -Met (b), and ^{15}N Lys (c), respectively.

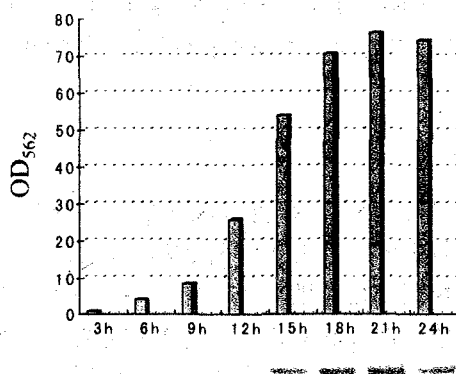


Figure 2. Cell growth rates and SDS-PAGE of the supernatants in each growth phase.

NMR structure and functions of N-terminal domain of SUMO ligase PIAS1

¹ Department of Pharmacy, ² Department of Life Science, Tokyo University of Pharmacy & Life Science, ³ RIKEN GSC, ⁴ RIKEN Harima, ⁵ The University of Tokyo
Seiji Okubo¹, Futoshi Hara², Yuki Tsuchida¹, ○Sakurako Shimotakahara^{1,2}, Sakura Suzuki³,
Hideki Hatanaka³, Shigeyuki Yokoyama^{3,4,5}, Hirofumi Tanaka² and Heisaburo Shindo^{1,2}

A member of PIAS family proteins, PIAS1, have been reported to serve as an E3-type SUMO ligase for tumor suppressor protein p53 as well as itself. It was also proposed that the N-terminal domain of PIAS1 interacts with DNA and other transcription factors. In the work presented here, first, the relative binding affinities of a series of truncated PIAS1 mutants to p53 and LEF1 were investigated and demonstrated that the binding is specific to the SAP domain (residues 1-65) of PIAS1. Second, the three-dimensional structure for the SAP domain of PIAS1 was determined, which revealed a unique four-helix bundle with a topology of up-down-extended loop-down-up. Third, DNA binding ability of the SAP domain of PIAS1 was investigated using gel mobility assay, showing that this domain is capable of binding to A/T-rich DNA fragments.

【はじめに】

SUMO リガーゼ(E3) である PIAS1 は癌抑制因子 p53 を始めとする様々な転写因子を SUMO 化し、その機能を調節することが報告されている。しかし、それらの SUMO 化ターゲットと PIAS1 との相互作用に関する詳細は明らかでない。そこで本研究においては、まず PIAS1 の p53 結合部位を同定し、その結合領域である SAP domain (1-65aa) の溶液中の立体構造を NMR により決定した。また PIAS1 の SAP domain について DNA との相互作用についても検討した。

キーワード：PIAS1, SUMO ligase, NMR 構造解析

おおくぼせいじ、はらふとし、つちだゆき、たしろさくらこ、すずきさくら、はたなかひでき、よこやましげゆき、たなかひろふみ、しんどうへいさぶろう

【方法】

種々の PIAS1 の His 融合欠失変異体を作成し、これらに対して pull down assay を行い、p53 との結合の有無を調べた。また p53 結合部位である PIAS1 の SAP domain (1-65) を調製し、その立体構造を多次元異種核 NMR 法を用いて決定した。さらに、この SAP domain について gel shift assay および chemical shift perturbation 法を用いて A/T-rich DNA との相互作用を詳細に検討した。

【結果および考察】

pull down assay の結果より PIAS1 の p53 結合部位は N 末端の 1-65aa 領域に存在することが判明した。この 1-65aa 領域 (SAP domain) の立体構造を NMR により決定した。得られた構造は Fig.1 に示すように 4 本 helix-bundle であり、“up-down-down-up” のトポロジーを持つユニークな構造であることが明らかになった。この構造は DNA 結合能を持つとしてすでに報告されている SAP モチーフと構造的類似性を有しており、今回 DNA との結合も確認された。現在、PIAS1 の SAP domain (1-65aa) と p53 のペプチド断片との相互作用について、また転写因子 LEF1 や c-jun に関しても PIAS1 との相互作用について検討中である。

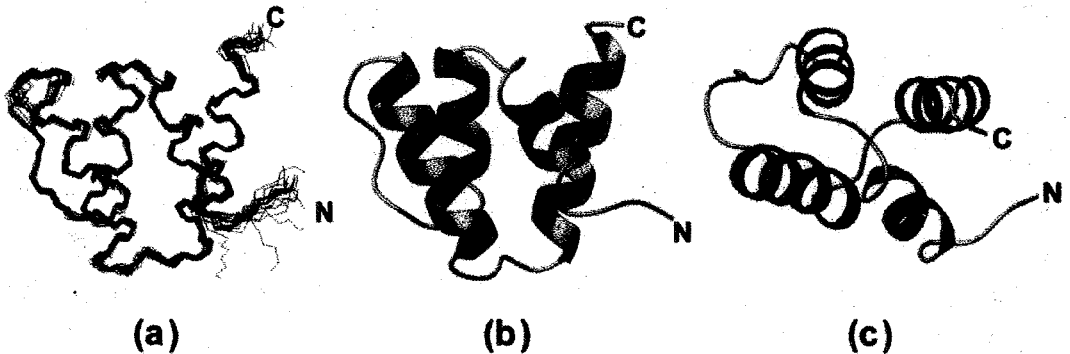


Fig.1. (a) Superimposed backbone chains of 20 calculated structures of PIAS1(1-65) with the lowest energy. (b) Ribbon diagram of the lowest energy structure. (c) The top view of the ribbon diagram in (b).

1) S. Okubo, et. al., (2004) *J. Bio. Chem.*, **279**, p31455-31461

3P021 ヒトおよび酵母リンカーヒストンの球状ドメインの構造と DNA との相互作用

(JBIC·JBIRC) 小野克輝, (東京薬大) 田代櫻子, ○神藤平三郎,
(明星大) 清水光弘, (農業生物資源研) 山崎俊正

Structure of Globular Domains of Human and Yeast Linker Histones and Their Interactions with DNA: (JBIC·JBIRC) K. Ono, (Tokyo Univ. of Pharmacy & Life Sci.) S. Tashiro, H. Shindo, (Meisei Univ.) M. Shimizu, (NIAS) T. Yamazaki

[Abstract] In most eukaryotes, linker DNA between nucleosomes is associated with a histone, termed linker histone H1. It is generally accepted that linker histones are implicated in chromatin condensation and the maintenance of its higher-order structure, and also serves as integral components of mechanisms that control gene expression.

We have reported the solution structures of the globular domains of Hho1p from *S. cerevisiae* presenting a winged helix-turn-helix motif. In this study, we characterized the DNA binding modes of Hho1p as well as H1.0p from human by NMR as well as gel mobility assay. Detailed discussion was made in the comparative study of 3D-structure and DNA binding ability of linker histone H5 with structurally related DNA binding proteins.

1. はじめに

すべての真核細胞においてヌクレオソーム間にあるリンカー DNA は塩基性の小蛋白質であるリンカーヒストンと結合している。一般にリンカーヒストンはクロマチンの凝集やその高次構造の形成において重要な役割を果たしていること、さらに遺伝子の発現制御にも関与していると考えられている。酵母リンカーヒストン Hho1p の球状ドメインの NMR 構造については 41 回 NMR 討論会において報告したが、典型的な winged helix-turn-helix motif であった¹⁾。今回は、酵母やヒトのリンカーヒストンの球状ドメインと DNA との相互作用について比較研究した結果を報告する。リンカーヒストンの DNA との結合部位や結合モードを明らかにするために、リンカーヒストンとスーパーコイル DNA や Holiday junction DNA との相互作用について比較検討した。

リンカーヒストン, Hho1p, H1.0, DNA との相互作用, NMR

おの かつき, たしろ さくらこ, しんどう へいざぶろう, しみず みつひろ,
やまざき としまさ

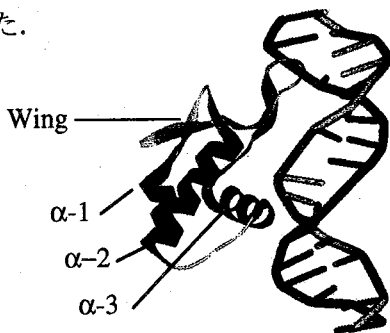
2. 方法

出芽酵母 Hho1p の遺伝子は酵母のゲノム DNA から直接 PCR 法により増幅して得られ、大量発現系に使用した。ヒトリンカーヒストン H1.0p の遺伝子はヒト脳組織の cDNA library から PCR 法により増幅し、さまざまな H1.0p 変異体を作成した。結合実験には、DNA として線状 DNA の他、とくに four-way junction を形成するようにデザインされた 1 本鎖 DNA(4W-J1a)をもつ 38-mer を用いた。多次元 NMR の測定には Bruker DMX750 および DMX500 を使用した。

3. 結果と考察

ヒトリンカーヒストン H1.0p は、分化しない末端の細胞から発見され、鶏のリンカーヒストン H5 の球状ドメインと約 80%の相同性をもつ。それゆえ、H5 との立体構造の類似性も推測された。事実、C α や C β 炭素の化学シフトの値から確かめられ、winged helix-turn-helix motif をもつことが分った。

ヒト H1.0p は、Hho1p にくらべて、スーパーコイル DNA に対して極めて高い親和性を示した。リンカーヒストンは、二重鎖 DNA が交差するようなスーパーコイル DNA に対して高い親和性を有することから、four-way junction に対しても高い結合特異性が推察された。H1.0p の球状ドメインと 4W-J1a との相互作用に関する 2D 1H-15 HSQC の解析から、H1.0p の DNA との結合部位を同定できた。すなわち、H1.0p の球状ドメインは主として α -1 の N 末端領域(His25-Ser29)、 α -2 と α -3 間の loop 領域(Lys59-Gln67)および wing 領域 (Lys85) の 3つの領域で結合していることが示された。DNA の結合による化学シフトの変化は転写因子 hRFX1-DNA 複合体の接触部位から予測される領域と一致していることから、リンカーヒストンの DNA 結合モードは hRFX1 に類似していることが示唆された(下図)。興味あることには、リンカーヒストンに高く保存されている塩基性残基 (Lys40, Lys42, Lys52, Lys69, Lys73, Lys85, Lys95) のうち、DNA との結合によって大きな化学シフトの摂動を受けた残基は Lys85 のみであった。



A model of complex of linker histone with DNA (α -3 of linker histone binds the minor groove of DNA)

1) K. Ono et al., Nucl. Acids Res., 31, 7199-7207(2003)

固体 NMR による自発磁場配向膜中ボンポリチン II の動的構造の解析

横浜国大院・工 ○虎谷 秀一、西村 勝之、内藤 晶

Dynamic Structure of Bombolitin II Bound to Magnetically Oriented Vesicles by Solid-state NMR

Graduate School of Engineering, Yokohama National University

Suichi Toraya, Katsuyuki Nishimura and Akira Naito

Bombolitin II (BLT2) is a hemolytic heptadecapeptide originally isolated from the venom of a bumblebee. We have investigated interactions between BLT2 and lipid by solid-state NMR spectroscopies. ^{31}P NMR spectra showed that BLT2-DPPC membranes orient parallel to the static magnetic field above the gel-to-lipid phase transition temperature (T_c) in a peptide-to-lipid ratio of 1:10 through a membrane fusion process. The magnetically oriented vesicle systems (MOVS) enable us to determine membrane-bound dynamic structure of BLT2 by analyzing of ^{13}C chemical shift anisotropies of the carbonyl carbons. It was revealed that the membrane-bound BLT2 adopt an α -helical structure and laterally diffuses in the membrane, rotating around the membrane normal with the tilt angle of the helix being $\sim 30^\circ$. These results suggest that the mechanism of membrane fusion induced by BLT2 is similar to that induced by melittin.

【序論】 ボンポリチン II (BLT2) はマルハナバチの毒液から単離された 17 アミノ酸残基から成るペプチド (SKITDILAKLGKVLAVH-NH₂) である。このペプチドは、メリチンと同様に赤血球やリポソームを溶解し、またホスホリパーゼ A₂ の活性を増加させることが知られている¹⁾。ミセルに結合した BLT2 の構造は α -ヘリックスであることが報告されている²⁾。本研究では、明確にゲル-液晶相転移点 (T_c) をもつ生体膜モデルとして DPPC 膜を用い、固体 NMR の手法を用いて BLT2 と DPPC 膜の相互作用を明らかにし、BLT2 の動的膜結合構造を調べることを目的とした。

【実験】 Fmoc 固相法で合成した部位特異的 ^{13}C 標識 BLT2 と DPPC をペプチド対脂質モル比が 1:10 になるように全量 50 mg を量り取り、300 μl の緩衝液 (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5) で水和した。凍結・融解を 10 回繰り返す、これを ^1H 高出力デカップリング (DD) 条件下における ^{31}P および ^{13}C NMR 測定に用いた。同試料を膜融合条件下で 1 時間放置し、急速凍結後、凍結乾燥したものを交差分極マジック角回転 (CP-MAS) 法による ^{13}C NMR 測定および Rotational Echo Double Resonance (REDOR) 法による原子間距離測定に用いた。全ての固体 NMR 測定は、Chemagnetics CMX infinity-400 NMR 分光器を用いて行った。

【結果と考察】 BLT2-DPPC 二分子膜系の ^{31}P NMR スペクトルを測定した結果、DPPC のゲル-液晶相転移点 ($T_c = 41.5^\circ\text{C}$) より低い 35°C では等方信号が観測され膜分断が BLT2 によって誘起されていることがわかった。一方、 T_c より高い 50°C では主に軸対称粉末線形の垂直成分が観測

動的膜結合構造、 ^{13}C 化学シフトテンソル、MOVS、REDOR、膜融合

とらや しゅういち、にしむら かつゆき、ないとう あきら

され (図 1)、膜小胞は静磁場に対して膜面を平行に配向することがわかった。また、50°C でこの自発磁場配向膜に結合した BLT2 に対して、Ile³、Ile⁶、Leu⁷ のカルボニル炭素の ¹³C NMR スペクトルを測定した結果 (図 2)、等方化学シフト値 δ_{iso} から BLT2 の N 端部 α -ヘリックス構造をとることが判明した。また、静止条件下において観測された化学シフト値 δ_{obs} は回転数 100 Hz の MAS によって得られた軸対称粉末線形の垂直成分 δ_{\perp} に一致した。これらの ¹³C 化学シフト値を表 1 にまとめた。さらに、昨年討論会にて報告した方法を用いて BLT2 の動的膜結合構造解析を行った結果、BLT2 の α -ヘリックスは膜法線から約 30° 傾けて膜法線軸のまわりを回転しながら並進拡散していることがわかった。過去のメリチンに対して行った結果³⁾ と照らし合わせると、BLT2 の残基数と一次構造はミツバチ毒メリチンのそれとは異なるが、メリチンと同様に BLT2 は膜表面を乱すことで膜融合を誘起することが示唆された。

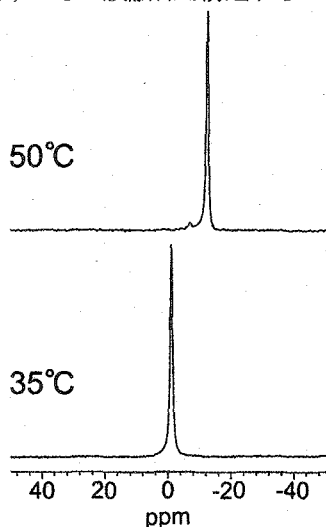


Figure 1. ³¹P NMR spectra of BLT2-DPPC bilayer systems at 35°C (top) and 50°C (bottom), respectively.

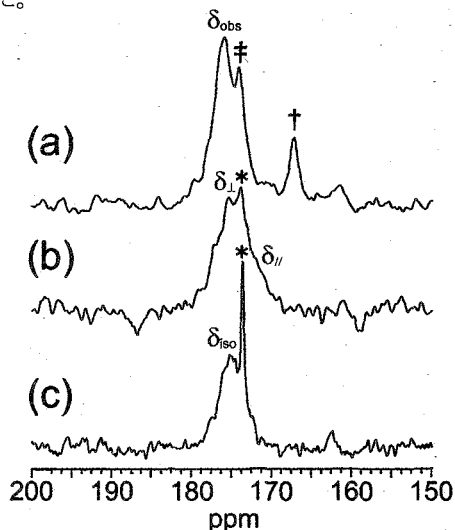


Figure 2. ¹³C NMR spectra of [1-¹³C]Ile⁶-BLT2 bound to DPPC vesicles under static (a), 100 Hz MAS (b), 2 kHz MAS (c) conditions. Peaks denoted by ‡, †, and * are signals of carbonyl carbons of lipid.

Table 1. ¹³C chemical shift values of BLT2 bound to magnetically oriented DPPC vesicles under a fusion condition

	δ_{iso} / ppm [†]	STRUCTURE [‡]	δ_{obs} / ppm	$\Delta\delta$ / ppm [†]	δ_{\perp} / ppm [§]	δ_{\parallel} / ppm [§]	δ_{33} / ppm [§]	δ_{iso}^* / ppm ^{§†}
[1- ¹³ C]Ile ³	174.9	α -helix	174.4	1.5	247.0	189.5	88.0	175.0
[1- ¹³ C]Ile ⁶	175.3	α -helix	175.9	-1.8	244.5	192.5	89.5	175.4
[1- ¹³ C]Leu ⁷	175.9	α -helix	165.8	30.3	244.5	192.5	89.0	175.3

Measurements of a BLT2-DPPC bilayer system was performed at 50°C.

§ Obtained from CP-MAS ¹³C NMR measurements of the lyophilized powder samples at 20°C.

† $\Delta\delta = 3(\delta_{iso} - \delta_{obs})$, where $\delta_{obs} \equiv \delta_{\perp}$.

‡ Typical ¹³C chemical shift values of (δ_{iso} of α -helix, δ_{iso} of β -sheet) are (175.7, 170.5) and (174.9, 172.7) for [1-¹³C]Leu and [1-¹³C]Ile, respectively.⁴⁾

【引用文献】

1. Argiolas and Pisano, 1985. *J. Biol. Chem.* **260**, 1437-1444.
2. Monticelli et al., 2002. *Biophys. Chem.* **101-102**, 577-591.
3. Toraya et al., 2004. *Biophys. J.* (in press)
4. Saitô and Ando, 1989. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **21**, 209-290.

(東工大院理工¹、高分子センター²、農工大工³、The University of Sheffield⁴)○中澤靖元^{1,2}、鈴木悠³、宮内真悟³、Michael P Williamson⁴、朝倉哲郎³、安藤勲^{1,2}

Determination of the Precise Structure of Silk Fibroin Model Peptide studied with Solid-State NMR

Yasumoto Nakazawa, Yu Suzuki, Shingo Miyachi, Michael P Williamson,

Tetsuo Asakura and Isao Ando

¹Dept of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, 152-8552, JAPAN ²Dept of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, JAPAN Tel&Fax, 042-383-7733 ³Dept of Molecular Biology and Biotechnology University of Sheffield Firth Court, Western Bank Sheffield S10 2TN, UK e-mail: ynakazawa@polymer.titech.ac.jp

The critical step in the development of Alzheimer's disease (AD) is the conversion of soluble, nontoxic amyloid β -protein ($A\beta$) to aggregated, toxic $A\beta$ rich in β -sheet structures. Yanagisawa *et al.* discovered GM1 ganglioside-bound $A\beta$ (GM1/ $A\beta$) in brains exhibiting early pathological changes of AD and suggested that GM1/ $A\beta$ may serve as a seed for toxic, amyloid fibril formation. Indeed, immunochemical and spectroscopic studies demonstrated that GM1/ $A\beta$ has a conformation different from that of soluble $A\beta$ and accelerates the rate of amyloid fibril formation of soluble $A\beta$ *in vitro*.

In this study, the effects of GM1-ganglioside in the membranes on the binding of $A\beta$ will examine in detail using angle-dependent solid-state NMR techniques. Especially, we will analyze ³¹P solid state NMR spectra of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) in the presence and absence of human $A\beta$ (1-40). In the case of the ³¹P angle-dependent NMR spectrum of the DMPC: $A\beta$, we can obtain three component of the orientational component. The main peak (ca. 55%) assigned the destruction of the DMPC bilayer like a micelle. However, about 30% of the DMPC component have a tilt of 30° compared with lipid bilayer. This result suggests that the $A\beta$ aggregation has an influence on the orientation of the lipid bilayer.

【Introduction】

老人性痴呆症として知られる Alzheimer 病は、 β -amyloid ペプチド($A\beta$)の神経細胞への沈着、凝集による神経機能障害によって発症、遺伝子因子と環境因子が組み合わさった複雑な病気である。

1995 年、Alzheimer 病初期の脳に見られるびまん性老人斑から、膜成分糖脂質である GM1 ガングリオシドと結合した $A\beta$ が発見された¹⁾。この発見を機序に、様々な研究成果が報告され、GM1 ガングリオシド結合型 $A\beta$ の形成が $A\beta$ 凝集を促進し、脂質二重膜を破壊、最終的に神経毒性につながるという説が有力視されてきた²⁻⁵⁾。しかしながら、これらの研究はすべて、IR や UV を用いた分光学的研究であり、GM1 ガングリオシド結合型 $A\beta$ の原子レベルでの構造の解明には至っていない。そこで本研究では、生体膜と $A\beta$ の相互作用について、詳細な解析を行うことを目的とし、配向脂質二重層膜を作成、角度依存固体 NMR 法を用いた解析を行った。

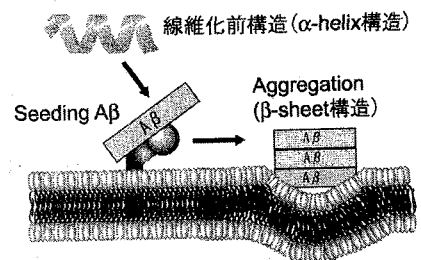


Figure 1 Schematic illustration of $A\beta$ -ganglioside GM1 interactions. $A\beta$ specifically recognizes a ganglioside cluster. $A\beta$ undergoes a conformational transition from an α -helix-rich to a β -sheet-rich structure.

Alzheimer 病・ β -アミロイド・配向脂質二重層膜・角度依存固体 NMR・凝集機構

なかざわやすもと、すずきゆう、みやうちしんご、Michael P Williamson、あさくらてつお、あんどういさお

【Materials and Methods】

A β モデルペプチド、A β (1-40) [DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV] は PE Biosystems 社製ペプチド合成機を用いて Fmoc 固相法により合成した。得られたペプチドは TOF/MS によって分子量の確認を行っている。配向脂質二重層膜試料は、DMPC: ガングリオシド GM1、DMPC:A β (1-40)、DMPC:A β :ガングリオシド GM1 の混合物をクロロホルム+メタノール溶媒に溶解し、A β (1-40)はベンゼンに溶解し、DMPC、ガングリオシド GM1 と混合してガラスプレートに展開した。ガラスプレートに展開後、3cm に切断した 10mm ϕ NMR 試料管に封入し、45 $^{\circ}$ C で 4 日間インキュベートした。角度依存固体 NMR 測定は、角度可変ゴニオメータ付き 10mm ϕ プローブを用いて行った。観測核は ^{31}P 、 ^{31}P 90 $^{\circ}$ パルス幅=8 μsec 、PD=3sec でのワンパルス測定を行った。各サンプルにおいて、磁場に対して 0 $^{\circ}$ 、15 $^{\circ}$ 、30 $^{\circ}$ 、45 $^{\circ}$ 、60 $^{\circ}$ 、75 $^{\circ}$ 、90 $^{\circ}$ の各角度において測定を行った。

【Results and Discussion】

A β (1-40)について固相合成を行い、純度の高い試料を得ることができた。Figure 2 には DMPC/GM1(10:1)の角度依存固体 NMR の測定結果を示した。Figure 2 上図が磁場に対してアシル鎖が平行 (0 $^{\circ}$) Figure 2 下図が磁場に対してアシル鎖が 45 $^{\circ}$ 傾いたときのスペクトルである。この結果、DMPC 中に存在する GM1 ガングリオシドは脂質膜の配向を乱すことなく存在し、脂質膜中に膜の不均一性は見られなかった。

同様に、DMPC/A β (20:1)の角度依存 NMR 測定の結果を Figure 3 に示す。Figure 3(a)、(b)、(c)の順にアシル鎖の方向が磁場に対して 0 $^{\circ}$ (平行)、45 $^{\circ}$ 、90 $^{\circ}$ (垂直)となっている。この結果、約 55%は無配向成分 (peak a) となっており、アミロイドの添加によって膜破壊がおきていることが示唆されている。

残りの 45%は、配向挙動を示し、ガラスプレートと平行に存在する配向成分(peak c; 約 15%)と平行配向成分に対して約 30 $^{\circ}$ の傾きを持った配向成分(peak b; 約 30%)が存在し、特定の配向構造を形成していることが明らかとなった。この現象は、DMPC と A β の比率を、30:1、10:1 と変化させても再現され、A β は脂質膜に対して何らかの影響を及ぼしているものと考えられる。本研究では以上の結果より、A β がリン脂質膜に添加されると、A β は凝集が起り膜の破壊が生じ、A β は局所的に膜と相互作用して、特殊な配向挙動をみせると結論づけた。現在、溶液 NMR 法も含めた脂質膜、GM1 ガングリオシド、A β の相互作用サイトの特定を行っている。なお、本研究は一部、文部科学省 科学研究費補助金 特定領域研究「生命秩序の膜インターフェイスを制御するソフトな分子間相互作用」によって行われた。

【References】

- (1) Yanagisawa, K. et al., *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1062-1066. (2) Kakio, A. et al., *J Biol Chem* **2001**, *276*, 24985-2990. (3) Mandal, P. K. & Pettegrew, J. W. *Neurochem Res* **2004**, *29*, 447-453. (4) Yamamoto, N. et al., *FEBS Lett* **2004**, *569*, 135-139. (5) Kurganov, B. et al., *Peptides* **2004**, *25*, 217-232.

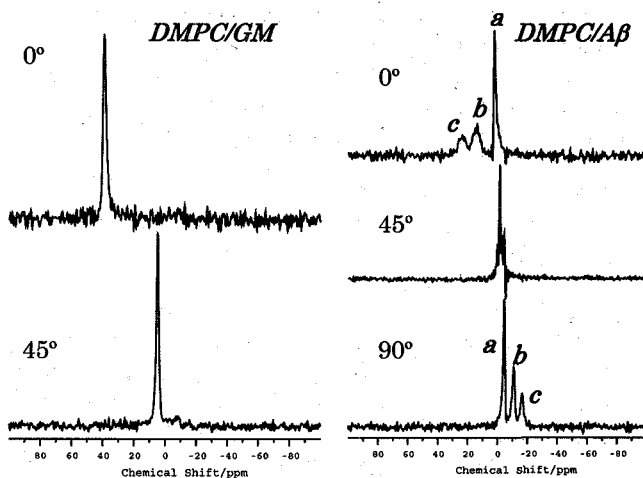


Figure 2 ^{31}P solid state NMR spectra of a macroscopically oriented DMPC sample with Ganglioside-GM1 at 35 $^{\circ}\text{C}$ as a function of the angle between the bilayer and the magnetic field. DMPC/GM1 molar ratio was 10:1.

Figure 3 ^{31}P solid state NMR spectra of a macroscopically oriented DMPC sample with A β (1-40) at 35 $^{\circ}\text{C}$ as a function of the angle between the bilayer and the magnetic field. DMPC/A β (1-40) molar ratio was 20:1

1) 阪大院薬、2) 理研 GSC、3) 理研播磨、4) 阪大院理、5) 東大院理
 ○西村 光広¹、吉田 卓也¹、白水 美香子^{2,3}、寺田 貴帆^{2,3}、倉光 成紀^{3,4}、
 横山 茂之^{2,3,5}、大久保 忠恭¹、小林 祐次¹

Solution Structure of Ribosomal Protein L16 from *Thermus thermophilus* HB8

○Mitsuhiro Nishimura, Takuya Yoshida, Mikako Shirouzu, Takaho Terada, Seiki Kuramitsu,
 Shigeyuki Yokoyama, Tadayasu Ohkubo and Yuji Kobayashi

Ribosomal protein L16 is an essential component of bacterial ribosome. Here we present the solution structure of L16 from *Thermus thermophilus* HB8 determined by NMR. L16 has an α/β sandwich structure with two β sheets combined at one connecting region. However, the both terminal parts and a protruding loop are fully disordered. The structured part of L16 could be superimposed well on the medium-resolution crystal structure of L16 determined in ribosome. By overlaying the solution structure of L16 on the crystal structure in ribosome, we constructed a model to show interaction between L16 and rRNA. L16 has three main rRNA interacting sites to six distant rRNA stems, suggesting large effect on ribosome's architecture. The L16 mutation sites, which are reported in the avilamycin/evernimicin resistant bacteria, are clustered on an α helix and the side chains are exposed to solvent at tRNA binding cavity. This result suggests that these antibiotics inhibit tRNA binding by covering its binding site around L16.

【序論】

リボソームは生命活動において最も基本的な働きの一つである蛋白質合成を行う分子機械である。バクテリアでは、リボソームは 50S サブユニットおよび 30S サブユニットと呼ばれる 2 つのサブユニットが会合することで働いており、それぞれのサブユニットは複数の RNA と蛋白質から構成されている。

それらの構成因子の中でも、リボソーム蛋白質 L16 はリボソーム研究の初期から最も注目されていた蛋白質の一つである。L16 を除いて再構成した 50S サブユニットはペプチド鎖転移反応活性、tRNA の結合、30S サブユニットとの会合、抗生物質の結合といった様々な側面で失活することが知られている。近年のリボソーム結晶構造解析では、L16 はリボソーム中で機能部位が集中するサブユニットの境界面に位置しており、ペプチド鎖転移反応の活性中心付近でアミノアシル tRNA の結合部位を構成していることが明らかにされた。また L16 上の変異が抗生物質 avilamycin および evernimicin の耐性に関与する事も報告されており、L16 は抗生物質の標的部位としても新たな注目を集めている。

しかし、これまで L16 の構造解析は原子レベルに達しておらず、構造の側面から L16 について報告されている実験事実を考察することができない状況にあった。50S サブユニットの結晶構造においても、分解能の不足から主鎖構造が得られているのみであり、側鎖構造は決定されていない。

そこで本研究では NMR によって高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 L16 の溶液構造を決定し、L16 構造を原子レベルで解明することで、その構造の特徴、周囲の rRNA との相互作用、抗生物質の耐性に関与する変異について考察した。

【結果・考察】

2427 の距離制限と 81 の二面角制限を用いて L16 の構造計算を行った結果、良く収束した構造が得られ、主鎖非水素原子の RMSD 0.40 Å、側鎖を含めると RMSD 1.15 Å であった。溶液中の L16 は四本鎖逆平行 β シートに 2 つの α ヘリックスが並んだ α/β 二層構造をとっており、さらに、この二層構造に 2 つの β シートが組み合わさっていた (Figure 1)。一方、L16 の N 末端領域、C 末端領域、突出したループ部分においては構造を決定することができなかった。¹H-¹⁵N 異核 NOE 実験を行ったところ、これらの領域では NOE 値の減少が観測され、溶液中で高い運動性を持つことが示唆された。

リボソーム蛋白質、NMR 構造、RNA-蛋白質相互作用、抗生物質

にしむらみつひろ、よしだたくや、しろうずみかこ、てらだたかほ、くらみつせいき、よこやましげゆき、おおくぼただやす、こばやしゆうじ

今回得られた L16 構造と 50S サブユニットの結晶構造中で決定された L16 主鎖構造との比較を、主鎖 C α 原子に関して行ったところ、溶液中で構造をとっていた部分について RMSD 1.3 Å と良い一致が見られた。この一致をもとにリボソーム結晶構造の座標に L16 溶液構造を重ね合わせることでモデルを構築し、リボソーム中の rRNA 構造に対する L16 側鎖構造の配向を求めた。このモデル構造中で L16 と周囲の rRNA との相互作用を調べた結果、L16 の二層構造部分は主に 3 つの部位で 6 つの rRNA ステムに対して相互作用していることが示唆された。これは L16 の結合がリボソームの高次構造に広く影響することを示唆しており、L16 を除いてリボソームを再構成した時に観測された様々な機能失活を説明する結果である。

また、70S リボソームと tRNA 複合体結晶構造を用いて同様にモデル構造を作成し、tRNA との位置関係を調べたところ、Arg56 がアミノアシル tRNA の T ループ部分に近接していることが示された。これまで L16 の N 末端領域と突出したループ部位がアミノアシル tRNA と接触することは報告されていたが、L16 が中心の二層構造部分においても相互作用している可能性が示されたのは本研究が初めてである。

L16 の高分解能構造が得られたことで、抗生物質の作用についても新たな知見が得られた。抗生物質 avilamycin および evernimicin の耐性に関与している L16 上の変異部位は Arg51、Val52、Arg56 の 3 残基であり、これらは L16 構造においては一つの α ヘリックス上に位置していた。上述のモデル構造中でそれらの側鎖構造を調べたところ、50S サブユニットの tRNA が結合する空間の表面に露出していることがわかった (Figure. 2)。また、その位置はこれまでに報告されている rRNA 上の耐性獲得変異部位や、これらの抗生物質を用いた rRNA probing 実験によって保護された部位の延長線上であった。これらのことから、avilamycin および evernimicin は L16 と隣接する rRNA ステムに横たわるように結合することが示唆される。上述のように、Arg56 を含むこの L16 と rRNA ステムの境界部分はアミノアシル tRNA の T ループが接触する部位であることから、これらの抗生物質の作用は、リボソームに結合することによってアミノアシル tRNA の結合部位を覆い、tRNA の結合を阻害することであると考えられる。

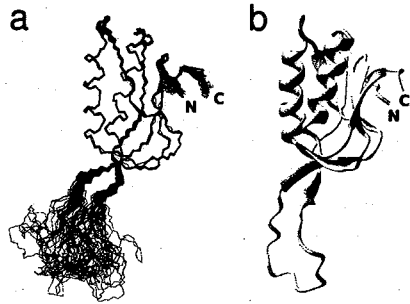


Figure 1. (a) Ensemble of 30 structures and (b) ribbon model of *T.thermophilus* L16. Residues in the disordered both terminal regions were not shown for clarity.

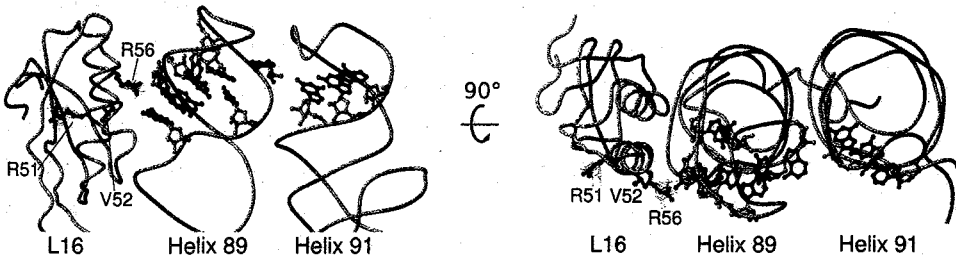


Figure 2. Indicated binding site of avilamycin and evernimicin. The side chain structures of the mutation sites of L16, that is, Arg51, Val52 and Arg56, were represented by balls-and-sticks. The resistant associated mutation sites or protected sites in RNA probing experiments on 23S rRNA helix 89 and helix 91 were also shown.

区分標識と残余双極子相互作用を利用した
ドメインオリエンテーションの決定

(阪大・蛋白研¹、理研 GSC²、東工大・資源研³)

○辻本拓哉¹、八木宏昌¹、山崎俊夫²、吉田賢右³、阿久津秀雄¹

Determination of domain orientations using the segmental isotope labeling
and residual dipolar couplings

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

○Takuya Tsujimoto¹, Hiromasa Yagi¹, Toshio Yamazaki², Masasuke Yoshida³, Hideo Akutsu¹

H⁺-ATPase is known to be the smallest motor protein on the earth. The β subunit is the catalytic region of this enzyme, and the conformational change of this subunit is related to the rotary motor mechanism. In order to monitor this conformational change, we determined the relative orientation of N- and C-terminal domains of this subunit in nucleotide binding and empty states using residual dipolar couplings. The analysis of this subunit (>50kDa) was difficult because of the signal overlapping. So, we used the segmental isotope labeling to reduce the number of NMR signals in a spectrum. The results demonstrated that even the isolated β subunit monomer can change its conformation from "open" to "closed" on nucleotide binding.

【序論】

マルチドメインを持つタンパク質にとって残余双極子相互作用の測定はドメイン間の立体配置を決定するのに有効な方法である。我々は ATP 合成酵素の β サブユニットにこの方法を適用した。 β サブユニットは ATP 分解活性を持つ $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体中ではヌクレオチド結合によって open から closed へ構造変化するということが X 線結晶構造ですでに報告されている。しかしながら、モノマー状態においては、構造変化に関する知見は未だよく分かっていない。そこで今回 β サブユニットモノマーが、ヌクレオチド結合に対してどのような構造変化を起こすのかを区分標識と残余双極子相互作用の測定を組み合わせることで検討した。ヌクレオチドが結合した時としていない時での N 末端と C 末端ドメインの配向テンソルをそれぞれ決定し、そこから各ドメイン間の相対配置の決定を試みた。 β サブユニットは分子量が 5 万を超えるため、シグナルの重なりが激しくなる。そこで N 末端と C 末端ドメインを区分標識で選択的に標識することで、各ドメインのシグナルを独立に観測することにした。

【実験】

¹³C、¹⁵N の標識区分が異なる 2 種類の β サブユニット(1-127 残基、391-473 残基が標識されたもの。これらはそれぞれ N 末端側と C 末端側ドメインの一部にあたる)をインテインの自己スプライシング反応を利用し

キーワード : 区分標識, 残余双極子相互作用

つじもとたくや、やぎひろまさ、やまざきとしお、よしだまさすけ、あくつひでお

て作成した。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整した。各々を大腸菌で発現させ、変性剤によって一端編成させた後リフォールディングする。温度を上げてやることでインテイン反応を促進させてやり目的タンパク質を得た。全てのフラグメントには80%重水素化を行った。残余双極子相互作用の測定は ^1H - ^{15}N IPAP-HSQCで行い、磁場配向には5% C_{12}E_5 /hexanolを用いた。各ドメインの配向テンソル及び相対配置の決定にはModuleを用いた。全ての測定はpH8.0、32°Cで行い、測定装置にはBruker DRX800 with CryoProbeを用いた。

【結果と考察】

β サブユニットは大きくN末端ドメイン、ヌクレオチド結合ドメイン、C末端ドメインの3つに分けることができ、NMR信号の帰属およびヌクレオチド結合に対するケミカルシフトパーターベーションの結果から、ヌクレオチド結合ドメインは比較的フレキシブルな領域であるのに対し、N末端およびC末端ドメインはしっかりと構造をとっている領域であることが分かっている。従って、今回対象としているN末端、C末端ドメインはそれぞれ独立に配向テンソルを持つものと考えることが出来る。

測定の結果、N末端で65個、C末端で39個の残余双極子相互作用が観測された。各計算値には $\alpha_3\beta_3$ の結晶構造(PDB ID=1SKY)中の β サブユニットの部分を用いた。観測された残余双極子相互作用をすべて使って実測値と計算値をフィットさせた場合、両者に良い一致が見られなかった。これは計算値に正確なモノマー β の構造を使っていないことによるものと考えられる。そこで2次構造をとっている領域のみで計算値とのフィットを行った。その結果、比較的良い一致がみられ、それから求めたN末端とC末端の相対配置はADPがある場合ではclosed、ない場合ではopenに近い結果が得られた。以上より β サブユニットはモノマーのみでも $\alpha_3\beta_3$ 複合体で見られたようなopenからclosedへの構造変化を起こすことが示唆された。

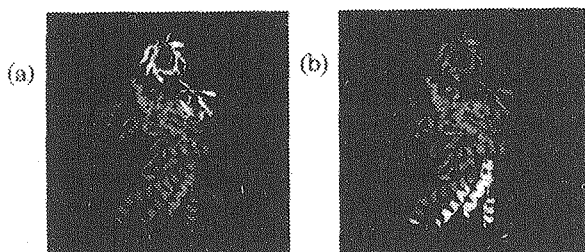
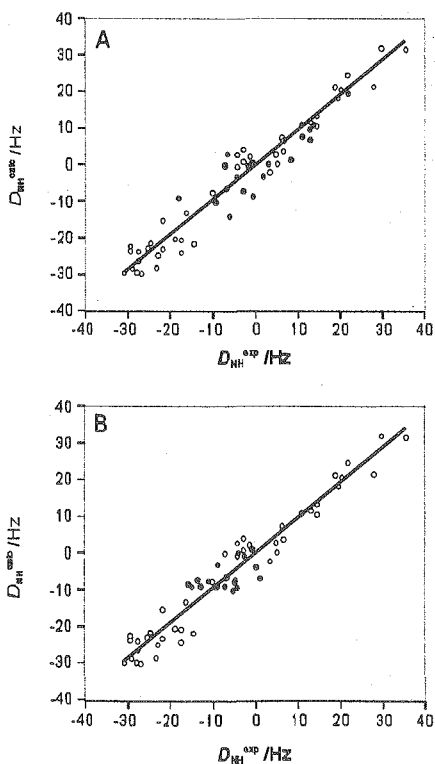


Fig1: White indicates the region of the segmental isotope labeling in the N-terminal domain 1-127 residues (a) and C-terminal domain 391-473 residues (b).

Fig2: Correlations between experimentally measured ^1H - ^{15}N RDCs in empty states (A) and nucleotide binding states (B) and the best-fit RDC values calculated with the monomer β subunit crystal structure in the $\alpha_3\beta_3$ complex. Open circles and Filled circles represent RDCs of N- and C-terminal domains, respectively.



2P026 クモ糸モデルペプチドおよび遺伝子組み換え法により作製した
クモ糸類似タンパク質の固体NMR構造解析
(農工大・工) ○大郷耕輔、川瀬泰司、楊明英、川村純司、朝倉哲郎

Structural Analysis of Model Peptides and Recombinant Proteins of Spider Silk with Solid State NMR
Kosuke Ohgo, Taiji Kawase, Mingying Yang, Junji Kawamura and Tetsuo Asakura
Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588
Tel&Fax: 042-388-7733 e-mail: asakura@cc.tuat.ac.jp

In recent years, new biomaterials based on fibrous proteins have been produced by genetic engineering method. For molecular design of such kinds of biomaterials, it is important to obtain the structural information on the original repetitive sequences in these fibrous proteins. In this study, we synthesized the repetitive sequential model peptides of spider silk and analyzed their structures by combining several solid state NMR methods, that is, the quantitative use of the ^{13}C chemical shifts and 2D spin-diffusion NMR.

【緒言】 蚕やクモの生産する絹など、天然の繊維状タンパク質は、高強度・高弾性であり、クモ牽引糸は最も強い天然繊維と言われ、同じ太さの鋼鉄線の5倍強い。それらの一次構造は、特徴的な繰返し配列の組み合わせから構成されており、蚕やクモの種類によって異なる。そしてそれらは実に多様であり、かつ、その物性も著しく異なる。そこで、その特徴的な繰返し配列を組み合わせた人工のタンパク質繊維を設計、大腸菌やトランスジェニック蚕、さらには、ヤギやジャガイモ等で発現する試みが行われるようになってきた¹⁾。

特に、クモ糸に関して海外を中心に多くの構造研究がなされてきたが²⁾、単結晶を得ることができなく、かつ、多様な繰返し配列が組み合わさることから、立体構造の解析に関しては明快な結論は得られていない。一方、我々は、これまで蚕絹タンパク質の構造解析において、一次配列を元に、安定同位体モデルペプチドを合成、詳細な原子レベルでの構造解析を行い、多くの成果を得てきた^{3,4)}。

そこで本研究では、クモ糸の各種一次配列由来のモデルペプチドを合成、その立体構造を解析することを試みた。さらに、遺伝子組み換え法により作製したクモ糸類似タンパク質の構造解析を併せて行った。

【実験】 女郎蜘蛛の一種である *Nephila clavipes* が生産するシルクの一次構造を元にモデルペプチドの配列を決定した。それらの配列を以下に示した。

- I. QGAGAAAAAAGGAGAGGAGGAGGAGGRGGLGG (34残基)
 - a QGAGAAA[1- ^{13}C]AAAGG[2- ^{13}C]AGAGGAG[2- ^{13}C]G[3- ^{13}C]AGGAGAGRGGLGG
 - b QGAGAAAAAAGGAGAGGAG[1- ^{13}C]G[1- ^{13}C]AGGAGAGRGGLGG
- II. GGLGGQGAGAAAAAAGGAGQGGYGGGSGAGRGGQAAAAAAGGAGQG (49残基)
 - a GGLGGQGAGAAA[3- ^{13}C]AAAGG[2- ^{13}C]AGQGGYGGG[1- ^{13}C]GSGAGRGGQ[2- ^{13}C]G-AAAAAAGGAGQG
- III. GPGGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGGAG (31残基)
- IV. 遺伝子組み換え法により作製したクモ糸類似タンパク質
 - a TS[DGG(A)₆GGAASGAGYGA(GAGSGA)₂GAGYGA]₈
 - b TS[DGG(A)₁₂GGAASGAGYGA(GGA)₄GAGYGA]₄

IとIIは、高強度かつ適度な弾性を有する牽引糸 (dragline silk) を構成する二つのタンパク質 (MaSp1, MaSp2) の一次構造を模倣したものであり、IIIは高い弾性を有する、クモの巣の横糸の核となる flagelliform silk のものである。

なおIVは、クモ牽引糸由来である Ala連鎖領域や (GGA)_n に、家蚕絹フィブロイン由来配列を組み合わせた配列であり、遺伝子組み換え法により改変した大腸菌を用いて生産したタンパク質である。

モデルペプチド Ia, IIa について、 ^{13}C CP/MAS NMR (CMX-400 NMR分光計) を測定し、得られた化学シフト値から局所構造の検討を行った。また、モデルペプチド Ib について、二次元スピン拡散固体 NMR (Varian Mercuryplus 400 NMR分光計) を off-MAS 条件下で測定し、得られた二次元パターンから詳細な二次構造の解析を行った。

クモ牽引糸・flagelliform silk・クモ糸類似タンパク質・二次元スピン拡散固体NMR法・構造依存性化学シフト
おোগこうすけ、かわせたいじ、やんみんいん、かわむらじゅんじ、あさくらてつお

【結果・考察】

【クモ牽引糸モデルペプチドIの構造解析結果】 試料Iはdragline silk(MaSp1) 中に見られる繰り返し配列であり、Ala連鎖領域とGGAの繰り返しを含んだ Gly rich領域からなる。試料Iaについて、 ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルの化学シフト値から、ラベル部位の局所構造を検討した。その結果、Ala連鎖領域及びその近隣は β -sheet構造を形成する事が示唆された。また、(GGA)₃の中心のAla残基については、構造依存性の強いAlaC β 炭素の化学シフト値から解析を行った。その結果、3₁-helixを示す成分が70%存在し、残りの30%は β -sheet構造を形成することが示唆された (Fig.1)。そこで(GGA)₃の詳細な構造情報を得るため、試料Ibについて、二次元スピン拡散固体NMR測定を行った (Fig. 2a)。以前に(GGX)₁₀配列のモデルペプチドである(AGG)₁₀について、二次元スピン拡散固体NMR法を適用した結果、Ala及びGly残基の二面角値は共に $(\phi, \psi) = (-90^\circ, 150^\circ)$ と決定された⁹が、そのスペクトルパターンと比べると、ピークが広幅化していた。そこで $(\phi, \psi) = (-90^\circ, 120^\circ)$ を70%、 β -sheet構造 $(\phi, \psi) = (-150^\circ, 150^\circ)$ を30%と仮定した際のスペクトルを計算した結果 (Fig. 2b)、非常によい一致を得た。この事より、(GGA)₃の構造は、Ala連鎖領域と存在することにより、一部 β -sheet構造に取り込まれるものの、概ね3₁-helix構造を形成していると言える。

【クモ牽引糸モデルペプチドIIの構造解析結果】 試料IIを、8M尿素へ溶解、アセトニトリルの滴下後に得られた沈殿物について、 ^{13}C CP/MAS NMR測定を行った結果、天然の牽引糸⁹のそれとほぼ一致を示し、また、各ピークの化学シフト値より、 β -sheet構造の形成が確認された。そこで次にペプチド内の局所的な構造について検討するため、安定同位体ラベルを導入した試料IIaのスペクトルを測定した。特にAlaC β のピークには三つの成分が検出され、各々の化学シフト値は、家蚕絹モデルペプチド(AG)₁₅をSilk II型 (β -sheet構造)に調整した試料や天然家蚕絹繊維に見られる不均一構造⁹のそれとほぼ等しいが、それらの割合は異なることが明らかになった。

【クモ糸類似タンパク質の構造解析結果】 試料IVaとIVbについて、TFA及びギ酸処理に伴う ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルの変化を、Fig.3にまとめた。試料IVaではAla連鎖長が短いために、 α -helix構造をとることができず、二つの処理で構造はかわらず、 β -sheet構造を主にとることがわかった (Fig.3a,b)。一方、試料IVbではAla連鎖長が長く、 α -helix構造をとることが可能となり (Fig.3c)、実際TFA処理では主に α -helixとなる (Fig.3d)。またギ酸処理では主に β -sheet構造となるので、処理法によって、Ala連鎖部位の構造をかえることができる。

なお発表では、flagelliform silkモデルペプチドである試料IIIの構造解析結果についても述べる。

【謝辞】 二次元スピン拡散固体NMR測定にご協力いただいたバリアンテクノロジー・ジャパンの芦田淳博士に感謝します。なお、本研究は一部、農林水産省「アグリバイオ実用化・産業化研究」及び(財)旭硝子研究助成金によって行われた。

【参考文献】

1. 朝倉哲郎、現代化学、2004年6月号、24-31(東京化学同人)。
2. Hölland, G. P.; Lewis, R. V.; Yarger, J. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5867-5872.
3. Asakura, T.; Ashida, J.; Yamane, T.; Kameda, T.; Nakazawa, Y.; Ohgo, K.; Komatsu, K., *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 291-305.
4. Nakazawa, Y.; Asakura, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7230-7237.
5. Ashida, J.; Ohgo, K.; Komatsu, K.; Kubota, A.; Asakura, T., *J. Biomol. NMR* **2003**, *25*, 91-103.
6. Simmons, A. H.; Ray, E.; Jelinski, L. W., *Macromolecules* **1994**, *27*, 5235-5237.
7. Asakura, T.; Yao, J.; Yamane, T.; Umemura, K.; Ulrich, A. S., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8794-8795.

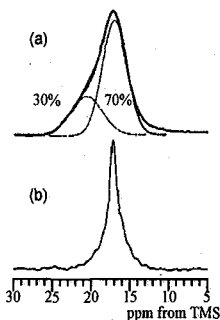


Figure 1. Expanded C β peaks of (a) the 21st Ala residue in the peptide Ia and (b) Ala residues in (AGG)₁₀ with 3₁-helix form reported previously.

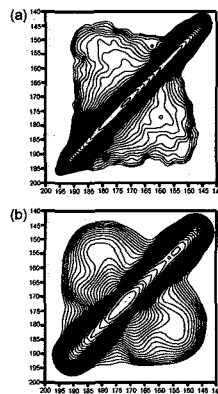


Figure 2. (a) 2D spin-diffusion NMR spectrum of the peptide Ib. (b) calculated spectrum by assuming 30% β -sheet and 70% 3₁-helix.

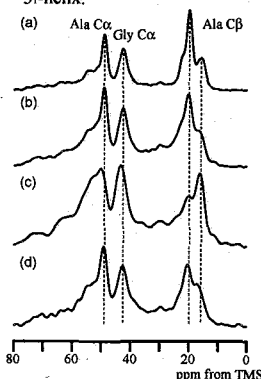


Figure 3. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of sample IVa: (a) treated with TFA and (b) treated with formic acid; and sample IVb: (c) treated with TFA and (d) treated with formic acid.

神経選択的サイレンサー結合因子 NRSF/REST と
mSin3B の相互作用解析

(横浜市大・院総理¹, 理研・GSC², 長寿研・分子遺伝学³)
○野村 充¹, 宇田 広子², 村井 清人³, 森 望³, 西村 善文¹

NMR study on the interaction of neural restrictive silencer factor (NRSF/REST) with mSin3B

○Mitsuru Nomura¹, Hiroko Uda², Kiyohito Murai³, Nozomu Mori³ and Yoshifumi Nishimura¹

¹Yokohama City Univ., Graduate School of Integrated Sci., ²RIKEN, Genomic Sciences Center, ³Natl. Inst. for Longevity Sci., Dept. Mol. Genetics

Neural restrictive silencer factor, NRSF (also known as REST) binds a neuronal cell type selective silencer element to mediate transcriptional repression of neuron-specific genes in non-neuronal cells and neuronal progenitors. NRSF/REST recruits the mSin3-HDAC complex and/or the CoREST-HDAC complex, which represses the neuronal gene expression by deacetylation of histone with remodeling of the chromatin structure. We found that the first paired amphipathic helix domain (PAH1) of mSin3B interacts with the N-terminal domain of NRSF/REST. Here we report on NMR study of the PAH1 domain of mSin3B complexed with a peptide comprising the NRSF/REST-N-terminal region.

【序】

NRSF/RESTは、神経選択的サイレンサーに結合し、非神経細胞もしくは未分化の神経細胞での神経特異的遺伝子の発現を抑える転写抑制因子である。NRSF/RESTのN末端側のドメインは、コリプレッサーmSin3を介してヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) をリクルートし、またC末端側のドメインではCoRESTを介してHDACをリクルートし、クロマチン構造を不活性化することで、転写を抑制することが示唆されている。我々は、NRSF/RESTのN末端数残基が、mSin3Bの4つのPAH (paired amphipathic helix) ドメインのうち、PAH1ドメインと相互作用することを明らかにした。更に原子レベルでの転写制御に関する知見を得るため、多核種多次元NMR法によりNRSF/RESTのSin3相互作用ドメインとmSin3BのPAH1ドメインの複合体の構造解析を行っている。今回は、複合体の二次構造と相互作用部位の解析結果について報告する。

キーワード NRSF/REST, mSin3, PAH1ドメイン, 相互作用解析, 転写

著者ふりがな のむら みつる, うだ ひろこ, むらい きよひと, もり のぞむ, にしむら よしふみ

【方法】

NRSF/REST の Sin3 相互作用ドメインは、シグマアルドリッチジャパン(株)により合成および精製された。mSin3B の PAH1 ドメインについては、大腸菌大量発現系を用いて、 ^{15}N もしくは $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識体を得た。ブルカー社製 Avance 700 を用いて、リン酸緩衝液中、温度 293K で mSin3B の PAH1 ドメインと NRSF/REST の複合体の構造解析を行った。mSin3B の PAH1 ドメインの主鎖の帰属には、2D ^1H - ^{15}N HSQC, 3D HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, HNCACB, 側鎖の帰属には、2D ^1H - ^{13}C HSQC, 3D HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, HCCH-COSY, CCH-TOCSY の各種スペクトルを用いた。NRSF/REST の Sin3 相互作用ドメインの帰属には、2D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -filtered NOESY, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -filtered TOCSY, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -filtered COSY の各種スペクトルを用いた。水素核間距離情報の収集には、2D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -filtered NOESY, 3D ^{15}N -edited NOESY, ^{13}C -edited NOESY, ^{13}C -filtered, ^{13}C -edited NOESY の各種スペクトルを用いた。また $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE を測定し、分子内運動から構造に関する情報を得た。

【結果と考察】

mSin3B の PAH1 ドメインの化学シフト値とランダムコイルの化学シフト値から作成した化学シフトインデックスと、隣接残基間および中位の ^1H - ^1H NOE より、複合体中の mSin3B の PAH1 ドメインは、4本の α ヘリックスから構成されていることが分かった。更に $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE より C 末端側に運動性の低いループ領域があることが示された。同様に NRSF/REST の Sin3 相互作用ドメインについても、化学シフトインデックスの作成と NOE の解析から、複合体中では α ヘリックス 1 本から構成されていることが判明した。また、主に疎水性残基間に分子間 NOE が観測されたことから、疎水的相互作用によって複合体が安定化していることが分かった。

現在、複合体の溶液構造を決定するため、更に NOE の収集と解析を行っている。

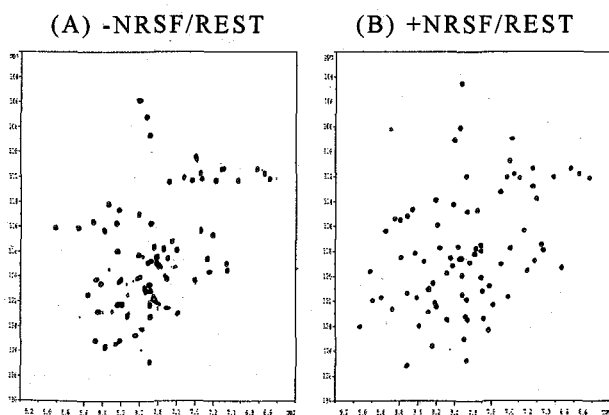


Figure 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of (A) free mSin3B PAH1 and (B) PAH1 in the presence of an equivalent amount of N-terminal region of NRSF/REST.

1P028★ 固体NMRによるエラスチンモデルペプチド(VPGVG)₆の精密構造解析

¹⁾農工大・工、²⁾バリアンテクノロジーズジャパン

○大郷耕輔¹⁾、芦田淳²⁾、朝倉哲郎¹⁾

Structural Analysis of an Elastin Model Peptide, (VPGVG)₆ with Solid State NMR

Kosuke Ohgo¹, Jun Ashida² and Tetsuo Asakura¹

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184-8588

²Varian Technologies Japan Ltd., Minato, Tokyo 108-0023 JAPAN

Tel&Fax: 042-388-7733 e-mail: asakura@cc.tuat.ac.jp

Recent advance in structural analysis of proteins and peptides with solid state NMR makes possible to study the precise structure of the essential sequences which are closely related to the function of these compounds. In general, such a sequence might be a mixture of several well-known secondary structures or might be different from the structure believed without detailed structural analysis. In this work, the structure of an elastin-mimetic model peptide, (VPGVG)₆, was determined with 2D spin-diffusion solid-state NMR and REDOR methods in order to study the detailed structure of the sequence VPGVG which has been considered to be the origin of elasticity of elastin. The torsion angles of the Pro residue were determined to be $(\phi, \psi) = (-60^\circ, 120^\circ)$, but there are several possible candidates of the torsion angles of the Gly residue prior to the Pro residue, indicating the heterogeneous structure for this residue.

【緒言】 固体NMR解析法の進歩に伴い、精密に構造を決定できるようになると、特定連鎖について、従来信じられてきた二次構造が間違っていたり、唯一の構造でなく構造の分布を有することが報告されるようになってきた。例えば、タンパク質において、特定連鎖の構造は、その機能と関連して語られることが多いことを考えると、特定連鎖の構造を詳細に検討することは極めて重要である。

エラスチンは生体組織の弾性を担う重要なタンパク質であるが、この一次配列中に見られる繰り返しの配列(VPGVG)_nについて、これまでに弾性を有するタンパク質設計のモデル系として多くの研究がなされてきた。実際、Poly(VPGVG)は弾性を示すが、構造をベースとした、その機能発現の議論は、βスパイラル構造 (typeII βターン構造を周期的に含む螺旋状構造)を仮定してなされてきたが¹⁾、ラマン分光法による結果は、Poly(VPGVG)の固体構造はむしろ、主にアモルファス成分から成ることを示しており、構造をベースとした機能発現の考察は異なることになる²⁾。このような観点から我々は、Poly(VPGVG)のモデルペプチド(VPGVG)₆について、固体NMR法による解析を進めた。その結果、15位のGly残基について、特定の二面角値をとらない不均一構造であることを明らかにした³⁾。また、Iowa大のHongらは、モデルペプチド(VPGVG)₃について、ターン構造と伸びきった構造が混在することを報告している⁴⁾。本研究では、各種、安定同位体ラベルモデルペプチド(VPGVG)₆を合成し、二次元スピンドiffusion固体NMR法及びREDOR法とを組み合わせて、より詳細な構造解析を行い、その結果に基づいて、エラスチンの弾性発現について検討する。

【実験】 Fmoc固相合成法により合成した一連のペプチド(VPGVG)₆をTable 1にまとめた。

Table 1. Several ¹³C and ¹⁵N-labeled (VPGVG)₆ for 2D spin-diffusion NMR and REDOR experiments.

Peptide	Method	Information
(VPGVG) ₂ [1- ¹³ C]V ₁₁ [1- ¹³ C]P ₁₂ GVG(VPGVG) ₃	Spin-diffusion	Pro ₁₂ (ϕ, ψ) Angle
(VPGVG) ₂ V[1- ¹³ C]P ₁₂ [1- ¹³ C]G ₁₃ VG(VPGVG) ₃	Spin-diffusion	Gly ₁₃ (ϕ, ψ) Angle
(VPGVG) ₂ VP[1- ¹³ C]G ₁₃ [1- ¹³ C]V ₁₄ G(VPGVG) ₃	Spin-diffusion	Val ₁₄ (ϕ, ψ) Angle
(VPGVG) ₂ VPG[1- ¹³ C]V ₁₄ [1- ¹³ C]G ₁₅ (VPGVG) ₃	Spin-diffusion	Gly ₁₅ (ϕ, ψ) Angle
(VPGVG) ₂ VPGV[1- ¹³ C]G ₁₅ [1- ¹³ C]V ₁₆ PGVG(VPGVG) ₂	Spin-diffusion	Val ₁₆ (ϕ, ψ) Angle
(VPGVG) ₂ [1- ¹³ C]V ₁₁ PG[¹⁵ N]V ₁₄ G(VPGVG) ₃	REDOR	[1- ¹³ C] V ₁₁ [¹⁵ N]V ₁₄ Distance

二次元スピンドiffusion固体NMR測定は、Mercuryplus400NMR分光計(Varian)を用い、Off MAS(54.7°-6.6°)条件下で行った(Mixing time:2s、試料回転速度:6kHz、室温で測定)。スペクトルシミュレーションの際の誤差評価は、 $\chi^2(\phi, \psi) = \frac{1}{\sigma^2} \sum_{i=1}^N [E_i - \lambda(\phi, \psi)S_i(\phi, \psi)]^2$ を用いて行った⁵⁾。

エラスチン・二次元スピンドiffusion固体NMR法・REDOR法・不均一構造
おごうこうすけ、あしだじゅん、あさくらてつお

REDOR測定は、CMX Infinity400NMR分光計(Chemagnetics Co.)に三重共鳴プローブを用いて行った。試料回転速度は6kHzで行い、Evolution timeは24msまで測定した。

【結果・考察】

【Pro残基の内部回転角】

二次元スピン拡散固体NMR測定結果をFig.1に、 χ^2 マップをFig.2に示した。12位のPro残基の二面角値に依存したスペクトルパターン(Fig.1a)より算出した χ^2 マップでは、極小点が複数現れるが、Pro残基の構造制限から、 $(\phi, \psi) = (-60^\circ, 120^\circ)$ 付近の極小領域をとる。これは理想的なtype II β ターン構造を形成する際の、Pro残基の二面角値と一致する。

【Gly残基(Pro-Gly)の内部回転角】

一方、13位のGly残基の二面角値に依存したスペクトルパターン(Fig.1b)より算出した χ^2 マップにおいても、極小点が複数現れる。タンパク質中において、Pro-Gly配列のとりうる構造はtype II β ターン構造が圧倒的に多いが、その際のGly残基の二面角値 $(\phi, \psi) = (90^\circ, 0^\circ)$ 付近での χ^2 値は、比較的高く、理想的なtype II β ターン構造の形成は考えられない。またGly残基は他の残基に比べ立体障害が少なく、とりうる二面角値の範囲が広いため、 χ^2 マップのみでの二面角値特定は難しい。

そこで次にREDOR法による距離制限から、構造の制限を試みた。試料のラベルサイト間距離は、Pro及びGly残基の二面角値に依存する。REDOR測定で得られた結果を、均一な構造由来として見積もった場合、その距離は5.1-5.2 Åとなった。Pro残基の二面角値を $(\phi, \psi) = (-60^\circ, 120^\circ)$ と仮定すると、原子間距離よりGly残基の二面角値が制限され(Fig.2b点線)、 χ^2 マップと比較すると、 $(\phi, \psi) = (60^\circ, -90^\circ)$ 付近が双方を満たす解となりうる。しかしながら、この二面角値から形成される構造は、エネルギー的に非常に不安定である。従って、13位のGly残基の二面角値に依存した二次元スピン拡散固体NMRスペクトルパターンは、均一の二面角値を反映したのではなく、分布を有した構造を反映していると考えられる。

現在、Pro及びGly残基について、その ψ 角に依存する原子間距離をREDOR法により測定、解析を行っている。また、他の残基についても、二次元スピン拡散固体NMR法による構造解析を行っており、発表ではそれらも併せて、(VPGVG)₆の分子鎖構造ならびにエラスチンの弾性発現について検討する。

【謝辞】本研究は一部、昆虫テクノロジープロジェクト、科研費「基礎研究B」及び(財)旭硝子研究助成金によって行われた。

【参考文献】

- (1) Urry, D. W. *J. Protein Chem.* **1988**, *7*, 1-34.
- (2) Rodriguez-Cabello, J. C.; Alonso, M.; Diez, M. I.; Caballero, M. I.; Herguedas, M. M. *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 1831-1838.
- (3) Asakura, T.; Ashida, J.; Ohgo, K. *Polymer J.* **2003**, *35*, 293-296.
- (4) Yao, X. L.; Hong, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4199-4210.
- (5) Blanco, F. J.; Tycko, R. *J. Magn. Reson.* **2001**, *149*, 131-138.

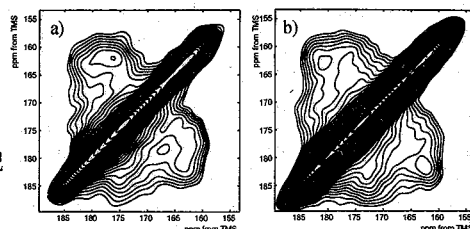


Figure 1. 2D spin-diffusion NMR spectra of a) (VPGVG)₂[1-¹³C]V₁₁[1-¹³C]P₁₂GVG(VPGVG)₃ and b) (VPGVG)₂V[1-¹³C]P₁₂[1-¹³C]G₁₃VG(VPGVG)₃ in the solid state.

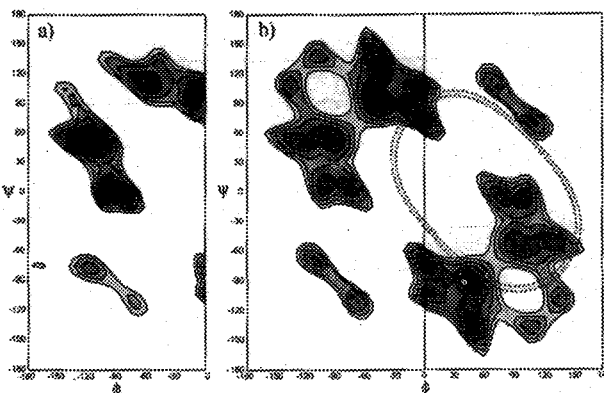


Figure 2. χ^2 maps between simulated and experimental 2D spin-diffusion NMR spectra of a) (VPGVG)₂[1-¹³C]V₁₁[1-¹³C]P₁₂GVG(VPGVG)₃ and b) (VPGVG)₂V[1-¹³C]P₁₂[1-¹³C]G₁₃VG(VPGVG)₃ as a function of the torsion angles ϕ and ψ . The black areas mean the torsion angles with small χ^2 values. The area surrounded by two broken lines satisfies the ¹³C—¹⁵N distance for (VPGVG)₂[1-¹³C]V₁₁PG¹³N₁₃VG(VPGVG)₃ of 5.1-5.2 Å determined by REDOR experiment.

タンパク質微結晶を用いた固体 NMR によるタンパク質-DNA 相互作用の研究
(理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター¹、横浜市立大学大学院 総合理学
研究科²、理化学研究所 遺伝生化学³)

○畑中 稔¹、本多賢吉²、石部聡子³、美川 務^{2,3}、伊藤 隆^{2,3}、柴田武彦^{2,3}、
山崎俊夫¹

Protein-DNA interaction studies by solid-state NMR enhanced using microcrystallization

(Genomic Sciences Center, RIKEN¹; Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University²; Cellular and Molecular Biology Laboratory, RIKEN³)

○Minoru Hatanaka¹, Masayoshi Honda², Satoko Ishibe³, Tsutomu Mikawa^{2,3}, Yutaka Ito^{2,3}, Takehiko Shibata^{2,3},
Toshio Yamazaki¹

Recently, a number of solid-state NMR experiments have been performed using microcrystallized proteins for obtaining intensively improved spectra in resolution and sensitivity. Microcrystallization of proteins is relatively easier than making a large single crystal that is essential to X-ray crystallography. In our research we introduced the microcrystallization for investigating interactions of RecA-DNA complex and obtained improvements in the quality of spectra. RecA protein is essential to homologous genetic recombination and DNA repair. The molecular structure of RecA has been determined by X-ray crystallography in 1992. However the structure of two loop regions of the protein have not yet determined, which are thought to be DNA binding sites. In spite of needs for the complete structure of the protein, solution NMR is also not amenable to this protein due to formation of a large protein filament in solution even at low concentration. In contrast with these methods, solid-state NMR is suitable for this kind of proteins, and moreover introduction of microcrystallization becomes essential for this research.

【序】 固体 NMR でタンパク質の高分解能スペクトルを得るために、微結晶化した試料を用いる実験が最近多く見られるようになってきた。タンパク質の微結晶は単結晶よりも容易に調製することが可能であり、著しいスペクトル分解能、感度の向上をもたらす。本研究では遺伝子相同組換えタンパク質 RecA の DNA 認識ダイナミクスを、これまでは再水和した凍結乾燥試料で固体 NMR によって研究を行ってきたが、測定試料の不均一性、長時間測定に対する不安定性などから十分な分解能を持ったスペクトルを得ることができなかった。しかし今回、微結晶試料で実験を行ったところ著しい状況の進展がみられた。

RecA (MW=37,842; 352amino acids)の構造は 1992 年に Story らによる X 線結晶構造解析により決定されたが、最初に結合する single-stranded DNA (ssDNA)の結合領域と考えられている 2 本のループ (L1, L2 ループ) は低電子密度のために現在も明かになっていない。原子レベルでの構造情報を与えるもう一つの手法である溶液 NMR では RecA が比較的低濃度でもフィラメントを形成することからその対象としては不適切である。こうしたことから固体 NMR は RecA およびその DNA 複合体の研究に適しており、前述のタンパク質試料の微結晶化を導入することで新たな知見を得ることができたのでそれを報告する。

【実験】 DNA と RecA の L2 ループの相互作用を調べるため L2 ループの中央に位置する Phe203 を Trp で部位特異的アミノ酸置換した RecA(F203W)を用いた。大腸菌由来の野生型 RecA(WT)は Trp を 2 個しか持たず、それらはループ領域に存在しないので、RecA(F203W) と RecA(WT)の NMR スペクトルを比較することで L2 ループの構造と運動を議論することができる。そのために Trp の indole-窒素とアミド窒素を ¹⁵N で同位体標識した試料、[¹⁵N₂]Trp-RecA(WT)、[¹⁵N₂]Trp-RecA(F203W)を調製した。タンパク質微結晶は RecA に特異的な沈殿剤である spermidine、または Crystal Screening Kit (Hampton Research)で screening を行い、良好な微結晶を得た 8% PEG8000, 0.1M Tris-HCl pH8.5 で得られた。

キーワード：タンパク質微結晶、固体NMR、RecA、タンパク質-DNA相互作用

はたなか みのる、ほんだ まさよし、いしべ さとこ、みかわ つとむ、いとう ゆたか、しばた たけひこ、
やまざき としお

RecA-ssDNA complex の形成は我々のグループで単結晶を作る際に ssDNA として用いている dT14 (deoxythymidylic acid; 14mer)で行い、微結晶試料を調製した。 ^{15}N -CPMAS、 ^{15}N [^{31}P]-REDOR、 ^{31}P [^{15}N]-REDOR の固体 NMR 測定は Chemagnetics CMX Infinity plus 400 を用いて行った。

【結果 & 考察】 Fig.1.(a)-(c)は昨年の本討論会で報告した再水和した凍結乾燥 RecA の ^{15}N -CPMAS スペクトルである。(a)[indole- ^{15}N]Trp-RecA(WT)から Trp の indole- ^{15}N に由来すると思われる小さなピークを(b)[$^{15}\text{N}_2$]Trp-RecA(WT)、(c)[$^{15}\text{N}_2$]Trp-RecA(F203W)で推察できるが、大きな backbone- ^{15}N のシグナルのためその存在を確認することは困難であった。

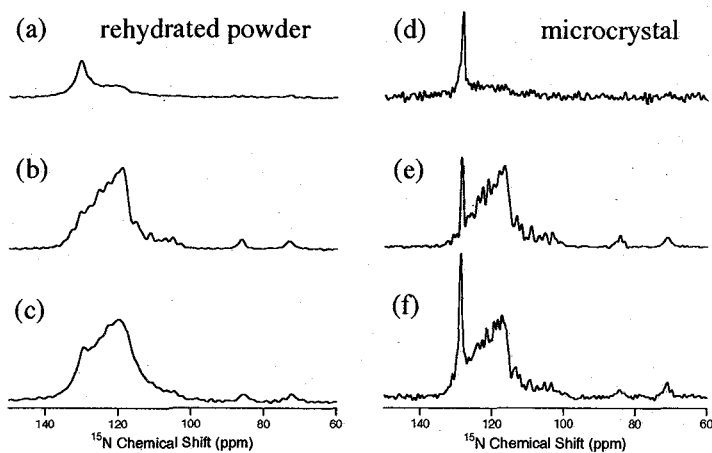


Fig.1. ^{15}N -CPMAS spectra of (a)[indole- ^{15}N]Trp-RecA(WT), (b)[$^{15}\text{N}_2$]Trp-RecA(WT), and (c)[$^{15}\text{N}_2$]Trp-RecA(F203W) in rehydrated sample condition recorded with 10 kHz of spinning frequency at 273 K. ^{15}N -CPMAS spectra of (d)[indole- ^{15}N]Trp-RecA(WT), (e)[$^{15}\text{N}_2$]Trp-RecA(WT), and (f)[$^{15}\text{N}_2$]Trp-RecA(F203W) in microcrystallized sample condition recorded with 10 kHz of spinning frequency at 273 K.

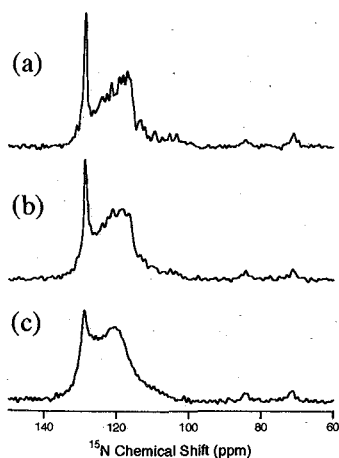


Fig.2. ^{15}N -CPMAS spectra of (a) [$^{15}\text{N}_2$]Trp-RecA(F203W), (b) [$^{15}\text{N}_2$]TrpRecA(F203W)-dT14 complex, and (c) Trp-RecA(F203W)-dT14-ATP γ S complex recorded with 10 kHz of spinning frequency at 273 K

それに対し微結晶 RecA では indole- ^{15}N のシャープなピークを観測することができ、その強度はそれぞれのタンパク質に含まれる Trp の個数に比例していることがわかる。比較的容易に調製できる微結晶から、このように著しいスペクトル分解能の向上が得られることを結果は示している。

今度は Trp203 が実際に DNA と相互作用をしていることを確かめるための実験を

Fig.2.で行った。Fig.2(a)は ssDNA 結合前のスペクトルである。次に RecA に ssDNA を加えたところ Trp のピークが少し弱くなり、backbone のシグナルに変化がみられたが、大きな変化は見られていない (Fig.2(b))。しかし、ssDNA の伸長を誘起することが知られている ATP γ S を加えると Trp のピークが大きく減少した (Fig.2(c))。このような大きな変化は ssDNA の backbone の ^{31}P のシグナルを ^{31}P -CPMAS で測定したときにもケミカルシフトの変化として観測された。このことから RecA が ATP γ S と結合し active form を形成することで、RecA 及び ssDNA に何らかの変化が生じていると考えられる。更に、こうした変化が Trp203 と ssDNA の直接的相互作用によるものかを調べるために Rotational Echo Double Resonance (REDOR)で Trp の indole- ^{15}N と ssDNA の backbone の ^{31}P 間の原子間距離の測定を現在行っている。本討論会では他の変異タンパク質での結果も含め報告する。

p47^{phox} タンDEM SH3 ドメインと p22^{phox} 由来ペプチド複合体の NMR による
溶液中での立体構造

(北大院薬¹, 九大生医研²)

○小椋賢治¹, 鳥飼真之介¹, 湯澤聰¹, 才川和也¹, 住本英樹², 稲垣冬彦¹

NMR Solution Structure of the Tandem SH3 Domains of p47^{phox} Complexed with p22^{phox}-Derived Peptide

Kenji Ogura¹, Shinnosuke Torikai¹, Satoru Yuzawa¹, Kazuya Saikawa¹, Hideki Sumimoto², and Fuyuhiko Inagaki¹

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University¹,
and Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University²

The superoxide-generating NADPH oxidase of phagocytes is activated through interaction between p47^{phox} and p22^{phox}, where the tandem SH3 domains of p47^{phox} is thought to cooperatively interact with a proline-rich region (PRR) of p22^{phox}. To investigate such a novel inter-molecular recognition mode, we determined the solution structure of the p47^{phox} tandem SH3 domains complexed with p22^{phox} PRR. We prepared the ¹³C/¹⁵N-labeled tandem SH3 domains of p47^{phox} (138 residues) and the p22^{phox}-PRR peptide (25 residues) by *E. coli*. A suit of triple resonance experiments were performed on a Varian UNITY INOVA 800 spectrometer. The solution structure of the complex was calculated with ARIA/CNS software which revealed that the core region of the p22^{phox} PRR peptide adopted a typical polyproline-type-II helix (PPII). PPII was recognized through the single binding groove formed by the conserved binding surface of both SH3 domains. Moreover, the C-terminal region of the peptide formed a short helix and interacted with the N-terminal SH3 domain. The result is consistent with the notion that the N-terminal SH3 domain plays a major role for the complex formation.

【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DEM SH3) は、分子内マスクされ

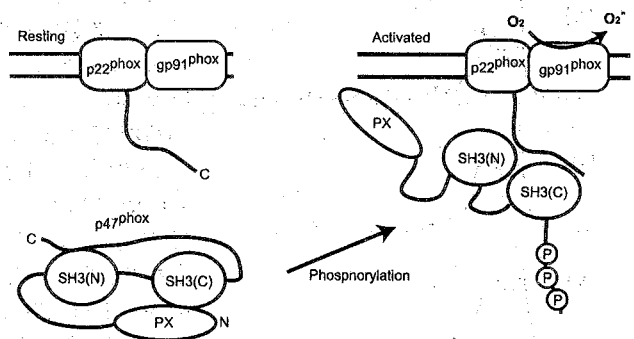


Fig. 1 Interaction mechanism of p47^{phox} and p22^{phox}

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

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

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ことが示唆されている。本研究の目的は、p47^{phox} のタンデム SH3 ドメイン—p22^{phox} PRR 複合体の立体構造を NMR を用いて解析することである。

【実験】¹⁵N および ¹³C/¹⁵N 均一ラベル p47^{phox} タンデム SH3(138 残基)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。NMR 滴定実験および蛍光滴定実験のための各種 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 残基)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 800, 600 および Unity Plus 600 分光計を用いて 25°Cにておこなった。¹H-¹⁵N 間の RDC 測定は、PEG(C12E5)/hexanol (r=0.85)による液晶配向媒体にておこなった。立体構造計算には、3D ¹³C-および ¹⁵N-edited NOESY 由来の距離制限、TALOS 由来の二面角制限、および RDC 制限を用いて、Red Hat linux 9 で動作する PC クラスタ (Athlon 2400+ X 10 CPUs)にて ARIA ver.1.2 および CNS ver.1.1 を使用した。

【結果】¹⁵N ラベル p47^{phox} タンデム 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った。その結果、両者の結合には、p22^{phox} の PRR 部位(10 残基)だけでなく、それに続く塩基性アミノ酸領域も必須であることがわかった。NMR 滴定実験で判明した p22^{phox} の必須領域ペプチド(20 残基)と p47^{phox} タンデム SH3 の affinity を蛍光滴定実験で測定したところ、K_d=640nM であった。この値は、SH3 による標的分子認識としては異例に強い数値である。

p47^{phox} タンデム 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} タンデム 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} タンデム 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示唆する。

つづいて、¹³C/¹⁵N ラベル p47^{phox} タンデム 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} タンデム SH3 ドメインの信号

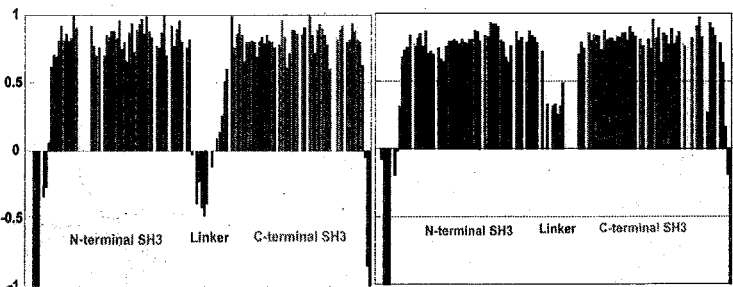


Fig.2 [¹H]-¹⁵N NOE of p47^{phox} tandem SH3 domain. (Left) peptide-free. (Right) p22^{phox}-peptide complex.

帰属を完了した。また、ノンラベル p47^{phox} タンデム 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(図3)。さらに、¹⁵N-edited NOESY 解析結果から、p22^{phox} ペプチドの PRR 領域後方の塩基性アミノ酸領域が短い α ヘルックスを形成していることがわかった(図4)。NOESY 由来の水素原子距離(3784), RDC(91), および TALOS による ϕ ψ 角度制限(109)に基づいて、p47^{phox} タンデム SH3 ドメインと p22^{phox} ペプチド複合体の溶液中での立体構造を決定した。エネルギー的に安定な 20 構造の重ね合わせおよびリボン図を、図5 および図6に示す。立体構造の RMSD は主鎖(N, C α , C')で 0.41 Å, 全重原子で 0.75 Å であった。この立体構造では、比較的柔軟なリンカー領域で繋がれたふたつの SH3 ドメインが、n-Src loop 部位と 3₁₀-helix 部位で互いに組み合っていた。そして、ふたつの SH3 ドメインが対向するように配置して形成されたドメイン間の溝に、ちょうど p22^{phox} ペプチドが挟みこまれるように結合していることがわかった。また、p22^{phox} の短い α ヘルックスは、p47^{phox} の N 末端側 SH3 ドメインと相互作用していることがわかった。

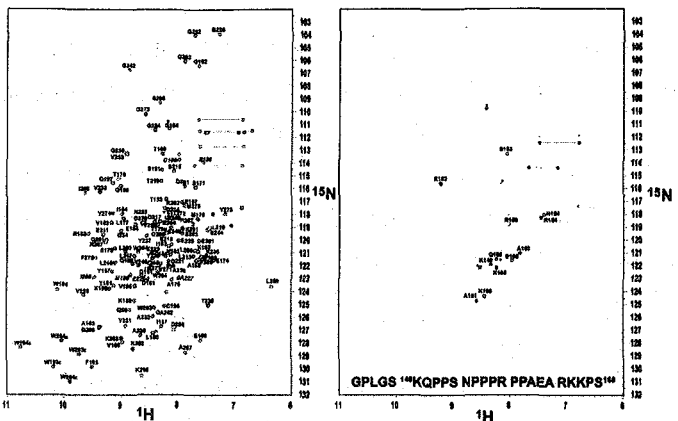


Fig.3 ¹H-¹⁵N HSQC spectra of p47^{phox} tandem SH3 domain complexed with p22^{phox} peptide. (Left) ¹⁵N-p47 + nonlabeled p22, (right) nonlabeled p47 + ¹⁵N-p22.

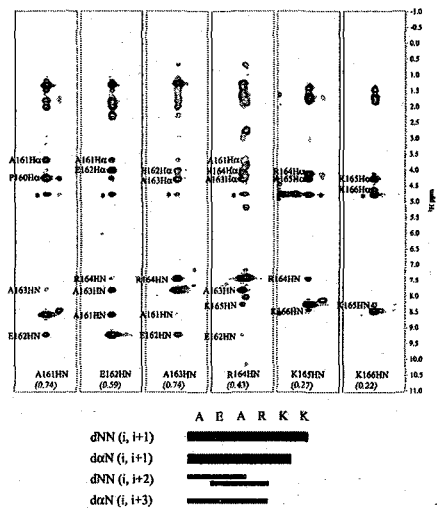


Fig.4 (Top) Strips of 3D NOESY spectrum of p22^{phox}-peptide and (bottom) Distance connectivity map from A161 to K166

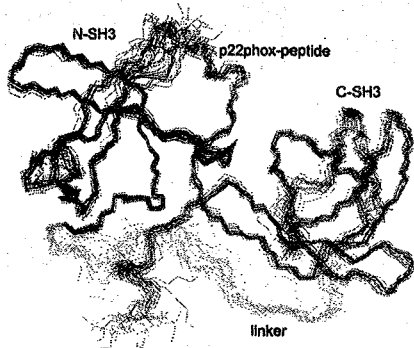


Fig. 5 Overlay of 20 structures of the tandem SH3 domains complexed with p22^{phox}-peptide.

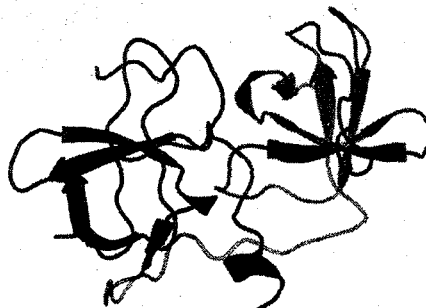


Fig. 6 Ribbon diagram of the tandem SH3 domain of p47^{phox} complexed with p22^{phox}-peptide.

図7に、N-SH3ドメインの p22^{phox} 結合面を示す。N-SH3ドメインは、Trp193, Tyr167, Pro206, Ser208, および Phe209 残基によって、他の SH3ドメインと共通の正則の結合面を形成している。p22^{phox} PRR ペプチドの Pro155 から Pro160 の領域がプラス配向(クラスIIリガンド)で結合して、ポリプロリンタイプ2ヘリックスを形成している。p22^{phox} ペプチドの Pro152 は N-SH3 の Trp193 および Trp204 の側鎖によって形成されたポケットに結合している。先に示したように、p22^{phox} ペプチドの C 末端側領域の Ala161, Glu162, Ala163 および Arg164 は短い α ヘリックスを形成して、N-SH3ドメインと相互作用している。heteronuclear NOE の結果から、Lys165 以降の残基は、主鎖の運動性が高く、特定のコンフォメーションは持っていないと推定される。p22^{phox} ペプチドの C 末端側残基は、Ala163 による疎水的な相互作用が主体となって、N-SH3 に結合しているようだ。全体的に見て、p22^{phox} ペプチドは N-SH3 に巻き付くように結合しており、N-SH3 は p22^{phox} ペプチドの N 末端側、中央部、および C 末端側の領域のすべてを認識している。この結合様式は、p47^{phox} - p22^{phox} 分子間相互作用において、C-SH3 よりも N-SH3 が中心的な役割を担っていることを説明できる。

図8に、C-SH3ドメインの p22^{phox} 結合面を示す。C-SH3ドメインは、Trp263, Tyr237, Pro276 および Tyr279 残基によって、p22^{phox} PRR ペプチド結合面を形成している。p22^{phox} PRR ペプチドは、マイナス配向(クラスIIリガンド)をもって Pro155 から Arg158 の領域が結合しているが、Pro152 および Ser153 は結合していない。Ser153 は、N-SH3 と C-SH3 のどちらとも強い相互作用を持っていない。Pro152 は、N-SH3 に結合しており、C-SH3 から離れた位置にある。C-SH3 の Met278 の長い側鎖が邪魔になって、p22^{phox} ペプチドの N 末端側領域は、C-SH3 に結合することができず、N-SH3 に結合しやすい配向をとっている。多くの SH3ドメインでは、Met278 に対応する位置には、Serine や Asparagine などの比較的小さい親水性側鎖を持つアミノ酸が配置されていることが多い。この位置に比較的大きな疎水性側鎖をもつメチオニンが挿入されているのは、p47^{phox} の C-SH3 が唯一の例である。p22^{phox} ペプチドの Arg158 は、C-SH3 に対する結合のマイナス配向を決定づける重要な役割を担っている。Arg158 側鎖は、Asp243, Glu244 および Tyr274 側鎖と強く結合している。

全体的に見て、C-SH3 は、p22^{phox} ペプチド認識に関して、N-SH3 よりも少ない相互作用を持っていることがわかった。

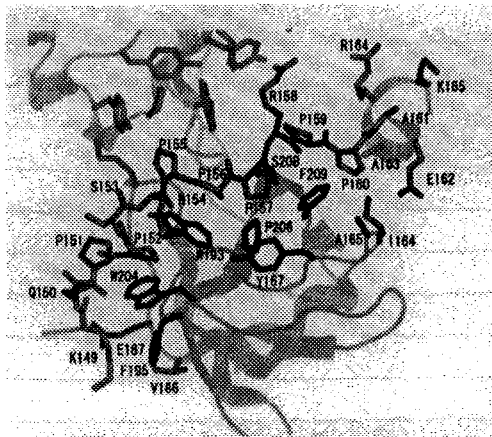


Fig.7 p22^{phox}-peptide binding sites of N-SH3 domain of p47^{phox}.

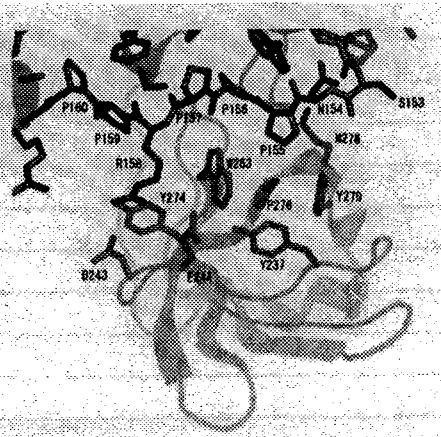


Fig.8 p22^{phox}-peptide binding sites of C-SH3 domain of p47^{phox}.

(筑波大院数物¹、長岡高専物質工²)○長尾 聡¹、平井佑紀¹、木村 英昭¹、三田 肇¹、長友 重紀¹、山本泰彦¹、鈴木秋弘²**¹⁹F NMR Relaxation Study of Hemoprotein Reconstituted with Fluorinated Hemes**○S. Nagao¹, Y. Hirai¹, H. Kimura¹, H. Mita¹, S. Nagatomo¹, Y. Yamamoto¹, and A. Suzuki²¹Graduate School of Pure and Applied Sci., Univ. of Tsukuba²Dept. of Materials Eng., Nagaoka Natl. Coll. of Tech.

¹⁹F NMR can be used for the structural characterization of active sites of various *b*-type hemoproteins reconstituted with fluorinated heme. ¹⁹F NMR signals observed for reconstituted proteins possessing a heme with a CF₃ group as a peripheral side-chain were much sharper than those for the proteins possessing a heme with F group directly bound to the porphyrin ring. Theoretical calculation using model molecules indicated that fast internal rotation of CF₃ group greatly diminishes the chemical shift anisotropy(CSA) contribution to ¹⁹F NMR relaxation.

序 論

ミオグロビン(Mb)など天然の*b*型ヘムタンパク質にフッ素を側鎖にもつヘムを導入すると、¹⁹F NMR 測定によりヘムタンパク質の活性部位の電子構造の変化を高感度に検出することができる。私共は従来の研究により、Fig. 1 に示した CF₃ 基をもつ 7-PF と F 基をもつ 2-MF を導入した Mb の様々な配位状態における ¹⁹F NMR スペクトルを比較した結果、CF₃ 基のシグナルは F 基と比較して極めてシャープに観測される事を明らかにしている。一般的に、化学シフト異方性(CSA)による緩和の寄与がフッ素の緩和に対して支配的であるため、分子運動が遅くなる程、また磁場強度が高くなる程 CSA の影響は大きくなり、シグナルの線幅は増大する。そこで、CF₃ 基のシグナルの線幅が F 基よりも狭く観測された理由には、CF₃ 基のフッ素が F 基よりも CSA の大きさが小さい事と、あるいは CF₃ 基の速いタイムスケールの内部回転運動が CSA による緩和の寄与を減少させている事が考えられた。本研究では、この CF₃ 基と F 基の CSA の寄与を見積もるため、モデル分子の分子軌道(MO)計算を行った。さらに理論計算から CF₃ 基の内部回転運動と分子の等方回転運動の速度がフッ素の CSA 緩和と与える影響をそれぞれ評価した。これらの事から CF₃ 基の導入により、高分子量のヘムタンパク質の構造解析における ¹⁹F NMR の可能性について考察した。

実 験

Fig. 1 に示したフッ素化ヘム 7-PF と 2-MF をマッコウジラ Mb のアポタンパク質に組み込み、常法により CO が配位した MbCO(7-PF Mb, 2-MF Mb)を調製し、Bruker AVANCE DRX-400 及び 500 を用いて ¹⁹F NMR 測定を行った。MO 計算では、実験に用いたフッ素化ヘムのモデル分子である CF₃ 基及び F 基を側鎖にもつポルフィン分子について、基底関数 B3LYP/6-311G を用いた構造最適化、エネルギー計算を行いフッ素核の遮蔽テンソルの主値を求めた。さらに、過去に報告されている理論計算式(William. E. Hull, Brian D. Sykes, *J. Mol. Biol.*, **98**, 121-153(1975))に MO 計算によって得られたパラメータを代入して、線幅への CSA 緩和の寄与を計算した。

Keyword : ¹⁹F NMR, ヘムタンパク質, 計算化学, 化学シフト異方性, 電子構造

ながお さとし、ひらい ゆうき、きむら ひであき、みた はじめ、ながとも しげのり、やまもと やすひこ、すずき あきひろ

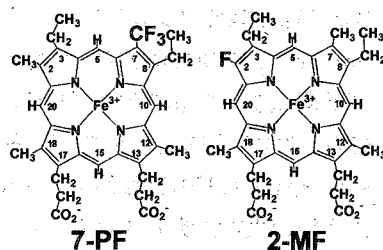


Fig. 1 Molecular structure of fluorinated heme used in this study.

結果と考察

7-PF Mbと2-MF Mbを376 MHz及び470 MHzの異なる磁場強度下で測定した ^{19}F NMRシグナルをFig. 2に拡大して示す。それぞれのシグナルの半値幅($\Delta\nu_{1/2}$)は376 MHzの磁場強度下において7-PF Mbは12.5 Hz、2-MF Mbは68.5 Hzであり、470 MHzの磁場強度下ではそれぞれ19.3 Hz、93.1 Hzであった。磁場強度の違いによる線幅の差は、2-MFよりも7-PFの方が小さい。この結果は、 CF_3 基のフッ素はF基よりも大きなCSAをもっている、または CF_3 基の内部回転運動がCSA緩和の寄与を減少させている可能性を示唆している。

そこで、 CF_3 基とF基のフッ素についてCSAをMO計算によって求めたところ、両者のCSAの値に大きな差は見られなかった。次に、側鎖に CF_3 基をもつポルフィン分子について、分子の等方回転運動の相関時間(τ_c)をMbと同じタイムスケールの 1.0×10^{-8} sに固定し、 CF_3 基の内部回転運動の相関時間(τ_i)を実際の CF_3 基の運動の 1.0×10^{-12} sからほぼ運動が止まっていると考えられる1.0 sまで変化させてCSA緩和の線幅への寄与を計算した(Table 1)。

Table 1 Calculated linewidths of ^{19}F relaxation due to CSA for perfluoromethylporphine at 376 and 470 MHz.

^{19}F NMR frequency	τ_i (s)								
	1.0×10^{-12}	1.0×10^{-11}	1.0×10^{-10}	1.0×10^{-9}	1.0×10^{-8}	1.0×10^{-7}	1.0×10^{-6}	1.0	
376 MHz	17.8	17.9	18.5	22.1	39.0	63.6	71.6	72.8	
470 MHz	27.9	28.0	28.9	34.2	60.9	99.3	111.9	113.7	

The linewidths are given in Hz.

τ_i が1.0 sの場合の線幅は、376 MHzでは72.8 Hz、470 MHzでは113.7 Hzと求められた。一方、 τ_i が 1.0×10^{-12} sの場合の線幅はそれぞれ17.8 Hz、27.9 Hzと求められた。この結果から、 CF_3 基の速い内部回転運動がCSA緩和の線幅への寄与を大幅に減少させている事が明らかとなった。また、高速で運動している場合はCSA緩和に対する磁場強度の影響が小さい事が明らかとなった。次に、 CF_3 基及びF基をそれぞれ側鎖にもつポルフィン分子について、分子の等方回転運動速度の違いがCSA緩和に与える影響を評価するために、 τ_i を 1.0×10^{-12} sに固定し、 τ_c をMbと同じタイムスケールの 1.0×10^{-8} sから分子量10万以上のタンパク質の運動のタイムスケールである 1.0×10^{-7} sまで変化させた計算を行った(Table 2)。

Table 2 Calculated linewidths of ^{19}F relaxation due to CSA for perfluoromethylporphine and fluoroporphine.

Complex	τ_c (s)									
	1.0×10^{-8}	2.0×10^{-8}	3.0×10^{-8}	4.0×10^{-8}	5.0×10^{-8}	6.0×10^{-8}	7.0×10^{-8}	8.0×10^{-8}	9.0×10^{-8}	1.0×10^{-7}
Perfluoromethylporphine	27.9	55.7	83.5	111.3	139.2	167.0	194.8	222.7	250.5	278.3
Fluoroporphine	84.1	168.1	252.1	336.2	420.2	504.2	588.3	672.3	756.3	840.4

The linewidths are given in Hz at 470 MHz.

CF_3 基を側鎖にもつポルフィン分子において、CSA緩和による線幅は τ_c が 1.0×10^{-8} sの場合27.9 Hz、 1.0×10^{-7} sでは278.3 Hzであったのに対し、F基を側鎖にもつポルフィン分子ではそれぞれ84.1 Hz、840.4 Hzと求められた。理論計算によって得られた線幅の値とMbのNMR測定によって得られた値はほぼ一致しており、この理論計算による線幅の評価が妥当である事が示された。このことから、フッ素を CF_3 基としてもつヘムを観測対象のヘムタンパク質に導入した場合には、分子量が10万以上のタンパク質においても ^{19}F NMRシグナルは約300 Hzの線幅で検出可能であることが理論計算から示され、 CF_3 基を導入することにより構造解析が可能となると期待される。

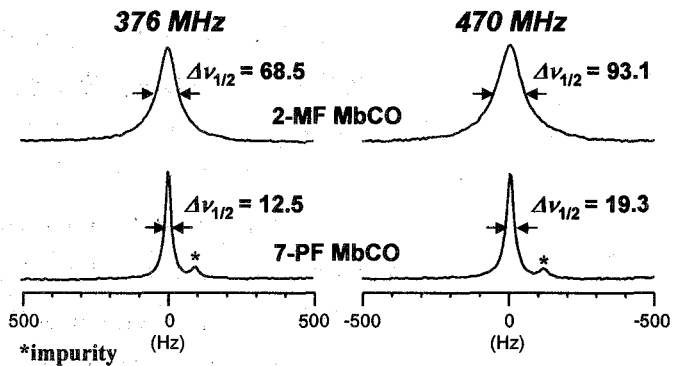


Fig. 2 Linewidths of 376 and 470 MHz ^{19}F NMR signals observed for MbCO reconstituted with 7-PF and 2-MF.

○山路奈保子¹、Li Dai¹、菅瀬謙治¹、Marta Andriantsiferana²、
中嶋暉躬¹、岩下孝¹

Three-dimensional Structure of Scorpion Toxin Peptide IsTX

¹Suntory Institute for Bioorganic Research, 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho,
Mishima-gun, Osaka, 618-8503,

²University of Antananarivo

Nahoko Yamaji¹, Li Dai¹, Kenji Sugase¹, Marta Andriantsiferana², Terumi Nakajima¹,
Takashi Iwashita¹

The peptide IsTX obtained from the venom of the Madagascar scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*, has 41 amino acid residues and 4 disulfide bridges. It has been found in male venom but not in female venom. This peptide has high sequential similarity with HsTX1 (*Heterometrus spinifer* toxin 1), which has high affinity for voltage-gated potassium channel (Kv1.3). However the affinity of IsTX is 10,000-fold lower than that of HsTX1. In order to investigate the difference of the affinity, three-dimensional structure of IsTX was revealed using solution NMR and compared with HsTX1.

【序】

IsTX はマダガスカル産サソリ (*Opisthacanthus madagascariensis*) の毒液から単離されたアミノ酸 41 残基のペプチドで、4 本のジスルフィド結合を有している。また、このペプチドは雄の毒液に存在しており雌の毒液には存在していない。IsTX は電位依存性カリウムチャンネル (Kv1.3) に対して非常に高い親和性を示す HsTX1 (*Heterometrus spinifer* toxin 1) とシークエンスの相同性が高い。しかし、IsTX のカリウムチャンネルに対する親和性は HsTX1 の一万倍弱い。活性の違いの原因を調べるために溶液 NMR を用いて IsTX の立体構造解析を行い、HsTX1 の構造と比較した。

キーワード：カリウムチャンネル、サソリ毒ペプチド、立体構造、溶液 NMR

発表者ふりがな：やまじなほこ、Li Dai、すがせけんじ、Marta Andriantsiferana、
なかじまてるみ、いわしたたかし

【実験】

測定サンプルは化学合成により調製した IsTX を用い、4.7 mM (H₂O/D₂O:9/1、pH 3.9) に調製した。すべての NMR 測定には Bruker Biospin 社製 DMX-750、DMX-500 の装置を用い、298 K で各種 2 次元 ¹H-NMR 測定 (DQF-COSY、TOCSY、NOESY) を行った。スペクトルの帰属、構造計算には Ansig、X-PLOR を用いた。

【結果と考察】

IsTX の立体構造を Fig. 1 に示す。解析の結果、IsTX は 1 本の α -ヘリックスと 3 本の β シートがジスルフィド結合で安定化された構造をとっていた。IsTX はアミノ酸配列の相同性から、サソリ毒ペプチドファミリーの α -KTX6 サブファミリーに属する。その中でも HsTX1 とはアミノ酸相同性が最も高い。HsTX1 と構造、活性を比較すると、得られた立体構造は HsTX1 と主鎖の構造がほぼ同じであったため、Kv1.3 に対する活性の違いは側鎖の配置の違いによる静電ポテンシャルの差であると考えられた。その上 IsTX は HsTX1 に比べ、N 末端が 4 残基長く、 β シートを 1 本多く形成していることと、C 末端の疎水性の 2 残基が多いため、これらがチャンネルに結合する際の障害になっていた。

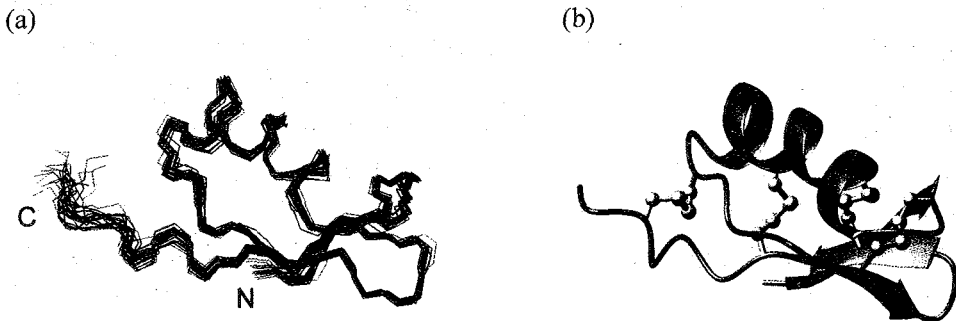


Fig.1 Three-dimensional structure of IsTX. (a) Superposition of 20 best structures.

(b) A ribbon diagram of the structure of the lowest energy.

NMR analysis of a novel domain interacting microtubuleHidekazu Hiroaki¹, Naoko Iwaya¹, Natsuko Goda¹ and Masahiro Shirakawa¹¹Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University

The AAA ATPases, which contain conserved AAA ATPase domains, associate with diverse cellular activities. The N-terminal regions of AAA ATPases are unique and may determine their specificities to the substrates. To interpret the molecular mechanisms of specific recognition for substrates, we have started to discover novel structural domains from the N-terminal regions. In this research, we selected the N-terminal region of katanin p60 (kp60), a microtubule interacting enzyme, and the N-terminal region of nuclear VCP-like protein (NVLP) 2, whose function is unknown. We have obtained soluble domains from both proteins, however, the initial NMR trial showed HSQC spectra typical to self-associating proteins. The program COILS predicted the regions of high coiled-coil-forming propensity. In case of kp60, the HSQC spectrum was significantly improved by a mutation or deletion within the predicted coiled-coil region. We propose a use of COILS analysis for rational design of mutant for improving spectra quality.

【序】

AAA ATPase はそれぞれが多様な細胞機能に関与している蛋白質であるが、酵素活性部位である AAA ドメインを共通に有する構造的特徴を持つ。この AAA ドメインのアミノ酸配列は原核生物から真核生物まで種を越えて保存性が高いが、基質蛋白質に対して明確な特異性を示す結合部位は見出されていない。一方、AAA ATPase の N 末端領域の配列は多様であり、この部分が基質特異性を持つ例も多く知られている。そのため、N 末端領域から機能解析と構造解析可能な新規ドメインを見つけることができれば、基質を特異的に認識する分子機構の解明につながると考えられる。我々は、すでにこの考えに基づいて PEX1 の N 末端に NSF/VCP の N 末ドメインに類似のドメインを新規に発見し、その立体構造を決定している¹⁾。本研究では、微小管結合蛋白質として知られている katanin p60 (kp60) とアポトーシスに関連する可能性のある nuclear VCP-like protein (NVLP) 2 の両者について同様の検討を行った。さらに、コイルドコイル領域予測プログラムである COILS を使った解析を行い^{2,3,4)}、アミノ酸配列に変異を入れることによってコイルドコイル形成の可能性がある領域の改良を試み、有意に NMR スペクトルを改善する方法を検討した。

キーワード：AAA ATPase、微小管、コイルドコイル、自己会合

著者ふりがな：ひろあきひでかず、いわやなおこ、ごうだなつこ、しらかわまさひろ

【結果】

1. バイオインフォマティクス的手法

kp60 と NVLP2 それぞれの一次配列において、AAA ドメイン領域より N 末端側に存在する配列に関して PSI-Blast による検索を行い、それぞれ約 100 残基の保存された領域を得た。これらの保存領域は kp60 と NVLP2 それぞれのオルトログ間でのみ保存されている配列であり、他の蛋白質には見出されなかった。また、構造既知の配列とも類似していることから、新規のドメインであると期待される。次に、ClustalX により各オルトログ配列間のマルチプルアライメントを作成し、保存性の高い部分 (kp60 と NVLP2 それぞれ約 90 残基と 100 残基) を仮のドメイン境界とした。

2. 発現と NMR 測定

仮のドメイン部分の cDNA をマウス、ヒト由来の cDNA プールより PCR で増幅し、当研究室により開発された PRESAT-vector 法⁵⁾に従い、GST 融合蛋白質発現系を作成した。得られた GST 融合蛋白質は大腸菌 BL21(DE3)に形質転換し、M9 培地中で培養して発現した。それを精製して、NMR (500 MHz, Bruker, 蛋白質濃度: 約 0.1 mM) により ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した。測定の結果、kp60 と NVLP2 共に予測されたピーク数より少ないものの、何らかの立体構造を有していると考えられるスペクトルパターンを得た。

3. COILS による解析

先の kp60 の NMR 測定結果から、仮のドメインの一部の領域が原因となり蛋白質の自己会合が起っている可能性が示唆された。そこで、ドメイン部分の配列をコイルドコイル領域予測プログラム COILS で調べたところ、ドメインの C 末端側に顕著なコイルドコイル形成の可能性を示す部分が見られた。次に、変異を入れた配列を数種類設計して、同様に配列を COILS で解析した。その結果、予測されたコイルドコイル領域を改良する配列を決定した。また、NVLP2 についても同様の傾向が見られたため、現在変異体を設計中である。

4. 変異体の作成と NMR スペクトルの比較

kp60 について、COILS による解析結果に基づき、コイルドコイル領域の変異体のコンストラクトを実際に作成した。これらの蛋白質を定法に従い発現・精製し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定して比較を行った。その結果、配列を改良した変異体においてスペクトルが有意に改善し、機能解析と構造解析に適したドメインのコンストラクトが得られた。今後、NVLP2 についても同様の検討を行う予定である。

【今後の展望】

構造・機能未知のドメインの自己会合を抑制するために、合理的に変異体を設計することはこれまで困難であった。COILS による予測と HSQC スペクトルを指標に用いる我々の方法は、構造未知のドメインの改良にも適用可能と思われる。

【参考文献】

- 1) Shiozawa K., et al. *J. Biol. Chem.* **24**, in press (2004)
- 2) Lupas A., Van Dyke M. and Stock J. *Science* **252**, 1162-1164 (1991)
- 3) Lupas A. *Methods Enzymol* **266**, 513-525 (1996)
- 4) Lupas A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 388-393 (1997)
- 5) Goda N., Tenno T., Takasu H., Hiroaki H. and Shirakawa M. *Protein Science* **13**, 652-658 (2004)

1P034★

UBA ドメイン類の構造解析と構造-機能相関研究

(横浜市大院総理¹, 理研・GSC², 東大院理³, 理研播磨⁴)

○樋口雄一郎¹, 阿部孝政², 大貫裕之², 濱田季之^{1,2}, 片山由貴子²,
超晨華², 鎌足雄司², 林文晶², 斉藤講平², 富澤忠², 小柴生造²,
木川隆則², 泉顕也², 好田真由美², 白水美香子², 寺田貴帆²,
井上真², 矢吹孝², 青木雅昭², 関英子², 松田貴意², 関原明²,
篠崎一雄², 横山茂之^{2,3,4}, 廣田洋^{1,2}

Studies on the structural - functional relationship of UBA domains

Graduate School of Integrated Science, Yokohama City Univ.¹, Genomics Science Center, RIKEN²,
Graduate School of Science, Tokyo Univ.³, Harima Institute, RIKEN⁴

○Yuichiro Higuchi¹, Takamasa Abe², Hiroyuki Onuki², Toshiyuki Hamada^{1,2}, Yukiko Katayama²,
Chenhua Zhao², Yuji Kamatari², Fumiaki Hayashi², Kouhei Saito², Tadashi Tomizawa², Seizo Koshiba²,
Takanori Kigawa², Kenya Izumi², Mayumi Yoshida², Mikako Shirouzu², Takaho Terada², Makoto
Inoue², Takashi Yabuki², Masaaki Aoki², Eiko Seki², Takayoshi Matsuda², Tomoaki Seki², Kazuo
Shinozaki², Shigeyuki Yokoyama^{2,3,4}, Hiroshi Hirota^{1,2}

Ubiquitination is a key regulatory signal controlling protein activity and location. Ubiquitin-associated (UBA) domains, which consist of approximately 45 residues, are found in various proteins with diverse functions involved in ubiquitin/proteasome pathway, DNA repair, cell signaling, and so on. Recent studies have indicated that the domains interact with mono-ubiquitin and poly-ubiquitin *in vitro*, while their affinities for mono-ubiquitin are different from each other. Although the structural information of the domains can provide critical insights into the molecular basis for their function, their structures have been little elucidated so far. In this study, we systematically performed structural determination of 10 UBA domains from various proteins by NMR spectroscopy. The structure-function relationship will be discussed in this presentation.

構造プロテオミクス, UBA ドメイン, three-helix bundle, ubiquitin, 構造-機能解析

○ひぐちゆういちろう, あべたかまさ, おおぬきひろゆき, はまだとしゆき, かたやまゆきこ, ちょうしんか, かま
たりゆうじ, はやしふみあき, さいとうこうへい, とみざわただし, こしばせいぞう, きがわたかのり, いずみけん
や, よしだまゆみ, しろうずみかこ, てらだたかほ, いのうえまこと, やぶきたかし, あおきまさあき, せきえいこ,
まつだたかよし, せきもとあき, しのぎかかずお, よこやましげゆき, ひろたひろし

タンパク質のユビキチン化は、プロテアソームによるタンパク質分解、DNA 修復、シグナル伝達、エンドサイトーシス、タンパク質輸送等において重要な役割を果たしている。ユビキチン結合モチーフとして同定された ubiquitin associated (UBA) ドメインは約 45 残基からなり、様々なタンパク質に見出されている¹。これまで、いくつかの UBA ドメインは mono-ubiquitin (mono-Ub) や poly-ubiquitin (poly-Ub) と相互作用することが知られているが、mono-Ub に対するアフィニティーが極めて弱いものも報告されている^{2,3}。UBA ドメインは数多くの種から同定され、pfam データベースに 692 配列が登録されている。タンパク質の構造情報に基づき、その機能を原子レベルで理解することは機能的な差異の解明だけではなく、機能を予測する上でも非常に重要である。しかしながら、UBA ドメインの構造についてはわずかに数個が PDB 登録されているのみで^{4,5}、構造に基づいた系統的な解析は進んでいない。そこで我々は、数種の UBA ドメインの構造決定を行い、比較することで詳細な機能的知見を得ることを目的として実験を行った。

まず、NMR で構造解析する UBA ドメイン 13 個を任意に抽出した。これらの UBA ドメインは、pfam データベースに登録されている約 95% の UBA ドメイン (654 配列) に対して 30% 以上の相同性を有している。すなわち、これら類似配列を持つ UBA ドメインについてホモロジーモデリングによる網羅的な構造予測が可能となり、UBA ドメインの系統的な解析に有用であると期待される。NMR 分光法によるすべての UBA ドメインの構造決定には ¹³C/¹⁵N 標識体を用いて行った。¹³C/¹⁵N 標識体 UBA ドメインの発現には無細胞タンパク質合成系を用いた。それらのタンパク質試料を用いて、Bruker, Varian, JEOL 社製の各 NMR 装置を用いて解析に必要な 2D, 3D-NMR を測定した。NMR スペクトルは NMRpipe, NMRView, Kujira を用いてシグナルの処理及び帰属を行い、¹³C-edited NOESY 及び ¹⁵N-edited NOESY スペクトル上で検出した NOE を用いて、CYANA-CANDID による NOE 自動帰属と立体構造計算を行った。これまで 13 種の UBA ドメインのうち、10 種について溶液中の構造を決定した。その結果、本研究で構造決定した全ての UBA ドメインもこれまでに報告されている典型的な UBA ドメインと同様に、three-helix bundle のフォールドを中心に構成されていることが明らかとなった。10 個の UBA ドメインの three-helix bundle 部分を重ね合わせたときの主鎖の RMSD 値は 1.69 Å と良く収束することからも、この部分は構造的にもよく保存されていると言える。しかしながら、ユビキチンとの相互作用に関与していると考えられている、保存性が高い疎水性パッチの形状には若干の差異があった。

本発表では、これまでに決定した 10 個の UBA ドメインの立体構造に基づいた機能比較について報告する。また分子系統学的な解析の結果も加味し、詳細に議論する予定である。

Reference

- [1] Hoffman, K., et al. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 172-173 (1996)
- [2] Caroline R. M. et al. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 939-943 (2001)
- [3] Kyoung-Seok R. et al. *J. Biol. Chem.*, **278**, 36621-36627 (2003)
- [4] Dieckmann, T. et al. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 1042-1047 (1998)
- [5] Thomas, D. et al. *J. Mol. Biol.*, **319**, 1243-1225 (2002)

NMR measurement of bovine β-lactoglobulin under neutral pH.

(Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

Kazumasa Sakurai¹, Atsushi Kameda¹, Masaru Hoshino^{1,2}, Yuji Goto¹.

¹Inst. Protein Res., Osaka Univ., ²Grad. Sch. of Pharm. Sci., Kyoto Univ.

Bovine β-lactoglobulin (β-LG) is retaining its native structure over wide pH range from 2 to 8. It is known that β-LG has many properties such as ligand binding, and these behaviors change as pH changes. In order to assign regions on the protein molecule responsible for the change of the behavior, we attempted to measure NMR spectra at acid and neutral pH and compare these results. However, the quality of spectrum acquired at neutral pH is significantly low because of signal broadening. As the broadening is probably caused by the dimerization, we tried to make mutants in which two monomers are disulfide-bonded. As a result, one of these mutants, A34C, was found to give a higher spectral quality. Therefore, measurements under neutral pH were performed by using A34C mutant, and the results were compared with those obtained on wild-type at acidic pH.

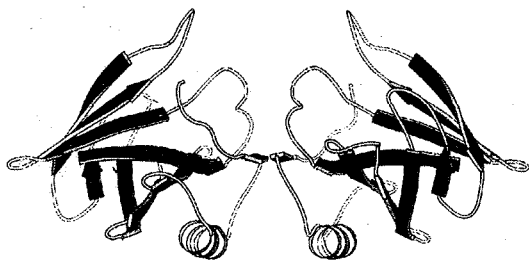


Fig.1 Crystal structure of β-lactoglobulin at neutral pH condition. While β-LG assumes a dimer form in this crystal structure, β-LG is in equilibrium between monomer and dimer in an aqueous solution.

ウシβラクトグロブリン (βLG) は 9 本のβストランド(A-I)と1つのアルファヘリックスからなる蛋白質で(fig.1)、pH2 から 8 という広い範囲においてほとんど変化すること無くその天然構造を保持している。しかし、βLGは多くの物理化学的性質が調べられており、これらの性質は pH の変化に伴い変化する。例えば、βLGは疎水分子リガンド結合能

を持っているが、その結合力は中性では高く、酸性では低い。また、ダイマー会合

キーワード：βラクトグロブリン、二量体形成、pH依存性、リガンド結合

さくらいかずまさ、かめだあつし、ほしのまさる、ごとうゆうじ

能も中性では高く、酸性では低い。そこでこの pH 変化による挙動の変化が構造のどの部位に起因するかを NMR で調べることにした。

β LG の NMR 測定は既に酸性条件では行われている。しかし中性条件ではシグナルの広幅化のため、これまで解析が行われていなかった。 β LG は中性では単量体と二量体の平衡状態にあり、これが広幅化の原因であると考えられるため、2つのモノマーを SS 結合で繋いだ変異体、A34C を作製した。この変異体を用いて測定を行ったところ、シグナル強度が大きく改善していたため、以降の中性での測定は A34C を用い、各解析を行った。

A34C の帰属の前に、HSQC スペクトルのシグナル帰属を野生型の中性条件で行った。前述の通り既に酸性でのシグナル帰属がなされているので、pH を徐々に変化させシグナルを追跡することで、約半数の残基を帰属できた。そしてその帰属を参考に A34C の CBCA(CO)NH, HNCACB, HNCO, HNCACO の各スペクトルを測定し、連鎖帰属を行った。結果、全残基中 95% の帰属が完了した。

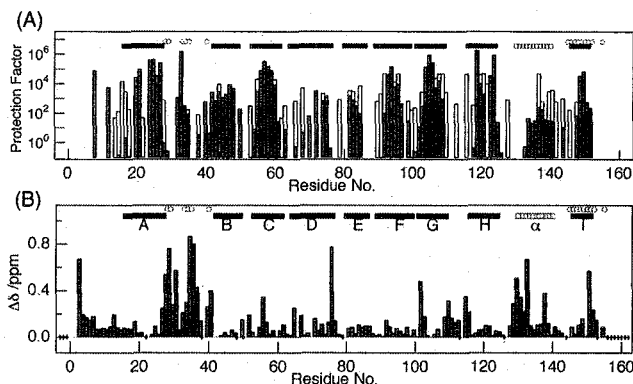


Fig.2 (A) A superimposition of protection factors of wild-type, pH2.4 (open bar) and A34C, pH6.5 (gray bar), and (B) apparent chemical shift differences on ^1H - ^{15}N HSQC spectra between the two conditions. The bars and circles on upper side of the graphs indicate secondary elements and dimer interface, respectively.

FG, GH ループ、 α ヘリックスで構造変化が起きていることが示された。pH の変化に伴う β LG の性質の変化はこれらの部位の変化に起因しているものと考えられ、他の実験から得られた結果をもとにこの結果を考察する。また、現在 A34C pH6.5 での緩和解析、およびリガンド結合時のスペクトル測定も行っており、それらの結果も合わせて報告する。

続いて、A34C の中性における重水素交換実験を行い、各残基のアミド水素のプロテクションファクターを求め、野生型酸性の結果と比較した。

(fig.2A) また同様に両条件間での HSQC 上の化学シフト値の変化も調べた。(fig.2B) これらの結果から、 β バレルを形成している残基にはほとんど変化が見られなかったのに対し、pH の変化に伴い二量体会合面、N末端 $\sim\beta$ A、

(北大院理¹、北大先端研²)

○八巻健¹、川口恭輔¹、相沢智康¹、熊木康裕¹、滝谷重治²、
出村誠¹、新田勝利¹

**Structural analysis of tandem repeat sequence of fibroin gene
transcriptional regulatory protein**

Takeshi Yamaki¹, Kyosuke Kawaguchi¹, Tomoyasu Aizawa¹, Yasuhiro Kumaki¹,
Shigeharu Takiya², Makoto Demura¹, Katsutoshi Nitta¹

¹Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan,

²Center for Advanced Science and Technology, Hokkaido University

Bombyx mori fibroin-heavy chain is a large protein (~391 kDa). The fibroin-H gene is a single copy gene and consisting of two exons and one intron. The 5' flanking sequence of fibroin-H gene is highly conserved and important for its expression. Recently it has been reported that fibroin-modulator binding protein-1 (FMBP-1) consisting of 218 amino acid residues binds these upstream and intron of the fibroin gene. Thus, FMBP-1 is one of the important elements as transcriptional regulatory proteins. In this study, solution structure of the DNA binding domain composed of four tandem repeats amino acid sequence was studied using two dimensional ¹H NMR techniques and circular dichroism measurements. All tandem repeat units were prepared to assign NMR signals and to clear structural flexibility and stability of these local conformation in water and trifluoroethanol aqueous solution.

[序論]

カイコ幼虫の絹糸腺器官は構造と機能の点で明確に識別される前部、中部、後部より成り、フィブロインタンパク質は後部絹糸腺細胞、セリシタンパク質は中部絹糸腺細胞でのみ合成され、明瞭な組織特異的な発現制御を受けている。また、これらのシルクタンパク質合成は発生過程で変化し時期特異的な制御も同時に受ける。このようなフィブロイン遺伝子やセリシン遺伝子の組織特異的かつ時期特異的な発現は主に DNA から mRNA が合成される転写の段階で制御されている。*Bombyx mori* フィブロイン H 遺伝子の転写制御因子候補である fibroin-modulator binding protein (FMBP-1) は 218 残基から成り、フィブロイン H 遺伝子の上流やイントロン内エレメントに結合するタンパク質で、フィブロイン遺伝子の組織特異的かつ時期特異的な発現に関与していると推定されている。FMBP-1 の C 末端側約半分の極めて特徴的な 23 残基の 4 回繰り返し構造が DNA 結合ドメインを構成している。全体構造と相同性の高い他のゲノムシークエンスは報告されていないが、DNA 結合ドメインと同様の特徴的な繰り返し構造が線虫、シヨウジョウバエ、マウス、ヒトに保存されている。しかし、これらの遺伝子の機能・構造解析

キーワード：転写因子、DNA 結合ドメイン、繰り返し配列、カイコ、フィブロイン

著者ふりがな：やまきたけし、かわぐちきょうすけ、あいざわともやす、くまき やすひろ、
たきやしげはる、でむらまこと、にったかつとし

は行われていない。本研究では、DNA 結合ドメインの立体構造解析及び DNA 結合ドメインを構成する各繰り返し配列についての特徴とタンデムリピート構造の DNA 結合能について NMR 法及び CD 測定から検討した。

[実験]

4つのタンデムリピートユニット (R1、R2、R3、R4、各 23 残基) はそれぞれ Boc 法による固相合成によって作製した。¹H-NMR 測定は TOCSY (mixing time: 80 msec), NOESY (mixing time: 150, 250 msec), DQF-COSY 測定を温度 20°Cで行った。NMR 測定のパепチド濃度は 1.5 mM とし、水系 (10% D₂O/90% H₂O, pH 6.2) と TFE 系 (30% TFE-d₂, 70% H₂O) の二条件で行った。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 CNS1.1 で行った。CD 測定は TFE 濃度を 0~50%に変えて 200~250 nm で行った。

[結果・考察]

DNA 非存在下では、CD 測定の結果より 4つ全てのタンデムリピートユニット(Fig.1)は水中でそれぞれ helix パターンを示した。更に TFE 濃度の増加に伴い helix 含量が増大することが示された。NMR 法により 4つ全てのタンデムリピートユニットの水溶液中ならびに TFE 溶媒中 (30% v/v)における立体構造を決定した。水溶液中においては 3 番目の残基から 10 番目の残基付近に α -helix が形成し、C 末端側領域がフレキシブルであるのに対して、TFE 溶媒中では 3 番目の残基から 20 番目の残基付近に至る長い α -helix を形成することが判明した。

水溶液中での 3~10 残基付近の α -helix 構造の安定化要因の解明として化学シフトに注目したところ、全てのタンデムリピートユニットに保存されている Arg 9 側鎖の H ϵ が異常に低磁場シフトしていることが観測された(Fig.2)。更に N 末端領域の構造安定化には Glu 1 と Arg 9 の間に形成される Salt bridge と共に Ser/Thr 2 と Gln/Glu 5 に形成される N-cap が寄与していることが解明された。

R1 99 ETSEERAARLAKMSAYAAQRLAN 121
 R2 122 ESPEQRATRLKRMSEYAAKRLSS 144
 R3 145 ETREQRAIRLARMSAYAARRLAN 167
 R4 168 ETPAQQRARLLRMSAYAAKROAS 190

Fig.1 DNA binding domain of FMBP-1

R1	Arg 6	7.23
R1	Arg 9	8.59
R1	Arg 20	7.14
R2	Arg 6	7.11
R2	Arg 9	8.29
R2	Arg 12	7.10
R2	Arg 20	7.04
R3	Arg 3	7.25
R3	Arg 6	7.28
R3	Arg 9	8.69
R3	Arg 12	7.21
R3	Arg 19	7.18
R3	Arg 20	7.19
R4	Arg 6	7.29
R4	Arg 9	8.78
R4	Arg 12	7.29
R4	Arg 20	7.19
Random coil	Arg	7.20

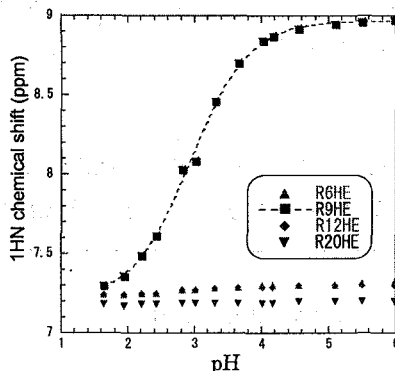


Fig.2 Extraordinary chemical shift of side-chain H ϵ of Arg 9 of all repeat-units (left) and cooperative changes of H ϵ chemical shifts of Arg 9 (R4) as a function of pH (right).

1P037★ ヒト脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)の立体構造と相互作用

(横浜市大・院総理¹)

○立石幸寛¹、柘尾豪人¹、白川昌宏¹

NMR analysis of the neuropeptide PACAP

(Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University¹)

○Yukihiro Tateishi¹, Hidehito Tochio¹, Masahiro Shirakawa¹

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide, which exists as two different forms, PACAP38 and PACAP27. Their C-terminal carboxyl groups are amidated. By binding to membranous G-protein coupled receptors (GPCRs), PACAP exerts pleiotropic effects. The structure of a truncated form of PACAP, PACAP(1-21)NH₂, bound to its receptor has been determined by trNOE technique, and that of one of the naturally occurring form, PACAP27, in the presence of dodecylphosphocholine (DPC) has also been determined. In order to advance structural studies of PACAP by NMR, we prepared isotopically labeled PACAPs, by expressing recombinant PACAP in *E. coli* as fusion proteins, followed by efficient purification and amidation steps. The obtained recombinant peptides, PACAP27 and PACAP38, are biologically active (IC₅₀=pM order). ¹H-¹⁵N HSQC spectra of free and DPC micelle-bound PACAPs proved the usefulness of isotope-labeling. The structural properties of the peptides will be discussed.

【概要】

ヒト脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) は、中枢神経系や末梢神経系で働く神経ペプチドである。生体中では 27 残基と 38 残基からなる 2 つフォームが同定されている。我々は PACAP がその受容体である GPCR に結合するまでの過程を解明するために、安定同位体ラベルした PACAP を調製し、DPC (dodecylphosphocholine) ミセル存在下においてその立体構造解析を NMR を用いて行った。そして PACAP は生体膜上で α -ヘリックスが誘起され、ヘリックス上で形成される疎水性のクラスターで膜と相互作用していることを示唆する結果を得た。

【実験】

2 種類の PACAP (PACAP27, PACAP38) は共に、チオレドキシンの融合型のタンパク質として大腸菌 (BL21) 内で発現させ、超音波破碎を行い、可溶性部分を回収した。そして、ニ

キーワード

GPCR, PACAP, PAM, DPC, NMR

著者ふりがな

たていし ゆきひろ、 とちお ひでひと、 しらかわ まさひろ

ツケルカラムを用いて融合型タンパク質を精製したのち、Factor Xa による融合部分の切断、C 末端部分のアミド化反応を行った。また大腸菌から調製したこの 2 つの PACAP の PACAP 特異的受容体(PAC-1)に対する結合活性を、放射性同位体を用いた結合競合実験により、化学合成した PACAP と比較した。

立体構造解析のために ^{13}C , ^{15}N ラベルした PACAP38 を調製し、生体膜環境を模擬している DPC ミセル存在下において 3 次元 NMR 測定を行った。また、PACAP が DPC ミセル上に存在しているかを確認するために、DPC ミセルに常磁性効果を呈する 5-doxy stearic acid, 16-doxy stearic acid の各試薬を混合し、 ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行った。

【結果・考察】

結合活性測定から、大腸菌から調製した PACAP27 の PACAP 特異的受容体に対する結合活性は、化学合成した PACAP27 とほぼ同等であった。また、PACAP38 の結合活性は PACAP27 よりも 5 倍程強いことを確認した(Fig.1)。このときの PACAP27, PACAP38 の IC_{50} 値は、どちらも 10^{-9} M のオーダーであった。

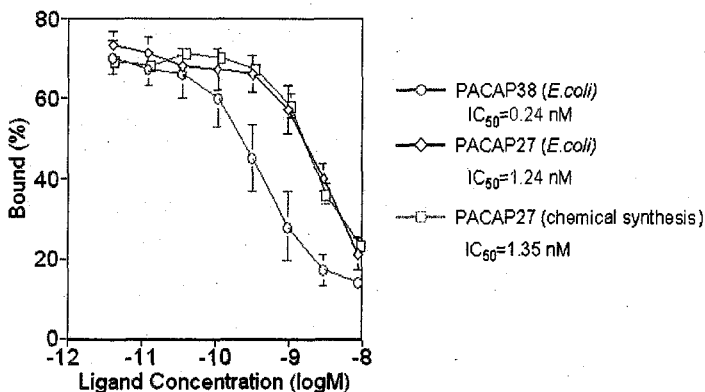


Fig.1 Binding assay for PACAPs to PAC-1

DPC micelle 存在下における PACAP38 の立体構造解析の結果、既報の PACAP27 の立体構造と非常に類似している事がわかった。PACAP38 は PACAP27 同様、DPC ミセル上で両親媒性ヘリックスを形成していることが考えられる。

また、スピララベル試薬を用いた ^1H - ^{15}N HSQC 測定により、PACAP27, PACAP38 のシグナルの消失が共に、5-doxy stearic acid の存在下で見られ (Fig.2)、PACAP の両親媒性ヘリックスが DPC ミセル表面上に位置することが示唆された。この結果は、PACAP は受容体に結合する際、一度膜に結合してから受容体のポケットに結合するという 2 段階リガンド移動モデルに矛盾しない結果であると言える。

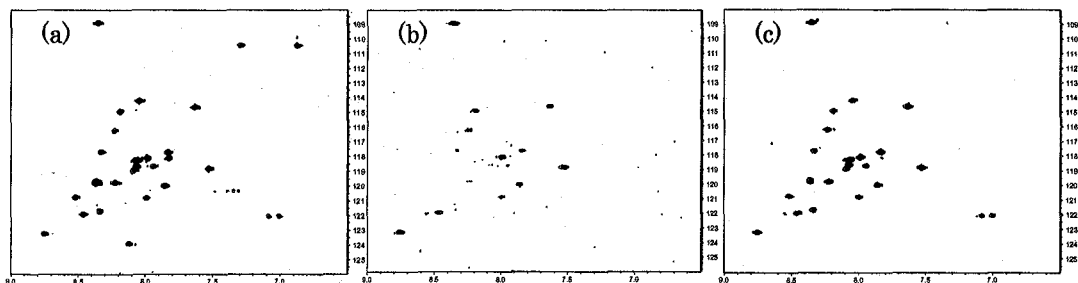


Fig.2 ^1H - ^{15}N HSQC spectra for PACAP27 in DPC micelle with (a) stearic acid, (b) 5-doxy stearic acid, and (c) 16-doxy stearic acid.

線虫由来抗菌ペプチド ASABF 変異体の
抗菌活性と立体構造解析

○中野学¹、相沢智康¹、三浦和紀²、星野宏和¹、宮澤光博³、加藤祐輔³、
熊木康裕¹、出村誠¹、津田栄²、河野敬一¹、新田勝利¹
(北大院・理¹、産業技術総合研²、農業生物資源研³)

Structure and Activity of ASABFd18c, Antibacterial Peptide Isolated from a Nematode, *Ascaris suum*

Manabu Nakano¹, Tomoyasu Aizawa¹, Kazunori Miura², Hirokazu Hoshino¹, Mitsuhiro Miyazawa³,
Yuusuke Kato³, Yasuhiro Kumaki¹, Makoto Demura¹, Sakae Tsuda², Keiichi Kawano¹, Katsutoshi Nitta¹,

¹Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University,

²National Institute of Advanced Industrial Science and technology, ³National Institute of Agrobiological Science

Structural studies of ASABF, antimicrobial peptide consisting of 71 residues and containing 4 intramolecular disulfide bridges derived from the body fluid of the nematode *Ascaris suum* have been performed using two-dimensional proton nuclear magnetic resonance. The secondary structure of ASABF consists of one α -helix, two β -strands with an antiparallel β -sheet and random coil region. Based on this solution structure, ASABF is likely to be categorized into insect defensin family with Cysteine-Stabilized $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) motif. C-terminal region of ASABF has flexible region, which complicates the spectrum. In order to improve the congestion of signals from C-terminal residues and the structural convergence, recombinant ASABF of which C-terminal 18 residues were deleted was constructed. We studied core structure of ASABF obtained from this mutant and the relationship between function and structure of C-terminal region.

【序論】

多細胞生物由来の抗菌ペプチドは、無脊椎動物や植物など幅広い生物から発見されているが、中でも記憶免疫システムを持たない無脊椎動物においては、主要な生体防御機構を担っていると考えられる。これらの抗菌ペプチドの立体構造解析は、生体防御タンパク質の進化を考える意味でも興味深い話題といえる。ASABF(*Ascaris suum* antibacterial factor)はブタの小腸に寄生する線虫(*Ascaris suum*)の体液に含まれる 71 残基の抗菌ペプチドであり 8 個の Cys 残基を持ち 4 本のジスルフィド結合を形成している。ASABF 全長の立

【キーワード】 抗菌活性、ペプチド、立体構造

なかのまなぶ、あいざわともやす、みうらかずのり、ほしのひろかず、みやざわみつひろ、かとうゆうすけ、くまきやすひろ、でむらまこと、つださかえ、かわのけいいち、
につたかつとし

体構造解析からN末端側は N-terminal loop, α helix, 逆平行 β sheet を有し昆虫において広く存在が知られている insect defensin のグループと類似した構造, Cysteine-stabilized α β (CS α β)モチーフを持つことが明らかになった。しかしながら、C末端側は収束した構造を有していないと考えられる。現在まで知られる insect defensin 様の立体構造を持つ抗菌ペプチドには存在せず、きわめて特徴的な領域といえる。本研究では、flexible と予想されるC末端側 18 残基を欠如させた ASABFd18c を作成し、N末端側 53 残基のコア領域の立体構造を詳細に解析するとともに、ASABF 全長と抗菌活性についての比較を行い、C末端側の活性への寄与や立体構造との関連性を考察することを目的としている。

【実験】

メタノール代謝酵母 *P.pastoris* を用い、C末端側 18 残基を欠如させた ASABFd18c を発現させた。NMR測定は Varian Unity-Inova 500, Jeol alpha 600 測定装置を用い、軽水中にて pH や温度を変え複数の条件下で測定を行い、スペクトルが判別できる条件を模索した。また詳細な情報を得るために ¹⁵Nラベル体での測定、解析も検討した。解析には、NMRPipe, SPARKY, ARIA1.2 を用いた。また ASABF 全長と ASABFd18c での活性の比較を行い、ASABF に特徴的な flexible と予想されるC末端領域の寄与を調べた。

【結果・考察】

FigのようにC末端側を欠如させることにより、スペクトルの単純化をすることができた。また立体構造解析により ASABFd18c も ASABF 全長と同様に 1本の α helix、2本鎖逆平行 β シートからなる CS α β モチーフをもつことがわかり、C末端領域が存在しなくても ASABF 全長のものと同様の構造をとることが確認され、より正確な NOE 情報を得ることに成功した。

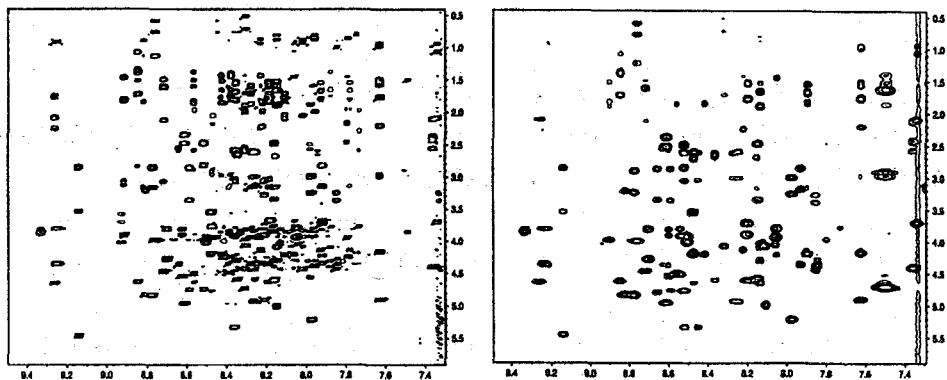


Fig. Fingerprint region from TOCSY spectra of ASABF (left) and ASABFd18c (right).

【謝辞】本研究の一部は生研センター基礎研究推進事業の補助を受けて行われた。

ヒト構造プロテオミクス:MAST205 タンパク質の N 末端ドメインと相同性の高いヒト MAST3 タンパク質ドメインの構造解析

(理研・GSC¹、かずさ DNA 研究所・ヒト遺伝子研究部²、東大院理³、理研・播磨⁴)

○柄尾尚哉¹、小柴生造¹、井上 真¹、好田真由美¹、廣田 洋¹、白水美香子¹、寺田貴帆¹、青木雅昭¹、鞆 康子¹、関 英子¹、藤倉由紀子¹、矢吹 孝¹、田仲昭子¹、木川隆則¹、小原 収²、横山茂之^{1,3,4}

Human Structural Proteomics: Solution structure of the N-terminal domain of human microtubule associated serine/threonine kinase 3.

(RIKEN Genomic Sciences Center¹, Kazusa DNA institute², The University of Tokyo³, RIKEN harima⁴)

N. Tochio¹, S. Koshiba¹, M. Inoue¹, M. Yoshida¹, H. Hirota¹, M. Shiroguzumi¹, T. Terada¹, M. Aoki¹, Y. Tomo¹, E. Seki¹, Y. Fujikura¹, T. Yabuki¹, A. Tanaka¹, T. Kigawa¹, O. Ohara², S. Yokoyama^{1,3,4}

Microtubule-associated serine/threonine kinase-205 kDa (MAST205) is required for the synthesis of proinflammatory cytokine subunit, IL-12 p40, induced after the stimulation with lipopolysaccharide (LPS). The N-terminal domain of MAST205 has been reported to be important for the IL-12 p40 synthesis and the stability of MAST205. In this study, we determined the solution structure of the N-terminal domain from human microtubule associated serine/threonine kinase 3 (MAST3), one of the MAST/SAST (syntrophin-associated serine/threonine kinase) family members, using NMR spectroscopy. Our results show that human MAST3 N-terminal domain adopts a new four-helix bundle structure. Based on the analysis of the structure and the multiple sequence alignment, the specific region in $\alpha 2$ (FxHHQ motif) is suggested to be important for the function of this N-terminal domain, named HHQ domain.

【序論】

LPS 刺激によって引き起こされる炎症反応で引き起こされる IL-12 p40 の生成には microtubule-associated serine/threonine kinase-205 kDa (MAST205)が必要であり、MAST205 の N-末端領域の欠損によって IL-12 p40 の生成が阻害されるという報告がなされている。この N 末端領域は MAST/SAST (syntrophin-associated serine/threonine kinase)ファミリー内でよく保存されており、このドメインを含む MAST205 の N 末端 418 アミノ酸領域が tumor necrosis factor receptor associated

キーワード: 構造プロテオミクス、microtubule-associated serine/threonine kinase、無細胞タンパク質合成

〇とちなおおや、こしばせいぞう、いのうえまこと、よしだまゆみ、ひろたひろし、しろうずみかこ、てらだたかほ、あおきまさあき、ともやすこ、せきえいこ、ふじくらゆきこ、やぶきたかし、たなかあきこ、きがわたかのり、おはらおさむ、よこやましげゆき

factor 6 (TRAF6)と相互作用し、MAST205 のユビキチンリガーゼ認識に関与している。今回、MAST/SAST ファミリーの一つ microtubule associated serine/threonine kinase 3 (MAST3)の N 末端ドメインの構造を NMR を用いて決定し、このドメインの構造上の特徴を述べるとともに機能部位の推定を試みた。

【方法】

無細胞タンパク質合成系により、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識 MAST3 N 末端ドメイン(残基番号 181-281)を調製した。NMR 測定は Bruker Avance700 および Avance800 を用いて行った。主鎖および側鎖の帰属には NMRView と強力な解析ツールである Kujira を用いた。NOE の自動帰属と立体構造計算は CYANA を用い、得られた構造の評価に PROCHECK-NMR を用いた。構造解析と図の作成は MOLMOL および GRASP を、配列解析には ClustalW、ConSurf、HMM Logos を用いて行った。

【結果と考察】

MAST3 N 末端ドメインの立体構造は 4 本の α -helix からなるバンドル構造であり、新規構造であることが分かった(Fig. 1)。このドメインの機能は未だ不明であるが、MAST/SAST ファミリーで特異的に保存された FxHHQ 配列を含んでおり、この FxHHQ 配列は $\alpha 2$ 上(残基番号 213-217)に存在している(Fig. 1)。特に、His216 側鎖のイミダゾール基は溶媒に露出しており、この領域が MAST/SAST ファミリーの N 末端ドメインの機能に重要であると考えられる。そこで、我われはこの MAST/SAST ファミリー N 末端ドメインを新たに HHQ ドメインと命名した。

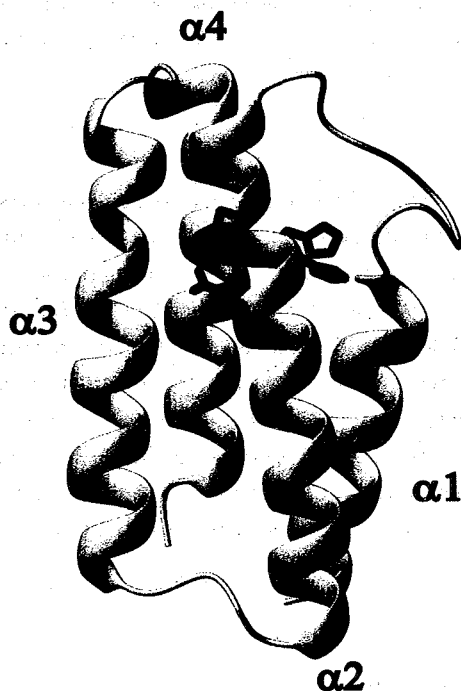


Figure 1 The structure of the HHQ domain of the human MAST3. Ribbon representation of the HHQ domain. The side chains of the $^{213}\text{FxHHQ}^{217}$ residues are stick model.

1P040★ TFIIE β の Mediator 複合体結合ドメインの動的構造解析

(1 生物分子工学研究所, 2 金沢大学・医)

笠井信幸¹、櫻井博²、楯真一¹

Dynamical structure of the Mediator binding domain of TFIIE β subunit
- significance of transient protein folding and protein-protein interaction

Nobuhiro Kasai, Hiroshi Sakurai, and Shin-ichi Tate¹

Biomolecular Engineering Research Institute (BERI)

Faculty of Medicine, Kanazawa University

Abstract

Gal11 subunit in the Mediator complex is a major interacting site to activator proteins in regulated transcription. The Gal11 is also engaged in the primal recruitment of general transcription factor TFIIE. We determined the solution structure of the TFIIE β binding site to Gal11 by NMR. The binding fragment forms a LEM-domain like structure consisting of three α -helices. We found the fragment is highly mobile in solution and, interestingly, it only transiently folds to specific structure. The binding site of TFIIE β to Gal11 is specifically located on this transiently folded part. This result suggests that the transient folding of TFIIE fragment is required for the binding of Gal11. In the presentation, we will discuss the details of the transient folding of TFIIE β binding site and its significance in TFIIE recruitment to the Mediator.

Introduction

The Mediator complex of *Saccharomyces cerevisiae* is required for both general and regulated transcription of RNA polymerase II (PolII). Gal11 subunit in the Mediator complex is a major interacting site to activator proteins in regulated transcription. The Gal11 also roles as the primal recruitment of general transcription factor TFIIE that consists of α and β subunits as hetero-tetramer. The TFIIE recruitment to the Mediator complex is an essential step to the following THIIH, a PolII-CTD kinase, recruitment to start the elongation. The structural details of TFIIE recruitment to the Mediator are little known. Sakurai and co-workers biochemically identified the binding sites of Gal11 to TFIIE α and β and *vice versa*. They showed the C-terminal part of Gal11 interacts with TFIIE β C-terminus and the N-terminal region of Gal11 is involved in TFIIE α binding. In the present work, we focused on the TFIIE β - Gal11 interaction to decipher the structural aspects of the general transcription factor recruitment to the Mediator complex.

¹ *Keywords* : NMR, protein folding, general transcription factor, Mediator

かさい のぶゆき、さくらい ひろし、たて しんいち

Results and Discussion

We determined the solution structure of a fragment of TFIIIE β which binds to Gal11 subunit in yeast Mediator complex. The fragment contains the binding region, which was identified by biochemical studies including GST pull-down assays and in vitro transcription analysis with a series of mutants, but it required additional N-terminal regions to stabilize the structure and binding activity to Gal11 fragment. Figure 1 shows the NOE sequential connectivity for the TFIIIE β fragment. Overall, the fragment consists of three α -helices and long apparently random C-terminal regions.

As seen in the ^1H - ^{15}N heteronuclear NOE profile, the TFIIIE β fragment is very floppy, Figure 2. The we found significant difference in the NOE build-up profiles for protons with fixed distance in aromatic rings and the neighboring amide-protons in α -helices. The NOE build-up between protons in aromatic ring showed the maximum at approximately 120-150ms NOE mixing time, as found in normal NOE build-up profile for this size of protein. The NOE build-up curves for the most neighboring amide protons in an α -helical regions showed the maximum over 300ms mixing period. This unusual NOE build-up behavior suggest that the TFIIIE β does not maintain fixed structure in solution but the structure, consisting of three α -helices, is just transiently formed.

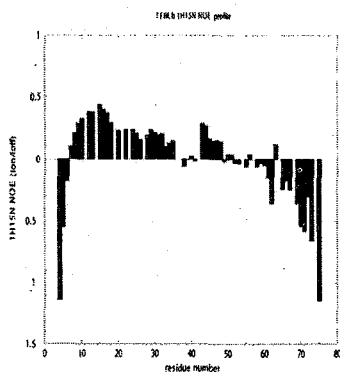


Figure 2: ^1H - ^{15}N heteronuclear NOE profile of TFIIIE β

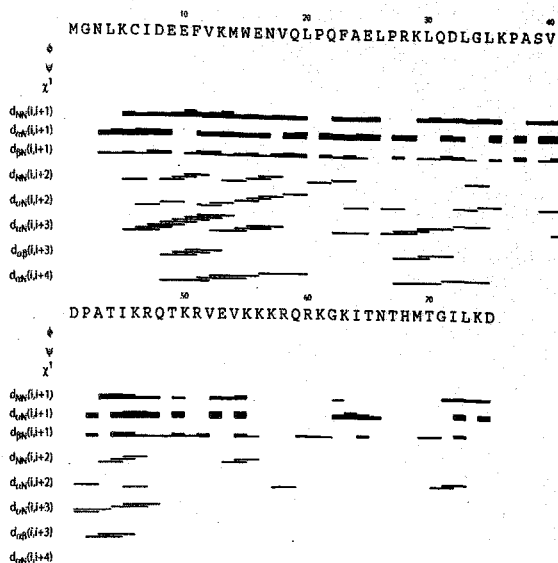


Figure 1: Sequential connectivity of TFIIIE β Gal11 binding fragment

In the presentation, we will show the three-dimensional structure of the TFIIIE β . We will also discuss the significance of its transiently folding structure in respect to its binding to Gal11 subunit.

2P041 イネ赤・遠赤色光受容体 phytochrome B 核内移行シグナルドメインの溶液構造解析 (奈良先端大バイオ¹、農業生物資源研²)

○小林俊達¹、田畑亮¹、三島正規¹、赤木香予²、酒井伸也²、加藤悦子²、
高野誠²、山崎俊正²、児嶋長次郎¹

Solution structure of rice phytochrome B nuclear localize signal domain

¹ Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology, and ² National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS)

○ Toshiatsu Kobayashi¹, Ryo Tabata¹, Masaki Mishima¹, Kayo Akagi², Shinya Sakai², Etsuko Katoh², Makoto Takano², Toshimasa Yamazaki² and Chojiro Kojima¹

Phytochrom B (phyB) is a dimeric chromoprotein that detects the quantity, quality, and duration of red or far-red light throughout the entire life cycle of plants. Upon absorption of red light, phyB translocates from the cytoplasm to nucleus, and regulates gene expression through interaction with transcription factors such as basic-helix-loop-helix proteins. The PAS domain within the phyB C-terminal domain contains determinants necessary for nuclear translocation and signal transduction. Here we show the solution structure of PAS1 domain, one of two PAS domains, determined by multidimensional NMR spectroscopy. In addition, NMR and biochemical experiments reveal that the N-terminal region of the PAS1 domain is necessary to form homodimer, and the PAS1 domain does not interact with the other PAS domain, PAS2.

[緒言]

植物にとって光は、エネルギー源としてだけではなく周囲環境の情報源としても重要である。環境シグナルとして、光は幾つかの光受容体を介して波長や強度・照射時間に応じて植物の様々な生理応答を誘導する。細胞内において 2 量体として存在するフィトクロムも、これら環境センサーとしての光受容体の一つである。細胞質に存在する不活性型のフィトクロムは、赤色光の吸収による活性型への構造変化を生じた後に核内へ移行し、転写因子を含めた様々なタンパク質との相互作用によって発芽から花成といった種々の光形態形成を制御する事が明らかとなっている。

フィトクロムは大きく二つのドメインに分けられる(N-及びC-末端ドメイン)。発色団を有するN-末端ドメインは光センサードメインであり、一方C-末端ドメインはシグナル伝達ドメインとして知られるPASドメイン、ヒスチジンキナーゼ様ドメインから構成される。これまでの遺伝学的研究は、PASドメインを含む領域のミスセンス変異の多くが、フィトクロムの機能を失活させることを明らかにしている。しかしながら、PASドメインを含めたフィトクロムに関する生化学的・構造学的知見に関しては未だ乏しい。このため、我々はフィトクロムファミリーの中でも明所において最も主要な役割を果たしていると考えられるイネ由来フィトクロム B (phyB)を用いて、PASドメインのNMRを用いた構造学的・生化学的研究を行った。

[方法]

PAS1ドメインの構造解析を目的として phyB (666-782)、PAS1ドメインの二量体形成能に関する知見を得るため phyB(621-782, 633-782, 647-782, 633-672)、さらに PAS1-PAS2 間の相互作用に関し

Keywords: 立体構造解析、多次元 NMR、phytochrome、homodimer、PAS domain

ふりがな: こばやしとしあつ、たばたりょう、みしまさき、あかぎかよ、さかいしんや、かとうえつこ、たかのまこと、やまざきとしまさ、こじま ちょうじろう

ては phyB(666-923)を、それぞれ ^{15}N もしくは $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 均一標識化タンパクとして大腸菌内で発現・精製し、実験に用いた。NMR 測定は Bruker 社製 AVANCE500 および DRX800 を使い、303K で主鎖・側鎖帰属、二面角 χ_1 角および距離情報取得のための多核多次元測定を行った。Buffer 条件は 50 mM Phosphate(pH 6.8)、20 mM KCl、5 mM DTT である。

[結果及び考察]

1. 立体構造 NOE から 1033 個の距離情報、TALOS から 68 個の ϕ 角と ψ 角、また H-D 交換実験および TALOS により得られた二次構造から 40×2 個の水素結合情報を収集し、CANDID を用いて構造計算を行った。その結果、phyB (666-782)は PAS-core, helical-connector および β -scaffold からなる典型的な PAS fold を有することが明らかになった(Fig. 1)。一方、N 末端側の 666-670 領域は α -helix 様の二次構造を有していることから、構造決定した PAS1 ドメインの N 末端領域はフォトトロピン LOV ドメインと同様の機能と密接に関与した構造をとる可能性が示唆された。また、HSQC スペクトルにおいて観察された 20 組のダブルピークは、 β -scaffold 中のループ領域、およびにループに接する残基に集中していた。全ての NMR 測定を通してこれらの残基由来のシグナルがダブルピークとして確認された事は、phyB 666-782 がループ領域近傍において二つの安定なコンフォメーションをとり得る事を示す。構造解析ではメジャーピークを用いて計算を行った。

2. 二量体形成 これまでのシロイヌナズナを用いた機能的解析から、phyB の二量体形成が光受容体としての効率的なシグナル伝達に必要な事が見られる。しかしながら、その二量体形成部位については不明確であった。今回我々は、phyB 647-782 領域が HSQC スペクトルにおいて濃度依存的な変化を示すことを明らかにした。また、分析ゲルろ過を用いた実験においても、見かけの分子量が同様の濃度依存的な変化を示した。これらの結果は、phyB 647-782 領域において濃度依存的なホモダイマーの形成が可能であることを示す。さらに、N 末端領域の長さの異なる 4 種類のコンストラクトの実験結果から、PAS1 の N 末端側に存在する phyB 647-665 領域が二量体形成に関与することを明らかにした。

3. PAS1-PAS2 間相互作用 フィトクロムの C 末端ドメインには、タンデムに並んだ二つの PAS ドメイン (PAS1, PAS2)が存在する。そこで PAS1-PAS2 (666-923, 258 残基)の主鎖帰属を行い、PAS1 及び PAS1-PAS2 の HSQC スペクトルの変化からその相互作用の有無を調べた。二つのスペクトルの間で PAS1 領域のシグナルに顕著な変化は見られず、PAS1-PAS2 間に分子内及び分子間相互作用は無いと考えられる(Fig. 2)。



Fig.1 Superposition of 20 calculated structures of the phyB PAS1 domain (residues 666-782)

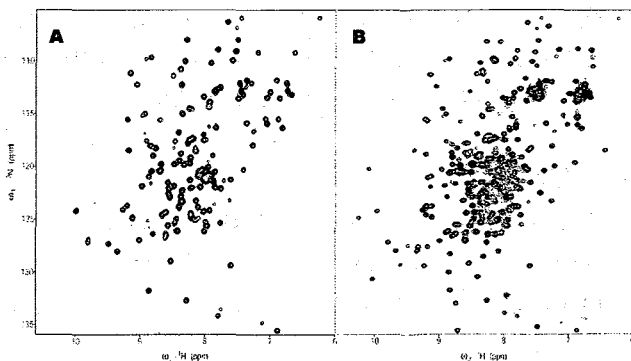


Fig.2 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC spectra of the phyB PAS1 (residues 666-782) (A) and the PAS1-PAS2 (residues 666-923) (B). (pH 6.8, 50 mM Phosphate, 20 mM KCl and 5 mM DTT, 500 MHz, 303K)

Specific Interaction between Bovine Lactoferricin and Acidic Phospholipid Bilayers

as Studied by Solid State NMR Spectroscopy

Graduate School of Engineering, Yokohama National University

Masako Umeyama, Katsuyuki Nishimura and Akira Naito

Bovine lactoferricin (LfcinB) is an antimicrobial peptide which consists of 25 amino acid residues with the sequence FKRR WQWRM KKLGA PSITC VRRAF forming the disulfide bond between C3 and C20. In this work, we investigated the specific interaction between LfcinB and acidic phospholipid bilayers (I) with the weight percentage of 65%DMPG, 10%CL (cardiolipin) and 25%DMPC by means of solid state ^{31}P , ^{13}C and ^1H NMR spectroscopy.

^{31}P NMR spectra indicated that there was specific interaction between LfcinB and I, and bilayer defect was appeared in the bilayer system. ^{13}C MAS NMR spectra indicated that LfcinB interacts with the part of glycerol group in phosphatidylglycerol of phospholipids. ^1H MAS NMR spectra indicated that Trp residues exist at the interfacial region of lipid bilayers. It is clearly demonstrated that LfcinB interacts with acidic phospholipids bilayers at the membrane interface and cause defects in the membrane. These defects may lead the permeability in the membrane to express the antimicrobial activity.

【序論】

ウシラクトフェリシン (bovine lactoferricin : LfcinB) は25アミノ酸残 (LfcinB-25) からなる抗菌ペプチドである。一次構造 Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe において, Cys³ と Cys²⁰ で S-S 結合をつくり環状構造を形成している。LfcinB の抗菌活性を示す最小単位は Arg⁴-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-NH₂ (LfcinB-6) であることが知られている。本研究では, 抗菌ペプチドは特定の細菌の膜に対して特異性をもつと考えられることから, 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の細胞膜のリン脂質組成を参考にした DMPG65%, CL10%, DMPC25%の混合膜と LfcinB-25 および LfcinB-6 のそれぞれとの特異的相互作用を固体 NMR スペクトルを用いて解析し, 抗菌作用の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【実験】

LfcinB-25 と LfcinB-6 を固相法により Fmoc アミノ酸を用いて化学合成した。レジンの切り出しとアミノ酸残基の保護基の脱保護を行って得た粗製試料を逆相 HPLC により精製した。LfcinB-25 (還元型) については, 空気酸化により分子内 S-S 結合を形成して LfcinB-25 (酸

キーワード: ラクトフェリシン, 抗菌ペプチド, 脂質二重膜, 混合膜, 固体高分解能 NMR

うめやままさこ, にしむらかつゆき, ないとうあきら

化型)を生成し、逆相 HPLC を用いて精製した。目的のペプチドが得られたことを質量分析法により確認した。次に、LfcinB-25 と LfcinB-6 をそれぞれ I : DMPG (65%), CL (10%), DMPC (25%) の重量百分率の脂質からなる混合膜, II : DMPC 膜に再構成した。pH7.5, 100mM NaCl, 20mM Tris 緩衝液を用いて水和・膨潤, 凍結融解を行って多重膜リポソーム (MLV) を形成し, さらに重水素置換を行い NMR 測定試料とした。NMR 測定は ^{31}P static, ^{13}C MAS, ^1H MAS の条件で液晶相温度およびゲル相温度で NMR 測定を行った。

【結果と考察】

^{31}P static NMR スペクトルの変化から LfcinB-25 は DMPC 膜とは相互作用を示さなかったが, 混合膜とは膜の極性基の構造や運動性を変える相互作用を示した (図 1)。この結果 LfcinB-25 は DMPC 膜より混合膜に強く結合し, 細菌の膜に特異性をもつことがわかった。これは混合膜に含まれる酸性脂質と LfcinB-25 の塩基性アミノ酸側鎖との間の静電的相互作用によると考えられる。さらに LfcinB-25-および LfcinB-6-混合膜系では液晶温度で等方成分が観測された。この結果から LfcinB の作用により二重膜に欠陥が生じた可能性が考えられる。これによりイオンが膜を透過する結果, 細菌の細胞膜はイオンの濃度勾配を保てなくなり, 抗菌作用が発現すると考えられる。

^{13}C MAS NMR 測定結果から LfcinB はリン脂質二重膜のグリセロール部位の信号をシフトさせることから, この部位と特異的に相互作用をしたことが示唆された (表 1)。また ^1H MAS NMR 測定結果から分解能の高いスペクトルが得られ, Trp の環電流効果を観測できたことから Trp 残基が二重膜の界面に存在する可能性があることが示唆された (表 2)。これらの結果は LfcinB がリン脂質二重膜の親水性基と疎水性基の界面に塩基性部位 (LfcinB-6) が局在していることを示している。以上の結果, 脂質膜系においても ^{31}P static, ^{13}C MAS, ^1H MAS のいずれも高分解能スペクトルが観測でき, LfcinB のリン脂質二重膜結合構造解析に関する詳細な情報を与えることがわかった。

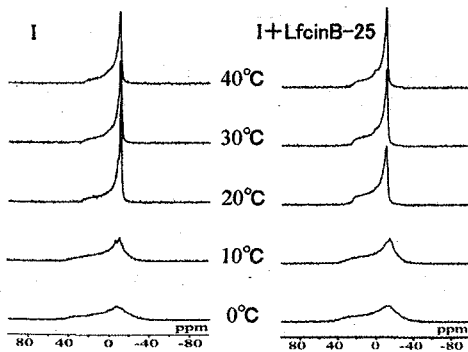


Fig.1 Temperature variation of ^{31}P NMR spectra of LfcinB-acidic phospholipids bilayer systems. (peptide : lipid = 1 : 20)

Table 1 ^{13}C chemical shift values for the peaks with significant shifts in LfcinB-acidic phospholipids bilayer systems at 40 °C.

	Chemical shifts (ppm from TMS)	
Acidic bilayer (I)	60.37	60.6
I+LfcinB-25	60.45	60.86
I+LfcinB-6	60.51	60.81

Table 2 ^1H chemical shift values for the peaks with significant shifts in LfcinB-acidic phospholipids bilayer systems at 40 °C.

	Chemical shifts (ppm from H_2PO_4^-)
Acidic bilayer (I)	-7.44
I+LfcinB-25	-7.46
I+LfcinB-6	-7.49

1P043★

ペルオキシソーム膜形成因子 Pex19p の NMR 解析

(名市大・院薬¹、理研・播磨²、京大・院薬³)

笹川 拓明¹、山口 芳樹¹、柴田 洋之²、加藤 博章^{2,3}、加藤 晃一¹

NMR analysis Pex19p, a peroxin contributing to the assembly of the peroxisomal membrane structure.

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University¹, Riken Harima Institute at Spring-8², Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University³)

○Hiroaki Sasakawa¹, Yoshiki Yamaguchi¹, Hiroyuki Shibata², Hiroaki Kato^{2,3}, Koichi Kato¹

Peroxisomes are components of virtually all eukaryotic cells and play critical roles in numerous metabolic pathways. Defects in peroxisome biogenesis cause human diseases such as Zellweger syndrome by interfering with peroxisomal metabolic processes. Pex19p is a 299-residue partially structured protein involved in the initial stages of peroxisomal membrane formation. This protein binds and imports cytoplasmic newly synthesized peroxisomal membrane proteins (PMPs) into peroxisome membrane. For structural analyses of the globular domain of Pex19p by NMR spectroscopy, unfolded region for Pex19p was digested by Proteinase K, giving rise to the 121-residue domain (Met175-Ala296) designated as Pex19p₁₇₅₋₂₉₆. We prepared uniformly ¹³C- and ¹⁵N-labeled Pex19p₁₇₅₋₂₉₆ and completed assignments of the resonances originating from its backbone.

Pex19p は細胞内小器官ペルオキシソームの形成初期段階であるペルオキシソーム膜形成に関与しているアミノ酸 299 残基からなる分子量 32.4 K のタンパク質である。細胞質中で生合成されたペルオキシソーム膜タンパク質 (PMP) は Pex19p により捕われ、ペルオキシソーム膜へ輸送され挿入される (Fig. 1a)。Pex19p の変異は Zellweger 症候群等の重篤な脂質代謝異常の原因となることがこれまでの研究により明らかとなっている。Pex19p はトリプシンにより容易に N 末端側 (1-155) と C 末端側 (156-299) のフラグメントに切断される (Fig. 1b)。円二色性スペクトルにより、この N 末端側フラグメントはほぼアンフォールド状態にあり、C 末端側フラグメントは α -ヘリックスに富むことが示された (1)。Pex19p に対する基質である PMP は N 末端側フラグメントに対応する領域に結合することが明らかとなっており、特定の構造を持たない N 末端側領域が基質を認識し、結合するメカニズムを明らかにすることは非常に興味深い。このメカニズムの分子構造論的基盤を解明するために Pex19p の多次元 NMR による解析を試みた。

キーワード: ペルオキシソーム、Zellweger 症候群、Pex19p

ささかわ ひろあき、やまぐち よしき、しばた ひろゆき、かとう ひろあき、かとう こういち

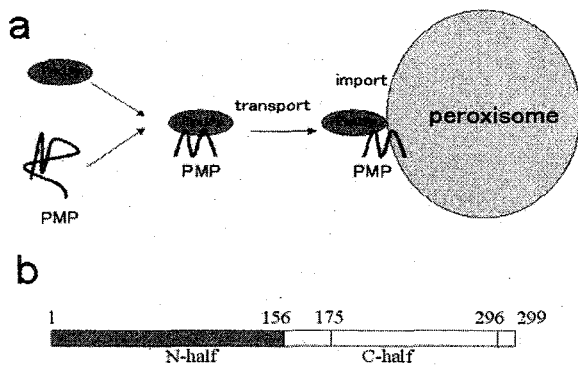


Fig.1 The function (a) and the domain structure (b) of Pex19p.

トリプシン処理によって得られる C 末端側フラグメントのスペクトルにも、依然として構造を持たない領域に由来する信号が含まれており、それらの帰属が非常に困難であった。そこで Proteinase K によって Pex19p に処理を施したところ、分子量約 14 K のフラグメントが得られた。質量分析の結果、このフラグメントは 175-296 に対応するアミノ酸残基より構成されていることが示された。そこで上記配列に対応する Pex19p フラグメント (Pex19p₁₇₅₋₂₉₆) を GST 融合タンパク質として発現する系を構築し、その ¹⁵N 及び ¹³C/¹⁵N 標識体を作成した。得られたタンパク質に対して ¹H-¹⁵N HSQC を測定したところ、C 末フラグメントのものとはほぼ同一パターンでなおかつ解析の容易なスペクトルを得ることができた。Pex19p₁₇₅₋₂₉₆ に対し、三次元構造決定のための各種多次元 NMR 測定を 500MHz、600MHz の分光器にて行った。北大の稲垣研究室により開発された帰属支援ソフト Olivia を用いて HNCQ、HNCA、HN(CO)CA、CBCANH、CBCA(CO)NH、HBHA(CO)NH の各スペクトルの解析を行うことにより主鎖シグナルの帰属を行い、HCCH-COSY、HCCH-TOCSY により側鎖シグナルの帰属を行った (Fig. 2)。Cα の化学シフトの値より、残基番号 182-188、197-214、219-241、247-266 に対応する領域が α-ヘリックスを形成しており、β-ストランドは存在しないことが予想された。現在構造計算のための NOE 情報を取得中である。また、Pex19p の N 末端側領域についての NMR 解析も現在行っている。

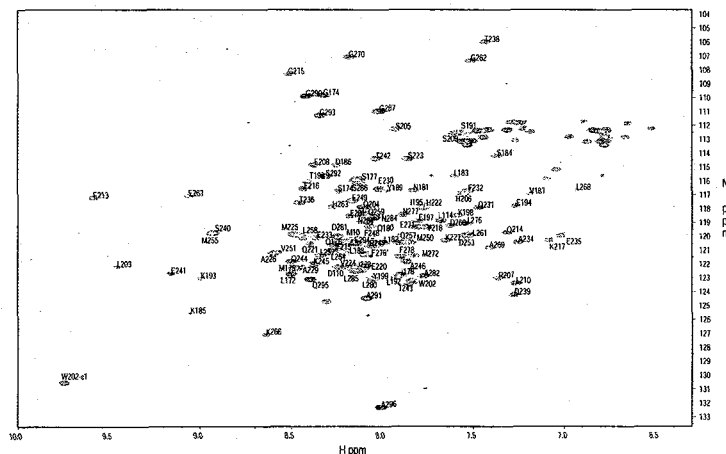


Fig. 2 ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of Pex19p₁₇₅₋₂₉₆.

<文献>

1. Shibata, H., Kashiwayama, Y., Imanaka, T. and Kato, H. *J. Biol. Chem.* 279(37), 38486-94 (2004).

マウス構造プロテオミクス:
SNARE タンパク質 Vti1a N 末端ドメインの構造と機能

(理研・GSC¹、東大・院理²、理研・播磨³)

○阿部孝政¹、廣田洋¹、安室憲一¹、富澤忠¹、小柴生造¹、寺田貴帆¹、
白水美香子¹、井上真¹、矢吹孝¹、青木雅昭¹、松田貴意¹、関英子¹、木川隆則¹、
好田真由美¹、田仲昭子¹、松尾 洋¹、荒川貴博¹、P. Carninci¹、河合純¹、
林崎良英¹、P.Güntert¹、横山茂之^{1,2,3}

Mouse structural proteomics:

Solution structure and function of N-terminal domain of SNARE protein Vti1a

Genomic Science Center, RIKEN¹; Graduate School of Science, University of Tokyo²; Harima institute, RIKEN³

Takamasa Abe¹, Hiroshi Hirota¹, Kenichi Yasumuro¹, Tadashi Tomizawa¹, Seizo Koshiba¹,
Takaho Terada¹, Mikako Shirouzu¹, Makoto Inoue¹, Takashi Yabuki¹, Masaaki Aoki¹,
Takayoshi Matsuda¹, Eiko Seki¹, Takanori Kigawa¹, Mayumi Yoshida¹, Akiko Tanaka¹,
Yo Matsuo¹, Takahiro Arakawa¹, Piero Carninci¹, Jun Kawai¹, Yoshihide Hayashizaki¹,
Peter Güntert¹, and Shigeyuki Yokoyama^{1, 2, 3}

In eukaryotes, SNARE proteins on transport vesicles and target membranes function at the center of membrane fusion reactions by forming complexes with each other via their C-terminal coiled-coil domains. Several SNAREs have N-terminal domains (NTDs), which precede the coiled-coil domain and are considered to have critical functions in regulating the fusion cascade. Recent structural analyses on some NTDs revealed that they form an antiparallel three-helix bundle with a left-handed twist. However, precise functions of the NTDs have remained unknown. In this study, we determined the solution structure of the NTD of mouse Vti1a by NMR spectroscopy. As a result, the NTD was found to have a similar structure to those of other NTDs. Details of its structure and function will be discussed.

【序論】

真核細胞において各オルガネラへの物質の輸送はおもに小胞によって行われており、オルガネラの機能維持のためにはこの小胞輸送が正確に行われなければならない。小胞輸送では、まず輸送される物質がオルガネラから出芽する小胞内に取り込まれ、生じた小胞が次のオルガネラへと輸送されたのち、小胞の膜とターゲットとなるオルガネラの膜が融合して小胞の内容物がそのオルガネラへと取り込まれる。SNARE 蛋白質は、この最終ステップ、すなわち小胞膜とオルガネラ膜の融合において重要な役割を果たしていることが明らかとなっており、近年注目を浴びている。SNARE 蛋白質はC 末端側に SNARE モチーフと呼ばれる領域を持ち、小胞側で1 本、オルガネラ側で3 本の SNARE モチーフが coiled-coil 様の複合体を形成することにより、膜融合が促進されると考えられている。この SNARE モチーフの

SNARE, Vti1a, three-helix bundle, マウス cDNA, 構造プロテオミクス

あべたかまさ、ひろたひろし、やすむろけんいち、とみざわただし、こしばせいぞう、てらだたかほ、しろうずみかこ、いのうえまこと、やぶきたかし、あおきまさあき、まつだたかし、せきえいこ、きがわたかのり、よしだまゆみ、たなかあきこ、まつおよう、あらかわたかひろ、CarninciP、かわいじゅん、はやしざきよしひで、GüntertP、よこやましげゆき

配列により、SNARE 蛋白質は syntaxin, SNAP25N, SNAP25C, および VAMP の 4 つのファミリーに分類されている。

多くの SNARE 蛋白質には膜融合に必須な SNARE モチーフの他、N 末端側に構造をとった領域が存在しているが、その機能はあまりよく分かっていない。最近、いくつかの SNARE 蛋白質についてこの領域の立体構造解析が行われ、それらは 3 本の α -helix が antiparallel にバンドルした構造をとっていることが明らかとなった。また、配列をもとにした二次構造予測から、syntaxin, SNAP25N および SNAP25C の 3 つのファミリーに属する SNARE 蛋白質の N 末端側には、このような three-helix bundle 構造が含まれていると予想されている¹⁾。しかしながら、それらの N 末端ドメインのアミノ酸配列は多様性に富んでいるため、これらのドメインが各蛋白質固有の機能を果たしているのかどうかは非常に興味深い。

そこで本研究では、マウス由来の SNARE 蛋白質の一つである Vti1a の N 末端ドメインの溶液構造を NMR により決定し、その構造にもとづいた機能についての検討・考察を行った。

【方法】

¹³C/¹⁵N 標識蛋白質を無細胞蛋白質発現系により調製した。約 1mM の Vti1a の N 末端ドメインを 20mM *d*-Tris-HCl buffer (pH 7.0), 100mM NaCl, 1mM *d*-DTT, 0.02% NaN₃, 10% D₂O に溶解し、NMR 測定を Bruker 社製 AVANCE 800 および 700 により 25°C で行った。シグナルを帰属するため、¹⁵N-HSQC, ¹³C-HSQC, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCOC, HN(CA)CO, HBHA(CO)NH, CC(CO)NNH, HCC(CO)NNH, HCCH-TOCSY, HCCH-COSY を測定した。さらに原子間距離情報を得るため、¹⁵N-edited NOESY-HSQC および ¹³C-edited NOESY-HSQC の測定も行った。これらのスペクトルのプロセスと帰属は NMRpipe, NMRview, Kujira を用い、構造計算には CYANA/CANDID を用いて行った。

【結果と考察】

SNAP25N ファミリーに属する Vti1a の N 末端ドメインの構造は antiparallel の three-helix bundle 構造であり、アミノ酸配列ベースの二次構造予測を支持するものであった。類似の構造を持ち、機能既知な SNARE 蛋白質の N 末端ドメインとしては syntaxin ファミリーに属する syntaxin1a が知られているが、この N 末端ドメインは自身の SNARE モチーフと分子内相互作用することで“閉じた”蛋白質構造を形成し、膜融合カスケードの制御に関与していると報告されている²⁾。そこで、今回構造決定を行った Vti1a の N 末端ドメインとの比較を行ったところ、全体的な構造は非常に類似していたが、その表面構造および電荷の分布は異なっていることが分かった。特に、syntaxin1a の N 末端ドメインには SNARE モチーフと分子内相互作用するための疎水的な長い溝が存在しているが、Vti1a の N 末端ドメインにはこのような溝は見られなかった。従って、Vti1a が自身の SNARE モチーフと分子内相互作用する可能性は低いと予想された。実際に、Vti1a の SNARE モチーフを用いて N 末端ドメインとの相互作用解析を試みているが、現時点では結合は見られていない。

以上の結果から Vti1a の N 末端ドメインのターゲットは少なくとも分子内ではないと推測される。今後、そのターゲット蛋白質を探索することにより Vti1a の N 末端ドメインの詳細な機能を解明したいと考えている。

【参考文献】

- 1) K. M. S. Misura, *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9184-9189.
- 2) K. M. S. Misura, *et al.* (2000) *Nature*, **404**, 355-362.

(筑波大院数物¹、高知大理²、日鯨研³、科博⁴)○八巻 武¹、阿部 千景¹、岩波 健太郎²、藤瀬 良弘³、山田 格⁴、三田 肇¹、鈴木 知彦²、山本 泰彦¹**¹H NMR study on heme orientation of myoglobin from skeletal muscles of cetacean**○T. Yamaki¹, C. Abe¹, K. Iwanami², Y. Fujise³, T. Yamada⁴, H. Mita¹, T. Suzuki², Y. Yamamoto¹¹Graduate school of Pure and Applied Sci., Univ. of Tsukuba, ²Fac. of Sci., Kochi Univ., ³Inst. of Cetacean Res., ⁴Natl. Sci. Museum

¹H NMR study of the myoglobins from skeletal muscles of a variety of cetacean, *Mesoplodon stejnegeri*, *Indopacetus pacificus*, *Balaenoptera borealis*, *Balaenoptera edeni*, *Balaenoptera acutorostrata*, *Physeter macrocephalus*, *Kogia breviceps*, *Peponocephala electra*, *Phocoenoides dalli* and *Stenella attenuata*, revealed that the structural features of the proteins of cetaceans are highly alike, as expected from their homologous amino acid sequences, and that heme in myoglobin possesses a unique orientation with respect to the protein moiety, in contrast to the results from "in vitro" reconstitution study of myoglobin, which demonstrated that heme is incorporated into apoprotein in two different orientations.

序 論

生物の骨格筋中に含まれるミオグロビン (Mb) は、アミノ酸 153 残基からなるタンパク質部分とヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体を補欠分子族としてもつ分子量約 17000 の酸素貯蔵ヘムタンパク質である。鯨類の骨格筋中の Mb 濃度は高く、その色は陸棲哺乳類のものよりもかなり濃いことに反映されている。したがって、細胞中での Mb の構造を研究する場合、鯨類の Mb は最良の研究対象となる。また、マッコウクジラの Mb はウマやウシなどの陸棲哺乳類の Mb より立体構造が安定であることが従来の研究から明らかになっている。そこで、鯨類の Mb を系統的に調べることにより、Mb の性質と生物の棲息環境との関係などがより詳しく明らかになると考えられる。本研究では、オウギハクジラ (*Mesoplodon stejnegeri*)、タイヘイヨウアカボウモドキ (*Indopacetus pacificus*)、イワシクジラ (*Balaenoptera borealis*)、ニタリクジラ (*Balaenoptera edeni*)、ミンククジラ (*Balaenoptera acutorostrata*)、マッコウクジラ (*Physeter macrocephalus*)、コマッコウ (*Kogia breviceps*)、カズハゴンドウ (*Peponocephala electra*)、イシイルカ (*Phocoenoides dalli*)、マダライルカ (*Stenella attenuata*) の骨格筋から分離精製した Mb を ¹H NMR により活性部位の立体構造を解析した。

結果と考察

アミノ酸配列 本研究で用いた Mb のアミノ酸配列を比較した結果、88 % 以上の高い相同性があった。活性部位の近傍でのアミノ酸残基の相違は N 末端から 45 番目の残基 (Arg または Lys) で認められた。その他の相同ではないアミノ酸残基のほとんどは、Mb の分子表面に存在していた。

Keyword: ミオグロビン、ヘムの配向、常磁性 NMR、タンパク質の高次構造

やまき たけし・あべ ちかげ・いわたみ けんたろう・ふじせ よしひろ・やまだ ただす・
みた はじめ・すずき ともしこ・やまもと やすひこ

ヘム活性部位の立体構造 Fig. 1 に様々な鯨類 Mb のメトシアノ体 (MbCN) の ^1H NMR スペクトル (10-29 ppm) を示す。通常の ^1H NMR シグナルより著しく低磁場側に観測されるのは、フェリ型ヘム鉄の不對電子による常磁性シフトのためである。これらのシグナルのシフト値がほぼ一致していることから、鯨類 Mb の活性部位はお互いに高い類似性をもつことがわかる。しかし、His64 の $\text{N}_\epsilon\text{H}$ と C_δH プロトンに由来するシグナルのシフト値に着目すると、鯨類の種類に依存して最大 1 ppm 程度の差が観測される。これはヘムに対する His64 の配向がそれぞれの Mb で異なることを示唆している。His64 の $\text{N}_\epsilon\text{H}$ は、ヘムに配位した O_2 、 CN などと水素結合を形成することにより、それらの配位状態を安定化することが知られている。したがって、アミノ酸配列の高い相同性に反して、これらの Mb では酸素親和性などの機能が有意に異なることが予想される。

骨格筋中の Mb におけるヘムの配向 Mb からヘムを取り出した apoMb にヘムを *in vitro* で再び加えるとタンパク質部分にヘムが取り込まれた再構成 Mb が得られる (Fig. 2)。常磁性 NMR による再構成 Mb の研究から (La Mar *et al.*, JACS (1984))、再構成反応ではヘムが表と裏の 2 通りで apoMb に取り込まれた異性体が生成することが示されている。Mb の機能を立体構造に基づいて理解する場合、このヘム回転異性体の存在は無視できない。骨格筋から Mb を素早く分離して *in vivo* の状態に近い Mb の ^1H NMR スペクトルを測定した結果、*in vitro* で調製された再構成 Mb の研究における結果とは異なり、1つの異性体のみ由来するシグナルが観測された。この結果は、Mb 生合成の最終段階において骨髄で合成されたヘムが細胞質中で合成された apoMb に組み込まれる際、ヘムはある特定の配向で組み込まれることを示している。

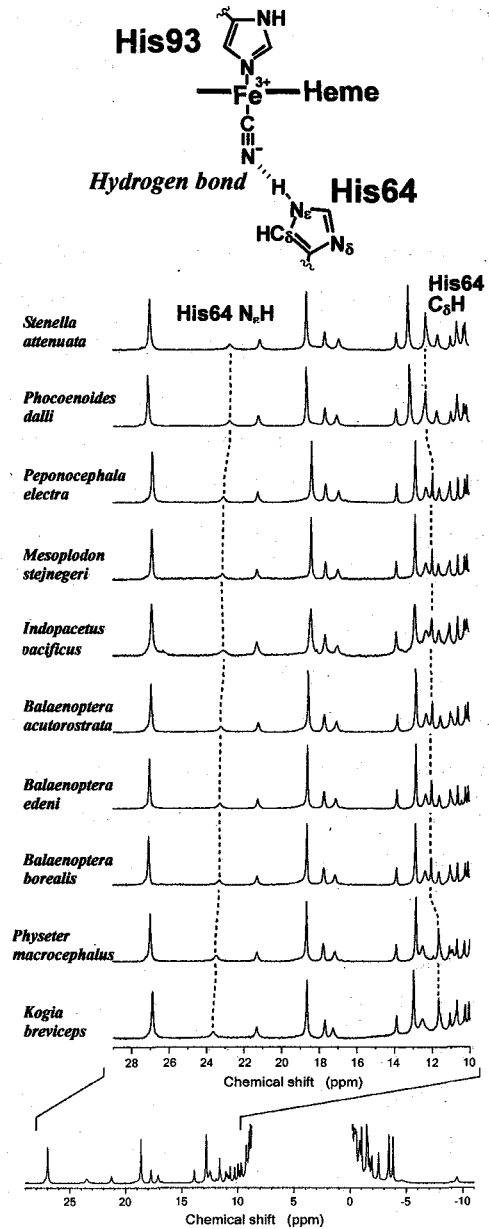


Fig. 1 ^1H NMR spectra of various cetaceous met-cyano Mbs. (pH 8.6, 25 °C)

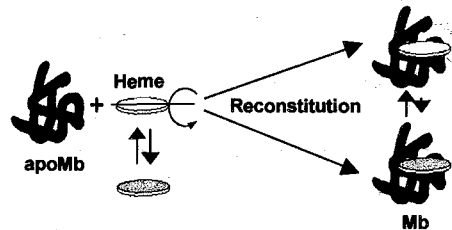


Fig. 2 Schematic representation of two different orientations of heme relative to apoMb.

Approaches to the efficient global fold determination of TPR domain in p67^{phox}

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University¹, National Project on Protein Structural and Functional Analysis²)

○Shinichi Yoshida¹, Kenji Ogura¹, Fuyuhiko Inagaki^{1,2}

Although a number of methodologies to determine global folds of larger protein were proposed, we still need general and efficient method. This prompted us to investigate and develop the systematic approaches for this purpose. TPR domain in p67^{phox} has a molecular weight of 24 kDa and its structure determination using only ¹³C-, ¹⁵N-labeled sample is very difficult. So we selected the TPR as target and carried out a structural analysis for global fold determination using a limited number of data sets based on NMR experiments. At first we determined the “semi” global fold using Val, Leu, Ile (δ1) methyl ¹H-, uniform ²H/¹³C/¹⁵N-labeled sample. As large quantities of Tyr residues existed in the region whose convergence was worse, we improved the precision and accuracy of the structure using Tyr ¹H/²C-, Val, Leu, Ile (δ1) methyl ¹H/¹³C-, uniform ²H/¹⁵N-labeled sample. The global structure of TPR was much improved with the r.m.s.d. of approximately 2.5 Å.

1. 序論

高分子量タンパク質のグローバルフォールドを決定するために開発された様々な方法論は、その有効性が実証されつつある。特に、Ile/Leu/Val のメチル基に ¹H を残した ²H/¹³C/¹⁵N トリプルラベル体を用いての方法論はほぼ確立されているが、得られるフォールドの質は二次構造やトポロジーに強く依存することも明らかにされている。芳香環由来の NOE 情報を活用する方法や異方性を利用した角度情報 (RDC など) の束縛条件としての有効性も報告されたが、非常に多様であり、また、それらの方法論を応用して実際の NMR データを基に決定した例は限られている。一般に、重水素化試料の調製には多大なコストを要するため、これらの報告された手法を導入・比較しながら、グローバルフォールド決定に向けて、最も効率的なアプローチを検討することは非常に重要であると言える。

キーワード：高分子量タンパク質、グローバルフォールド、重水素化、選択的プロトン標識、残余正極子結合

著者ふりがな：○よしだ しんいち、おぐら けんじ、いながき ふゆひこ

p67^{phox} の TPR ドメインは分子量約 24 kDa のタンパク質で、¹³C/¹⁵N ダブルラベル体のみを用いての構造決定は困難であった。加えて、TPR ドメインは極めて α -ヘリックスに富んだタンパク質であり、グローバルフォールドの決定が比較的難しいと考えられた。そこで、この TPR を対象として選択し、実際の NMR 実験から得られたデータのみを基にした束縛条件から、グローバルフォールド決定のための最も効率的なアプローチの検討を行った。

2. グローバルフォールド決定に向けた第一段階；有用な中間構造の決定

【方法】 Ile(δ 1)/Leu/Val のメチル基に ¹H を残した ²H/¹³C/¹⁵N トリプルラベル体を用いて、主鎖およびメチル基の帰属、および NOESY 実験 (600 MHz、混合時間 50/ 200 msec) を行い、NOE 束縛条件および TALOS による二面角予測の束縛条件を作成した。また、¹⁵N ラベル体を用い、Pfl⁺ フェージを配向媒体として IPAP-HSQC 実験を行い、RDC 束縛条件も作成した。構造計算には CNS を用い、伸びた構造から SA 法により計算を行った。

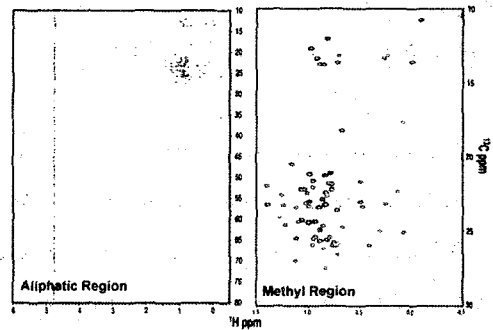


Fig. 1 ¹H-¹³C CT-HSQC spectrum of I (δ 1)/L/V methyl ¹H-, ²H/¹³C/¹⁵N-labeled TPR

【結果・考察】 NOESY の解析により、計 808 個 (残基あたり 4.2 個) の NOE を確認できた。また、メチル基が関与する NOE はフォールドに重要な遠距離 NOE 計 192 個の内 95% を占めた。構造計算では、SA 計算における距離制限や角度制限に関する力場のパラメータを適切に調整することで、NOE 束縛条件を満たす構造 (上位 10 個/100 個計算) が得られたが、二次構造を形成している領域の主鎖 r.m.s.d は約 5.0 Å 程度であったが、収束の良い領域と悪い領域が顕著であった。また、この段階では、RDC 束縛条件 (¹H-¹⁵N のみ) の有無で、計算結果に有意な差は見られなかった。

3. 中間構造をベースとしたラベル体の選択とグローバルフォールドの決定

【方法】 収束の悪い領域には Tyr 残基が多く存在したので、次の指針として、Tyr を ¹H/¹³C、Ile(δ 1)/Leu/Val のメチル基を ¹H/¹³C ラベルした均一 ²H/¹⁵N ラベル体を調製し、NOESY 実験 (600/800 MHz、混合時間 200 msec) 等から Tyr の芳香環プロトンの帰属、さらなる NOE の帰属を進め、再度構造計算を行った。

【結果・考察】 プロトン化する芳香環を Tyr 残基に限定したことで、Tyr 芳香環の帰属が容易に完了した。また、NOE 総数は 1330 個 (さらに解析中。残基あたり 6.9 個、遠距離 NOE は 334 個) であった。主鎖構造の収束が格段に上昇し、現段階で二次構造を形成している領域の主鎖 r.m.s.d は約 2.5 Å 程度である。



Fig. 2 Superposition of the 5 best structures with the lowest energy

(富山医薬大薬¹、順天堂大医²)○ 河野隆英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

Photo-CIDNP analysis of the microtubule-associated protein light chain 3, MAP-LC3

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-0194, Japan² Department of Biochemistry, Juntendo University of Medicine, Tokyo 113-8421, Japan

Microtubule-associated protein light chain-3 (MAP-LC3) is a human homologue of Apg8/Aut7 included in yeast Apg/Aut (autophagy) family. Apg/Aut family is involved in autophagy induced under nutrient-starvation condition in yeast and is composed of a number of Apg/Aut mutants. Apg8/Aut7 is cleaved at its C-terminal glycine residue by Apg4, cysteine protease. In addition, the cleaved Apg8/Aut7 is covalently attached to phosphatidylethanolamine at the glycine residue by interaction with Apg3 and Apg7. Thereby the modified Apg8/Aut7 interacts directly with membranes.

In the present study, we report the solution structure of MAP-LC3 and the result of additional analysis by means of photo-chemically induced dynamic nuclear polarization.

【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/Aut (autophagy) ファミリーと呼ばれている。Microtubule-associated protein light chain-3 (MAP-LC3) は、同ファミリーに属する Apg8/Aut7 ヒト類似体であり、他にも GABA_A receptor associated protein (GABARAP) や Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa (GATE-16) が同定されている。

本研究では MAP-LC3 の溶液構造を決定し、さらに photo-CIDNP 法による実験を行い、類似蛋白質で

MAP-LC3、Photo-CIDNP、溶液構造

このたかひで、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

ある GABARAP で報告されている N 末端領域の運動性(1)について考察した。これらから MAP-LC3 は GABARAP と異なり、溶液中で単一の構造を有するとの結論を得た。

【実験】

大腸菌に発現させた MAP-LC3 蛋白質を GST 親和性カラム、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。精製した蛋白質は終濃度 0.8 mM に調製し、光色素として 0.4 mM flavin mononucleotide を加えた。Photo-CIDNP 実験は Kaptein らの方法(2, 3)に従った。試料管の概略を Fig. 1 に示した。

【結果と考察】

GABARAP において N 末端領域は 2 種類のコンフォメーション、opened form と closed form、の平衡状態にあることが示されている(1)が、MAP-LC3 の構造計算では単一の立体構造を与え、その N 末端領域は Tyr110 を覆っている。Photo-CIDNP 実験では蛋白質表面の His、Trp、Tyr 残基を特異的に観測する。MAP-LC3 は 3 つの His 残基(27、57、86)、および 4 つの Tyr 残基(38、99、110、113)を持つが、His 残基はいずれも CIDNP 効果を示したものの、Tyr 残基においては Tyr38 に由来する信号のみを得た(Fig. 2)。このことは他の Tyr 残基が蛋白質内部にパッキングされていることを示しており、すなわち Tyr110 は溶媒に露出しないことを意味している。よって、MAP-LC3 の N 末端領域は常に Tyr110 を覆っており、GABARAP と異なり溶液中で単一の立体構造を保持していることが示された。

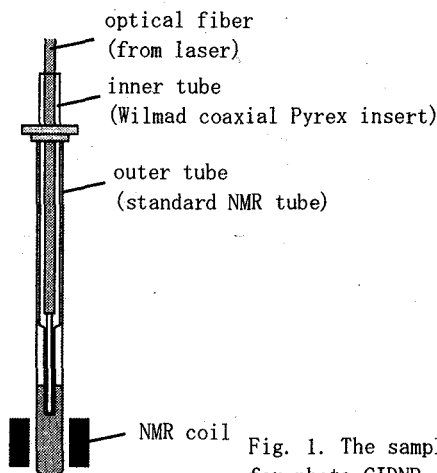


Fig. 1. The sample tube used for photo-CIDNP experiment.

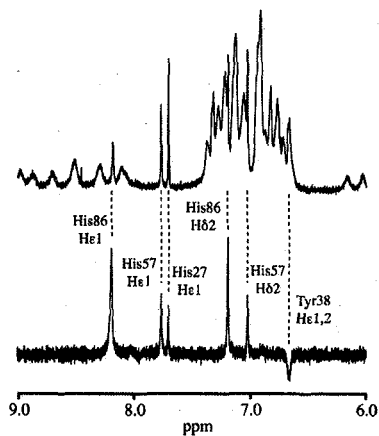


Fig. 2. The normal 1D spectrum (upper) and the CIDNP difference spectrum (lower) of MAP-LC3.

【参考文献】

- 1) J. E. Coyle, S. Qamar, K. R. Rajashankar, & D. B. Nikolov, *Neuron* 33, 63-74 (2002).
- 2) R. Kaptein, K. Dijkstra, & K. Nicolay, *Nature* 274, 293-294 (1978).
- 3) R. Kaptein, *Biol. Magn. Reson.* 4, 145-191 (1982).

Protein structure and dynamics study by high pressure NMR

Ryo Kitahara¹, Shigeyuki Yokoyama^{1,2}, and Kazuyuki Akasaka^{1,3}¹*Structural and Molecular Biology Laboratory, RIKEN Harima Institute at Spring-8, 1-1-1 Kouto, Mikazuki-cho, Sayo, Hyogo 679-5148, Japan*²*Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan*³*Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, 930-Nishimitani, Uchita-cho, Wakayama 649-6493, Japan*

Conformational fluctuation is a key for understanding protein function, but we know little about the actual *structural or shape changes* associated with the fluctuation. Here we present a general method for elucidating the shape change of a protein molecule in solution associated with a conformational fluctuation in atomic coordinates. We utilize multi-dimensional NMR spectroscopy and determine average coordinates at different pressures, which are to give “NMR snap shots” of a fluctuating protein structure because of the intimate relationship between conformation and volume of a protein. The first target protein chosen is ubiquitin (pH 4.6 at 20 °C), whose average coordinates were determined at 30 bar and at 3 kbar using NOE distance and torsion angle constraints. The structure at 3 kbar revealed that the helix swings out by ~3 Å outwardly with a simultaneous orientational change of the C-terminal segment carrying the reactive-site residue 76, forming an “open” platform suitable for enzyme recognition. Spin relaxation analyses at two pressures indicate that the conformational fluctuation takes place in the 10 microsecond time range.

溶液中の蛋白質は大きく構造を変化させることによりその機能を生み出す。しかしある種の運動に伴う立体構造の変化或いは分子形状の変化を原子レベルで捉えることは難しい。NMRは溶液中で蛋白質の構造を原子レベルで解析可能な手段であるが、その構造変化が速い場合($>>10^3 \text{ s}^{-1}$)測定時間(ms-s)の間にスペクトルは平均化され構造に関する情報も平均化されてしまう。一方スピン緩和の解析からps-msまでの広い時間領域にわたる“構造揺らぎ”の情報を得ることも可能であるが、構造或いは分子形状の変化の情報は得られない。我々の目的は圧力を用いて蛋白質の“揺らいでいる姿”をスナップショットのように捉えることである。圧力はもともと存在する蛋白質の多様構造間の平衡を、分子体積を軸に、加圧により部分モル体積の小さな構造の方へシフトさせることによって、天然状態から逸脱した構造を安定化させる。これにより常圧下では分光学的検出限界外にある“揺らいだ構造”も、加圧下で安定に捕捉され検出可能になる。

キーワード：圧力、準安定構造、ユビキチン

きたはらりょう、よこやましげゆき、あかさかかずゆき

我々はこれまでに細胞内でポリユビキチンを形成し蛋白質分解の信号となるユビキチンについて、その構造の全体像を明らかにした。すなわち広い圧力範囲で全残基レベルでの高圧 NMR 実験 (-21°C ~ 35°C, 30 bar ~ 3.7 kbar) を行うことによって、ユビキチンは N_1 , N_2 , I, U の少なくとも 4 つの構造間の平衡状態にあることを明らかにした^{1,2}。

昨年度の NMR 討論会で 30 bar (N_1 :85%) と 3 kbar (N_2 :77%) の加圧下でのプロトン-プロトン NOE 情報に基づくユビキチンの構造解析について発表を行った。構造解析を行う上での重要な問題点は、ユビキチンのように構造変化が速い場合 ($>10^3$ s⁻¹)、測定時間 (ms-s) の間にスペクトルは平均化されるため、得られる NOE 情報も平均化されてしまう。よってそこから得られる構造も複数の構造の、その分布率に応じた平均構造になるため、これまでの構造精密化の方法論では解決できない様々な問題を含むことがわかった。天然状態から逸脱した構造、すなわち熱励起構造の構造解析法の確立はこれからの NMR 法の重要な課題となると考えられる。

構造

二次元 ¹H/¹H NOESY, HNCA、三次元 ¹⁵N-edited HNHA を pH4.6, 20°C で 1 bar から 3 kbar まで測定した。距離制限は NOE から二面角 (ϕ , ψ) 制限は J カップリング定数と C ^{α} シフト値から得た。30bar と 3 kbar の圧力下で、約 1000 個の距離制限と約 80 個の二面角制限から CYANA を用いて構造計算を行った。

3 kbar では活性部位 Gly76 を含む C 末端残基 70-76 が Val170 の位置から大きく配向を変えており、これらは Val170 と Arg42 間に形成される 2 つの水素結合が切れた事と Val170 ϕ 角の変化に起因する。また β シート部位に対する α ヘリックスの配向が外側に 3Å 以上変化しており、これはその前後の部位つまり 22-24 番、38-41 番残基の主鎖二面角の変化によって説明できる。

ダイナミクス

30 bar と 3 kbar における ¹⁵N- R_1 , R_2 , NOE 測定に基づいて、Modelfree 解析からユビキチンのダイナミクスを調べた。加圧により ps~ns の速い運動 (S^2 , τ_c) に顕著な変化は無いが、 α ヘリックスと C 末端部位で R_2 の化学交換による寄与 Rex が認められた。Val170 N^H , H^N の加圧によるシグモイド状の化学シフト変化から見積もられた 3 kbar における N_1 (~23%), N_2 (~77%) の存在比率²、化学シフト差 $\delta\omega$ と Modelfree 解析より見積もられた Rex から、 N_1 と N_2 間の化学交換速度定数が 1 bar で 4.12×10^6 ($=k_{21}$) と 0.72×10^5 ($=k_{12}$) と見積もられ、ユビキチンは数十 μ s の時間スケールで 2 つのフォールド構造内を行き来していることが明らかになった。また各圧力における交換速度定数の解析から活性化状態の体積は N_1 構造に近いことがわかった。圧力は大きな正の活性化体積変化を伴う $N_2 \rightarrow N_1$ 構造変化の速度定数を遅くすることにより、加圧下で N_2 構造を安定化していることがわかった。

1. Kitahara and Akasaka *PNAS* **100**, 3167-3172 (2003).
2. Kitahara et al. *Biochemistry* **40**, 13556-13563 (2001).

1P049

テロメア DNA 結合タンパク質 TRF2、TRF1 の DNA との複合体の構造及び DNA 結合活性の比較

(1 横浜市立大学、2 木原記念横浜生命科学振興財団)

花岡慎悟^{1,2}、長土居有隆¹、西村善文¹

Comparison between TRF2 and TRF1 on their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities

Shingo Hanaoka^{1,2}, Aritaka, Nagadoi¹ and Yoshifumi, Nishimura¹

1 Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, 1-7-29, Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, 230-0045, Japan,

2 Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Sciences, 1-7-29, Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, 230-0045, Japan,

Mammalian telomeres consist of long tandem arrays of double-stranded telomeric TTAGGG repeats packaged by the telomeric DNA-binding proteins, TRF1 and TRF2. Both contain a similar C-terminal Myb domain that mediates sequence specific binding to telomeric DNA. In a DNA complex of TRF1 only the single Myb-like domain consisting of three helices can bind specifically to double-stranded telomeric DNA. Here we have determined the DNA complex structure of TRF2. In addition, we have examined telomeric DNA-binding activities of both DNA-binding domains of TRF1 and TRF2 and found that TRF1 binds more strongly than TRF2. Based on the structural differences of both domains, we created several mutants of the DNA-binding domain of TRF2 with stronger binding activities compared to the wild type of TRF2.

【序】

真核生物の染色体末端構造テロメアは G 塩基に富んだ繰り返し配列の DNA とタンパク質から構成されている。テロメアは染色体の安定維持には不可欠であり、染色体同士の融合や損傷 DNA 修復などから末端を保護している。ヒトでは TTAGGG の 6 塩基からなる繰り返し配列の 2 本鎖 DNA に TRF1 と TRF2 が結合する。TRF1 と TRF2 の C 末に存在する DNA 結合ドメインの 1 次構造は非常に類似しており、同じ配列の 2 本鎖 DNA を認識する。さらに TRF2 は 3' 突出末端の 1 本鎖 DNA の保護に関与している。TRF1 とテロメア DNA の構造は既に西川らにより構造が解析されている。本研究では TRF1 と TRF2 の DNA 結合ドメインの詳細な違いを調べるため、TRF2 の DNA 結合ドメインと DNA との複合体の構造を NMR により決定した。さらに変異体を作成し、TRF2 と TRF1 の DNA 結合活性の違いをアミノ酸レベルで同定した。

キーワード : telomere, protein/DNA interactions, NMR, Myb domain

はなおかしんご、ながどいありたか、にしむらよしふみ

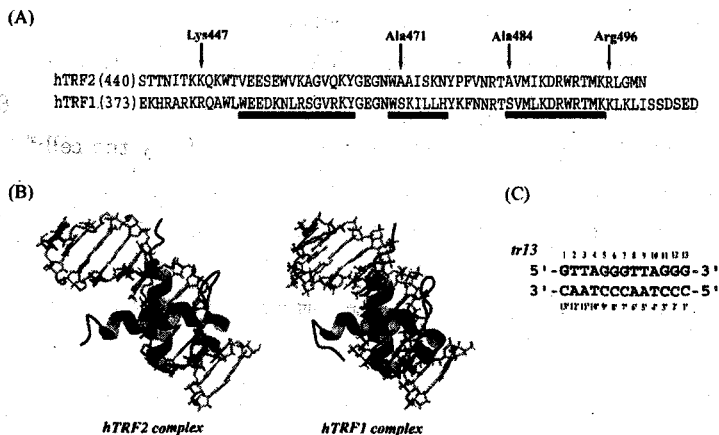
【実験】

TRF2は大腸菌発現系を用いて大量発現させ精製した。TRF2と2本鎖DNA(tr13:GTTAGGGTTAGGG/CCCTAACCCCTAAC)を1:1で混同し、5mM KPB, pH6.9に調整しNMR試料とした。Bruker社のDMX-600、AVANCE-800で測定し、CNSで構造を決定した。TRF1、TRF2及びTRF2変異体のDNA結合活性は10mM HEPES - KOH(pH6.8), 3mM EDTA, 180mM KCl, 0.003% Triton-100(v/v)の条件でBiacore3000により測定した。

【結果】

TRF2のDNA結合ドメインの構造は3本のヘリックスからなり、DNAとの複合体では3番目のヘリックスがDNAの主溝に深く入り、さらにTRF2のN末にあるLys447が副溝から塩基を認識していた。このDNAとの結合様式は以前に報告されたTRF1と良く似ていた。しかし、TRF1とTRF2では4つのアミノ酸(Lys447、A471、A484、R496)がDNAの認識において異なっていた。そこでTRF2とTRF1の詳細なDNA認識の違いを調べるために6種類の変異体(K447R, A471S, A484S, R496K, QM(K447R/A471S/A484S/R496K), DM(A471S/A484S))を作成した。最初に、各変異体とDNAの結合を確認するために1次元NMR測定で複合体のDNAイミノプロトン領域を調べた。

次にTRF1、TRF2及びTRF2変異体とDNAとの結合活性をBiacoreで測定した。得られた結果からTRF2はTRF1よりも解離定数が4倍高く、DNAとの親和性が弱いことが示された。そしてTRF2の変異体はR496Kを除きTRF2の野生型よりもDNAとの親和性が強く、QMとTRF1は、ほぼ同じ解離定数であった。このことから、Lys447、Ala471、Ala484の3残基がTRF1との親和性の違いに関わっており、特にLys447が大きく影響していることが示された。



- (A) The amino sequences of DNA binding domains of TRF2 and TRF1. Three helical regions are underlined. The four amino acids that interact with DNA shown by the arrow differ between TRF2 and TRF1.
- (B) The DNA complex structures of TRF2 and TRF1.
- (C) The base sequence of the telomeric DNA(tr13) used in this experiment.

高等動植物のプロテオミクス：zf-AN1 ドメインの溶液構造の網羅的な解析

(理研・GSC¹、日本電子(株)²、物質・材料研究機構³、東大・院理⁴、理研・播磨⁵)

○富澤忠¹、小柴生造¹、井上真¹、斉藤講平¹、泉顕也¹、根本暢明²、朝倉克夫²、高杉憲司²、木吉司³、好田真由美¹、廣田 洋¹、白水美香子¹、寺田貴帆¹、青木雅昭¹、鞆康子¹、関英子¹、藤倉由紀子¹、矢吹 孝¹、田仲昭子¹、林崎良英¹、関原明¹、篠崎一雄¹、木川隆則¹、横山茂之^{1, 4, 5}

Structural proteomics of animals and a plant: A comprehensive analysis of solution structures of the zf-AN1 domain

(RIKEN Genomic Sciences Center¹, JEOL Ltd.², National Institute of Material Sciences³, University of Tokyo⁴, RIKEN Harima Institute⁵)

○T. Tomizawa¹, S. Koshiba¹, M. Inoue¹, K. Saito¹, K. Izumi¹, N. Nemoto², K. Asakura², K. Takasugi², T. Kiyoshi³, M. Yoshida¹, H. Hirota¹, M. Shirouzu¹, K. Terada¹, M. Aoki¹, Y. Tomo¹, E. Seki¹, Y. Fujikura¹, T. Yabuki¹, A. Tanaka¹, Y. Hayashizaki¹, M. Seki¹, K. Shinozaki¹, T. Kigawa¹, S. Yokoyama^{1,4,5}

The zf-AN1 domain was first identified at the C-terminus of a ubiquitin fusion protein AN1 from *Xenopus laevis*. Recently, Huang et al. (2004) indicate that the zf-AN1 domain of ZNF216 interacts with TRAF6 protein, suggesting that it functions as a protein interaction module. In this study, we determined solution structures of zf-AN1 domains from the mouse 2310008M20Rik, the mouse 2810002D23Rik, the *Arabidopsis thaliana* At2g36320, and the *A. thaliana* F5O11.17 proteins using multidimensional NMR spectroscopy. Uniformly ¹³C-/¹⁵N- labeled protein samples were prepared by the cell-free expression system. Automated NOE cross-peak assignment and structure calculations with torsion angle dynamics were performed using the software package CYANA 2.0.17.

構造プロテオミクス、zf-AN1 domain、無細胞タンパク質合成、亜鉛結合タンパク質

○とみざわただし¹、こしばせいぞう¹、いのうえまこと¹、さいとうこうへい¹、いずみけんや¹、ねもとのおあき²、あさくらかつお²、たかすぎけんじ²、きよしつかさ³、よしだまゆみ¹、ひろたひろし¹、しろうずみかこ¹、てらだかほ¹、あおきまさあき¹、ともやすこ¹、せきえいこ¹、ふじくらゆきこ¹、やぶきたかし¹、たなかあきこ¹、はやしざきよしひで¹、せきもとあき¹、しのざきかずお¹、きがわたかのり¹、よこやましげゆき^{1,4,5}

All of the zf-AN1 domain structures are composed of 40 residues with two zinc ions, and the protein cores are formed mainly by the buried conserved Phe residue together with the zinc ions. Sequence alignment shows that the zf-AN1 domain family is classified into two classes according to the difference of the N-terminal zinc binding residues (CX₂C and CX₄C types). In the CX₂C type zf-AN1 domain, highly conserved Phe, Arg, and Tyr residues on the protein surface stack with each other, suggesting that these residues are involved in protein interactions.

【序論】

zf-AN1 ドメインは、アフリカツメガエルのユビキチン融合タンパク質 AN1 の C 末端に存在するドメインとして同定された。近年、Huang et al.(2004)によって、ZFP216 タンパク質の zf-AN1 ドメインが TRAF6 との相互作用に関与していることが示唆されている。このことから zf-AN1 は、タンパク質との相互作用を担っている可能性が高い。我々は、マウスの 2310008M20Rik、2810002D23Rik、シロイヌナズナの At2g36320 protein, F5O11.17 protein の zf-AN1 ドメインの構造を多次元 NMR 法によって決定した。

【方法】

¹³C, ¹⁵N 標識体 zf-AN1 ドメインの発現には無細胞タンパク質合成系を用いた。NMR 測定には、Bruker 社製 AVANCE800、700、600、JEOL 社製 ECA920, 800, 600 を使用した。NMR スペクトルは、NMRpipe によるデータ処理を経た後に小林らが開発した Kujira を用いてシグナル帰属を行った。CYANA 2.0.17 による NOE 自動帰属と立体構造計算を行った。

【結果】

zf-AN1 ドメインの構造を解くことにはじめて成功した。zf-AN1 ドメインは、40 アミノ酸残基で立体構造を形成している。2 つの亜鉛イオンと保存性の高い Phe がタンパク質の核を形成している。配列解析により zf-AN1 は、N 末端の亜鉛結合部位の違いによって 2 つのグループに分けることができる(CX₂C と CX₄C)。CX₂C タイプにおいては、分子表面に高い保存性をもった Phe, Arg と Tyr がスタックした構造が存在しており、タンパク質相互作用において重要な役割を演じている可能性が高い。

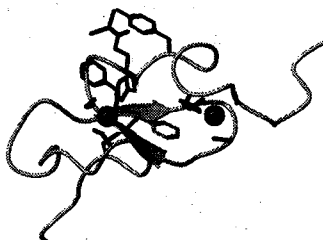


Figure Structure model of the zf-AN1 domain from the mouse 2810002D23Rik.
Ribbon model of the zf-AN1 domain (CX₂C type) from the mouse 2810002D23Rik (751-793).

SWIB ドメインの立体構造解析

(理研・GSC¹, 東大・院理², 理研・播磨³)○米山 操¹, 行木信一¹, 梶尾尚哉¹, 小柴生造¹, 井上 真¹, 好田真由美¹, 廣田洋¹, 白水美香子¹, 寺田貴帆¹, 青木雅昭¹, 柄 康子¹, 関 英子¹, 藤倉由紀子¹, 矢吹 孝¹, 田仲昭子¹, 関 原明¹, 篠崎一雄¹, 木川隆則¹, 横山茂之^{1,2,3}*Arabidopsis thaliana* Structural Proteomics:

Solution structures of the two SWIB domains of the BAF60b homologue and a plant-specific protein encoded by gene At5g08430

¹RIKEN Genomic Sciences Center, ²The University of Tokyo, ³RIKEN HarimaM. Yoneyama¹, N. Nameki¹, N. Tochio¹, S. Koshiba¹, M. Inoue¹, M. Yoshida¹, H. Hirota¹, M. Shirouzu¹, T. Terada¹, M. Aoki¹, Y. Tomo¹, E. Seki¹, Y. Fujikura¹, T. Yabuki¹, A. Tanaka¹, M. Seki¹, K. Shinozaki¹, T. Kigawa¹, S. Yokoyama^{1,2,3}

The SWIB domain consists of about 80 amino acids and is found in several proteins such as the eukaryotic BRG1/Brm-associated factor 60kDa subunit (BAF60) of the SWI/SNF complex and the plant-specific SWIB domain-including proteins. The SWIB domain is referred to as the SWIB/MDM2 domain family in Pfam database. The multiple sequence alignment of the SWIB/MDM2 domain family shows that this family can be divided into three groups; BAF60 type SWIB domains, plant-specific type SWIB domains, and the MDM2 domain. It is known that the MDM2 domain is the p53-binding domain of the MDM2 oncoprotein that acts as a cellular inhibitor of p53 activity. However, the structure and the function of the SWIB domain remain unclear. Here, we report the solution structures of the two SWIB domains of the BAF60 homologue and a plant-specific protein encoded by gene At5g08430 from *Arabidopsis thaliana* by NMR spectroscopy. The structures of the two SWIB domains are similar to that of the MDM2 domain. Although the conserved residues are different among three groups, these residues are clustered on the regions corresponding to the p53-binding site of the MDM2 domain. Our results suggest that each SWIB domain group, respectively, has a different function.

[序論] SWIB ドメインは約 80 アミノ酸残基からなる真核生物に特有なドメインである。SWIB ドメインを含むタンパク質には、クロマチンの再構築に関与する SWI/SNF 複合体を構成する BAF60 があり、また、植物では機能未知である複数の植物特有な SWIB ドメイン含有タンパク質がある。SWIB ドメインは、Pfam データベースでは、MDM2 ドメインとともに SWIB/MDM2 ドメインファミリーとして分類されている。この SWIB/MDM2 ドメインファミリーは、配列比較により 3 種類のサブグループ、すなわち、BAF60 型 SWIB、植物特有型 SWIB 及び、MDM2 に分けられた。MDM2 ドメインは、MDM2 腫瘍タンパク質の p53 結合ドメインであり、p53 の転写活性領域に結合することにより p53 の活性を阻害することが知られている。また、p53-MDM2 複合体の結晶構造が報告されており、MDM2

SWIB domain, MDM2 domain, 構造プロテオミクス, 無細胞タンパク質合成

○よねやまみさお, なめぎのぶかず, とちおなおや, こしばせいぞう, いのうえまこと, よしだまゆみ, ひろたひろし, しろうずみかこ, てらだたかほ, あおきまさあき, ともやすこ, せきえいこ, ふじくらゆきこ, やぶきじゅん, たなかあきこ, せきもとあき, しのぎかずお, よこやましげゆき

ドメインの p53 結合部位は $\alpha 2$ と $\alpha 4$ 間の溝であることがわかっている。しかしながら、SWIB ドメインの詳細な立体構造及び機能に関してはわかっていない。

我々は、シロイナズナの BAF60b ホモログ (BAF60 型 SWIB) および、シロイナズナの遺伝子 At5g08430 にコードされた植物特有タンパク質 (植物特異型 SWIB) の SWIB ドメインの立体構造を決定した。

[方法] 無細胞タンパク質合成系により、2つの $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 SWIB ドメイン (BAF60 ホモログ, At5g14170 由来タンパク質:315-394 a.a.および、At5g08430 由来タンパク質:25-112 a.a.) を調製した。NMR 測定には、Bruker 社製 Avance600 および Avance800 を用いた。主鎖および側鎖の帰属には NMRView と理研 GSC にて開発された解析用ツール KUJIRA を用いた。NOE 自動帰属と立体構造計算には CYANA1.0.7 を用いた。

[結果・考察] 今回解析した2種類の SWIB ドメインの立体構造を Fig. 1(a)および(b)に示す。どちらの SWIB ドメインも、4つの α -helix からなる open helix-bundle を形成している。BAF60 型 SWIB ドメインでは、その open helix-bundle に2つの antiparallel β -sheet が対称的に位置し、また、植物特有タンパク質 SWIB ドメインでは、1つの antiparallel β -sheet が存在する。これらの構造は、MDM2 ドメイン (PDB code: 1YCR) とよく似た構造である。それぞれのサブグループ内で保存されており、かつ溶媒に露出しているアミノ酸残基は、BAF60 型 SWIB ドメイン、植物特異型 SWIB ドメイン、ともに MDM2 の p53 結合部位に相当する領域にほとんど集中しているが、サブグループ間での共通性は見出せなかった。これらの結果から、BAF60 型 SWIB、植物特異型 SWIB は、MDM2 ドメインとはそれぞれ異なった機能を持つことが示唆される。

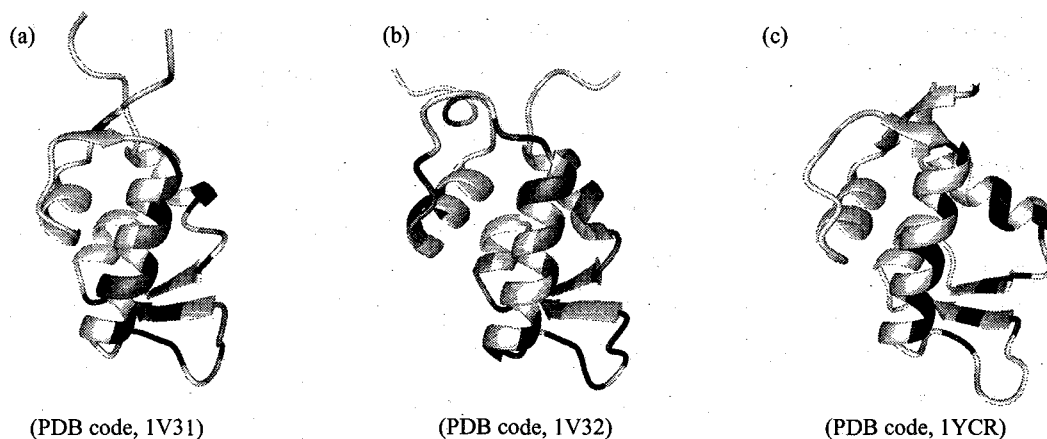


Fig. 1 Comparison of the structures of the SWIB/MDM2 domain

The structures of the SWIB domains of the BAF60 homolog (a) and a plant-specific protein encoded by gene At5g08430 (b) from *Arabidopsis thaliana* are shown in ribbon diagrams. The structure of the MDM2 domain from human MDM2 oncoprotein is also shown (c). The color represent the conserved residues(a, b) in two SWIB domains and the p53-binding residues (c) in the MDM2 domain.

1P052

スピララベルを用いた膜環境下のペプチドの配向決定

(¹群大工、²三菱化学生命研)

○細田和男¹、野口真路¹、稲岡斉彦¹、河野俊之²、若松 馨¹

Determination of peptide orientation in membraneous environments using spin labeled lipids

Kazuo Hosoda¹, Shinji Noguchi¹, Yoshihiko Inaoka¹, Toshiyuki Kohno², and Kaori Wakamatsu¹

¹Faculty of Engineering, Gunma University, ²Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences

The information of the orientation of peptides in membranous environment is important for understanding the function of the peptides. A transferred NOE (TRNOE) method, which has been used to determine the conformation of peptides bound to vesicles, may be applied also to determine the orientation of peptides in the lipid bilayers. Last year, we reported that TRNOE signals of peptides are quenched depth-specifically by spin label groups incorporated in vesicles, and determined the orientation of mastoparan-X bound to vesicles by such quenching of TRNOE signals. Here we will report the precise determination of the orientation of the peptides bound to vesicles by quantitative analysis of the quenching. We will also present the application of the spin label-mediated quenching for determining the orientation of peptides bound to bicelles.

【緒言】

膜蛋白質や膜作動性ペプチドの構造と機能との相関を解明するには、蛋白質やペプチドの膜中の立体構造だけでなく、膜内での配向も明らかにする必要がある。脂質二重膜に結合したペプチドのコンフォメーションを決定する手法としては、脂質二重膜存在下での転移核オーバーハウザー効果 (TRNOE) が有効である。TRNOE は膜中のペプチドの配向を決定するうえでも有用である。膜の特定の深さにスピララベルを導入したベシクルの存在下で TRNOE 測定を行い、スピララベルによる TRNOE シグナルのクエンチングを解析することにより、二重膜に結合したマストパラン X (MP-X) の配向を決定できる事を昨年報告した。今回、そのシグナルのクエンチングを定量的に評価することによって、配向を精度良く決定できる事を報告する。また、bicelle に結合したペプチドの配向をスピララベルで決定できることも報告する。

スピララベル、mastoparan-X、配置、膜環境

ほそだ かずお、のぐち しんじ、いなおか よしひこ、こうの としゆき、
わかまつ かおり

【サンプルおよび測定】

^{15}N でラベルした MP-X はユビキチン融合蛋白質として大腸菌で発現させ調製した。bicelle は $q=0.5$ の組成比の物を DMPC と CHAPSQ で調製した。スピララベル脂質は DPPC の脂肪酸に DOXYL 基を、5 位 (5-DOXYL)・12 位 (12-DOXYL) に結合させたもの、および、リン酸基に TEMPO 基を結合させた物 (TEMPO-PC) を用いた。それぞれのスピララベルの適正濃度は滴定により決定した。NMR 測定は pH 5.0 のサンプルについて Bruker ARX-400 を用い 318 K で行った。NMR スペクトルの処理は NMRPipe と PIPP/CAPP/STAPP を用いて行った。

【結果と考察】

リン脂質二重膜に結合した MP-X は α ヘリックスを形成する事から、ヘリックス状態のペプチド構造を作成した。種々の配向においてスピララベルから各プロトンまでの距離を見積り、実測のクエンチングと比較した。その結果、膜面に対するヘリックスの配向について詳細に議論できる事を明らかにした。

リン脂質二重膜に結合した MP-X は、 α ヘリックスを形成する事から、ヘリックス状態のペプチド構造を作成した。種々の配向においてスピララベルから各プロトンまでの距離を見積り、実測のクエンチングと比較した。その結果、膜面に対するヘリックスの配向について詳細に議論できる事を明らかにした。Fig. 1 に bicelle に結合した MP-X の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示す。各スピララベル (TEMPO-PC、5-DOXYL-PC、12-DOXYL-PC) を 0.4 mM 添加したときのシグナルを小ウィンドウに示した。この結果から、昨年報告したベシクル存在下での TRNOE 測定と同様に、bicelle に結合したペプチドについても、スピララベルの位置の違いにより、クエンチされる HN シグナルに違いがある事が確認された。さらに、Trp の側鎖 NH シグナルが 5-DOXYL-PC の存在下で最も強くクエンチされていることから、Trp の側鎖 NH が浅い疎水領域に存在する事がわかる。現在、クエンチングの定量的の評価をおこなっており、総合的な評価を報告する。

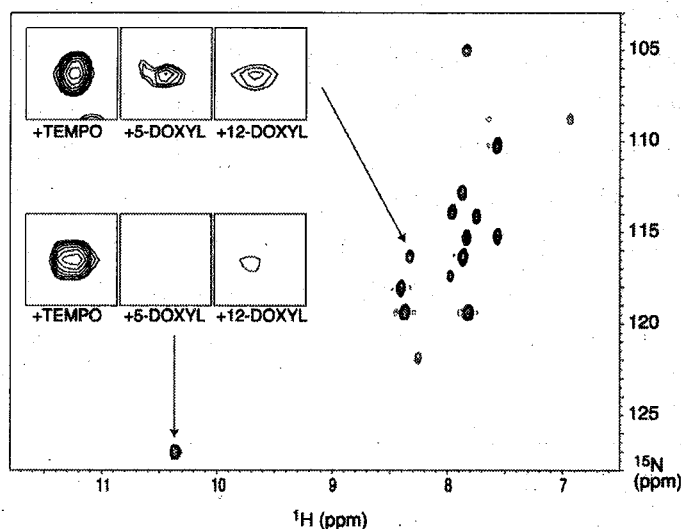


Fig. 1: ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of MP-X (3.75 mM) in the presence of DMPC/CHAPSQ bicelle (4 mM). Insets show signals in the presence of each spin labeled lipid (0.4 mM).

(¹群大工、²三菱化学生命研)

○石井 毅¹、小暮広行¹、飯塚靖子¹、河野俊之²、窪田健二¹、若松 馨¹

Improvement of solution NMR spectra of proteins by the addition of NDSB

Takeshi Ishii¹, Hiroyuki Kogure¹, Yasuko Iizuka¹, Toshiyuki Khono²,

Kenji Kubota¹, Kaori Wakamatsu¹

¹Faculty of Engineering, Gunma University, ²Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences

Non-detergent sulphobetaines (NDSBs) are a group of small zwitterionic molecules having a hydrophilic sulphobetaine group and a short hydrophobic group. NDSBs are known to prevent aggregation of proteins. They are also known to increase the solubility and thermal stability of proteins. These properties should be particularly useful for solution NMR measurements of proteins. We confirmed that NDSB-195 increases the sensitivity of NMR signals of ubiquitin. Improvements of NMR spectra of other proteins will also be presented.

【緒言】

溶液 NMR 測定において蛋白質の会合によるみかけの分子量の増大はシグナルをブロードにし、解析を困難にする一つの原因となっている。また、長時間の測定を要する事が多いので、蛋白質サンプルの安定性も問題になる。Non-detergent sulphobetaines (NDSBs) は親水性のスルホベタイン基と疎水基をもつ両性イオン化合物である。この試薬は疎水基の長さが界面活性剤に比べ短いため、1 M という高濃度でもミセルを形成しない。NDSB は蛋白質の会合を防止するとともに、溶解度や熱安定性を増加させることが知られている。実際に、X 線結晶構造解析においては、NDSB の会合防止効果を利用して良質な結晶が作成されている。そこで、NDSB は溶液 NMR 測定においても利用価値が高いと考えられる。蛋白質の会合を防止する添加剤としては従来 CHAPS やコール酸などが用いられているが、これらに比べて NDSB は溶液の粘度をあまり上昇させないというメリットがある。我々は NDSB 存在下でユビキチンの NMR シグナルの感度が向上することを確認した。今回、動的光散乱法を用いて得られた他の蛋白質に対する NDSB の会合防止効果を含めて NDSB 添加による測定感度の向上を報告する。

NDSB、会合、熱安定性、溶液 NMR

いしい たけし、こぐれ ひろゆき、いづか やすこ、こうの としゆき、
くぼた けんじ、わかまつ かおり

【実験】

^{15}N ユニホームラベルしたヒスチジンタグのついたユビキチンは大腸菌で発現させた。NMR 測定には Bruker 製 ARX-400 を使用し、緩衝液として 20 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.5), 100 mM NaCl, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O を用い、 30°C で 0.5 M NDSB-195 存在下・非存在下で測定した。NDSB は疎水基の構造によりいくつかの種類があるが本研究では、分子量 195.3 の NDSB-195 (Fig. 1) を用いた。

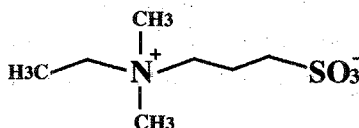


Fig. 1: Structure of NDSB-195.

【結果と考察】

NDSB 存在下・非存在下での NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。二つを比較すると NDSB 存在下非存在下にはないシグナルがあることがわかる。NDSB を加えたことによって蛋白質どうしの会合が防止され、シグナルがシャープになったために、弱いシグナルも観測できるようになったと考えられる。また我々は動的光散乱法により蛋白質の会合に及ぼす NDSB の効果を解析した。その結果、NDSB 存在下で蛋白質の会合状態を検討するためには NDSB の前処理が必須であること、NDSB の蛋白質の会合を防止能には至適濃度があること等がわかった。動的光散乱で得られた測定結果、NDSB の物性、NDSB 以上の効果が期待される低分子化合物についてもあわせて報告する予定である。

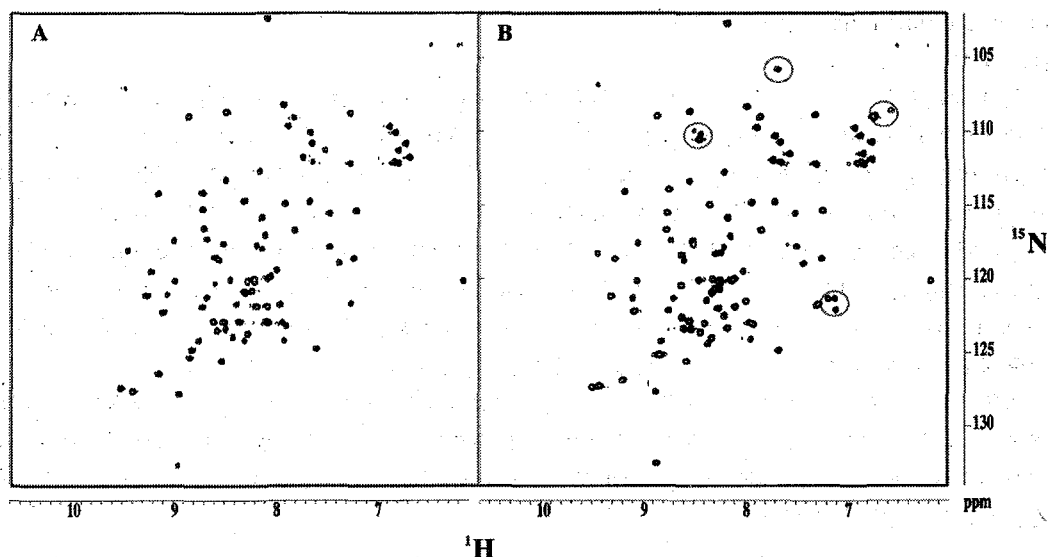


Fig. 2: HSQC spectrum of ubiquitin in the absence (A) and presence (B) of 0.5 M NDSB-195.

○久米田博之¹, 小椋賢治¹, 朝山宗彦², 加藤静恵³, 加藤悦子³, 稲垣冬彦¹**Solution structure of the NifU-like protein from *Oryza sativa***

(¹Department of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, ²Laboratory of Molecular Genetics, College of Agriculture, Ibaraki University, ³Biochemistry Department, National Institute of Agrobiological Sciences)

○Hiroyuki Kumeta¹, Kenji Ogura¹, Munehiko Asayama²,
Shizue Katoh³, Etsuko Katoh³, Fuyuhiko Inagaki¹

The NifU/NifU-like protein is proposed to provide a molecular scaffold for the assembly of iron-sulfur cluster and is required for photosynthesis, electron transfer reaction and regulation of gene expression. The chloroplastic NifU-like protein has a chloroplast targeting signal sequence at the N-terminus and tandem-repeat of NFU domains. A CXXC motif in the NFU domain is suggested to accept and transfer an iron-sulfur cluster to receptor protein, but the C-terminal domain is devoid of this motif. This domain arrangement is unique to chloroplastic NifU-like protein family. A NifU-like protein from *Haemophilus influenzae* (HiNifU) was determined in this protein family, but has low sequence similarity with disparity in the Cys residue location.

Here, we describe the solution structure of the C-terminal domain (L154-S226) of NifU-like protein from *Oryza sativa* (OsNifU1) by heteronuclear NMR spectroscopy and discuss structural differences between OsNifU1 and HiNifU, which provides clues to biological function of the C-terminal domain of OsNifU1.

[はじめに]

葉緑体局在型 NifU-like タンパク質は、葉緑体中における Ferredoxin 局在誘因子および葉緑体内鉄硫黄クラスター形成の足場部位として機能する。また葉緑体局在型 NifU-like タンパク質は、N 末端に葉緑体標的シグナル配列を持ち、二回繰り返しのドメイン構造をとっていることが既に明らかになっている。二つのドメインのうち、C 末端側にあるドメインには CXXC モチーフが欠けている。このような配列構成は他の生物種由来 NifU/NifU-like タンパク質には見られず植物特有である。また現在までに立体構造の明らかになっている NifU/NifU-like タンパク質は、*Haemophilus influenzae* 由来の NifU-like タンパク質 (HiNifU) のみである。また、葉緑体局在型 NifU-like タンパク質と HiNifU は配列相同性に乏しく、システイン残基の一次配列上の位置も異なっている。

本発表では、イネ由来葉緑体局在型 NifU タンパク質 (OsNifU1) の CXXC モチーフを持たないドメイン (L154-S226) に関して、NMR 法を用いた構造解析を行い、本構造を葉緑体局在型 NifU-like タンパク質のモデルとして HiNifU との比較検討を行うこと、および本ドメインの機能に関する考察を行うことを研究目的とした。

構造プロテオミクス、イネゲノムプロジェクト、鉄硫黄タンパク質、NifU/NifU-like タンパク質

くめた ひろゆき、おぐらけんじ、あさやま むねひこ、かとう しずえ、かとう えつこ、
いながき ふゆひこ

[方法・結果]

NMR 測定サンプルは 0.8 mM ^{15}N ラベル体、0.45 mM $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体を用いた。多核多次元 NMR 測定は、Varian 社製 UNITY INOVA 800 MHz および 600 MHz 分光計によって行った。スペクトル処理には NMRPipe、スペクトル解析には Sparky をそれぞれ用いた。 ^{13}C -および ^{15}N -NOESY-HSQC により NOE 信号を取得し、CYANA による自動 NOE 信号帰属および立体構造計算を行った。構造計算の結果、安定最終構造 20 個の平均 Target function は 0.05 \AA^2 になり、Asn157 から Leu225 までの主鎖の RMSD は 0.5 \AA 、重原子の RMSD は 0.88 \AA であった (図)。本構造は、二本の α ヘリックス (Asn157 - Ala173、Thr203 - Ile216) と逆平行および平行ストランドの三本による β シート (Met184 - Lys186、Ile189 - Val192、Ile221 - Leu224) から構成されている事がわかった。また、TALOS による二面角予測と得られた立体構造は、良い一致を示した。

配列アライメントから CXXC モチーフが欠落していると考えられる領域は、Pro197 と Ala198 の間と推測され、それが含まれるループ領域は NOE も少なく、収束の悪い領域であった。また、このループを構成している残基 (Ala198~Val201) の主鎖アミドは [^1H - ^{15}N]-HSQC 上において、微弱なピークであるかもしくは観測されなかった。Steady-State NOE の解析結果からも、C 末端側からループに向かって柔軟性が上昇しているのが見てとれ、おそらくループ全体が柔軟な構造をしている事が推察された。

[考察]

得られた立体構造と既知の NifU-like タンパク質、HiNifU との比較を行った。一次配列上、非常に離れた位置にある Cys 残基は、両タンパク質において α ヘリックス末端の一方向に偏重して存在していた。鉄硫黄クラスターが α ヘリックス末端の一方向に形成される事が推察される。鉄硫黄クラスター形成に関与しない他の領域を GRASP による表面電荷表示により比較を行ったところ、OsNifU1L154-S226 は塩基性に、HiNifU は酸性に富んでいた。OsNifU1 の鉄硫黄クラスターレセプターである Ferredoxin が酸性に富む分子表面を持つ事から、OsNifU1 の塩基性に富む分子表面は、標的タンパク質との結合に寄与していることが考えられた。

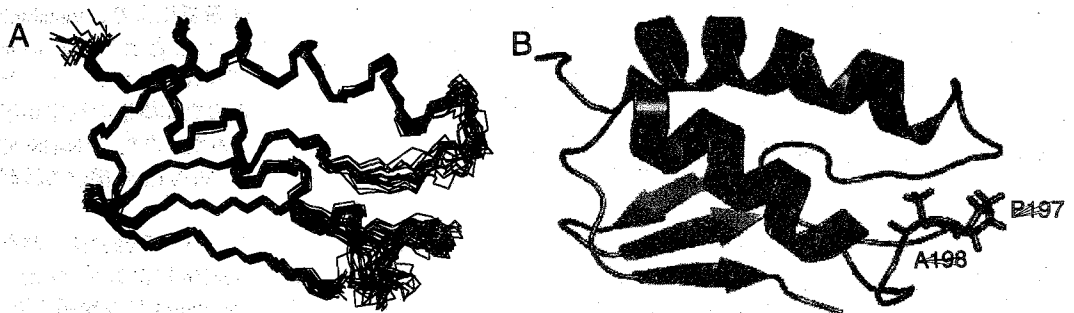


Fig. The solution structure of OsNifU1L154-S226.
(A) Superimposed of 20 structures (B) Ribbon diagram

ホヤ由来バナジウム結合タンパク質 Vanabin2 の構造とバナジウムとの相互作用に関する研究

(理研 GSC¹, 横浜市大院総理², 広島大院理³)

○濱田季之^{1,2}, 浅沼三和子¹, 植木龍也³, 林 文晶¹, 小林直宏¹, 横山茂之¹, 道端 齊³, 廣田 洋^{1,2}

Studies on Vanabin2, a vanadium-binding protein in a vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. – solution structure and vanadium-protein interaction –

RIKEN Genomic Sciences Center¹; Grad. Sch. Integrated Science, Yokohama City Univ.²; Grad. Sch. Science, Hiroshima Univ.³

○Toshiyuki Hamada^{1,2}, Miwako Asanuma¹, Tatsuya Ueki³, Fumiaki Hayashi¹, Naohiro Kobayashi¹, Shigeyuki Yokoyama¹, Hitoshi Michibata³, and Hiroshi Hirota^{1,2}

Ascidians belonging to the suborder Phlebobranchia are known to accumulate high levels of a transition metal, vanadium, in blood cells called vanadocytes, even though the mechanism for this biological phenomenon remains unknown. Recently, we identified vanadium-binding proteins, named Vanabins, from a vanadium-accumulating ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. Here, we report the first 3D structure of Vanabin2 in aqueous solution. The structure consists of an overall bow-shaped conformation with four α -helices connected by nine disulfide bonds. The ¹⁵N-HSQC perturbation experiments of Vanabin2 indicated that vanadyl cations are exclusively localized on the same face of the molecule, and contact most of positively charged residues. The present NMR studies provide information that helps for understanding yet unknown mechanism of vanadium accumulation in ascidians.

脊索動物のホヤは高濃度かつ高選択的にバナジウムを濃縮している。特にバナジウムボヤ (*Ascidia gammata*)の血球において、その濃度は海水のバナジウム濃度 (35 nM) の1,000万 (10⁷) 倍に相当する350mMに達する。血球中の濃縮されたバナジウムはバナジウム濃縮細胞 (バナドサイト)の液胞内の硫酸酸性下 (pH 1.9, 500 mM H₂SO₄) で、三価[V(III)]に還元されて蓄えられる。他の生命体に例を見ないこの特異な生理現象は、金属イオンの選択的濃縮機構を解明する上で格好のモデルであり、化学的にも生物学的にも興味深い。我々は、最近、スジキレボヤ (*Ascidia sydneiensis samea*)のバナドサイトから5種類の Vanabin 類 (Vanabin1, 2, 3, 4 and P) を同定した^{1,2}。これらは全て配列上約20%のシステイン残基を含み、{C}-{x(2-4)}-{C}という特徴的なモチーフの繰り返し配列を示していた。これらの Vanabin 類の中で、Vanabin2 は、Hummel-Dreyer 法により、1分子あたり10-20原子の四価のバナジウム[V(IV)]と結合することが分かっている (結合定数は10⁻⁵M程度)。また、EPR解析により、Vanabin2のリジン残基の窒素原子とV(IV)が錯体を形成することも示唆されている³。以上のことより、Vanabin類は、全く新しいタイプの金属結合タンパク質であり、バナジウムイオンとの相互作用メカニズム、そしてホヤにおけるバナジウムイオンの濃縮還元機構を解明する上で、Vanabin類の立体構造の決定が不可欠である。そこで、我々は、NMRを用いたVanabin2の三次元構造の決定を試みた。また、¹⁵N-HSQCスペクトル上でV(IV)イオンの titration 実験を行ない、Vanabin2の構造上におけるV(IV)結合部位の検討を行なった。

まず、大腸菌を用いた発現系により、¹⁵Nおよび¹⁵N,¹³C-標識の Vanabin2 をマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現させ、amylose resin アフィニティーカラム、factor Xa による tag 切断、ついで陰イオン交換カラムを用いて単離、精製した。これらの標識タンパク質を20mMリン酸緩衝液 (pH 6.9) に、タンパク質濃度1mM程度の10% D₂O水溶液として調製し、主に、Varian Inova600とInova800によりNMR測定を行なった。主鎖および側鎖の帰属にはNMRViewおよび理研GSCで独自に開発されたKujira(ver. 0.8995)を用いた。ここで、Vanabin2に含まれる18個のシステイン残基のC β カーボンのケミカルシフトは36-48ppmであり、全て酸化型であることが分かった。この結果は、ESI-MS測定から得たVanabin2の分子量の値が、アミノ酸配列から推定される分子量より18mu小さいことから

ホヤ、バナジウム、NMR、三次元構造、結合部位

はまだとしゆき、あさぬまみわこ、うえきたつや、はやしふみあき、こばやしなほひろ、よこやましげゆき、みちばたひとし、ひろたひろし

も明らかである。

そこで、SS 結合情報を含まない Vanabin2 の初期構造を用いて、立体構造計算を行なった。¹³C-edited NOESY 及び ¹⁵N-edited NOESY スペクトル上で検出した 2,686 個の NOE を CYANA(ver. 1.0.7)を用いて、自動帰属および立体構造計算を行なった。得られた 20 個のグローバルフォールド構造 (主鎖の RMSD 1.39 Å) において、システイン残基の C_β と S 原子間の距離を求め、9 個全ての SS 結合の組み合わせ (9-63, 13-59, 17-56, 23-49, 27-44, 31-40, 67-94, 72-89, and 76-86) を決定した。なお、これらの組み合わせのうち、4 組の SS 結合は、質量分析法により確認された。

次に、全ての SS 結合情報を含めて、最終的な構造計算を行なった。NOE から得た距離制約条件に加えて、Talos 計算から得られた 103 個の ϕ, ψ angles の二面角制約条件、そして、HNHB, HN(CO)HB から得られた 14 個の χ_1 angles の二面角制約条件をもとに、100 個の初期構造から CYANA 構造計算を行なった。その結果、Vanabin2 は、4 本の α -helices からなる弓形の構造をとり、SS 結合がはしご状に配置していることが分かった (Fig. 1)。Vanabin2 は、構造が rigid なタンパク質に見られるような疎水性コアが見られない。そのため、それぞれの helix は、良く収束している (主鎖の RMSD 0.2 - 0.3 Å) のに対し、分子全体の収束度はやや低め (主鎖の RMSD 1.1 Å) であった。また、Vanabin2 は、14 個のリジン残基、5 個のアルギニン残基を含んでいるが、それらのほとんどが分子表面の片側に局在し、positive charge の分布を示していた。

更に、Vanabin2 とバナジウム(IV)イオンとの相互作用を調べるため、NMR を用いた titration 実験を行った。0.15mM の ¹⁵N 標識 Vanabin2 の NMR 測定試料に、VO₄ と iminodiacetic acid (IDA) の 1:1 mixture を徐々に加えていき、¹⁵N-HSQC 上のシグナルの挙動を調べた。タンパク質 : V(IV) のモル比を 1:0.2, 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 で行った。モル比 1:1 では、若干の signal broadening を示したが、signal の消失は見なかった。モル比 1:5 では、signal broadening とともに、約 1/3 の残基が消失した。消えた残基は、C9, K10, C13, T21, C23, K24, K38, R41, R42, C44, K45, D53, D57, A58, R60, M61, K62, C63, H64, K65, A66, C67, R68, A69, N71, C72, C76, E80, S83, T85, C86, R87, A88, M90, T92, C94 の 36 残基であった。モル比 1:10 では、かなりのシグナルの消失に加え、ケミカルシフトも変わってきており、ほとんどの残基が同定不可能であった。モル比 1:5 の条件下で消えた残基は、三次元構造上で局在化しており、その局在は、surface model の positive charge の分布と相関が見られた。そのことは、Vanabin2 は、側鎖に窒素原子を持つリジンやアルギニンと相互作用していることがわかり、V(IV)-N で錯体を形成するという ESR 研究の結果を支持した。

以上、NMR を用いて、Vanabin2 の三次元構造を決定し、バナジウム(IV)イオンとの相互作用部位を明らかにした。今後の更なる研究によって、Vanabin2 とバナジウムイオンの相互作用メカニズムについて、また、ホヤのバナジウム濃縮還元メカニズムについて、より詳細な知見が得られるものと期待する。

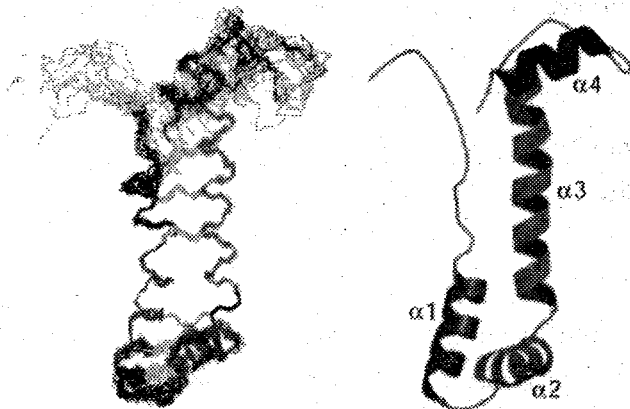


Figure 1. Structure of Vanabin2

(Left) The final 10 structures superposed over the backbone heavy atoms of encompassing residues 18 to 70. The side chains of half-cystine residues are shown. (Right) Ribbon representation of a single structure.

References

1. Michibata, H., Yamaguchi, N., Uyama, T., Ueki, T., *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, 237, 41-51.
2. Ueki, T., Adachi, T., Kawano, S., Aoshima, M., Yamaguchi, N., Kanamori, K., Michibata, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, 1626, 43-50.
3. Fukui, K., Ueki, T., Ohya, H., Michibata, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 6352-6353.

2P056

ミトコンドリア・プレ配列受容体 Tom20-ALDH プレ配列複合体の
結晶構造と緩和解析

¹九州大学・生体防御医学研究所

²名古屋大学・大学院理学研究科

○帯田孝之¹、井倉真由美¹、尾瀬農之¹、前仲勝実¹、遠藤斗志也²、神田大輔¹

Crystal structure and NMR backbone dynamics of the mitochondrial import receptor
Tom20-ALDH presequence complex

¹ Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

² Graduate School of Science, Nagoya University

○Takayuki Obita¹, Mayumi Igura¹, Toyoyuki Ose¹, Katsumi Maenaka¹, Toshiya Endo²,
Daisuke Kohda¹

Tom20, a general import receptor in the outer mitochondrial membrane, binds to mitochondrial presequences, and distinguishes mitochondrial proteins from non-mitochondrial ones. Based on the NMR structure of Tom20 in complex with the presequence of rat aldehyde dehydrogenase (ALDH), we designed a new Tom20 construct by removing flexible tails at the N-terminal and C-terminal ends for crystallization. Then, we succeeded to obtain crystals of a complex of Tom20 with the ALDH presequence connected by a disulfide bond and determined the structures at 1.9 Å and 3.0 Å resolutions. The overall crystal structures are similar to that of the NMR structures. NMR relaxation analysis of ¹⁵N-labeled presequence peptide in the disulfide bonded complex demonstrated residual mobility of the presequence peptide in the bound state.

ミトコンドリアのマトリックスタンパク質は細胞質で合成された後、ミトコンドリアに輸入される。ミトコンドリアには輸送を司るタンパク質複合体が存在し、なかでも Tom20 は外膜上に存在してプレ配列に最初に結合する受容体として機能している。マトリックスタンパク質は N 末端にプレ配列が余分に付加した前駆体蛋白質として合成されるが、Tom20 がプレ配列を認識することで輸送過程が始まる。

キーワード；結晶構造、緩和時間解析、Tom20、ミトコンドリア、タンパク質輸送

著者ふりがな；おびたたかゆき、いぐらまゆみ、おせとよゆき、まえなかかつみ、えんどうとしや、こうだだいすけ

この Tom20 分子による詳細なプレ配列認識機構を解析するために、NMR 構造をもとにフレキシブルな N 末端と C 末端を除いたコア構造に対応する Tom20core を作製し、X線結晶構造解析を行った。Tom20core とプレ配列(アルコール脱水素酵素由来: ALDH)との結合は弱いいため、プレ配列の C 末端に人為的に導入したシステインを介して SS 結合を形成させた Tom20core-プレ配列複合体の結晶化を行った。

Tom20core は大腸菌 BL21(DE3)を用いて発現させ、GS4B カラムにより精製した。ALDH プレ配列はペプチド合成し、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。Tom20core と ALDH プレ配列を pH8.0 にて混合後、一晩室温に静置することにより SS 結合を形成させた。リンカーのデザインを多少変えることで、2つの異なる結晶型で分解能 3Å と分解能 1.9Å の結晶を得ることができた。それぞれのリンカー配列は YAGC と AAGC であり、Y リンカーおよび A リンカーと呼ぶことにする。Y リンカー結晶は空間群 C2 で非対称単位中に 7 分子、A リンカー結晶は空間群 P2₁ で 2 分子が含まれていた。セレノメチオニン誘導体を用いて、Y リンカー構造を MAD 法によって構造決定を行った。ついで、この構造を用いて、分子置換法により A リンカー構造を決定した。Y 結晶ではすべての Tom20 分子がプレ配列ペプチドを交換し、インターツインドダイマーを形成していた。ここから、5つのファンクショナルユニットを切り出した。

NMR 構造 (溶液中、分子間 SS 結合なし) と比較すると、Tom20core 部分はほぼ同一であった (rmsd < 2.5 Å)。プレ配列ヘリックスの位置と方向は NMR 構造と結晶構造でよく重なった。Tom20 に認識される部分のペプチド配列 (R¹⁴LSRLL¹⁹) は α ヘリックス構造をとることがわかった。ただし、A 結晶では結晶のパッキング効果により α ヘリックスからのずれが認められた。

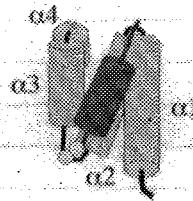


Figure 1. A schematic model structure of Tom20-ALDH complex

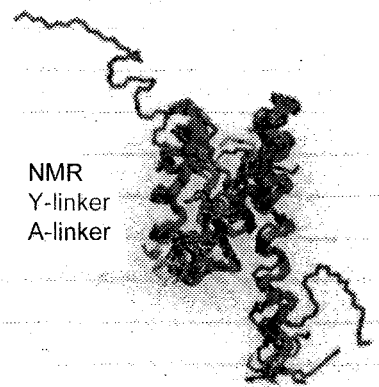


Figure 2. Superposition of the NMR structure and two X-ray structures

プレ配列ペプチドを ¹⁵N 標識し、SS 結合で結合状態に固定した状況において NMR 緩和時間解析をおこなった。その結果、モデルフリー解析において結合状態にあるプレ配列部分では化学交換による効果を反映する R_{ex} 項の導入が必要であった。このことは結合状態においてペプチドに運動性が残っていることを示している。

(千葉工業大学 工学部 生命環境科学科)

○ 坂本泰一, 染谷龍彦, 馬場清喜, 野口聡子, 清宮恭子, 木村友美, 富士原和也, 河合剛太

Effect of Residual Dipolar Coupling Information on the Structure Determination of RNA by NMR
Taiichi Sakamoto, Tatsuhiro Someya, Seiki Baba, Satoko Noguchi, Kyoko Seimiya, Tomomi Kimura,
Kazuya Fujiwara and Gota Kawai

Department of Life and Environmental Sciences, Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology

The global conformation of long RNA molecules containing bulge or internal loop is not well characterized by conventional NMR methods that rely on NOE-derived distance restraints and *J*-coupling derived torsion angle restraints. Recently, residual dipolar couplings (RDCs) that provide long-range angular information have been used for structure determination of RNAs. In this study, RDCs were used for structural determination of a model RNA including internal loop, and the effect of RDCs on the structure determination was analyzed. The global structure of the model RNA was improved by refinement with RDCs. Furthermore, the local structure of the internal loop was significantly improved, despite RDCs in the internal loop region was not included in the refinement.

1. はじめに

NOE の解析による近距離情報と *J*カップリングの解析によるねじれ角の情報を用いて構造決定する従来の解析法では、離れた部分どうしを関係付ける直接的な構造情報を得ることができない。そのため、RNA 分子のように長細く、また分子が折れ曲がっている場合には、全体構造を正確に決定することは困難であった。しかし、このような問題を解決する方法として、残余双極子相互作用 (RDC) を利用する方法が開発され、RNA の立体構造解析に利用されている。最近では 77 残基 (25 kDa) の RNA や 101 残基 (33 kDa) の RNA の RDC を用いた立体構造解析も報告されており、RDC は RNA の立体構造研究において必須の情報となってきた¹⁾。

HIV-1 のゲノム RNA は、ウイルス粒子にパッケージングされる際に RNA の二量体化が起こる。私たちは、ゲノム RNA の二量体化メカニズムを明らかにする目的で、二量体化開始部位の RNA の立体構造解析を行っている。この二量体化開始部位の RNA は、非対称の内部ループを持つために、全体構造が折れ曲がっており、全体構造を決定するためには、RDC の情報の導入が必須である。本研究では、その二量体化開始部位の内部ループを含むモデル RNA (Fig. 1) を用いて、RDC の情報を加えた構造解析を行い、その効果について解析した²⁾。

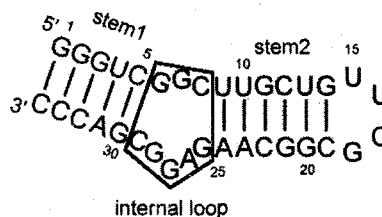


Fig. 1 Secondary structure of a 34 mer model RNA.

Keywords: RNA, RDCs, bulge, conformation, convergency

さかもとたいいち, そめやたつひこ, ばばせいき, のぐちさとこ, せいみやきょうこ,
きむらともみ, ふじわらかずや, かわいごうた

2. 方法

G, A, C および U のそれぞれについて塩基特異的に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した試料を調製した。分子を配向させるためには、Pfl phage を用いた。DRX-600 (Bruker) を用いて、 25°C で測定を行い、定法に従ってシグナルの帰属を行った。計算には、8 mg/ml pfl phage のときの RDC の値を用いた。

398 個の距離情報および 204 個のねじれ角情報を用いて、discover により simulated annealing (SA) を行い、100 個の構造を計算した。これらの構造の中で総エネルギーの低い 18 個の構造を用いて PALES により配向テンソルの成分を求めた。RDC の情報として、ステム部分の 26 個の情報を用いた。さらに、CNS を用いて、RDC の情報を加えた構造の精密化を行った。初期構造として、discover により計算した 100 個の構造のうちエネルギーの低い 5 個の構造を用いた。それぞれの初期構造について、RDC の情報が加えられたときと加えないときで、それぞれ 100 個の計算を行い、結果を比較した。

3. 結果および考察

PALES を用いた grid search により RDC を fitting したところ、総エネルギーが低い構造は、RDC の fitting もよいことがわかった。そこで、総エネルギーが低い構造を用いて、配向テンソルの主軸 (D_a) と斜方軸 (R) 成分の値を計算し、その平均値を求めたところ、それぞれ -13.4 Hz, 0.34 となった。構造の精密化計算では、これらの配向テンソルの値を用いた。

100 個の初期構造のなかで総エネルギーの低い 5 個の構造のそれぞれを初期構造として、CNS を用い、拘束条件に RDC の情報を加えた場合と加えない場合のそれぞれについて 100 個の計算を行なった。それぞれの計算によって得られた構造において、総エネルギーの低い 10 個の構造を重ね合わせた結果を Fig. 2 に示す。図は、ステム 2 で重ね合わせてある。RDC の情報を加えない場合には内部ループを挟んだステムの角度は大きく動いていたが、RDC の情報を加えることによってステムの角度がほぼ一定となり、構造計算が収束していることがわかった。また、ステム部分の RDC の情報のみを加えたにもかかわらず、内部ループ部分の構造がよく収束することがわかった。これは、ステム間の相対角度が決まることによって、内部ループ部分も制約を受けたためであると考えられる。

4. 今後の課題

RNA の立体構造解析において RDC の情報が有用であることを示すことができたが、配向テンソルの成分値を求める際に注意が必要である。今回は、最初の RDC の情報を加えない構造計算の結果を利用して、RDC の実測値を最もよく再現する配向テンソルを探した。この場合、用いる構造が実際の構造と大きく異なる場合には、適切な配向テンソルは得られない。また、今回用いた構造においても、ある程度の構造のばらつきがあり、そのばらつきにより正確な配向テンソルの成分値は得られていないと思われる。今後は、より正確な配向テンソルの成分値をどのように算出するかについて検討したい。

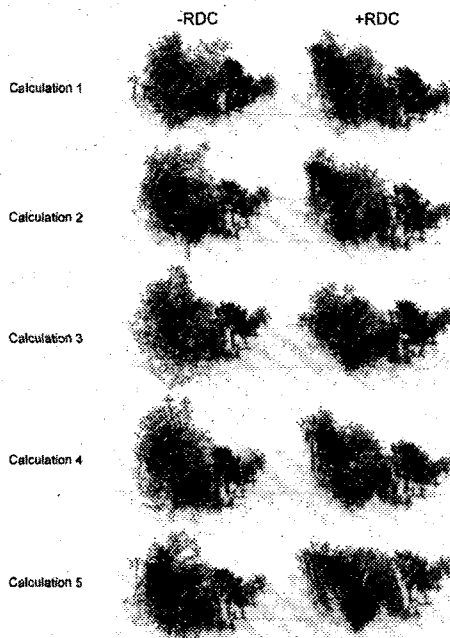


Fig. 2. Comparison of the 10 refined structures between without and with RDCs. The 5 calculations were performed with the 5 different initial structures. Each 10 structures are superimposed for the stem2.

- 1) 坂本泰一, 染谷龍彦 分光研究 49, 257-258 (2000).
- 2) 馬場清喜 他, 分光研究 53, 171-176 (2004).

テロメアタンパク質 TRF2 による G-4 重らせん構造への特異的相互作用
 (1 横浜市立大学・大学院総合理学研究科, 2 木原財団)
 ○平尾優佳¹, 西川忠輝^{1,2}, 花岡慎悟^{1,2}, 岡村英保^{1,2}, 岩崎了教¹,
 明石知子¹, 佐藤衛¹, 西村善文¹

Specific Interaction of Human TRF2 with a G-quadruplex Structure

○Yuuka Hirao¹, Tadateru Nishikawa^{1,2}, Shingo Hanaoka^{1,2}, Hideyasu Okamura^{1,2}, Noriyuki Iwasaki¹, Satoko Akashi¹, Mamoru Sato¹ and Yoshifumi Nishimura¹

(¹Yokohama City University, Graduate School of Integrated Science, ²Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Sciences)

Telomeres are the ends of eukaryotic linear chromosomes. Human telomeres consist of long tandem arrays of a double-stranded TTAGGG/CCCTAA sequence followed by a single-stranded DNA with a TTAGGG sequence repeatedly at their 3' ends. The double-stranded DNA regions of human telomeres are specifically recognized by two proteins, hTRF1 and hTRF2, both of which play an important role in the negative regulation of the elongation of telomeres. It is well known that single-stranded DNA containing telomeric sequence could form a four-stranded structure, G-quadruplex. Here, we have found that hTRF2 can bind to a parallel G-quadruplex structure formed by single-stranded DNA with TTAGGGTTAGGG sequence in addition to the double-stranded telomeric DNA.

【序】

真核生物の線状染色体末端はテロメアと呼ばれ、染色体が安定に存在するために重要な役割を持っている。テロメアは TG リッチな繰り返し配列の二重らせん DNA (脊椎動物では TTAGGG) 部位と、3' 末端部位が突出した 1 本鎖 DNA 部位からなる。テロメアが正しく機能するためにはテロメアタンパク質に大きく依存する。ヒトのテロメアタンパク質には hTRF1 と hTRF2 があり、この 2 つのタンパク質はテロメア 2 重らせん DNA に結合することでテロメア DNA 伸張酵素テロメラーゼの活性を負に制御している。hTRF1 と hTRF2 は単にテロメア配列に結合しているのではなく、テロメア末端の三次元的な構造変化を引き起こすことによって特異的なテロメア構造を形成すると考えられている。また、テロメア突出末端の 1 本鎖 DNA は折れたたまって G-4 重らせん構造を形成する。

我々は 12mer のテロメア DNA、TTAGGGTTAGGG (tr12+) が平行 G-4 重らせん構造を形成し、hTRF2 の DNA 結合ドメイン (DBD) と相互作用することを NMR や MS を用いて発見した。円二色測定と NMR 測定により、tr12+ が K⁺ 存在下で平行 G-4 重らせん構造を形成することを確認した。また NMR の測定から平行 G-4 重らせん構造を形成する tr12+ は hTRF2-DBD の 2 番目のヘリックス周辺である V462~N476 と相互作用し、さらに tr12+ 側は全ての G と 7 番目の T が相互作用に関係することが示唆された。この複合体の全体構造は X 線小角散乱実験により確認することができた。G-4 重らせん構造のテロメアにおける機能は明らかではないが、本研究により、テロメア末端の超高度構造の形成に関与する可能性が示唆された。

キーワード: テロメア, hTRF2, G-四重らせん構造, タンパク質-DNA 複合体

著者ふりがな: ひらおゆうか, にしかわただてる, はなおかしんご, おかむらひでやす, いわさきのりゆき, あかしさとこ, さとうまもる, にしむらよしふみ

【実験】

tr12+は 75mM KCl を含む 50mM KPB(pH6.8)の緩衝液中で調製し、アニーリングした。アニーリング後の tr12+に対して、平行 G-四重らせん構造の形成を確認するために温度 293K で円二色測定を行った。また、K⁺と比較して Na⁺における構造依存性を調べるために、50mM NaPB(pH6.8), 75mM NaCl で調製しアニーリングした tr12+に対しても同様の測定を行った。さらに、Bruker 社製 AVANCE-500MHz(cryo probe)を使用して、2 次元(¹H-¹⁵N HSQC、NOESY、¹H-¹³C ct-HSQC、HCCH-COSY、HCCCCH-COSY、HCCCCH-COSY、HCCCCCH-COSY、HCN、HCNCH)の測定を行い、DNA のシグナルの帰属を行った。測定は温度 293K で行った。

tr12+と hTRF2-DBD の複合体に関しては、Bruker 社製 AVANCE-500MHz(cryo probe)を使用して、tr12+もしくは hTRF2-DBD の単独時と混合時の 1 次元・2 次元のシグナル変化を温度 293K で観測した。

【結果・考察】

円二色測定において、tr12+は K⁺存在下で平行 G-四重らせん構造に特徴的な波形(265nm に正の極大、245nm に負の極大)を示し、さらに、tr12+単独の 1 次元 NMR 測定において G-imino proton のシグナルが確認されたことから、平行 G-四重らせん構造の形成が確認された。また、50mM NaPB(pH6.8), 75mM NaCl で調製した tr12+の円二色測定の結果は K⁺存在下の tr12+の波形とは明らかに異なり、逆平行 G-四重らせん構造に特徴的な波形(295nm に正の極大、265nm に負の極大)を示した。tr12+は K⁺の存在によって平行な構造を形成することが示された。

tr12+と hTRF2-DBD 複合体の NMR 測定において、hTRF2-DBD もしくは tr12+単独と複合体のシグナルを比較したところ、下図に示すように大きな変化が観測された。このことから、シグナルシフトや消失などが観測された hTRF2-DBD の 462~475 番目の残基と tr12+の 7T~9A が相互作用に関係している部位であると考えられる。

さらに、この複合体の全体構造は X 線小角散乱実験により確認することができた。

本研究により、G-四重らせん構造が hTRF2 に結合することが明らかになり、G-四重らせん構造がテロメア末端の超高次構造の形成に関与する可能性が示唆された。

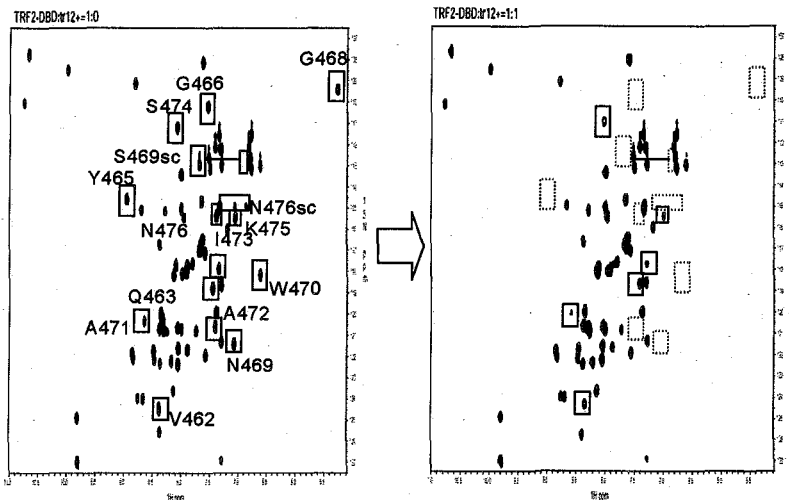


Figure: The H-¹⁵N HSQC spectrum of hTRF2-DBD was greatly changed after adding tr12+.

Left : The H-¹⁵N HSQC spectrum of hTRF2-DBD, Right : hTRF2-DBD:tr12+ = 1:1

□... Amino acid cross peaks shifted markedly after adding DNA

酵母ミトコンドリア DNA 組換え蛋白質 Mhr1 に結合した
単鎖オリゴ DNA の立体構造解析

(¹横浜市大院・総合理学研究科 分子生理学, ²理研・生体超分子構造・機能
G, ³理研・遺伝生化学, ⁴CREST/JST)

○増田ときは^{1,2}, 美川務^{1,2,3,4}, 吉益雅俊^{3,4}, 凌楓³, 柴田武彦^{1,2,3}, 伊藤隆^{1,2,3,4}

TRNOE analysis of the single-stranded DNA structure induced by binding of the
yeast mitochondrial DNA recombination protein Mhr1p

Tokiha Masuda^{1,2}, Tsutomu Mikawa^{1,2,3,4}, Masatoshi Yoshimasu^{3,4}, Feng Ling³,
Takehiko Shibata^{1,2,3} and Yutaka Ito^{1,2,3,4}

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

MHR1 gene was isolated as being required for mitochondrial DNA recombination and repair in *Saccharomyces cerevisiae*. Our recent studies showed that Mhr1 protein has a homologous pairing activity to form heteroduplex joints from single-stranded and double-stranded DNA in the ATP-independent manner (Ling and Shibata, 2002).

In this study, we analyzed the three dimensional structure of oligo ssDNA bound to Mhr1p by using the transferred NOE (TRNOE) approach, previously used for the structural analyses of oligo ssDNA bound to RecA/Rad51 (Nishinaka *et al.*, 1997 & 1998). The d(TACG) bound to Mhr1p showed very similar TRNOE pattern as was previously observed for the same oligo ssDNA bound to RecA. This result suggests that the unique structure of RecA-bound ssDNA is also conserved in the Mhr1-bound state.

<序>

最近の我々の研究により、出芽酵母においてミトコンドリア DNA の相同組換えに関わる *MHR1* 遺伝子が同定された。さらに *MHR1* 遺伝子が関与する相同組換えに依存したミトコンドリア DNA の複製・分配機構の存在も明らかにされている。

MHR1 遺伝子産物である Mhr1 蛋白質は、単鎖および二本鎖 DNA に対する結合活性を持ち、相同塩基配列を有する単鎖 DNA と環状二本鎖 DNA を ATP 非依存的に対合させ、相同 DNA 組換え中間体であるヘテロ二本鎖を形成する相同 DNA 対合活性を持つ。これまでに我々は、ATP 依存的な相同 DNA 対合活性を持つ RecA/Rad51 蛋白質に結合した単鎖 DNA について TRNOE 法を用いて構造解析を行い、特異的な構造をしていることを明らかにしてきた。今回は、ATP 非依存的な相同 DNA 対合活性を持つ Mhr1 と結合した単鎖 DNA について TRNOE 法を用いた同様な解析を行い、RecA/Rad51 結合型単鎖 DNA の構造との比較を試みた。

キーワード：ミトコンドリア, TRNOE, DNA 相同組換え

ますだ ときは, みかわ つとむ, よしまた まさとし, りん ふえん,
しばた たけひこ, いたう ゆたか

<実験>

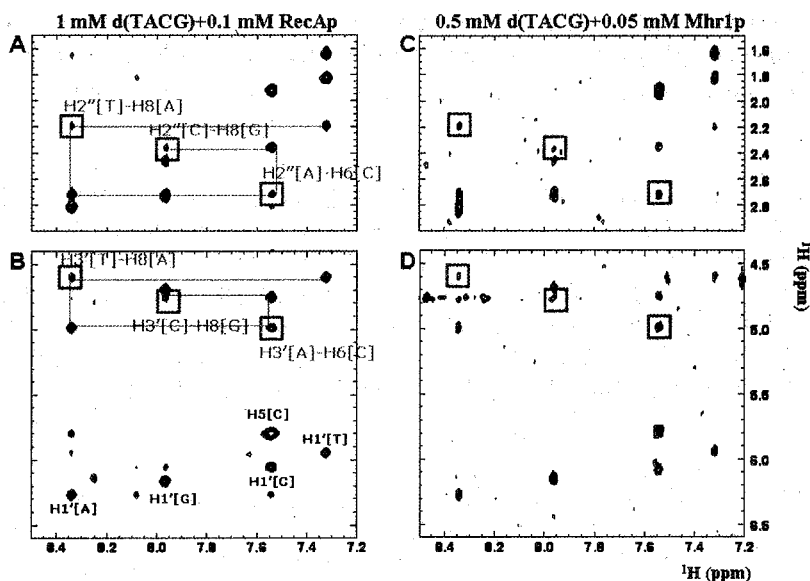
0.5 mM d(TACG)と0.05 mM Mhr1 (20 mM ^2H -Tris-Cl pH7.1, 50mM NaCl, 6.7mM MgCl_2)は凍結乾燥した後、 $^2\text{H}_2\text{O}$ に溶解してから混合し、すぐにNMR測定を行った。2次元 TRNOESYはCryoprobeを装着したBruker DRX600分光計を用いて測定した。測定温度は298Kで行った。データ処理およびスペクトル解析はLinux PC上でそれぞれAZARAおよびANSIG-for-OpenGLソフトウェアを用いて行った。

<結果・考察>

RecA存在下のd(TACG)試料について測定したTRNOESYスペクトルの2つの領域を図中A, Bに示した。Mhr1存在下のd(TACG)試料について今回測定したTRNOESYスペクトルの同じ2つの領域を図C, Dに示した。図のように、Mhr1存在下でも、RecA結合型d(TACG)に特徴的な構造に由来する残基間のNOEクロスピークが観測されることが明らかになった。

このことからMhr1蛋白質に結合した単鎖DNAは通常のB-型DNAやA-型DNAのコンフォメーションとは異なり、RecA蛋白質に結合した単鎖DNAの構造と同様であることが示唆された。現在NOE情報を用いて構造計算を行っている。

以上の結果から、ATPなどの補助因子の要求性が異なる場合でも相同DNA組換えに関わる蛋白質に結合した単鎖DNAの構造が共通である可能性が示された。



Figure

Expansions of the H2'/H2''-H8/H6 and H1'/H3'-H8/H6 regions of 2D TRNOE spectra of d(TACG) in the presence of either RecA/ATP γ S (A and B) or Mhr1 (C and D).

<参考文献>

- Ling, F., and Shibata, T. *EMBO J.* 21, 4730-3740(2002)
Nishinaka, T., Ito, Y., Yokoyama, S., and Shibata, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 6623-6628(1997)
Nishinaka, T., Shinohara, A., Ito, Y., Yokoyama, S., and Shibata, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 11071-11076(1998)

○石川 麗、川原 俊一、児嶋 長次郎、小野 晶、甲斐荘 正恒

The Nature of the Hydrogen Bonds of the Watson-Crick Base Pairs in DNA Duplexes as
Studied by Stable-Isotope-Aided NMR spectroscopy
JST-CREST & Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

*National Food Research Institute, Biological Function Division

○Rei Ishikawa, *Shun-ichi Kawahara, Chojiro Kojima, Akira Ono, and Masatsune
Kainosho

The effects on various NMR parameters of substitutions, which may influence the hydrogen bond strengths of Watson-Crick-type base pairs, were investigated for DNA dodecamers containing 5-substituted-2'-deoxyuridine derivatives in oligomers, 5'-d(CGCGPATXCGCG)-3', where P and X were [*ul*-¹⁵N]-2'-deoxyadenosine or [*ul*-¹⁵N]-2'-deoxynеbraline, and [3-¹⁵N]-2'-deoxyuridine derivatives. The uridine derivatives were designed to minimize the structural perturbations of the DNA duplexes and to maximize the pK_a range. The substitution effects on the NMR parameters were linearly correlated with the pK_a values of the 2'-deoxyuridine derivatives.

はじめに

¹⁵Nで選択的に標識した核酸塩基部分に一連の置換基を導入し、核酸の立体構造への影響を最小限に保ちつつ系統的な摂動を導入するという伝統的な有機構造化学的アプローチにより、Watson-Crick型のAT塩基対、およびNT塩基対(Nはデオキシネブラリン)においてN-H...N型水素結合を介したJ結合定数への置換基効果を精密に測定するモデル系を構築し、核酸塩基対間の特異的水素結合に関連する様々なNMRパラメーターを正確に測定した。(Fig. 1a&1b)この結果、Watson-Crick AT塩基対間水素結合においては、N-H...N型水素結合を介したJ結合定数は水素結合のドナー(NH)の酸性度と極めて良い相関を示すことが明らかとなった。

標識DNAオリゴマーの調製

[N3-¹⁵N]-5位置換-2'-デオキシウリジン類は、対応する非標識ヌクレオシドを原料として化学合成した。[¹⁵N₅]-2'-デオキシアデノシンは発酵法により得た[¹⁵N₅]-アデノシンから誘導した。また、[¹⁵N₅]-2'-デオキシネブラリンは[¹⁵N₅]-2'-デオキシアデノシンを出発原料として合成した。これらの標識ヌクレオシドは常法に従ってアミダイト体とし、DNA自動合成機によりオリゴマーに導入した。合成した10種のドデカマーはNa塩とした後、100 mM NaCl及び0.01% NaN₃を含む10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解してNMR測定に用いた。また、これらのサンプルはNMR測定条件下安定にduplexを形成していること、またその構造に大きな変化がないことをDQF-COSY及びNOESYスペクトルにより確認した。

キーワード: ¹⁵N選択標識核酸、ワトソン-クリックAT塩基対、水素結合を介したJ結合定数、置換基効果、水素結合ドナーの酸性度

いしかわ れい、かわはら しゅんいち、こじま ちょうじろう、おの あきら、かいのしょう まさつね

NMR 測定と結果

Watson-Crick AU_X (及び NU_X) 塩基対の $NH\cdots N$ 型水素結合において水素結合のドナーの酸性度の変化と各種 NMR パラメーター (イミノプロトンの化学シフト、 $^1J_{NH}$ 、 $^{2h}J_{NN}$ 、相補鎖のデオキシアデノシン又はデオキシネブulariンの環上の ^{15}N の化学シフト) の間に良好な一次の相関を得た。Fig. 2 には水素結合のドナーの pK_a 値と D12- AU_X 、D12- NU_X における水素結合を介した J 結合定数 ($^{2h}J_{NN}$) の相関を示した。また、理論計算により算出された $^{2h}J_{NN,cal}$ 値と本実験により観測された $^{2h}J_{NN}$ 値は非常に良く一致した。(Fig. 3)

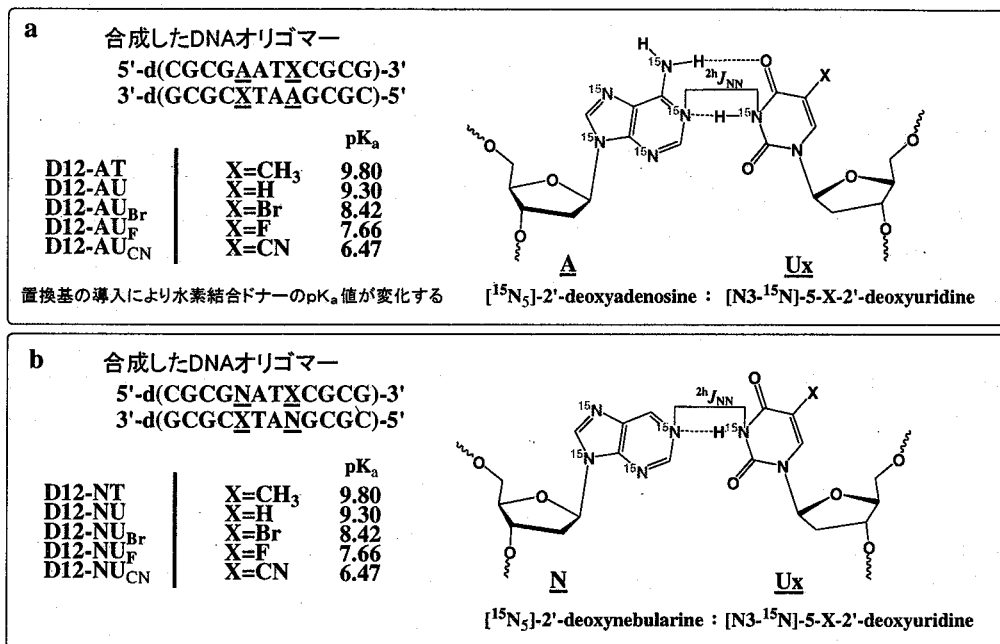


Figure 1. Synthesized DNA sequences containing $[N_3-^{15}N]$ -5-substituted -2'-deoxyuridine derivatives and a) $[^{15}N_5]$ -2'-deoxyadenosine, b) 2'-deoxynebularine. AU_X base pair and NU_X base pair are shown, respectively.

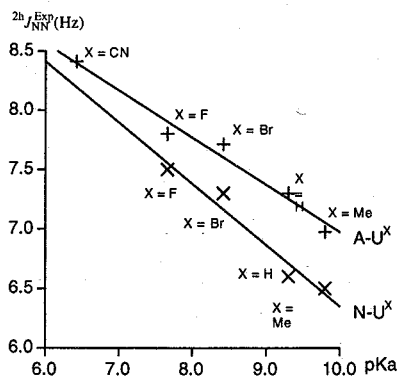


Figure 2. Correlation plot of $^{2h}J_{NN}$ in D_2O at 275 K against the pK_a values of U^X .

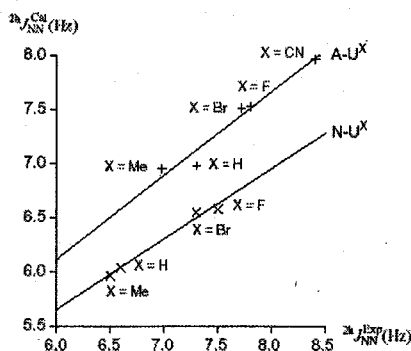


Figure 3. The reproductivity of the theoretically Calculated values ($^{2h}J_{NN,cal}$) for the experimentally observed values ($^{2h}J_{NN,exp}$)

Dynamics of MBD1-MBD/Methylated DNA complex

Yokohama City University¹, BERI², Nara Institute of Science and Technology³○Kosuke Inomata¹, Izuru Ohki², Nobuya Shimotake³, Kenichiro Fujiwara¹, Hidehito Tochio¹ and Masahiro Shirakawa¹

We previously determined the structure of MBD1 methyl-CpG binding domain (MBD) in complex with a methylated DNA. As the complex is formed between monomeric MBD and a symmetric duplex DNA with a palindromic sequence, each strand of the DNA interacts with the MBD in a distinctly different way, exhibiting chemical shifts that are different to each other. For this complex, we have found exchange of the orientation of MBD bound to the duplex DNA, based on analysis of cross peaks in NOE spectra with various mixing times. In order to delineate this exchange phenomenon, we analyzed thermodynamic and kinetic properties.

脊椎動物に見られる唯一の生体内での化学修飾である DNA メチル化は CpG 配列中のシトシンの 5 位において起こり、クロマチン構造制御などの機構で転写調節を行う。ヒト MBD1 はメチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) を含むファミリーのうちの一つで、DNA のメチル化部位 (メチル化 CpG 塩基対) を認識するタンパク質である。そのうち、MBD1-MBD に関してはメチル化 DNA との複合体構造も決定されている。その複合体構造は 2 回対称軸を持つ 2 本鎖メチル化 CpG 部位に対して、一分子の MBD が結合することが示されている。

キーワード NOE、化学交換、解離速度、DNA 結合タンパク質

いのまたこうすけ、おおきいづる、しもたけのぶや、ふじわらけんいちろう、とちおひでひと、しらかわまさひろ

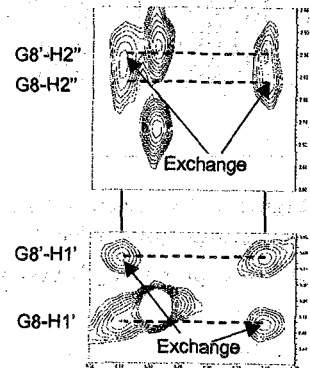


Figure 1. Selected sections from a 2D F1, F2 ¹³C-filtered NOESY spectrum of the methylated DNA in the MBD1-MBD / DNA complex, showing the region for the chemical shifts of G8 / H1', G8' / H1'. The sample contains 20mM potassium phosphate, 50mM KCl, 5mM DTT, 0.6mM protein-DNA complex at pH 6.5 and 25°C, and the mixing time was 300ms. The internuclear distance between G8-H1' and G8'-H1' is 10.1 Å.

これは見かけ上 MBD が DNA に対して 180° 異なる方向で結合する 2つの様式が存在することを意味する。NMR スペクトルの解析から、MBD とメチル化 DNA に対して 2つの結合様式の間には化学交換があることが示された。すなわち常温・溶液中において MBD は DNA に対して、見かけ上フリップしていることが判った。この交換現象には、少なくとも以下の 2種類の解釈が可能である。すなわち、MBD がメチル化 DNA から解離し、ランダムな向きで再結合する、という解離・再結合モデルと、MBD は DNA と何らかの会合をしながら向きを変える会合反転モデルである。我々は二つのモデルを検証するため、NMR 測定によって求められ交換速度と表面プラズモン共鳴法および水晶発振子マイクロバランス法によって得られる MBD とメチル化 DNA の結合・解離速度、さらに、等温滴定型熱量計による熱力学的解析も行い、比較検討した。その結果、上記 2種の可能性のうち、会合反転モデルであることが強く示唆された。このような現象は、天然の物質間においても、さらには生体分子間においても、今までに見出された例はなかった。生体分子間の相互作用中における交換現象としては新規に発見した現象であり、その生理機能との関連に興味をもたれる。

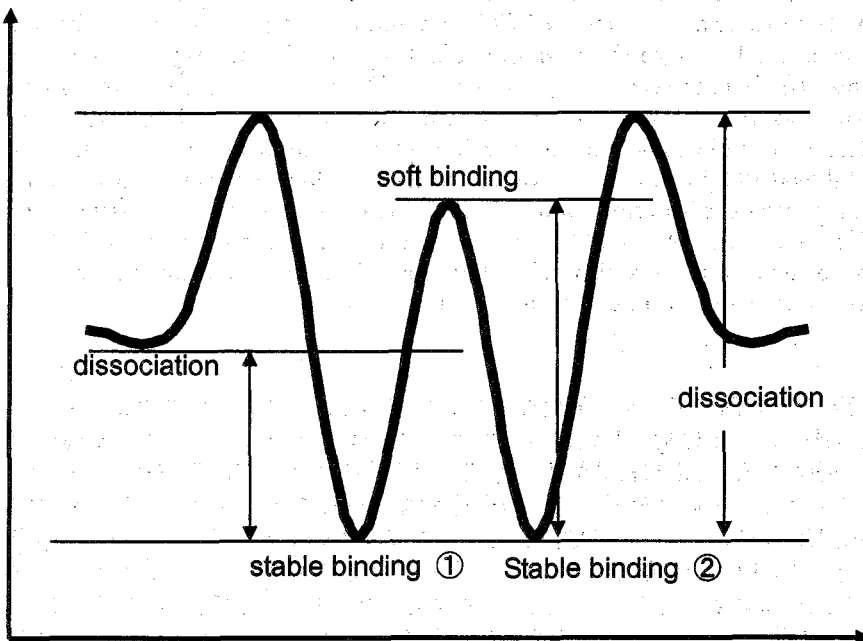


Figure 2. Thermodynamic states of MBD/DNA complex estimated from result of thermodynamic and kinetic experiments. This diagram suggests that the protein flips on the duplex DNA without completely detached from the DNA.

2次元固体 ^{13}C -NMRによるクロロゾーム中 バクテリオクロロフィル *c* 会合体の構造解析

(阪大・蛋白研¹、立命館大・理工²、関西学院大・理工³)

○江川文子¹、秋庭健吾¹、溝口正²、原一公³、柿谷吉則³、小山泰³、藤原敏道¹、
阿久津秀雄¹

Structure analysis of chlorosomal bacteriochlorophyll *c* assembly by 2D solid-state ^{13}C -NMR

Ayako Egawa¹, Kengo Akiba¹, Tadashi Mizoguchi², Kazukimi Hara³,
Yoshinori Kakitani³, Yasushi Koyama³, Toshimichi Fujiwara¹ and Hideo Akutsu¹
¹Institute for Protein Research, Osaka University ²College of Science and Engineering,
Ritsumeikan University ³Faculty of Science and Technology, Kwansei Gakuin University

The photosynthetic system of green bacteria has a unique antenna complex called chlorosomes. Chlorosomes contain bacteriochlorophyll (BChl) *c* as the major component. We studied chlorosomes and model BChl *c* assembly by high-resolution solid-state NMR. We have completely assigned ^{13}C signals of BChl *c* by ^{13}C correlation experiments using RFDR and DQ dipolar recoupling sequences. 2D ^{13}C - ^{13}C proton-driven spin diffusion experiments were carried out to obtain the distance information. Intra- and intermolecular correlations were discriminated by using a mixture of 100% ^{13}C labeled and non-labeled BChl *c* molecules. We calculated a relaxation matrix from spin diffusion spectra at a series of mixing times. Internuclear distances were estimated from the matrix elements. The obtained intermolecular distance indicated that BChl *c* forms a dimer-based molecular assembly. The structure of the BChl *c* complex were determined by simulated annealing under the distance restrictions.

【序】

緑色光合成細菌のアンテナ複合体クロロゾームは、バクテリオクロロフィル *c* (BChl *c*) の高次会合体で、分子運動の制限された巨大な構造体である。このような結晶化できない生体高分子の構造解析は、X線結晶解析や溶液 NMR 法では困難である。それに対し、固体 NMR 法では、このような生体高分子から直接構造情報を得ることに有効である。本研究では、固体高分解能 NMR を使って、 ^{13}C 標識したクロロゾームとモデル系として BChl *c* 会合体の構造解析を行った。原子分解能で BChl *c* 会合体の構造を決めるためには、多くの原子間距離を高い精度で求める必要がある。このために対象として ^{13}C 完全標識試料を用いて、 ^1H 駆動スピンの拡散法^{3,4}を適用した。また、混合時間に依存した多くのスペクトルからシグナル強度を定量的に評価し、リレーによる間接的な磁化移動と、長い距離での直接的磁化移動を区別した。さらに、複数の同位体標識試料を用いて分子間と分子内の相関も区別した。これらの方法で得られる距離制約を満たす集積体の構造についてシミュレート・アニーリング法を用いて算出したので、これを報告する。

キーワード：固体 NMR、 ^{13}C 均一安定同位体標識、スピン拡散法

○ えがわあやこ、あきばけんご、みぞぐちただし、はらかずきみ、かきたによしのり、こやまやすし、ふじわらとしみち、あくつひでお

【実験】

試料は、 ^{13}C 安定同位体標識した培地で培養した *Chlorobium limicola* のクロマトフォアをメタノールとアセトンで抽出した後、HPLC で BChl *c* を単離精製し、ジクロロエタンに溶解させヘキサンで析出したものを固体 NMR 試料とした。クロロゾームは、菌体をフレンチプレスした後、ショ糖密度勾配にかけて超遠心により分画したものを固体 NMR 試料とした。

固体 NMR の測定は、高分解能スペクトルを得るためにマジック角試料回転(MAS)下で行った。固体 NMR の測定には、Chemagnetics Infinity-plus 500 分光計を用いた。 ^{13}C 共鳴周波数は 125.6 Hz、マジック角試料回転は 12.5 kHz、測定中の試料温度は 10 °C で行った。帰属には、RFDR 法¹と二量子双極子相関法である SPC-5 法²を用いた。更に、遠距離情報を得るためにスピン拡散法³を用いた。NMR より得られた距離からの構造計算には CNX(Accelrys)によるシミュレーテッド・アニーリング法を用いた。計算は 18 分子(2232 atoms)で行い、二量体構造の形成時に必要不可欠な配位結合と算出した全ての空間距離(83 個)を拘束条件にした。配位結合は、OH と Mg、4 つの N の距離情報として設定した。温度は 20000 K まで上げ、ステップ数 16000、タイムステップ 0.003 ps で行った。

【結果】

クロロゾームの RFDR による相関スペクトル(混合時間 1.28 ms)を使って ^{13}C から ^{18}C まで連鎖的に帰属することができた。二量子双極子相関スペクトル(混合時間 1.1 ms)では、共鳴周波数差の小さい信号について 2 つ離れた信号で区別して帰属することができた。このようにして 51 個全ての帰属を完成させた。

次に、スピン拡散スペクトル(混合時間 100 ms)の 100 % 標識及び 50 % 標識 BChl *c* 会合体の結果を Fig. 1 に示した。ここで、スピン拡散法で分子内相関と分子間相関が区別できないという問題点は、 ^{13}C 標識 BChl *c* 及び非標識 BChl *c* を 1 : 1 で混合した会合体 (50 % 標識 BChl *c* 会合体) を使うと分子間相関の信号強度がより大きく減少することを利用した。この方法を使って分子間相関の同定を行った。50 % 標識 BChl *c* 会合体で信号強度が減少した交差ピークを丸印で示す。ここで観測された主要な分子間相関は、二量体基本構造で説明することができた。また、混合時間 250 ms では、二量体間の分子間相関が多く観測された。

次に、クロロゾームについて混合時間 0, 3, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 400 ms のスピン拡散スペクトルからシグナル強度行列を作成した。ある混合時間 τ_{mix} の交差ピーク強度 $M(\tau_{mix})$ と $\tau_{mix} = 0$ の対角ピークの強度 $M(0)$ と緩和行列 R の関係を(1)式⁵に示す。

$$M(\tau_{mix}) = \exp(-R\tau_{mix})M(0) \quad (1)$$

非線形最小自乗法を用いて、時間に依存した一連のスペクトルの信号強度と(1)式から求められる計算信号強度との差が最小になるように R を算出した。なお、 R は 31×31 の行列である。このとき、 R の初期値は短い混合時間のスペクトルから線形近似をして推定した。ここで、実験結果とシミュレーションの信号の強度曲線を Fig. 2 に示した。短距離では早い立ち上がりの曲線を描き、長距離では、緩やかな曲線を描いている。シミュレーションの曲線は実験値によくフィットしていることがわかる。交差緩和速度は、短距離(約 3.5 Å)で $3.0 \sim 2.0 \text{ s}^{-1}$ 、中間距離(約 4.5 Å)で $0.8 \sim 0.4 \text{ s}^{-1}$ 、長距離(約 5.5 Å)で $0.3 \sim 0.1 \text{ s}^{-1}$ であった。

距離への換算には、(2)式を仮定した。

$$R_{ij} = K \frac{A_i A_j}{r_{ij}^6} \quad (2)$$

ここで、 R_{ij} はスピン間交差緩和定数、 $A_i A_j$ は ^1H デカップリングを行わない時の信号 i と信号 j の重なり、 r_{ij} は i と j の空間距離である。 K は経験的に定めるパラメータである。距離既知の分子内相関の約 50 個の K 値に基づいて、(2)式が成り立つように K 値を補正した。この K

値を用いて、152 個の ^{13}C - ^{13}C 相関の空間距離を算出した。この結果、短距離($\sim 3.5 \text{ \AA}$)、中間距離($\sim 4.5 \text{ \AA}$)、長距離($\sim 5.5 \text{ \AA}$)に区分することができ、それぞれ、9、62、12 個の情報を得た。また、分子内距離は 69 個の情報を得た。

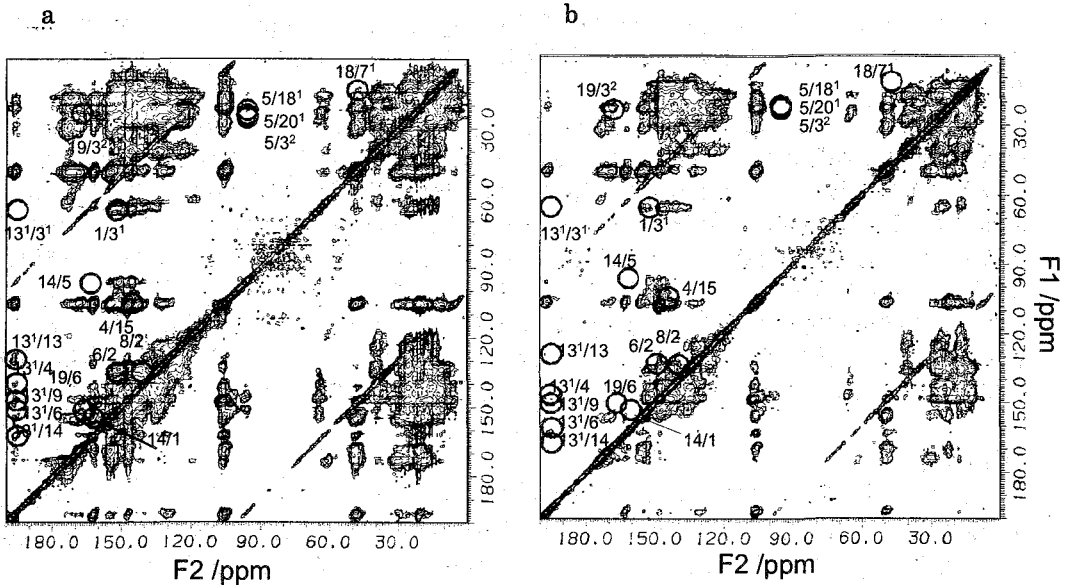


Fig. 1. ^1H -driven ^{13}C spin diffusion spectra of fully ^{13}C labeled BChl *c* (a) and 50 % ^{13}C labeled BChl *c* (b) at the mixing time of 115 ms.

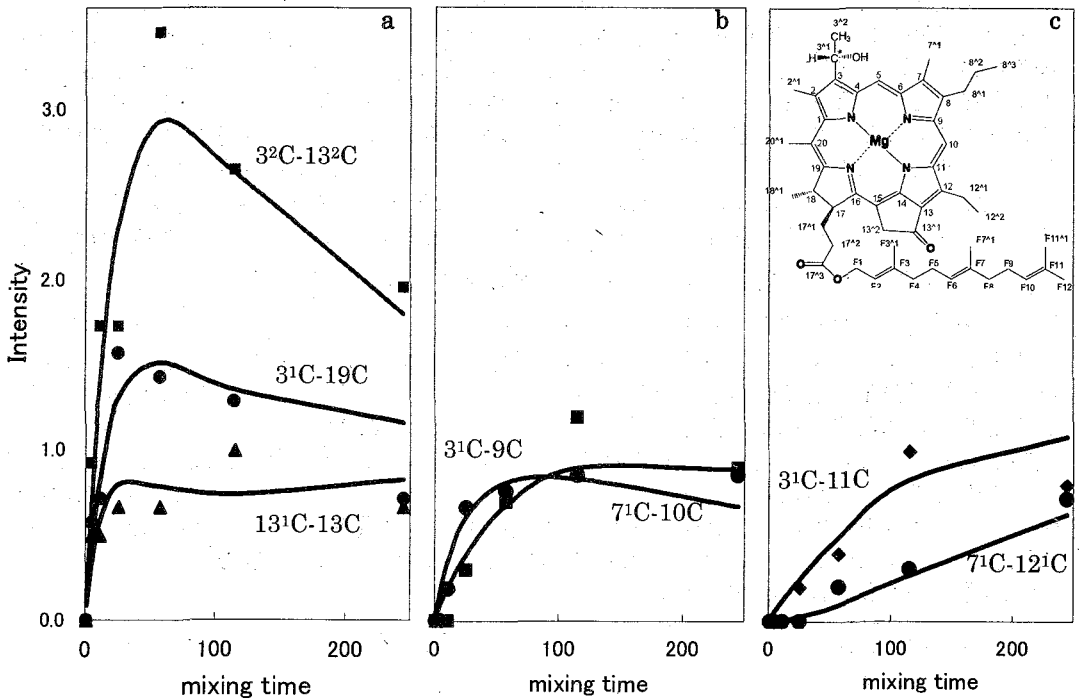


Fig. 2. Experimental (symbols) and simulated (lines) cross peak intensities of the spin diffusion spectra as a function of the mixing time for short distance of about 3.5 \AA (a), 4.5 \AA (b) and 5.5 \AA (c).

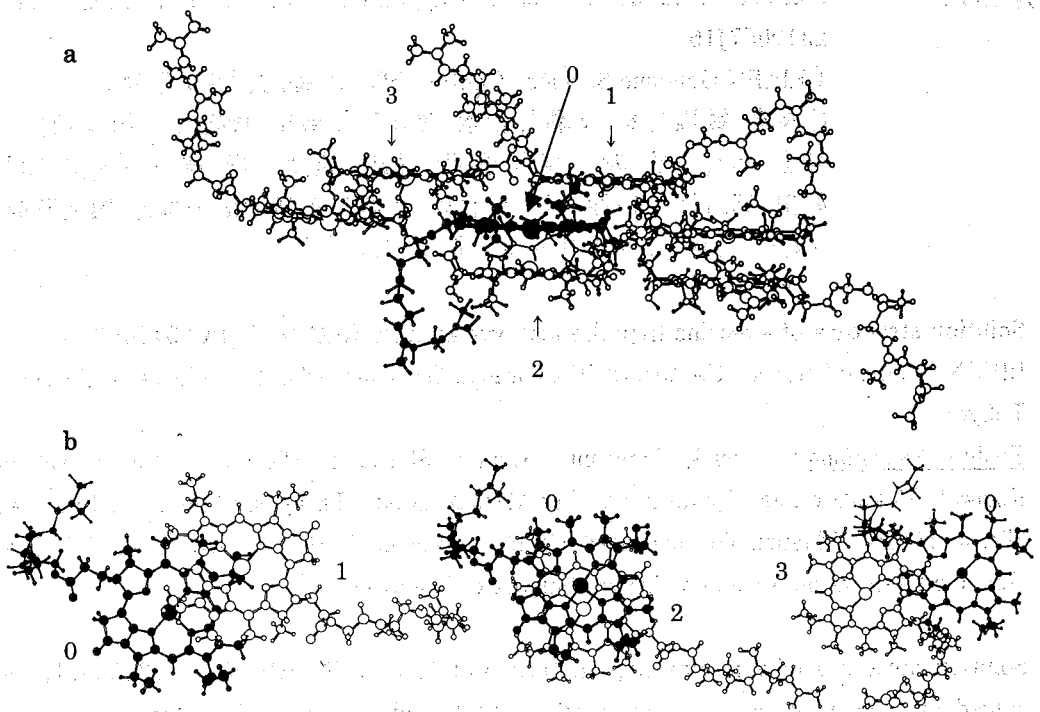


Fig. 3. BChl *c* complex structure calculated with simulated annealing under distance constraints. a: side view. b: top view.

これらの距離を全て満たす集積体の構造を導き出すために、シミュレーテッド・アニーリング法を用いて構造計算を行った。その結果、Fig. 3を安定構造として得た。Fig. 3bの0-1間のBChl *c*対は、解析の早い段階から明らかにできた基本的な二量体構造である。この会合体構造は、0-2間は二量体間で深く重なり、0-3間は二量体間で浅く重なっていることが特徴である。

【おわりに】

これまでに、固体 NMR を使った ^1H - ^{13}C 双極子相関スペクトルを使った研究でクロロゾームは単量体構造であると報告されている⁶。しかし、構造決定に必要な多くの距離情報を得た解析はされていない。今回、 ^{13}C 均一標識試料を使って、信号帰属だけでなく、多くの距離情報を得ることができた。この段階では、混合時間に依存した2次元 NMR シグナル強度を定量的に評価して152個のより正確な距離を算出した。この距離を拘束条件にシミュレーテッド・アニーリング法を使った構造計算から、ほぼ全ての距離情報を満たす構造をほとんど一義的に導き出せた。これまで固体 NMR 法を用いた生体分子の構造解析では、選択的同位体標識試料から少数の距離を求めることが多かった。しかし、今回の結果は、均一 ^{13}C 標識した試料について固体 NMR スピン拡散法による多数の距離を用いた構造解析が有効であることを示している。

参考文献：(1) A. E. Bennett, et al, *J. Chem. Phys.* 1992, 96, 8624. (2) M. Hohwy, et al, *J. Chem. Phys.* 1999, 110, 7983. (3) N. M. Szeverenyi, et al, *J. Magn. Reson.* 1982, 47, 462. (4) F. Castellani, et al, *Nature* 2002, 420, 98. (5) T. Kato, et al, *J. Biol. NMR* 1993, 3, 653. (6) B.-J. van Rossum, et al, *Biochemistry* 2001, 40, 1587.

Solution structure of a murine hypothetical protein from RIKEN cDNA 2310057J16

(¹RIKEN Genomic Sciences Center, ²RIKEN 播磨、³東大院理)

○長島 敏雄¹、林 文晶¹、白水 美香子¹、寺田 貴帆¹、木川 隆則¹、井上 真¹、矢吹 孝¹、青木 雅明¹、松田 貴意¹、関 英子¹、廣田 洋¹、好田 真由美¹、田仲 昭子¹、林崎 良英¹、理研遺伝子構造・機能研究グループ Phase I&II チーム¹、横山 茂之^{1,2,3}

Solution structure of a murine hypothetical protein from RIKEN cDNA 2310057J16

RIKEN Genomic Sciences Center, RIKEN Harima, Graduate School of Science, University of Tokyo

Toshio Nagashima¹; Fumiaki Hayashi¹; Mikako Shirouzu¹; Takaho Terada¹; Takanori Kigawa¹; Makoto Inoue¹; Takashi Yabuki¹; Masaaki Aoki¹; Takayoshi Matsuda¹; Eiko Seki¹; Hiroshi Hirota¹; Mayumi Yoshida¹; Akiko Tanaka¹; Yoshihide Hayashizaki¹; Phase I & II team, Genome Exploration Research Group¹; Shigeyuki, Yokoyama^{1,2,3}

Solution structure of a murine hypothetical protein from RIKEN cDNA 2310057J16 was solved in a common way of analysis of 3D NMR and calculation by molecular dynamics (CYANA). This protein was consisted of two alpha-helices aligned at N-terminus and seven beta-strand at C-terminus, and was consequently the unique fold that has not been reported in PDB yet. The function of this protein is unclear at all, even though the homologous sequence of this protein is found at various species. On the other hand, the sequence is quite similar to that of C-terminal domain in calmodulin regulated spectrin-associated protein 1 (CAMSAP1) at 66% identity. The results lead to investigation about the function of this protein or CAMSAP1.

<序> 網羅的なタンパク質の構造解析研究の中で、RIKEN cDNA(2310057J16)から発現したマウス由来のタンパク質の溶液構造を解明した。今回発表するタンパク質のアミノ酸配列はラット(100%)、ヒト(identity: 99%)やミドリフグ(71%)と高い相同性を持っているものの、機能は未だに解明されていない。一方で、calmodulin regulated spectrin-associated protein 1 の C 末側とも高い相同性(66%)があり、構造も類似していると推測できる。2310057J16 の立体構造を決定することにより、自身や CAMSAP1 の機能解析の研究につながると期待される。

キーワード: マウス cDNA、無細胞タンパク質合成、Calmodulin regulated spectrin-associated protein 1

ながしま としお、はやし ふみあき、しろうず みかこ、てらだ たかほ、きがわ たかのり、いのうえ まこと、やぶき たかし、あおき まさあき、まつだ たかよし、せき えいこ、ひろた ひろし、よしだ まゆみ、たなか あきこ、はやしざき よしひで、りけんいでんしこうぞう・きのうけんきゅうぐーぶ ふえいずわんあんどつーちーむ、よこやま しげゆき

〈方法〉 マウス由来の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識をしたタンパク質を無細胞タンパク質合成系によって大量発現させ、NMR スペクトルの測定をした。測定試料は 1.2mM (20mM phosphate buffer (pH6.0), 100mM NaCl, 1mM DTT, 0.02% NaN_3 , 10% D_2O) を用いた。測定は Varian Unity INOVA 600MHz と 800MHz を使用し 298K で行った。主鎖帰属に ^{15}N -HSQC、HN(CO)CA、CBCA(CO)NH、HNCO、HNCACB、HCA(CO)CANH、側鎖帰属に ^{13}C -HSCQ、HBHA(CO)NH、HBHANH、C(CO)NH、HCCH-TOCSY、CCH-TOCSY、 ^{15}N -edited NOESY、 ^{13}C -edited NOESY を解析に用いた。データ処理に NMRPipe、ケミカルシフト帰属に NMRView 上で動作する自家製の Kujira、分子動力学計算に CYANA を用いた。また、主鎖の二面角は TALOS を用いて予測した。

〈結果と考察〉 立体構造解析の結果、N 末側から 2 本のヘリックス、その後 anti-parallel と parallel の 7 本の β ストランドが続くフォールドで、Dali Server での構造検索から新規であることがわかった。2310057j16 と CAMSAP1 の表面に露出している親水性残基がよく保存されている部分もあるため、どちらも同様の機能を果たしている可能性があることがわかった。今回の結果が今後の 2310057J16 や CAMSAP1 の機能解析につながるものと考えられる。

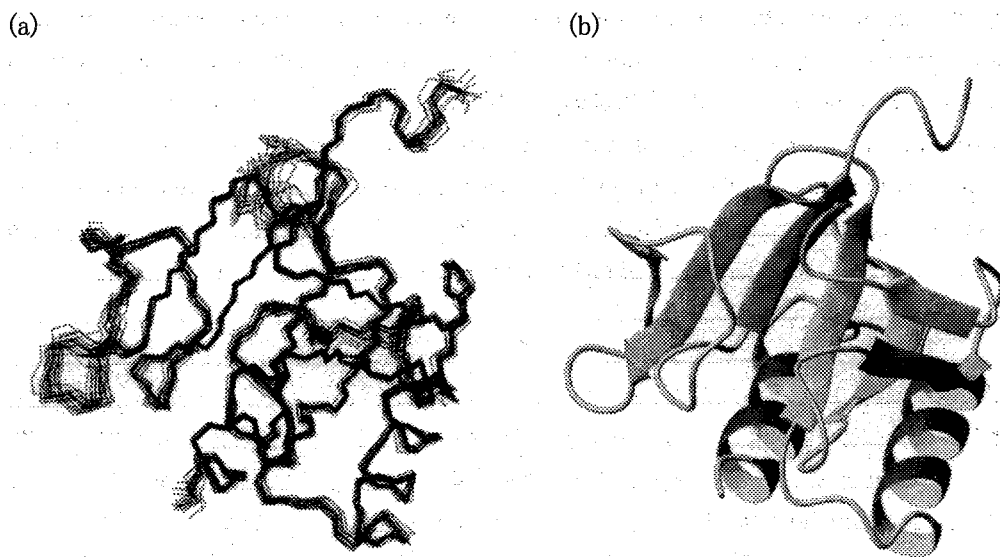


Fig. Ensemble of 20 structures of the lowest energy in 100 (a) and ribbon model (b).

1P064

マウス構造プロテオミクス：

ハイスループット構造解析の実際 — MSP ドメイン、DUF232 を例にして

(理研 GSC¹、理研・播磨²、東大院理³)

遠藤弘¹、八田玲子¹、○林文晶¹、好田真由美¹、白水美香子¹、寺田貴帆¹、木川隆則¹、井上真¹、矢吹孝¹、青木雅昭¹、関英子¹、松田貴意¹、廣田洋¹、田仲昭子¹、林崎良英¹、横山茂之^{1,2,3}

Mouse structural proteomics:

Practical aspect in high throughput structural analysis of MSP domain and DUF232

¹RIKEN Genomic Sciences Center, ²RIKEN Harima Institute, ³Graduate School of Science, University of Tokyo

H. Endo¹, R. Hatta¹, O.F. Hayashi¹, M. Yoshida¹, K. M. Shirouzu¹, T. Terada¹, T. Kigawa¹, M. Inoue¹, T. Yabuki¹, M. Aoki¹, E. Seki¹, T. Matsuda¹, H. Hirota¹, A. Tanaka¹, Y. Hayashizaki¹, and S. Yokoyama^{1,2,3}

High throughput structural analysis is an important issue to promote structural genomics. Actually this year's goal of the number of NMR structures is 300 in the comprehensive analysis program of "Protein 3000 Project". In addition to the request for the speed of structural analysis, the quality of the structure is very important especially in the pharmaceutical application like drug design. In order to fulfill the both demands, various approaches have been tried and tested here at RIKEN. We will present practical aspect of high throughput structural analysis of MSP domain and DUF232 as examples.

序

理研 GSC で担当している「タンパク 3000 プロジェクト」の網羅的解析プログラムでは、今年度の NMR 構造解析目標数は 300 個という数字が設定されている。これを達成するにはハイスループットで構造解析を行う必要がある。他方、構造情報をドラッグデザイン等産業利用していくためには、得られた構造は高い精度で決められている必要がある。ここでは、これを両立していくために、我々のグループで行っている手法を、MSP domain と DUF232 を例にしてその一端を紹介する。

キーワード：マウス cDNA、無細胞タンパク質合成、KUJIRA、CYANA、lower limit distance constraints

えんどうひろし、はったれいこ、はやしふみあき、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、いのうえまこと、やぶきたかし、あおきまさあき、せきえいこ、まつだたかよし、ひろたひろし、たなかあきこ、はやしざきよしひで、よこやましげゆき

方法と考察

すべての NMR 測定は $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識蛋白質を用いて行った。標識蛋白質の合成は無細胞蛋白質発現系を用いた。測定開始時の試料濃度は MSP domain が 0.99mM、DUF232 が 1.05mM であった。バッファー条件は両蛋白質とも 20mM TrisHCl(pH7.0)、100mM NaCl、1mM DTT、0.02% Na₃N、10%D₂O を用いた。NMR 測定は Varian 社製 UnityINOVA-600、-800、-900 を用い、25 度にて行った。主鎖の帰属用に ^{15}N -HSQC, HNC0, H(CA)CO(CA)NH, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH, HNCACB、側鎖の帰属用に ^{13}C -HSQC, HBHAHN, HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, CCH-TOCSY、距離制限用に ^{13}C -edited 3D NOESY, ^{15}N -edited 3D NOESY を測定した。データ処理は NMRPipe、スペクトル解析は NMRView-KUJIRA (Kobayashi N. unpublished) を用いた。NOE ピークの帰属、立体構造解析は CYANA 1.0.7 を用いて行った。

主鎖帰属を効率よく行うには、ゴミやマイナーピークのないきれいな HN の ID ピークファイルを作成すること、および、ID 番号⇔NMR スペクトル⇔化学シフト表間のリンク、情報の連携がスムーズに行えることが必須である。

側鎖帰属の場合も NMR スペクトル⇔化学シフト表間のリンクが重要なのは言うまでもないが、それに加えて、HN の広幅化やその他の理由によって、HN と関係付けられなかったピークをいかに効率よく帰属していくかという問題がある。この場合我々は CCH-TOCSY にジャンプして残基の種類を特定し、候補を検討する方法を取っている。さらに、側鎖帰属の問題点として芳香族残基、特に広幅化することの多い PHE の帰属をどうするかという問題があるが、これに関しては HCCH-TOCSY、CCH-TOCSY、NOESY の結果を総合的に判断するしかないのが現状である。

CYANA を構造計算に用いた場合、構造の精密化を効率よく行うためには、まず精密化前半は帰属の確認とごみピークの除去が主となるので、NOESY スペクトル上に CYANA による帰属の結果を表示できると解析の助けとなる。精密化後半は主鎖および側鎖の二面角のひずみを取ることが主となる。ひずみが生じる原因は、動力学計算の際 van der Waals 半径を実際より小さめに設定して計算する必要があることに起因していると考えられる。このひずみを取る方法はいくつか考えられるが、NOESY 情報に基づいて行う方法としては、NOE より見積もられた距離よりも近づきすぎたプロトンペアに対して、lower limit を入れて遠ざける方法が考えられる。ここでは、この方法にて精密化を行い、有用であることがわかった。

今回構造解析した MSP domain、DUF232 はドメインとしても、蛋白質としても機能は明らかになっていない。MSP domain の構造解析の結果、N 末端に β ストランドが追加している点を除いて、immunoglobulin 様フォールドをした MSP domain 独特の構造をとっていることがわかった。また、保存された表面残基は C 末 β ストランドを伴う β シート面側に分布しており、この面で他の因子と相互作用して機能を果たしていると考えられる。DUF232 は配列解析からは相同性のあるドメインは検索されなかったが、構造解析の結果、winged-helix 構造をとっていることがわかった。また、分子表面の電荷分布を表示してみたところ、winged-helix 蛋白質の相互作用部位と考えられる溝部分は、正ではなく負の電荷分布を示し、TFIIIE α や RAP74 同様ペプチドを結合するのではないかと予想された。

β -grasp 様溶液構造(RIKEN GSC¹、RIKEN 播磨²、東大院理³)○秦旭栄¹、林文晶¹、白水美香子¹、寺田貴帆¹、木川隆則¹、井上真¹、矢吹孝¹、青木雅昭¹、
関英子¹、松田貴意¹、廣田洋¹、好田 真由美¹、田仲昭子¹、関 原明¹、篠崎 一雄¹、横山茂之^{1,2,3}**Solution structure of a β -grasp fold like domain At3g63000
from *Arabidopsis thaliana***(RIKEN GSC¹、RIKEN Harima Institute² and University of Tokyo³)○Xu-rong Qin¹、Fumiaki Hayashi¹、Mikako Shirouzu¹、Takaho Terada¹、Takanori Kigawa¹、
Makoto Inoue¹、Takashi Yabuki¹、Masaaki Aoki¹、Eiko Seki¹、Takayoshi Matsuda¹、Hiroshi Hirota¹、
Mayumi Yoshida¹、Akiko Tanaka¹、Motoaki Seki¹、Kazuo Shinozaki¹、Shigeyuki Yokoyama^{1,2,3}**Introduction**

Arabidopsis thaliana is an important model system for identifying genes and determining their functions. A 94 amino acid domain from N-terminal was selected from the gene At3g63000 on chromosome 3, for which conventional sequence alignment revealed significant homology with protein NPL4. Human NPL4 is a protein interacting with the ubiquitin fusion-degradation protein (UFD1L), which related to DiGeorge syndrome(DGS) and velocardiofacial syndrome(VCFS).

We solved the structure of the domain with NMR. The result showed that the domain adopts a β -grasp fold which is similar to that found in ubiquitin and Ras-binding domains.

Keywords: Structural proteomics , *E. coli* cell-free protein synthesis system, ubiquitin and Ras-binding domains, β -grasp fold

しんきよくえい、はやしふみあき、しろうずみかこ、てらだたかほ、きがわたかのり、いのうえまこ
と、やぶきたかし、あおきまさあき、せきえいこ、まつだたかよし、ひろたひろし、よしだまゆみ、
たなかあきこ、せきもとあき、しのざきかずお、よこやましげゆき

Materials and Methods

The ^{13}C - and ^{15}N -labeled protein was produced by the *E. coli* cell-free synthesis system. All NMR measurements were performed at 298K under ambient pressure on Varian INOVA 600 or, in the case of the NOESY experiments, Varian INOVA 800 spectrometers.

The sequence-specific backbone resonance assignment was achieved through a combination of standard triple resonance techniques using 2D ^1H , ^{15}N -HSQC and 3D HNC(O), HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB and CBCA(CO)NH spectra. Side-chain assignment was obtained using 2D ^1H , ^{13}C -HSQC and 3D H(CCCO)NH, (H)CCH-TOCSY and HCCH-TOCSY spectra. Assignments were confirmed using 3D ^{15}N -edited (^1H , ^1H)-NOESY and ^{13}C -edited (^1H , ^1H)-NOESY spectra.

The programs NMRPipe, NMRView and Kujira were used for spectral processing and data analysis.

Structure calculation were performed with the program CYANA 1.0.7.

Result and Discussion

100 conformers were calculated, of those, 20 CYANA conformers with the lowest target function were selected to represent the structure (Figure a).

There are four α -helices and four β -strands were detected by the program MolMol (Figure b). helix α_1 (Val30 to Gln40) is rotated approximately 45° relative to the first two β -stands (β_1 and β_2), and this arrangement represents the typical ubiquitin-like conformation. Except the ubiquitin-like fold, there are two α -helices, α_2 (Arg54 to Leu58) and α_3 (Phe65 to Phe68), insert into β_3 and α_4 .

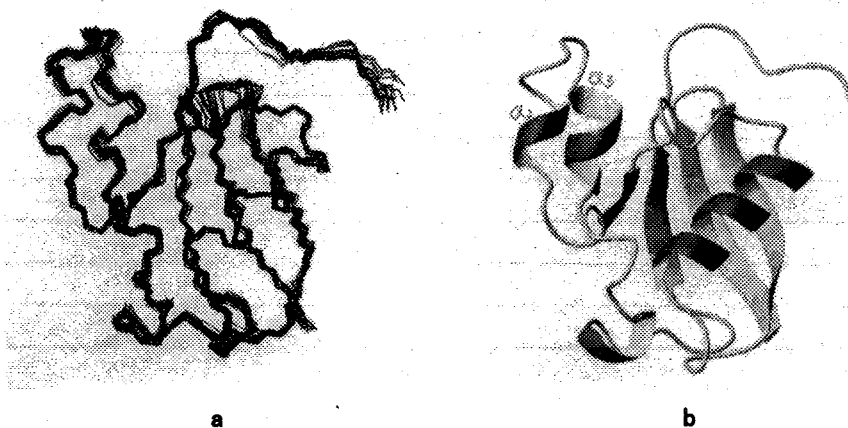


Fig. Superposition of 20 calculated structures (a) and ribbon diagram (b) of the β -grasp fold like domain Atg6300

Intramolecular interactions among alkyl chains in triglycerides

Gaku Kobayashi, Kunio Nikki

(Graduate School, University of Electro-Communications)

^1H and ^{13}C NMR for a series of triglycerides ($n=10-20$) and carboxylic acids ($n=10-20$) were observed in toluene, 1-chloronaphthalene and chloroform. As the chain length increases, methylene peaks for the middle of the chain of both triglycerides and carboxylic acids showed low field shift in aromatic solvent. It means that aromatic solvent molecules which induce high field shifts for methylene peaks are excluded around the middle of the chains. The larger the low field shifts for triglycerides than for carboxylic acids suggests the additional excluding of solvent molecules around the middle of the triglyceride chains.

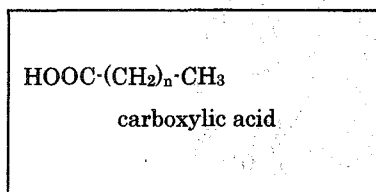
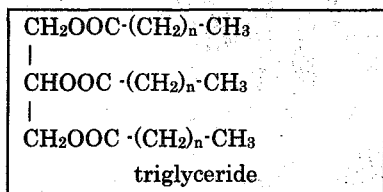
【緒言】

タンパク質の高次構造の安定化や細胞膜の構造で、分子間に働くアルキル基間の弱い相互作用の重要性が指摘されているが、その具体的な役割については不明な点が多い。細胞膜はリン脂質の集合体からなり、その構造はミセル様の脂質 2 分子膜である。その膜構造の形成にリン脂質内の炭化水素鎖同士の相互作用が寄与していると考えられる。

本研究は炭化水素鎖同士の相互作用についての基礎的な研究として、triglyceride をモデル化合物として選び、細胞膜において考えられる疎水性相互作用のない有機溶媒中で、triglyceride の炭化水素鎖間に働く弱い相互作用について検討した。

【実験】

溶質として炭化水素鎖の炭素数が $n=10,12,14,16,18,20$ の triglyceride (3 本鎖) および carboxylic acid (1 本鎖) を使い、溶媒には toluene, 1-chloronaphthalene, chloroform を用いた。Varian Unity Plus 500FT-NMR Spectrometer を使用し、 ^1H (パルス幅: $4.8\ \mu\text{s}$ 、積算回数: 100 回) 及び ^{13}C (パルス幅: $7.0\ \mu\text{s}$ 、積算回数: 1000 回) NMR を $293\sim 353\text{K}$ の温度範囲で測定した。



キーワード；炭化水素鎖間の引力的相互作用、トリグリセリド、芳香族溶媒

著者ふりがな；こばやし がく、につき くにお

【結果・考察】

Fig. 1. は trilaurin($n=10$)を溶質とし、溶媒に toluene, 1-chloronaphthalene, chloroform を用いたときの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した。methyl 基のピークを基準(0.0ppm)とした。

chloroform に比べて芳香族溶媒中では、全ての methylene のピークが高磁場側(図の右側)へシフトした。carbonyl から遠い methylene 部分は、chloroform では1本の鋭いピーク(0.3-0.5ppm)だが、芳香族溶媒では、その溶媒効果によって高磁場シフトすると共にいくつかのピークに分裂した。この溶媒効果は、溶媒分子の芳香環における磁気異方性効果により、芳香環の平面上に近づくと高磁場シフトを示すという効果である。このピークが分裂するという事実は、同じ methylene でも場所により溶媒の磁気異方性効果が異なることを示している。この現象を利用すると、methylene の $^1\text{H NMR}$ スペクトルがより細かくアサインできるという利点がある。

そして、1-chloronaphthalene では toluene と比べて、磁気異方性効果による高磁場シフトは大きく、methylene 部分のピークの分裂も大きかった。

Fig. 2. には、1本鎖である carboxylic acid の toluene 溶媒中における $^1\text{H NMR}$ スペクトルを示した。chloroform 溶媒では1本の鋭いピークだった methylene 部分が高磁場シフトをして、さらにピークが分裂した。全てのピークの化学シフトの変化は、chain が $n=10$ から $n=20$ へと炭素数が増えると各ピークで低磁場シフトを示した ($\alpha=0.002\text{ppm}$, $\beta=0.049\text{ppm}$, $\gamma=0.009\text{ppm}$, $\delta=0.001\text{ppm}$)。

methylene 基の中でも比較的low磁場側のピーク (β) は chain の炭素数が増えるとlow磁場側へと最も大きくシフトした。 β の部分では炭素数が増えたことによって溶媒が近づきにくくなり、芳香族溶媒による磁気異方性効果(高磁場シフト)が効きにくくなったので、low磁場シフトを示したと考えられる。一方、高磁場側にあるピーク(γ)は chain の炭素数が増えても化学シフトの変化は小さく、ピークの高さも変わらなかった。chain の炭素数が増えても γ の部分は増え

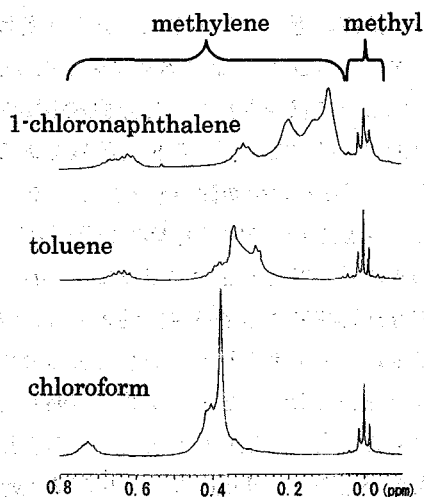


Fig. 1. $^1\text{H NMR}$ spectra of trilaurin($n=10$) in chloroform, toluene and 1-chloronaphthalene at 293K.

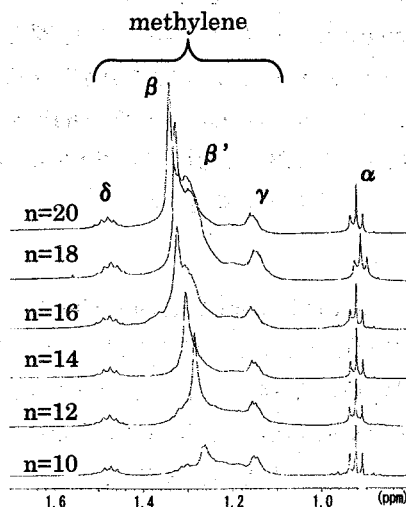
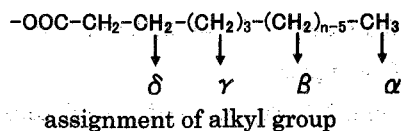


Fig. 2. $^1\text{H NMR}$ spectra of a series of carboxylic acids in toluene at 293K.

(Reference : TMS)

ず、溶媒の近づきやすさは、あまり変わらないと考えられる。

また、 $n=16$ で β が 2 本に分裂した (β : 低磁場側、 β' : 高磁場側)。この現象は、Winnik⁽¹⁾ らによって報告されている芳香族溶媒中における *n*-alkane の ¹H NMR スペクトルが、 $n=15$ 付近で分裂するという現象と同様であると考えられる。我々はこの現象について、次の様に考えた。chain の炭素数が増えたことで、chain が折れ曲がりの構造をとりやすくなって、同じ methylene の中でも溶媒が近づきにくい部分ができ、比較的溶媒が近づきやすい部分と近づきにくい部分の 2 つの状態に分かれたと考えられる。そして、溶媒が近づきにくい部分は、芳香族溶媒による磁気異方性効果 (高磁場シフト) が効きにくくなるので、低磁場側にピークが現れたと考えられる。そして β の分裂後は、chain の炭素数が増えると β はわずかに低磁場シフトをしながらピークの高さが増していったが、 β' は γ と同様に化学シフトもピークの高さもほとんど変化しなかった。この β と β' のピークの様子より、 β の分裂後は chain の炭素数が増えると、chain の中でも溶媒が近づきにくい部分が増えていることが推測される。

一方、Fig. 3. には 3 本鎖である triglyceride の toluene 溶媒における ¹H NMR スペクトルを示した。chloroform 溶媒と比べて methylene 部分が大きく高磁場シフトをして、ピークの分裂幅は carboxylic acid よりさらに大きく広がった。全てのピークの化学シフトの変化は、chain が $n=10$ から $n=20$ へと炭素数が増えると各ピークで低磁場シフトを示した ($\alpha = 0.001\text{ppm}$, $\beta = 0.077\text{ppm}$, $\gamma = 0.017\text{ppm}$, $\delta = 0.009\text{ppm}$)。

Fig. 2. と Fig. 3. における triglyceride と carboxylic acid の最も大きな違いは、 β の分裂の様子である。

triglyceride では $n=14$ で分裂し始めたが、carboxylic acid では $n=16$ で分裂し始めた。carboxylic acid より triglyceride の方が、chain の炭素数が少なくても、 β において溶媒が近づきにくい部分ができ始めるということが推測される。

なお、1-chloronaphthalene 溶媒中ではさらに大きく methylene のピークが高磁場シフトをして、toluene よりも多くのピークへと分裂した (Fig. 1.)。triglyceride の methylene における、分裂後 ($n=20$) の β - β' 間の化学シフトの差は、toluene 溶媒中と比較をすると、1-chloronaphthalene 溶媒中の方が約 2 倍大きかった。磁気異方性効果が toluene よりも大きく働いていると考えられる。

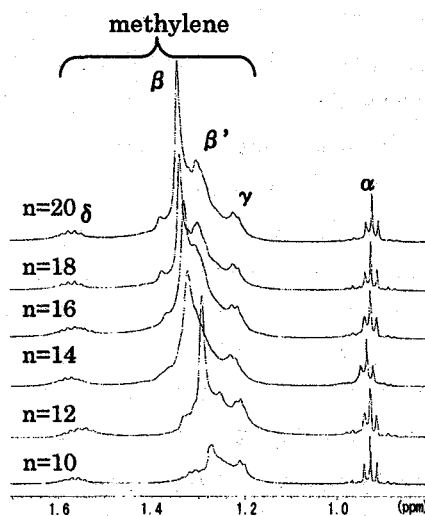


Fig. 3. ¹H NMR spectra of a series of triglycerides in toluene at 293K. (Reference : TMS)

(triglyceride における chain 同士の分子内相互作用)

さらに細かく triglyceride と carboxylic acid の比較を行った。

- (a) $n=10$ では、triglyceride と carboxylic acid を比較すると、triglyceride の方が低磁場側に各ピークがあった (Fig. 4)。この triglyceride と carboxylic acid の化学シフトの違いより、triglyceride の方が溶媒効果を受けにくく、toluene (溶媒) が近づきにくいので、低磁場側にピークが現れたと考えられる。この原因として考えられるのが、triglyceride の chain 間に働く引力的な相互作用である。

また、triglyceride と carboxylic acid の化学シフトの差は、 γ (0.035ppm) $>$ β (0.002ppm) であった (Fig. 4)。この化学シフトの差は、chain 間に働く引力的な相互作用の差であると考えられる。これより、triglyceride の中でも β より γ の方が、chain 間の相互作用が強く働いていると考えられる。

- (b) $n=10$ から $n=16$ に chain の炭素数が増えると、triglyceride では γ が低磁場シフトする (Fig. 2. $\gamma=0.016$ ppm)。しかし、carboxylic acid では同様に炭素数が増えても、 γ はほとんど低磁場シフトしない (Fig. 3)。この低磁場シフトについても、溶媒効果の変化を反映していると考えられる。よって、triglyceride の γ では chain の炭素数が増えると、toluene (溶媒) がより近づきにくくなり、 γ における chain 間の相互作用が強くなると考えられる。

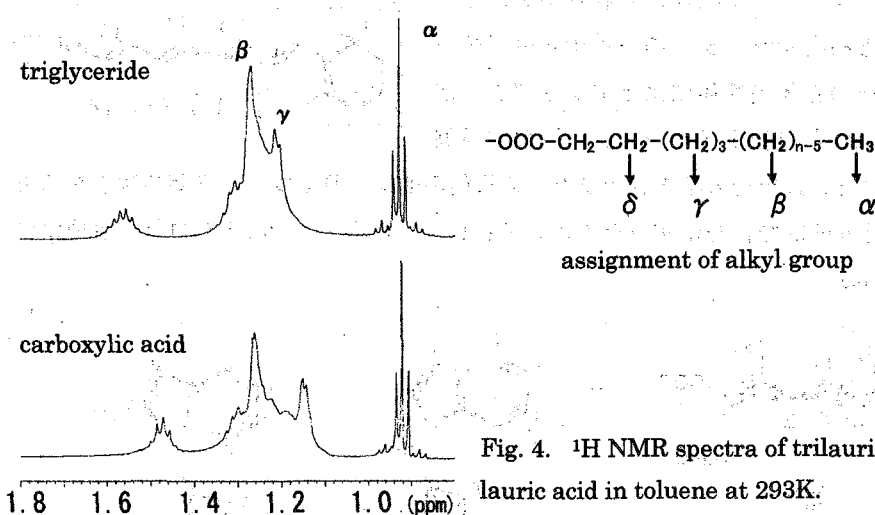


Fig. 4. ^1H NMR spectra of trilaurin and lauric acid in toluene at 293K.

【結論】

(a) triglyceride では、分子内の chain 間に働く引力的な分子内相互作用が chain と toluene の間に働く分子間相互作用に打ち勝って toluene を排除するように作用していると考えられる。(b) また、分子内の chain 間に働く引力的な分子内相互作用は、chain の炭素数が増えると methyl 基より離れた場所ほど強くなるということが考えられる。

(参考文献)

(1) M.A. Winnik, A. Mar, W.F. Reynolds, Ph. Dais, B. Clin and B. Caussade, J. Am. Chem. Soc., 12, 257 (1979)

(神戸薬大) ○杉浦眞喜子 浅見由美 和田昭盛 伊藤允好

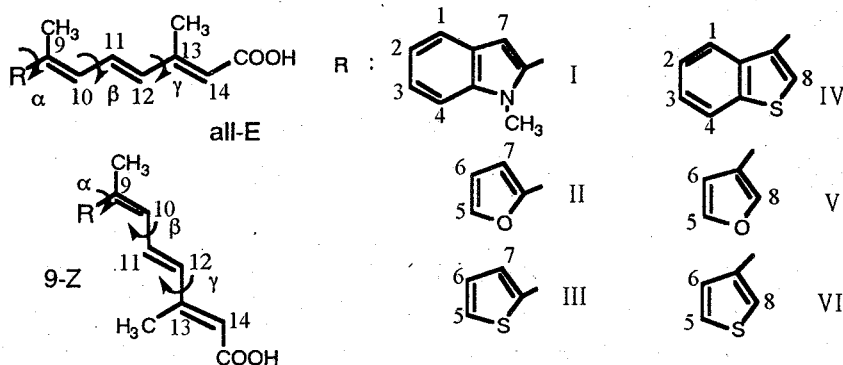
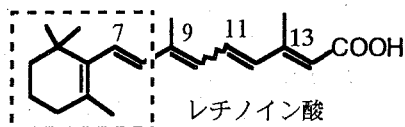
*Conformational Analyses of Retinoic Acid Derivatives
containing Heterocycles in Solution.*

Kobe Pharmaceutical University

Makiko Sugiura, Yumi Asami, Akimori Wada, Masayoshi Ito

Conformations of several retinoic acid derivatives containing heterocycles (I - VI) have been investigated by means of the selective relaxation method. Using the H-H distances obtained, the dihedral angles defined by β and γ have been estimated as shown in Table 1. On the other hand, the conformation defined by α is difficult to estimate for all derivatives because of the conformational equilibrium between two or more conformers. Now, the conformational analysis under the equilibrium model is applied for this conformation.

【はじめに】 レチノイン酸は、動物細胞の増殖・分化を制御する核内レセプターのシグナル分子の一つであるが、その立体異性体によってレセプターが異なり、立体化学とコンホメーションの関係には興味を持たれている。近年その核内レセプターの機能解明ばかりでなく、創薬の観点からも、レセプターと特異的な結合を示すシグナル分子として、レチノイン酸アナログの合成がさかんに行われている。



レチノイン酸 複素環 コンホメーション解析 選択的緩和法 緩和時間

すぎう らまきこ あさみ ゆみ わだ あきもり いたう まさよし

今回これらの内、シクロヘキサン環を含む 8 位までをさまざまな複素環に変えたアナログ化合物の溶液中でのコンホメーション解析を、主に緩和時間を使う選択的緩和法を用いて行った。今回解析の対象としたのは、図に示す I~VI のレチノイン酸誘導体の all-E 体および 9-Z 体である。これら誘導体は、 α , β , γ で表される結合廻りのコンホメーションが議論の対象になるが、そのレセプターとの結合能を議論する上で、このようなコンホメーションの情報は不可欠と思われる。複素環の種類・立体化学の違いにより、これらのコンホメーション、特に α で表される C8-C9 (C7-C9) 結合廻りのコンホメーションにどのような変化が見られるか、特にその点に興味を持ち、解析を行った。

【実験】

それぞれの誘導体を CDCl_3 に溶解し (7~13 mM), 脱ガス・溶封して緩和時間測定用サンプルとした。NMR 測定は, Varian INOVA-500 (^1H : 499.8 MHz, ^{13}C : 125.7MHz) を用い, T_1^{NS} 及び ^{13}C T_1 は通常の Inversion-recovery 法で, T_1^{SNI}

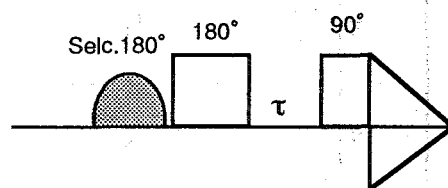


Fig. 1 Pulse Sequence for Measurement of T_1^{SNI}

(Selective Non-inversion T_1) は, Fig. 1 のパルスシーケンスによってそれぞれ測定した。Fig. 1 のシェードパルスとしては, *i*-SNOB-3 (inversion type of selective excitation for biochemical applications)¹⁾ を選び, シグナル幅に合わせてバンド幅を変化させて用いた。

【結果と考察】

常法により, 観測された T_1^{NS} と T_1^{SNI} の値のそれぞれ逆数の差から交差緩和 (σ_{ij}) を得, それと $^{13}\text{C}T_1$ から得られる回転相関時間 (τ_c) とからそれぞれの水素間距離を Table 1 のように得ることが出来た。同じ水素間距離について誘導体間で見比べてみると, 期待に反して大きなコンホメーションの違いを示唆するような大きな差は見られなかったが, 詳細に見ると, 微妙な差は観測出来, この微妙な差がコンホメーションの微妙な変化を反映していると思われる。

これらの水素間距離を満足するコンホメーションを組み立てることが出来れば, それがその誘導体の優位コンホメーションということになる。Table 2 に β , γ で表される結合周りのコンホメーションについて得られた結果を示した。 β については, I と IV の 9-Z 体で, $30\sim 40^\circ$ ほどの平面からのねじれが観測され, γ については, I が all-E 体, 9-Z 体共に同様の平面からのねじれが観測された。

一方 α については, いずれの誘導体も, 得られた水素間距離すべてを満足するようなコンホメーションを一義的に決めることが出来なかった。このことは, ここでのコンホメーションが一つの配座に固定されているのではなく, 2 つまたそれ以上のコンホメーションのコンホメーション平衡にあることを示唆する結果と考えられる。現在コンホメーション平衡を考慮に入れた解析²⁾を行い, α のコンホメーションの詳細を検討中である。

Table 1. The H-H Distances (Å) Estimated by the Selective Relaxation Method for Retinoic Acid Derivatives

	all-E						9-Z					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
NMe - H10	3.0											
NMe - H11							3.6					
H1 - 9Me				>4						3.9		
H6 - 9Me					3.4	>4					>4	3.4
H7 - 9Me	3.5	3.6	3.2				>4	3.7	3.7			
H8 - 9Me				3.7	3.4	-				3.7	>4	3.6
H1 - H10				2.6 - 2.8								
H1 - H11										3.1 - 3.4		
H6 - H10					2.4 - 2.5	2.5 - 2.5						
H6 - H11											2.7 - 2.9	2.8 - 3.0
H7 - H10	2.7 - 3.1	3.7	2.9 - 3.1									
H7 - H11							3.1 - 3.3	3.5 - 3.5	2.8 - 2.9			
H8 - H10				3.3 - 3.3	2.9 - 3.2	2.5						
H8 - H11										3.0 - 3.4	3.0 - 3.0	2.8 - 2.9
9Me - H11	2.9	2.9	2.9	2.9	3.0	2.7						
H10 - H11	>4	3.1 - 3.8	3.2 - 3.2	3.2 - 3.3	3.2 - 3.2	3.1 - 3.3	3.2 - 3.2	3.1 - 3.3	3.0 - 3.2	-	3.1 - 3.1	3.0 - 3.0
H10 - H12	-	2.4 - 2.5	2.5 - 2.6	2.5 - 2.7	2.4 - 2.4	2.4 - 2.5	2.6 - 2.6	2.3 - 2.3	2.4 - 2.4	2.6 - 2.6	2.3 - 2.4	2.4 - 2.4
H11 - 13Me	3.2	2.8	2.9	3.0	2.9	2.7	3.0	2.9	2.8	3.0	2.8	2.9
H12 - 13Me	3.8	3.9	>3.5	4.0	4.0	>4	>4	4.0	3.9	4.0	4.0	>4
H12 - H14	2.7 - 2.8	2.2 - 2.3	2.3 - 2.5	2.4 - 2.5	2.3 - 2.4	2.2 - 2.4	2.5 - 2.6	2.2 - 2.2	2.2 - 2.3	2.3 - 2.5	2.2 - 2.3	2.2 - 2.4

Table 2. The Proposed Prefer Conformations defined by β and γ for all Derivatives

	all-E		9-Z	
	β (°)	γ (°)	β (°)	γ (°)
	C9-10-11-12	C11-12-13-14	C9-10-11-12	C11-12-13-14
I	180	135	144	150
II	179	167	167	165
III	178	179	179	177
IV	179	170	142	167
V	178	165	171	171
VI	170	167	166	178

【参考文献】

- 1) E. Kupce, J. Boyd, I.D. Campbell, *J. Magn. Resn., B*, **106**, 300 (1995).
- 2) M. Sugiura, A.V.Vashchenko, A.Kimura, H. Fujiwara, *J. Chem. Soc., Perkin 2*, 1489 (2000).

2,5-Dicyclopentylcyclopentanone の cyclopentyl 基が 香気に及ぼす影響についての考察

高砂香料工業(株)総合研究所 ○春日 久栄、白井 文晴

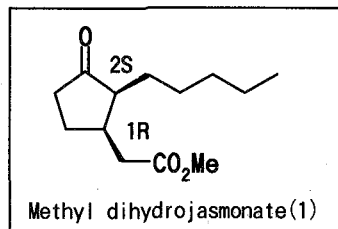
The olfactory influence of the stereochemistry of the two cyclopentyl groups in 2,5-Dicyclopentylcyclopentanone.

TAKASAGO INTERNATIONAL CORPORATION Central Research Laboratory

○Hisae Kasuga, Fumiharu Shirai,

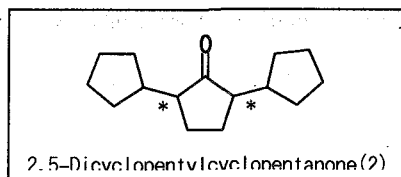
The relation of the stereochemistry & odor was well investigated in 2,3-disubstituted cyclopentanone analogues like Methyl jasmonate & Methyl dihydrojasmonate. On the other hand, the stereochemistry of 2,5-disubstituted cyclopentanone analogues was not studied. In this experiment, the relation of the stereochemistry & the odor of the isomers of 2,5-Dicyclopentylcyclopentanone was discussed. The odors are different between three isomers. One of the isomers has stronger floral fragrance than the others. One isomer has bad oily smell. The other isomer has strong woody-green odor.

【はじめに】 シクロペントノン誘導体には香料として有用な化合物があることが知られている。例えば、methyl dihydrojasmonate (1)などは天然ジャスミンから発見され、ジャスミンフローラル香を有する有用な香料化合物として広く使われており、それら 2,3-二置換シクロペントノンの立体科学とその香気の関係 1980 年代から研究されている。



しかし、シクロペントノン骨格の 2 位と 5 位に大きな官能基が入った化合物についての官能基の立体と香気の間連についてまだ報告されておらず、興味を持たれる。

2,5-Dicyclopentylcyclopentanone(2)では 2 つのシクロペンチル基の立体構造によって、嗅覚受容体への作用が異なることが考えられ、香気にも大きな差があると予想される。しかし、この化合物は対称構造を有しており、対称面を境に左右のそれぞれのプロトンが同じケミカルシフトに観測されるため、通常の NOE 実験では相対立体

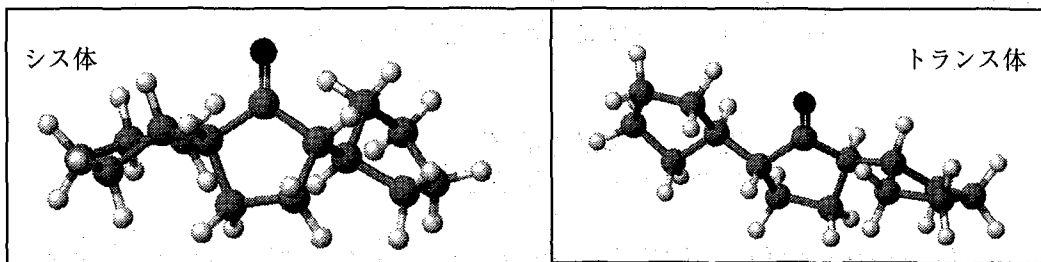


配置を明らかにすることは不可能である。そこで、本実験では、化合物 2 の各異性体の 2,5 位のシクロペンチル基の相対立体配置を HSQC-NOESY により検討した。HSQC-NOESY は ^{13}C に結合したプロトンから ^{12}C に結合したプロトンへの NOE 相関を観測する方法であり、対称な化合物の相対立体配置を決めるのに適している。化合物 2 の場合は、2,5 位メチンプロトン同士の NOE 相関を観測することが可能であり、シクロペンチル基の立体を明らかにすることができると予想された。また単離した各異性体の香気の違いを確認した。

Key word : 2,5-Dicyclopentylcyclopentanone, Cyclopentyl group, Floral fragrance, HSQC-NOESY

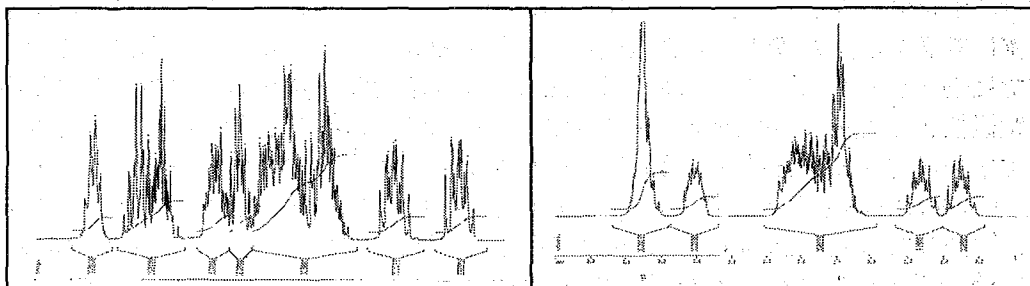
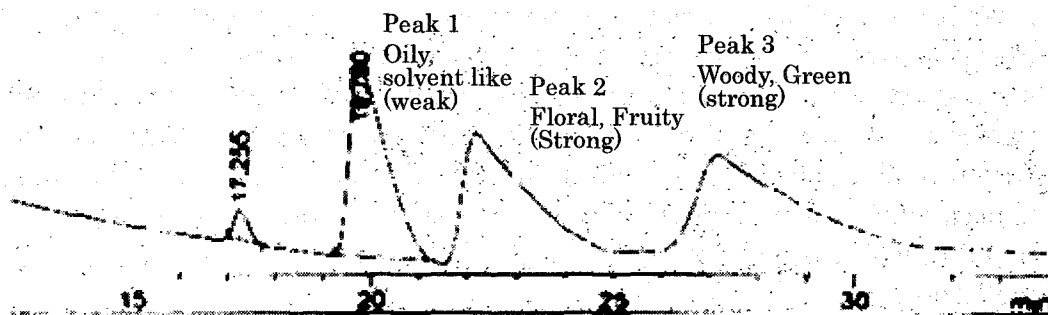
ふりがな ; かすが ひさえ、しらい ふみはる

化合物 2 のシス体、トランス体のコンフォメーションの違い(予想)



【実験および結果】キラル分取 HPLC を用い、サンプル中に存在する 3 種類の異性体を単離した(下図参照)。各々のピークの¹H-NMR、¹³C-NMR、COSY、HSQC、HMBC、sel-CTHMBC スペクトルにより、各シグナルのアサインを行った。また、各ピークの香気を確認した。

(HPLC 条件 ; Chiralpak IA 20mm×25cm、溶離液 1.5%AcOEt/Hexane 8ml/min)



< ¹H-NMR spectrum of Peak1 >

< ¹H-NMR spectrum of Peak2 & 3 >

単離された各異性体の相対立体配置について HSQC-NOESY で検討中である。また、トランス体の絶対構造については、今後 X 線結晶構造解析を用いて検討する予定である。

【参考文献】

J. Am. Chem. Soc., Vol. 114, No. 3, 1992 川端、福土、水谷
Aroma Research No. 9 (Vol. 3/No. 1 2002) Kraft, Bajgrowicz, Denis, Frater
公開特許広報 2001-261609 山田、藤沢
Tetrahedron: Asymmetry 14 (2003) 1-42 Brenna, Fuganti, Serra

(理研¹, 国立情報学研²)○越野広雪¹, 佐藤寛子²Applications of CAST/CNMR System to Chemical Shift Assignments
and Structural Revisions(RIKEN¹, NII²)H. Koshino¹ and H. Satoh²

We have developed a new computer system CAST/CNMR for ¹³C-NMR chemical shift prediction using a structure-NMR database considering stereochemistry. The accuracy of the predicted ¹³C-NMR chemical shift values is enough for the applications to chemical shift assignments and structure determinations including stereochemistry. We describe advanced applications to structural revisions of recently reported some terpenoids together with the concepts of a CAST/CNMR system application methodology.

CAST/CNMRは立体化学を規範的に表現できるCASTコードを基盤とした化学構造-NMR化学シフトデータベースを予測のデータソースとして利用し、立体化学を的確に考慮する、高精度¹³C-NMR化学シフト予測システムである。¹⁻⁴ 本討論会ではすでにCAST/CNMRシステムの応用として、立体化学既知の化合物に対する立体構造類似性と1次元¹³C-NMRデータに基づく¹³C-NMRの帰属方法について、⁵また立体化学を決定する部分構造に関し可能性のある全立体異性体の化学シフト予測値と¹³C-NMRの実測値との比較によって立体化学を決定する方法について報告してきた。⁶ 今回はCAST/CNMRシステムの応用として幾つかのテルペノイド系化合物の¹³C-NMRデータの帰属と化学構造の訂正に関して報告する。

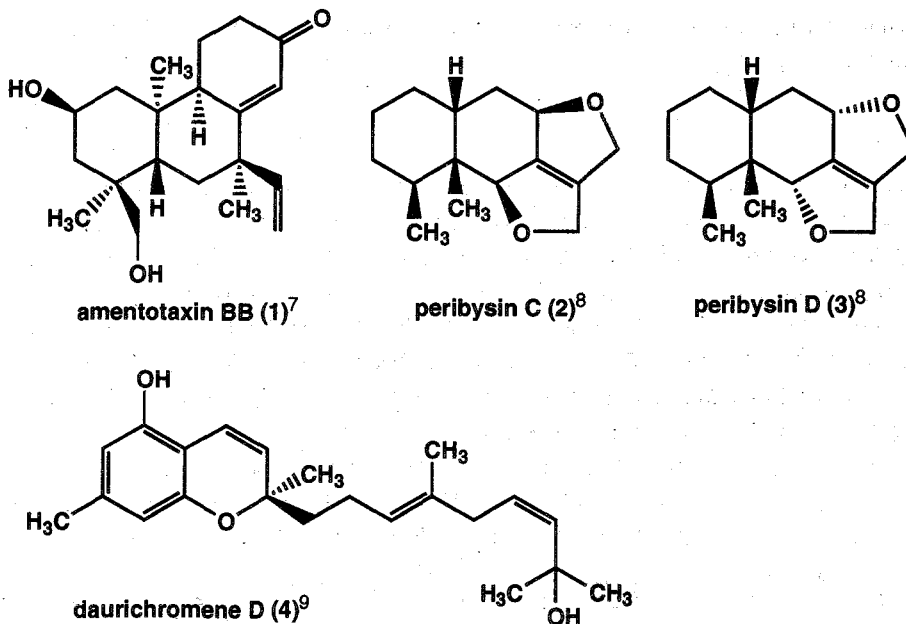
近年磁場勾配パルス法を用いる2次元NMR法の普及により、構造解析の専門家でもなくとも、NMRを用いた数多くの構造決定の報告がなされるようになった。一方で、NMRデータの帰属や化学構造の訂正に関する報告も少なく無いのが現状である。データベースを基本としたCAST/CNMRシステムにとって、登録するデータの質は極めて重要である。そこで、帰属や構造決定に適用できるCAST/CNMRの予測精度の高さを利用し登録データの評価も行っている。具体的には、データベースへ

CAST/CNMR、帰属、構造訂正、データベース、化学シフト予測

こしのひろゆき, さとうひろこ

の登録時に化合物のシフト予測を行い、予測値と矛盾する結果が得られた際には論文に記載された構造、構造決定や帰属の方法について詳細に検討している。また、登録時にこうした問題が見い出されない場合でも、シフト予測を行う際に予測に利用されたデータ間のシフト値の差が大きい場合、その原因を検討することで帰属の間違が見い出される。また、シフト予測結果から構造式に合った帰属が出来ないときや、特定の部分構造に対して明らかに異なるシフト値が記載されている場合には、化学構造が間違っている可能性もあるため検討を行っている。

このように登録データの評価を行った結果、2次元NMR、特にHMBCなど4級炭素の帰属に有効な手法が普及する以前の論文には帰属の間違が見い出された。化学構造に間違のある可能性が考えられた場合には、詳細に論文を検討して可能性のある化学構造を提案し、その提案構造に対してCAST/CNMRシステムを用いてシフト予測を行い提案構造の妥当性を評価した。間違った構造も含め新規性の高い部分構造に関しては、その新規性のために適したデータが存在しない場合も少なく無いが、CAST/CNMRシステムの類似性検索機能を利用して効率的に帰属および構造の評価を行い、本システムの有効性を明らかにできた。以下に示した化合物の構造について検討した結果、報告されている構造に間違が見い出されたのでその構造訂正の詳細について発表する。



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) H. Satoh, H. Koshino, J. Uzawa, and T. Nakata, *Tetrahedron*, **59**, 4539-4547 (2003).
- 5) 越野広雪, 佐藤寛子, 第41回NMR討論会講演要旨集, pp148-149 (2002).
- 6) 越野広雪, 佐藤寛子, 第42回NMR討論会講演要旨集, pp380-381 (2003).
- 7) H.-J. Su et al, *Helv. Chim. Acta.*, **86**, 2645-2652 (2003).
- 8) T. Yamada et al, *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 2131-2135 (2004).
- 9) N. Iwata et al, *J. Nat. Prod.*, **67**, 1106-1109 (2004).

(日本電子 (株)¹、神戸薬大²、横浜国大³)○櫻井智司¹、上田昌史²、内海博明¹、中越雅道³、宮田興子²、内藤猛章²Usefulness of DOSY method for the analysis of labile and unisolable compound
in the synthetic reaction

The DOSY (Diffusion-ordered NMR spectroscopy) method is received much attention as a technique for separating NMR spectrum in a mixed sample using the difference of the self-diffusion coefficient. However, these are limited to the application to the intentionally mixed samples and the practical example was few. Thus, we have confirmed the usefulness by applying the DOSY method to the analysis of the labile and unisolable intermediate in a newly found and useful synthetic reaction via radical species.

We tried the analysis of the reaction intermediate in the synthesis of amines. In triethylborane (Et_3B) mediated radical addition reactions to oxime ethers that give amine derivatives in good yields, a borane complex is proposed as a key intermediate. However, the isolation is quite hard and the analysis by the general analyzing method is difficult. Then, we tried the analysis of the intermediate by the DOSY method and succeeded in the detection for the first time.

(緒言)

DOSY (Diffusion-ordered NMR spectroscopy) 法は、分子の自己拡散係数の差を利用して、混合試料中の NMR スペクトルを分離する手法として注目を浴びている¹。しかしながら、これまでは故意に混合した試料に対する応用例が多く、実用的な例が乏しかった。そこで今回は、合成化学における単離不可能な中間体の解析に DOSY 法を適用することで、その有用性を確認した。

解析を試みたのは、アミン類の合成法における中間体である。アミン類あるいはそれらの誘導体 (アミノ酸類やアミノアルコール類等) は生命維持に必須である神経伝達物質、ホルモン類および多くの天然生物活性物質の構成成分として重要な位置を占めており、その合成法の開発および解析は重要である。トリエチルボラン (Et_3B) とオキシムエーテル類を反応させると、 Et_3B をラジカル開始剤としてアミン類を高収率で得ることができる²が、このときホウ素錯体と思われる中間体の存在が確認されている (Fig. 1)。しかしながら、この中間体は単離不可能であり、一般的な解析法での解析は難しい。そこで、DOSY 法を用いてこの単離不可能な中間体の解析を試みた。

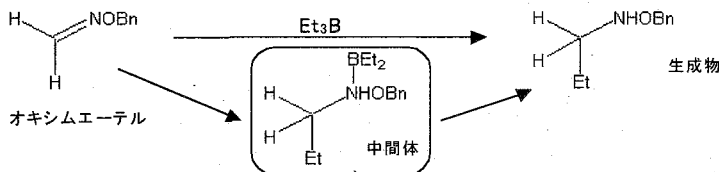


Fig.1 The reaction pathway of amine synthetic from oxime ether

DOSY、混合試料、中間体

さくらいさとし、うえだまさふみ、うつみひろあき、なかこしまさみち、みやたおきこ、ないとうたけあき

(実験)

測定には JNM-ECX400 および JNM-ECA500 を用いた。試料は、 Et_3B の CH_2Cl_2 溶液を加え反応を開始させた後、減圧下で試料管を封管して、反応を停止させている。溶媒には CD_2Cl_2 を使用しており、測定温度は長期低温システムを用いて、 25°C に温度可変を行なった。また、対流を防ぐために外径 3mm の試料管を用いている。

尚、DOSY 処理には Delta プログラムの SPLMOD (SPLine Model) を用いた。

(結果)

Fig. 2 に ^1H -DOSY スペクトルを示す。自己拡散係数の大きい順に、溶媒類、 Et_3B 、生成物、中間体の 4 つの成分に分離されていることが分かる。それぞれの拡散係数値におけるスライスデータを Fig. 3 に、 ^1H -DOSY-COSY における中間体のスライスデータを Fig. 4 に示す。尚、COSY の一次元データには、 ^1H -DOSY スペクトルにおける中間体のスライスデータを貼り付けている。

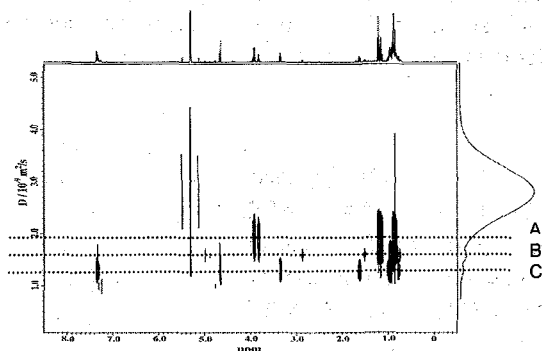


Fig.2 ^1H -DOSY spectrum of reaction mixture

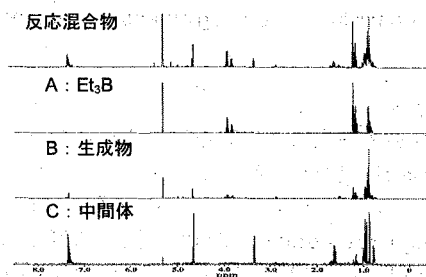


Fig.3 ^1H spectra of reaction mixture and each slice

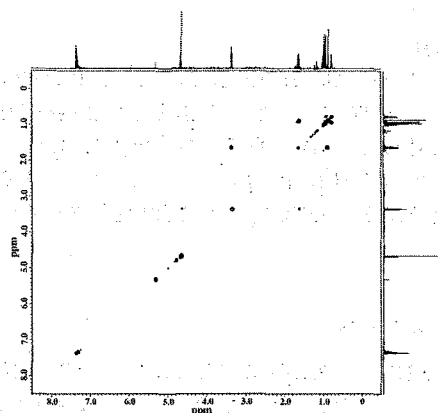


Fig.4 Slice spectrum of ^1H -DOSY-COSY for intermediate

(まとめ)

以上のように 2D, 3D-DOSY 法を用いることで、単離不可能な中間体を解析できることが分かった。合成法の開発において、中間体の解析は反応経路を考える上で重要である。しかしながら、今回の例のように単離不可能であるケースも多いため、その解析に DOSY 法は有用であると言える。

References

- (a) K. F. Morris and C. S. Johnson, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3139
- (a) H. Miyabe, C. Ushiro, M. Ueda, K. Yamakawa, T. Naito, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 176; (b) H. Miyabe, M. Ueda, T. Naito, *Synlett*, 2004, 1140.

2P071 ポリ (アルキルプロピオレート) の動的溶液構造

北大院工 ○小日山輝泉・平沖敏文・馬渡康輝・小塚心尋・田畑昌祥

Dynamics of Poly(propiolate) Solutions

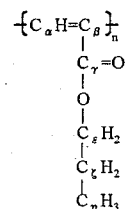
Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060-8628

T. KOHIYAMA, T. HIRAOKI, Y. MAWATARI, M. KOZUKA, and M. TABATA

Solution structures of poly(propiolate)s were characterized by ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopies. In poly(*n*-propyl propiolate)(PnPP)/ CDCl_3 , the side chain ϵ protons of PnPP shows a doublet line shape with a splitting of about 50 Hz below 20°C , and becomes a singlet with increasing temperature. On the other hand, other protons and all carbon signals, including ϵ carbon, of PnPP exclusively keep a singlet independent on temperature, and chemical shifts of them do not change with temperature. These results show extremely slow internal rotation about the $\text{O}_\gamma\text{-C}_\epsilon$ axis. T_1 values imply the slow motion for the $\text{C}_\alpha\text{-C}_\epsilon$ region and the fast motion for the $\text{C}_\zeta\text{-C}_\eta$ region.

<序>

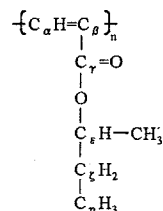
Rh錯体触媒により重合した種々のアルキルプロピオレートはほぼ100%*cis-transoid*構造を有する。このシス体ポリマーの結晶部は、擬ヘキサゴナル構造のカラムナーを形成している。本研究では、側鎖に*n*-propyl基を有するpoly(*n*-propyl propiolate) (PnPP) 並びに側鎖に2-butyl基を有するpoly(2-butyl propiolate) (P2BP) についてそれぞれ CDCl_3 、 CD_2Cl_2 溶液中におけるNMR測定を行い、主鎖及び側鎖のダイナミクスを検討した。



poly(*n*-propyl propiolate)
(PnPP)

<実験>

モノマーは既知の方法で合成し、Rh錯体触媒の存在下、MeOH溶媒中で 40°C 、4時間重合した。NMR測定はBruker DSX-300を用いた。それぞれの試料に対して、 CDCl_3 系では測定温度 $220\text{K}\sim 323\text{K}$ 、 CD_2Cl_2 系では $220\text{K}\sim 300\text{K}$ にわたって ^1H -NMR測定を行った。さらにPnPP/ CDCl_3 については ^{13}C -NMR測定及び $263\text{K}\sim 323\text{K}$ での ^{13}C - T_1 測定も併せて行った。



poly(2-butyl propiolate)
(P2BP)

<結果と考察>

Fig. 1にPnPP/ CDCl_3 の 303K における ^{13}C 、 ^1H -NMRスペクトルを示す。側鎖 ϵ 位の ^1H シグナルのみがダブルットで現れた。このシグナルは温度上昇に伴い分裂幅が狭まり、 323K でシングレットとなった。その他のピークは温度変化に関わらずすべてシングレットであった。一方、 ^{13}C のシグナルは測定温度範囲においてすべてシングレットであった。これらの結果は ϵ 位の二つの ^1H が非等価な磁気的環境にあり、遅い内部回転運動をしていることを示している。この線形変化をjumpモデルで計算し観測スペクトルと比較すると、 $\text{O}_\delta\text{-C}_\epsilon$ 軸 (χ_2) のまわりの内部回転の速さが数十Hzであり、NOESYスペクトルからも確認できた。この非常に遅い側鎖内部回転運動は、主鎖の共鳴構造が側鎖のエステル部位まで及んでいることを示唆している。

key wards : Poly(propiolate)/ line shape / temperature dependence / internal rotation

○こひやま てるみ、ひらおき としふみ、まわたり やすてる、こづか むねひろ、たばた まさひろ

PnPP/CD₂Cl₂の¹H-NMRスペクトルは、CDCl₃と同様に側鎖ε位の¹Hシグナルのみダブルレットであり、その他のシグナルはすべてシングレットであった。220K~300KでH_εはダブルレットのままであった。

Fig.2にP2BP/CD₂Cl₂溶液の296Kと273Kにおける¹H-NMRスペクトルを示す。296Kでは全てのシグナルがシングレットであったが、273KではH_αが分裂幅180Hz、H_εが分裂幅50Hzのダブルレットとなった。他のシグナルはすべてシングレットであった。一方、CDCl₃中ではシグナルは温度によらずすべてシングレットであった。

Fig.3にPnPP/CDCl₃の¹³C-T₁温度依存性を示す。NT₁は、温度上昇に伴い側鎖末端のC_ζとC_ηは直線的に増加する。C_αとC_εはほぼ一定の値である。等方的な運動モデルでは、C_ζとC_ηが相関時間数~数十psで運動しているのに対して、C_α、C_εの相関時間はnsのオーダーであると考えられる。この結果は、側鎖末端の速いC_ζとC_ηの運動に比べて、主鎖C_αから側鎖C_εまでの部位は非常に遅く運動しており、主鎖が剛直な構造であることを示唆している。

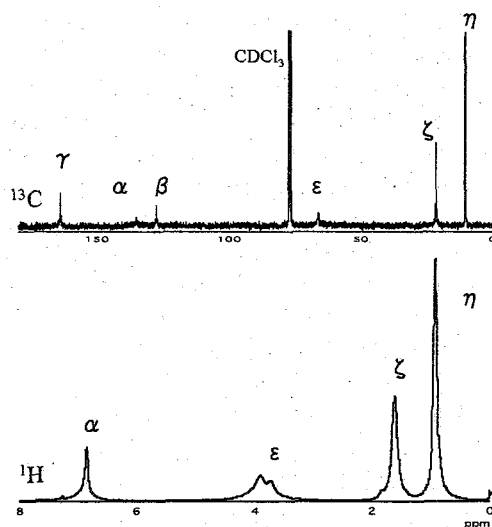


Fig.1: ¹³C and ¹H spectra of PnPP/CDCl₃ at 303K.

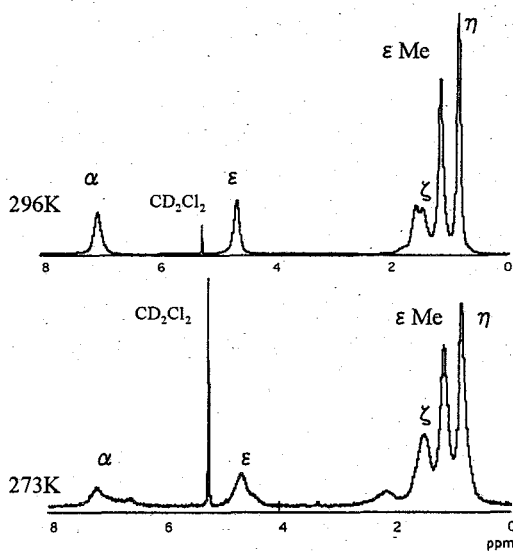


Fig.2: ¹³C and ¹H spectra of P2BP/CD₂Cl₂.

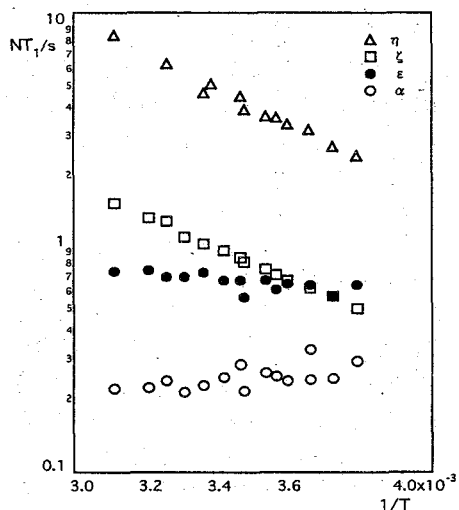


Fig.3: Temperature dependent T₁ of PnPP/CDCl₃.

3D-CT(CONSTANT TIME) HMBC, A IMPROVED TECHNIQUE USEFUL FOR IMPROVING SEPARATION OF CROSS PEAKS IN HMBC SPECTRA

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 order to get good CT-HMBC spectra, one of the experimental parameters, delay time (Δ) must be set to a proper value by considering several parameters such as the magnitude of long-range ^1H - ^{13}C coupling constants and splitting patterns of protons used for detecting ^1H - ^{13}C cross peaks. These parameters, however, are variable depending on the relationships between a given proton and its long-range coupled carbons, and therefore, it is impossible to select an all-purpose delay time which will give satisfactory results with all ^1H - ^{13}C long-range relations.

In order to overcome the problem of the delay time (Δ) of CT-HMBC, we propose the 3D-CT-HMBC, a improved method of the CT-HMBC experiments. The 3D-CT-HMBC enables to cover wide delay time range needed to observe from small to large long range couplings and thus gives better CT-HMBC spectra than obtained by the 2D-CT-HMBC.

HMBC 法の問題点の一つは、プロトン-プロトンの J-coupling を有するシグナルは、 t_1 の展開期においてプロトン-プロトンの J-modulation を受け、 F_1 軸側の炭素シグナルの上にプロトン-プロトンの J-coupling を検出し、線幅を広げてしまうことである。そのため、分離の悪い炭素シグナルが存在するときは、クロスピークの帰属が困難になることがしばしばある。既にこの問題を解決する方法として CT-HMBC 法¹⁾を開発してきた。

この CT-HMBC 法は通常の HMBC 法と同様、HMBC 磁化を展開するのに、予想されるスピン結合に対応したスピン展開時間 (Δ) を設定しなければならない。スピン展開時間 (Δ) の設定値が不適切な場合は、シグナルの強度は減少する。また観測するプロトンが多数のプロトンとスピン結合してブロードなシグナルとなっている場合、あるいは炭素とのスピン結合が小さい場合はクロスピークの観測がしばしば困難となる。この HMBC のスピン展開時間 (Δ) とプロトン-プロトンの J-modulation の問題を同時に解決する方法として、2D-J-分解法と CT-HMBC 法を結合した、3D-CT-HMBC 法を開発し、良好な結果を得ることができたので報告する。

3D-CT-HMBC 法

図 1 に 3D-CT-HMBC 法のパルス系列を示す。このパルス系列は、CT-HMBC のパルス系列の Δ_2 を t_1 、 t_1 を t_2 に置き換えて 3D-CT-HMBC パルス系列としたものである。3D-CT-NMR は、二つの 2D-NMR 法の組み合わせからなる。この場合は、2D- J_{CH} 分解法と 2D-CT-HMBC 法である。CT-HMBC 法では、スピン展開時間 (Δ) が重要な設定パラメーターである。スピン展開時間 (Δ) に適合しないプロトンは観測されない。3D-CT-HMBC 法は、このスピン展開時間 (Δ) を $-t_1/2-180(\text{H,C})-t_1/2-$ として時間展開する方法である。

3D-CT-HMBC スペクトルでは、 F_1/F_2 軸では、炭素化学シフトの J_{CH} -分解スベ

3D-CT-HMBC、CT-HMBC

ふりはたかずお、せとはるお

クトル、 F_1/F_3 軸ではプロトン化学シフトの J_{CH} - 分解スペクトルを得る。そして、 F_2/F_3 軸では CT-HMBC と HMQC の混在したスペクトルを得る。 F_1/F_2 軸 projection データのセンターバンドのスライスから CT-HMBC スペクトルが得られ、サテライトバンドのスライスからは non decoupled mode の HMQC スペクトルが得られる。

2D-CT-HMBC スペクトルでは J_{CH} による HMQC 由来のシグナルは観測しないように、low pass J-filter を用いて消去しているが、low pass J-filter に適合しないシグナルは HMQC シグナルとして観測され、CT-HMBC スペクトルの解析を困難にする。

一方、3D-CT-HMBC スペクトルから得られる CT-HMBC スペクトルは、この問題を解決し、良好なスペクトルを得る。3D-CT-HMBC スペクトルの主たる目的はこのスライスあるいは部分 projection による、CT-HMBC スペクトルを得ることにある。

CT-HMBC 法が優れているのは、通常の HMBC スペクトルでは、炭素軸のシグナル分離能を高めた時に、 J_{HH} -modulation が生じるが、CT-HMBC 法はこの J-modulation を消去することにある。そのため CT-HMBC 法では、 F_2 軸の分離能を高めるために、データポイントを多く取ることが必要である。この点は、3D-CT-HMBC 法でも同様である。

3D-CT-HMBC 法では、分離能の高い CT-HMBC スペクトルを得ようとするれば、 $F_2 \times F_3$ のデータ量が大きくなる。そのため、 F_1 軸のデータ点を多く取ることが出来ない。 F_1 の観測領域はプロトン-炭素 J_{CH} ($\Delta t_1 = 2.5 \sim 5 \text{ msec}$) で展開し、データ点は 16~32 点取得し 3D-CT-HMBC を得る。このデータ points の問題は、3D-NMR 処理ソフトによる制限があるためである。

3D-CT-HMBC スペクトル

図3に portmicin の 3D-CT-HMBC スペクトルから得られた 2D-CT-HMBC、HMQC スペクトルと選択的な J_{CH} - 分解スペクトルを示す。

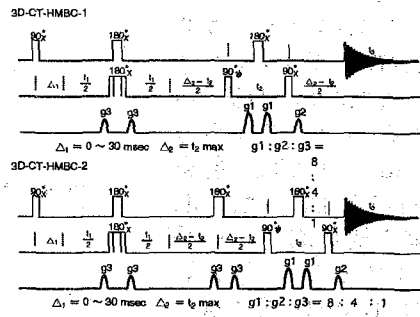


図1. 3D-CT-HMBC-1、-2のパルス系列

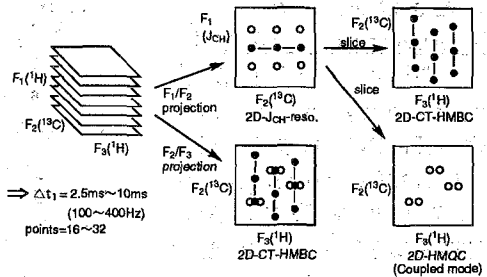


図2. 3D-CT-HMBCスペクトルの模式図

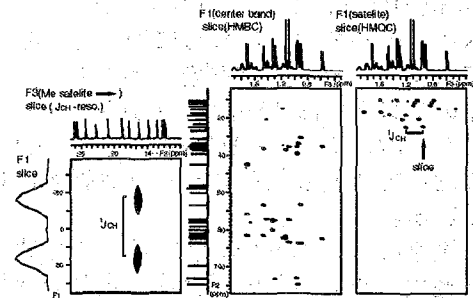
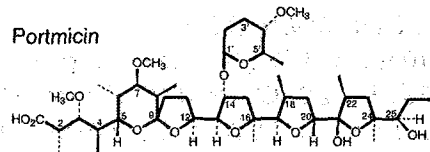


図3. ポートミシン 3D-CT-HMBC-2スペクトル
 $F_1 \times F_2 \times F_3 = 400 \times 14000 \times 2200 \text{ Hz}$
 point = 16 x 512 x 1024scans = 4, 6 hours

F₁ 軸のセンターバンドのスライススペクトルから CT-HMBC スペクトルを得る。また、F₁ 軸の再度バンドのスライスからは、Coupled HMBC を得る。F1-F2 面では、Me 基由来の選択的 J_{CH} 一分解スペクトルを得る。3D-CT-HMBC 法では、一つの実験からこれらのスペクトルを同時に得ることを容易にする

Monazomycin への応用

図 4 に抗生物質 monazomycin の 2D-CT-HMBC および 3D-CT-HMBC projection スペクトルを示す。3D-CT-HMBC (左) の場合は、F₁ x F₂ x F₃=400 x 23000 x 2900 Hz で測定した。測定ポイントは 16 x 512 x 1024 point である。t₁ の初期値とし

て 40msec を設定し、 $\Delta t_1=2.5\text{msec}$ で展開した。scasn 数は 4、測定時間は 12 時間である。2D-CT-HMBC スペクトル (図 5 右) は、3D-CT-HMBC パルス系列の $\Delta t_1=2.5\text{msec}$ に固定して、2D-CT-HMBC として、 Δ を 40msec に設定し同一時間で測定した。サンプルは、30mg を 0.4ml の CD3OD に溶かした。

2D-HMBC スペクトルでは、22 位のプロトン (4.55ppm) からは、23、1'、20 位の炭素についてのみクロスピークが観測されている。これに対して、3D-HMBC スペクトルでは、これらに加え 24 位及び弱いながらも 21 位の炭素シグナルについてのクロスピークが観測されている。また、47 位のプロトン (4.75ppm) および 31 位のプロトン (3.15ppm) からのクロスピークにおいて、2D-HMBC スペクトルにおいて観測されないピークが観測されている。

通常の 2D-HMBC 法では、 Δ の値が最適化されていない場合は、観測できないことがある。シグナル強度を比較するために、22 位のプロトンについてのスライスデータを図 5 に示した。20 位、1'位のシグナルは、3D-CT-HMBC スペクトル (上) では、通常の 2D-CT-HMBC スペクトル (下) よりは強度の強いクロスピークとして観測されていることがわ

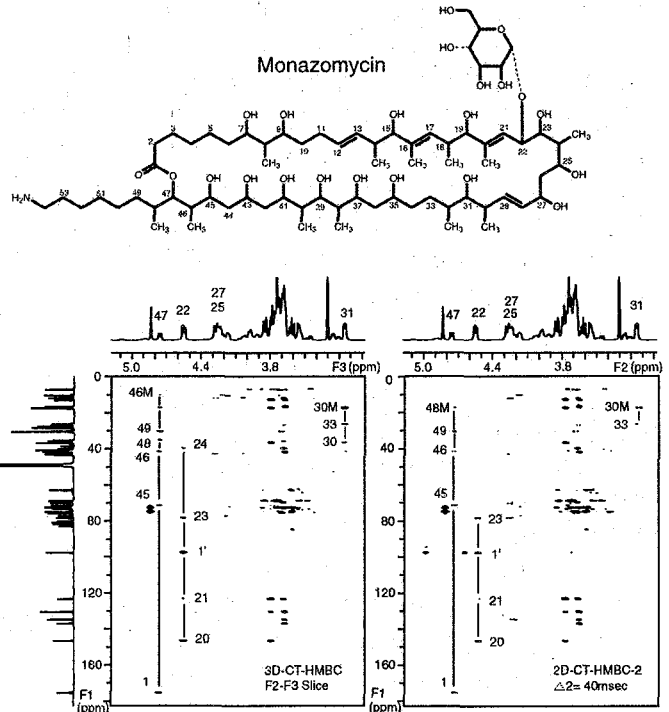


図4. モナゾマイシン、3D-CT-HMBCのスライスF2/F3スペクトルと2D-CT-HMBC-2スペクトル

F₁ x F₂ x F₃ = 400 x 23000 x 2900 Hz
point = 16 x 512 x 1024、scans = 4、12 hours

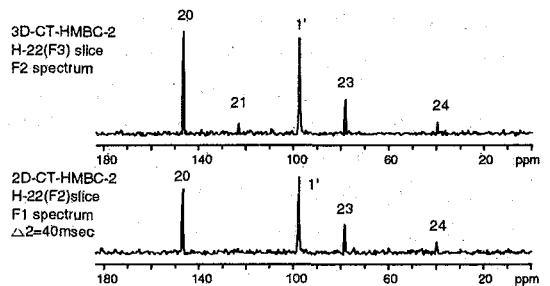


図5. モナゾマイシン、3D-CT-HMBCと2D-CT-HMBCスペクトルのスライススペクトル

かる。2D-CT-HMBC 法では、スピン展開時間(Δ) を一つの値(今回 40msec)に設定するため、この値に適合しないシグナルは観測されない。この Δ の値を種々のスピンの最適値に設定することは困難であるが、3D-CT-HMBC 法ではこのスピン展開時間の設定の問題は存在しない。

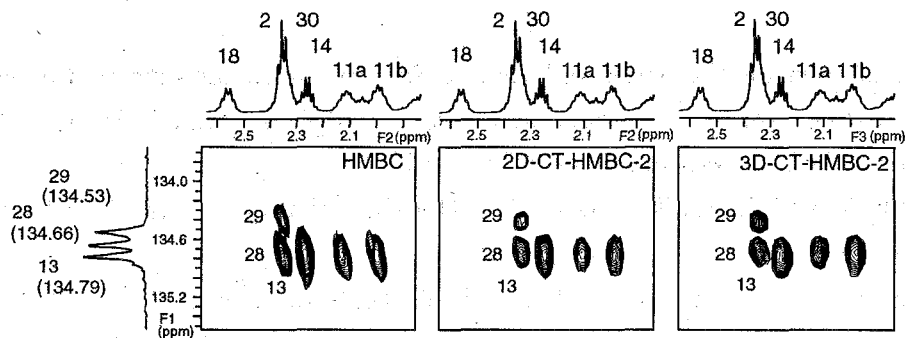


図6. モノゾマイシンの拡大スペクトル
a). HMBC、b).2D-CT-HMBC-2、c).3D-CT-HMBC-2

CT-HMBC スペクトル

3D-CT-HMBC と 2D-CT-HMBC とではスペクトルの S/N に差が見られることがあるが、スペクトルの解析には差はない。図 6 に化学シフトが近接した炭素シグナルの CT-HMBC スペクトルを示す。

C17(130.42ppm)と、C13(130.38ppm)は化学シフトが非常に近接し、シグナルの帰属が困難である。通常の HMBC スペクトルでは、炭素軸の分解能を高めても、プロトン-プロトンの J_{HH} の分裂が大きくなり、線幅を高めることはない。それに対し、CT-HMBC スペクトルでは、 J_{HH} の分裂を取り除き、線幅を狭くし、見かけの分解能を高める事ができる。その結果、C17(130.42ppm)と、C13(130.38ppm)の帰属は容易であった。

まとめ

我々は、CT-HMBC 法におけるスピン展開時間 (Δ) を 3D evolution time(t_1)にした 3D-CT-HMBC 法を開発した。この 3D-CT-HMBC 法には 2D-CT-HMBC 法にはない三つの特徴がある。

- 1). 新手法によりスピン展開時間 (Δ) に依存しない HMBC スペクトルを得る。
- 2). HMBC スペクトルと HMQC スペクトルをはっきり分離することができる。
- 3). JCH 分解スペクトルも同時に得ることができる。

3D-CT-HMBC スペクトルを測定するには、長時間測定が予想されるが、2D-CT-HMBC スペクトルを測定する時間と同等の時間で、3D-CT-HMBC スペクトルを測定することは可能である。従って、測定時間はさほど問題にはならない。また、3D-HMBC 法では 2D-HMBC 法に比較して、当然データ量が増大するが、これに伴う問題は無視し得ると考えられる。

実験に際しては、時間の制約があるため、 F_2 軸のポイント数を多くすることを優先し(実用的には 512)、scan 数はゴーストを消すために 2 回以上にすることが望ましい。またデータ処理に関しては、特に F_1 軸、 F_2 軸、 F_3 軸の window 関数の最適化を図ることが重要である。

1) K. Furihata, and H. Seto, Tetrahedron Lett., 39, 7337, (1998).

1P073★ ペプチド結合を有する分子の溶液中での動的挙動と溶媒効果

(¹産総研・生物情報センター、²東理大院・基礎工、³産総研・生物機能工学部門、⁴原研・中性子利用センター)

○堤遊^{1,2}、中村和彦³、中西洋志^{1,2}、千葉かおり^{1,4}

Studies of molecular behavior and solvent effect on molecules with peptide bonds

(¹AIST・BIRC, ²Tokyo University of Science, ³AIST・Biological Resources and Functions, ⁴JAERI・Neutron Science Research)

○Yu Tsutsumi^{1,2}, Kazuhiko Nakamura³, Hiroshi Nakanishi^{1,2}, Kaori Chiba^{1,4}

Peptide bonds, which construct the back bone of a protein molecule, are considered to be fairly stable. However, that structure could easily be changed when the environment surrounding it changes. Recently, we have found through an analysis of a crystal structure of a human lysozyme that some peptide bonds within a protein do not take a planar conformation. In order to see what happens when this kind of local environmental changes occur, we chose two compounds of a lactam family(enantholactam, caprylolactam) and their HCl salts as models. We would like to report some interesting results obtained from these experiments.

【序論】

タンパク質の構造解析においてペプチド結合まわりの構造は安定な平面構造をとるものとして捉えられていることが多いが、実際には周辺の環境によりその構造は大きく変わりうる。最近我々はヒトリゾチームの結晶構造の詳細な解析により、一部の残基についてペプチド結合まわりの構造に大きな歪みがあることを発見した。このような局所的な環境の違いによりペプチド結合周辺の構造や動的挙動がどのように変化するかを調べるために、モデル化合物として2種のラクタム類(enantholactam, caprylolactam)及びそれらの塩酸塩を用いて実験を行った。

【実験】

エナントラクタム、カプリロラクタムをそれぞれ水、アセトン、クロロホルム中に溶かしてNMR用のサンプルとした。濃度は298Kでの測定用のサンプルでは1M、より低温の実験用のサンプルでは100mMとした。アセトン中のサンプルについては

キーワード：ラクタム、ペプチド結合、シス・トランス異性体、塩酸塩、溶媒効果

著者ふりがな：つつみゆう、なかむらかずひこ、なかにしひろし、ちばかおり

218~298K の範囲で温度を変化させ測定を行った。また H₂O 中のサンプルについては pH を 0.50~3.5 の範囲で変え、測定を行った。

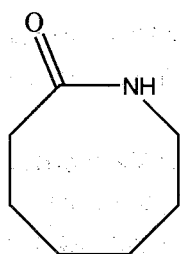
測定は JEOL 社 ECP-500 (¹H=499.2 MHz、¹³C=125.5 MHz) および JEOL 社 ECA-800(¹H=800.0 MHz、¹³C=201.2 MHz、¹⁵N=81.07 MHz)を用いて行った。

エナントラクタムおよびカプリロラクタムの塩酸塩はラクタムを溶かしたジエチルエーテル中に塩酸ガスを吹き込むことによって得た。

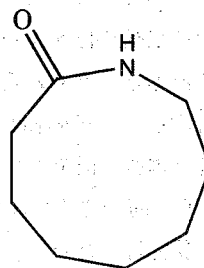
【結果】

エナントラクタム、カプリロラクタムの両化合物を様々な溶媒中で ¹H NMR スペクトル測定したところ、エナントラクタムはどの溶媒中でも 1つの構造しかとらないのに対しカプリロラクタムではシス、トランスの2つの構造が存在することが分かり、また、そのスペクトル上で大幅なブロードニングが確認された。温度変化を行いそのブロードニングの原因を追究したところ、カプリロラクタムのトランス体では一部のメチレンが動きを大幅に制限されていることが分かった。さらにブロードニングの程度の違いからその束縛の程度が溶媒により異なることが示唆された。

また塩酸塩のスペクトル及び pH 変化の実験から極端に酸性度の高い条件ではペプチド結合まわりの構造に変化が現れることが確認された。



Enantholactam



Caprylolactam

Fig1. エナントラクタムおよびカプリロラクタムの構造

(電気通信大院) ○松野 めぐみ、初田 美砂紀、仁木 國雄

Intermolecular Interactions Between Branched-Chain Alkanes and Aromatic Rings

○Megumi Matsuno, Misaki Hatsuda and Kunio Nikki

University of Electro-Communications

^1H and ^{13}C NMR for branched-chain alkanes and n-alkanes (carbon numbers of main chains are 5, 7 and 9) were examined in toluene- d_6 in the temperature range of $-50\text{ }^\circ\text{C}$ to $40\text{ }^\circ\text{C}$. High field shifts which induced by toluene- d_6 of branched-chain alkanes were entirely larger than those of n-alkanes. It means that intermolecular interactions of aromatic rings with branched-chain alkanes are stronger than with n-alkanes.

[緒言]

分子間あるいは分子内の弱い相互作用は、タンパク質の立体配座や酵素反応などの分子認識において重要な役割を果たすと言われている。

分子認識を意識したモデル化合物である、芳香環とアルキル基を持つ一対のチオール酸化反応では、炭素数4以上のアルキル基において生成比が直鎖状よりも分枝状の方が大きくなることが報告されており、この結果は直鎖状のものより分枝状のアルキル基の方が芳香環との引力的な相互作用が強いことを示唆している⁽¹⁾。またアミノ酸の鎖状アミノ残基も分枝状のものしか存在しないことから、分枝状構造はタンパク質の3次構造の構造保持や、酵素反応などの分子識別の点から見ても有利であると考えられる。このような興味深い事実から今回分枝アルカンと直鎖アルカンについて芳香環との分子間相互作用を検討した。

芳香環が外部磁場と垂直に配向した場合、環の平面方向では反磁性遮蔽により NMR シグナルが高磁場シフトし、その面の側面では常磁性遮蔽により低磁場シフトする⁽²⁾。これは芳香環の平面構造という形状に異方性があるため、芳香環が球状だった場合、芳香環の周りの分子は均等に磁気異方性を受け、溶媒シフトは観測されない。

芳香族溶媒中に溶質分子が存在したときに、溶媒と溶質の間で異方性のある引力が働き、芳香環の平面方向が溶質分子に近づきやすくなると、大きな高磁場シフトが得られ、分子間の相互作用が強いと言える。また同じ溶質分子内で相互作用に差があれば、溶媒シフトも分子内の位置によって異なる。これらの現象を利用し、分枝アルカンと芳香環との分子間相互作用について n-アルカンとの違いを比較した。またメチル基の位置が異なる種々の分枝アルカンについても芳香環との相互作用がどのように変わるのか検討した。

Keywords : 芳香族溶媒、分枝状アルカン、分子間相互作用、磁気異方性効果

まつの めぐみ、はつだ みさき、につき くにお

【実験】

主鎖の炭素数 5、7、9 の直鎖アルカンとそれらにメチル基が 1 つ付いた種々の分枝状アルカンについて、toluene- d_8 (芳香環 1 個) を溶媒として ^1H および ^{13}C -NMR 測定をした。アルカンの濃度は toluene- d_8 に対し 2~3 mol%、温度は 40 °C ~ -50 °C とした。装置は Varian UNITYplus 500MHz を使用した。

【結果】

1. ^1H -NMR

Fig.1 は toluene- d_8 中の 2-methylheptane の ^1H -NMR スペクトルである。メチル基 α' を基準とすると、低温になるに従って、 α' に対してメチレン基が高磁場シフトした。特に γ, γ', δ のプロトンは高磁場シフトが著しかった。また β' と γ', δ のスペクトルは温度が下がるにつれて分裂した。

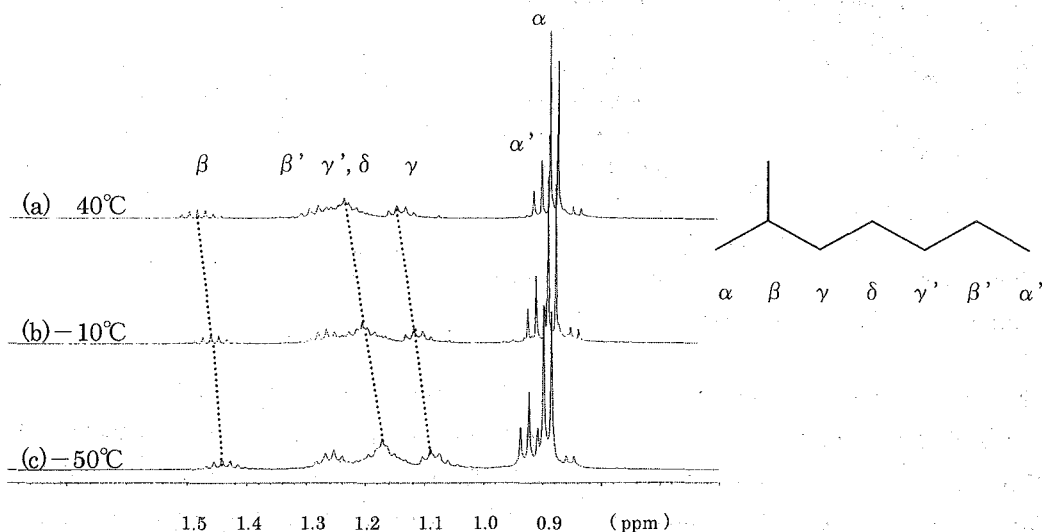


Fig.1 ^1H NMR spectra of 2-methylheptane in toluene- d_8 at 40 °C (a), -10 °C (b) and -50 °C (c).

2. ^{13}C -NMR

NMR の化学シフト (δ 値) は通常 TMS を基準にして表示するが、TMS も芳香環の磁気異方性効果を受けている。そこで直鎖側の末端の CH_3 基 (α') を内部基準とする相対的な化学シフトを示し、同じ分子内の各々の炭素における α' からの溶媒シフト差を検討した。

$$\Delta \delta (\text{observe}) = \delta (\text{observe}) - \delta (\alpha')$$

さらに 40 °C のスペクトルを基準にとり、そこからどの程度高磁場シフトしたかを以下のグラフに表した。

$$\Delta \Delta \delta (\text{observe}) = \Delta \delta (\text{observe}) - \Delta \delta (40 \text{ }^\circ\text{C})$$

このように分子の熱運動の擾乱のため弱い相互作用の寄与が小さいと推測される、40 °C を基準に

することで、それよりも低い温度で観測されたスペクトルの溶媒シフトをより顕著にグラフ化することができる。

(1) heptane と 2-methylheptane の比較 (直鎖アルカンと分枝アルカンの比較)

Fig.2は直鎖アルカンのheptane(点線)と分枝アルカンの2-methylheptane(実線)のtoluene- d_8 溶媒における ^{13}C -NMR スペクトルの温度依存性を示したものである。グラフが負の値になるほど直鎖側末端のメチル基 (α') よりも高磁場シフトしている。全体的には分枝アルカン(実線)の方が直鎖アルカン(点線)よりも高磁場シフトの割合が大きかった。また直鎖、分枝アルカンともにメチル基から数えて3番目の炭素 (γ : グラフ中 \blacktriangle) が最も高磁場シフトしていたが、その隣の炭素 (δ : グラフ中 \times) は低磁場側へシフトしていた。

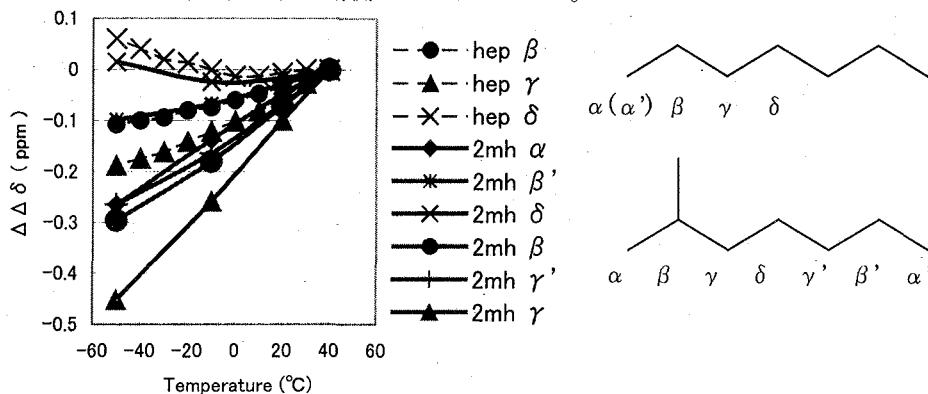


Fig.2 Temperature dependence of the $\Delta\Delta\delta$ values for heptane(dotted lines) and 2-methylheptane(solid lines) in toluene- d_8 .

(2) 2-methylheptane と 4-methylheptane の比較 (分枝アルカンどうしの比較)

Fig.3は2-methylheptane(太線)と4-methylheptane(細線)のtoluene- d_8 溶媒における ^{13}C -NMR スペクトルの温度依存性を示したものである。どちらも分枝側のメチル基から3番目の炭素 (γ : グラフ中 \blacktriangle) が最も高磁場シフトし、特に2-methylheptaneは分枝側のメチル基周辺の炭素で高磁場シフトが著しかった。

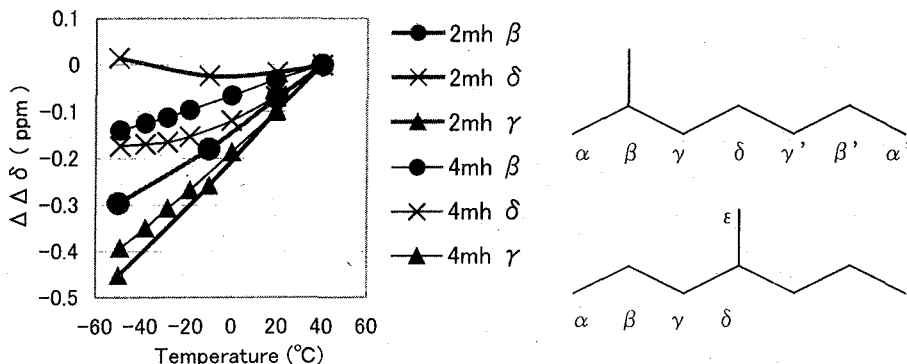


Fig.3 Temperature dependence of the $\Delta\Delta\delta$ values for 2-methylheptane(thick lines) and 4-methylheptane(thin lines) in toluene- d_8 .

[考察]

分子の熱運動による擾乱を少なくするために温度を下げて測定したことで、 ^1H 、 ^{13}C -NMR とともに低温では溶媒シフトが大きくなり、弱い相互作用をさらに拡大して観測することができた。

Fig.2 の結果から heptane よりも 2-methylheptane の方が高磁場シフトの割合が大きかった。特にメチル基から3番目に位置する炭素 (γ) が最も高磁場シフトしており、この現象はメチル基の周辺にある γ に芳香環の平面方向が近づきやすくなっていることが考えられる。したがってメチル基が付くことで分枝アルカンの方が芳香環との引力的相互作用がより強く働いたことが示唆される。一方、低温において γ の隣の炭素 (δ) は高磁場シフトの割合が小さいかあるいは低磁場シフトしていた。これは高磁場シフトをもたらす芳香環の平面が γ に配向した時に、低磁場シフトをもたらす芳香環側面に δ が位置するためであると推測される。

Fig.3 の結果から 4-methylheptane よりも 2-methylheptane の方が全体的に高磁場シフトの割合が大きかった。稲倉ら (2001) は、 n -アルカンは鎖の折りたたみにより鎖が長くなるほどアルカンの中央部には芳香環が近づきにくいという報告をしている⁽³⁾。それにもかかわらず、4-methylheptane はメチル基が付くことで、直鎖の場合では芳香環が近づきにくい鎖の中央部で、わずかながら高磁場シフトが見られた。すなわちメチル基が付くことで n -アルカンよりも鎖の中央側に芳香環の平面が近づきやすくなったことが言える。また 2-methylheptane は芳香環の平面が配向しやすい鎖状末端にさらにメチル基が付いたため、4-methylheptane と比べて高磁場シフトがより大きくなったと考えられる。

以上の結果から、芳香族溶媒中における直鎖アルカンと分枝アルカンとの相互作用の違いを NMR を用いて観測することができた。メチル基が付くことで鎖状アルカンは芳香環との引力的相互作用がより強くなることが推測できる。

参考文献

- (1) T. Endo et al., *Nature*, 268, 74 (1997)
- (2) R. J. Abraham, P. Loftus (竹内敬人 訳), ^1H および ^{13}C NMR 概説, 化学同人(1979)
- (3) Kunio Nikki, Hideki Inakura, Wu-Le, Noboru Suzuki and Tadashi Endo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2370-2373 (2001)

3P075 固体高分解能 ^1H , ^{13}C NMR を用いたコハクの分子レベルでの構造解析

(筑波大院数物¹・群馬大工²・東工大³)

○ 木村英昭¹、塚田好美¹、三田肇¹、山本泰彦¹、荘司顯²、中條利一郎³

Structural Characterization of Amber by High-Resolution Solid-State ^1H & ^{13}C NMR

H. KIMURA¹, Y. TSUKADA¹, H. MITA¹, Y. YAMAMOTO¹, A. SHOJI², R. CHÛJÔ³

(¹Graduate School of Pure and Applied Sci., Univ. of Tsukuba, ²Dept. of Biological Sci., Gunma Univ., ³Beijing Office, Tokyo Inst. of Tech.)

High-resolution solid-state ^1H and ^{13}C NMR spectra of ambers with various deposits such as Balt, Dominica and Kuji-Japan, Madagascar copal, dammar, rosin and sap of *Agathis australis* tree have been measured in order to reveal the mechanism of the maturity of amber. It was found that the signals at around 108 and 148 ppm assigned to the exocyclic methylene functional group of labdanoid diterpene were the fingerprint of the resin that could turn to strongly hardened amber. This finding argued against the widespread prejudice that the sap of modern pinaceous trees can turn to strongly hardened amber such as Baltic, Dominican and Japanese ambers.

序論

コハクは、主に針葉樹やマメ科の木の樹液が化石化したもので、主成分はテルペンである¹。コハクは、その素朴な美しさと手触りの良さから主に装飾品として利用されているが、工業材料としてのポテンシャルも非常に高い(軽量、電気絶縁、耐溶媒、高密封、加工が容易)。人工コハクを製造するために、また、天然に産出するコハクをより有効に利用するには、コハクの分子レベルでの構造解析、特に、熟成、劣化のメカニズムの解明が必須である。コハクは不溶・非晶性の固体なので、その構造解析には固体 NMR が最も有効である。

本研究では、産地・年代の異なるさまざまなコハクやコーパル(十分に化石化していない年代が 4 万年以下の樹脂)、それを作り出したとされる木の樹液、コハク以外の樹脂の固体高分解能 NMR スペクトルをそれらの主成分であるテルペンと関連付けながら解析し、コハクの熟成のメカニズムについて議論する。

実験

Agathis australis (ナンヨウスギ科) の樹液は筑波実験植物園から入手した。マダガスカル産コーパルは、いわき市石炭化石館で購入し、ドミカ産コハクは Fossil Depot から購入した。バルト産コハクはポーランド、久慈産コハクは岩手県久慈市川代でのフィールド・ワークで得られた。

^{13}C CP-MAS NMR 測定は Bruker Avance DRX-600 分光計で行った。 $\pi/2$ パルス幅は 6 μs , CP (VACP) 接触時間は 2 ms, MAS 回転速度は 9 kHz で行った。待ち時間 4 s で、2200-3000 回の積算を行った。 ^1H - ^{13}C HETCOR, ^1H CRAMPS NMR 測定は Bruker Avance DSX-300 分光計で行った²。 ^{13}C 化学シフトはアダマンタン ($\delta = 29.5$ ppm)、 ^1H 化学シフトはシリコン・ゴム ($\delta = 0.12$ ppm) をそれぞれ外部基準とした。

Keyword: コハク、テルペン、固体高分解能 NMR、 ^1H CRAMPS、INADEQUATE

きむらひであき、つかだよしみ、みたはじめ、やまもとやすひこ、しょうじあきら、ちゅうじょうりいちろう

結果と考察

Fig. 1 にマダガスカル産 (a), ドミニカ産 (b), バルト産 (c), 久慈産 (d) のコハクの 150.9 MHz ^{13}C CP-MAS NMR スペクトル及びそれぞれの年代、由来する植物、コハクの主成分と考えられている *communic acid* の化学構造を示す。スペクトルは(a)から(d)に年代順に並べた。コハクの ^{13}C NMR スペクトルは、大きく3つの領域、すなわち、170 ppm より低磁場側のエステル・カルボキシ・ケトン領域、105-155 ppm のオレフィン領域、10-90 ppm の脂肪族領域に分かれる。産地の違いはスペクトルに反映され、特に、約 108, 148 ppm の exocyclic methylene 基に帰属されるピークの強度は、年代の増加と共に減少していくのが観測される。従って、この exocyclic methylene 基がコハクの架橋形成に関与していると考えられる。

Fig. 2 に *Agathis australis* の樹液 (a), ドミニカ産コハク (b), ダンマール (c), ロジン (d) の 150.9 MHz ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルを示す。ナンヨウスギの樹液の ^{13}C NMR スペクトルには、ドミニカ産コハクのスペクトル同様、約 108, 148 ppm に大きなピークが観測される。ドミニカ産コハクを生産した *Hymenaea* (マメ科) と *Agathis australis* (ナンヨウスギ科) は、植物学的に近種ではないが、その樹液の成分に exocyclic methylene 基をもつという、コハクの高分子化に重要な官能基を含むことで共通している。一方、*Dipterocarpaceae* (フタバガキ科) 由来であるダンマールと *Pinaceae* (マツ科) 由来であるロジンは、共にワニスに使用される脆い樹脂であるが、そのスペクトルには、108, 148 ppm 付近にピークは観測されていない。これは、フタバガキやマツの樹液が強固なコハクになり得ないことを示している。従って、「コハクはマツの樹液が数百万年かけて固まったもの」という説は誤解であり、約 108, 148 ppm の2つの ^{13}C ピークは、強固なコハクを作りうる樹液・樹脂の指紋であると考えられる。

謝辞

ナンヨウスギの樹液の採取で御助言いただきました国立科学博物館筑波実験植物園の遊川 和久 博士に感謝します。バルト産、久慈産コハクは、それぞれ、アイオワ州立大学の Beata Pruski 女史、久慈琥珀博物館の佐々木 和久 館長に提供していただいた。

参考文献

- 1) Grimaldi, D. A. *Amber: Window to the Past*; Harry N. Abrams Inc.: 1996.
- 2) Kimura, H.; Kishi, S.; Shoji, A.; Sugisawa, H.; Deguchi, K. *Macromolecules* **2000**, *33*, 9682-9687.

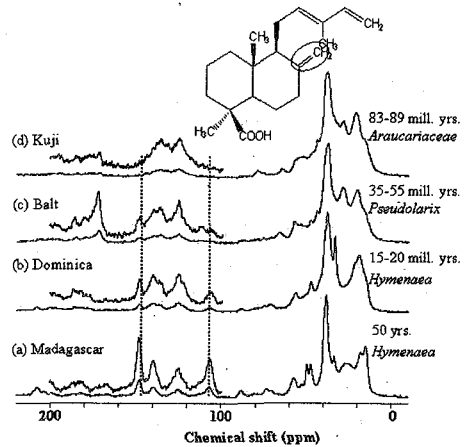


Fig.1 150.9 MHz ^{13}C CP-MAS NMR spectra of Madagascar copal (a), Dominican amber (b), Baltic amber (c) and Kuji amber (d) with each chronology and botanical origin.

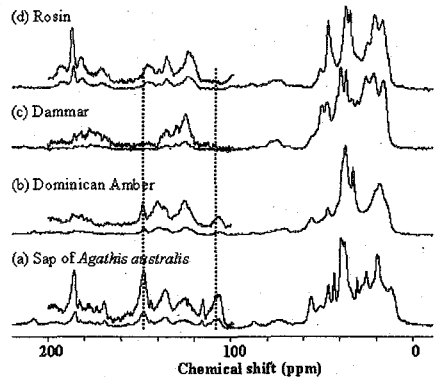


Fig. 2 150.9 MHz ^{13}C CP-MAS NMR spectra of sap of *Agathis australis* (a), Dominican amber (b), dammar (c) and rosin (d).

濃度依存性—NMF, NMA, NMP の場合—

(福井大工) ○水野和子, 齋藤隆通

Concentration dependence of chemical shifts and $^1J(\text{C-H})$ values for amides and water in binary aqueous mixtures : NMF, NMA, and NMP

Kazuko Mizuno and Takamichi Saito, Faculty of Engineering, University of Fukui, Fukui 910-8507, Japan

Abstract: We have been carrying out determination of chemical shifts for some series of sample solutions at different concentrations and temperatures using external double reference methods.¹ By the method, a reference solution is sealed in a capillary tube with a bulb in the bottom and the tube is set in the center of the sample tube. Since the difference in the volume magnetic susceptibilities of a sample and the reference solutions are measured in situ and the apparent chemical shifts observed are corrected explicitly in terms of the bulk susceptibilities, chemical shifts thus corrected can be measured on a unified scale. We discuss the formation of hydration cluster in aqueous NMA mixtures in the water rich region, where anomalously high polarization of water molecules was confirmed judging from the higher chemical shifts of water protons than that of pure water.

目的 : N-methylformamide(NMF), N-methylacetamide(NMA), N-methylpropionamide(NMP)はペプチド結合を1組ふくんでいるので, タンパク質の構造についての基本的な情報を得るための分子として, さまざまの実験に用いられてきている. 私達もこれまでに, これらのアミド化合物の水溶液または重水溶液のNMRケミカルシフトの濃度依存性, 赤外およびラマンスペクトルの濃度による変化, さらには, 液体断片化質量分析法によって得られる水和クラスターの形成しやすさの濃度依存性を3種のアミド化合物について比較してきた. これらの実験結果で注目したいことは, 次の3点である.

1) 3種のアミド化合物はいずれもペプチド基同士の $\text{C=O}\cdots\text{H-N}$ 水素結合によって自己会合していることが知られているが, $\text{C=O}\cdots\text{H-C}$ で示される相互作用は詳しく調べられていない. アミド化合物の水溶液中で, アミド間とアミド-水分子間でこれを見いだす可能性がある. とくに NMF については, $\text{C=O}\cdots\text{H-C}$ によってダイマーを形成するアルデヒドと同じ分子構造をふくんでいるので, 可能性が高い.

アミド化合物, ケミカルシフト, 外部複基準法, $\text{C-H}\cdots\text{O}$ 相互作用, 水和クラスター

みずの かずこ, さいとう たかみち

2) それぞれのアミド化合物, 中でも NMA 水溶液中の水プロトンのケミカルシフトは, 水のモル分率が高い領域で純水よりも大きな値を示した. これを Fig.1 に示す. この異常な水の分極が起きる領域は, 液体断片化質量分析法によって水和クラスターが形成しやすい領域で, これよりも水の濃度が低い領域では, アミド分子間が会合しているクラスターができやすい. これらの実験結果より, 水分子が異常に強く分極する領域で, 安定な水と水和クラスターが形成されていることが予想できる.

3) C-H \cdots O 相互作用では C-H 伸縮振動バンドが高波数側にシフトして, 吸収強度が減少する実験結果が数多く報告され, *ab initio* 法による計算もこれをサポートする. 私達はこれまで, アセトン, ジメチルスルホオキシド, 1,4-ジオキサソ²など, 水素結合による自己会合をしないが親水性基を含む有機化合物中のアルキル部分の水和メカニズムを調べてきた. その結果, いずれの場合にも, O \cdots H-O(H) \cdots H-C で表される, 水分子による bi-functional H-bond がアルキル基の水和に関与していることを示してきた.² しかしながら, 本研究で取り上げたアミド化合物では, 水による希釈で生じる C-H 伸縮振動バンドのブルーシフトはかなり小さく, しかも水のモル分率の高い領域ではほとんど変化しない. 上の 1) との関連からの議論が期待できる.

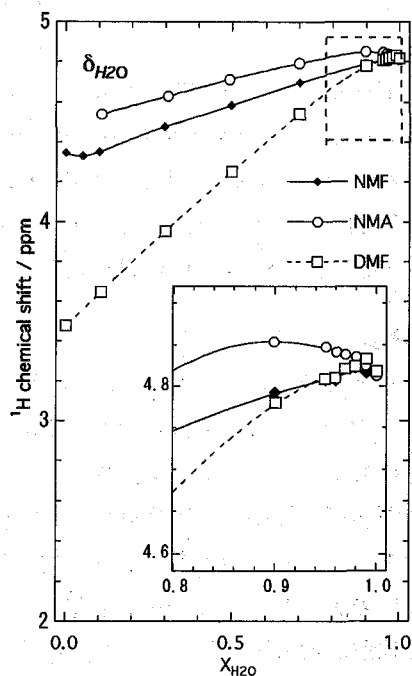


Fig.1 Concentration dependence of the chemical shifts of the water protons in aqueous binary mixtures of three amides at 25.0°C.

以上のことから本研究では, a) アミド化合物の四塩化炭素溶液について, ケミカルシフトの濃度依存性を測定して, 水溶液と比較する. b) C-H \cdots O 相互作用についての情報が得られる $^1J(C-H)$ を測定する. c) アミドと水分子の数を変化させて, *ab initio* MO 法による計算からケミカルシフトと振動の波数のシミュレーション値を得て, アミドの水和について議論する.

References

1. K. Mizuno, Y. Tamiya, and M. Mekata, *Pure Appl. Chem.*, **2004**, *76*, 105-114,
2. K. Mizuno, S. Imafuji, T. Fujiwara, T. Ohta, and Y. Tamiya, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 3972-3978.

2P077 磁場勾配 NMR による粘土ゲル中での金属イオンの拡散係数の測定

東京工業大学原子炉工学研究所 ○大窪 貴洋、池田泰久

Measurement of self diffusion coefficients of metal ions in the clay gel by pulse field gradient NMR method.

Research Laboratory for Nuclear Reactors, Tokyo Institute of Technology

Takahiro Ohkubo, Yasuhisa Ikeda

The diffusion coefficient of the metal ions in clay gel (water rich) were measured by the pulse field gradient NMR method. From these experiments, it was found that the self diffusion coefficient of ^{23}Na nuclei by NMR method decreased as compared with water molecules in clay gel. The obtained results suggested that metal ions in clay gel were attracted by clay surface becoming with negatively charged.

[諸言]

水と接触した粘土(モンモリロナイト)は、層間に水を取り込むことで膨潤しゲル化する。ゲル中での水の拡散は、極めて制限されるためにバルク水と比較して非常に小さい自己拡散係数を示す。このような特性から、モンモリロナイトは、放射性廃棄物の地層処分において、核種移行を抑制する緩衝材料として利用されることが予定されている。この緩衝特性は、モンモリロナイトの層間カチオン種(初期状態は Na^+ イオン)に依存するため、処分場の安全評価の際に Na^+ イオンの拡散過程を把握する必要がある。従来、粘土ゲル中での金属イオンの拡散係数の測定は、放射性同位体を用いた拡散実験により用いられてきた。しかしこの手法は、長い測定時間を必要とする上に試料をスライスする破壊法であるために破壊後の変化を計測することができない。そこで本研究は、簡便かつ短時間で測定可能な磁場勾配 NMR 法による手法に着目し、粘土ゲル中での金属イオン(^{23}Na)の自己拡散係数の測定を試みた。

[実験]

装置は、300MHz(7.04T)の超電導マグネットに tecmag 社製の RF 送受信機を用いて行った。RF アンプとして 1kW(30-100MHz)、勾配磁場発生用のアンプとして 20A アンプを 5 つ直列に接続して用いている。プローブヘッドは、静磁場方向と平行な方向に勾配磁場発生用の Maxwell コイルと RF 送受信用のソレノイド型コイルを配置した自作のプローブを用いた。拡散測定は、Fig. に示すパルス系列(Stimulated-Echo 法)を用いた。測定条件として勾配磁場強度を 600G/cm まで変化させ室温にて測定を行った。試料として日本粘土協会が配布している Na 型モンモリロナイトにイオン交換水を加え粘土ゲルを調整した。勾配磁場

おおくぼ たかひろ、いけだ やすひさ

Keywords; PFG-NMR, Clay gel

強度の調整は、0.1M NaCl 水溶液中での Na⁺ の自己拡散係数より補正した。自己拡散係数は、次式により決定した。

$$\frac{I_0}{I} = \exp(-bD) \quad (1)$$

ここで $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ 、 I_0 は、 $g = 0$ の信号強度である。

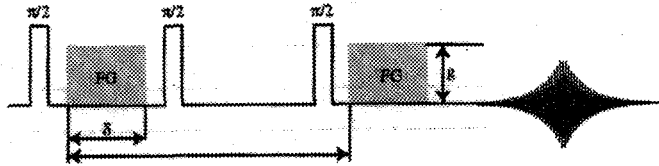


Figure 1 Pulse sequence for pulse field gradient stimulated echo

[結果および考察]

含水率 98wt.% 粘土ゲルでの ²³Na の測定結果を Fig. に示す。拡散プロットは、直線として解析できて、その勾配から D を計算した。結果として得られた ²³Na の自己拡散係数は、 $1.4 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ で水分子の自己拡散係数 [1] と比較して $0.5 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ 程度小さい値を示した。今回測定した高い含水率の粘土ゲルにおいて、Na⁺ は、粘土粒子表面に束縛されていない拡散層に存在 [2] している。このような状態で Na⁺ は、粘土粒子近傍の“結合水”ではなくゲル中に分散した水分子と水和し存在していると考えられるが、マイナスにチャージした粘土粒子表面との相互作用により水分子と比較して小さい拡散係数を示していると考えられる。

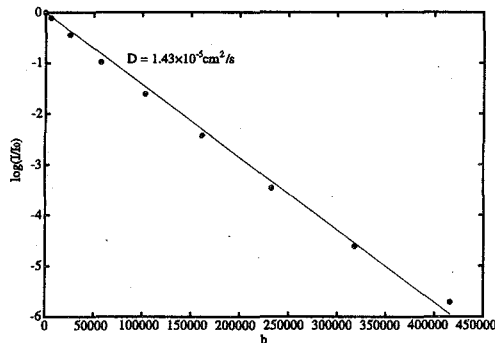


Figure 2 The diffusion plots for clay gel, ²³Na measured at room temperature.

参考文献

- [1] Y. Nakashima *America. Mineral.*, **85**, 132-138, (2000)
- [2] T. Ohkubo, K. Kanehashi, K. Saito and Y. Ikeda, *Sci. Tech. Adva. Mater.*, in press.

抗菌活性錯体を包摂したシリケートゲルのNMR法による構造解析

(神奈川大工)○高山俊夫、篠原和也、小池芳雄

The structural analysis of antibacterial activity- vanadium complexes into silicated gel using solid state ^{51}V -NMR

(Department of Chemistry, Kanagawa University) ○T. Takayama, K. Shinohara and Y. Koike

Since the discovery of vanadium-containing enzymes two decades ago, there has been a growing interest in coordination chemistry of vanadium. In this work, a series of 4 oxovanadium(V) complexes ($[\text{VOL}(\text{hq})]$: 1(gly), 2(val), 3(glyphe), 4(leu)) mimicking the active site of vanadium haloperoxidases have been investigated by ^{51}V magic angle spinning NMR spectroscopy. The MAS spectra are dominated by the anisotropic quadrupolar and chemical shielding interactions. ^{51}V is a half-integer quadrupolar nucleus ($I=7/2$) with high natural abundance (99.76%) and relatively high gyromagnetic ratio. The small quadrupolar moment allows direct observation of vanadium, and due to the favorable magnetic properties, small quantities of vanadium can be readily detected. The ^{51}V -NMR chemical shielding interaction was gly ($\delta = -440.9, -466.7$), val ($-452.3, -465.0$), leu (-444.0) and glyphe (-442.3) from VOCl_3 ($\delta = 0.0$). In addition, we also report for these oxovanadium(V) complexes which intercalated into the silicated gel.

1. はじめに

バナジウム錯体は生物学的、医薬的応用として実験糖尿病動物の血糖値を正常化させることが明らかにされている。さらに、V-N, V-O結合したバナジウム錯体は最近数多く合成されていて、抗癌作用をもっているものも見出されてきている。本研究ではまず、バナジウム・ハロパーオキシダーゼの活性部位を想定したオキソバナジウム(V)錯体, $[\text{VOL}(\text{hq})]$: L=salgly, salval, salglyphe, salleu; hq=8-ヒドロキシキノリン、の合成とその構造を ^{51}V -NMR法にて明らかにし、その錯体の構造と医薬的応用・抗微生物活性との相関を解明することを試みた。さらに、オキソバナジウム(V)錯体の安定性を持続させるためにシリケートゲルに包摂した化合物を合成し、その錯体の応用についても検討する。

2. 実験

オキソバナジウム(V)錯体, $[\text{VOL}(\text{hq})]$ (1)-(4)は8-ヒドロキシキノリン(Hhq)の存在下、配位子 LH_2 と $[\text{VO}(\text{acac})_2]$ との反応で得た。 LH_2 は4-ヒドロキシサリシルアルデヒド(sal)とグリシン(1:gly), バリン(2:val), グリシルフェニルアラニン(3:glyphe), ロイシン(4:leu)と反応させて得た。ここで、三座配位子 ONO は 1:H₂salgly, 2:H₂salval, 3:H₂salglyphe(四座), 4:H₂salleuである。オキソバナジウム(V)錯体包摂シリケートゲルはシリケートをゾルーゲル法にて調製し、その中にオキソバナジウム(V)錯体をイソントカレートさせて得た。本錯体は溶液中(DMF, DMSO)では不安定なので固体 ^{51}V -NMRを測定した。

固体 ^{51}V /MAS-NMR測定はJEOL-ECA270WB(MAS=6kHz)を用いて行った。 ^{51}V 核は核スピン $I=7/2$ 、天然存在比 99.76%、相対感度 0.383(^1H 基準)、観測周波数 71.0259MHzである。化学シフト基準は VOCl_3 である。

3. 結果及び考察

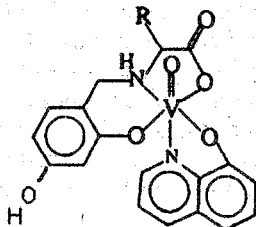
オキソバナジウム(V)錯体, $[\text{VOL}(\text{hq})]$ の構造図をScheme 1に示す。合成したオキソバナジウム(V)錯体のうち、置換基 gly, leuについての固体 ^{51}V -NMRスペクトルをそれぞれFig. 1, Fig. 2に示す。glyでは二つのピークを示し、2つの環境の異なるオキソバナジウム(V)錯体であることが分かった。またvalも化学シフトは異なるが、同

キーワード: V-ペプチド錯体、抗微生物活性、シリケートゲル、包摂化合物、 ^{51}V -NMR

○たかやまとしお、しのはらかずや、こいけよしお

じであった。一方、Leu では一つのピークのみであり、一成分のオキソバナジウム(V)錯体であることが分かった。同じように glyphe も化学シフトは異なるが、一つのピークのみであった。これらの、 $^{51}\text{V-NMR}$ 化学シフトは gly ($\delta = -440.9, -466.7$), val ($-452.3, -465.0$), leu (-444.0), glyphe (-442.3) であった。本錯体は DMF, DMSO 溶媒中で構造が変わり $^{51}\text{V-NMR}$ 化学シフトが複雑に変化するので、固体 $^{51}\text{V-NMR}$ 測定は大変有用である。

オキソバナジウム(V)錯体の医薬的・抗微生物活性をみるために、Esherichia coli(E-coli)への抗微生物活性試験(コロニーカウント法)を行った。その結果、[VOL(hq)] 1(gly), 2(val), 3(glyphe), 4(leu), その他(ser)を Fig.3 に示す。その結果、大腸菌 E-coli の数はいずれの錯体も時間がたっても減少しなかった。これは、本オキソバナジウム(V)錯体が E-coli に対して不活性であることを示している。この理由は現在検討中である。さらに、オキソバナジウム(V)錯体を包摂したシリケートゲルについての固体 ^{51}V 及び $^{29}\text{Si-NMR}$ の結果についても報告する。



Scheme 1 Proposed structure for [VOL(hq)]: 1(gly), 2(val), 3(glyphe), 4(leu).

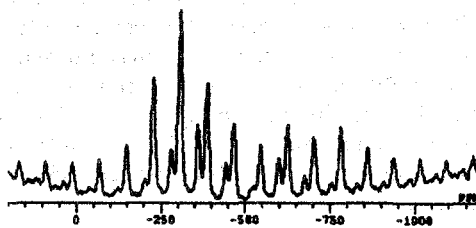


Fig.1 $^{51}\text{V-NMR}$ spectrum of [VOL(hq)]: 1(gly).

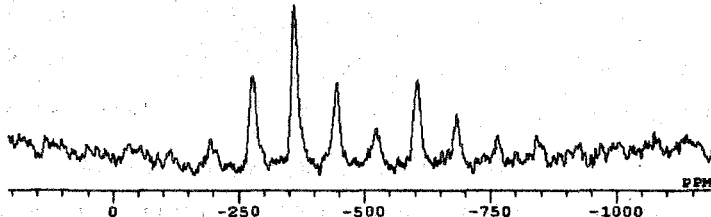
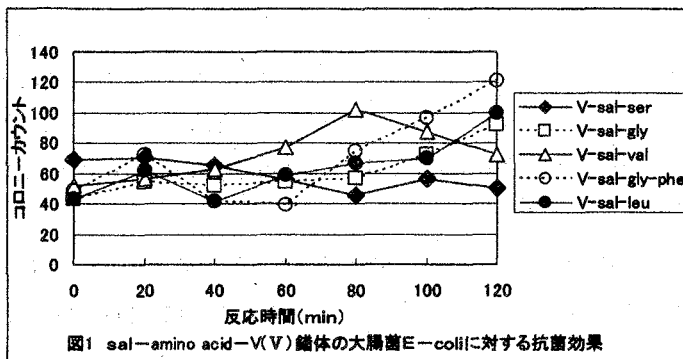


Fig.2 $^{51}\text{V-NMR}$ spectrum of [VOL(hq)]: 4(leu).

Table 1 Antibacterial activity for [VOL(hq)]: 1(gly), 2(val), 3(glyphe), 4(leu).



Narcissistic aggregation of steroid compounds in diluted solution elucidated by CSI-MS, PFG NMR and X-ray analysis

[¹Chemical Analysis Center, Chiba University, ²Nissan Chemical Industries, Ltd., ³Crest, Japan Science and Technology Agency (JST), ⁴NMR Application Lab., JEOL, Ltd., ^{*}Present address: Faculty of Pharmaceutical Sciences at Kagawa campus, Tokushima Bunri University]
 ○Kazuaki Shikii^{1,2}, Hiroko Seki^{1,3}, Hiroaki Utsumi⁴, Kentaro Yamaguchi^{1,3,*}

Abstract—Large-scale aggregated chain structures of steroid compounds were observed in diluted solution by means of cold-spray ionization mass spectrometry (CSI-MS). In pulsed field gradient (PFG) NMR diffusion studies, a calibration curve was obtained from the results of calculated molecular volume and observed diffusion coefficient of the molecules having no hydrogen bondings to compare with that of the steroid compounds. The crystal structures were determined by X-ray crystallography, and the relationship between the crystal and solution structures is discussed. It is suggested that the intermolecular hydrogen bondings observed in the crystal might be partly retained in diluted solution. It was also revealed the existence of large-scale clusters in some steroid compounds.

1. はじめに

分子間水素結合をもつ化合物が溶液中におかれた場合、一定濃度以上で図 1 のように水素結合によって自己会合することは知られている。

これまでに我々は、コールドスプレーイオン化質量分析法 (CSI-MS) を用いて、溶

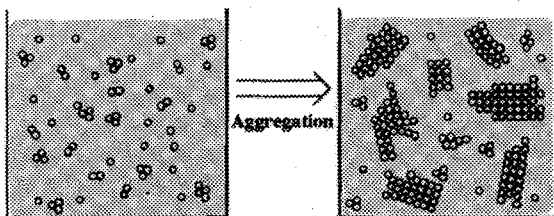


Figure 1. The model of molecular aggregation.

液中で平衡状態にあるグリニャール試薬や不安定な有機金属錯体の構造を明らかにした。この方法を用いることで、通常の方法では観測が困難とされる弱い分子間相互作用の観測が可能となることをすでに報告している。ここでは希薄溶液中の分子間水素結合を観測することを目的として CSI-MS、NMR 及び X 線構造解析による検討を行った。特に、ステロイド化合物を例として、それらの溶液構造についての検証結果を本発表で述べる。

2. 実験方法

質量分析計は JMS-700 (日本電子) に CSI イオン源を取り付け、スプレー温度 -20°C 、ニードル電圧 0 kV にて測定した。NMR は JNM-LA600 (日本電子) を用いて 10°C で対流の影響を抑えるため 3 mm ID チューブを使用して測定した。X 線回折装置は SMART 1000 (BRUKER) CCD を用いて -100°C 下で測定を行った。

5 種類のステロイド化合物について CSI-MS によるスペクトルを比較した。なお、5 種類のうちここでは差が顕著だったもの 2 つを示す (図 2)。さらに CSI-MS 測定に用いた同様の溶媒条

件 $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}=98:2$ で濃度 10 mM にて PFG NMR による自己拡散係数の測定を行った。パルスシーケンスは Bipolar Pulse Pair-Stimulated Echo (BPP-STE) 法を用いた。ここでは水素結合を持たない化合物を標準物質として用いて、それらについての自己拡散係数をそれぞれ求め、さらに MOPAC による計算から求めた分子体積の値との関係についての検量線を作成した (図 3)。こうして作成した検量線を用いてステロイド化合物の会合状態について 5 種類のステロイド化合物についての比較を行った。

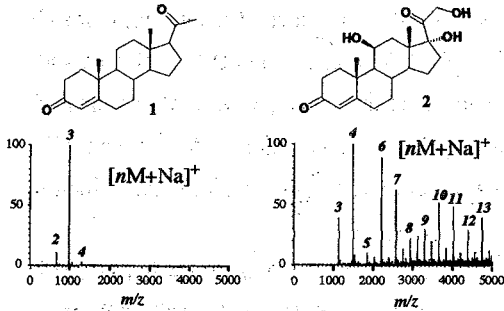


Figure 2. CSI-MS spectra of progesterone (1) and hydrocortisone (2)

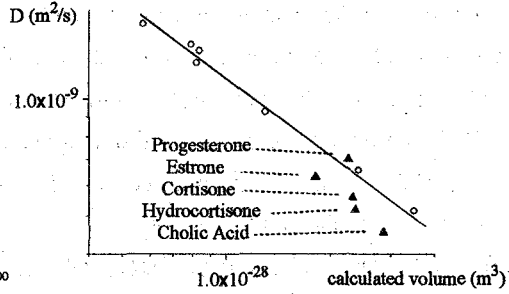


Figure 3. Correlation with diffusion coefficient and calculated molecular volume. O represent reference compounds, ▲ represent steroid compounds.

3. 結果及び考察

CSI-MS では、水素結合を持たないと思われるプロゲステロン(1)は小規模なクラスターのみ観測された。エストロンについては、微弱ながら大規模な連鎖構造が観測された。さらに、コルチゾン・ヒドロコルチゾン(2)・コール酸など水酸基を複数持つステロイド化合物については、大規模な連鎖構造が観測された。また PFG NMR により求めた自己拡散係数を検量線上で比較した場合、プロゲステロンは水素結合を形成しないためにほぼ検量線上に位置するのに対して、水素結合を形成するものは検量線より下方に位置することが分かった。これは水酸基を介した分子間水素結合によって拡散速度が遅くなっていることに起因する。さらに X 線結晶構造解析から得られた結晶中の水素結合形式 (図 4) は CSI-MS や PFG NMR の結果を反映したものであることが分かった。つまり溶液中でも結晶中に見られた分子間水素結合をある程度保持していると考えられる。

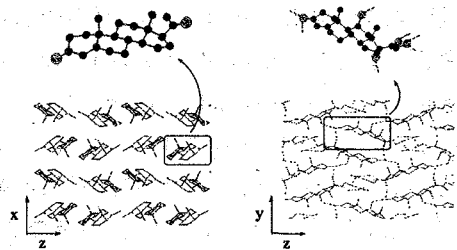


Figure 4. The crystal structure of 1 and 2

キーワード 自己会合 自己拡散係数、CSI-MS、ステロイド化合物、単結晶 X 線回折

○しきいかずあき、せきひろこ、うつみひろあき、やまぐちけんたろう

Al-EDTA 錯体における ^1H , ^{13}C Dynamic-NMR の研究

(東和大工¹、(株)ハイテック千葉研究開発センター²、福岡大理³、九州大院理⁴)

○加藤祐子¹、立石雄一²、栗崎 敏³、横山拓史⁴、脇田久伸³

Study of ^1H and ^{13}C Dynamic-NMR in Al-EDTA Complex

Al atom of Al-EDTA complex in aqueous solution has 5-fold coordinated structure with two N atoms of an EDTA molecule, and two O atoms of the CH_2COO groups in an EDTA molecule and one O atom of an H_2O molecule.(1) Now we have appeared the exchange rates of C atoms of two N-C and four C atoms of carboxyl groups on Al-EDTA complex with ^1H and ^{13}C dynamic-NMR. Then it has simulated by NMR exe.program and it was calculated the value of activity energy (Ea) with Arrhenius plots.

[緒言] 近年、酸性雨などにより土壌が酸性化すると、土壌中の Al がイオンの状態で存在することが知られているが、この結果、浸透していく水に Al イオンが含まれていき、飲料水への毒性問題や、あるいは植物の栄養吸収阻害などが環境問題となっている。

カルボキシル基をもつ土壌中のフルボ酸などと Al イオンが錯形成すると、毒性が低下することが知られているが、我々はフルボ酸のモデル化合物として、EDTA を用い、Al-EDTA 錯体化合物 (Fig.1) の構造を NMR で調べた。Al-NMR のケミカルシフト値から水溶液中では5配位構造をとっていることが推測できた。この5つの配座には、1つの H_2O と EDTA 中の2つの N 原子が配位し、残り2座を EDTA の4つのカルボキシル基の O が競争していると考えられる。これまで Al-EDTA 錯体は静的な化合物と考えてきたが、実は4つのカルボキシル基を中心に、動的に運動していることが、 ^1H , ^{13}C dynamic-NMR からわかった。この NMR の温度可変スペクトルとシュミレーションの結果から、配位子の交換速度をもとめ、さらに Arrhenius plots から活性化エネルギーを計算し、Al-EDTA 錯体の運動性を明らかにしていく。

[実験] 試料として 0.17 M Al-EDTA 水溶液 (0.25M Al-EDTA 水溶液 0.4mL に、重水 0.2mL を加えた) を使用した。装置には Varian 社製の UNITY INOVA 400 WB を使用した。測定は ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR とも温度は -10°C ~ 60°C まで 5°C 刻みで測定した。シュミレーションソフトは、NMR.exe をもちいた。

[結果] Al-EDTA 錯体化合物 (Fig.1) の ^1H , ^{13}C dynamic-NMR 測定から得られたカルボキシル基の交換運動に由来する、実測と計算の連続スペクトルを、(Fig.2) に示す。カルボキシル基の3と4の O が交換することによって、5と6のカルボキシル基の C の交換、7と8のメチレン基の C と H の交換が、さらに1, 2位のエチレン基の交換が明らかになった。カルボキシル基の活性化エネルギー (Ea) は 44.6kJ/mol であった。

Key words: Al-EDTA 錯体、Dynamic NMR、活性化エネルギー (Ea)、Al-NMR

かとうゆうこ、たていしゆういち、くりさきつとむ、よこやまたくし、わきたひさのぶ

[参考文献] (1)S.Matsuo, H.Wakita, T.Yokoyama Advances in QUANTUM CHEMISTRY, 42(2003)407.

Fig.1. Exchange movement of four carboxyl groups in Al-EDTA complex

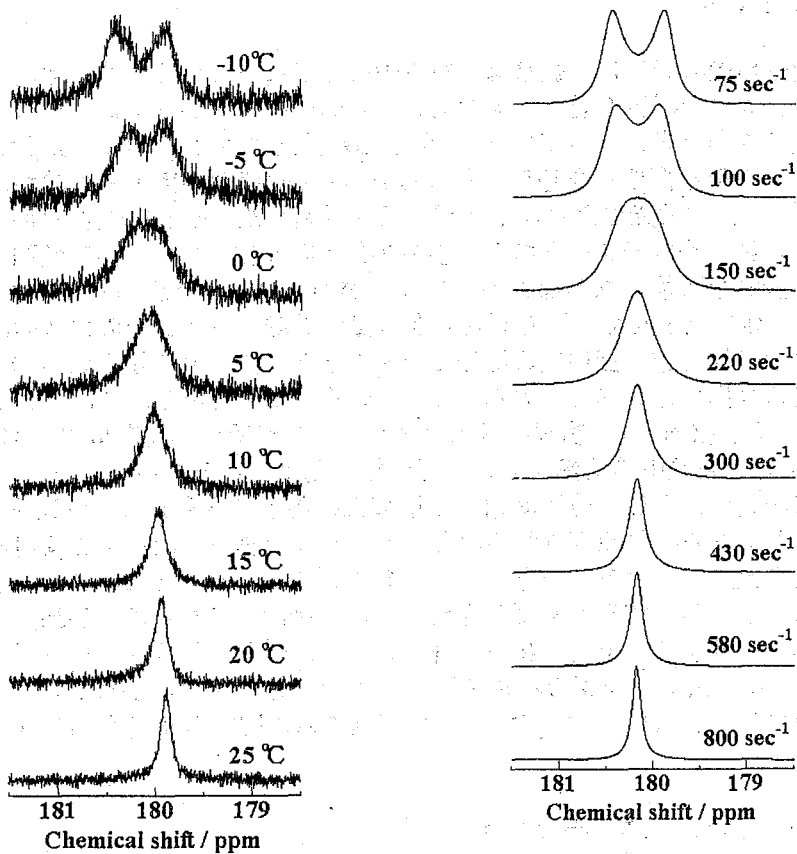
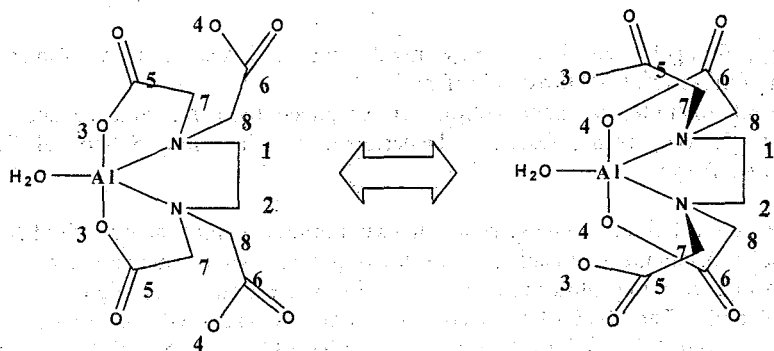


Fig. 2. Observed and calculated ¹³C-NMR spectra of Al-EDTA aqueous solution (carboxyl group)

Analysis of molecular interactions among inclusion compounds and Xe using hyperpolarized ^{129}Xe NMR

Mineyuki Hattori¹, Young-Ju Lee¹, Kikuko Hayamizu¹, Takashi Hiraga², Yasunori Yamanoi³, Masaru Kurashina³, Tetsu Yonezawa³, and Hiroshi Nishihara³

¹Photonics Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Ibaraki, ²Kansai, Ikeda, Osaka. ³Department of Chemistry, School of Science, the University of Tokyo, Tokyo.

The hyperpolarization technique can increase ten thousand times the signal sensitivity of NMR for ^3He and ^{129}Xe and make instantaneous imaging of the cavity gases. An automated batch type apparatus for hyperpolarization, including ultra pure gas application system and using high-power diode laser arrays was developed. The field of the permanent magnets was used for the optical pumping processes. We achieved 2~3% polarization of ^{129}Xe for Xe (98%) and N_2 (2%) gas mixture. The hyperpolarized Xe gas were extracted in a 30ml syringe and introduced into the sample tubes including the inclusion compounds. The temperature dependences of the ^{129}Xe NMR spectrums from the samples were analyzed.

核磁気共鳴(NMR)分光法は、従来は、熱平衡磁化を扱っているため、原理的に感度が低いことが、本法の限界を規定してきた。一般的にはナノテクノロジー研究のためには感度が足りないと考えられている。しかし、最近、光ポンピング法による ^3He 、 ^{129}Xe を代表して、この熱平衡磁化を超越した(hyperpolarized)状態が実現され始めた。希ガス(^3He 、 ^{129}Xe)を、円偏光により電子スピン系を励起したルビジウムと共存すると、10,000倍強い磁気共鳴信号を得られる。超偏極技術を利用すると、空間分解能の向上、リアルタイム計測が可能になるなどのメリットが得られる。計測例としては、Heを導入した肺のMRI、Xeを取り込んだ脳内血流量の計測、カラム中のガスの流量、多孔性高分子のポア径分布、蛋白質の溶液にXeを溶かしたときの蛋白質へのXeの会合・変性などの検出などがあげられる。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。

材料の構造決定法、及び、分子間相互作用解析のために核磁気共鳴分光法(NMR)が広く用いられており、同原理を利用したイメージング法(MRI)が医療用機器として大きな役割を果たしている。一方で、ナノテクノロジーの発展に伴い、分子を対象としたボトムアップ型の構造作製がなされている。今回、これらの「部品」として重要視されている、各種の包摂化合物、 α 、 β 、 γ -シクロデキストリン、パラジウムケージ、及び、カリックスアレン類の粉末試料、及び、溶液での ^{129}Xe NMRスペクトルの温度依存を取得し、これらの化合物とXeの相互作用に関する研究をおこなったので報告する。

超偏極、 ^{129}Xe 、包摂化合物、線形解析

はっとりみねゆき、りよんじゅ、はやみずきくこ、ひらがたかし、やまのいよしのり、くらしなまさる、よねざわてつ、にしはらひろし

【実験】東横化学(株)と産総研で開発した、偏極率 3%の超偏極 Xe ガスをバッチ式で連続供給することを可能とした実用機[1]を使用した。本装置は、原料となる Xe/N₂ 混合ガス及びパージ用 N₂ ガスのシリンダー収納部、圧力制御部、偏極用セル部、及び、システム制御部により構成される。Rb が封入されたパイレックスセルに、Xe/N₂ の高純度混合ガスを供給し、永久磁石アッセンブルにより生成した約 10mT の均一磁場 (±1%) 中において 794.7nm の半導体レーザー光を照射することにより、1 回に約 300ml の超偏極 Xe ガスを貯留して生成させた。Fig. 1 に、同装置の配管系の模式図を示す。超偏極 Xe ガスは、約 10 分以上の間隔を開けて、30ml のシリンジに連続的に取り出され、専用を開発したオンライン式導入管を接続した試料管中の包摂化合物試料へ導入し接触させた。¹²⁹Xe NMR スペクトルは、6.3T で、tecmag Apollo Spectrometer により得た。

【結果と考察】

Fig.2 に α-シクロデキストリンとパラジウムケージ(L4M6)のガスピークを 0ppm として規準にしたスペクトルを示した。各包摂化合物により異なるシフトと線幅を与えた。これらのスペクトルは、これら包摂化合物の微結晶表面の構造及び Xe に対する親和性の情報を反映していると考えられる。さらに、温度依存性を取得して、その線形解析からさらに詳細な、解析が可能であると考えられる。

【参考】

[1] 開発事例：超偏極キセノンガス生成装置実用機の研究開発，服部峰之，工業材料，52-3，pp.86-89，2004/03/01；核スピン偏極キセノンガスの製造方法及び製造装置，特願 2003-4304，東横化学(株)，産総研，大竹紀夫，村山守男，平賀隆，服部峰之，本間一弘，2003.1.10.

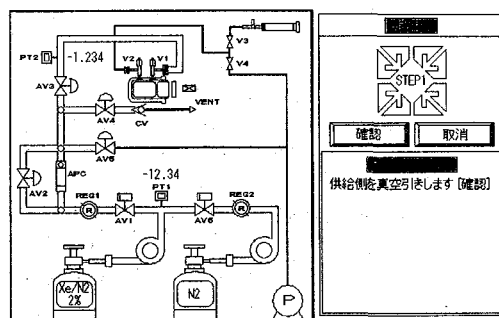
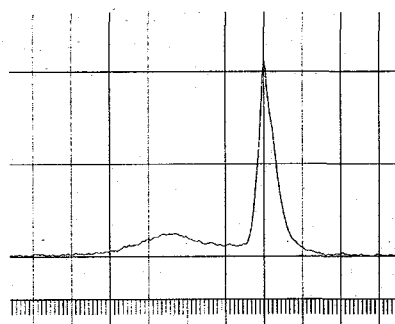
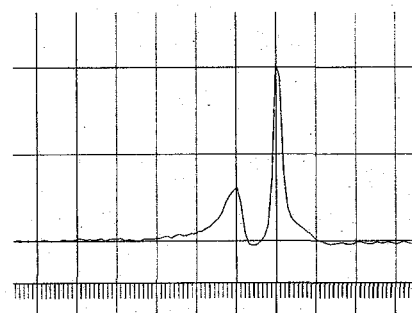


Fig.1 Schematic block diagram of the automated hyperpolarized Xe gas generator.



(a)



(b)

Fig.2 ¹²⁹Xe NMR spectrum of (a) α-cyclo-dextrin, and (b) paradium cage (M6L4) on 298K.

(東京大学工学系研究科, CREST 科学技術振興機構)

○塚原剛彦, 火原彰秀, 北森武彦

Physicochemical Studies on liquids confined in fabricated one-hundred nanometer-sized channel by NMR measurements

(Department of Applied Chemistry, School of Engineering, the University of Tokyo and CREST, Japan Science and Technology Agency)

O Takehiko Tsukahara, Akihide Hibara, and Takehiko Kitamori

Complicated chemical processes can be integrated on a microchip using microfabricated devices. In order to develop more integrated systems, we have investigated the nano fabrication techniques as well as physicochemical properties of water confined in fabricated one hundred-nanometer-sized channels on fused-silica substrate. In this work, hydrogen bonding structure and dynamics of confined water were examined by ^1H -NMR chemical shifts and ^1H - and ^2H -NMR spin-lattice relaxation rate measurements. These results suggested that the proton transfer mechanisms of water molecules are affected by the electrostatic effects of fused-silica surface containing ionizable silanol groups from the vicinity of diameter of $1\mu\text{m}$, and such effects are attributable to the lower dielectric constants and higher viscosities of confined water.

[緒言]

我々は、ガラス基板上に数十～数百 μm スケールの微小流路（マイクロチャネル）を作製し、ここに、混合、反応、分離、検出といった複雑な化学プロセスを集積化した、マイクロ化学システムの開発に成功してきた^[1]。この化学操作をより高度に集積化するためには、半導体などの微小加工技術で実現可能な極限である数百 nm まで微小化したメソ空間の利用が有効になると期待される。しかし、この人工メソ空間はマイクロ空間と分子細孔のようなナノ空間との中間領域に位置し、溶液のクラスターサイズ（～数十 nm）と比較的近くなるため、メソ空間中の溶媒はマイクロ空間とは異なる性質を示す可能性が考えられる。そこで、近年我々は、ナノチャネルを設計・製作し、その空間内の水のマクロ物性について研究している。これまでに、時間分解蛍光測定から、ナノチャネル内の水はマイクロ空間に比べ、高粘度・低誘電率な性質を有することを明らかにしている^[2]。本研究では、ナノチャネル中における水のミクロ物性を NMR によって直接的に調べ、その分子構造とダイナミクスの空間サイズ効果に関する知見を得ることを目的としている。

[実験]

220nm から $30\mu\text{m}$ の流路幅 (W)、250nm から $2.3\mu\text{m}$ の深さ (D) を有するナノチャネルを、電子線リソグラフィおよび高速原子線エッチングによって合成石英基板上に作製した。この空間サイズは、円筒形とみなした場合、直径 (R) 250 から 4200nm に相当する。ナノ加工された基板と石英製カバーガラスを真空炉内において 1060°C で熱融着後、ダイヤモンドカッターによる切削を行い、NMR 用ナノチャネル試料管として利用した (Figure 1)。 ^1H 、 ^2H -NMR 測定は $4\text{--}50^\circ\text{C}$ の温度領域で 300MHz の NMR 装置 (JEOL lambda シリーズ) によって行った。全ての試料は freeze-pump-thaw サイクルで数回脱気した後、真空中でナノチャネル内に導入した。

(1) lithography and etching

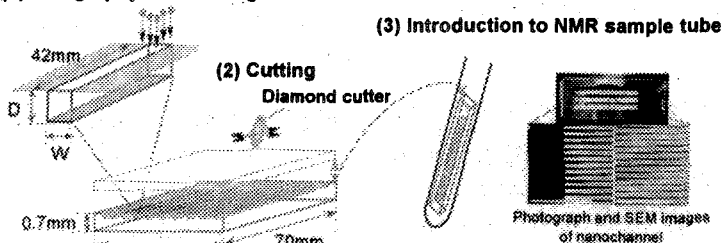


Figure 1. Schematic illustration of the fabrication procedures of nanochannels for the NMR measurements.

キーワード：マイクロ化学システム、マイクロチップ、ナノチャネル、緩和時間、プロトン拡散

つかはら たけひこ、ひばら あきひで、きたもり たけひこ

[結果と考察]

バルク中 ($R=10000\text{nm}$) およびナノチャンネル中における水の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果を Figure 2 に示す。 ^1H ケミカルシフトは、全測定サイズ領域において 4.5ppm 近傍でほぼ一定であることから、ナノチャンネル内に閉じ込めた水分子の構造はバルク中と類似した liquid-like な構造を有していると考えられる。しかしながら、スペクトルの線幅が空間サイズの減少と共にブロードニングしているため、分子の運動状態は、空間サイズ制限の影響を受けている様子が伺える。

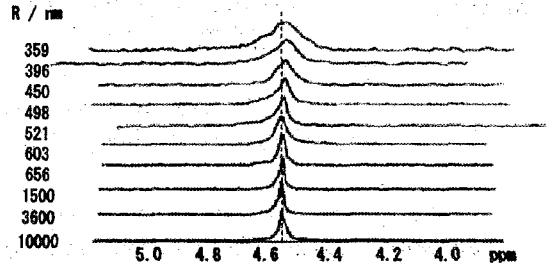


Figure 2. $^1\text{H-NMR}$ spectra of water confined in bulk and nanochannels (R = equivalent diameter) at 300MHz and 22°C .

そこで、スピン-格子緩和速度 ($1/T_1$) 測定から、分子ダイナミクスの空間サイズ効果の検討を試みた。溶液の $^1\text{H-}1/T_1$ 値は分子間・分子内双極子-双極子相互作用の影響を受けるが、 ^2H のような四極子核の $1/T_1$ ($^2\text{H-}1/T_1$) 値は分子内回転運動のみに支配されているため、これら二つの結果を結びつけることによって、分子の並進および回転運動状態の寄与の分離が可能となる。得られた結果を Figure 3 に示す。分子間相互作用の寄与は、空間サイズの減少によって $R=1\mu\text{m}$ 近傍から急激に増加する傾向を示したが、分子内相互作用の寄与にサイズ依存性は殆ど見られないことが分かる。この分子間成分の増加は、ナノチャンネル中にある水分子の並進運動のみがバルク水よりも極めて制限された状態にあることを示唆している。

ナノチャンネル内に閉じ込めた水分子は、liquid-like な構造を保持したままその移動性のみを変化させる、という特異な結果を鑑み、我々は Figure 4 に示すようなプロトン移動拡散モデルを想定した。これは、石英壁面のシラノール基からの静電的な影響が水分子間のプロトン移動速度の変化を誘起し、その結果、水の分子拡散よりむしろプロトン拡散が支配的になるというものである。その影響は鎖状のように波及するため、 $1\mu\text{m}$ という極めて long-range な領域の水分子にまで及ぶと考えられる。

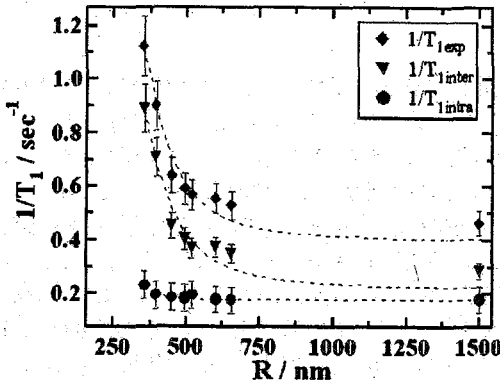


Figure 3. Separation of the intermolecular component (∇) and intramolecular one (\bullet) of $1/T_1$ values based on experimental $^1\text{H-}1/T_1$ (\blacklozenge) of water confined in nanochannels, and its channel size dependences.

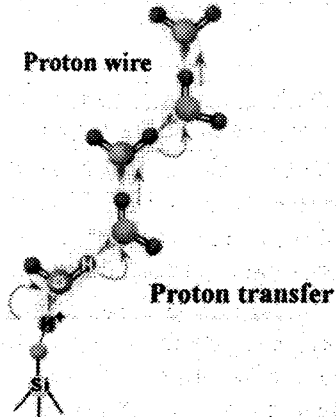


Figure 4. Concept model of the proton transfer mechanisms of water confined in nanochannels. Proton ion would be transferred on hydrogen bonding network like proton wire.

発表では、この推察の妥当性を補足する実験結果として、1) 水分子の分極状態異方性、2) 見かけの活性化エネルギー減少、3) HCl 添加による $^1\text{H-}1/T_1$ 値挙動の反転などを示すと共に、ガラス壁面の疎水性修飾効果が水分子に及ぼす影響について考察を行う。

[参考文献]

- [1] T. Tokeshi, T. Minagawa, K. Uchiyama, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, and T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **74**, 1565-1571 (2002).
- [2] A. Hibara, T. Saito, H.B. Kim, M. Tokeshi, T. Ooi, M. Nakao, and T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **74**, 6170-6176 (2002).

NMR studies of structure of the associative polymer in aqueous solutions
(Shiseido research center) ○Tadao Fukuhara, Katsunori Yoshida, Kazuo Komatsu

Many kinds of polymers are used for cosmetics as thickeners to optimize the stability and texture of the formula. We developed a novel associative thickening polymer (AP), which designed having a nonionic polyethyleneoxide (PEO) backbone with long alkyl chains (R) at both ends. The thickening mechanism of AP in aqueous solutions is assumed that the AP associates at R moiety via hydrophobic forces leading to polymer network formation. The solution properties of AP concentrations were studied by viscosity, self-diffusion coefficient (D_{sel}), and T_1 , T_2 measurements. The viscosity slightly increases with increasing concentrations of the AP below 0.4%, on the other hand, dramatically increases with increasing concentrations of the AP above transition concentration ($\approx 0.4\%$). The D_{sel} gradually decreases with increasing concentrations of the AP below 0.3%, in contrast, drastically decreases in the concentration range of 0.4 - 1%. Result in D_{sel} measurements suggest that part of the AP starts to bridge micelles, forming inter-micellar networks at the transition concentration ($\approx 0.3\%$). The T_1 and T_2 measurement of the R moiety and PEO moiety of AP indicate that there is no change in these T_1 and T_2 in the concentration range of 0.001 - 1%, even though we observe drastic changes in viscosity and D_{sel} in this AP concentration range. This result suggests no structural change at the transition concentration observed in viscosity and D_{sel} . Further, the values of T_1 and T_2 for the PEO moiety of AP are in the same level ($T_1 = 0.7s$, $T_2 = 0.5s$), whereas, for the end of R moiety, T_2 is shorter than T_1 in one order of magnitude ($T_1 = 0.6s$, $T_2 = 0.05s$). These data imply that the inter-micellar networks are formed through the R moiety of the AP, which is presumably driven by hydrophobic forces.

【序】

多くの化粧品、トイレットリー商品には、製品の安定性や使用感を調整するために増粘剤が配合されており、その目的に合わせて様々な増粘剤が開発されている。カルボキシビニルポリマーに代表されるイオン性ポリマーは、少量で高い増粘効果を有するが、その粘度は添加塩濃度や pH に大きく影響を受けるといふ欠点がある。また、キサンタンガムなどの多糖類は、添加塩濃度や pH の影響を受けにくい、ヌルつきや糸引きといった化粧品としては好ましくない性質を有するものが多い。これらの問題を解決するため、我々は新たな増粘機構をもつ増粘剤として、親水性高分子の両端に疎水基を持つ会合性高分子 (AP) の開発を行った。非イオン性である AP の粘度は、添加塩濃度や pH に依存せず、またこれまでにない新奇な使用感を有することがわかった。AP 水溶液の増粘機構については、粘度測定や動的光散乱の結果から、疎水基の会合による分子間ネットワークの形成による予想されたが、分光学的な確認は困難であった。そこで、種々の濃度の AP 水溶液を試料とし、NMR により自己拡散係数 (D_{sel}) 測定、および、緩和時間測定を行い、AP 濃度の変化に伴う会合状態の変化を検証し増粘機構を検討した。

【サンプルおよび実験】

AP は、ポリオキシエチレンオキシド (PEO) の両端にポリオキシエチレンデシルテトラデシルエーテルをウレタン結合させてものであり、平均分子量は約 35,000 であった。NMR 測定用サンプルとしては、AP の 0.001~5% の重水溶液を調製した。 D_{sel} 測定は、JNM ECA-400 と磁場勾配発生装置 (最大磁場勾配強度; 20T/m) を用い、STE-LED 法により、磁場勾配強度を 8T/m、 Δ を 50~250ms の範囲で固定し、 δ を最大 15ms まで変化させて行った。緩和時間測定は、JNM ECA-600 を用いて行った。

キーワード: 磁場勾配 NMR、自己拡散係数、緩和時間、会合性高分子

ふくはらただお、よしだかつのり、こまつかずお

【結果と考察】

(1) 粘度測定結果等から予想される増粘機構

Fig.1に、APの濃度と粘度の関係を示した。0.1~0.4%までの濃度では、粘度は殆ど変化しないが、0.4%から急激に粘度が上昇しゲル状態へと変化することが確認された。また、ピレン蛍光プローブ法により、APの臨界ミセル濃度 (cmc) は約0.0003%であることが確認されている。これらの結果から、APの水溶液中での会合状態の変化はFig.2のように推察された。すなわち、APは、水溶液中で末端の疎水基どうしが会合するが、濃度により会合状態が異なり、cmc以下では分子内の疎水基どうしが会合したユニマーを形成、cmc以上では複数の分子間の疎水基が会合するフラワーミセルを形成、そして0.4%以上の濃度ではミセル間の疎水基が会合を開始し、濃度増加に伴いより大きな会合体を形成し系を増粘させているものと予想された。

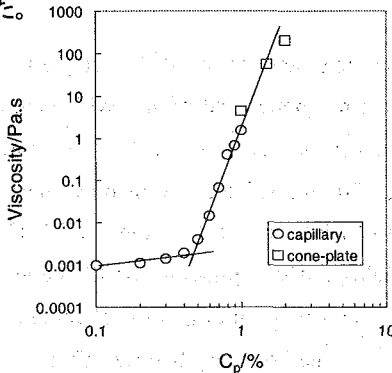


Fig.1 The viscosity plotted as a function of the concentrations of AP.

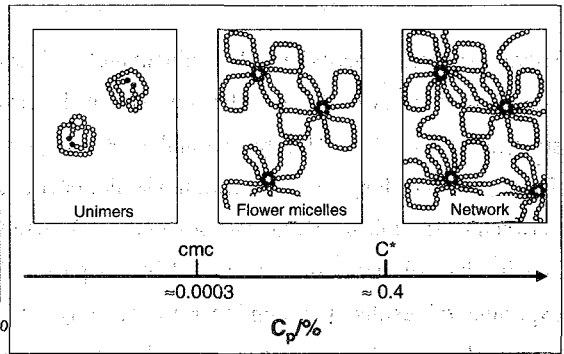


Fig.2 Schematic illustrations of the structure of AP at various concentrations.

(2) D_{sel} 測定による会合体形成の確認

Fig.3に、APの濃度と D_{sel} の関係を示した。0.01~0.3%までの濃度では D_{sel} は殆ど低下しないが、0.4%からは急激に D_{sel} が低下し、1%では3桁も D_{sel} が小さくなっていることが確認された。 D_{sel} のブレイクポイントは粘度のブレイクポイントとほぼ同じ濃度であり、かつ、0.4%以上の濃度では D_{sel} が急激に低下することから、AP濃度上昇に伴い予想通り大きな会合体が出現していることが確認された。また、1%以上の濃度では D_{sel} に殆ど変化が見られないが、この濃度ではAP溶液の外観が硬いゲル状であり、濃度増加による変化が観察されないことと良く対応していた。

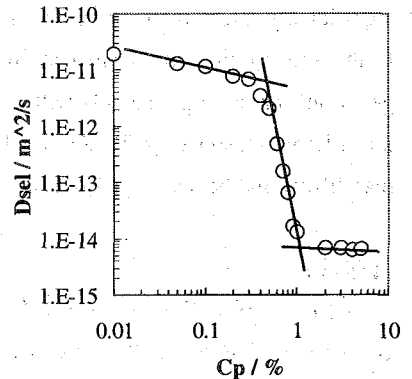


Fig.3 The D_{sel} plotted as a function of the concentrations of AP.

(3) 緩和時間測定による会合状態の確認

Fig.4に、APの濃度と緩和時間の関係を示した。0.001~1%の濃度において、PEOおよびアルキル鎖の緩和時間には殆ど変化が無かった。粘度および D_{sel} の急激な変化が生じる0.4%以上の濃度でも緩和時間は殆ど変化しないことから、粘度上昇は、APの構造の変化によるものではなく、ミセル間の会合数の増加によるのみ生じていることが示唆された。また、PEOの T_1 と T_2 はほぼ同じ値なのに対し($T_1=0.7s$, $T_2=0.5s$)、アルキル鎖の T_1 と T_2 を比較すると T_2 が1桁小さいことから($T_1=0.6s$, $T_2=0.05s$)、APは水溶液中で疎水基どうしが会合していることが確認された。

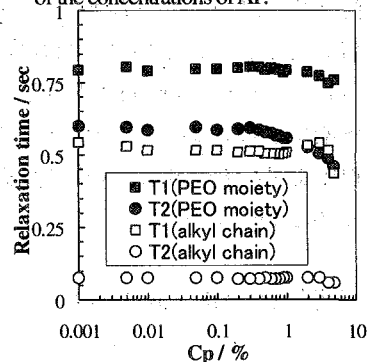


Fig.4 The T_1 and T_2 plotted as a function of the concentrations of AP.

以上のように、従来の方法では困難であったAPの会合状態の仮説を、 D_{sel} および緩和時間測定結果を組み合わせて実証した。

(東工大院理工・高分子セ) ○山根祐治、大橋淳史、黒木重樹、安藤勲

Diffusional Behavior of probe molecules in Gel Having Cavity
as Studied by Field Gradient NMRYuji Yamane, Atsushi Ohashi, Shigeki Kuroki and Isao Ando
(Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology)

Highly-oriented poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG) gels are prepared by ethylenediamine as cross-linker in 1,4-dioxane in the presence of the strong magnetic field of an NMR magnet with the strength of 10.5 T. Highly-crosslinked PBLG gels have long channels with a μm scale diameter. These gels have long channels with mode diameter of ca. 70 μm , which are formed by phase separation between cross-linked PBLGs and solvent. Diffusional behavior of 1,4-dioxane in PBLG gel matrix and in channel cavities is elucidated by ^1H pulsed-field-gradient spin-echo NMR method. From experimental results, it is found that it is not easy for solvents to go through from channel to PBLG gel matrix, that is, solvents in channels collide and rebound at the boundary between channel and PBLG gel matrix, and that the diffusion coefficient of 1,4-dioxane D_{\parallel} value along the α -helical PBLG axis is significantly larger than that in the direction perpendicular to the α -helical PBLG axis corresponding to the anisotropic cells formed by highly-oriented PBLG chains. While, lowly-crosslinked PBLG gels don't have long channels with a μm scale diameter, but have structural color. In this stage, we don't know reason why PBLG gels have structural color. From the diffusion analysis, it is found that diffusional behavior of 1,4-dioxan and amino acids in PBLG gels is anisotropy.

【緒言】

ポリ(γ -ベンジル-L-グルタメート) (poly(γ -benzyl L-glutamate): PBLG) はジクロロメタン、1,4-ジオキサン、クロロホルムなどの良溶媒中でリオトロピック液晶を形成する。また、PBLG 液晶は磁場及び電場中で PBLG 鎖が高配向しネマチック液晶となる。NMR 磁場中で高配向の PBLG ゲルを調製し、仕込み条件によって μm スケールの channel が発現することを報告している¹⁾。このような背景から、架橋密度を変化させることによって nm スケール及び μm スケールの channel の直径を変化させ、数百 nm の周期構造を持ったポリペプチドゲルを創製できないかと考えた。そこで、10.5 T の NMR 磁場中で架橋剤の濃度を変化させて高配向 PBLG ゲルを合成し、高度に制御された高分子ゲル中の物質拡散過程を磁場勾配 NMR 法により明らかにする。

磁場勾配 NMR、3D NMR イメージング、高配向ゲル、制限拡散、channel Cavity

やまねゆうじ、おおはしあつし、くろきしげき、あんどういさお

【実験】

PBLG 液晶を磁場配向させたまま架橋させることにより、PBLG 鎖が高配向したゲルを創製した。架橋密度が高い場合にはゲル内部に μm スケールの channel cavity を有するゲルが得られ、架橋密度が低い場合には構造色を有するゲルが創製された。ゲルの調製方法の詳細については参考文献 1) を参照されたい。

拡散係数の測定には磁場勾配(最大 1100G/cm)を発生できる磁場勾配ユニットを付属した Bruker 社製 DSX-300 分光器を用い、 ^1H pulsed-field-gradient spin-echo(PFGSE) NMR 法及び ^1H pulsed-field-gradient stimulated-echo(PFGSTE) NMR により高配向高分子ゲル中の 1,4-ジオキササン及びアミノ酸の拡散過程の解析を行った。本測定においてはパルス磁場勾配を印加する方向のプロープ分子の拡散係数を測定するため、サンプルの置き方によって、配向軸方向(D_{\parallel})及び垂直方向(D_{\perp})の拡散係数の測定を行った。また、channel 内の溶媒がチャンネルの壁と衝突することを利用して channel の性質を評価した。さらに、時間依存拡散 NMR 法により創製したゲルの不均一性に関する評価も行った。

【結果・考察】

channel cavity を有する PBLG ゲル中において、溶媒は PBLG ゲルマトリックス中及び channel cavity 中を拡散できる。channel の直径の最頻値は約 $70\mu\text{m}$ であり、障壁によって跳ね返される拡散過程を観測した際に現れる^{2,3)}エコー信号の極小が $q = (65\mu\text{m})^{-1}$ で最初の極小点が観測された。また、配向 PBLG ゲルマトリックス中の 1,4-ジオキササンについてサンプル A(架橋剤：エチレンジアミン 33%/モノマー単位)中において $D_{\perp} = 5.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、 $D_{\parallel} = 6.4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ であり、サンプル B(架橋剤：エチレンジアミン 66%/モノマー単位)中において $D_{\perp} = 4.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、 $D_{\parallel} = 6.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (純 1,4-ジオキササン： $D = 12.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) であった。拡散の異方性 $D_{\parallel} / D_{\perp}$ はそれぞれ、1.21 及び 1.29 であり配向軸方向に拡散しやすいネットワーク構造を有することを明らかにした。さらに、構造色を有する架橋密度の低い PBLG ゲルについて、アミノ酸をプロープ分子として用い、ゲル内のネットワークの異方性を $D_{\parallel} / D_{\perp}$ により評価した。Fig に $D_{\parallel} / D_{\perp}$ を体積膨潤度に対してプロットした結果を示す。体積膨潤度が小さくなることによりアミノ酸分子の拡散過程の異方性が大きくなることがわかる。高配向 PBLG ゲルは配向軸に対して垂直方向に優先的に膨潤することから、膨潤度が低くなることによって PBLG 鎖の間隔が狭くなり、アミノ酸の拡散過程がより異方的になると考えられる。本討論会においては、観測時間依存性のデータから、配向及び無配向ゲルの不均一性の評価について討論する予定である。

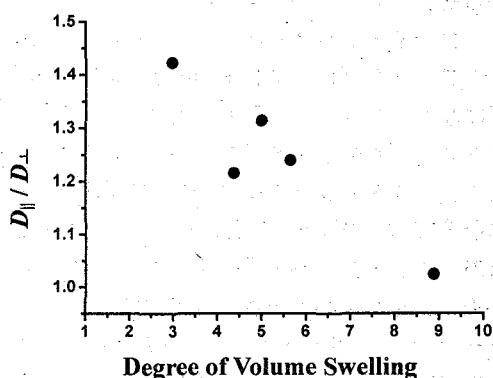


Fig. Dependence of the $D_{\parallel} / D_{\perp}$ on the degree of volume swelling.

- 1) Y. Yamane, M. Kanekiyo, S. Koizumi, C. Zhao, S. Kuroki, I. Ando, *J. Appl. Polym. Sci.*, **92**, 1053(2004).
- 2) W.S. Price, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **32**, 53-135(1996)
- 3) P.T. Callaghan, *J. Magn. Reson. A* **113**, 53-59(1995).

磁場勾配 NMR 法を用いたポリメタクリル酸メチル
 ゲル中の線状及び球状ポリスチレンの拡散機構の研究
 (東工大院理工) ○上口憲陽・黒木重樹・安藤勲・佐藤満・石津浩二

A Study of Diffusional Behavior of Linear and Star Polystyrenes in Poly (methyl methacrylate) Gels by ^1H Pulsed-Field-Gradient NMR Method

Kazuhiro Kamiguchi¹, Shigeki Kuroki¹, Isao Ando^{1,2}, Mitsuru Satoh^{1,2} and Koji Ishizu²

¹Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology

²Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology

The diffusion coefficients of linear polystyrenes (PSs) and star PSs in poly(methyl methacrylate) (PMMA) gels swollen with deuterated chloroform have been measured as a function of the molecular weight by pulsed-field-gradient (PFG) ^1H NMR method, in order to elucidate the diffusion of probe molecules in a polymer gel affected greatly by intermolecular interactions between probe molecules and polymer network. From these experimental results, it is found that probe PSs in a PMMA gel have two diffusion components that reflect the network size and the polymer size. In the slow diffusion component, the diffusion coefficients of star PSs are quite smaller than those of linear PSs with the same hydrodynamics radius. Further, it is found that the strength of intermolecular interactions between probe PSs and the PMMA network depends on the PS size and shape.

1. 緒言

近年、高分子ゲルのネットワークサイズとその分布をゲル中のプローブ分子の拡散挙動から解明しようという試みがなされている。高分子ゲル中のプローブ分子の拡散運動はプローブ分子とゲルネットワークとの相互作用により強く影響を受ける。ある一つのゲルネットワークをプローブ分子の拡散実験から評価しようとする際、プローブ分子の選択が重要になる。プローブ分子として高分子を用いた場合、その多様性から任意の大きさ、形状のプローブ高分子を選択でき、最適なプローブ分子を見つけることができると考えられる。また、ゲル中の様々な高分子の拡散過程を解明することは高分子物理学的に重要である。本研究では、プローブ高分子として分子量を大きく変えた数種類の、線状ポリスチレン (PS) 及びスターPSを用いた。スターポリマーは代表的な分岐ポリマーであり、全ての分子鎖の一端が中心の小さなコア部にグラフトした特徴的な構造を持つ。また、ゲルネットワークとしてポリメタクリル酸メチル (PMMA)、溶媒として重水素化クロロホルム (CDCl_3) を用いた。拡散実験の手法には、パルス磁場勾配NMR (pulse-field-gradient: PFGと略記) 法を用い、プローブPSの拡散係数Dを求めてその拡散挙動を議論した。

磁場勾配 NMR、拡散、ゲル、スターポリマー

かみぐちかずひろ、くろきしげき、あんどういさお、さとうみつる、いしづこうじ

2. 実験

2-1. プローブ PS を添加した PMMA ゲルの合成

モノマーとしてメタクリル酸メチル (MMA) (1.4 mol/l)、架橋剤としてエチレングリコールジメタクリレート (EGDM) (47.7 m mol/l)、開始剤として 2,2-アジビスイソブチロニトリル (4.6 m mol/l) を用いた。モノマーと架橋剤の禁止剤を除去した後、これら上記の分量でプローブ PS (2wt%) とともに溶媒脱水トルエンに溶解して、15 分間 N₂ バブリングの後封管し、75°C において 1 日間ラジカル重合を行いゲルを合成した。得られたゲルを 70°C で真空乾燥した後、1wt% プローブ PS 重水素化クロロホルム溶液に浸漬して一日おき、平衡膨潤状態として試料を調製した。

2-2. パルス磁場勾配 NMR 法を用いたプローブ PS の拡散係数の測定

¹H PFG NMR 法では、核磁気的な励起状態に標識された分子が移動する平均変位距離の時間変化を測定するために自己拡散係数 D を決定できる。エコー信号強度 A(k) と磁場勾配パラメーター k、拡散係数 D との関係は次式で与えられる。

$$\frac{A(k)}{A(0)} = \sum_i f_i \exp(-kD_i) \quad (k = \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)) \quad (2)$$

ここで拡散係数 D_i の核の分率を f_i とした。A(0) は磁場勾配を印加していないときのエコー信号強度、δ はパルス磁場勾配の持続時間、g はパルス磁場勾配の強度、Δ はパルス磁場勾配の間隔、τ は RF パルスの間隔、γ は観測核の磁気回転比である。装置には磁場勾配 (最大 1100 G/cm) を発生できる磁場勾配ユニットを付属した Bruker 社製 DSX-300 分光器を用いた。

3. 結果と考察

3-1. CDCl₃ 希薄溶液中でのプローブ PS の拡散

プローブ PS の CDCl₃ 溶液中でのサイズを求めるために、CDCl₃ 希薄溶液中でのプローブ PS (線状 PS、スター PS) の拡散係数 D₀ を ¹H PFG NMR 法を用いて求めた。実験結果を

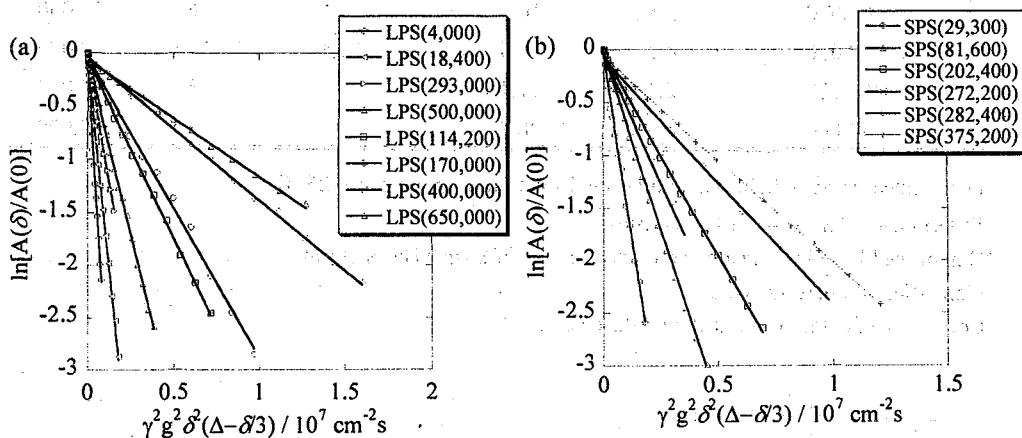


Fig. 1 The plots of $\ln[A(\delta)/A(0)]$ for (a) linear PSs and (b) star PSs in CDCl₃ dilute solution as solvent against $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$.

式 (2) に従ってプロットした図を Fig.1 に示す。プローブ PS の物性は、以下で得られる D_0 、流体力学的半径 R_h とともに次ページの Table1 にまとめた。

プロットは全て直線に乗り、 $CDCl_3$ 希薄溶液中においてプローブ PS の拡散成分は 1 成分であった。式 (2) に従って近似直線の傾きから拡散係数 D_0 を求めた。希薄溶液中では多くの高分子鎖は巨視的な剛体球として仮定することができ、その場合の拡散は以下の Stokes-Einstein の式に従う。

$$D_0 = kT / 6\pi R_h \eta \dots\dots\dots (3)$$

溶媒中における高分子鎖の広がりや流体力学的半径 R_h で表すことができるため、 R_h をプローブ PS の $CDCl_3$ 溶液中でのサイズとして見積もった。

Table 1. Diffusion coefficients and hydrodynamics radii of probe polymers in $CDCl_3$ dilute solution

	molecular weight	diffusion coefficient	hydrodynamic radius	distribution of molecular weight		M_w^c
	M_w^a	$D_0 / \times 10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$	R_h^b / nm	M_w / M_n^a	arm number	per arm
linear PS	4,000	26.6	1.5	1.04		
	19,000	16	2.5	1.07		
	29,000	9.9	4.1	1.09		
	50,000	6.7	6.0	1.06		
	114,000	3.4	11.9	1.08		
	170,000	2.8	14.2	1.05		
	400,000	1.3	29.9	1.06		
	650,000	1.1	35.6	1.06		
star PS	24,000 ^d	14.2	2.8	1.08	5.8	4,000
	82,000 ^e	6.8	5.9		8	10,000
	202,000 ^e	3.8	10.5		8	25,000
	272,000 ^d	4.7	8.6	1.09	34.1	8,000
	282,000 ^e	2.3	17.4		8	35,000
	375,000 ^e	1.9	20.7		8	47,000

^aDetermined by static light scattering using Zimm mode in toluene at 25 °C.

^bDetermined by Stokes-Einstein equation.

^cDetermined by gel permeation chromatography (GPC) in THF as eluent.

^dConsisting of micro-gel core.

^eConsisting of octafunctional chlorosilane core.

3 - 2 . ゲル中の高分子の拡散

溶媒中における高分子鎖の広がりや上述した通り、流体力学的半径 R_h で表され、数 nm から数 10 nm 程度である。この大きさは網目サイズと比較しても十分に大きいためゲル内のプローブ高分子はネットワークからの相互作用を強く受けながら拡散しており、その拡散挙

動は非常に興味深い。ゲル中を拡散する線状ポリマーは、そのサイズが網目サイズよりも小さいと溶媒との流体力学的な相互作用が支配的な拡散挙動を示し、網目サイズよりも大きいと網目鎖との絡み合いによるより強い相互作用が支配的な拡散挙動を示すと考えられている。磁場勾配 NMR 法を用いた拡散測定を行い (Fig.2(a))、前者の拡散挙動が拡散係数 $10^6 \sim 10^7 \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ の速い拡散成分、後者が拡散係数 $10^7 \sim 10^8 \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ の遅い拡散成分として表れることを見出した。さらに、ポリマーサイズを大きくしていくと、相対的に小さな網目の割合が増えるために、遅い拡散成分比が増加していることが観察できた。また、プローブポリマーとしてスターポリマーを用いた場合、形状による拡散挙動への影響が表れ、遅い拡散成分が線状ポリマーの遅い成分よりさらに遅く、拡散係数が $10^9 \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ のオーダーであった (Fig.2(b))。これは、スターポリマーのコア付近の準希薄～濃厚領域がサイズの小さな網目と非常に強く相互作用するためと考えられる。詳細は発表にて述べる。

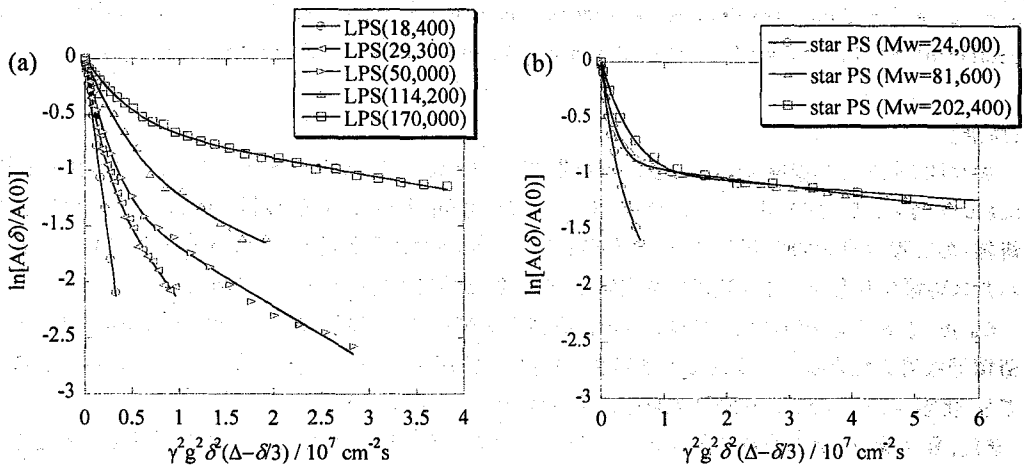


Fig. 2 The plots of $\ln[A(\delta)/A(0)]$ for (a) linear PSs and (b) star PSs in a PMMA gel with CDCl_3 as solvent against $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta^3)$.

超偏極 Xe-129 を用いた拡散係数の測定と
多孔質微粒子の特性評価への応用

(阪大院医) ○金子暁里 木村敦臣 藤原英明

Measurements of Diffusion Coefficient and Characterization
of Porous Media Using Hyperpolarized Xe-129

A. Kaneko, A. Kimura, H. Fujiwara

Division of Medical Physics and Engineering, Graduate School of Medicine,
Osaka University, Osaka, Japan

Hyperpolarized Xe-129 NMR, enhanced in the sensitivity by the order of four or five in magnitude, has been a one of powerful tool to characterize porous media. This study reports the diffusion coefficient of hyperpolarized Xe-129 in porous media. If xenon is embedded in porous media, the diffusion coefficient is expected to show considerable dependence on diffusion time (Δ). The time-dependent diffusion coefficient may be extended to obtain the morphological information of porous media.

【序論】

我々はこれまで超偏極 Xe-129 を自作装置により生成し、様々な報告を行ってきた。昨年度の討論会においては2D-EXSY を用いて、2 サイト間(バルクの超偏極 Xe ガス相と超偏極 Xe の多孔質微粒子吸着相)の交換速度定数の測定について報告した¹⁾。今回は、超偏極 Xe-129 を多孔質微粒子に適用し、パルス磁場勾配を用いて拡散係数を測定し、その構造的特性を検討したので報告する。

Cavity を有する物質においては、cavity 構造の規則性やサイズ分布が物性に影響を与えるため、構造情報取得のため様々な測定法が提案されてきた。超偏極 Xe-NMR を用いたこれらの測定法についても、化学シフトの関係から細孔径を推定する試みが行われている²⁾。

また、熱平衡 Xe ガスを粒子径 0.1mm~4mm 程度のガラスビーズに適用し、拡散時間 Δ を変化させて拡散係数を測定すると、観測時間 Δ の増加に伴い、幾つかのパラメータに依存して減少することが報告されている³⁾。本研究においては、超偏極 Xe を用いて μm 単位の粒子径の場合において拡散時間 (Δ) 依存性拡散係数の測定を試みた。

【実験】

超偏極 Xe-129 は Fig.1 に示す自作装置 (Fig.1) で生成、供給した。Rb を蒸着させたガラスセルをマグネットの漏れ磁場が 120gauss となる位置に配置し、110°C に加温し、Coherent 製 GaAlAs ダイオードレーザーレイ (FAP システム) により出力 90W、795nm の円偏光レーザーで Rb を偏極させた。Xe ガスは Xe-129 天然存在比含有 (26.4%) を 1 気圧で使用した。

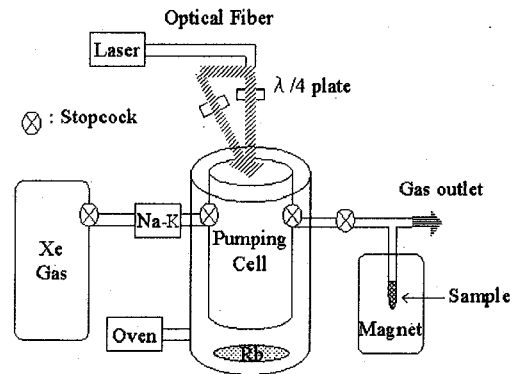


Fig.1 Schematic diagram of hyperpolarizing system

キーワード: 超偏極 キセノン 拡散係数

かねこあかり、きむらあつおみ、ふじわらひであき

測定はVarian製 INOVA-400WB NMR分光器で、Doty Scientific製 Imaging Probe (Litz Coil)によりパルス磁場勾配を発生させ、シーケンスはVarian PFGSTEを使用した。測定周波数110.549MHz、温度 $26.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ であった。サンプルはLC用全多孔性球状シリカゲル(富士シリシア化学)、粒子径 $75 \sim 150 \mu\text{m}$ 、平均細孔径 $52.4[\text{nm}]$ を使用した。拡散係数は $\ln[A(g)/A_0] = -D \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ より算出した。

【結果と考察】

拡散時間 $\Delta = 0.1 \sim 1.0[\text{msec}]$ において縦軸に $\ln[A(g)/A_0]$ 、横軸に $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ をプロットすると、Xe 原子がシリカゲルの細孔内に閉じ込められており、複数の拡散成分が存在すると予測される信号減衰を得た(Fig.2)。Xe ガスの自己拡散係数は $5.65 \times 10^{-6} [\text{m}^2/\text{sec}]$ であり、この拡散時間 Δ においてXe の3次元上の根平均二乗距離が約 $60 \sim 180 \mu\text{m}$ となる。シリカゲルの粒子径とXe の根平均二乗距離がほぼ等しくなることから、今回使用したシリカゲルの細孔構造と何らかの関連があることが予想される。

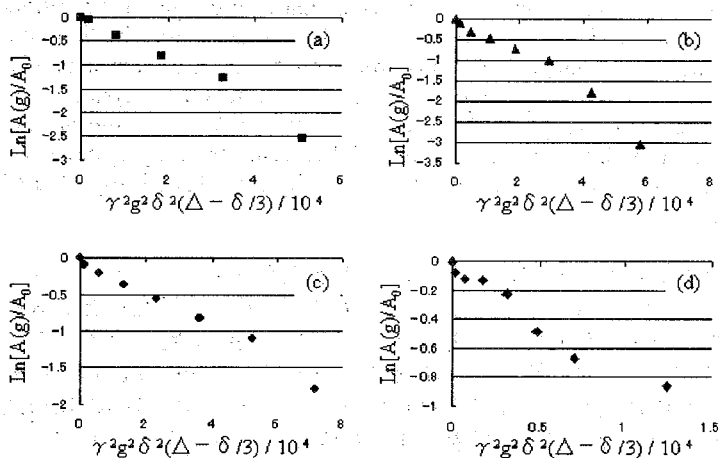


Fig.2 Signal attenuation plots from PFGSTE NMR diffusion experiments of hyperpolarized xenon. (a) $\Delta=0.1\text{ms}$, (b) $\Delta=0.3\text{ms}$, (c) $\Delta=0.5\text{ms}$, (d) $\Delta=1.0\text{ms}$

また、Xe の根平均二乗距離がシリカゲルの粒子径より大きくなる $10 \sim 100 [\text{msec}]$ において同様にプロットすると、信号減衰はほぼ直線となり、拡散成分は1成分であることが示唆された(Fig.3)。これは、バルクのXe ガスに由来すると考えられる。今後は、構造が規則的でサイズ分布の異なるサンプルを選択するとともに、細孔の構造に関連するパラメータに関して詳細な検討を行う予定である。

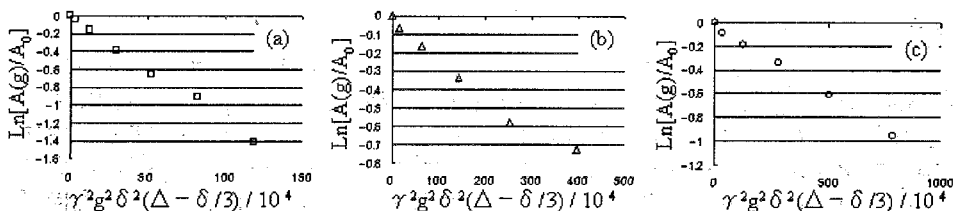


Fig.3 Signal attenuation plots from PFGSTE NMR diffusion experiments of hyperpolarized xenon. (a) $\Delta=10\text{ms}$, (b) $\Delta=50\text{ms}$, (c) $\Delta=100\text{ms}$

【参考文献】

- (1) 若山哲也、木村敦臣、藤原英明、第42回NMR討論会要旨集 pp158 (2003)
- (2) 齋藤公児、藤原英明、木村敦臣、第42回NMR討論会要旨集 pp424 (2003)
- (3) R.W. Mair, P.N. Sen, et al., *J. Magn. Reson.*, 156, 202-212 (2002)

固体 NMR による茶カテキン類と脂質膜との相互作用の解析
 (静岡県大食栄¹、横浜国大院工²、姫路工大理³、三井農林食総研⁴)
 ○熊澤茂則¹、加治屋勝子¹、内藤晶²、芥藤肇³、辻暁³、谷生道一³、
 鈴木壯幸⁴、南条文雄⁴、中山勉¹

Studies on interaction of tea catechins with lipid bilayers by solid-state NMR

¹School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

²Graduate School of Engineering, Yokohama National University

³Department of Life Science, Himeji Institute of Technology

⁴Food Research Laboratories, Mitsui Norin Company

Shigenori Kumazawa¹, Katsuko Kajiya¹, Akira Naito², Hazime Saito³, Satoru Tuzi³, Michikazu Tanio³, Masayuki Suzuki⁴, Fumio Nanjo⁴, and Tsutomu Nakayama¹

The biological activities of tea catechins evaluated by *in vitro* experiments reflect various chemical factors such as the affinity for cell membranes and the amount incorporated into the lipid bilayers. We investigated that interaction of tea catechins with lipid bilayers measured with liposome systems to estimate their affinities for cell membranes. However, the interaction of catechins with membranes has not been directly observed, and the site and the orientation of catechins in membranes of phospholipids have been unknown. We studied the interaction of epigallocatechin gallate (EGCg) with model membranes by solid-state ³¹P and ²H NMR spectroscopy. Further, we investigated the molecular orientation of EGCg in membranes using the magnetically aligned phospholipids bilayers (bicelles).

【序論】緑茶に含まれるカテキン類は、抗酸化作用、ガン細胞増殖抑制作用、インフルエンザウイルスの不活化、O-157 やピロリ菌を含む広範囲な細菌に対する抗菌活性などが報告されている。カテキン類の作用機構に関しては、そのターゲットが動物細胞・ウイルス・細菌いずれの場合も、第一段階として細胞膜やリン脂質への作用（吸着や取り込み）が考えられる。しかし、この作用機構に関する研究は少なく、カテキン類の脂質膜への親和性や生体膜中での状態が明らかになれば、細胞内動態や生理活性機構の解明が一段と進み、機能性成分としてのカテキン類の利用がさらに拡大すると考えられる。

我々はすでに、リポソームを用いてカテキン類の脂質膜への取り込み量を測定する方法を開発し、報告した¹⁾。そして、この方法を応用して、カテキン類の脂質膜における位置や膜の物性に対する影響も一部調べることができた^{2,3)}。しかし、カテキン類が脂質膜中で、どのような状態で存在しているか点については依然不明のままであった。

そこで、本研究では茶カテキン類と脂質膜との相互作用を、さらに詳細に解明することを目的に、固体 NMR を用いて解析を行った。

【実験方法】

茶カテキンとして、代表的な成分の一つであるエピガロカテキンガレート(EGCg: epigallocatechin gallate)を用いた。なお、²H-NMR 測定のため、別途 EGCg の 4 位を ²H でラベル化した ²H-EGCg ([4-²H]EGCg) も化学合成した(Fig. 1)。これらの EGCg 試料を、中性リン脂質 DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) より調製したリポソームに組み込み、固体 ³¹P-NMR および ²H-NMR を測定した。さらに、脂質膜に取り込まれた EGCg の分子配向情報を得るため、自発磁場配向膜の一種であるバイセル膜を用いた解析も試みた。バイセル膜は 2 種類のリン脂質 (DMPC : DHPC=3 : 1) を用いて調製した。なお、すべての固体 NMR 測定は Chemmagnetics CMX-400 を用いた。

キーワード：カテキン、リポソーム、脂質膜、固体 NMR、バイセル

くまざわ しげのり、かじや かつこ、ないとう あきら、さいとう はじめ、つじ さとる、たにお みちかず、すずき まさゆき、なんじょう ふみお、なかやま つとむ

【結果と考察】

脂質側の変化を調べるため、 ^{31}P の NMR を測定し、これらの異方性を観測した。膜の構成成分である DMPC のみの場合に比べ、EGCg 添加により ^{31}P -NMR スペクトルの線幅の減少を確認した。これは、EGCg が脂質膜中に存在することによって脂質のリン酸基の運動性を変化させていることを示している。この ^{31}P -NMR の結果より、EGCg は膜表面に付近に存在して、リンの運動性に影響を及ぼしていることが考えられた。

次に、脂質膜中における EGCg の状態を明らかにするため、 ^2H でラベルした EGCg ($[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$) をプローブにして ^2H -NMR を測定した。 $[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$ だけの場合と DMPC リポソームに $[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$ を組み込んだ場合の固体 ^2H -NMR スペクトルを比べ、四極子分裂幅が $[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$ だけの場合よりも小さくなっていることを観測した (Fig. 2)。この ^2H -NMR の結果からも、EGCg は確実に膜に作用していることが明らかとなった⁴⁾。

さらに、 $[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$ を組み込んだバイセル膜の固体 ^2H -NMR スペクトルは、パウダーパターン⁵⁾の垂直成分に相当する配向線のみを示した。この結果より、 $[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$ は膜に対して 1 種類の分子配向を示すことが明らかになった。また、 ^2H -NMR 測定の際、四極子エコー法におけるパルス系列の τ の遅延時間を様々に変えて測定したところ、固体 ^2H -NMR スペクトルの分裂幅に変化が認められたため、 $[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$ と膜との結合の強さに分布があることも判明した。さらに、脂質膜に結合した $[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$ は、 $\text{C}-^2\text{H}$ が運動の対称軸である膜法線から 48 度傾いて回転する動的に配向した状態をとることも明らかになった。

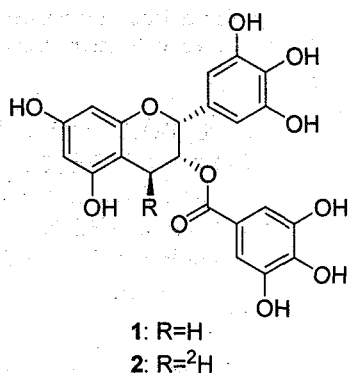


Fig. 1. Structures of EGCg (1) and $[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$ (2).

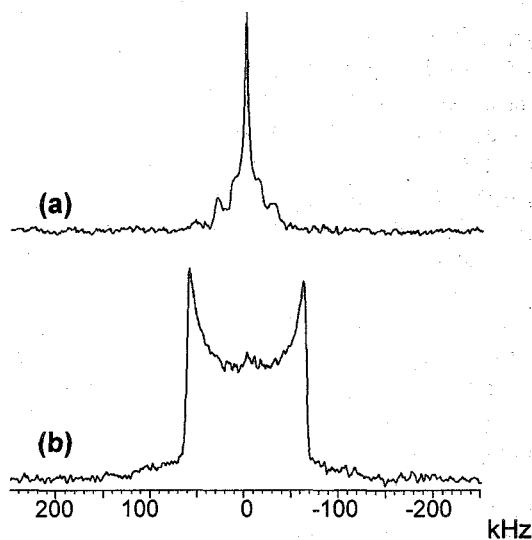


Fig. 2. ^2H -NMR Spectra of $[4\text{-}^2\text{H}]\text{EGCg}$ in the DMPC liposomes (a) and solid phase (b).

【参考文献】

- 1) T. Hashimoto, K. Kumazawa, F. Nanjo, Y. Hara, and T. Nakayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2252-2255, 1999.
- 2) K. Kajiyama, S. Kumazawa, and T. Nakayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2638-2643, 2001.
- 3) K. Kajiyama, S. Kumazawa, and T. Nakayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2330-2335, 2002.
- 4) S. Kumazawa, K. Kajiyama, A. Naito, H. Saito, S. Tuzi, M. Tanio, M. Suzuki, F. Nanjo, E. Suzuki, and T. Nakayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 260-265, 2004.

(東工大院理工) ○松井政徳、山根祐治、黒木重樹、安藤勲、付凱、渡辺順次

Diffusion process of gases in polyester having channel cavities as studied by field-gradient NMR method
(Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology)
Masanori Matsui, Yuji Yamane, Shigeki Kuroki, Isao Ando, Kai Fu and Junji Watanabe

Diffusion coefficients of probe methane and ethane molecules in the direction parallel and perpendicular to the cylindrical channel cavity axis have been successfully measured by pulsed field-gradient spin-echo ^1H NMR method, in order to elucidate the inside nature of the cylindrical channel cavity from the diffusion coefficients. From these experimental results, it is found that diffusional behavior of methane and ethane molecules is strongly restricted by channel cavity. Further, as probe methane and ethane molecules diffuse in the direction perpendicular to the cylindrical channel cavity axis, it is suggested that the wall of cylindrical channel cavity takes some defects. Then it is found that probe ethane molecules are difficult to go through the defects in the wall of the cylindrical channel cavity compared with probe methane molecules.

【緒言】 高磁場勾配発生プローブシステムを用いることにより、極めて小さな拡散係数 $10^{-11}\text{cm}^2/\text{s}$ の計測が可能になり、この高磁場勾配 NMR 法は高分子の拡散過程を研究するための有力な手法であることを示してきた。本研究では磁場勾配 NMR 法を用いてスマートメンブレン材料の新しい解析法の開発を行った。

スマートメンブレンとして大きな発展の可能性の高い、炭素数 (n) が 12 以下の n -アルキル側鎖を有する poly(*p*-biphenylene terephthalate) (PBpT-On) (図 1) は、剛直な芳香族主鎖と柔軟な n -アルキル側鎖との相互作用によりカラムナー相、ネマチック相、等方相を形成する。なかでもカラムナー相は、直径約 3 nm のチャンネルキャビティーを有することが明らかになっている¹。そこで、

本研究では、チャンネルキャビティーの性質・機能を明らかにするために、PBpT-O12 のカラムナー相のチャンネルキャビティー内部にプローブ分子としてメタン分子およびエタン分子を充填し、高磁場勾配 NMR 法を用いて、チャンネルキャビティー内部のプローブメタン分子およびエタン分子の拡散係数の計測を行った。特に、本研究においてはチャンネル軸に平行および垂直方向に拡散するプローブメタン分子およびエタン分子の拡散係数を通してチャンネルキャビティー内部の高精度解析を行っている。

【実験】

拡散係数の計測には磁場勾配 (最大 1100 G/cm) 発生プローブシステムを装備した Bruker 社製 DSX-300 NMR 分光器 (共鳴周波数 300 MHz) を用い、パルス磁場勾配スピネコー (PFGSE) ^1H NMR 法より行った。拡散係数は、

$$\ln[A(G)/A(0)] = -\gamma^2 G^2 \delta^2 D (\Delta - \delta/3) \quad (1)$$

の関係から決定した。 ^1H の化学シフトは部分的に重水素化された H_2O の信号 (4.72 ppm) を TMS 基準に換算した。

測定に用いた高配向 PBpT-O12 はネマチック液晶下 (160°C) において延伸した後、室温で放冷し、繊維状にし、チャンネル軸を繊維軸と同方向に配向させた。そして、繊維軸が NMR 管に対して平行および垂直に向くように置き、チャンネル軸に平行および垂直方向に拡散するプローブメタン分子およびエタン分子の拡散係数の計測を行った。プローブメタン分子およびエタン分子

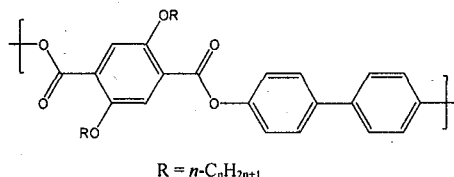


Fig. 1 Structure of poly(*p*-biphenylene terephthalate) with long n -alkyl side chain attached to the terephthalate moiety.

【keywords】 高分子エステル、チャンネルキャビティー、磁場勾配 NMR、拡散係数

まついまさのり、やまねゆうじ、くろきしげき、あんどういさお、ふがひ、わたなべじゅんじ

は、高配向 PBpT-O12 を真空ポンプで吸引した後、メタンガスおよびエタンガスを注入しチャンネルキャビティーに充填させた。

【結果・考察】 図2は室温、 $\Delta = 6$ ms、 $\delta = 2$ ms、 $G = 0 \sim 1100$ G/cm で測定されたチャンネル軸に垂直方向に拡散しているプローブメタン分子のPFGSE ^1H NMR スペクトルである。 $G = 0$ G/cm のスペクトルにおいて、2.5 ppm に繊維間に存在するメタンガスの信号と0.5 ppm にチャンネル内部のプローブメタン分子の信号が現われた。プローブメタン分子の信号は G が増加するにつれ徐々に減衰している。これは、チャンネル内部でプローブメタン分子がチャンネル軸に垂直方向に拡散していることを意味する。図3は、 $\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ に対して0.5 ppmの信号の強度比 $\ln[A(G)/A(0)]$ のプロットである。この直線の傾きから決定した拡散係数 D_{\perp} は 0.65×10^{-7} cm^2/s である。また、室温および $\Delta = 6$ ms において計測されたチャンネル軸に平行方向に拡散しているプローブメタン分子の拡散係数 D_{\parallel} は 4.2×10^{-7} cm^2/s である。これらの値はメタンガスの拡散係数 0.22 cm^2/s と比較すると非常に小さな値である。このことから、チャンネルキャビティー内部でメタン分子の拡散は強く束縛されていることが明らかになった。また、 D_{\parallel} が D_{\perp} に比べて約6倍大きいことは、チャンネル内部のプローブメタン分子の拡散が異方的であることを示す。また、チャンネル軸に垂直方向に拡散することから、プローブメタン分子は隣接するチャンネルキャビティーに移動していることが明らかになった。さらに、これはチャンネルの壁にメタン分子が通過できるサイズの欠陥が存在していることを示唆している²。

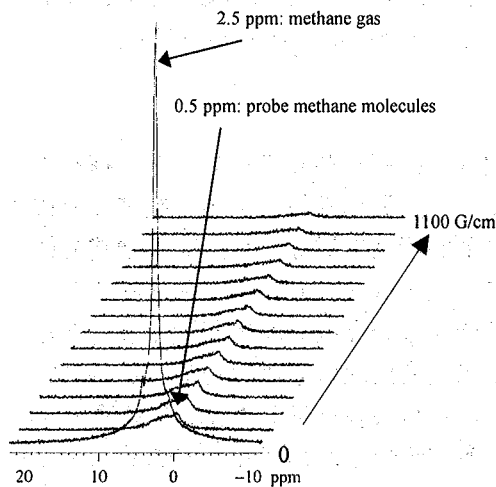


Fig. 2 PFGSE ^1H NMR spectra of probe methane molecules in the direction perpendicular to the cylindrical channel cavity axis on $\Delta = 6$ ms by varying field-gradient strength (G) at 25°C .

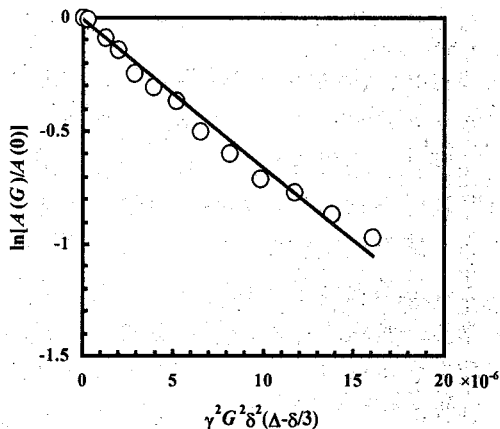


Fig. 3 Diffusional spin echo attenuation of probe methane molecules in the direction perpendicular to the cylindrical channel cavity axis on $\Delta = 6$ ms by varying field-gradient strength (G) at 25°C .

室温において、 $\Delta = 6$ ms で計測されたチャンネル軸に垂直方向に拡散しているプローブエタン分子の拡散係数 D_{\perp} は 0.095×10^{-7} cm^2/s である。一方、平行方向の拡散係数 D_{\parallel} は 2.9×10^{-7} cm^2/s となり、プローブメタン分子の拡散係数と比較すると両方向とも拡散係数が小さくなっている。特に、チャンネル軸に垂直方向のプローブエタン分子の拡散係数は小さくなる。このことから、プローブエタン分子はプローブメタン分子と比較するとチャンネルの壁の欠陥を通過しにくくなり、隣接するチャンネルキャビティーに移動することが困難になることが明らかになった。また、プローブメタン分子の拡散の異方性は $D_{\parallel} / D_{\perp} = 6.5$ であるが、プローブエタン分子の異方性は $D_{\parallel} / D_{\perp} = 31$ となり非常に大きくなっていることが明らかとなった。

- 【References】 1) K. Fu, N. Sekine, M. Sone, M. Tokita and J. Watanabe, *Polymer J.*, **34**(2002)291.
2) M. Matsui, Y. Yamane, S. Kuroki, I. Ando, K. Fu and J. Watanabe, *J. Mol. Struct.*, in press(2004).

Structure and Dynamics of Water-Cluster Constructed in Microporous Cobalt Complex Crystals

(Univ of Tsukuba, Osaka City Univ, Kyushu Univ, Osaka Univ)

S. Ishimaru, R. Nakamura, M. Tadokoro, Y. Nagao, H. Kitagawa and K. Nakasuji

Dynamics of water molecules included in crystals of a Co-complex compound [Co(Hbim)₃](TATC) was studied by solid-state ²H NMR. The ²H NMR spectrum at room temperature showed an extremely narrowed peak indicating liquid-like behavior of the water molecules in the compound. Molecular motions of the ²H₂O in the specimen seemed to freeze around 250 K.

【序】

細孔性固体はその体積に比して非常に大きな容積及び表面積をもち、様々な分子を取り込むことが出来るため、エネルギー貯蔵用媒体、不均一触媒などに応用され活用されている。また、異方性の高い細孔空間は、バルクの物質では実現困難な新しい物性を発現させるための物質設計場としても注目を集めている。細孔性固体にはポーラスガラスや活性炭などの非晶質固体やゼオライトなどの無機高分子が良く知られているが、近年、金属錯体を用いた新しい細孔性物質が合成され、研究が進められている。これらの物質は、上記の無機高分子固体とは異なり、フレキシビリティの高い有機配位子を用いていることにより動的に細孔サイズや形状を制御できるという優れた特質を持っている。

田所らは、細孔性コバルト錯体 tris(2,2'-biimidazolate) cobalt (III) 1,3,5-benzenetricarboxylate・7水和物 ([Co(Hbim)₃](TATC)・7H₂O)を新たに合成し、この錯体結晶中に存在する結晶水がコバルト錯イオンとアニオンによって形成される一次元細孔内で鎖状構造をとっていることを明らかにした。この細孔中における水分子は4核クラスターを形成し、スピロタイプの一次元鎖構造をとっており、各々の水分子は4面体の各頂点にディスオーダーしたプロトンが存在する。そこで本研究では、重水素化した[Co(Hbim)₃](TATC)・7H₂Oを取り上げ、結晶中に存在する水分子のディスオーダーに関する詳細な情報を得るために²H NMR スペクトル測定を行ない、水分子の動的挙動に関して検討した。

【実験】

試料は重水中で合成を行ない、 $[\text{Co}(\text{}^2\text{Hbim})_3](\text{TATC}) \cdot 7\text{}^2\text{H}_2\text{O}$ を得た。得られた試料は、少量の重水とともにガラス管に封入し、NMR測定試料とした。

${}^2\text{H}$ NMR測定はBruker社製MSL-300 NMRシステムを用い、160 Kから293 Kの温度範囲で行なった。

【結果と考察】

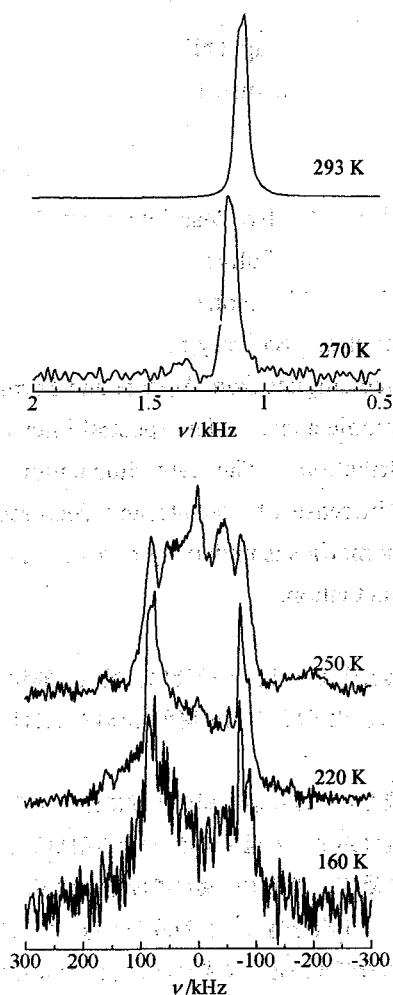


Fig. 1 Temperature dependence of ${}^2\text{H}$ NMR spectrum measured on polycrystalline $[\text{Co}(\text{}^2\text{Hbim})_3](\text{TATC}) \cdot 7\text{}^2\text{H}_2\text{O}$.

得られた ${}^2\text{H}$ NMRスペクトルの温度変化の様子をFig. 1に示す。室温(293 K)では、スペクトルは先鋭化した一本の吸収線を示し、細孔中の水分子が液体と同様に速い等方的回転、並進拡散を行なっていることが明らかとなった。また、吸収線が一本のみ観測されたことから、結晶外部に存在する少量の水と結晶細孔内の水の間には速い交換が起こっていることが示唆される。270 K付近では、中央の先鋭化した吸収線に加えて、非常に幅の広い成分が観測された。幅の広い成分の線幅はほぼ重水水の ${}^2\text{H}$ NMR線幅に一致しており、結晶外部の自由水が凍結したものと考えられる。また、中央のシャープなピークの化学シフト値が室温でのスペクトルのそれとは異なっているが、これは結晶外部の水との交換が遅くなったためではないかと考えられる。220 K以下では線形の変化は見られず、その線幅及び線形からrigidな重水分子に帰属することができる。

また、160 Kでは磁化の回復が非常に遅く、縦緩和時間は100秒程度になっているものと推測された。

3P090

SQ, DQ-NMR による唾液成分の *in situ* スペクトル測定
若年健常女性の日内変動の解析

○ 高橋征三¹, 井村桂子¹, 荻野孝史², 山口行治³

1 日本女子大学理学部物質生物科学科、2 国立精神神経センター神経研究所、3 ファイザー (株) クリニカルテクノロジー部

In situ SQ- and DQ-NMR Spectra of Metabolites in Saliva. Analysis of Daily Fluctuation in Healthy Young Females.

Seizo Takahashi¹, Keiko Imura¹, Takashi Ogino², Yukiharu Yamaguchi³

1. Dept. Chem. & Biol. Sci., Japan Women's Univ. 2. Natl. Inst. Neuroscience, NCNP, 3. Dept. Clinical Technologies, Pfizer Inc.

High-resolution SQ- and DQ-¹H NMR of fresh and intact saliva was investigated to get insight into the intra/inter variance of healthy young females. Saliva of over 300 samples was collected for a model system of "drug response" to internal hormones. Signal intensities varied with time as well as the presence of macromolecules. Salivary pH did not affect to the chemical shift of organic acids. DQ-spectra observed singlets from Acetate and Formate. The results suggest the interactions of them with macromolecules. The spectral intensities among samples scattered following a log-normal distribution. The daily fluctuation was larger in DQ- than in SQ-spectra, such as the mean increase of lactate and decrease of acetate after meal. Multivariate analysis such as Chemometrics is underway to overcome the large variance among samples comparing to the mean fluctuation.

月経周期はホルモンという一種の生理活性物質による生理反応である。本研究は、唾液が薬物応答のバイオマーカーとして使えるかどうかを検討すると同時に、生理反応の個体間/個体内における変動の理由を理解することを目的とした。

唾液はほとんどが体内に再吸収されるという意味で、体液としては血液と尿の中間に位置する。しかし唾液成分は変動が大きいだけでなく、唾液中の薬物濃度は必ずしも血中濃度と比例関係にないことから、あまり診断材料としては使われない。いっぽう血中濃度と組織中の薬物濃度との関係はほとんど知られていないことも事実である。唾液は、唾液腺という組織を通して血液成分が選択的に通過する系であると考え、体内組織や器官中の薬物動態を探るモデル系として考えることができよう。

唾液は有機酸などの低分子だけでなく、アミラーゼなどの高分子も同時に分泌されている。しかし従来、唾液の NMR ではこれらの高分子の存在はまったく無視されていた。これらの高分子成分は低分子成分と何らかの相互作用すると考えられ、我々ではできるだけ唾液を無処理で測定し、唾液が脳組織等の MRS を理解するモデル系として使うことを試みた。分泌された高分子成分の一部は時間とともに変成し沈澱する。そういう意味で無処理の唾液は生体系の NMR と同等の難しさがある。

キーワード: 唾液、二量子遷移、相互作用、対数正規分布、日内変動

(実験) 20-24 才の健常な女性 30 人を選び、毎日の基礎体温のデータから高温期と低温期に各 1 回ずつ 1 日 5 回、合計 300 の唾液を採取した。採取時間は以下のとおりである。

1. 6:30-8:00
2. 10:00-10:40
3. 11.30-12:00
4. 13:00-13:30
5. 15:00-15:30

唾液はサリベット™を用い、綿に唾液を十分に浸潤させたあと、3000rpm で遠心してろ液を集めた。潜血や pH の測定は試験紙を用いた。ろ液は 5mm の NMR 試料管に 380uL 秤取し 20uL の重水を入れ、Bruker AMX-400WB で測定した。標準的な測定条件はつぎの通りである。

NS=64, TR=5s, TD=16K, FR=400MHz, SW=10ppm, TE=298K

[結果と考察] 1. 経時変化

図 1 に示すようにスペクトル強度は 2 日にわたって増大した。この試料はサリベットを通さずに唾液を直接に NMR 試料管に入れて測定したが、試料は時間とともに沈殿を生じた。試料中の高分子成分を超速心で除去すると、スペクトル強度の変化は見られなかった。サリベットを通すと強度変化はやや緩やかになった。また同一サンプルについて SQ と DQ スペクトルを交互に測定した結果、スペクトルの挙動は必ずしも平行関係にないことを確認した。この結果から、唾液試料は採取後から測定までの時間が強度の再現性を得るために重要な因子となることが分かった。

図 1 (b) の DQ スペクトルで一番大きい信号は酢酸メチル基の信号を示す。つまり唾液中では SQ でしか観測されないはずの singlet ピークが観測された。この結果は、唾液中の酢酸が高分子成分と動的な磁気交換をすることを意味する。ギ酸についても同様の結果を得た。

2. pH 測定

唾液の pH は主に唾液中に分泌される重炭酸イオンの濃度に支配されることが知られている。pH の測定は試料作成の時間的制約から pH 試験紙を用いた。図 2 に示す通り、新鮮な唾液では pH 変化に対して酢酸メチル基の化学シフトは有意な変化を示さなかった。

コントロール実験として唾液に NaOH と HCl で滴定した結果に Hill 係数を入れた Henderson の式にフィットしたものを曲線で示す。溶液中の酢酸に比べて pKa は約 0.4 高く、Hill 係数は約 1.5 であった。

この結果は、唾液中の酢酸が高分子と強く結合し、観測される化学ソフトが大きく影響されることを意味する。同様な結果はギ酸においても観測された。

3. 化学シフトの分布

300 個の NMR スペクトルについてデータの分散を調べる

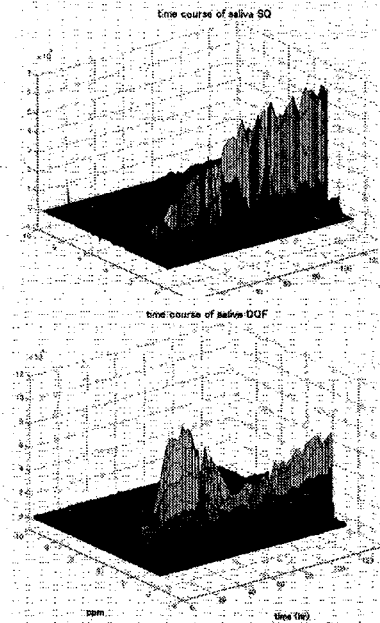


Fig. 1 Time dependent intensity change over 2 days of (a) SQ and (b) DQ spectra. Note that the largest peak is derived of acetate methyl.

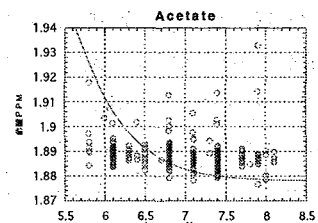


Fig.2 Chemical shift of acetate methyl resonance against pH difference of salivary samples.

ために matNMR を使ってピーク解析を行い、ピーク位置および強度 Excel に集計した。その結果の一部を使い JMP で統計解析を行った。

NMR 測定は水のピーク位置を基準にして化学シフトを補正した。分布は正規分布から系統的なズレが観測されたが、酢酸のメチル基のヒストグラムは2種類か3種類の分散と平均から構成されているように見える。正規分布からの系統的なズレはすべてのピークにおいて観測された。つまりこの結果は、唾液中の成分は2種類以上の環境下にあることを示唆する。

4. 強度分布

図 4 は上に正規分位点プロットを、下に酢酸メチル基の強度のヒストグラムを示す。(a)の横軸は強度の値に比例したスケールで示し、対数正規分布でフィットした曲線を挿入した。(b)は同じデータについて横軸を強度の対数値に比例したスケールで示した。(b)の正規分位点のプロットから、酢酸の強度分布は対数正規分布に従うことが示された。この結論は、解析したすべてのピークについて成り立っていた。さらに aliphatic 領域の積分値について解析したところ、正規分布と対数正規分布の中間にあった。この事実は、ノイズは正規分布に従い代謝物質の濃度は対数正規分布に従うことで理解できる。

したがって生理条件下における生体反応は、細胞内物質の濃度でなく相対濃度に比例してフィードバックコントロールを受け、代謝されている、という結論になる。さらに重要なことは、複数のサンプルからの観測値の平均は、相加平均でなく、相乗平均すべきことである。aliphatic 領域の解析から、実験精度が推定できる場合は、相乗平均と相加平均の convolution を行った方がより望ましい。この結論は、多くの動物実験におけるデータ解析に再検討を迫ることになる。相加平均を使うと、平均値は常に大きめに評価され、ほとんどの場合、分散分析は無意味な結果を与えるからである。

5. aliphatic 領域の主値解析

周波数領域でピークが観測される領域を選択した。この領域には高分子成分からの信号も含まれていると考えられる。これらを分離しないで、スペクトル全体についてサンプルの傾向を掴むために MATLAB のアプリケーションプログラム PLS_Toolbox を使用して主値解析を行った。4 の結果から、スペクトルの強度は予め対数変換を行ったが、主値解析には影響しないことが分った。

図 5 に示すように、サンプルを高温期と低温期の2群に分けたとき、両者に有意の差は見られなかった。両群とも共通したパターンが見られたが、これは唾液を採取した時期、つまり気温が影響した

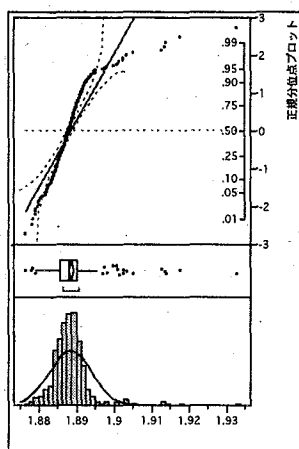


Fig.3 Distribution of chemical shift of acetate methyl.

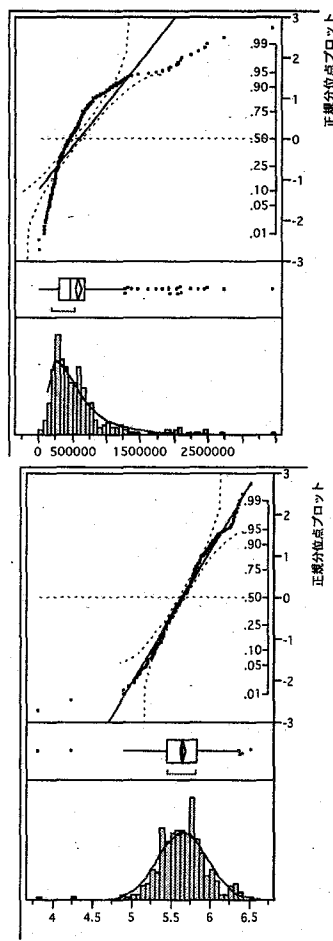


Fig.4 Distribution of intensities of acetate methyl under (a) normal and (b) log scale.

ものと思われる。基礎体温にも外気の変動の影響が観察された。つまり被験者の経験する気温が生理反応の変動要因となることを示唆する。

6. SQ と DQ の強度の解析

図1に示したように、唾液中ではDQでも酢酸やギ酸のピークが明瞭に観測される。DQスペクトルは積分強度がゼロになるので、絶対値表示のもとでの面積強度を評価した。

DQスペクトルも強度は対数正規分布に従った。そこで対数強度の相関をとると相関係数は0.73であった。つまりSQの信号強度とDQの信号強度が比例するという当然の傾向が伺われた。つぎにそれぞれの信号強度と強度比の相関を調べたところ、図6に示すように、SQとの相関が0.08にたいしてDQとの相関は0.72であった。また強度比の平均から唾液中の酢酸のDQスペクトル強度はSQの5%弱であることがわかる。

この結果から、SQとDQの信号強度比はSQの信号強度とはまったく独立の情報を与えると期待される。この信号強度比は唾液中の物質が高分子成分と相互作用している程度を伝えるレポートになるかもしれない。

7. 今後の展望

一般にNMRで生体内の薬物の信号を直接捉えることは期待できない。しかし薬物応答の結果は代謝物の量的変動として現れ、しかも特定の代謝物でなく代謝物全体の摂動として現れる可能性が高い。NMRは未知の物質を含めて多成分を同時に定量できるだけでなく、限定的ではあるが無侵襲的に臓器や組織内の成分を測定できる要素技術はすでに存在する。

今回の結果からも明らかのように、単純な統計解析では個体間/個体内変動を越えて月経周期と同期した成分の変動を捉えることが極めて難しい。本研究では300サンプルという多数の試料を、制御された環境下で収集した。今回のデータから目的の有意な結果を出すためには、従来の統計解析を越えた新しいアプローチが必要となろう。

現在、従来のピーク解析による成分分析が進行中であるが、一方で主値解析に代表される Chemometrics による多変量解析や、作業仮説モデルによる制限条件つき最少自乗法を試みる予定である。高次元の位相空間内で個体を定義し、個体の薬物応答を位相空間の座標変化で追跡するモデル構築が今後の大きな課題である。

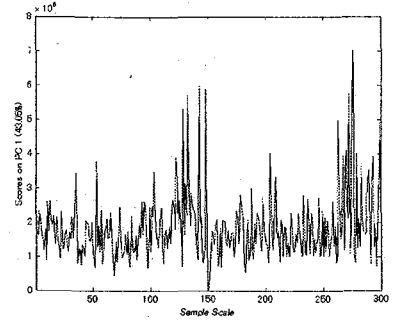


Fig.5 PCA analysis of aliphatic region of samples. Group of 1-150 belongs to high temp., while the rest to low temp period of menstrual cycle.

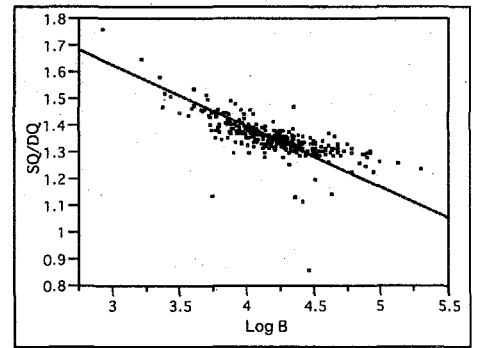
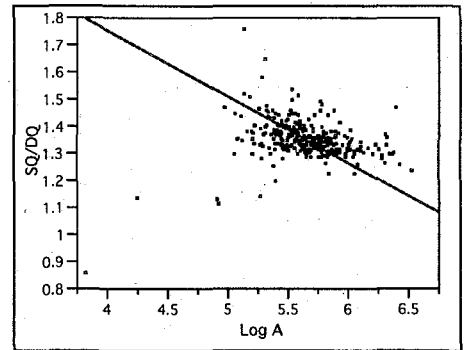


Fig.6 Correlation of intensity ratio SQ/DQ against (a) SQ and (b) DQ intensity. SSQ is -0.04 and -0.72, respectively.

Low Dimensional Lattice Diffusion in Solids Investigated by
 Nuclear Spin Transverse Relaxation Time Measurements:
 Analysis of NMR Spin Echo Amplitudes by Superoperator Fourier Spectrum Method

Naoki Asakawa, Kiyohiko Matsubara, and Yoshio Inoue
 Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology,
 4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, JAPAN,
 email: nasakawa@bio.titech.ac.jp, Phone: 045-924-5796, FAX:045-924-5827

We have explored internal local magnetic field gradients (ILMFGs) in solids by nuclear magnetic resonance (NMR) transverse relaxation time measurements. The Fourier-spectral method was employed in order to solve the Bloch-Torrey equation with arbitrary magnetic field gradients in one- and two-dimensional lattice restrictions.

緒言

固相での輸送現象は材料の物性を決める重要因子の一つである。例えば物質拡散を例に挙げると、気体透過膜、発砲材料、細胞培養用基材、オイルシールなどのポラス材料中の物質輸送や、イオン伝導体・パイ共役系高分子などの導電材料中での電荷輸送あるいは励起子の拡散や、フェルミ液体あるいは朝永-ラッティンジャー液体といった量子液体などである。また、構造不整や準秩序構造の動的構造変調波や、空孔拡散のような格子欠陥の拡散も輸送現象の一種である。後者の方は物質拡散ではなく、分子構造などの情報の拡散といえることができる。

我々は、固相での輸送現象を調べるために、原子核のスピン状態間のコヒーレンスの寿命、すなわち横緩和測定により輸送現象をとらえるをこと試みてきた¹。本発表では、拡散の次元性の違い、試料に印加または内在する磁場勾配の関数型などが NMR スピンエコー強度にどのような影響を及ぼすのかを調べるために、超演算子フーリエスペクトル法によるスピンエコー強度の理論およびシミュレーションプログラムを作成したので報告する。

理論・実験

拡散を考慮したスピン系の振舞いは Bloch-Torrey 方程式として知られている偏微分方程式を数値的に解く必要がある²。例えば、二次元拡散の場合の例を 1 式に示す。

$$\frac{\partial M}{\partial t} = \tilde{D}_{x0} \frac{\partial^2 M}{\partial \tilde{x}^2} + \tilde{D}_{y0} \frac{\partial^2 M}{\partial \tilde{y}^2} - i\tilde{\gamma} f(\tilde{x}, \tilde{y}) M(1)$$

ここで、M は磁化、 D_0 は拡散係数、 (x, y) は二次元空間内の座標、 γ は磁場勾配、 $f(\tilde{x}, \tilde{y})$ は磁場勾配の関数

型である。チルダ記号は問題を一般化するために無次元化されたパラメータであることを示している。変数のアンダーフローの問題や差分方程式に変換した場合の解の安定性の問題から、実空間では解くのが困難であったので、空間フーリエ空間で解くことを試みた。その際に、磁場勾配の関数型 $f(\tilde{x}, \tilde{y})$ と磁化の k 番目のフーリエ成分との畳み込み積分を計算する必要が生じた。通常この畳み込み積分は変換法などの操作により簡便に計算されるが、スピンエコー実験の場合には任意の時間での時間発展演算子として予め計算しておくことが好ましい。この要請により、本シミュレーションでは畳み込み積分を直接計算することとした。プログラムは Message Passing Interface (MPI) 法による並列化を行なった C++ 言語により書かれ、計算時間の節約を試みた。

結果・考察

問題を一般化するために無次元された拡散係数 ($\tilde{D}_0 = D_0 \tau / L_0^2$; τ : CPMG エコー時間、 L_0 : 制限距離) に対して Carr-Purcell Meiboom-Gill (CPMG) スピンエコーの減衰指数をプロットすると、減衰挙動の現象論から三つの領域 (拡散支配領域、局所化領域、運動平均化領域) に分けられることがわかる。その領域のうち、局所化領域での緩和指数プロファイルは拡散の次元性や磁場勾配の関数型の違いにより大きく影響を受けることがわかった。

Fig. 1 に拡散の次元性がスピンエコー減衰指数に与える影響を示す。拡散は各次元で等方的であると仮定した。磁場勾配は $0.5 \cos(2\pi x) \cos(2\pi y)$ 型を用い、8 番目の CPMG エコーに対する減衰指数を \tilde{D}_0 に対してプロットした。

*横緩和時間、輸送現象、局所磁場勾配、Bloch-Torrey 方程式、超演算子フーリエスペクトル法
 あさかわなおき、まつばらきよひこ、いのうえよしお

超演算子フーリエスペクトル法による計算は第 16 次までの Fourier 係数を用い、 $\gamma = 10$ の条件で行なった。二次元拡散の場合には、一次元拡散と比べ、局所化領域でのエコー減衰指数が小さいことがわかる。このことより、CPMG 実験をエコー時間の関数として行なうことにより、拡散の次元性に関する情報が得られると期待される。

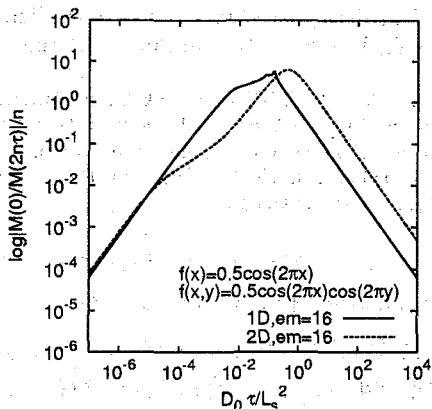


FIG. 1: Effect of dimensionality of diffusion on decay exponent of CPMG spin echo experiments. The eigen modes up to 16th is taken into account and the value of $\tilde{\gamma}$ is set at 10.

次に、Fig.2 に関数型の違いのエコー減衰指数への影響を示す。磁場勾配に対して幾つかの関数型を仮定して計算を行なった。その他のパラメータは Fig.1 と同じである。磁場勾配の次元性により減衰指数が大きく異なる結果となった。二次元の磁場勾配下に試料が置かれる場合には、一次元勾配下の場合と比べ極端に減衰指数が大きくなった。

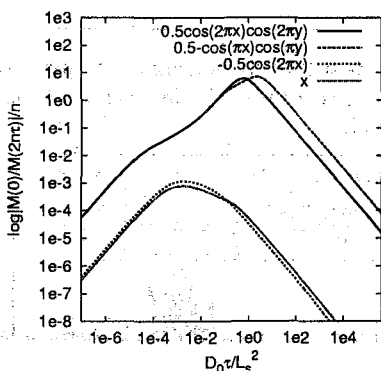


FIG. 2: Dependence of function type of magnetic field gradients on decay exponent of CPMG spin echo experiments

Fig.3 に異方的二次元拡散条件下での関数型の違いがスピネコー減衰指数に与える影響を示す。拡散の異方性が 10^2 より大きくなると減衰指数に二つのピークが観測される。さらに、磁場勾配の関数型の違いにより、局所化領域での減衰指数プロファイルの形状が大きく異なっている。すなわち、拡散係数が既知で拡散の異方性が大きい場合には、磁場勾配の関数型の決定が可能となることを示唆して、固体物質などの内部局所磁場勾配を決定する場合には重要となるだろう。

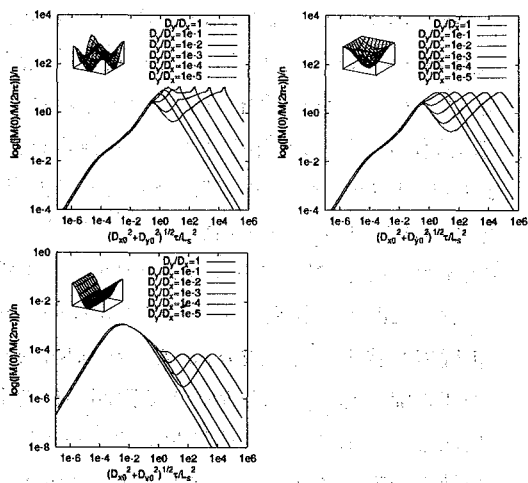


FIG. 3: Effect of anisotropic diffusion on decay exponent of CPMG spin echo experiments. a) $f(x, y) = 0.5 \cos(2\pi x) \cos(2\pi y)$, b) $f(x, y) = 0.5 - \cos(\pi x) \cos(\pi y)$, c) $f(x, y) = -0.5 \cos(2\pi x)$, and d) $f(x, y) = x$.

まとめ

局所化領域での CPMG スピネコー実験を行なうことにより高分子結晶などの固相中に存在する磁場勾配の関数型を決定できることを示唆している。結晶中に存在する周期的な磁場勾配は結晶がもつ周期性、Peierls ポテンシャルなどの性質と関係があると考えられ、実験的に決定することが可能となれば固相の動的な性質を調べる新しい方法論と成り得るだろう。

¹ N.Asakawa, T.Kajikawa, K.Sato, M.Sakurai, Y.Inoue, and T.Yamamoto, *J.Mole.Struct.*, **602-603**, 455(2002).

² S.Axelrod and P.N.Sen, *J. Chem. Phys.*, **114**, 6878(2001).

Development of a PC-Software for NMR-based Metabolic Analysis;
ALICE2 for Metabolome

JEOL DATUM LTD¹, Nippon Medical School², Tohoku University, Graduate School of Medicine³
Kazunori Arifuku¹, Keiko Hirakawa², Kaoru Koike³, Kyoko Uekusa², Masako Fujiwara¹ and
Youkichi Ohno²

We have developed a new software for metabolic analysis by NMR, "ALICE2 for Metabolome". Automated data analysis concerned Absolute Differential Calculus Method (new method) and bucket integration to export into an excel file. To testify this program, the measured ¹H spectrum of kinds of tea samples were processed in batch. The results were analyzed by the chemometric method, which showed that those tea were clearly classified into groups. This program could be useful for metabolic analysis.

NMRスペクトルによる代謝物プロファイリングはメタボローム解析の有力な手法である。一般に生体試料のスペクトルは、多種の低分子代謝物や生体高分子化合物を含むので複雑なパターンを示す。メタボローム解析を目的とする場合は、従来の構造解析とは異なり各々のピークを同定する必要はない。多検体のスペクトル測定を行い、統計的解析を行うことで検体間の構成成分種や比率の相違をパターン（特徴量）として抽出する方法を取る。〈参考文献〉

我々は、NMR処理ソフトウェアALICE2（日本電子製）に改良を加え、全自動メタボローム解析機能を特化した「ALICE2 for Metabolome」を新規開発した。本開発の重要課題の自動化に関してのポイントは位相およびベースライン補正の精度である。従来の手法では多大な時間と労力を必要とする上、位相およびベースライン補正をマニュアルで行うことにより、オペレータのバイアスがかかってしまう危険性がある。今回この解決手法として新たに絶対値微分法（Absolute Differential Calculus Method）によるスペクトル解析手法を開発した。これにより位相およびベースライン補正をすることなく簡易に高品位なスペクトルを得ることができる。また巨大な軽水ピークの影響を最小限にとどめる効果も確認できた（Fig. 1）。この手法の欠点はスペクトル間の相対的な関係は保たれるが絶対的な定量性は

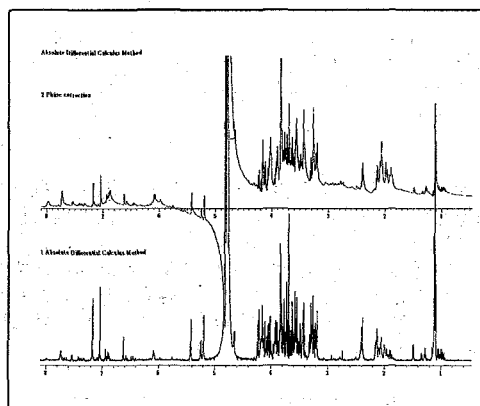


Fig.1 Result of the spectrum by processing ADC (Absolute Differential Calculus Method)

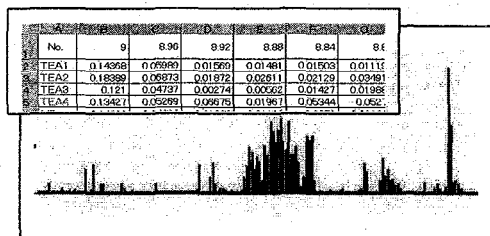


Fig.2 Bucket integration and export to an excel file

キーワード：メタボローム、代謝物プロファイリング、バケット積分、多変量解析

ありふるかずのり、ひらかわけいこ、こいけかおる、うえくさきょうこ、ふじわらまさこ、おおのようきち



失われ、特にブロードなピークの信号強度が極端に減衰してしまうことが上げられる。しかし本研究目的である多検体の解析には非常に有効な手法でありバケット積分等の新技術と組み合わせ (Fig. 2)、データの入力から解析結果の出力 (MS-EXCEL) までの一連の処理を完全自動化し、ハイスループットでの多検体データ処理を可能にした。

またALICE2 for Metabolomeの検証を目的として、複雑な生体試料を解析するための基礎サンプルとしてお茶を用いて実験を行った。(生体試料に対する応用については、発表2P107を参照) 数十種類の市販の茶飲料に重水を10%添加してプロトンNMRを測定した。なお、測定装置はJNM-ECA500 (500MHz 日本電子製)、軽水消去にはpre-saturation法を使用した。代表的な3種類 (緑茶、紅茶、ウーロン茶) を見るとカテキン、カフェイン、多種の糖類を特徴つけるピークが現われ、スペクトルパターンの違いが見て取れる。(Fig. 3) 全てのスペクトルをALICE2 for Metabolomeでバッチ処理し、0.04ppm幅でとった積分値をエクセルファイルにエクスポートする。次段階の多変量解析についてはSirius™ (Pattern Recognition System AS, Norway) ソフトウェアを用いて行う。PCA (主成分分析) を行った結果をFig. 4に示すが、2つの主成分PC1, PC2についてのスコアプロットを作成すると上記3種類の発酵過程の違うお茶間のグループ分けが出てきていることがわかった。以上のようにALICE2 for Metabolomeの基礎的な検証としては満足の行くものであった。さらに生体試料では一般に、含まれる生体高分子化合物が微量で多種のため、スペクトルは変化が複雑になる。これにはバケット積分幅などのカスタマイズで対応が可能である。

<参考文献>

Lindon J., Nicholson JK., Holmes E, etal. Toxicol Appl. Pharmacol 187 (2003), 137-146

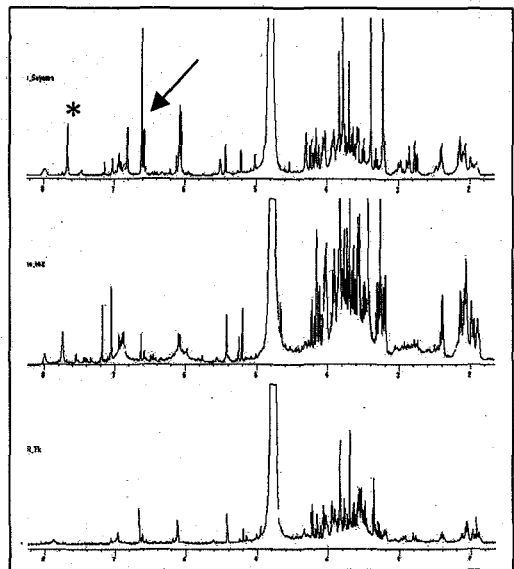


Fig.3) Multi-Spectrum Display: from the top: Green, Black and Oolong tea. The asterisk corresponds to Caffein, the arrow to Catechin. Many amino acids and saccharides peaks are shown in the higher magnetic field

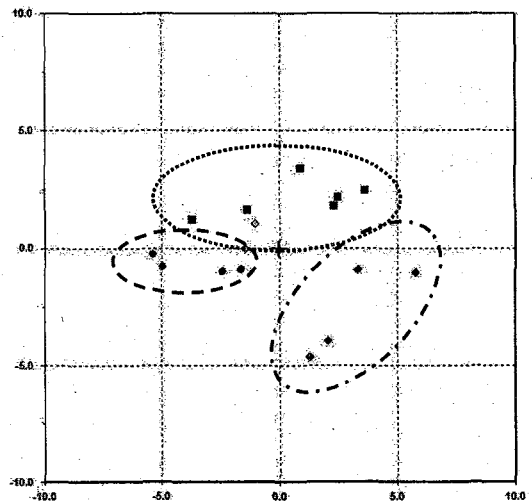


Fig4) PCA analysis (PC1 vs. PC2) for various teas. The score-plot shows each circle corresponds to the group of tea. The upper :black tea, the lower right; green tea, the lower left: Oolong tea.

[謝辞] 多変量解析については安藤一郎氏 (ドゥサイエンス) にお願ひした。

Calculation of nuclear magnetic shieldings using an analytically
differentiated relativistic shielding formula

H. Fukui and K. Kudo

Kitami Institute of Technology

<Abstract>

Two expressions for nuclear magnetic shielding tensor components based on analytically differentiating the electronic energy of a system are presented. The first is based on a second-order Douglas-Kroll-Hess (DKH2) approach, in which the electronic states of the transformed Dirac Hamiltonian are correct to second order with respect to both the nuclear potential V and magnetic vector potential \vec{A} . The second expression is based on the method of Barysz and Sadlej (BS), in which the electronic states are completely correct with respect to V and correct to second order with respect to \vec{A} . The two approaches are applied to the calculation of nuclear magnetic shieldings of hydrogen halides with common gauge origins. Both methods yield similar results except for the shielding of nucleus I.

<Results and Conclusion>

Two analytical differentiation expressions for calculating nuclear magnetic shielding tensor components were derived at the coupled Hartree-Fock (CHF) level. The first approach is based on the second-order Douglas-Kroll-Hess (DKH2) method, and the second approach is based on the method of Barysz and Sadlej (BS). The second method is more exact than the first method. The two approaches were applied to the calculation of nuclear magnetic shieldings of hydrogen halides with common gauge origins. Each shielding of halogen and hydrogen atoms was computed using the two common gauge origins placed at the positions of halogen and hydrogen nuclei. The results are shown in Table I. The dependence of the computed shieldings on the gauge origin was small enough except for σ^{iso} of the proton in HI. Comparison of the results of present two approaches for hydrogen halide shieldings showed that the relativistic corrections of higher than second order are negligibly small except for the paramagnetic shielding of the I nucleus. The present results were found to be consistent with previously reported values for hydrogen halide

化学シフト、相対論的効果、遮蔽テンソル

ふくいひろゆき、くどうけいいち

shieldings, except for large discrepancies for the anisotropy of proton shielding of HI compared to previous reports. The large anisotropy values for proton shieldings of HI shown in the present calculations are not thought to be due to error because the present values are similar for the two different approaches with the two different common gauge origins. Unfortunately, no experimental values for the anisotropy of proton shielding in HI are available for verification. It is concluded that the present two expressions for calculating nuclear magnetic shielding yield self-consistent and reliable results.

TABLE I. Calculation of nuclear magnetic shieldings (in ppm) for HF, HCl, HBr, and HI by the DKH2-CHF and BS-CHF methods.

Molecule	Nucleus	Gauge origin	NR ^a	DKH2-CHF ^b	BS-CHF ^c	BS-FPT-1 ^d	4-RPA ^e
HF	F	F	413.5	419.9	418.5	418.1	423.3
	H	F	28.36	28.14	28.16	28.57	27.87
	F	H	413.5	416.4	420.6	418.1	423.3
	H	H	28.36	28.54	28.53	28.57	27.87
HCl	Cl	Cl	949.9	989.3	982.2	982.1	1020.1
	H	Cl	30.65	31.47	31.40	31.76	31.00
	Cl	H	949.9	984.6	991.4	982.1	1020.1
	H	H	30.65	31.77	31.86	31.76	31.00
HBr	Br	Br	2641.3	3008.6	2999.0	2978.6	3224.6
	H	Br	31.01	36.58	36.50	36.96	36.08
	Br	H	2641.3	3005.1	3002.1	2978.6	3224.6
	H	H	31.01	36.86	36.77	36.96	36.08
HI	I	I	4539.8	6455.6	6394.4	6077.0	6768.4
	H	I	31.20	45.73	45.57	49.62	47.98
	I	H	4539.8	6454.5	6330.7	6077.0	6768.4
	H	H	31.20	47.65	47.50	49.62	47.98

^a Previous nonrelativistic results using GIAO's.

H. Fukui and T. Baba, *J. Chem. Phys.* **117**, 7836 (2002).

^b Present DKH2-CHF results.

^c Present BS-CHF results.

^d Previous finite perturbation calculation results using the BS scheme and GIAOs.

H. Fukui, T. Baba, Y. Shiraishi, S. Imanishi, K. Kudo, K. Mori, and M. Shimoji, *Mol. Phys.* **102**, 641 (2004).

^e Four-component relativistic random phase approximation results using GIAOs.

L. Visscher, T. Enevoldsen, T. Saue, H. J. Aa. Jensen, and J. Oddershede, *J. Comput. Chem.* **20**, 1262 (1999).

Electronic analysis of a protein by FMO: Structure optimization of ligand binding pocket
National Institute of Advanced Science and Technology(AIST), Tadashi Nemoto, D. G. Fedorov, Yuto Komeiji, Kenji Kanazawa, Masami Uebayasi and Kazuo Kitaura

The FMO method is a non-empirical molecular orbital calculation method for macromolecules. As an example for ligand-ligand binding pocket interactions, we analyzed a *Bombyx mori* sex pheromone binding protein (BmPBP) with its ligand (bombykol) which structure has been determined both by X-ray crystallography and by solution NMR. Starting from the experimental structure (PDB:1DQE chain A), we optimized the structure of the ligand in the complex and the binding energy was calculated by FMO method. Moreover, the interaction energy of the ligand with each amino acid residue of the protein was analyzed. The binding mechanism will be discussed based on the interaction energies.

電気生理学的手法によりカイコガ (*Bombyx mori*) オス触角は 1 分子の性フェロモン分子を検出し、神経興奮を引き越すことが知られ、非常に敏感なシステムである。オス触角の化学受容体のほとんどすべてが性フェロモン受容突起で、その触角体液中のタンパク質の 98% 以上が性フェロモン受容タンパク質であり、その濃度は実に 10mM にまで及ぶ。

この性フェロモン受容タンパク質 (BmPBP) は X 線結晶構造解析法および溶液 NMR 法により、リガンドであるボンピコールの有無、および不活性体の三種の構造が報告されている (PDB: 1DQE, 1LS8, 1GMO)。われわれはそれらの構造情報をもとに計算科学的手法によってフェロモン分子の分子認識のメカニズムを詳細な検討を進めて来た。

近年報告された、活性 Apo 型溶液 NMR 構造とリガンドを含む結晶構造は基本的に同一であったことから、この結晶構造が生理的な条件でも活性であると考え、さらに 1DQE ファイル内の A 鎖に注目して解析を続けてきた。

現在まで、A 鎖に水素核を付加後、Amber94 力場を用いて位置を最適化、さらに結合ポケット内の Ser56 残基とリガンドの水酸基の位置の最適化を行うという手順を経て、FMO 法による 1 点計算を実行したが (第 41 回 NMR 討論会にて発表)、結合の詳細を解析するにはモデルが不十分であることが判明している。

そこで、今回リガンド分子から 1.5 オングストローム以内に存在する BmPBP の 22 残基を切り

FMO 法、分子軌道法、シミュレーション、分子間相互作用

ねもとただし、でいみとりふえどろふ、こめいじゆうと、かなざわけんじ、うえばやしまさみ、きたうらかずお

出し、切断面を水素でキャップした後、結合ポケット部分の全水素とリガンド分子の全原子の位置を *ab initio* 計算 (FMO RHF/STO-3G および 3-21G レベル) によって構造の最適化を行う手順を追加し、その計算の終了した「構造最適化結合ポケット」を PDB ファイルに埋め戻し、それぞれ FMO1 点計算のための全体構造のモデルとした。

リガンドであるボンピコール分子は水酸基と二つの二重結合をもつだけの単純な長鎖アルコールであるので、特徴有る部分の分子認識の寄与を検討する目的で水酸基、二重結合部分、および其の他の部分 4 フラグメントに、BmPBP は 1 残基ごとに分割し、FMO による 1 点計算を行なった。

その結果から分子認識に関与する原子の特定と結合エネルギーの見積りを行なったところ、ボンピコールの結合に関するエネルギーの 2/3 を水酸基が、1/3 を二重結合部位が担っていることなどが判明した。現在、カイコガの別なフェロモン成分であるボンピカル (アルデヒド) について同様な構造最適化を行なっているところであり、最適化計算終了後直ちに 1 点計算を行い、ボンピコール (アルコール) 分子との比較検討を行なう予定である。

参考、引用文献

- D. G. Fedorov, and K. Kitaura, *J. Chem. Phys.*, **120**, 6832 (2004)
- Y. Komeiji, T. Nakano, K. Fukuzawa, Y. Ueno, Y. Inadomi, T. Nemoto, M. Uebayasi, D. G. Fedorov, and K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.*, **372**, 342-347 (2003)
- B. H. Sandler, L. Nikonova, W. S. Leal, and J. Clardy, *Chem. Biol.* **7**, 143-151 (2000).
- D. Lee, F. F. Damberger, G. Peng, R. Horst, P. Güntert, L. Nikonova, W. S. Leal, and K. Wütrich, *FEBS Letters* **531**, 314-318 (2002)
- K. Fukuzawa, K. Kitaura, K. Nakata, T. Kaminuma, and T. Nakano, *Pure Appl. Chem.* **75**, 2505-2410 (2003)

2P095

Full force field implementation for torsion angle
dynamics in the CYANA program

○Tomoki Matsuda, Peter Güntert
(RIKEN Genomic Sciences Center)

The 3D structure determination of proteins by NMR is based on experimentally measured distance and angle information. Structures are constructed that satisfy all available experimental data. Today several programs for NMR structure calculation exist that can determine correctly folded structures if applied to proper input data. However, the structural optimization gives priority to fulfill the experimental data. To achieve convergence and efficiency, generally a strongly simplified representation of the physical interactions in a protein is used which results in distortions from energetically favorable protein structures [1]. As a first step we have implemented the AMBER [2] force field in CYANA [3] and show its application for energy minimization.

[1] Xia, B. et al. (2002) *J. Biomol. NMR*, 22, 317-331

[2] Ponder, JW. and Case D.A. (2003) *Adv. Prot. Chem.*, 66, 27-85

[3] Güntert, P., Mumenthaler, C. & Wüthrich, K. (1997) *J. Mol. Biol.* 273, 283-298

Herrmann, T., Güntert, P. & Wüthrich, K. (2002) *J. Mol. Biol.* 319, 209-227

Key words: protein structures, simulation, molecular dynamics, torsion angle dynamics

ともき まつだ、ペーたー ぎゅんたーと

NMR による蛋白質の立体構造解析では測定データとして原子間の距離や角度の大まかな情報を用い、それらの全てに対してつじつまの合う位置に原子を配置させて構造を構築する。分子シミュレーションによる構造最適化はその際に非常に重要な役割を担っている。現在、様々な NMR 構造解析プログラムが開発されており、いずれも適切な測定データを用いれば正しいフォールドの蛋白質の立体構造が得られる。しかし、実験データを満たすことを優先した最適化を行っており、細部に関しては実際の蛋白質の構造に比べて歪んだものとなっていることも多い。すなわち、構造決定のための主要な実験データである NOE 距離情報を満たすために、分子全体がよりコンパクトな状態に陥り不適当な水素結合が形成されたり、主鎖の二面角がラマチャンドラプロット上の disallowed region に比較的多く分布するといったことが起こり得る。これらの問題は、蛋白質分子の周囲を溶媒で取り囲み全原子力場を用いたシミュレーションを行うことにより改善されることが明らかになっている [1]。

我々は、torsion angle dynamics を用い、高速に NMR 構造解析を行うプログラム CYANA [3] に対して、NMR 構造計算の後に全原子力場を用いて水を考慮した構造リファインメントを行うアプリケーションを付加し、CYANA ユーザーが一連の操作でよりリアリスティックな構造を得ることができるシステムを構築することを目指している。その第一段階として、CYANA への Amber 全原子力場 [2] の導入を行っている。

Implementation of orientation-independent residual dipolar coupling restraints in Cyana

○ Kimmo Pääkkönen¹, Arto Annala², Peter Güntert¹

1) RIKEN Genomic Sciences Center, 1-7-22, Suehiro, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan

2) Department of Physical Sciences, P.O. Box 64, FIN-00014 University of Helsinki, Finland

Residual dipolar couplings (RDCs) provide information on the dipole vector orientation in respect to the average alignment of the molecule in the magnetic field. In studies of proteins in water solution the free molecular tumbling usually averages out dipolar couplings, while in solid state NMR the large dipole-dipole interactions broaden the signals and greatly increase the complexity of the spectra. Since the discovery of enhanced alignment using dilute liquid crystals it became possible to measure residual dipolar couplings in solution while still retaining the narrow lines (Tolman et al., 1995; Tjandra et al., 1996).

Today residual dipolar couplings are well established parameters for protein structural studies. There are many types of RDCs to measure and there are a number of liquid crystal media available. Residual dipolar couplings provide long-range structural data which complements to the short distance data from NOEs. RDCs are applicable to a wide range of problems, from additional structural restraints to building macromolecular complex from protein domains and from identifying protein folds to constructing backbone structures.

The implementation of dipolar couplings in the program Cyana (Güntert et al., 1997) is based on orientation-independent restraints (Meiler et al., 2000; Skrynnikov and Kay, 2000). The orientation-independent restraints eliminate the reference to the molecular alignment frame by combining a pair of RDC restraints, forming a new combined restraint that limits the angle between two dipole vectors. The overall outcome from the conversion is a large number of generous restraints between dipole vectors. The frame-independent formulation simplifies the energy landscape and allows us to use RDC restraints throughout the structure calculation.

Keywords: Cyana, residual dipolar coupling, orientation-independent restraint

きんも ぱーつこねん、 あると あんにら、 ペーたー ぎゅんたーと

References

- Tolman, J.R., Flanagan, J.M., Kennedy, M.A. and Prestegard, J.H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9279-9283
- Tjandra, N., Grzesiek, S. and Bax, A. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6264-6272
- Güntert, P., Mumenthaler, C. and Wüthrich, K. (1997) *J. Mol. Biol.* **273**, 283-298
- Meiler, J., Blomberg, N., Nilges, M. and Griesinger, C. (2000) *J. Biomol. NMR* **16**, 245-252
- Skrynnikov, N. R. and Kay, L. E. (2000) *J. Biomol. NMR* **18**, 239-252

Automated Protein Structure Determination from NMR Spectra

○ Blanca López-Méndez & Peter Güntert

*Tatsuo Miyazawa Memorial Program, RIKEN Genomic Sciences Center, 1-7-22, Suehiro, Tsurumi, Yokohama
230-0045, Japan*

Combined automated NOESY assignment and structure calculation has significantly reduced the time required to solve an NMR protein structure. Nevertheless, the preceding manual or semi-automatic assignment of the chemical shifts remains a major time-consuming step in NMR protein structure determination. We present a new protocol for automated protein structure determination from NMR spectra. The procedure uses as input a standard set of 3D NMR spectra for polypeptide backbone chemical shift assignment, side-chain chemical shift assignment and the collection of conformational constraints and can yield the three-dimensional structure of the protein without manual intervention.

Until recently NMR protein structure determination has been a laborious undertaking that occupied a trained spectroscopist over several months for each new protein structure. However, it has been recognized that many parts of the interactive spectra analysis can be accomplished by automated computational approaches. Currently, NMR protein structure determination typically involves the acquisition of a set of 3D NMR experiments, chemical shift assignment, NOESY assignment, and structure calculation and refinement. Fully automated combined automated NOESY assignment and structure calculation with the CYANA software has been applied for most of the NMR structure determinations within the RIKEN Structural Genomic/Proteomics Initiative (RSGI). However, the manual or semi-automatic chemical shift assignment remains a time-consuming step of the NMR protein structure determination.

Keywords: structure calculation, CYANA, chemical shift assignment, NOESY assignment, automation.

ぶらんか ろぺず めんでず、ペーたー ぎゅんたーと

Here, we present a new protocol for the automated protein structure determination from NMR spectra. The new procedure combines automated peak picking and the generation of multiple sets of raw chemical shift assignments by the program GARANT with the determination of consensus chemical shifts and NOESY assignments by the program CYANA, which is also used for the structure calculations. This procedure can be iterated by using the preliminary three-dimensional structure obtained from a first CYANA calculation as input to a second cycle of chemical shift assignment with the program GARANT. GARANT uses a genetic algorithm in conjunction with a specific local optimization routine to match observed and expected cross peaks from multidimensional NMR spectra. The most populated chemical shifts obtained from several parallel GARANT runs provide the input for the CYANA combined NOESY assignment and structure calculation using network-anchoring, ambiguous distance constraints and constraint combination. Results of test calculations suggest that despite of imperfections in the automatically determined chemical shift assignments it is possible to reproduce protein structures of up to 150 amino acid residues obtained previously by the 'classical' method with reasonable precision and accuracy by using exclusively automated peak picking and automated assignment procedures without intermediate manual corrections or additions to the peak lists or chemical shift assignments.

References

- Bartels, C., Billeter, M., Güntert, P. and Wüthrich, K. (1996) *J. Biomol. NMR*, **7**, 207-213.
- Bartels, C., Güntert, P., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1997) *J. Comp. Chem.* **18**, 139-149.
- Gronwald, W. and Kalbitzer, H. R. (2004) *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **44**, 33-96.
- Güntert, P., Mumenthaler, C. and Wüthrich, K. (1997) *J. Mol. Biol.* **273**, 283-298.
- Herrmann, T., Güntert, P. and Wüthrich, K. (2002) *J. Mol. Biol.* **319**, 209-227.
- Güntert, P. (2003) *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.* **43**, 105-125.

Diffusion Tensor Imaging を用いた白質加齢変化の基礎検討

(財) 先端医学薬学研究センター¹、明治鍼灸大²、(財) 石川県産業創出支援機構³○藤川昭彦¹、福永雅喜²、矢嶋一賀³、陳偉萍³、松成一朗¹、西村伸太郎¹、梅田雅宏²、田中忠蔵²、成瀬昭二²

Basic study for age-related changes to the white matter by using diffusion tensor imaging

The Medical and Pharmacological Research Center Foundation¹Meiji University of Oriental Medicine²Ishikawa Sunrise Industries Creation Organization³○Akihiko Fujikawa¹, Masaki Fukunaga², Kazuyoshi Yajima³, Weiping Chen³,Ichiro Matsunari¹, Shintaro Nishimura¹, Masahiro Umeda², Chuzo Tanaka²and Shoji Naruse²

There is a pressing need to develop the early detection and the curative medicine for brain diseases, such as a lifestyle-related disease especially dementia and cerebral infarction. The diffusion tensor magnetic resonance imaging (DTI) is considered to reflect detail of cerebral structures and physiological changes directly, and its analysis map of the anisotropy calculated by diffusion coefficients can be an evaluating method for the damage grade on brain white matter quantitatively. We applied the approach to normal volunteers in a broad age group mainly for local residents based on sufficient consent. The volunteers also underwent MRI and PET inspection simultaneously. We found out the difference of white matters in the younger age group and an old age layer using FA-maps.

【序論】生活習慣病、特に痴呆や脳梗塞など脳疾患は、介護等社会への負担が大きいため早期発見・治療薬の開発が急務となっている。我々は、高齢社会に対応した健診システムの形成を目指し、痴呆の早期診断支援技術の開発に取り組んでいる。初期の痴呆、特に Alzheimer 病(AD)において PET・SPECT を用いた SPM (statistical parametric mapping) 解析や 3D-SSP (3 dimensional stereo tactic surface projection) 解析などにより後部帯状回の糖代謝、脳血流量が低下することが報告された。この帯状回の血流や糖代謝の低下は、病理学的に初期の変性が強い海馬や海馬傍回から帯状束を通しての線維連絡を強く受けているためと考えられている。しかしながら、この PET・SPECT による手法では白質の線維連絡機能は解像度の点から十分に検討できない。これに対して、脳微細構造や生理的变化をそのまま反映していると考えられている拡散テンソル MR 画像法(Diffusion Tensor Imaging:DTI)では、生体の脳から非侵襲的に得られた指標を用いる事で、脳白質の損傷程度が定量的に評価可能になると考えられる。DTI 法は拡散強調画像で捉えられる異方性の解析画像であり、水分子の拡散の方向性と見かけの拡散係数を得ることができ、主に白質を中心とした脳内の軸索走行の解析が可能となる。今回我々は、この DTI 法を用いた主要白質繊維の異方性について、加齢による変化と脳変性疾患に影響を及ぼすと考えられている生活習慣因子との関係について調べた。

キーワード: MRI, DTI, FA, 脳機能診断, 白質病変

ふじかわあきひこ、ふくながまさき、やじまかずよし、ちんいへい、まつなりいちろう、にしむらしんたろう、うめだまさひろ、たなかちゆうぞう、なるせしやうじ

【方法】財団法人医学薬学研究センターでは、2002年より石川県地域結集型共同研究事業として、次世代型脳機能計測・診断支援システム構築を目的とした総合的な研究を行っており、主として地域住民を対象に健常人ボランティアを募集し、MRI および PET 検査を実施している。既に幅広い年齢層において約700名のボランティア登録があり、被験者への十分な説明と同意のもと、300人超について検査を実績済みである。今回はこのうちDTI法が適応できた約100例を対象とした。解析対象はMRIにおける形態的異常が無く、かつ神経内科的異常の無い健常人ボランティアとした。画像撮影には、1.5T MRI (Signa Horizon, GE-YMS 製) および標準ヘッドコイルを使用した。SE-EPI法を用いた拡散テンソル画像の撮像パラメーターは、TR/TE = 7500/88ms、Single-shot で加算回数 6 回、96 × 96 matrix acquisition (128 × 128 reconstruction)、撮像領域 200 × 200mm²、スライス厚 3.4mm、スライスギャップなし、50 スライス、b-value = 700s/mm²、MPG 印加軸は 6 direction (XZ, -XZ, ZY, -ZY, XY, -XY)、撮像時間 5 分 15 秒とした。画像データは、geometric distortion の補正を考慮し、1) 拡散テンソル画像、2) T2 強調 EPI 画像、3) T1 強調 3D 画像、の 3 つについて収集し、EPI distortion correction、MPG correction の順で画像補正し、DTI 解析処理をおこなった。また、検査の際同時に実施しているアンケートから、生活習慣との関係について年代別、性別で区分化し検討をおこなった。

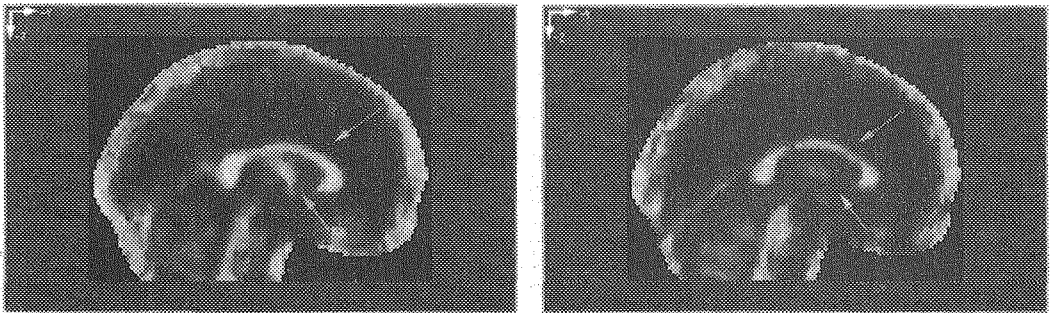


fig.1 mean FA-maps of normal volunteer, twenties(left) and seventies(right)

【結果および考察】MRI 超高速撮像法(EPI)を用いることにより、不等方性拡散(anisotropic diffusion)から白質路の走行の解析も可能となった。また、拡散強調画像から得られる拡散係数をテンソルとして扱うことにより、大脳白質におけるボクセル毎の拡散の大きさと異方性を異方性比率(fractional anisotropy: FA)を用いることで定量化した。さらに、EPI法の拡散テンソル画像において、元画像のMPG(Motion probing gradient)の方向の違いによる異なる歪みを補正し、位置ずれの無いFAマップを得ることができた。これにより、FAマップとして正常例DTIデータを蓄積していくことが可能となった。

解析例として、Fig.1に正常例の20歳代男性および70歳代男性の脳梁部位での平均のFAマップを示した。両者を比較すると、脳梁膝、脳梁体および脳梁膨大部のすべての脳梁部位において萎縮傾向が観測された。また、脳弓についても同様の傾向であった。脳白質内での拡散は、ミエリンや毛細血管などにより自由拡散ではなく方向性をもつ。この異方向性拡散における程度の評価にはいくつかの指標がある。今回の検討ではFAを用いたが、これは拡散の非等方度をテンソルの大きさで標準化した値である。このようにFAマップは白質変化を鋭敏にとらえ得る有用な手法であるといえる。正常例のDTIデータを蓄積していくことは、脳白質を定量的に評価することとなり、加齢による変化、あるいは痴呆を中心とした脳白質に影響を及ぼす脳変性疾患の病態評価と予後予測をおこなう上で良い指標になると考えられる。発表では、脳機能に影響を及ぼすとされる生活習慣因子とFAマップとの関係について議論する。

1P099★

骨密度計測用コンパクトMRIの開発 —大量被験者の計測—

(筑波大学物理工学系¹, (株)エム・アール・テクノロジー²)

○富羽 貞範¹, 古家 健¹, 飯田奈智子¹, 岡田芙美¹, 巨瀬 勝美¹, 拝師 智之²

Development of a Compact MRI for Bone Density Measurements

S.Tomiha¹, T. Furuya¹, N.Iita¹, F.Okada¹, K. Kose¹, T. Haishi²

1. Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 2. M R Technology Inc.

A compact MRI system for bone density measurement was developed by using a permanent magnet and a portable MRI console. The MRI system was specially designed to measure trabecular marrow volume fraction at the calcaneus using image intensity of 2D spin-echo MR images. Good reproducibility and close correlation between MRI and DXA was achieved in human calcaneus measurements. Measurements for a large number of subjects (1000 order) study showed a correlation between MRI and QUS, and T2 distribution that have a potential for simplification in the measure protocol.

1. はじめに

骨密度計測は、骨粗鬆症の診断やスクリーニングに不可欠な手法である。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が、骨量の定量的評価に不可欠の海綿骨体積骨密度(Trabecular Bone Volume Fraction: TBVF)の計測は不可能である。

MRIはTBVFが得られる手法であるが、これまで全身用MRIを用い、研究レベルでのみ計測が行われてきた(1-3)。そこで、我々のグループでは、多くの研究施設と医療機関で使用できる骨量計測用コンパクトMRIを開発した(4, 5)。これまで、本システムにおいて再現性(CV: coefficient of variance; 標準偏差/平均)として、ファントムで0.8%、被験者で0.9%、既存の装置との相関としては、 $R^2=0.33$ (QUS) 0.38 (DXA) という結果が得られている(5)。

また、これまでの計測は20~100人程度であったが、今回は、プロトコル改善を目的とした、統計的な評価や、幅広い年齢、骨密度を持つ被験者の計測を目的とし、1000人規模の被験者を対象とした計測を行った。

2. システム開発

Fig.1にシステムの全体像とRFプローブの構造を示す。図に示すように、水平方向に静磁場(0.21T)を発生する永久磁石のギャップ(16cm)間に、上方から踵を挿入できるように、長円形の口径(長径21cm, 短径8.4cm)を有するRFプローブを設置した。また、RFプローブの中に、標準となる、オイル(ベビーオイル)を満たした円筒ファントムを挿入した。

骨量計測 コンパクトMRI 海綿骨体積骨密度(TBVF)

とみはさだのり, ふるやたけし, いいたなちこ, おかだふみ, こせかつみ, はいしともゆき

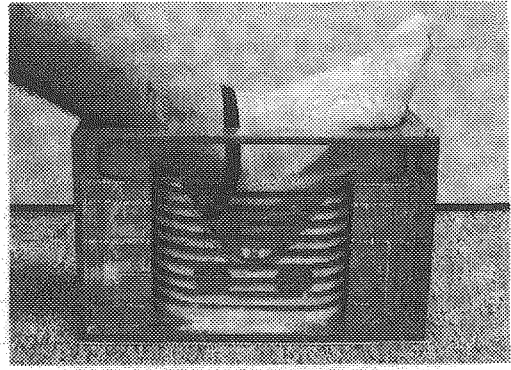
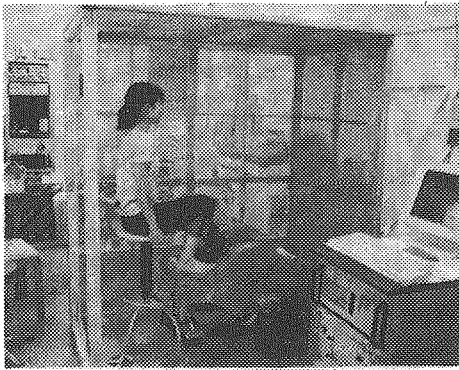


Fig.1 Overview of the compact MRI for bone density measurements (left), RF probe for measurements of calcaneus (right).

3. 海綿骨体積率定量化の方法

スピンエコー法で、二次元断層像を取得する場合、その画素強度 $I(x, y)$ は、

$$I(x, y) = kf(x, y)\rho(x, y)\{1 - p(x, y)\exp(-T_R^*/T_1(x, y))\}\exp(-T_E/T_2(x, y))$$

と表すことができる (J カップリングの項は 12ms, 96ms のエコー時間を用いることで無視できると仮定した)。 k は、全体に一樣な画素強度変化を表すパラメタ、 $f(x, y)$ は、静磁場の不均一性など、さまざまな要因による空間的不均一性を表す関数である。 $\rho(x, y)$ は、プロトン密度分布、 $T_1(x, y)$ と $T_2(x, y)$ は T_1 と T_2 の面内分布である。 $p(x, y)$ は、縦磁化の緩和に関する量で、理想的なスピンエコー法で $T_E \ll T_R$ の場合には、1 となる定数である。 T_R^* はパルスシーケンスの繰り返し時間に近い時間、 T_E はエコー時間である。 T_1 に関する項は T_R の長いシーケンス ($T_R = 1200$ ms) を用いることで無視できるようにした。 T_2 に関する項は、シングルエコー法で 2 回撮像することで補正した ($T_E = 12\text{ms}, 96\text{ms}$)。 $k, f(x, y)$ に関しては外部標準のオイルファントムとの同時撮像、および、踵の代わりに挿入したオイルファントムの撮像を行うことで補正した。

4. 撮像シーケンスの検討

1000 人規模の被験者の計測において、撮像効率は非常に重要である。そこで、位相エンコード数を従来の 128 ステップから 64 ステップに変更し、撮像撮像時間を 1/2 に短縮した計測シーケンスを導入した。

再現性と定量性の 2 点に注目して、従来の計測シーケンスと上記のシーケンスの比較実験を行った。再現性においては、ファントムによる短期的な計測 (計測回数 8 回、計測時間 4 時間) で比較した (Fig.2)。また、定量性は、2 種類のシーケンスから得られる TBVF の相関を、プロトン密度を変化させたオレイン酸ファントム (0~100%) と、被験者群 (健康女性ボランティア、年齢 18~21 歳、平均 19.1 歳、 $n=22$) を対象とした計測をそれぞれ行い、 $y=x$ の一次関数との相関で評価した (Fig.3)。

この結果、再現性では、従来のシーケンスと同程度の CV を得ることができ、定量性に関しては、両者の間に、良好な相関が得られ、計測時間を短縮したシーケンスは、今後の計測に用いることが可能であることが分かった。

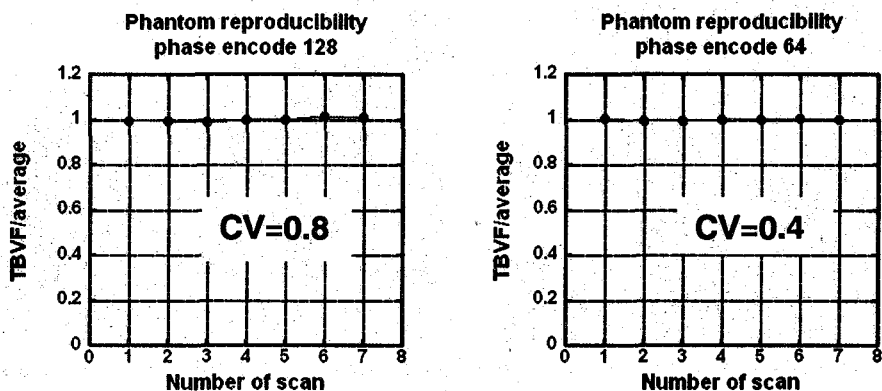


Fig.2. Comparing between new measure protocol (right) and current one (left) in reproducibility.

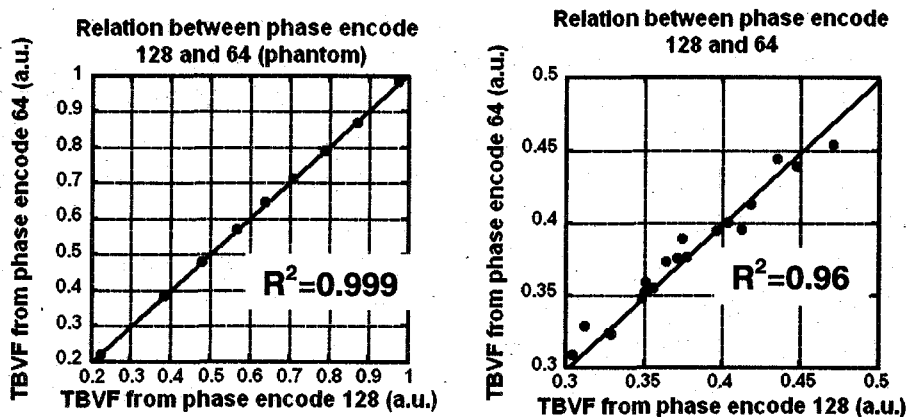


Fig.3. Comparing between new measure protocol and current one in linearity.
oil phantom (left), human subjects(right)

5. 大量被験者を対象とした計測

健康女性ボランティアの被験者群（年齢 18～79 歳，平均 40.1 歳， $n=235$ ）を対象に，実験内容を説明し，同意を得た後，MRI，QUS での計測を行った。使用した QUS は松下電器の DM-US100 であり，MRI，QUS ともに，右足を計測した。本システムの TBVFi と QUS の SOS (Speed of Sound, m/s) との相関を調べた (Fig.4)。また，骨密度定量化の際に，補正に用いた骨髄の T_2 の分布を調べた (Fig.5)。

MRI と QUS の間に $R^2=0.18$ という相関が得られた。MRI は骨体積密度，QUS は骨強度を表すと言われている音速を計測している。骨密度と骨強度には，有意な相関が報告されており，今回の結果も，それを反映する結果である。また，Fig.5 に示すように骨髄の T_2 の分布は，およそ 83ms を中心に集中しており，計測プロトコル高速化の可能性を示す結果が得られた。

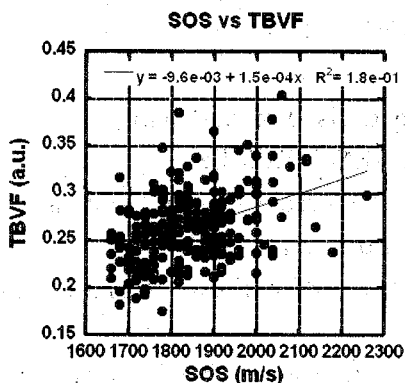


Fig.4. Relation between MRI and QUS

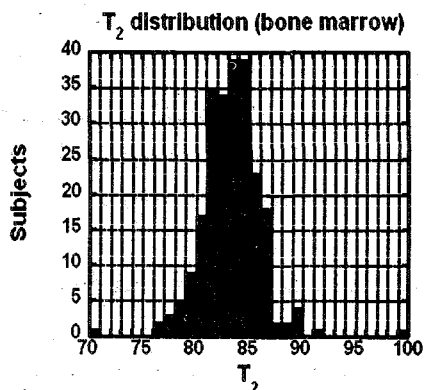


Fig.5. T₂ distribution of 235 subjects

6. むすび

骨密度専用のコンパクトなMRIを開発し、踵骨骨髓の体積率を計測した。計測用シーケンスを改良し、計測時間を短縮させた。本計測は現在、進行中であり、年末までに1000人の被験者の計測を行う予定である。今後、計測を進めるとともに、骨密度計測の解析領域をはじめとする、プロトコルを再検討する。また、前腕の橈骨を対象とした骨密度計測システムも開発し、踵骨との相関を調べる予定である。

なお、DXA計測の際、ご協力いただきました筑波大学体育科学系 向井直樹先生、川崎絵美さん、徳山薫平先生に、この場を借りて御礼申し上げます。

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. Katsumi K, Yoshimasa M, Takeaki K, Seitarou H, Yukako Y, Tomoyuki H, Shin U, Hiroyuki Y, Shigemasa O, Masaaki A, and Tsuyoshi T. Development of a compact MRI system for trabecular bone volume fraction measurements. *Magnetic Resonance in Medicine* 52, 440-444, 2004.
5. 富羽貞範, 栗本岳明, 白猪亨, 小野真也, 松田善正, 拝師智之, 宇津澤慎, 巨瀬勝美, 青木雅昭, 津崎剛, 川崎絵美, 向井直樹, 徳山薫平「骨量計測用コンパクトMRIの開発」平成15年11月, 第42回NMR討論会, 大阪

1P100★

超偏極 Xe-129 MRI/MRS を用いたマウスの脳機能評価

○上山毅、若山哲也、木村敦臣、藤原英明

大阪大学医学部保健学科

Estimating the brain functions of mouse using

Hyperpolarized Xe-129 MRI/MRS

○Tsuyoshi Ueyama, Tetsuya Wakayama, Atsuomi Kimura,
and Hideaki Fujiwara

The Department of Health Science, Faculty of Medicine, Osaka University

The method to determine the longitudinal relaxation time (T_1) of hyperpolarized Xe-129 in the mouse brain has been established in vivo. T_1 is crucial in the aspect that it can be related to some important physiological parameters such as the extent of brain tissue oxygenation, the temperature of tissue and so on. In the present study, the T_1 value of hyperpolarized Xe-129 is determined in the mouse brain by continuously administering the hyperpolarized Xe-129 under the controlled-flow condition and by analyzing the uptake and washout processes using a two-compartment model. The versatile utility of this method is discussed in the present study.

1.はじめに

超偏極希ガスを用いた NMR 信号は、原理的には熱平衡状態の希ガスに比べ約 10 万倍程度にも増強され、通常の MRI/MRS でははっきりと見ることでできない生体の機能や構造の情報を与えてくれる。特に、Xe-129 は生体組織に良く溶解することを利用して、組織の画像化にも適用範囲が広げられ、脳組織や肺など幅広く臨床応用を目指した研究が行われるようになってきている。¹⁾ 本研究では脳機能評価を目的とし、マウスにおける超偏極 Xe-129 ガスの動態の解析を行うこととした。このためには、脳組織の T_1 値を求めることが必須となるが、正確な脳組織の T_1 値を求める方法は確立されていない。そこで今回の実験では、連続フロー型超偏極希ガス供給システムを開発し、定常的にマウスに換気させ得られる脳からの Xe-129 の取り込み及び洗い出し曲線を解析することで、より正確な T_1 値を求める手法を確立したので報告する。

2.方法

自作の簡易フロー型超偏極 Xe-129 生成装置を用いて、超偏極 Xe-129 ガスを生成した。ここでは光ポンピング法によって超偏極 Xe-129 ガスを生成している。光ポンピング法は Rb の電

超偏極 Xe-129 T_1 値 脳血流

うえやまつよし、わかやまつや、きむらあつおみ、ふじわらひであき

子スピンをレーザーによって偏極させ、その偏極を Xe-129 ガスの核スピんに移す方法である。Rb を封入した偏極セルにレーザー(Coherent 社製 FAP システム(Ga·Al·As ダイオードレーザー; 波長 795nm,60W)を照射しておき 110℃に温めた後、天然存在比組成のキセノンガス(Xe-129:26.4%)と窒素ガスを 7:3 で混合させたものを乾燥(脱酸素)させてから偏極セルに送り込んだ。測定用の NMR 装置は Varian 社製 INOVA-400WB(9.4T)を用いた。雄性 ddY マウス(6 週齢)をネブタール(30~40 mg/kg)の腹腔内投与により麻酔を行った後、自作のマスクをかぶせて NMR プローブ内に固定した。Xe-129 スペクトルの測定にはパルス幅 15 μ s と 30 μ s のハードパルスを使用し、繰り返し時間 TR は 0.9~1.3 秒で測定した。脳組織に溶解した Xe-129 のイメージングにはグラディエントエコーを用いて行い、TR=0.1sec、TE=1msec、FOV=5cm \times 5cm、スライス厚=5mm で撮像を行った。

3. 結果と考察

スペクトル測定結果からマウスの脳の溶解相のピークは 196ppm 付近に観測され、この 196ppm の信号はグラディエントエコー法による超偏極 Xe-129 イメージングの結果から脳実質に由来することが確認できた。我々の実験において得たマウスの脳の信号は灰白質に溶解した信号であると考えられる。なぜなら、マウスの脳では白質の体積は灰白質の体積に比べ小さく NMR 信号を

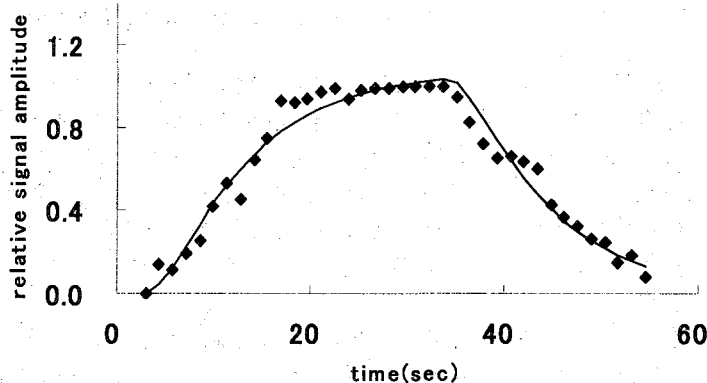


Fig.1 Time-dependent changes of NMR signal amplitudes observed in the time course of uptake and washout processes.

十分に観測できないと考えられるからである。この 196ppm の信号から得られた脳組織における Xe-129 の取り込み及び洗い出し曲線を図 1 に示す。また、図 1 には 2 コンパートメント解析により得られた理論曲線を併せて示した。この解析により算出した脳組織の T1 値は 5.3 \pm 0.8 秒であった。以上の結果から、連続フロー型換気法は非常に簡便かつ高精度であることが分かった。

参考文献

- 1) Duhamel G, Choquet P, Grillon E, Leviel JL, Décorps M, Ziegler A, Constantinesco A, Acad Radiol 2002;9:SS498-S500.

4.7T MRI における多核種局在化スペクトル同時測定法 — ヒト脳のアルコール摂取前後の変化 —

(国立環境研) ○三森文行、高屋展宏、渡邊英宏

Multinuclear localized spectroscopy in the human brain at 4.7T — spectral changes in ^1H and ^{31}P after intake of alcohol —

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

We applied a multinuclear localized spectroscopy method (TRINITY) to the observation of metabolic changes in the human brain after intake of ethanol. ^1H and ^{31}P localized spectra were obtained in a single measurement from the region of $3\text{x}3\text{x}3\text{cm}^3$ in the occipital lobe before and after alcohol drinking. Quantitation of ethanol and ^1H metabolites were performed using a LCModel program. Concentration of ethanol in the brain was well correlated with the amount of drunk alcohol. Although ^1H and ^{31}P metabolites were well maintained with the concentration of ethanol up to 25mmol/l tissue, Pi resonance was broadened with ethanol over 16mmol/l tissue, suggesting an increase in the diversity of tissue pH in the brain.

【はじめに】我々は、4.7T 人体用 MRI 分光計に 3 つの送受信系を装備し、同一の選択領域から多核種スペクトルを同時に測定する方法の開発を進めている。これまで、 ^1H 、 ^{31}P 、 ^{13}C 核の同時測定を可能とする TRINITY (TRiple Nuclei Interleave in Triple channel spectroscopY)法について報告してきた[1,2]。今回は、この方法を、アルコール摂取前後のヒト脳に適用し、 ^1H で観測できる脳内エタノールと代謝物、および ^{31}P で観測できる代謝物を同時測定した。 ^1H スペクトルについては LCModel を用いて定量を試みた。

【方法】MRI 分光計は Oxford Magnet Technology 社の 4.7T 磁石 (ボア径 925mm) を接続した Varian Inova を用いた。信号検出器は直径 8cm の 2 重ループを用いるクオドラチャ型 ^{31}P 検出器と、口径 30cm の頭部用 ^1H TEM 型コイルと組み合わせ、 ^1H 、 ^{31}P 同時測定を行った。アルコールは主に日本酒 (エタノール含有量 19%) を 200~800g 経口摂取し、その前後で MRS 測定を行った。 ^1H 局在化測定は STEAM 法、 ^{31}P は ISIS 法を用い、一回毎の interleave で 32 回加算 (2.66 分) のスペクトルを 8 個ずつ収集した。TR = 5s、STEAM の TE = 4ms、TM = 33ms。 ^1H では 32 回積算そのまま、または 4 個ブロック積算した 128 回積算、 ^{31}P では 4 個ブロック積算した 128 回積算結果についてスペクトル解析を行った。いずれの場合にもブロック積算の前に化学シフトのドリフト補正を行った。 ^1H スペクトルの定量はエタノール、水をベイスセットに加えた LCModel プログラムを用い、定量には同一選択領域で測定した水の信号強度を用いて補正を行った。すなわち、後頭葉に設定した測定領域で別に測定した T_1 強調画像を用いた組織分離の結果 (灰白質(GM):75%, 白質(WM):10%, 脳脊髄液 (CSF):15%) より領域内の NMR 可視な水濃度を $39.62\text{ mol/l tissue}$ と仮定して各代謝物を定量した。

【結果と考察】アルコール 38g を経口摂取した前後のヒト脳後頭葉から同時測定した ^1H 、 ^{31}P スペクトルを図 1 に示す。アルコール摂取後の ^1H スペクトルでは通常の代謝物に加えて、1.18ppm、3.65ppm にエタノールのメチル基、メチレン基の共鳴線が明

Keywords: 高磁場 MRI、多核種 NMR、局在化スペクトル、脳、アルコール

みつもり ふみゆき、たかや のぶひろ、わたなべ ひでひろ

瞭に認められる。 ^1H スペクトルについて 2.66 分ごとのエタノール、代謝物の濃度を LCMoDel プログラムを用いて定量したところ、脳内エタノールは $5.84 \pm 1.37 \text{ mmol/l tissue}$ ($n=3$)であった。この間、 ^1H スペクトルで観測される *N*-アセチルアスパラギン酸 (NAA)、グルタミン酸、クレアチン、コリン、イノシトールの共鳴線、 ^{31}P スペクトルで観測されるクレアチンリン酸、ATP の高エネルギーリン酸化合物、無機リン等に変化は認められなかった。この結果は、38g ($\sim 0.6\text{g/kg}$ 体重)程度のアアルコール量では脳内の代謝は定常に保たれていることを示す。

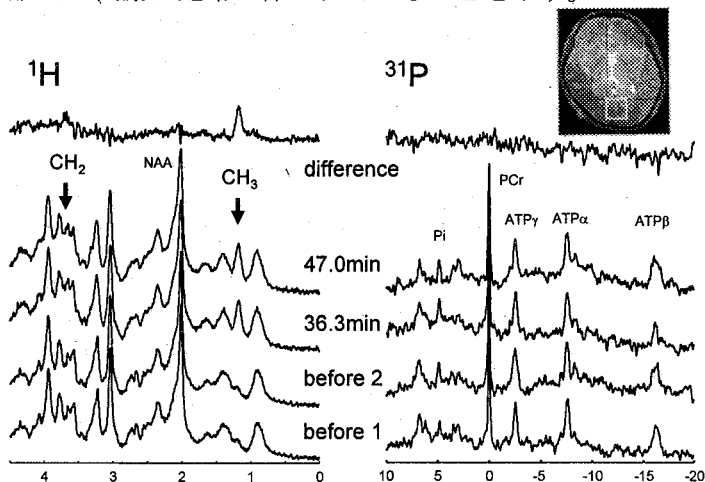


Fig.1. ^1H and ^{31}P localized spectra obtained from the area of $3 \times 3 \times 3 \text{ cm}^3$ at the occipital lobe (see right upper insertion) before and after an intake of 38g EtOH. Each spectrum was the sum of 4 blocks of 32 transients (10.7min). TR/TE/TM = 5000/4/33 ms. Top traces show the difference spectra between the ones at 36.3min after and immediately before EtOH.

さらに、摂取を繰り返すと (エタノール総量 61g、152g)、脳内エタノールはほぼ摂取量に比例して上昇するが代謝物の ^1H 代謝物には変動は見られなかった (図 2)。これに対し、 ^{31}P スペクトルの無機リン共鳴線は高摂取量で線幅が広がり、エタノール量 152g では pH 7.02 から 6.98 とわずかに酸性化の傾向を示した。線幅の広がりには細胞内 pH の多様化を示唆するものと考えられる。

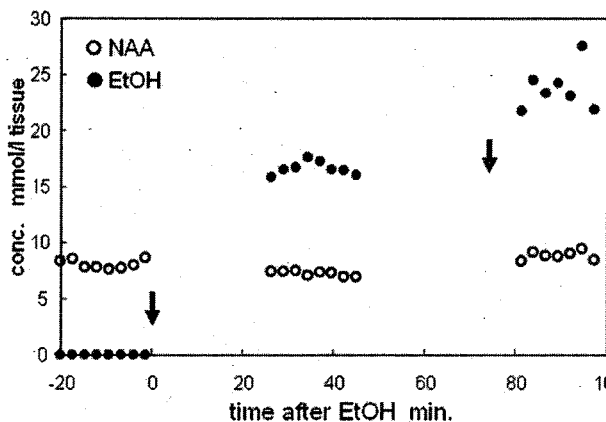


Fig.2. Concentrations of EtOH and *N*-acetylaspartate (NAA) in the brain before and after intakes of EtOH. Amount of taken EtOH was 38g for the first time ($t=0$), and 23.8g for the second time ($t=43 \text{ min}$) (Both timings are indicated by arrows). Quantitation was performed on spectra with 32 transients using a LCMoDel program with including H_2O and EtOH into the basis set.

【結 語】

ヒト脳に TRINITY 法を適用し、アルコール摂取前後の脳内エタノールおよび代謝物の変動を ^1H 、 ^{31}P 局在化スペクトロスコピー法を用いて追跡できた。

【参考文献】

- [1] F.Mitsumori, N.Takaya, Proc.Soc.Mag.Reson.Med, 11, 1138 (2003).
- [2] F.Mitsumori, N.Takaya, H.Watanabe, Proc.Soc.Mag.Reson.Med, 12, 2461 (2004).

遺伝子発現のイメージング技術の開発

(横浜市大院・総合理)

○杉原文徳、朽尾素人、奇世媛、岡田あずさ、渡邊清、笠原浩司、古久保哲朗、白川昌宏

Development of a reporter system of *in vivo* gene expression using MRI

Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University

1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, 230-0045

Sugihara, B., Tochio, H., Ki, S., Okada, A., Watanabe, K., Kasahara, K., Kokubo, T., Shirakawa, M.

[Abstract]

To provide an ideal method for monitoring *in vivo* gene expression, we are developing a novel method of reporter gene assay using NMR/MRI. In this method, activity of a gene expression is converted to ^{31}P NMR signal of polyphosphate (PolyP). As fundamental study for developing this method, functions of genes, which were supposed to relate to PolyP accumulation, were analyzed in yeast cells and the availability of the selected genes was tested. We have reported the establishment of the ^{31}P NMR/MRI method for monitoring gene expression in yeast colonies by using the selected genes last year. This time, we'll report the improvement of this method in experimental-time and spatial resolution. And also the results of the experiment of promoter analysis by using this method will be shown and discussed.

[背景]

新しい視点から生命現象をとらえる手法として、分子イメージングが流行する兆しがある。手法自体は既存のものであるが、そこに分子生物学的な手法を導入し、生体内部でのイベントを分子レベルで解析できる測定方法として生命科学・医療への応用が行われようとしている。

本研究では分子イメージング研究の課題の一つである、生体内での遺伝子発現を可視化することを目指している。既存の遺伝子発現を測定する手法は、生体の破壊が前提であったり、蛍光プローブを用いた手法がとられてきた。しかし、動物個体中の遺伝子発現をみるには、破壊的な手法では生きたまま (*in vivo*) での解析を行うことはできず、蛍光プローブでは深部組織の測定を行うには不適當である。また放射線を用いた手法 (PET, SPECT) は高感度であるが、被曝を伴うことから非侵襲的な手法としては理想的でない。そこで我々は非侵襲・非破壊的な可視化手法として MRI (Magnetic Resonance Imaging) を用いて、分子生物学的な手法を基にして遺伝子発現の生体内可視化技術の開発を行っている。

[実験内容]

昨年度までに本討論会において NMR/MRI で遺伝子発現をモニターするレポーターシステムについて報告してきた^{1,2}。今年度は構築した測定手法の改良を行ったので報告する。用いたレポーターシステムは、遺伝子発現を ^{31}P -NMR/MRI で観測可能なリン酸のポリマーであるポリリン酸で測定する手法であり、ポリリン酸量が発現量 (mRNA) と相関することから定量的な手法であることが示されている³。

測定手法の改良として、測定時間の短縮と分解能の向上を目指した。 ^{31}P -NMR は 1H に比べて磁気回転比が小さく、また密度も少ない為に画像を得るために長時間の積算を必要とする。より簡便な測定手法とするために、測定時間の短縮を図ることが必要であった。また、感度が低いため分解能を高く設定できないことが、詳細な解析を行う際の問題となっており、その点の改善も必要であった。そこでポリリン酸量を比較的感受度のよい 1H-NMR/MRI のパラメーターで間接的に測定し、感度の向上を図り、測定時間の短縮と分解能の向上を図った。

測定には、レポーター遺伝子 *PHM4* のプロモーター領域を発現強度の異なる異種プロモーターに置換

Key Words : 化学シフト選択的イメージング, *in vivo* ^{31}P NMR/MRI, 酵母, 遺伝子発現

すぎはらぶんとく、とちおひでひと、きせおん、おかだあずさ、わたなべきよし、かさはらこうじ、こくぼてつろう、しらかわまさひろ

した酵母株を用いた。それぞれの酵母を YPD 培地で培養後、外径 1.2mm のキャピラリーに詰め、φ8mm NMR チューブに入れてサンプルとした。測定装置は Bruker DRX-500+マイクロイメージングプローブ Micro-5 を使用した。

ポリリン酸の MRI 測定には CHESS (Chemical Shift Selective Imaging) 法を改良して使用し、1-H の T1 測定には Saturation Recovery 法を使用し 5 秒から 50m 秒の 9 つの繰り返し時間 (TR) を用いて測定した。測定時間はポリリン酸画像に約 1 時間、1-H T1 測定に 10 分を要した。

【 結果・考察 】

測定より得られたそれぞれの酵母株のポリリン酸量 (ポリリン酸画像における各キャピラリー領域のシグナル強度の平均値) を縦軸に、1-H T1 値を横軸にプロットした結果が Fig.1b である。

2 つのパラメーターは非常に高い相関を示しており、ポリリン酸量を 1H T1 で見積もれることが示された。これより 2 つの点において本手法を改善することができた。1 つには測定時間の短縮と 2 つ目には解像度の向上である。

1 つ目の測定時間の短縮については、積算時間の

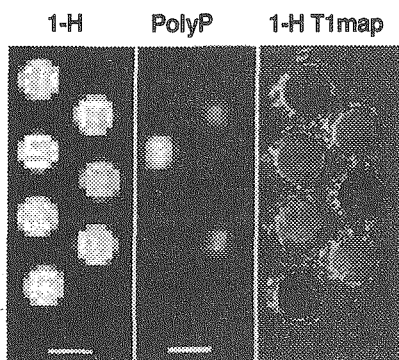
短縮による効果のほかに、1-H T1 の測定手法の改良による更なる短縮が図れることから、より詳細な経時変化を測定できることが期待される。

2 つ目の分解能の向上については、ボクセルあたりの 1-H スピン密度がポリリン酸に比べ高いことから、ボクセルを細かくしても十分なスピン密度を確保でき、高分解能を達成することができる。サンプルの配置を工夫すれば、多検体の測定も効率良く行うことができる。

また、ポリリン酸量と 1H T1 の相関が示されたが、この相関が得られる機構はポリリン酸量と常磁性効果をもつ金属の細胞内含量が比例していることに起因すると考えている。細胞内の金属含量などの詳細な解析については、今後進めていく予定である。

現在はここで得られた知見をもとに、ポリリン酸では感度・解像度の点から測定が困難な高密度に酵母コロニーを生育させたセルチップを用いた測定方法の開発を行っており、既知の結果と矛盾しない 1-H イメージの結果が得られている。今後はセルチップを用いたプロモーター解析を実際に進めていく予定であり、この結果についても討論を行いたい。

1-a



1-b

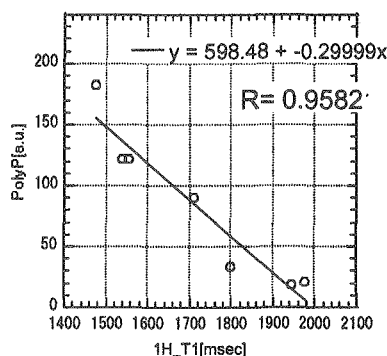


Fig.1 (1-a) 1-H ordinal image, polyP selective image and 1-H T1 map image of capillaries containing different types of yeast cells. (Bar : 1mm)(1-b) 1-H T1 time and polyP intensity plot shows high correlation between them.

【 参考文献 】

1. 枋尾豪人 et.al., 第 41 回 NMR 討論会講演要旨集, pp390-1 (2002)
2. 杉原文徳 et.al., 第 42 回 NMR 討論会講演要旨集, pp102-3 (2003)
3. 杉原文徳 et.al., 第 9 回 NMR マイクロイメージング研究会講演要旨集, pp52-5(2004)

三次元撮像:KHEMMP

(1:筑波大学院 数理物質科学研究科 2:筑波大学院 理工学研究科 3:筑波大学 工学基礎学類 4:(株)エム・アール・テクノロジー 5:京都大学 医学研究科)

○松田善正¹, 小野真也², 半田晋也¹, 大竹陽介¹, 増本秀史³, 拝師智之⁴, 巨瀬勝美¹, 塩田浩平⁵

MR microscopy of a large human embryo collection (Kyoto collection) using multi-channel super-parallel MR microscope : KHEMMP

1:Graduate School of Pure and Applied Science, University of Tsukuba, 2:Masters Program in Science and Engineering, University of Tsukuba, 3:College of Engineering Sciences, University of Tsukuba, 4:MRTechnology Inc., 5:Graduate School of Medicine, Kyoto University

Y. Matsuda¹, S. Ono², S. Handa¹, Y. Ootake¹, H. Masumoto³, T. Haishi⁴, K. Kose¹, K. Shiota⁵

An efficient (super-parallel) MR microscope was developed for 3D MR microscopy of 1,400 chemically fixed human embryos. About 900 embryos were already measured at from $(70\mu\text{m})^3$ to $(150\mu\text{m})^3$ isotropic spatial resolution. The 3D image datasets were demonstrated to be useful for studies in human embryology.

1. はじめに

京都大学先天異常標本センター（センター長：塩田浩平教授）では、1960年代に組織的にヒト胚子を収集し、現在、数万体に及ぶヒト胚子の世界最大のコレクション（京都コレクション）を所蔵している(1)。本コレクションは、日本人初期子宮人口を代表する標本群であり、奇形の発生率も高く、先天異常を研究する上で重要なサンプル群である。これらのサンプルは、今後様々な観点から研究されていくものと考えられるが、その解剖学的基礎データを取得するために、代表的な胚子に関して、

MRI、ヒト胚子、三次元撮像、高速撮像、解剖学的基礎データ

まつだよしまさ、おのしんや、はんだしんや、おおたけようすけ、ますもとひでし、はいしともゆき、こせかつみ、しおたこうへい

MR マイクロスコープ撮像を行なうことを計画した。このため、従来の手法に比べて飛躍的な高速化を可能とした超並列型 MR マイクロスコープシステムの開発を行なった。現在、開発したシステムを用いて、外表面に先天異常が無く、傷のない代表的な胚子約 1,400 体の三次元 MR マイクロスコープ撮像を行なうことを目標としたプロジェクトが進行中であり、ここにその経過を報告する。

2. Kyoto Human Embryo 3D MR Microscopy Project (KHEMMP)

京都大学医学研究科先天異常標本センターには、約 5 万体のヒト胚子サンプルが所蔵されている。それらのサンプルのうち、外部表面に先天異常がなく、傷のない Carnegie Stage(以下 CS) 13~CS 23 の約 1,400 体に対し、三次元 MR マイクロスコープ撮像を行い、三次元デジタルデータとして保存するのが我々の計画である。

これらのデータ群を元に、(1)ヒト胚子データベースの構築、(2)撮像したサンプルデータからの各ステージの標準データの構築を行なう予定である。

3. 超並列型 MR マイクロスコープ：現状と 8CH 化へ向けた開発

本プロジェクトを行なうために、動物実験用 MRI システムの超伝導磁石(静磁場強度 2.34T、室温開口径 40 cm、均一領域 16 cm 球)を用いた 4CH 超並列型 MR マイクロスコープシステムを構築した(2)。さらに、8CH 超並列型 MR マイクロスコープを構築した Fig.1)。

これらのアレイ型プローブにサンプルをセットし、同時撮像を行なった。RF コイルは各サンプルの試験管の大きさごとにごとにソレノイドコイルを作成し、それらを使用した。MRI コンソールは 4 チャンネル型送受信系(当研究室開発)、8 チャンネルパワーアンプ(Thamway 製)、工業用 PC 1 台を用いた 4 チャンネル型 MRI コンソール、および 8 チャンネル型送受信系(DS Technology 製)、8 チャンネルパワーアンプ、工業用 PC 2 台を用いた 8 チャンネル型 MRI コンソールを用いた。

なお、CS17~CS23 には 4CH 型システムを用いて行なった。今後 CS13~CS16 には 8 CH 型システムを用いて撮像を行なう予定である。

4. ヒト胚子サンプル撮像データ

これまでに、Fig.3 に示すように CS17~CS23、約 900 体のヒト胚子の撮像を行なった。撮像シーケンスは 3D スピンエコー法、繰り返し時間は 100 ms エコー時間は 8 ms、10 ms および 12 ms、積算回数は 16 回、空間分解能は $(70 \mu\text{m})^3 \sim (150 \mu\text{m})^3$ とした。今後、約 6 ヶ月で CS13~CS16 の約 500 体のサンプルの撮像を行なう予定である。

5. 染色データとの比較

得られたヒト胚子のMR撮像データ(T₁強調画像)と、染色された解剖データの比較を行なった(Fig.4)。解剖データは、UNSWのHPに公開されているデータである。なお比較データはStage22である。T₁強調画像と、染色した解剖データでは類似したコントラストを有することが分かった。このことから、解剖学のデータとしてもMRIのデータが有用であるということが分かった。今後、体の部位ごとに、画像の画素値比較を行い、どの程度相関が高いかどうかを定量的に比較する予定である。

6. ヒト胚子標準標本データ

得られたデータ群から、ヒト胚子標準標本データを作成するが、これらの標準データは、先天異常標本との比較のための基準、そしてヒト胚子のステージ分けの基準となる。本研究では、その第一段階としてヒト胚子数体の正中断面を用いて、ヒト胚子の外表、心臓、肝臓、脊髄、背骨という周囲との判別が容易な部位に関して標準データの作成を、CS21～CS23に関して行なった(Fig.5)。現在、脊椎骨の形態学に関する情報(形状、相対座標など)を得るためのプロトコルの開発を行なっている。

7. まとめ

本プロジェクトは現在進行中であり、現在CS17～CS23に関して撮像を終了した。今後CS13～CS16の撮像を今年度で終了予定である。

この第一期プロジェクトが終了した後に、400MHzのMRマイクロスコプを用いて、得られたサンプルデータのうち、より標準的なものに対し、より高い空間分解能で撮像を行なう事を計画している。

参考文献

- (1) Nishimura H, Takano K, Tanimura T, Yasuda M. Normal and abnormal development of human embryos: First report of the analysis of 1213 intact embryos. *Teratology*, 1(1968) 281-290
- (2) Yoshimasa Matsuda, Shin Utsuzawa et al., A Super-parallel MR microscope, *Magnetic Resonance in Medicine*, Volume 50 (2003) 183-189

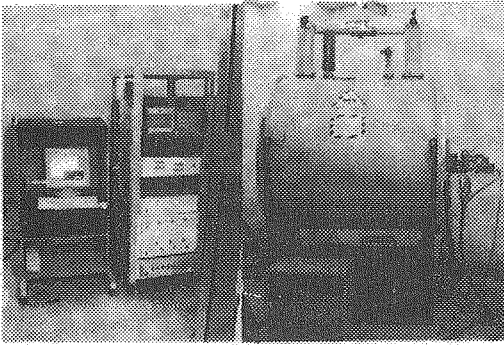


Fig.1 Super-parallel MR microscope

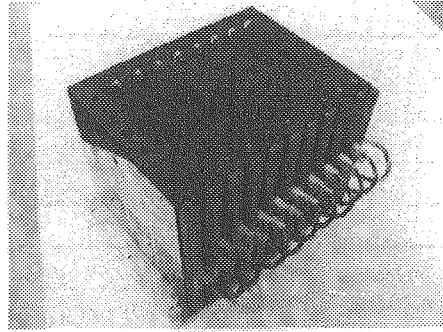


Fig.2 8CH Gradient Probe array

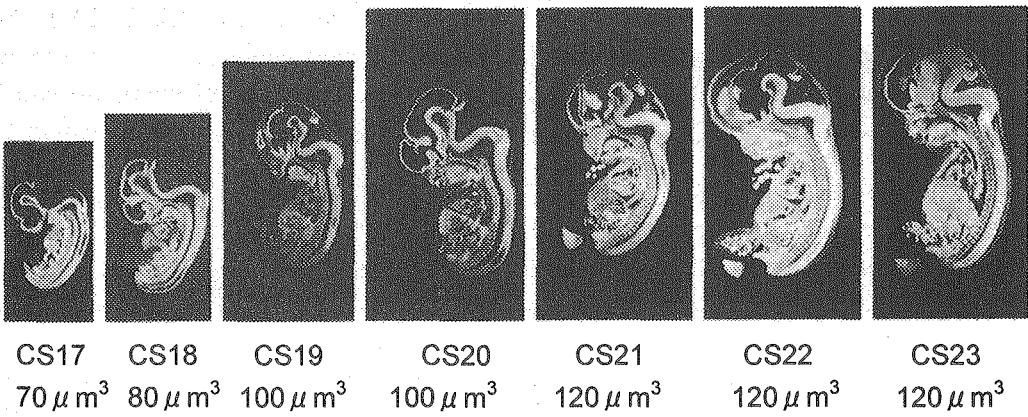
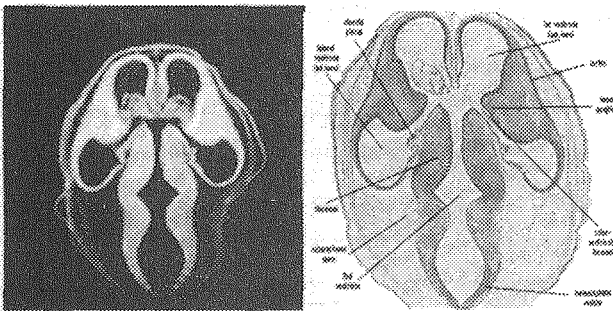


Fig.3 MR microscopy of Human Embryo

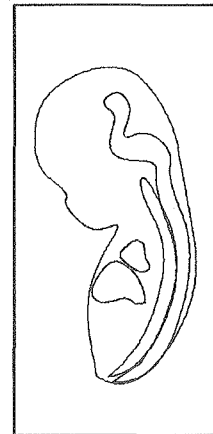


MR Microscopy

Real Data

Stage22

Fig.4 Comparison MRM with Real data



Stage23

Fig.5 Human Embryo Average Data

(¹食総研、²エム・アール・テクノロジー) ○石田信昭¹、内藤成弘¹、拝師智之²

Imaging of fat distribution in meet sample by compact MRI

Nobuaki Ishida¹, Shigehiro Naito¹, Tomoyuki Haishi²

¹National Food Research Institute, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8642, Japan

²MR Technology, Tsukuba Science City, Ibaraki 300-8642, Japan.

Imaging of fat distribution in meet sample were investigated using high field MRI and lowfield compact MRI system. Because T1 of fat was short comparing to fresh (meet) tissue, fat image can be emphasized in T1-weight images. In beef meat, fat can be clearly imaged by both MRI systems but chemical shift artifact was observed in the image by the high field system. Fat distribution of sausages can be clearly imaged by compact MRI. Though the sausage image of high field MRI show the detailed structure of the sample, the fat distribution is not clear.

MRIは医療分野だけでなく広範な分野へ応用が広がってきており、食品科学の分野でもNMRイメージングは食品の品質を非破壊で調べるよい手法であることが示されてきている。また最近では、永久磁石を用いたコンパクトなMRIが開発され、医療分野への応用やマウス標本の3次元データライブラリーの作成に使われるようになり、高価な上保守も手間がかかる超電導磁石を用いた高磁場型の研究用MRIを用いた食品研究だけでなく、食品研究の現場においてもMRIへの期待が高まっている。しかし、永久磁石を用いた低磁場型のMRIを用いて測定した食品のイメージは、超伝導磁石を用いた高磁場型のMRIの画像とは異なるコントラストを与えることも多く、低磁場型MRIの利用にあたり、高磁場型MRIを中心にこれまで進められてきた食品に関する研究結果の解釈と、低磁場型MRI画像との比較再検討が必要となってきた。

ここではこのような低磁場型コンパクトMRIを食品に利用するにあたり、感度面や磁場均一度の欠点はあるが、化学シフトアーティファクトが少ない低磁場の特長を生かして利用できる、脂肪分布のイメージ化について、高磁場型MRI画像と比較して検討した。

【材料及び方法】

試料：牛肉及びソーセージは市販品を用いた。

測定は、超電導磁石を用いたNMR装置に付属した高磁場型MRI装置(300MHz)及びエム・アール・テクノロジー社製の1T低磁場型装置を用いて行った。

キーワード：コンパクト、MRI、食品、3D、脂肪分布

著者：いしだのぶあき、ないとうしげひろ、はいしともゆき

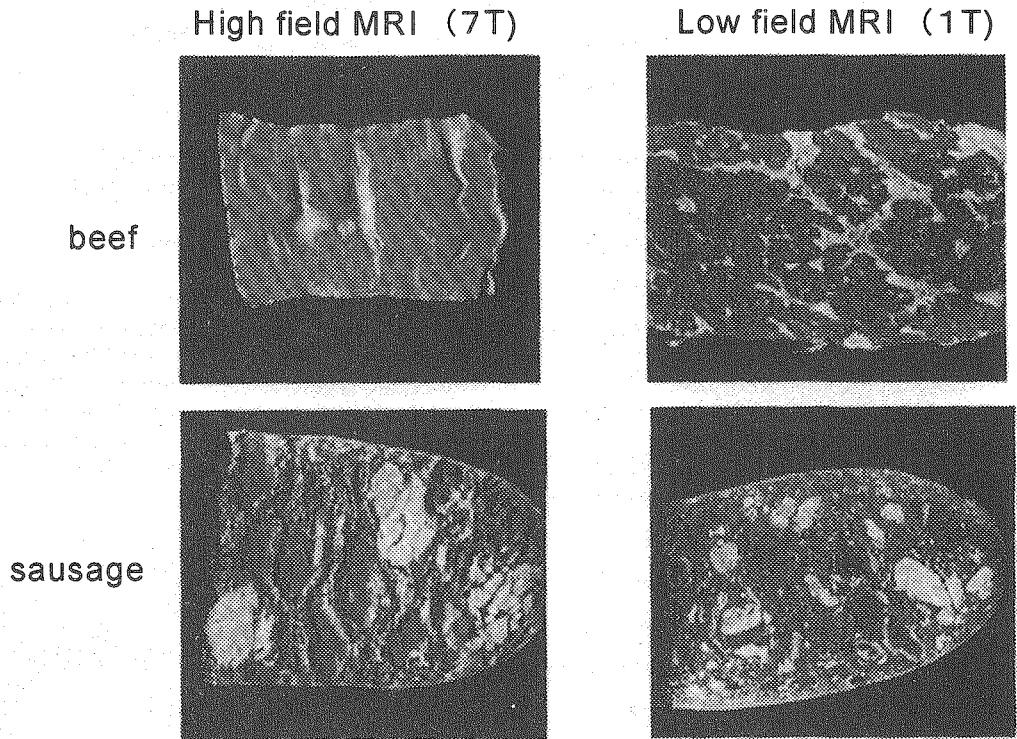


Fig. 1 MR images of meat samples with different magnetic field
 Images were measured by spin-echo method.
 High field MRI: TE=10ms, TR=5.0s for beef, TE=15ms, TR=0.2s for sausage
 Low field MRI: TE=10ms, TR=0.1s

【結果及び考察】

Fig. 1に磁場強度7T(300MHz)と1T(40MHz)でとった牛肉と粗挽きソーセージのイメージを示す。測定は通常のスピネコー法を用いており、試料に含まれる水と脂肪のイメージが重なって出てくる。牛肉のイメージはどちらの磁場強度でも脂肪が強調されたイメージとなり、脂肪分布がよくわかるが、高磁場MRIでは脂肪の化学シフトアーティファクトが強く出ている。

一方、ソーセージのイメージでは高磁場MRIはソーセージの構造(赤身、脂肪、すり身)を反映したコントラストが強かついた上に化学シフトアーティファクトがついたイメージとなったのに対し、低磁場MRIでは構造の違いによるコントラストや化学シフトアーティファクトはきつくなき、水と脂肪のT1の違いによるコントラストが大きかついたため、脂肪分布を明瞭に捉えることができた。ソーセージ組織毎の縦緩和時間の値は、7Tに比べ1Tでは2/3から1/2程度に短縮していたが、ともに脂肪の値は赤身に比べ1/2であり、T1-weightにより脂肪を強調することができた。このような磁場によるイメージコントラストの違いは、磁場強度が高くなると組織あるいは組織境界における磁化率の違いが強調され、T2*による減衰がコントラストに大きく影響してくるためと考えられた。

T2*及び化学シフトアーティファクトが小さい低磁場型コンパクトMRIは、食品の脂肪分布の観測には適していると考えられた。

“Development of a compact NMR/MRI for food science/engineering”
Tomoyuki HAISHI¹, Shin Utsuzawa^{1,2}, Shinya HANDA², Katsumi KOSE²

¹MRTechnology Inc., Tsukuba-city, Japan

²Institute of applied physics, University of Tsukuba, Japan

Three compact NMR/MRI systems using permanent magnetic circuits for food science/engineering have been developed. Three maintenance-free magnets were selected for samples and applications. Its fields strength were 0.12T (17cm gap), 1.0T (6cm gap), or 2.0T (6cm gap). With using higher order current shim coils, we have achieved 0.5ppm of H_0 homogeneity over an imaging volume (3cm dsv) at the 1T magnet. Experimental imaging results acquired at the 2T have showed us a similar image contrast of cherry tomatoes which was obtained at higher fields of superconducting magnets (>3T).

1. はじめに

超伝導 NMR/MRI を利用して食品を計測対称とした歴史は非常に古く、局所的傷害、腐敗及び劣化の検出が可能であることから高い有用性が指摘されてきている

[1]. しかし、大型・高価であり維持管理も大変なことからその利用は幅広い食品開発研究者の要望に応えにくいレベルに止まっているだけでなく、さらには全数検査を前提とした現場での頻繁な利用までに果てしない道のりがある。いっぽうで、工業及び電子工学技術の発達により、小型永久磁石磁気回路とコンパクトな NMR/MRI 分光計の作製が可能となり、扱いが容易なコンパクト MRI システムの開発が行える状況が開けており、食品用コンパクト MRI の実用化が強く期待されている。本研究開発は、平成 15 年度より認定された農林水産省民間結集型アグリビジネス創出技術開発事業によって 67% の資金援助を受けており、

食品総合研究所、筑波大学、および農林水産先端技術産業振興センターの協力を得て平成 17 年度末まで遂行される予定である。今回はその初年度の研究内容に関して報告する。

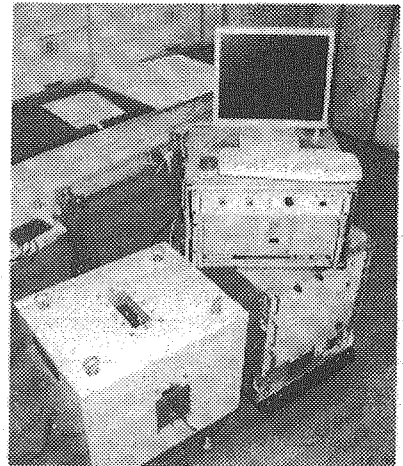


Fig.1. compact NMR/MRI (1T)

2. 研究開発の目的

本研究開発の最終目的は、食品検査・評価用のインタラクティブ（会話型）操作ができる、フルオート測定・解析型コンパクト NMR/MRI を開発することである。さらに、開発される装置は臨床用 MRI と同様に、検査によって装置・人件費等の諸経費を十分にカバーできる計測性能とコストパフォーマンスを同時に有するものとし、それを食品検査・評

コンパクト, MRI, 食品, シム

はいしともゆき

価・開発の基盤技術とする。

3. 食品用コンパクト NMR/MRI プロトタイプ: 1T-NMR/MRI システム

Fig.1 に開発された 1T 食品用コンパクト NMR/MRI を示す[2][3]。左下が 1T 永久磁石磁気回路(ギャップ 60mm, 水平垂直両開口, 12ppm@30mm φ球)であり, 図右が分光器である。NMR/MRI コンソール(AC100V, 1500W)は移動を前提としてラックケースに収納されている。また 1T 用の RF コイルは 7 巻の分割ソレノイドであり 43MHz に同調したときの Q 値はサンプルロード時でも 250 以上である。分割ソレノイドは, 撮像試料の違いに対して SN 比を安定させるために並列 LC 共振回路のコンデンサをコイルに対して分散させ浮遊容量を低減させる方法であり, サンプルの違いに対するチューニングのズレが改善できる。

4. 永久磁石磁気回路(1T)のための高次シムコイル開発[4]

1T 永久磁石磁気回路(1テスラ, 60mm ギャップ)は, グランドシミングによって 12ppm(30mm φ球内)均一度が達成されている。しかしながら, NMR スペクトルにより例えば水と油を分離するためには, 磁場均一性は概算で 1ppm/FOV が必要になってくる。そこで, 高次のシムコイル開発 ($Z^0, Z^2, Z^3, X^2, Y^2, X^2-Y^2$) を行い磁気回路のポールピース内面に取り付けた。Fig.2 に示すように, 水とサラダ油の NMR スペクトルを観測しながらシムコイルを駆動して電流シミングを行うことにより, 磁場均一度を約 0.5ppm(30mm φ球内)に高めることができた。Fig.2 左では水油のスペクトルは分離していないが, シムコイルに適切な電流を印加することにより, Fig.2 右では水油は明確に分離している。

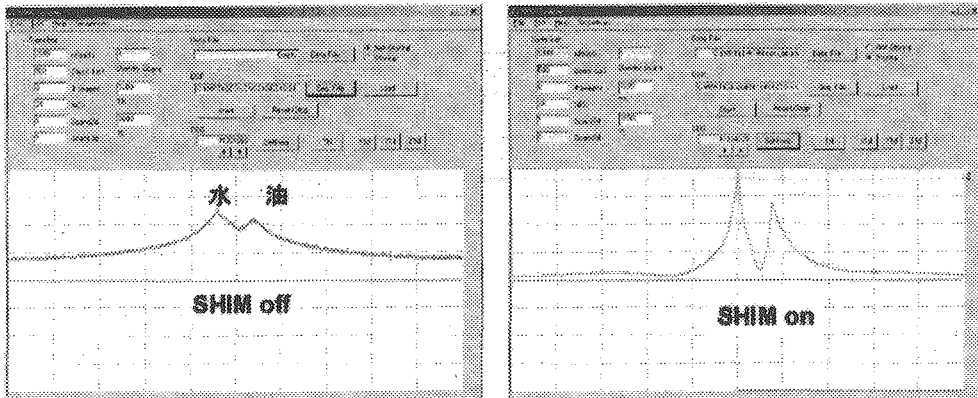


Fig.2. Spectrum changing at 30mm dsV with using higher-order current shim coils at 1T permanent magnet. The improved homogeneity is 0.5ppm and the spectrum of water and fat is clearly recognized.

5. 撮像実験: チェリートマトを用いて従来の NMR/MRI 装置の画像と比較する

コンパクト NMR/MRI に用いる永久磁石は, これまで食品研究用に主に用いられてきた超伝導磁石に比べ磁場強度が最小 1/7 以下に低く, さらに, 静磁場均一度も超伝導磁石 (0.1ppm) に比較して永久磁石 (10ppm) では 100 倍悪い。この場合に, 撮像試料のコントラストがどのように変化するかの実験を行った。チェリートマトは一年を通して国内で何処で

も購入することが可能であり、NMR/MRI の標準資料として非常に扱いやすい。Fig.3 は様々な NMR/MRI 装置で静磁場強度を変えて撮像を行ったチェリートマトであり、撮像は 2 次元もしくは 3 次元スピンエコー法、TR = 4000ms もしくは 5000ms、TE = 30ms から 100ms までの臨床用 MRI でいう T2 強調で取得されている。永久磁石磁気回路を用いたコンパクト NMR/MRI で取得された画像は(a)(b)(c)である。これらの MR 画像の大きな特徴としては、チェリートマトの中心部と辺縁部の画像コントラストが 1.0T を超える領域で明確になってくることであろう。0.3T では TE>100ms の設定値でも T2 減衰によるコントラストがほとんど現われず、どのようにしてもプロトン密度強調画像になってしまう。いっぽうで、7.0T の高磁場ではチェリートマトの辺縁部の信号低下が TE=30ms でも著しい。

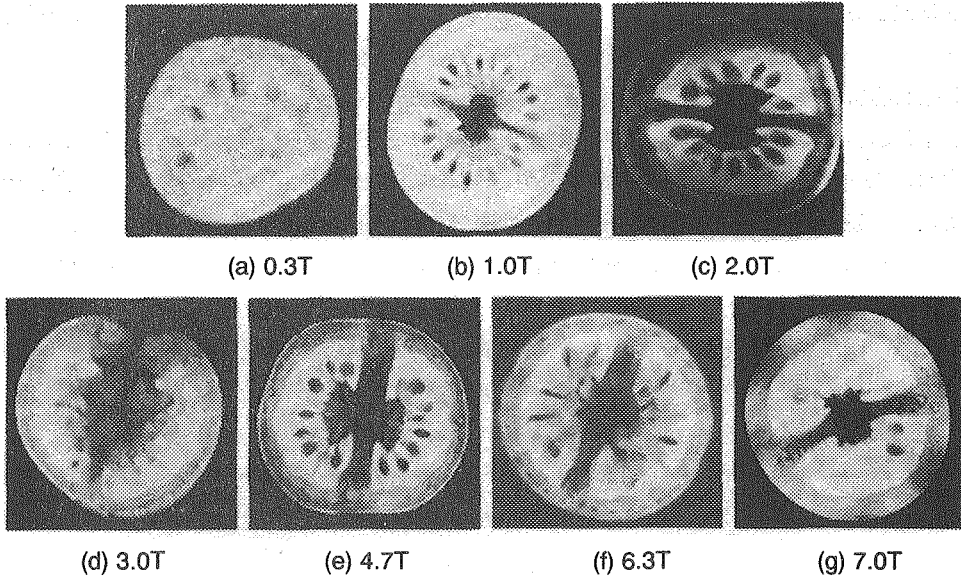


Fig.3. MR images of cherry tomatoes acquired at various field strength. Images of (a)(b)(c) were obtained with permanent magnetic circuit and images of (d)(e)(f)(g) were taken with superconducting magnet.

6. 食品の多様性に対応するために: 0.12T および 0.2T の NMR/MRI システム

Fig.4 は開発した、持ち運びがさらに容易な 0.12T 永久磁石磁気回路(C 型, 150kg, ギャップ 17cm, 均一度 50ppm@10cm ϕ)と、それを用いて撮像されたハッサクの画像である。この NMR/MRI システムのユニークなところは、ベルトコンベアなどの搬送機構に組み込んで野菜、果物、および肉魚貝類などの食品全数検査に用いる事ができることであろう。

Fig.5 は 2T 永久磁石磁気回路(上下左右両開口, ギャップ 6cm, 均一度 1.0ppm@30mm ϕ)と、それを用いて撮像されたチェリートマトの画像である。Fig.3(c)も同一の磁気回路で取得されている。ポイントは 2 つあり、超伝導高磁場で取得されたものに近い画像コントラストが得られる点と、検出コイルにソレノイドが使える点である。2T は鉄の飽和磁化の限界点付近であり今後の数年間は、NMR/MRI 用の永久磁石磁気回路としてはこれが世界最高の磁場強度を持つものとなるであろう。また SNR であるが、ソレノイドコイルが鞍型コイルの $2\sqrt{2}$ 倍良好であることを考えれば、2T+ソレノイドコイルの組み合わせでは、4.7T+鞍型コイルの SNR を凌駕する。

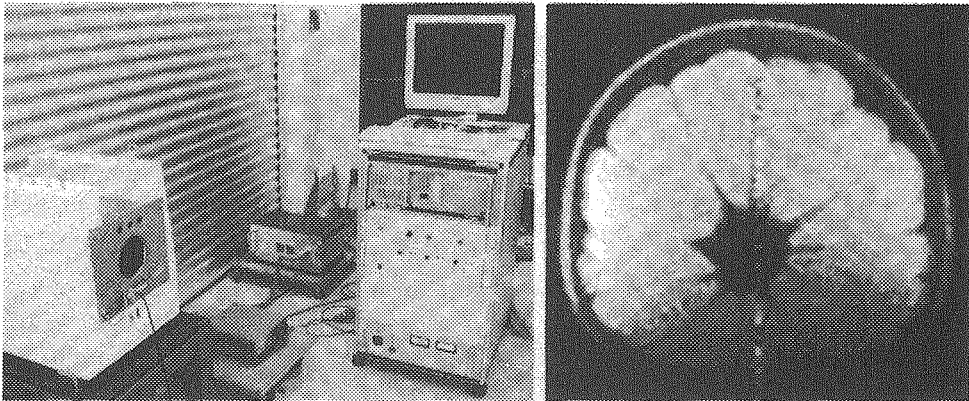


Fig.4. 0.12T-NMR/MRI system (gap170mm, weight 150kg) and 2D-SE image of Hassaku (FOV: 96mm×96mm, TR/TE=2000/96ms).

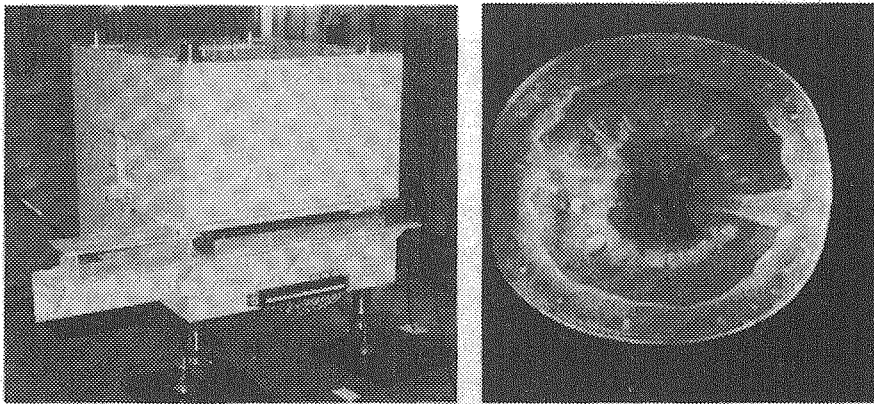


Fig.5. 2T-NMR/MRI system (gap 60mm, weight 1,000kg, installation space 1m²) and 3D-SE image of cherry tomato (FOV 25.6mm×25.6mm, TR/TE=100/10ms, S.T. 1mm)

7. まとめ

コンパクト MRI の食品への応用に関する F.S.を行い今後の開発方針を定め、試作 1号機の作製を行った。磁場均一性の向上についてはシムコイルを開発し均一度を約 20 倍向上させることができた。低磁場型 MRI の特長を生かした応用例の蓄積については、肉や魚の脂肪分布について測定例を増やすとともに、断面のイメージ、3次元立体イメージ、脂肪分布の解析を行うデータ処理プロトコルの開発を行った[5]。魚、肉及びその製品について、コンパクト MRI は脂肪の分布と内部構造を非破壊で3次元的にとらえるための非常によい手段であることがわかった。計測装置の洗練度を上げるため試験撮像は随時行っているのご連絡いただきたい。

8. 参考資料

- 1)狩野広美ら・食品研究とコンパクト MRI・第 8 回 NMR マ研究会講演要旨集・11・2003
- 2)K. Kose et al・MRMics・6th ISMRM・Sydney・1998
- 3)Tomoyuki Haishi et al・Magnetic Resonance Imaging・19・875-880・2001
- 4)半田晋也・H16 年卒業論文・筑波大学工学基礎学類・2004
- 5)拝師智之, 石田信昭ら・p94-p95・食品科学工学会第 51 回大会講演集・2004

Elongated T_1 values in human brain and the optimization of
MDEFT measurements at 4.7T

○Nobuhiro Takaya, Hidehiro Watanabe, Fumiyuki Mitsumori
(National Institute for Environmental Studies)

It was reported that the MDEFT (modified driven equilibrium Fourier transform) measurements gives an excellent T_1 contrast in the human brain at 4T. However, T_1 values for the grey and white matters were significantly increased at 4.7T compared with those values at 4T. In this study, we optimized the MDEFT measurements based on the T_1 values at 4.7T. In MDEFT measurements, a preparation period for the longitudinal magnetization, T_{MD} plays a decisive role for production of the contrast. Both the theoretical calculation and the experimental measurements on the phantoms indicated that the best contrast between the grey and white matters were obtained with the T_{MD} around 2.8s. Taking into account of total measurement time, T_{MD} was set to 2.0s. We also adjusted the flip angle. Tissue contrast was improved approximately 40% with the optimized parameters.

【はじめに】高磁場においては T_1 の延長により従来の T_1 強調画像法では良好な組織間コントラストが得られない。これに対し、3D MDEFT(3D modified driven equilibrium Fourier transform)法では二重の T_1 強調準備パルスを用いることにより高磁場において良好な組織間コントラストが得られる^[1,2]。しかし、4.7T でも高い組織間コントラストを得るためには T_1 の延長を考慮した測定パラメーターの最適化が必要である。今回我々は3次元の T_1 強調画像が得られる3D MDEFT 法のパラメーターを4.7T で最適化することにより、1mm³ の空間分解能で灰白質、白質間の高いコントラストノイズ比(CNR)を得ることができた。

【方法】測定は Varian 製人体用 4.7T INOVA 分光計と頭部用 ¹H TEM コイルを用いて行った。4.7Tにおける灰白質、白質の T_1 値は IR-Turboflash 法で測定した。パラメーターの最適化は、4.7Tにおける灰白質、白質の T_1 値を模擬したファントムを用いた実測、および、それぞれの T_1 値から予測される信号強度を用いた CNR の計算によりおこなった。3D MDEFT シークエンスは T_1 コントラストをつける 90° - 180° - α° パルス間の T_{MD} 期間と、FLASH 部から構成されている。(Fig.1)最適化は T_{MD} の長さ、FLASH 部のフリップ角について実施した。

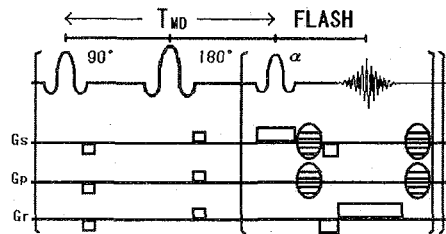


Fig.1. 3D MDEFT sequence

【結果と考察】

T_{MD} の最適化 4.7Tにおける灰白質、白質の T_1 値は $1.63 \pm 0.06s$ 、 $1.07 \pm 0.04s$ ($n=4$) であった。4Tで報告されている測定条件は $T_{MD}=1.2s$ 、フリップ角は 10° 、FLASH部のセグメント数は4である。4.7Tでのファントム測定では T_{MD} が3秒のときに最も高い T_1 コントラストが得られた。これは理論値の2.8秒に近い値であった。(Fig.2)我々は、ボランティアでの測定時間を考慮し、 T_{MD} を2秒と決定した。

Keywords: 高磁場 MRI, 3次元画像, T_1 , MDEFT, 4.7Tesla

たかや のぶひろ, わたなべ ひでひろ, みつもり ふみゆき

フリップ角の最適化 FLASH 部のフリップ角 20°の時に CNR が最も高かった。フリップ角が大きくなると測定後期での定常磁化が小さくなり、 k 空間周辺部分での信号が小さくなる。これは、空間分解能の劣化をもたらすおそれがある。このため、ゲル中に置かれた無信号のガラス壁をどこまで識別できるか、フリップ角を変えて空間分解能の評価を行った。その結果、フリップ角 15°以降で急激な分解能の低下が見られたので、最適なフリップ角を 13°に決定した。測定時間を延ばさずに、灰白質、白質間の CNR が 4T の条件を用いた場合に比べて約 40%高い画像を得ることができた。(Fig.3)

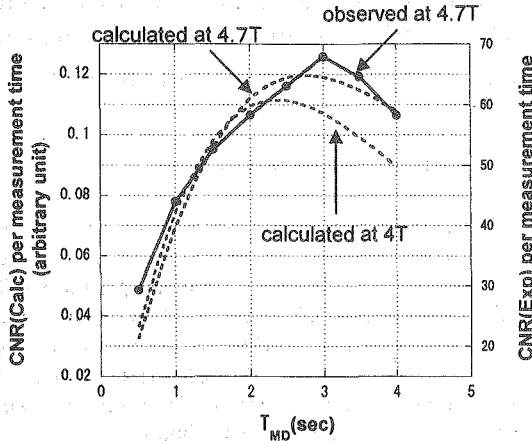


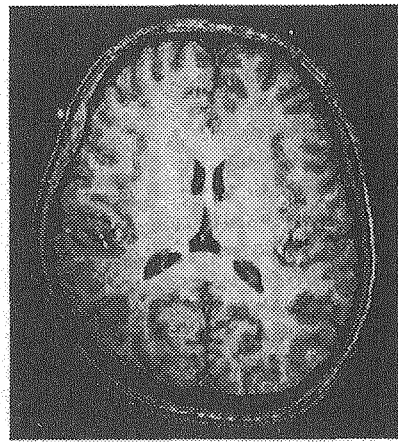
Fig.2. Observed and calculated CNR per measurement time between Grey matter(GM) and white matter(WM) as a function of T_{MD} .

Measurements was performed on gel phantoms whose T_1 and T_2 values were adjusted to simulate GM and WM.

$$\text{CNR per measurement time} = \frac{[\text{Signal(GM)} - \text{Signal(WM)}]}{[\text{noise} \times \sqrt{T_{MD}}]}$$



(1) optimized at 4T



(2) optimized at 4.7T

Fig.3. Comparison of 3D MDEFT images obtained parameters with (1) optimized at 4T and (2) optimized at 4.7T.

- (1) T_{MD} =1.2s, flipangle=10°, 4segment, measurement time=24min
- (2) T_{MD} =2.0s, flipangle=13°, 2segment, measurement time=21min

【結論】4.7Tにおける3D MDEFTの最適条件を T_{MD} を2秒、フリップ角を 13° に決定した。測定時間を延ばさずに、灰白質、白質間の CNR が 4T の条件を用いた場合に比べて約 40%高い画像を得ることができた。

【参考文献】

1. J.Hochmann, H.Kellerhals, J. Magn. Reson. 1980,38:23-39
2. Lee JH, Garwood M, Menon R, Adriany G, Andersen P, Truwit CL, Ugurbil K. Magn Reson Med. 1995,34(3):308-12.

NMR-based metabolomics (metabonomics) approach to understanding the metabolic responses of mammalian system to patho-physiological stimuli using 300 MHz NMR spectrometer and new PC software for analyzing FID data from biological samples.

Nippon medical School
Tohoku University
Graduate School of Medicine
JEOL DATUM LTD.

Keiko Hirakawa, Kyoko Uekusa, and Youkichi Ohno
Kaoru Koike

Kazunori Arifuku and Masako Fujiwara

NMR-based metabolomics (metabonomics) established and evolved by Nicholson and co-workers is an integrated NMR spectroscopic and chemometric approach applied to investigation of disease processes and toxic reaction induced by xenobiotics. They usually use high frequency proton NMR spectroscopy, 600MHz or greater, to increase sensitivity and to obtain high resolution. We have developed new software, 'alice2 for metabolome', well suited for NMR-based metabolomics (metabonomics), operated at Windows PC, and applied it to analyze the FID data of various biological samples for metabolomics measured at 300MHz NMR spectrometer. Chemometric results of them showed good results to understanding the metabolic responses to patho-physiological stimuli.

NMR によるメタボローム解析法(メタボロミクスあるいはメタボノミクス)は、Nicholson らによって確立され、主に創薬初期段階の毒性スクリーニング法として発展している。各種の病態解析に関する報告はまだ少ないが、ポストゲノムサイエンスとして、医学応用への期待度は極めて高い。

通常の NMR 測定試料とは異なり、この手法では、ヒトあるいは動物の血液、尿といった体液が測定対象となるため、多数の低分子代謝物と蛋白、脂質といった生体高分子が同一の試料中に混在する。得られたスペクトルについて、パターン認識による解析を行うので、個々の代謝物に由来するピークをすべて同定する必要はないが、巨大な軽水ピークや生体高分子に由来するブロードなピーク成分の存在は、低分子の代謝物の変化についての分析には妨害となる。また、統計解析を行うために、多数の検体によるデータセットが必要となるので、従来行われている NMR スペクトル解析手法では、多大な時間と労力を必要とするうえ、位相補正やベースライン補正等をマニュアルで行うことにより、オペレータのバイアスがかかってしまう危険性がある。

現在にいたるまで、NMR によるメタボローム解析用の測定法と共にさまざまなスペクトル解析ソフトウェアが考案され、実用化されているが、多検体自動一括処理機能に優れたスペクトル処理ソフトウェアは皆無に等しい。

今回、我々は、PC 用 NMR ソフトウェア Alice2 for Windows を改良し、生体試料に最適化したスペクトル処理方法を搭載、マクロ機能をフルに生かして操作を自動化し、多数の検体をわずかな時間で一括処理できる Alice2 for metabolome を新たに開発した。(詳細は本討論会にて有福が発表)。さまざまな病態モデル動物から採取した生体試料について、300MHz の装置で測定後の proton NMR データについて本ソフトウェアを用いてを処理し、メタボノミクスの常法に従って多変量解析を行ったところ、薬物の投与量やさまざまな処置後の病態などを反映した解析結果を得ることができた。NMR によるメタボローム解析の汎用性を考えると、300MHz といった低磁場の装置でいい結果を得られた意義は大きい。

Fig.1には同一の FID データについて Alice2 で処理した結果と Alice2 for metabolome で自動処理したスペクトルを示した。Fig.2～Fig.4 に酸素欠乏死のラット脳の死後変化のについての多変量解析の結果を一例をして示した。

キーワード:メタボローム、病態解析、代謝物プロファイリング、NMR 処理ソフトウェア、多変量解析

ひらかわけいこ、こいけかおる、ありふるかずのり、うえくさきょうこ、ふじわらまさこ、おおのようきち

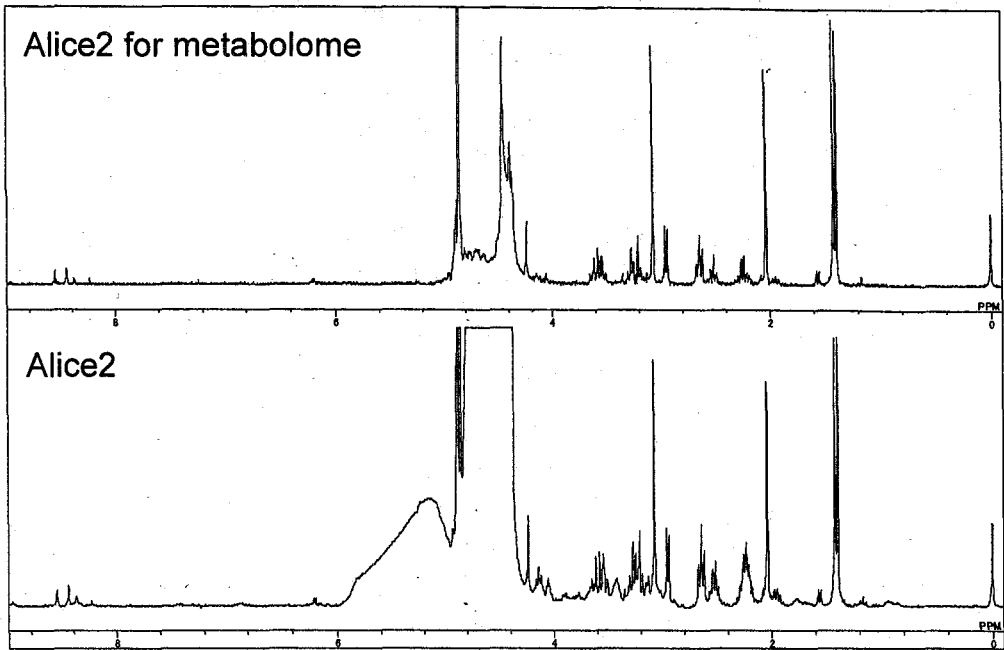


Fig.1 1H-NMR spectra of rat brain extract

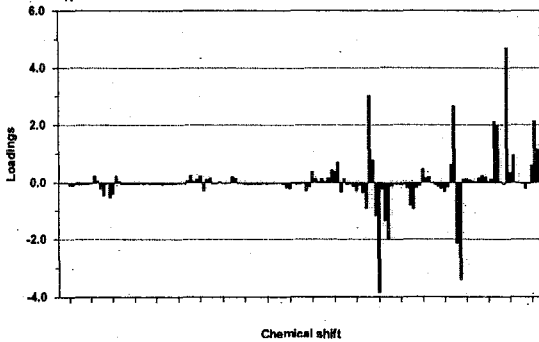


Fig.2 Loading plot

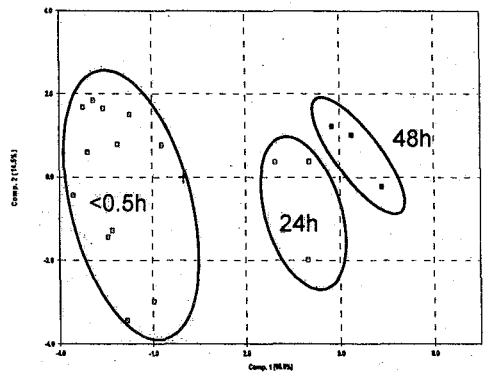


Fig.3 Principal Component Analysis(PCA)

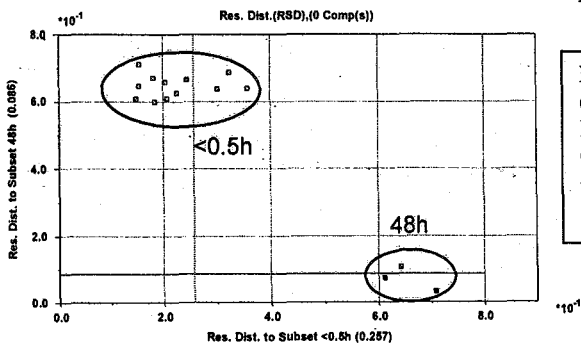


Fig.4 Soft Independent Modelling of Class Analogy(SIMCA)

Multivariate solutions to metabolomic profiling
 (Sirius® ver6.5 (PRS, Norway))
 Postmortem changes of the rat brain
 Cause of death: hypoxia
 <0.5h: Rigor Mortis (-)

高磁場高速MASおよび立体整列同位体標識(SAIL) を用いた固体高分解能 ^1H -NMR とその応用

(阪大蛋白研¹、CREST/JST²、都立大院理³)

○高橋大樹¹、藤原敏道¹、寺内勉²、甲斐荘正恒^{2,3}、阿久津秀雄^{1,2}

Fast MAS of stereo-array isotope labeled amino acid under high magnetic field for high-resolution solid-state ^1H -NMR

Hiroki Takahashi¹, Toshimichi Fujiwara¹, Tsutomu Terauchi²,
Masatsune Kainosho^{2,3}, and Hideo Akutsu^{1,2}

¹*Institute for Protein Research, Osaka University*

²*CREST/JST*

³*Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University*

^1H -NMR is widely used for the liquid-state samples because of its high sensitivity due to the high natural abundance and large gyromagnetic ratio. The measurement of ^1H - ^1H distances is a useful method for characterizing molecular structures. In solids, however, it is difficult to obtain high-resolution ^1H spectra, since the chemical shift differences of ^1H spins are comparable to the linewidths broadened by the strong homonuclear dipolar interactions. In this study, we demonstrate that fast MAS of stereo-array isotope labeled (SAILED) amino acid under high magnetic field improves the resolution of solid-state ^1H NMR spectra. This high-resolution method was applied to ^1H -observed 2D ^1H - ^1H and ^1H - ^{13}C NMR experiments. These 2D experiments provided the ^1H - ^1H distance constraints of SAILED valine with high sensitivity. This solid-state ^1H -NMR strategy will contribute to the signal assignment and structural determination of proteins.

【序】

^1H は天然にも多く存在して感度が良いため ^1H -NMR は有用であり、溶液状態では広く利用されている。また、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。ペプチド鎖の折れたたみを決定するためには離れた残基間の距離情報が必要であるが、 ^1H は炭素骨格から突き出ているため、構造決定に必要な距離は ^{13}C - ^{13}C 間よりも ^1H - ^1H 間の方が短く有利である。

しかし、固体状態においては ^1H - ^1H 双極子相互作用による線幅が大きく化学シフトによる分散が ^{13}C より小さいために、 ^{13}C に比べて高分解能な ^1H スペクトルを得ることは難しい。本研究では ^1H の分解能を上げることを目的として以下の3点を利用した。まず、高い磁場(16.4T、 ^1H 共鳴周波数: 700MHz)を用いて化学シフト差を双極子結合より大きくする。そして、高いMAS回転数で ^1H 間双極子結合を切る。さらに、SAIL法で構造情報を失わないように重水素化して ^1H 間双極子結合を弱め

マジック角試料回転、固体 NMR、安定同位体標識、高磁場、 ^1H -NMR

たかはしひろき、ふじわらとしみち、てらうちつとむ、かいのしょうまさつね、あくつひでお

る。また、応用として ^1H 直接観測による ^1H 間距離解析法を開発した。昨年の発表では ^1H 間磁化移動の機構を理論的に検討し、分解能の高い ^{13}C を通じて観測したが、今回は ^1H を直接観測することで感度を上げることにした。ここで働く ^1H 間磁化移動の機構は前回議論したことと同じである。

【実験】

図1に今回用いたパルス系列(a)および昨年度発表したパルス系列(b)を示す。 ^{13}C 磁化を交差分極(CP)で増幅した後、 ^{13}C の化学シフトで展開する。2つ目の CP では ^{13}C から ^1H へ磁化移動させ ^1H コヒーレンスを作り出す。その後、 ^1H を混合させ ^{13}C デカップリングを行いながら ^1H を観測する。試料としては 20%塩酸中で結晶化させたバリンとSAILバリンを用いた。用いた装置はVarian社CMX 500 Infinity Plus(3.2mmφスピナー)、およびCMX700 Infinity Plus(2.5mmφスピナー)であり、 ^1H の共鳴周波数はそれぞれ 500MHz、700MHz である。

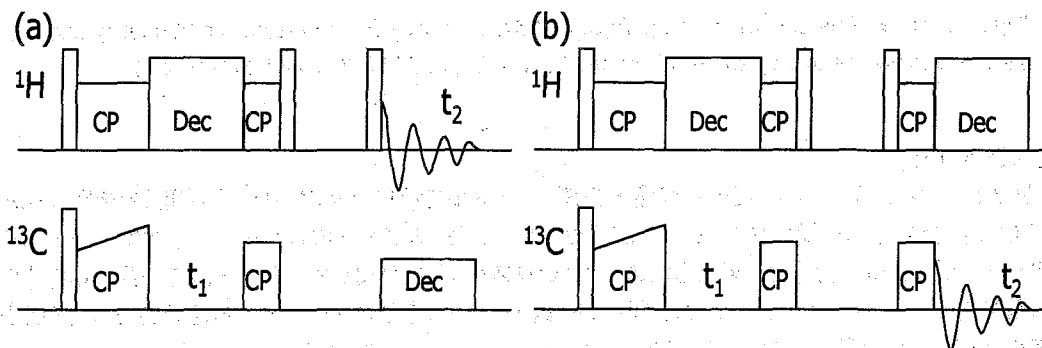


Figure 1. Pulse sequence used for the ^1H - ^1H magnetization transfer experiments under MAS with ^1H detection (a) and ^{13}C detection (b). The initial magnetization for ^{13}C is prepared by ramped-amplitude cross polarization from the proton magnetization. The ^{13}C magnetization is evolved during the t_1 period and transferred to ^1H with CP. The transferred magnetization is, then, mixed by the ^1H - ^1H zero-quantum dipolar interaction. The experimental parameters for the pulse sequence are as follows. The ^1H RF amplitude was 70 kHz for the $\pi/2$ pulse, 50 kHz for CP and 100 kHz for the ^1H TPPM decoupling. The contact times are 2.0 ms for the first CP and 74 μs for the second and third ones. The ^{13}C rf amplitude was 70 kHz for the $\pi/2$ pulse and varied from 58 to 89 kHz in the first cross polarization and 73 kHz for the second and third cross polarization. The ^{13}C rf field strength of the GARP decoupling for ^1H observation was 5 kHz.

【結果】

①1次元測定

^1H の 1 次元単一パルス測定の結果を図2に示す。共鳴周波数 500MHz、MAS周波数 23kHz では図2(a)のように一塊になっていた H^{N} 、 H^{O} のシグナルが、共鳴周波数 700MHz、MAS周波数 29kHz においては図2(b)のようにきれいに分離されているのがわかる。さらに、2つのメチル基の ^1H を1つだけ立体選択的に残し、あとは全て重水素化されたSAILバリンを用いることで、重なっていた H^{β} 、 H^{γ} のシグナルが見事に分離された(図2(c))。ここで、 H^{O} の線幅は 0.71ppm(a)、0.49ppm(b)、0.43ppm(c)、 H^{N} の線幅は 2.5ppm(a)、1.1ppm(b)、0.75ppm(c)、そして H^{γ} の線幅は 3.0ppm(a)、1.5ppm(b)、0.40ppm(c)である。このようにSAILアミノ酸を試料として高磁場(16.4T)中で高速MAS(29kHz)実験を行うことで線幅を減少させることができ、GRAMPS 多重パルスを用いることなしに高い分解能の ^1H スペクトルが得られた。

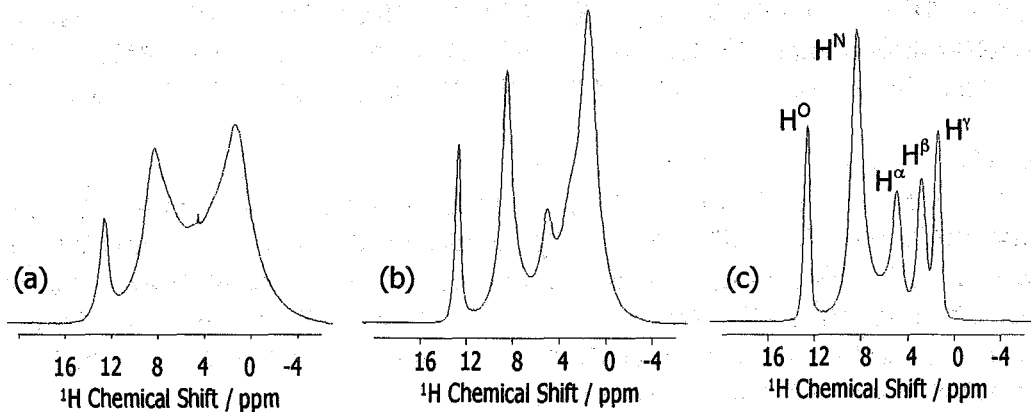


Figure 2. 1D ^1H -NMR spectra of valine (a,b) and SAILed valine (c). ^1H resonance frequency and the sample spinning frequency are 500 MHz and 23 kHz (a), and 700 MHz and 29 kHz (b,c).

②2次元測定

図3(a)に SAIL バリンの2次元 ^1H 双極子相関スペクトルを示す。MAS27kHz、 ^1H 間混合時間 592 μs であり、隣接する ^1H 間のクロスピークが観測されている。スピナーのスペーサー(材質:ベスペル)のピークが 8 ppm 付近に強く現れるため、きれいなスペクトルが得られなかった。次に図1(a)のパルス系列を用いた SAIL バリンの2次元異種核相関スペクトルを図3(b)に示す。測定条件は ^1H 双極子相関スペクトルと同じであり、(α,β : 2.5 Å)、(β,γ : 2.8 Å)、(γ,α : 3.0 Å)、(α,N : 2.7 Å)、(β,N : 2.9 Å)、(O,N : 4.7 Å)のクロスピークが観測された。スペーサーは ^{13}C 標識されていないためスペクトルには現れず、また ^{13}C の分解能を利用しているため、 ^1H 双極子相関スペクトルよりも分解能の良いスペクトルとなった。

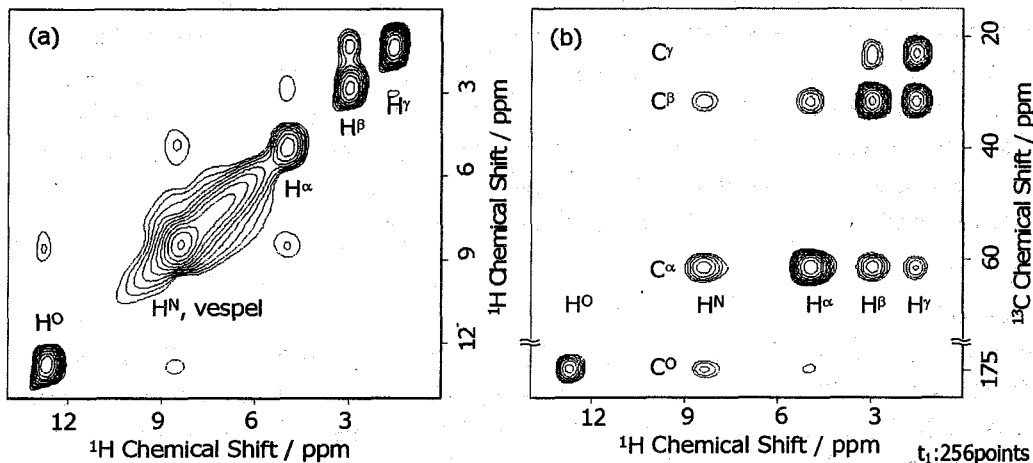


Figure 3. 2D ^1H - ^1H (a) and ^{13}C - ^1H (b) dipolar correlated NMR spectra of SAILed valine with the pulse sequences shown in Fig 1(a). The sample spinning frequency and the proton mixing time are 27 kHz and 592 μs , respectively. The contour levels for the signals in the carbonyl region are lowered by a factor of 3 in (b).

【考察】

今回おこなった実験を昨年度発表した方法と比較する。昨年度の方法はパルス系列を図1(b)に示したとおり、 ^{13}C の高いスペクトル分解能を利用するために混合後の ^1H 磁化をCPで ^{13}C に移してそこで観測している。このパルス系列で得られる SAIL バリンのスペクトルを図4に示す。実験条件は同じである。 t_2 軸上でスライスし、2つの ^{13}C スペクトルのS/Nを比較した。 ^1H 観測のものは ^{13}C 観測よりも α 位で1.4倍、 β 位で1.1倍、そして γ 位では3.4倍のS/Nが得られた。メチル基ではCPの接触時間が最適となっていないため、図1(b)の3回目のCPにおいて ^1H から ^{13}C に効率よく磁化が伝わっていない。したがって、 ^{13}C 観測におけるメチル基のシグナルは弱くなっている。また、 ^1H の直接測定のもはアミド ^1H との相関も観測されているため、主鎖の帰属や構造解析に有用となるだろう。

前回議論したように ^1H 間の磁化移動ではSAILアミノ酸を用いることによって移動する磁化が増大する。これは、SAIL法では構造情報を失わないように立体選択的に重水素化を行っているからである。したがって、SAILアミノ酸を用いれば分解能だけでなく、磁化移動効率も向上しクロスピークの強度が増すという利点もある。また、前回に比べて2倍以上も速いMASを用いたため磁化移動にかかる時間が増えたが、それに伴って対角ピークの減衰も遅くなったので緩和による磁化の損失に大きな影響はみられなかった。今回は ^{13}C 観測との比較を行ったが、 ^{15}N はさらに感度が低いため、より大きな感度の上昇が期待される。さらに、今回用いたMASよりも速い回転によって残存する双極子結合を弱めれば、さらにS/Nが増大し得るだろう。

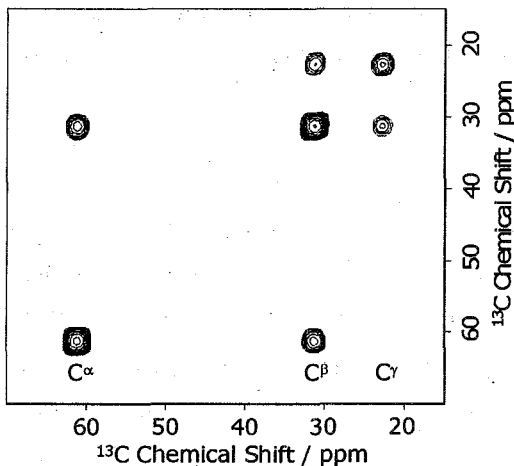


Figure 4. 2D ^{13}C -NMR spectra of SAILed valine with the pulse sequences shown in Fig 1(b). The sample spinning frequency and the proton mixing time are 27 kHz and 592 μs , respectively.

【まとめ】

高磁場中での高速 MAS-NMR 実験によってSAILアミノ酸の ^1H -NMRスペクトルが高い分解能で得られた。これを2次元 ^1H 双極子相関実験に応用することで、隣接 ^1H 間の距離相関を得ることができた。さらに、 ^{13}C の高い分解能を利用した2次元異種核相関実験では分解能も上がり、 ^{13}C 標識されていないバックグラウンドも消えた。この方法を応用すればペプチドや蛋白質などの大きな分子の ^1H 間距離解析ができ構造解析に役立つであろう。

参考文献

高橋大樹ら、第42回NMR討論会、2P34。

Decoupling and recoupling of nuclear spin interactions by modulated rf-fields in
 sample-spinning solid NMR

Yusuke Nishiyama¹, Toshio Yamazaki¹, Tsunenori Kameda²,
 Mitsuhiro Miyazawa², and Takehiko Terao³

¹RIKEN Genomic Sciences Center, ²National Institute of Agrobiological Sciences, ³ Graduate
 School of Sciences, Kyoto University

Abstract

We propose an approach to obtain modulated rf-fields which are robust with respect to rf-strength error. First, we present a condition to remove terms including rf-strength error in the 0th order average Hamiltonian. Second, the terms in the higher order average Hamiltonians are minimized by evaluating the effective Hamiltonians via numerical calculations. In line with this approach, we obtain a new and robust CSA recoupling sequence. The effectiveness of this sequence is experimentally demonstrated on [¹⁵N]-N-acetyl-D,L-alanine and α -chitin.

はじめに

スピン相互作用の空間的異方性は、分子の微細構造に関する情報を豊富に含んでいる。解析を容易にするために、試料回転のもとで着目した相互作用のみを取り出し(recouple)、不要な相互作用を消去(decouple)するさまざまな NMR 手法が提案されてきた。我々は近年、recouple/decouple を行う位相強度変調 rf-field を設計する一般的な手法を開発した[1]。この手法ではスピン空間の回転を表す Euler 角 $\Omega_{\text{spin}}(t) = (\alpha_{\text{rf}}(t), \beta_{\text{rf}}(t), \gamma_{\text{rf}}(t))$ を Fourier 級数を用いて表す。Fourier 級数を変化させることによりさまざまな選択的 decouple/recouple シーケンスを得ることができる。本発表では、rf-field の強度のずれに強い modulated rf-field を得るために適切な Fourier 級数を得るアプローチについて発表する。

modulated rf-field sequence

Symmetry principle においては N, ν, n の 3 つの symmetry numbers により Euler

固体 NMR、化学シフト異方性、MAS、recoupling

○にしやまゆうすけ やまざきとしお かめだつねのり みやざわみつひろ てらおたけひこ

角 $(\alpha_{\text{rf}}(t), \beta_{\text{rf}}(t), \gamma_{\text{rf}}(t))$ の時間に対する周期性が定められている[2]。シーケンスの周期は試料回転周期 $\tau_r (= 2\pi/\omega_r)$ の n 倍である。 RN_n^v の symmetry を満たすあらゆる Euler 角は次のように与えられる[2]。

$$\beta_{\text{rf}}(t) = \frac{\pi N t}{n \tau_r} + \sum_q \left[b_{cq} \cos \frac{2\pi N q t}{n \tau_r} + b_{sq} \sin \frac{2\pi N q t}{n \tau_r} \right] \quad (1)$$

$$\gamma_{\text{rf}}(t) = -\frac{2\pi \nu t}{n \tau_r} + \sum_q \left[g_{cq} \cos \frac{2\pi N q t}{n \tau_r} + g_{sq} \sin \frac{2\pi N q t}{n \tau_r} \right] \quad (2)$$

こうして設定した $\beta_{\text{rf}}(t)$ や $\gamma_{\text{rf}}(t)$ から位相強度変調 rf-field が直接求まる [3,4]。作成された rf-field の 0 次の average Hamiltonian の項と N, ν, n には次の関係があり、symmetry numbers を適切に選ぶことにより選択的 decouple/recouple を実現できる[2]。

$$\bar{H}_{lm\lambda\mu} = 0 \quad \text{if } mn - \mu\nu \neq (2Z + \lambda) \frac{N}{2} \quad (Z: \text{any integer}) \quad (3)$$

l は空間の rank であり m は $m = -l, -l+1, \dots, l$ の値をとる。また λ はスピン空間の rank であり $\mu = -\lambda, -\lambda+1, \dots, \lambda$ の値をとる。

0 次の average Hamiltonian における Rf-strength のずれ

Rf-field の強度 $\omega_1(t)$ がずれ、 $(1+f)\omega_1(t)$ の強度の rf-field が照射されたとき、rf-field の強度のずれによる 0 次の average Hamiltonian は $\nu \neq 0$ のとき

$$\bar{H}^{\Delta\text{rf}} = -\frac{f}{n \tau_r} \int_0^{n \tau_r} dt \dot{\gamma}_{\text{rf}}(t) \sin^2 \beta_{\text{rf}}(t) I_z \quad (4)$$

と与えられる。我々はこの項を消去する次の条件を見つけた

$$b_{cq} = b_{sq} = 0 \quad \text{for all } q, \text{ and } g_{s1} = -\frac{2\nu}{N} \quad (5)$$

この条件の下でも g_{s1} 以外の $\{g_{cq}, g_{sq}\}$ は自由に選べる。

高次の average Hamiltonian の効果

(3)式および(5)式を満たしながら g_{s1} 以外の $\{g_{cq}, g_{sq}\}$ を変化させることにより、同じ形の 0 次の average Hamiltonian をもつ rf-field が無数に作成できる。しかし、実際の性能は高次の average Hamiltonian や cross term により決まってくるので、 $\{g_{cq}, g_{sq}\}$ の選択は実用的な rf-field を作成する上で重要である。

我々は rf-field の強度のずれによる高次の average Hamiltonian を次の手順で評価した。まず rf-field とスピンの相互作用のみが存在する spin 系で数値的にプロパゲーター $U(f)$ を計算した。 $U(f)$ から rf-field のずれによる実効 Hamiltonian $H^{\Delta\text{rf}, \text{eff}}(f)$ を次のように計算した。

Structural analysis of Amyloid-β

(Graduate School of Science, Kyoto Univ.) ○ R. Ohashi, K. Takegoshi, T. Terao

(Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.) Y. Masuda, K. Murakami, K. Irie

The supreme feature of solids NMR is that it is applicable to powder samples which can not be crystallized or dissolved. For example, the solid-state NMR techniques have been applied to analyze a 3D structure of fibrous Amyloid-β, which is related to Alzheimer's disease[1]. In fact, by analyzing solid-NMR data, Tycko proposed a structural model for amyloid fibrils formed by the 40 amino-acid residues (Aβ40)[2] (Fig. 1(a)). In this work, we studied the mutant of Amyloid-β42 consisting of 42 residues with the 22th Glu being replaced by Lys. This mutant is called as Italian Amyloid-β42 and its neurotoxicity and aggregative ability are much stronger than Aβ40. Recently, Irie et al. proposed its structural model as illustrated in Fig. 1(b) [3]; two β-sheet structures are linked by a turn structure formed roughly by the Ala-21, Lys-22, Asp-23, and Val-24. In this work, we applied DARR[4] to examine the structure of the 21-24th residues by observing ¹³C-¹³C dipolar correlation among the 21-24 residues labeled uniformly by ¹³C, ¹⁵N.

¹³C-¹³C 2D DARR spectra of labeled Aβ42 taken at the mixing time of 20ms and 1 s are shown in Fig. 2(a) and (b), respectively. The assignment of the ¹³C peaks of the 21-24 residues were done by the former 2D spectrum. In the latter spectrum, two relevant cross-peaks for structural analysis were found (Fig. 3). One peak is between Lys-C_ε and Asp-C_γ (the peak-(a) in Fig. 3), and the other is between Val-C_γ and Asp-C_γ (the peak-(b) in Fig. 3). The appearance of these two cross-peaks indicate that the side chains of Lys, Asp, and Val lie in close proximity, thus negating β-sheet as for a secondary structure of the 22-24th residues because the two side chains of the continuous residues should exist in the opposite sides of the peptide chain (Fig. 4(a)). For a turn structure, two arrangement of the side chains may be invoked, namely, the side chains spread outside of the turn (Fig. 4(b)) or they come together inside of the turn (Fig. 4(c)). Despite of the apparent steric hindrance of the latter, our observation suggest the latter model for the structure of the 22-24th residues. Further details of the turn structure will be discussed.

[1] For a review, see: Serpell LC., *Biochim. Biophys. Acta.* **1502**, 16 (2000)

[2] A. T. Petkova, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 16742 (2002)

[3] K. Murakami, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 46179 (2003)

[4] K. Takegoshi, et al. *J. Chem. Phys.*, **118**, 2325 (2003)

Key words : 固体 NMR、ペプチド試料、多次元相関 NMR、構造解析、アルツハイマー病

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

ますだ ゆういち、むらかみ かずま、いりえ かずひろ

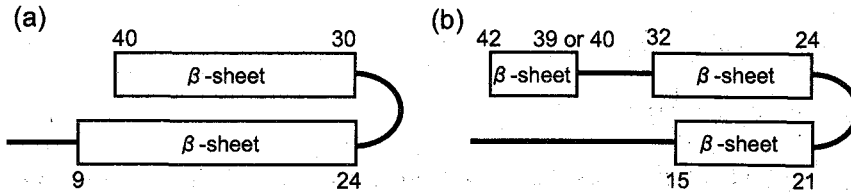


Figure 1 : Models of Amyloid- β
 (a) Tycko's model of A β 40, (b) Irie's model of A β 42

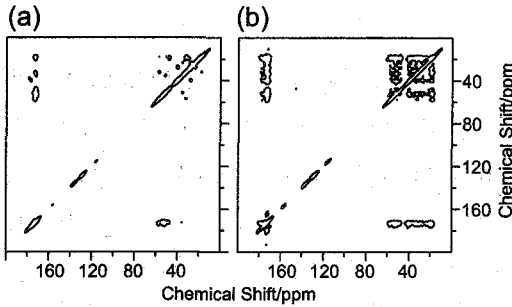


Figure 2 : ^{13}C - ^{13}C correlated 2D spectra
 The DARR polarization transfer time is 20 ms (a) and 1 s (b).

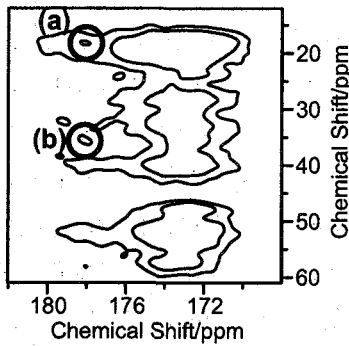


Figure 3 : Expand view of the 2D spectrum (Figure 2b)
 The thick circles indicate the cross peaks between Asp-C γ and Val-C γ (a), and Asp-C γ and Lys-C ϵ (b).

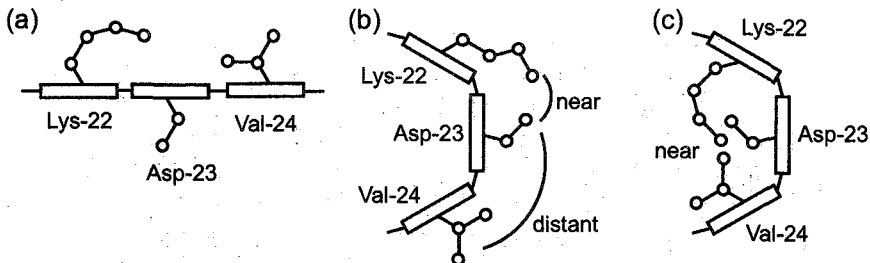


Figure 4 : Schematic illustration of the side-chain arrangement of the 22-24th residues of A β 42 : β -sheet (a), two turn models with side-chains existing outside (b) or inside of the turn (c)

$$H^{\text{Arf,eff}}(f) = \frac{i}{n\tau_r} \log U(f) \quad (6)$$

また $H^{\text{Arf,eff}}(f)$ の大きさを次のように評価した。

$$|H^{\text{Arf,eff}}(f)| = \text{Tr} \left\{ \left(H^{\text{Arf,eff}}(f) \right)^2 \right\}^2 \quad (7)$$

$H^{\text{Arf,eff}}(f)$ は rf-field のずれの高次の average Hamiltonian による寄与をすべて含んでいるので、 $|H^{\text{Arf,eff}}(f)|$ を小さくすることにより、rf-field の強度のずれに強い rf-field を作成できる。

σ_2 CSA recoupling

我々は $(l, m, \lambda, \mu) = (2, \pm 2, 1, \pm 1)$ すなわち σ_2 項を選択的に復活させ他の CSA の項を消去する σ_2 CSA recoupling シーケンスに対して今回のアプローチを適用した。 σ_2 による粉末パターンは、 $\sigma_2 = -\frac{1}{2}\Delta\sigma \sin^2\theta$ から $\sigma_2 = \frac{1}{2}\Delta\sigma \sin^2\theta$ までの幅を持つ特異な線形を示し、 σ^{iso} とあわせて化学シフトテンソルの3つの主値を決定できる。ここで θ は試料回転軸と静磁場のなす角、 $\Delta\sigma$ は化学シフトテンソルの3つの主値のうち最大のものと最小のものとの差である。(3)式より、 $n \leq 6$ 、 $N/n \leq 10$ 、 $|\nu| < 2n$ の条件の下で σ_2 CSA recoupling を実現するすべての symmetry numbers の組を求めた。それぞれの symmetry numbers に対して、(5)式を満たしながら $\omega_i(t)$ の最大値が $5\omega_r$ を超えない範囲で $\{g_{s2}, g_{s3}\}$ のみを変化させ $-0.2 < f < 0.2$ の範囲で $|H^{\text{Arf,eff}}(f)|/S$ の平均値が最小になる symmetry numbers および $\{g_{s2}, g_{s3}\}$ を求めた。ここで S は recouple する項のスケーリングファクターである。この操作により $(N, \nu, n) = (6, 1, 5)$ 、 $\{g_{s2}, g_{s3}\} = [-2.6, -1.1]$ がもっとも小さな $|H^{\text{Arf,eff}}(f)|/S$ を実現することを見つけた。この modulated field シーケンスの rf-field のずれに対する補償性、offset 補償性、CSA の大きさに対する挙動を図1に示す。図1に示されるように rf 強度が理論値の0.9倍 ($f = -0.1$) から1.3倍 ($f = 0.3$) の範囲で共鳴周波数の変化は5%以下に抑えられる。このようにこのシーケンスはさまざまな大きさの CSA にたいして rf-field のずれ、offset の補償性が大変良い。図2にさまざまな rf-field の強度および照射オフセットに対して観測を行った $[^{15}\text{N}]\text{-N-acetyl-D,L-alanine}$ の CSA スペクトルを示す。

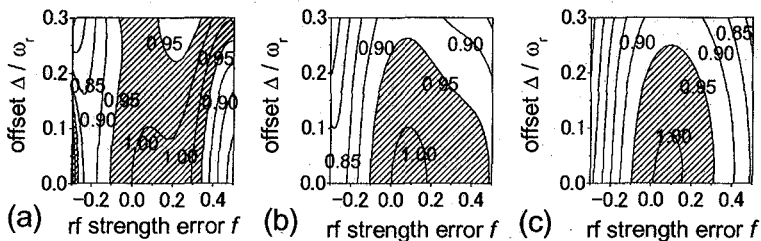


Fig.1 Peak positions in the calculated spectra under various offsets and rf-field inhomogeneities for modulated rf-field sequence. The peak positions are normalized by the σ_2 value used in the calculations. CSA values of $\gamma B_0 \sigma_2 = 0.1\omega_r$ (a), $0.2\omega_r$ (b), and $0.4\omega_r$ (c) were used. The contour lines from 0.7 to 1.3 by 0.05 are plotted and the regions between 0.95 and 1.05 are shaded.

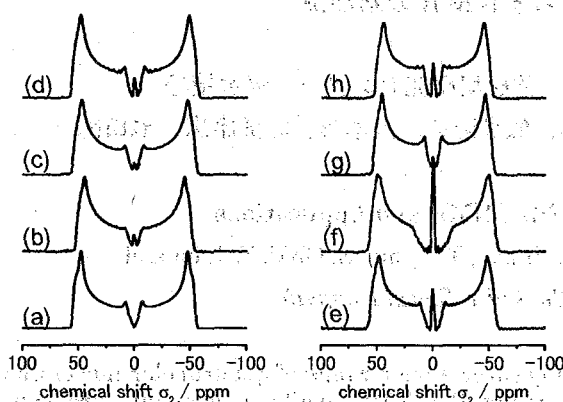


Fig.2
 Simulated (a) and experimental (b-h) 40 MHz ^{15}N σ_2 NMR spectra of ^{15}N -N-acetyl-D,L-alanine observed by modulated rf-field sequence under MAS. The experimental spectra were obtained from the slice of the 2D $\sigma_2/\sigma^{\text{iso}}$ spectra along the σ_2 axis at $\sigma^{\text{iso}} = 125.4$ ppm. A spinning frequency of 10.0 kHz was used. The spectra were observed under various rf-strength and offset (f_{exp}, Δ) = (-0.10, 0) (b), (0.00, 0) (c), (0.10, 0) (d), (0.20, 0) (e), (0.30, 0) (f), (0.00, 0.13 ω_r) (g), and (0.00, 0.19 ω_r) (h). The simulated spectrum was calculated with principal values of (65, 86, 226) ppm with Gaussian line-broadening of 3.0 ppm. The σ_2 axis has been corrected by the theoretical scaling factor S .

α キチンの水素結合構造

α キチンにおいては、6位の OH が形成する水素結合が分子内か分子間かに応じた 2 種類の水素結合様式が存在する。カルボニル炭素の ^{13}C CP/MAS スペクトルにはこの二つの水素結合様式を反映していると考えられる 2 本のピークが現れる。我々はキチンのカルボニル炭素の CSA を今回開発したシーケンスにより測定した。図 3 に示すように -60°C において 2 本のピークはわずかに異なる粉末パターンを示した。シミュレーションにより CSA テンソルの主値をそれぞれ A (86, 197, 245) B (87, 190, 242) ppm と決定した。モデル分子をもちいた量子化学計算の結果から、我々は A を分子内水素結合をもつカルボニル炭素からの信号、B を分子内水素結合を持たないものからの信号だと帰属した。また 1D CP/MAS スペクトルよりそれぞれの存在比率を 35:65 と決定した。温度変化を行うとこの二つのサイトが交換して平均化される様子が観測できた。水素結合構造の詳細な検討は 3P135 にて行う。

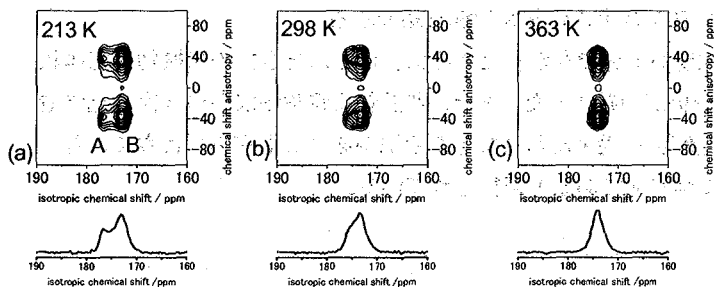


Fig. 3
 $\sigma_2/\sigma^{\text{iso}}$ 2D ^{13}C correlation (upper) and 1D ^{13}C CPMAS (lower) spectra of α -chitin. The 2D spectra were obtained by modulated R6_5^1 sequence with $(g_{s1}, g_{s2}, g_{s3}) = (-0.33, -2.6, -1.1)$ at 213 K (a), 298 K (b), and 363 K (c). The sample was spun at magic angle with a spinning frequency of 15 kHz.

参考文献

- [1] 西山裕介, 山崎俊夫, 寺尾武彦, 第 4 2 回 NMR 討論会 1P25 (2003)
- [2] M.H. Levitt, Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance Volume 9 (2002) 165.
- [3] J. Zhou, C. Ye, and B.C. Sanctuary, J. Chem Phys. 101 (1994) 6264.
- [4] Y. Ishii, and T. Terao, J. Chem. Phys. 109 (1998) 1366.

((独) 物質・材料研究機構 強磁場研究センター) 清水禎〇

(同上) 丹所正孝、後藤敦、端健二郎、飯島隆広、大木忍、藤部康広、池田龍一

Developments of High Filed NMR and Applications

T. Shimizu, M. Tansyo, A. Goto, K. Hashi, T. Iijima, S. Ohki, Y. Tobu and

R. Ikeda (NIMS, Tsukuba, Ibaraki, Japan)

Possible applications of a high field NMR may cover a wide range of quadrupolar nuclei like Al, B, Ca, Cu, O, Ti, etc. About 75% among the NMR available elements are spin half-integer quadrupolar nuclei (HIQN). Many HIQN can be seen in practically important materials, especially in inorganic materials. HIQN located at non-cubic sites gives a poor resolution, because a possible 2nd order quadrupole effect giving rise to a line broadening cannot completely be resolved by a conventional high resolution technique such as magic angle spinning (MAS). Applying high field may be the best straightforward solution to improve the resolution of HIQN, because the 2nd order quadrupole effect is reduced in inverse proportion to the field.

物質・材料研究機構ではNMR用磁石としては世界性高磁場となる930MHz(21.9T)を最近開発して定常運転に入った。他にも、従来から40T級ハイブリッド磁石など世界水準の強磁場磁石を稼働中である。これらの特徴ある強磁場磁石を用いて固体NMR測定を行える装置開発を最近、整備し始めた。本講演では、整備や研究の狙いなどについて報告したい。

欧米では強磁場NMRが積極的に導入されている。現在は溶液で800MHz(16T)NB、固体で600MHz(14T)NBまでのNMRシステムが普及しつつあるが、多くの材料でさらに強い磁場のNMRシステムを必要としている。物材機構では、超伝導磁石の世界最高磁場930MHz(21T)NMR磁石、および定常磁場の世界第二位となるハイブリッド磁石等の先端的磁石を開発してきた。これらの強磁場磁石を利用したNMRシステムの整備状況を紹介する。

従来の固体NMR技術では磁場の強度が十分でなかったために、ほとんど全ての無機物や固体状態の有機高分子材料等は高精度な分析が困難だった。また、非晶質物質や触媒等の3次元化学構造の解明などは、X線回折等、構造解析に従来使われてきた手法が必ずしも有効ではなく、むしろ、原理的な理由から強磁場NMRが有利であると期待されている。

キーワード： 固体NMR、強磁場、装置開発、研究基盤の強化

著者ふりがな： しみずただし、たんしょまさたか、ごとうあつし、はしけんじろう、いいじまたかひろ、おおきのぶ、とうぶやすひろ、いけだりゅういち

NMRは本来、周期律表の90%の元素に対して分析可能であるにも係わらず、従来の分析対象は水素など観測容易な主要3核種に限られてきた。他の元素は四極子核（酸素、アルミ、ホウ素、チタン、カルシウム等の電気四重極モーメントを持つ核種）のため分解能が足りなかったことが主な原因である。

図1に代表的な四極子核の特性を示す。縦軸は信号強度、横軸は四極子相互作用の2次摂動による線幅を示す。左上から右下に行くほど観測困難な核種を示している。この図から、強磁場を用いるほど信号強度と分解能の両面で有利になることが分かる。四極子核の分解能を解決する原理的に唯一の方法である強磁場化によって、従来は分析対象にならなかった多くの元素において固体高分解能NMR分析が可能になり、莫大な量の未開拓分野が発掘できる。

本研究の目的は、物材機構が開発した930MHz世界最高磁場NMR磁石など20T以上の強磁場を持つ優位性を活かしたNMRシステムを開発し、それを産学官の国内ユーザーに開放することによって、材料の開発効率を劇的に向上させるための技術基盤・知的基盤として貢献することである。物材機構では共同利用施設として強磁場NMRシステムを国内のユーザーに開放している。宿泊施設や旅費の支給等のサービスも整備してきた。現状では交通の便が悪いが、平成17年に開通予定の新線（つくばエクスプレス）によって秋葉原—つくば中央間が45分で結ばれるため、劇的な改善が期待できる。NMRをルーティンで行うには、測定に従事する支援者（オペレーター）が必要である。現状では皆無なので、今後、改善したい。

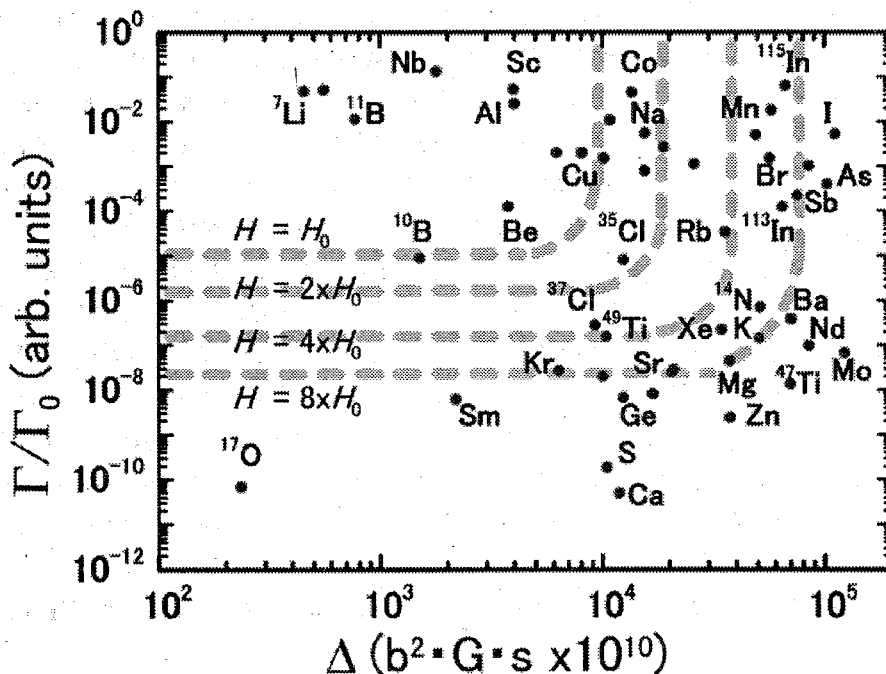


図1: 四極子核の感度と線幅 (T. Shimizu, et al., submitted to *Chem. Lett.* 2004)

1P112★

¹⁴N オーバートーン照射による

近接 ¹³C 線幅増大を利用したペプチド二次構造解析

(京大院理¹、群馬大工²)

○深澤隼¹、竹腰清乃理¹、莊司顯²、寺尾武彦¹

**Peptide secondary structure analysis using ¹³C NMR spectrum line broadening
due to overtone NMR irradiation to neighboring ¹⁴N**

¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

²Department of Biological Sciences, University of Gunma

○¹Jun Fukazawa, ¹K. Takegoshi, ²Akira Shoji, ¹Takehiko Terao

To exploit the possibility of using ¹⁴N NMR in solids for structural study of peptides, we have developed a technique to observe ¹⁴N overtone NMR via ¹³C spectra under magic angle spinning (MAS) [1]. Here we applied the technique to a few polypeptides whose secondary structures are known. Observed ¹⁴N quadrupole coupling constants were analyzed by using Gaussian98 [2].

窒素はペプチドの主鎖を構成しており、その構造を知る上で重要な手掛かりを与える原子である。その窒素の同位体である ¹⁴Nはその天然存在比が 99.63%と高いにもかかわらず、その四重極相互作用が数MHzと大きく、高分解能測定が困難な為そのNMRは殆ど利用されていなかった。この問題を克服するために ¹⁴Nの $|+1\rangle$ と $|-1\rangle$ の状態間の遷移、すなわち overtone 遷移を観測する手法が開発された[3]。¹⁴Nの overtone 遷移の共鳴周波数は四重極相互作用の 1 次のシフトの影響を受けず、それより一般に小さい 2 次の影響を受ける。そのため、四重極相互作用の 1 次のシフトの影響を受ける $\Delta m=1$ の遷移に比べ高分解能のスペクトルが得られることが期待される。Stewart らは、単結晶のペプチドの ¹⁴N overtone NMRスペクトルを測定することによって主鎖の二面角に対する知見を得ることを提案している[4]が、overtone の遷移確率は小さいため、一般に粉末試料の ¹⁴N overtone NMRスペクトルを直接測定するのは困難である。本発表では我々が開発した、粉末試料に ¹⁴N overtone 照射をすることによってMAS下において平均化されている ¹³C-¹⁴N相互作用を復活させる手法をペプチド試料に応用することを試みる。つまり、¹⁴N overtone 照射のもとで ¹³C高分解能NMR測定を行い、照射周波数と復活する ¹⁴N-¹³C双極子相互作用の大きさ、具体的には ¹³Cの線幅の増大などとの関係を調べることにより間接的に ¹⁴N overtone スペクトルを得て、構造の知見を得ることを行った。

¹Hと ¹³Cの共鳴周波数はそれぞれ 299.5202MHzおよび 75.323MHz、MAS回転速度は

キーワード： ¹⁴N、オーバートーン、四極子

ふかざわじゅん、たけごしきよのり、しょうじあきら、てらおたけひこ

5.5kHz、オーバートーン照射強度は 80kHz で測定を行った。

Figure 1A に、Ala の C_α を ^{13}C ラベルした polypeptide (Ala*:Val)=30:70 の ^{13}C CP-MAS スペクトルの C_α 部位を示す。高周波数側のピークが α -helix、低周波数側が β -sheet の C_α に由来する。B, C に ^{14}N オーバートーン照射を行った結果を示す。全体的なシフトは Bloch Siegert シフトによるものである。43.370MHz に照射したとき(B)に α -helix のピークが、43.346 MHz に照射したとき(C)に β -sheet のピークが最も幅広になった。この線幅の変化を、照射周波数を細かく変えながらとり、プロットしてやると、 ^{14}N overtone スペクトルが間接的に得られる。

サンプルとして、各の Ala の C_α を ^{13}C でラベルした polyalanine ((Ala*:Ala)=50:50) (α -helix)、(Ala)₃-Ala*(Ala)₃ (β -sheet)、poly(Ala*:Val)=20:80 (α -helix)、poly(Ala*:Val)=30:70 (β -sheet) を用いた。()内は各の取る二次構造である。各の ^{13}C CP-MAS スペクトルを Figure 2 A-D に示し、 ^{14}N オーバートーン照射による線幅の変化を a-d' に示した。これをみると、 α -helix のスペクトルは共に 43.37MHz 付近、 β -sheet のスペクトルは共に 43.35-6MHz 付近を頂点とした

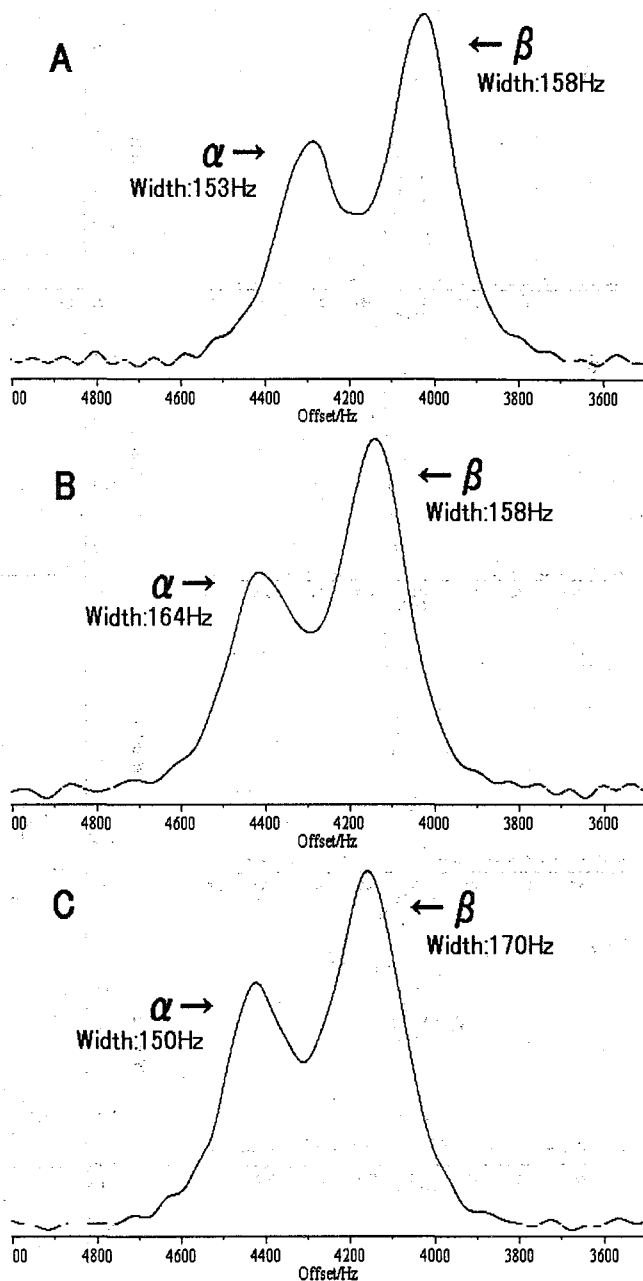


Figure 1. ^{13}C spectra of Polypeptide (Ala*:Val)=30:70 without irradiation (A), and under the ^{14}N overtone irradiation at 43.370 MHz (B) and 43.346 MHz (C).

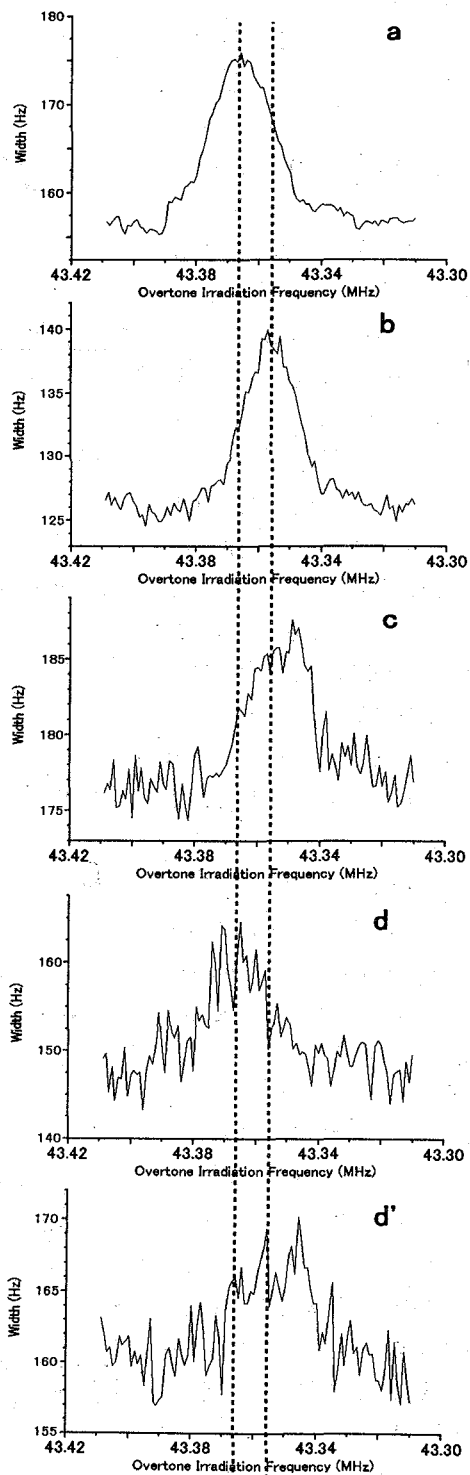
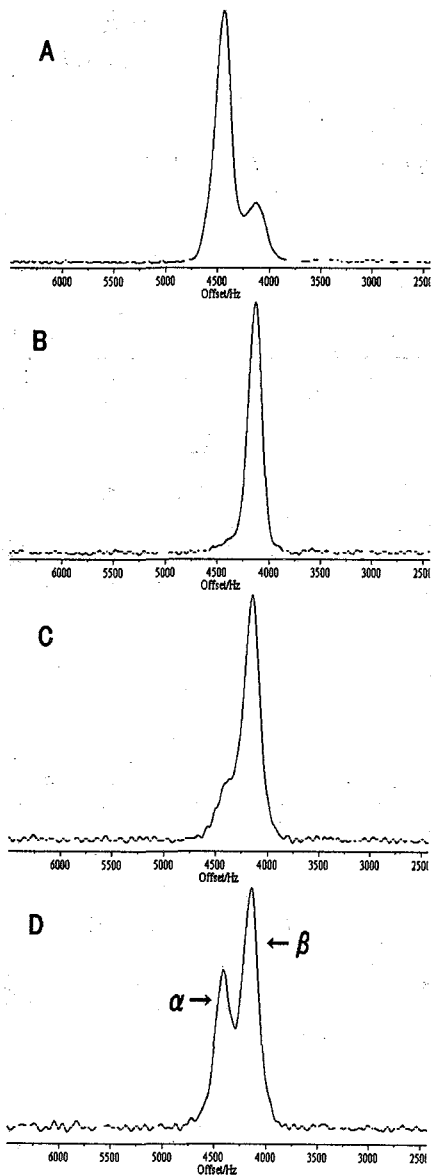


Figure 2. ^{13}C spectra of peptides C_α (capital letters) and ^{14}N spectra plotting the width of ^{13}C spectra (small letters.)

A, a: (Ala*, Ala)=50:50(α)

B, b: (Ala)₃-Ala*(Ala)₃(β)

C, c: (Ala*, Val)=20:80(α)

D, d, d': (Ala*, Val)=30:70

d: left peak(α), d': right peak(β)

形になっており、明確に区別が可能であることがわかる。この最大線幅の照射位置が ^{14}N のオーバートーン共鳴の中心に対応すると考えられる。従って、この結果により、 α -helix と β -sheet で C_α に直接結合した ^{14}N の四極子の大きさに違いがあることが分かる。この線幅変化の違いを利用して α -helix/ β -sheet の ^{13}C C_α 信号を簡便に選択する手法について検討中である。

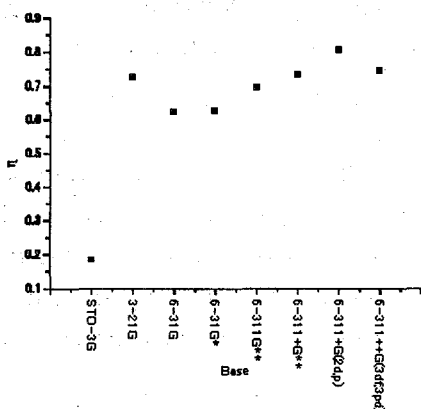


Figure 3. The quadrupole asymmetric parameter η of ^{14}N of alanine calculated by Gaussian98 using various base sets.

また、この結果を Wi らの理論[5]に基づいたシミュレーションと比較検討する際に ^{14}N の四重極カップリング定数などを求める必要があるが、これには Gaussin98[2]を用いる予定である。Figure 3 は基底を増やして計算の精度を上げた際の四極子定数の計算結果の収束の様子を示す。ここでは Alanine の四重極カップリング定数を計算した。これにより、およそ 6-311G** 程度の基底で十分な結果が得られることが示唆され、現在、 α -helix や β -sheet に関して検討を行っている。

References

- [1] K. Takegoshi, T. Yano, K. Takeda, and T. Terao, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10786(2001).
- [2] Gaussian 98, Revision A.11.1, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, P. Salvador, J. J. Dannenberg, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2001.
- [3] R. Tycko and S. J. Opella, *J. Chem. Phys.* **86**, 1761(1987).
- [4] P. L. Stewart, R. Tycko, and S. J. Opella, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **84**(11), 3803(1988).
- [5] S. Wi, L. Frydman, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10354(2001).

Development of Solid State NMR Methodology for Determination of Intermolecular Structure

(Tokyo University of Agriculture and Technology¹, Tokyo Institute of Technology²)

○Kazuo Yamauchi¹, Michi Okonogi¹, Mitsutaka Matsuzaki¹,
Yasumoto Nakazawa², Tetsuo Asakura¹

The solid state NMR can be used for structural determination of proteins or peptides which are difficult to prepare single crystals or insoluble in appropriate solvents. In this study, development of the solid state NMR methods for determination of the intermolecular arrangements was tried. As the first step, determination of the inter-nuclei distances was performed with dipolar CH-HETCOR method for Ala-Ala-Ala with different inter-molecular arrangements; anti-parallel and parallel forms.

緒言

固体高分解能 NMR では、特定の核間の距離を正確に測定するために、核間の双極子相互作用を利用する方法が多く報告されている。多くの方法は、特定部位の炭素核および窒素核に安定同位体ラベルを施し、距離決定を行いタンパク質やペプチドの構造決定に用いられている[1]。また、ラベル部位を選択することによって、分子内の核間距離と分子間の核間距離を区別することが可能であり、例えば、分子間の距離のみを抽出すれば、分子間構造の決定が可能となる。現在、生体高分子の自己会合や組織化の研究は極めて盛んであるが、原子レベルでの構造解析の手法が限られていることを考えると固体 NMR の果たす役割は大きい。そこで、本研究は、HETCOR をはじめとして、双極子相互作用を利用した各種固体 NMR 測定を行い、生体分子の分子間構造解析法を開発することを目的とする。

このために、サンプルとして構造既知のアラニン 3 量体 (Ala-Ala-Ala) を選んだ。アラニン 3 量体は調整条件を変えることによって、100% 逆平行 β シート構造 (AP-Ala₃) の場合と 100% 平行 β シート構造 (P-Ala₃) の場合をとらせることができる[2],[3] ので、本目的のためのモデルサンプルとして適している。

実験

Ala-Ala-Ala (Bachem 社製) を、水に溶解して乾燥させたものを AP-Ala₃、40% DMF 水溶液に溶解して乾燥させたものを P-Ala₃ 構造とした。各構造は IR 測定により確認した。通常の ¹³C CP/MAS NMR 測定は Chemagnetics infinity 400 (9.3T) で行った。帰属は INADEQUATE 法を用い、CH-HETCOR 測定は参考文献[4]の BLEW-BB を用いた手法と FSLG を用いた方法[5]で Bruker Avance 300(7.5T) および 400(9.3T) 中で測定を行った。F1 軸の化学シフトとスケールの基準はアダマンタンおよび *p*-ジメトキシベンゼンを用いた。

分子間構造、距離測定、固体高分解能測定法、 β シート、ペプチド

やまうちかずお、おこのぎみち、まつざきみつたか、なかざわやすもと、あさくらてつお

結果・考察

Figure1に(a) AP-Ala3と(b) P-Ala3のCP/MASならびにCH-HETCORスペクトルを示す。

CP/MASのスペクトルでは20ppm付近のAla残基のメチルピークに着目すると、P-Ala3では各残基ごとに2本ずつのピークが観測されAP-Ala3の場合と著しく異なる。これはP-Ala3の場合、構造のかなり異なる二つの分子の存在を示している。

BLEW-BBのHETCORスペクトルでは両サンプルとも双極子の影響で近傍にある炭素核と水素核の相関が確認できる。特に今回、短いmixing time (81.6 μ sec)を用いたために主に分子内の相関が見えている。スペクトル中で、3残基目のカルボキシルピークに帰属できる炭素核の180ppm付近のピークに注目する。このピークはAP体では α プロトンと相関を持っているがP体では α プロトン

およびアミドプロトンの両方に相関を持っている(図中枠内)。X線構造解析のデータと合わせて考えると、最も近いNHプロトンは隣の分子の1残基目NH₃⁺である。この距離はAP体では2.44Åであり、P体では2.37Åであることがわかっている。このことから81.6 μ secのmixing timeでは2.4Å程度の距離を持つものまでは観測され最も近い分子間のピークがひとつだけ観測されていることがわかる。

さらに詳しく解析するためAP構造体のサンプルについてmixing timeを変えてFSLG-HETCORスペクトルを測定した(Fig.2)。FSLG法による高分解能化によってプロトンの化学シフトが分離され化学シフト情報から構造を推測できるとともにmixing timeの違いにより双極子相互作用に基づく距離情報が引き出せることが分かる。さらにinadequateの結果から行った帰属を基にして距離情報と結びつけた定量的な考察を行う予定である。

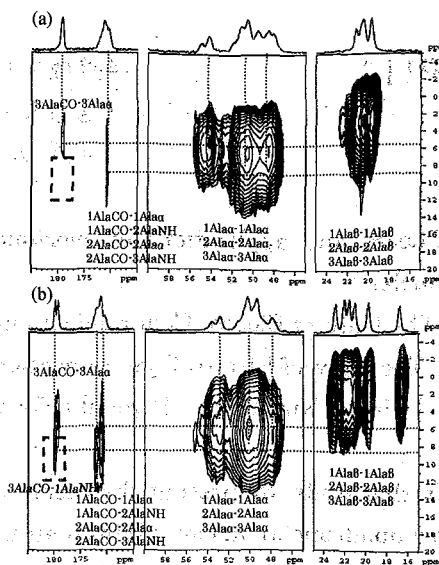


Fig. 1 BLEW-BB HETCOR spectra of (a) AP-Ala3 and (b) P-Ala3 structure, 81.6 μ sec was used for mixing time. The assignments (carbon to proton) are also shown in the spectra

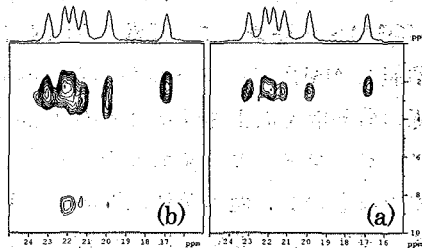


Fig. 2 FSLG HETCOR spectra of P-Ala3 with mixing time of (a) 100 μ sec and (b) 200 μ sec.

参考文献

- [1] S. Dusold, A. Sebald, *Ann Rept. NMR*, **41**, 184-265 (2000).
- [2] A. Hempel, N. Camerman, A. Camerman, *Biopolymers*, **31**, 187-192 (1991)
- [3] J.K. Fawcett, N. Camerman, A. Camerman, *Acta Cryst.*, **B31**, 658-665 (1975)
- [4] D.P. Burum, A. Bielecki, *J. Magn. Reson.* **94**, 645-652 (1992)
- [5] B.J. van Rossum, H. Foester, H.J.M. de Groot, *J. Magn. Reson.* **124**, 516-519 (1997)

謝辞

本研究は一部、科研費「基盤研究B」において行われました。

INADEQUATE及びHETCORの測定に御協力をいただいたブルカーバイオスピン㈱の甲野裕之博士に感謝いたします。

Theory and applications of overtone NMR spectroscopy for half-integer quadrupolar nuclei(The Univ. of Electro-Communications, Center for Instrumental Analysis¹,The Univ. of Electro-Communications, Department of Applied Physics and Chemistry²)Daisuke Kuwahara¹, Hiroyuki Koyano², Hajime Okamoto²

In this study, we present the theory and applications of the overtone NMR spectroscopy for quadrupolar nuclei having half-integer spins in solids. The overtone NMR does not give rise to isotropic shifts for quadrupolar nuclei. However, it was revealed from the theory that the overtone NMR for half-integer quadrupolar nuclei had the adequate ability to produce high-resolution solid-state NMR spectra.

1. 緒言

固体試料に含まれた半整数スピンの四極子核の NMR 共鳴線は、マジック角試料回転 (MAS) を用いて測定しても 2 次の核四極子相互作用による共鳴線の広がりが残る。この問題を解決するために、10 数年前には、DAS、DOR という特殊な手法が開発された。さらに最近 MQMAS が登場して、通常の MAS NMR probe を用いて (特殊な装置にたよらずとも) 高分解能な NMR スペクトルが得られるようになった。本研究では、半整数スピンの四極子核共鳴線の分解能を向上させるための新しい取り組みとして、半整数スピンのオーバートーン NMR スペクトロスコピーを取り上げる。本研究の手法は半整数スピンの等方シフト値を与えるものではないが、他の手法に匹敵する利点のあることが理論計算から明らかになった。また感度の面において非常に検出が難しいオーバートーン NMR 遷移の実験的検出も試みる。

2. 理論

オーバートーン NMR 分光法 (OT-NMR) は元来固体試料に含まれたスピン量子数 1 の窒素核に対して高分解能な NMR スペクトルを得るために開発されたものである¹⁾。その後密度演算子を用いた OT-NMR の信号計算は Frydman ら²⁾によって確立された。

我々は昨年 ¹⁴N-¹³C overtone REDOR experiments を記述する密度演算子方程式を発表したが³⁾、本研究ではそこで用いられた道筋に従って“スピン 3/2 の系に rf 磁場が照射された時”および“スピン 5/2 の系に rf 磁場が照射された時”の密度演算子方程式を導出した。本研究で考慮したスピン系のハミルトニアンは、ゼーマン相互作用 \mathcal{H}_z 、核四極子相互作用 \mathcal{H}_Q 、化学シフト \mathcal{H}_{CS} 、さらに核スピンと rf 磁場との相互作用 \mathcal{H}_{rf} である。以下ではスピン 3/2 (²³Na) の結果を示す。

キーワード: 半整数スピン, オーバートーン

くわはら だいすけ, こやの ひろゆき, おかもと はじめ

3. 結果と考察

文献 3)で示された方法に従って、ゼーマン項+核四極子相互作用 $\mathcal{H}_z + \mathcal{H}_Q$ を対角化する座標系に移り、さらにラーモア周波数で回転する座標系に移って考えると、ハミルトニアンは次の形となる（これには、rf 磁場との相互作用を表す項は含まれていない）：

$$\mathcal{H}^R = \begin{bmatrix} 3\omega^{(1)} - \frac{3}{2}\omega^{(2a)} + \frac{3}{2}\omega_{cs} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -3\omega^{(1)} + \frac{3}{2}\omega^{(2b)} + \frac{1}{2}\omega_{cs} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -3\omega^{(1)} - \frac{3}{2}\omega^{(2b)} - \frac{1}{2}\omega_{cs} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 3\omega^{(1)} + \frac{3}{2}\omega^{(2a)} - \frac{3}{2}\omega_{cs} \end{bmatrix},$$

$$\omega^{(2a)} = (\omega_Q^2 / \omega_0)(2|f|^2 + |g|^2), \quad \omega^{(2b)} = (\omega_Q^2 / \omega_0)(2|f|^2 - |g|^2).$$

ここで、 ω_0, ω_Q はそれぞれラーモア周波数と核四極子結合定数、 $3\omega^{(1)}$ は核四極子相互作用による 1 次のシフト、 $\omega^{(2a)}, \omega^{(2b)}$ は 2 次のシフトである。また ω_{cs} は化学シフトである。各対角項は 半整数スピンを持った核の固有エネルギーを表し、4 個の固有状態間の遷移に伴う共鳴周波数は 単にそれらの差で与えられる。 f, g と記された 2 つの量は、核四極子相互作用 主軸系から実験室系に移るためのオイラー角と非対称因子に依存する。上の \mathcal{H}^R から、

(i) 中心遷移 $|1/2\rangle \leftrightarrow |-1/2\rangle$: $\omega_{ct} = 3(\omega_Q^2 / \omega_0)(|g|^2 - 2|f|^2) - \omega_{cs}$,

(ii) オーバートーン遷移 $|3/2\rangle \leftrightarrow |-1/2\rangle$: $\omega_{OT} = 3(\omega_Q^2 / \omega_0)(|g|^2) - 2\omega_{cs} - 6\omega^{(1)}$.

オーバートーン遷移には 1 次のシフトに関する項も効いてくるが、それは MAS によって消し去ることができる。よって (i), (ii) の遷移に関するスペクトルの分解能を比較するためにまず 2 次の項 (第 1 項) に注目する。下記の図は、 $|g|^2 - 2|f|^2$ と $|g|^2$ の粉末全体にわたる分布を表したものである (非対称因子が 0 の場合)。

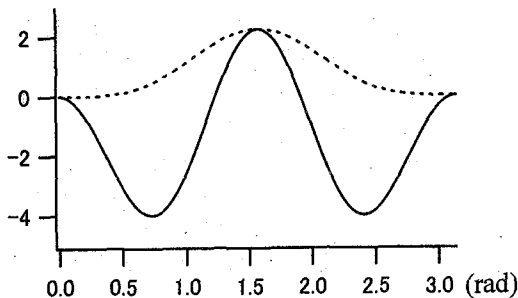


Fig. 1. Distribution of $|g|^2 - 2|f|^2$ and $|g|^2$ in a powder. The solid and dotted lines correspond to $|g|^2 - 2|f|^2$ and $|g|^2$, respectively.

このことから、オーバートーン遷移は (それが観測された場合には) 中心遷移のスペクトルと比較して、線幅の広がり約 1/3 となるのがわかる。一方 化学シフトは 2 倍になるので、総合すると中心遷移と比較して約 6 倍分解能が向上することになる。ただ オーバートーン遷移は遷移確率が非常に小さいため、実際に観測できるかどうかは測定物質と実験条件とに左右される。会場では、 ^{23}Na 標準サンプルの単結晶を使った実験結果と 計算機シミュレーションの結果を発表する。

<参考文献>

- 1) R. Tycko, S. J. Opella, J. Chem Phys., 86 (1987) 1761. 2) L. Marinelli, S. Wi, L. Frydman, J. Chem Phys., 110 (1999) 3100. 3) D. Kuwahara, Chem. Phys. Lett., 377 (2003) 20.

(バリアンテクノロジーズジャパン¹、Varian Ltd. UK²)○ 芦田 淳¹、Eriks Kupce²

Fast Multidimensional Solid State NMR Spectroscopy with Hadamard Transform.

Jun Ashida¹, and Eriks Kupce²Varian Technologies Japan Ltd.¹, Varian Ltd. UK²

Multi-dimensional NMR techniques give a lot of information about structure and dynamics in both liquid state and solid state NMR. However, it takes a long time to obtain multidimensional NMR spectra. In this study, we present that frequency domain Hadamard encoding multidimensional NMR experiments in solids can reduce by several orders of magnitude of experiment time. We demonstrate both frequency- and band-selective Hadamard experiments at C-13 and N-15 enriched samples. In order to avoid multiple quantum interferences, the Hadamard encoding pulses in the enriched samples are applied sequentially rather than simultaneously in this study. Among other possible applications, the experiments of NOESY type solid 2D NMR with both proton driven spin diffusion (PDS), and dipolar assisted rotational resonance (DARR) are demonstrated.

【緒言】

多次元 NMR 測定法は、構造や運動に関する情報を高分解能で得られる手法として定着している。しかし最大の欠点は、T1 次元や T2 次元（3 次元以上）での FID を得るために数十から数百のポイント数が必要なことで、そのため積算時間が長くなることである。これまでに、MEM や FDM などの様々な高速データ処理法が発表されており、最近では Frydman が Gradient を encode した超高速測定法を発表している[1]。

本発表では、選択励起パルスと Hadamard 行列[2]を併用して、固体多次元 NMR 測定法の高速化を試みた。なお、筆者は以前にも Hadamard 行列を用いた Separated Local Field(SLF)法の 1D-SASS (Switching Angle Sampler Spinning)法について報告している[3]が、今回は固体の MAS 相関(Correlation)スペクトル測定法に関しても大幅な測定時間短縮を図ることができることを示す。

【実験】

NMR 測定は、Varian UNITY INOVA 600MHz(NB)分光計と、3.2mm T3 HX MAS プロープ、および 5mm T3 HX MAS プロープを用いた。試料は [U-¹³C, ¹⁵N]ヒスチジンなどを用いた。

【結果と考察】

Hadamard 行列は、複数の情報がある中で選択的にある一つの情報を（情報量/時間）を最大にして取得する場合に有効である[3~6]。例えばピークが I_{1~4} のように 4 本ある場

固体 NMR、Hadamard 行列、多次元 NMR

あしだ じゅん、Eriks Kupce

合には、選択反転パルスを用いて下左のようにそれぞれのピークの正あるいは負の強度情報を内含した $S_1 \sim S_4$ の4つの状態を作成する。この後、データ取り込みまでの間に何もなければ、全ての係数 a_{xy} は1のままなので、下右のように計算を行うとそれぞれのピークが選択的に得られるが、もし混合時間の間にスピンの状態が変化すると係数の値が変化するためスピン間の交換などの情報を取得することができる。

$$\begin{array}{l}
 S_1 = a_{11}I_1 + a_{12}I_2 + a_{13}I_3 + a_{14}I_4 \\
 S_2 = a_{11}I_1 + a_{12}I_2 - a_{13}I_3 - a_{14}I_4 \\
 S_3 = a_{11}I_1 - a_{12}I_2 - a_{13}I_3 + a_{14}I_4 \\
 S_4 = a_{11}I_1 - a_{12}I_2 + a_{13}I_3 - a_{14}I_4
 \end{array}
 \xrightarrow{a_{xy} \text{ が全て 1 の場合}}
 \begin{array}{l}
 4I_1 = S_1 + S_2 + S_3 + S_4 \\
 4I_2 = S_1 + S_2 - S_3 - S_4 \\
 4I_3 = S_1 - S_2 + S_3 + S_4 \\
 4I_4 = S_1 - S_2 + S_3 + S_4
 \end{array}$$

図1に Hadamard 行列を用いた $[U-^{13}C, ^{15}N]$ ヒスチジンの $^{13}C-^{13}C$ 相関 DARR[7] スペクトルを示す。N=8 の Hadamard 行列を用い、各 S_n の積算回数は8回なので、トータル積算回数は64回で測定時間は約9分である。右に 139ppm でスライスを取った1次元スペクトルを通常の2次元測定法で得たスライスと比較した。通常の2次元測定では、 t_1 次元は400ポイント取得しており、積算時間は18時間かかっている。Hadamard 行列を用いた2次元測定では、同感度のスペクトルを得るための測定時間を約1/50に短縮することができた。

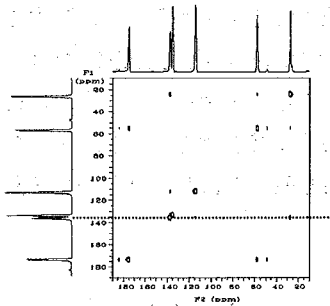


Figure 1. $[U-^{13}C, ^{15}N]$ histidine $^{13}C-^{13}C$ DARR spectrum with mixing time of 1ms.
Sample spinning speed = 19kHz.
Recycle delay = 10 sec. 8 scans.
The experiment time is only 9min.

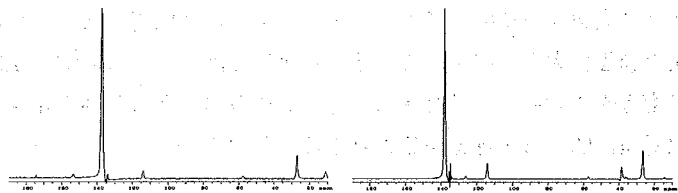


Figure 2. F2 slices of $[U-^{13}C, ^{15}N]$ histidine from $^{13}C-^{13}C$ DARR spectra in Fig.1 (dashed line) with mixing time of 1ms.
(left) Hadamard 2D experiment with only 9min.
(right) Conventional 2D experiment with 18hours.
Time saving factor is about 50!

発表当日は、他に $^1H/^{13}C$ Indirect HETCOR[8]など異種核間相関2次元スペクトルの結果も合わせて報告する予定である。

なお、本研究は Lille 大学の Jean-Paul Amoureux 氏と Versailles 大学の Francis Taulelle 氏との共同研究である。

【参考文献】

- 1) L. Frydman, T. Scherf, and A. Lupulescu, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 15858 (2003)
- 2) J. Hadamard, *Bull. Sci. Math.*, 17, 240 (1893)
- 3) J. Ashida, T. Nakai, and T. Terao, *Chem. Phys. Lett.*, 168, 523 (1990)
- 4) E. Kupce and R. Freeman, *J. Biomol. NMR*, 25, 349 (2003)
- 5) E. Kupce, T. Nishida, and R. Freeman, *Prog. NMR Spectrosc.*, 42, 95 (2003)
- 6) R. Freeman and E. Kupce, *J. Biomol. NMR*, 27, 101 (2003)
- 7) K. Takegoshi, S. Nakamura, and T. Terao, *Chem. Phys. Lett.*, 344, 631 (2001)
- 8) Y. Ishii, J. P. Yesinowski, and R. Tycko, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 2921 (2001)

Characterization of Chain Dynamics of Polymer Crystallites by Dipole-Dipole Interactions

Toshikazu Miyoshi (Nanotechnology Research Institute, AIST)

Homo- and hetero-nuclei dipole interactions are sensitive to molecular dynamics of each function in polymers. We will show functional mobility of polymer crystallites isothermally crystallized from the melt state, using ^1H - ^{13}C modified WISE NMR techniques. We use WIM24 sequence and short CP for polarization transfer, and ^{13}C CW decoupling in the indirect t_1 dimension to suppress hetero-nuclear dipolar interaction. Consequently, we obtain fast and characteristic dynamics information for the main and side chains of *isotactic*-poly(1-butene) constrained in the crystalline lattices.

はじめに 高分子の結晶化のメカニズムを理解するために多くの実験や計算機シミュレーションが行われている。固体 NMR 法は動的な構造情報を供給するといった点で、他の手法と比較して大きなアドバンテージを持っている。我々はこれまでに CSA を用いた 1 次元交換 MAS 法により結晶内部における低速周波数のダイナミクス解析を行い、結晶領域の低速ダイナミクスに関する知見を集積してきた。これまでの研究成果より、¹⁻⁴⁾ 幾つかの高分子は等温結晶化温度(T_c)では、非常に高速な分子鎖ダイナミクスを示すことが推測される。 T_c における分子鎖ダイナミクスは結晶化過程に大きく関与している。本研究では二次元 ^1H - ^{13}C WISE 法を高度化することにより、 T_c 温度近傍において、結晶領域の分子鎖の各原子団の双極子相互作用を明らかにし、高分子の結晶化過程に関する知見を得ることを目的とする。

実験 測定には BRUKER 社製の AVANCE300 を使用した。測定には二重共鳴用 MAS(7mm)プローブを使用した。 ^1H の双極子相互作用を調べるために二次元 ^1H - ^{13}C WISE 法を用いた。展開時間(t_1)における異種核双極子相互作用の影響を消去するために t_1 時間では ^{13}C 核を高出力 CW デカップリングした。 ^1H - ^{13}C 分極移動には WIM24 パルスか CP を用いた。CP では 50 μs -1ms を用いた。MAS の周波数は 2-5kHz に設定した。測定にはイソタクチックポリ(1-ブテン)(iPB)を用いた。iPB の融点(T_m)と T_c はそれぞれ 393K と 373K である。

結果と考察 溶融状態より T_c 以下である 368K まで冷却し、固体 ^1H -MAS NMR スペクトルの時間依存性を調べた。溶融状態におけるスペクトルでは先鋭化した ^1H スペクトルのみが観測された。オレフィン系高分子のため、各原子団において異なる化学シフト値は観測されなかった。時間経過に伴い、SSB を持つ幅広い結晶性分に由来するシグナルが増大した。一時間以上では結晶成分のシグナル強度は平衡に到達した。次に高分解能 ^{13}C -NMR スペクトルを測定した。溶融状態では CP(1ms)によるシグナルは観測されなかった。 ^{13}C を直接分極したスペクトルではメルト状態固有の先鋭化したシグナルを観測した。等温結晶化後の ^{13}C CPMAS NMR スペクトルの各原子団はメルトした状態とほぼ同じ化学シフトを示した。このことは、結晶化前の平均の分子鎖構造が結晶化

固体 NMR、MAS、高分子結晶、ダイナミクス、双極子相互作用、
みよしとしかず

後の構造に極めて近いことを示唆する。また、結晶成分の各炭素シグナルはメルト状態に比較してより幅広であった。結晶成分の温度可変高分解能スペクトルより結晶成分の線幅は室温近傍で最大値を示すことが明らかになった。室温において、結晶領域の分子鎖は数 10kHz 以上の大振幅の分子鎖運動をしていることを示している。

図 1(a)に 368K において *iPB* の ^1H - ^{13}C WIM/WISE スペクトルを示す。個々の原子団のスペクトルは SSB を伴う特長的なパターンを示した。接触時間の短い(50 μs)CP を用いて測定した CP/WISE スペクトルにおいても同様の線形パターンが得られた。CP 時間を長くすることにより、個々の線形パターンが均一化することがわかった。個々の原子団の運動性を反映する ^1H 線形がスピン拡散により平均化されることを示している。つまり、WIM24/WISE(CP=50 μs)法で測定した ^1H 線形が個々の原子団の運動性を反映していることを示唆する。主鎖と側鎖の CH_2 のスライスデータと 2 スピン系を仮定して計算したスペクトルを図 1(b)に示した。実験スペクトルより、側鎖の高次の SSB パターン強度が主鎖の SSB パターン強度より大きいことがわかる。計算値より側鎖の双極子相互作用が 14kHz であり、主鎖の 10kHz よりはるかに大きいことが明らかになった。この結果は結晶格子という極微小空間内に閉じ込められた *iPB* 分子鎖は $T_g=373\text{ K}$ より僅かに低い 368 K においては、側鎖の分子運動性が主鎖より制約を受けていることを示唆する。今後、異種核双極子相互作用の計測を行い、より詳細なダイナミクスに関する知見を得て、結晶化のプロセスを解明したい。

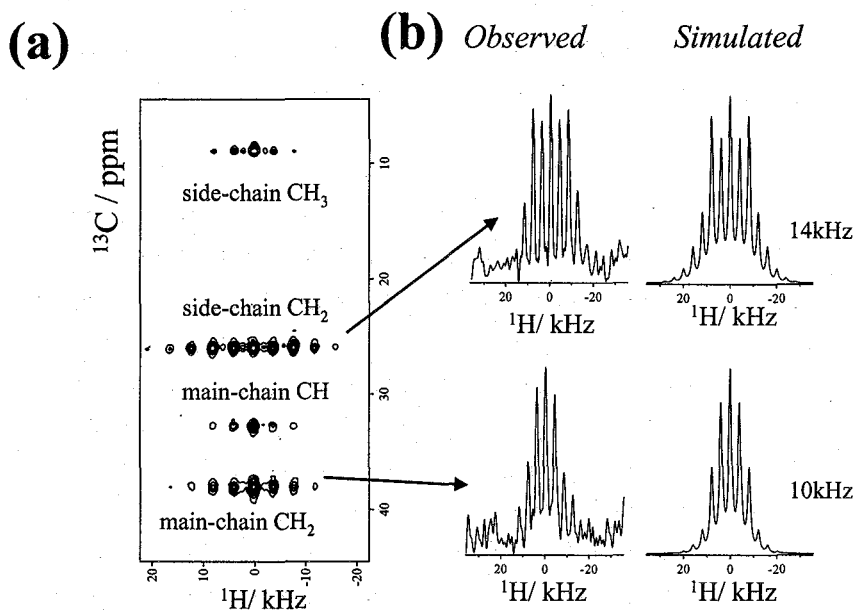


Figure 1. (a) ^1H - ^{13}C WIM/WISE NMR spectrum of *iPB* crystalline region at 368 K. (b) Observed and simulated ^1H slices for main-chain and side-chain CH_2 protons. The latter were calculated under isolated 2 spin system.

文献

- 1) Miyoshi, T.; Pascui, O.; Reichert, D. *Macromolecules* 2002, **35**, 7178-7181.
- 2) Miyoshi, T.; Pascui, O.; Reichert, D. *Macromolecules* 2004, **37**, 6460-6471.
- 3) Miyoshi, T.; Pascui, O.; Reichert, D. *Macromolecules* 2004, **37**, 6653-6656.
- 4) Miyoshi, T.; Hayashi, S.; Imashiro, F.; Kaito, A. *Macromolecules* 2002, **35**, 6060-6063.

バクテリオロドプシンの局所運動性と構造変化の検出
 (1横浜国大院・工、2姫路工大院・理、3広大・量子生命)
 ○川村 出¹ 大嶺 将人¹ 山口 悟² 西村 勝之¹
 辻 暁² 斉藤 肇³ 内藤 晶¹

Detection of local dynamics and structural change of bacteriorhodopsin

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, ²Graduate School of Science, Himeji
 Institute of Technology, ³Center for Quantum Life Science, Hiroshima University
 Izuru Kawamura¹ Masato Ohmine¹ Satoru Yamaguchi² Katsuyuki Nishimura¹ Satoru Tuzi² Hazime Saito³
 and Akira Naito¹

Bacteriorhodopsin (bR) in purple membrane shows a variety of local motions, which correlate to the proton pump activity. To analyze the local structure and motions, ¹³C NMR spectra of [1-¹³C]Val/[¹⁵N]Pro-bR were examined by solid-state NMR. It turned out that relatively narrow signals were obtained for the ¹³C and ¹⁵N CP-MAS NMR spectra. REDOR (Rotational Echo Double Resonance) filter measurements for [1-¹³C]Val/[¹⁵N]Pro-bR were examined in order to assign [1-¹³C]Val/[¹⁵N]Pro signal to the specific sites. The resonance at 172.0 ppm was determined to Val69 by considering significantly dephasing effect. In addition, ¹³C spin-lattice (T₁) and spin-spin relaxation times (T₂) were measured in [1-¹³C]Val-bR. It turned out that Val199 in the surface area has higher frequency motion than Val49 in α-helix and Val69 in loop area as revealed from T₁ values. These results indicate that bR has a variety of motions in various parts of the membrane proteins.

【緒言】 レチナルタンパク質であるバクテリオロドプシン bR は好塩菌の紫膜中で 2 次元的に配列した膜タンパク質であり、レチナルの光異性化反応をトリガーに細胞外へプロトンを輸送する。水和状態において、bR は部位特異的に多様な運動性を示しており、この局所運動が機能に対して重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では緩和時間測定、REDOR による信号の帰属、[¹⁵N]Pro-bR の CP-MAS、高速 MAS 条件による測定から得られた、bR の局所構造とその運動性の特徴について報告する。

【実験】 NMR 測定には Chemagnetics CMX Infinity-400 FT-NMR 分光器を使用した。試料には [1-¹³C]Val/[¹⁵N]Pro 標識した bR をそれぞれ使用し、交差分極(CP)と ¹H 高出力デカップリング(DD)にマジックアングルスピニング(MAS)を組み合わせた CP-MAS と 90°パルスによる観測核の励起と DD と MAS を組み合わせた DD-MAS による ¹³C と ¹⁵N NMR 測定を行った。REDOR 測定は三重共鳴プローブを用いて REDOR 展開時間を 2 ms に設定して行った。この設定時間では ¹³C-¹⁵N

固体高分解能 NMR バクテリオロドプシン 局所運動性 REDOR 高速 MAS

かわむら いずる¹、おおみね まさと¹、やまぐち さとる²、にしむら かつゆき¹、つじ さとる²、さいとう はじめ³、ないとう あきら¹

が直接結合している場合に REDOR 効果による信号の減衰が大きくなり、信号の帰属が可能となる (REDOR フィルター)。[1-¹³C] Val / [15N] Pro-bR においては ¹³C REDOR から C 端側に Pro が結合した Val、¹⁵N REDOR から N-端側に Val が結合した Pro の信号の帰属を行った。

【結果と考察】 図1に[1-¹³C]Val/[15N]Pro-bRにおける¹³Cおよび¹⁵N CP-MAS スペクトルを示す。[1-¹³C]Valの¹³C CP-MAS 信号は分解能の高い信号が得られた。特に高磁場側の3本の信号はよく分離しており、局所構造の解析に適している。さらに[15N]Proの¹⁵N CP-MAS 信号は分解能が非常に高く、5本の信号が分離して現れた。Val-Pro シークエンス部位へ¹³C REDOR フィルターを行い、172.0, 171.1 ppm の信号に REDOR 効果が観測できた(図2 左)。これまでの部位特異的の変異体などによる実験¹と合わせて、172.0 ppm の信号を Val 49 と 69 に、171.1 ppm の信号を Val199 に帰属することができた。さらに[15N] Pro と Val に直接結合している Pro の信号を¹⁵N REDOR フィルターにより選択した(図2 右)。この結果3本の信号(111.3,114.0, 122.0 ppm)に REDOR 効果が現れた。

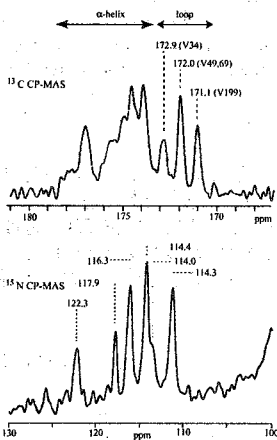


Fig.1 ¹³C (top) and ¹⁵N (bottom) CP-MAS NMR spectra of [1-¹³C]Val/[15N]Pro-bR.

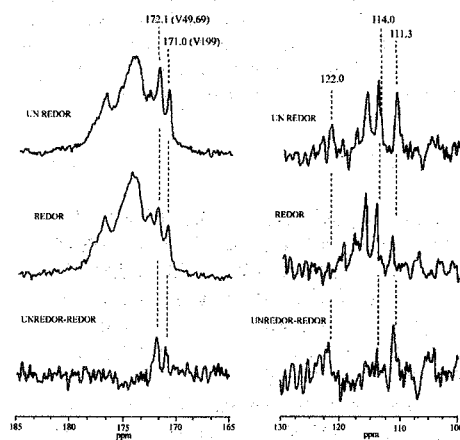


Fig.2 ¹³C (left) and ¹⁵N (right) REDOR dephasing effect of [1-¹³C]Val/[15N]Pro-bR.

[1-¹³C]Val-bR の高磁場側のピークに注目し、緩和時間測定を行った結果、171.1 ppm の Val 199 の信号は T₁ が短く、同じ細胞外側に位置する Val 69 の運動性は低いことがわかった (Table 1)。これよりプロトン放出基 (Glu194,204) が位置する FG loop は高い運動性をもつことから、Val 199 近傍は細胞外側へプロトンの拡散を促すような速い運動をしていることが判明した。また同じ細胞外側に位置する Val 69 は [2-¹³C]Val の信号で β-sheet のコンフォメーションが観測されたことと緩和時間のデータから、ループ内であるにもかかわらず、強い相互作用をもっていることが示唆された。

Table 1. ¹³C isotropic chemical shifts (ppm) and ¹³C T₁, T₂, ¹H T_{1ρ}, T_{CH} values of [1-¹³C] Val-bR.

	δ _{iso} (ppm)	T ₁ (s)	T ₂ (ms)	T _{CH} (ms)	T _{1ρ} (ms)
Val199	171.1	6.5	12.2	0.43	3.6
Val 49,69	172.0	24.9	8.9	0.52	5.5
Val 34	172.9	13.5	5.1	0.26	5.6

【参考文献】 1. M.Tanio, S.Inoue, K.Yokoi, T.Seki, S.Tuzi, R.Needleman, J.K.Lanyi, A.Naito, H.Saito *Biophys. J.* (1999) 77: 431-442

1P118★ π 共役系高分子準秩序構造のダイナミクス

(東工大院生命理工) ○ 守 誠一朗, 浅川直紀,
(東工大資源研) 山本隆一, (東工大院生命理工) 井上義夫

Dynamics of Quasi-ordered Structure in a Regio-regulated π -Conjugated Polymer : Poly(4-methylthiazole-2,5-diyl)

Seiichiro Mori*, Naoki Asakawa, Takakazu Yamamoto, Yoshio Inoue

Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatuta-cho, Midoriku,
Yokohama, Kanagawa, 226-8501, Japan

email: seimori@bio.titech.ac.jp, Phone: 045-924-5796, FAX: 045-924-5827

Dynamics of regio-regulated Poly(4-methylthiazole-2,5-diyl)[HH-P4MeTz] was investigated by solid-state ^1H NMR spectroscopies. The frequency dependence of proton longitudinal relaxation rate at 288K shows a $\omega^{-1/2}$ dependence, which is due to the one-dimensional diffusion-like motion of backbone conformational modulation waves. The diffusion rate was estimated as 3 ± 2 GHz, which was approximately 10^7 times larger than that estimated by 2DEX NMR measurements. These results suggest that there exists anomalous dispersion of modulation waves in HH-P4MeTz. The data of T_1 and T_2 measurements at variable temperature suggests that the relaxation process is governed by thermally activated molecular motions with an Arrhenius type, and the activation energy is estimated as 2.9 and 3.4 kcal/mol, respectively.

1. 諸言

高分子結晶,特に導電性高分子である準結晶性ポリマーや液晶, π 共役系高分子などの構造と物性の相関を議論する際には,凝縮系が形成する素励起状態やそれらの生成と消滅(緩和)過程,結晶性高分子材料の準秩序構造などについて考えることも材料の物性を徹視的な立場から明らかにしようとする場合には無視できないものである。

結晶性高分子の中には準秩序構造と呼ばれる,非晶ほどの乱雑さは無いが結晶よりも構造が乱れた中間構造が存在することが知られている。特に π 共役系高分子の準秩序構造は結晶中の π 電子の広がりに関わってくるため,その存在と静的および動的構造を明らかにすることは,電子材料や光学材料の物性機能相関を探る上では重要となる。しかし結晶中の分子ダイナミクスについてはその重要性にも拘らず,方法論に限られているためまだ不明な部分が多い。そこで我々は,結晶中での分子ダイナミクスを調べる方法としてしばしば用いられる核磁気緩和測定により, π 共役系高分子中の主鎖のねじれに関する構造変調波の拡散現象や異常分散性などを明らかにした。

2. 実験

近年,側鎖の結合様式を高度に制御した π 共役系高分子が合成され,ランダム体と異なる物性が判明してきている[1]。Head-to-Head(HH)型のポリ(4-メチルチアゾール-2,5-ジイル) [P4MeTz](M_w)はランダム体との物性の違いが顕著で,かつ側鎖アルキル基がより長いものや環がチオフェンの場合とは異

なり,face-to-face型の π スタッキングを結晶中で形成していることがX線回析から分かっている[1]。さらに, π スタッキング層と,二次元的に側鎖のメチル基が高密度に充填した層が交互に積層した独特な結晶構造を有している(Fig.1)。したがって特異的な

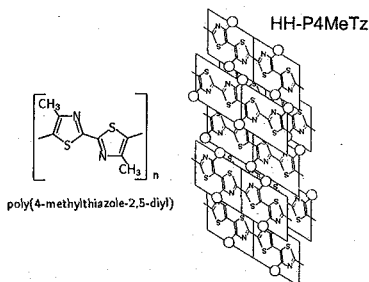


Figure 1. Chemical structure and schematic representation of the alternative layered molecular packing in HH-P4MeTz.

スピン系のネットワークが形成されていると考えられる。

本研究ではHH-P4MeTzの分子ダイナミクスに関する知見を得るため,温度および観測周波数を変化させてスピン-格子緩和時間(T_1)測定を行った。

* π 共役系高分子,準秩序構造,核磁気緩和,変調波拡散,異常分散もりせいichろう,あさかわなおき,やまもとたかかず,いのうえよしお

3. 結果と考察

3.1. スピン-格子緩和時間測定の間周数依存性

Figure 2にはHH-P4MeTzのプロトンに対するスピン-格子緩和速度 ($T_1^{-1} = R_1$) の周波数依存性を示す。観測周波数に対して -0.5 乗性が観測された ($R_1 \propto \omega^{-0.5}$)。このような関係を説明する理論として、一次元酔歩モデルの基いた動的感受率の計算がある [2,3]。一次元の環境揺らぎを仮定すると、帰結として

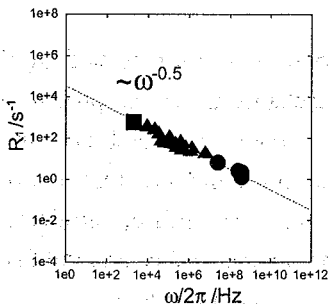


Figure 2. The frequency dependence of proton longitudinal relaxation rate for HH-P4MeTz at 288K.

次のような式を得る。

$$R_1 = M_2 f(\omega), \quad (1)$$

$$f(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2}} \tau_c^{-1/2} \omega^{-1/2} (\omega < \tau_c^{-1}), \quad (2)$$

ここで τ_c は相関時間である。Fig.2に対してフィッティングを行った結果、拡散速度 $W (= \tau_c^{-1})$ が 3 ± 2 GHzと得られたが、これは二次元交換 NMR から得られた 100 Hz 程度の運動と比較して 7 桁も大きくなった。実験方法が異なれば観測される運動モードも変わり得るので、相関時間の大きな差は不思議ではない。しかし今回の実験では、 T_1 測定での高速運動の存在を示すようなスペクトルが二次元交換 NMR でも観測されるはずであったが、実際には観測されなかった。したがってどちらの測定法も同じ運動モードを捉えていると考えざるを得ない。

3.2. 異常分散性

このように、準秩序相での主鎖のねじれと運動したメチル基の首降り運動の相関時間が、異なる測定法で 7 桁もの差を生じるという結果が得られた。これは準秩序相と結晶相が共存していて、主鎖のねじれに関する構造変調波が準秩序相に局在化していると考えることにより説明が可能となる。一般に局在化した波をつくり出すには変調波の波長に分布をもたせればよい。波の波長に分布つまり分散がある場合、個々の波は位相速度、合成波は群速度でそれぞれ特徴づけられる。二次元交換 NMR では主鎖のねじれの遅い

運動 (位相速度) を捉え、 T_1 測定では波長に分布を持つ変調波の合成波 (群速度) を観測していると考えられる。したがって群速度 > 位相速度という関係が成り立つので、HH-P4MeTz 中の構造変調波は異常分散性を有すると言える。

3.3. 温度依存性

T_1 の温度依存性をみると (Fig.3), 温度上昇とともに R_1 は増大した。HH-P4MeTz における緩和過程が、アレニウス型で示されるような熱的に活性化した分子運動によるものとみなすと、次のような関係式

$$\tau_c^{-1} = \tau_0^{-1} \exp\left(-\frac{E_a}{kT}\right) \quad (3)$$

が成り立つ。さらに式 3,2 から

$$(R_1)^2 \propto \tau_c = \tau_0 \exp\left(+\frac{E_a}{kT}\right). \quad (4)$$

という関係が得られ、Fig.3 にフィッティングすると活性化エネルギーが $E_a = 3.4$ kcal/mol と求められた。これはスピン-スピン緩和時間 (T_2) の温度依存性および Tail-to-Tail 型の 4MeTz 二量体の主鎖のねじれに対する量子化学計算から得られた E_a (それぞれ 2.9 kcal/mol と 3.0 kcal/mol) とよく一致した。

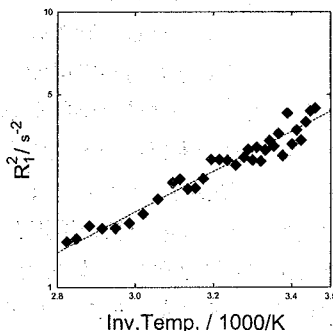


Figure 3. The temperature dependence of proton longitudinal relaxation rate for HH-P4MeTz over the temperature range from 290 to 355K.

REFERENCES

1. T.Yamamoto, H.Suganuma, T.Maruyama, T.Inoue, Y.Muramatsu, M.Arai, D.Komarudin, N.Ooba, S.Tomaru, S.Sasaki, and K.Kubota, Chem. Mater., 9 1217 (1997).
2. K.Holczer, J.P.Boucher, F.Devreux, and M.Nechtschein, Phys.Rev.B, 23 1051 (1981).
3. M.Nechtschein, F.Devreux, F.Genoud, M.Guglielmi, and K.Holczer, Phys.Rev.B, 27 61 (1983).

生体膜表面において誘起される膜脂質結合性 蛋白質ドメインの変形と運動

(兵庫県立大・院・生命理)

○辻 暁、上釜奈緒子、杉田多喜男、岡田雅司、八木澤 仁

Alteration in the structure and dynamics of the lipid-binding protein domain induced at the lipid bilayer surfaces

(Graduate School of Life Science, University of Hyogo)

○Satoru Tuzi, Naoko Uekama, Takio Sugita, Masashi Okada, Hitoshi Yagisawa

The structure and dynamics of a membrane binding protein may be modified by the local environment at the membrane surface. The molecular mechanisms for the protein function, therefore, should be interpreted based on the dynamic structure at the membrane surface. We applied solid-state ^{13}C NMR spectroscopy to examine the molecular structure and dynamics of the rat PLC- $\delta 1$ PH domain at a negatively charged membrane surface, and demonstrated that changes in the electrostatic interaction between the membrane surface and the PH domain caused a remarkable alteration in the structure and mobility of the domain.

細胞内情報伝達系、細胞骨格系などの重要な細胞機能に関与する蛋白質の多くが脂質分子を認識、結合するドメインを有し、脂質膜上において機能を発現するとともに、細胞の状態に応じた脂質膜上への局在の変化を通じて機能の制御を受けることが知られている。脂質膜表面環境下における膜結合性蛋白質の構造と動的な挙動に関する知見は、生体膜上におけるこれらの蛋白質の機能発現とその制御の機構を知る上で重要であり、細胞膜、細胞内小器官等の膜系における生体機能の理解のために必要と考えられる。本研究室では細胞内情報伝達系に含まれるホスホリパーゼ C- $\delta 1$ (PLC- $\delta 1$) 等の膜結合性蛋白質を対象として、脂質二重膜環境下における膜結合性蛋白質の構造および動的挙動を固体 NMR を用いて観測し、脂質膜表面局在時の蛋白質ドメインの構造的特徴を解析してきた。PLC- $\delta 1$ の膜脂質結合性ドメインである PH ドメインを対象としたこれまでの解析により、PLC- $\delta 1$ PH ドメインは結合基質であるホスファチジルイノシトール(4,5)ニリン酸 (PtdIns(4,5)P₂) を認識し電気的に中性の脂質二重膜表面に局在した際に、脂質膜内部の疎水環境との疎水的相互作用により立体構造の変化と局所的な運動性の低下を生じることが見出された (1)。

ここでは、生体膜中に全脂質分子の 10-40% 含まれる負電荷脂質の影響に注目し、負電荷脂質であるホスファチジルセリン (PtdSer) を含む脂質二重膜表面への PLC- $\delta 1$ PH ドメインの結合による構造と動的挙動の変化を固体高分解能 ^{13}C NMR により解析し、水溶液中および中性脂質膜結合時の構造と比較した。

キーワード： 固体 NMR、膜表在性蛋白質、PH ドメイン、脂質二重膜、動的構造

つじ さとる、うえかま なおこ、すぎた たきお、おかだ まさし、やぎさわ ひとし

ラット PLC- $\delta 1$ PH ドメインは大腸菌中で GST 融合蛋白質として大量発現し、アラニン残基側鎖メチル炭素に ^{13}C 標識を導入した。得られた $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ 標識 PH ドメインは精製後、GST の酵素切断により単離し、緩衝液中に懸濁した脂質二重膜ベシクルに結合した状態で固体 NMR 測定を行った。Fig.1A は PtdIns(4,5) P_2 を 5% 含むホスファチジルコリン (PtdCho) ベシクルに結合した時の $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ 標識 PH ドメインの DD-MAS (single pulse excitation Dipolar Decoupled-Magic Angle Spinning) NMR スペクトルを示す。Fig.1 下部に縦線で示した水溶性結合基質イノシトール(1,4,5)三リン酸(Ins(1,4,5) P_3)結合時の信号と比較すると、脂質膜疎水部と相互作用するループに含まれる両親媒性 α ヘリックス近傍の Ala88 および Ala122 の信号が変化しており疎水的相互作用による構造変化が見出される。これに対し、20% PtdSer および 5% PtdIns(4,5) P_2 を含む PtdCho ベシクル結合時のスペクトル (Fig.1B) では中性脂質膜結合時の構造に対応する信号(Ala88: 16.76 ppm)とともに Ins(1,4,5) P_3 結合時の信号に近い化学シフトを持つ信号 (Ala88: 17.64 ppm, Ala112: 18.44 ppm) が観測され、PtdSer の存在下では、脂質二重膜上において水溶液中における PH ドメイン-Ins(1,4,5) P_3 複合体に近い蛋白質構造が生じることが見出された。また、運動性の低い中性脂質膜結合型の構造に対して、Ins(1,4,5) P_3 複合体類似の構造はより高い運動性を示し、これら二つの構造は負電荷脂質膜上で交換していることが温度に依存する Ala88 信号の相対強度変化から示された。このような負電荷脂質膜上に特有の Ins(1,4,5) P_3 複合体類似構造の生成は一価または二価カチオンの添加による脂質膜上の負電荷の遮蔽により阻害されることから、PtdSer 頭部の負電荷と PH ドメイン表面の荷電性基間の静電相互作用に由来すると帰属された。これらの知見に基づき、負電荷脂質膜上における PH ドメインの構造モデルを議論する。

このような、脂質膜組成、および周囲の溶媒環境に依存する膜結合性蛋白質の構造と運動状態の変化は、生体中における脂質膜近傍の環境変化に対する PLC- $\delta 1$ 等の膜表在性蛋白質の構造と機能の応答に関与している可能性が考えられる。

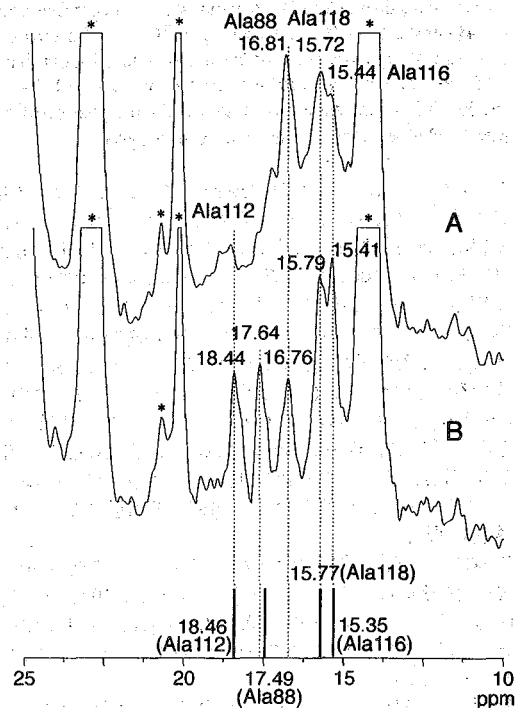


Figure 1 DD-MAS NMR spectra of the $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -labeled PLC- $\delta 1$ PH domain-PtdIns(4,5) P_2 complex at the surface of the PtdCho/PtdIns(4,5) P_2 vesicle at 20°C (A), and the PtdCho/PtdIns(4,5) P_2 /PtdSer vesicle at 20°C (B). The PH domain-vesicle complexes in each sample were suspended in mops buffer (pH6.5). The peaks arising from lipid molecules are indicated by asterisks. The chemical shifts of the peaks corresponding to Ala residues in the $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -labeled PLC- $\delta 1$ PH domain-Ins(1,4,5) P_3 complex in solution are shown as vertical bars at the bottom of the spectra.

(1) Tuzi, S., Uekama, N., Okada, M., Yamaguchi, S., Saito, H. and Yagisawa, H. (2003) J. Biol. Chem., 278, 28019-28025.

Structural Analysis of Cellulose Polymorphs by Solid-state NMR Spectroscopy

Hiroyuki Kono[†], Yukari Numata[‡], Etsuko Katoh[†][†]Bruker BioSpin Company Ltd., Ninomiya, Tsukuba, Ibaraki, and[‡]Department of Biochemistry, Natural Institute of Agrobiological Sciences, Kamondai, Tsukuba, Ibaraki.

Abstract: 2D RFDR experiment was applied to the uniformly ¹³C-enriched cellulose II in order to obtain interatomic distance information in the cellulose II crystal. The 2D spectra recorded with a short mixing time (0.80–2.58 ms) provided the correlations between a pair of strongly coupled ¹³C spins such as neighbor carbon nuclei, which enabled us to assign all ¹³C resonance lines of two kinds of anhydroglucose residues A and B in the structure of cellulose II. On the basis of the ¹³C resonance assignment of residues A and B, the interatomic distances from each C1 to the other carbon nuclei were compared by measuring the 2D spectra recorded with longer mixing times (5.12–20.48 ms). As a result, it was revealed that the respective residues A and B are composed of independent chains (–A–A– and –B–B– repeating units) and that there are no –A–B– repeating units in the chain. The ¹³C and ¹H chemical shift data for residues A and B suggest that the two residues have similar conformations for the hydroxymethyl group but different backbone structures. These findings obtained from NMR experiments supported the structure model of cellulose II proposed by Langan *et al.*¹ rather than that by Kolpak and Blackwell². By the similar ways to reveal the crystal structure of cellulose II, the structures of two kinds of allomorphs in native cellulose, namely Ia and Ib, were investigated.

1. 緒言: 1970年代に Blackwell²らによってセルロースIIが逆平行の二本鎖から構成されていることが明らかにされ、最近、Langan¹は中性子線と高分解能な回折法によってセルロースIIの原子配置、水素結合様式といった詳細な構造を報告している。この両者の構造は逆平行の二本鎖という点で一致しているが、コンフォメーションの点で大きく異なる。Blackwellらのモデルでは、二本の分子鎖の炭素骨格構造は同一、–CH₂OHがそれぞれ *tg*, *gt*であるのに対し、Langanらは二つの分子鎖は異なる炭素骨格、CH₂OHは全て *gt*であるとした。この矛盾に対し、Stembrug³はセルロースIIの¹³C化学シフトから構造シミュレーションを行い、得られた構造はLanganらではなくBlackwellらの構造と良く一致したと報告している。本研究では、マーセル化¹³Cラベルバクテリアセルロースを試料とし、RFDRなどの固体NMR実験によってセルロースIIの構造を評価した。

2. 試料: 次の2種類のラベル化グルコース(混合物)を含む酢酸菌生育培地を調製した; 1) 10% D-(¹³C₆)glucose, 2) 10% D-(1-¹³C), D-(2-¹³C), D-(3-¹³C), D-(4-¹³C), D-(5-¹³C), D-(6-¹³C)glucose. 1), 2) それぞれの培地から得られたセルロースをマーセル化し、フルラベル、均一ラベルセルロースIIを得た。

3. 結果と考察: 1, 4, 6位は等強度の二重線であるため、それぞれは単位胞中の異なる二本鎖に対応していると考えられている。しかし、共鳴線の帰属が完了しておらず、その解釈の是非は明らかではない。そこで均一ラベル化セルロースIIの2D RFDRスペクトルで共鳴線の帰属を試みた。混合時間1.28msのスペクトル(Fig. 1)では原子核間距離で0.1nm程度の相関(隣接炭素間距離に相当)が観測されたため、すべての共鳴線の帰属が完了できる(Table 1)。この結果から、セルロースIIのCP/MASスペクトルはFig. 1の実線と点線で示される二種類のグルコース残基(AとB)の重なりであることが明らかになった。さらにA、B

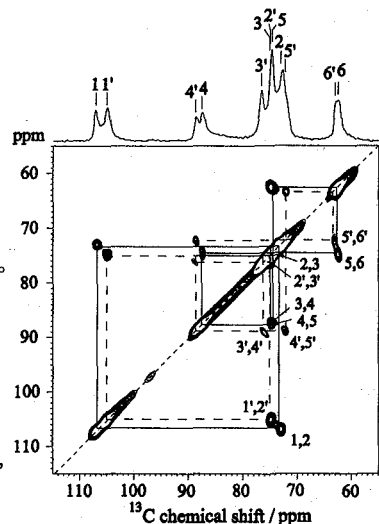


Fig. 1 2D RFDR Spectrum of uniformly ¹³C-labelled Cellulose II recorded with 1.28 ms of mixing time (16 rotor cycles)

Table 1 ¹³C Chemical shifts of residues A and B

	¹³ C Chemical shifts / ppm					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Residue A	107.1	72.8	75.1	87.5	74.3	62.6
Residue B	105.0	74.8	76.5	88.7	71.7	63.0
Difference	1.9	-2.0	-1.4	-1.2	2.6	-0.4

RFDR、固体NMR、結晶多形、セルロース、

こうの ひろゆき、ぬまた ゆかり、かとう えつこ

残基の化学シフト差は骨格炭素核 (C1, 2, 3, 4, 5) で 1.2~2.6ppm と大きく異なるのに対し、C6 では僅かに 0.4ppm である。よって **A**、**B** 二種類のグルコース残基は互いに異なる骨格構造を持ち、C6 水酸基はほぼ同一のコンフォメーションであると結論した⁴。

次に混合時間を変化させて測定した二次元スペクトルの C1 二重線、107 (**A** 残基)、105 (**B** 残基) ppm から抽出した 1D スライス (Fig. 2) を示す。混合時間 0.8、1.28ms では C1/C2 (107ppm)、C1' /C2' (105ppm) の相関のみ観測された。混合時間の増加に伴い、C1 と C3, C5 核間、C1' と C3', C5' 核間の積分強度の増加がそれぞれ確認できる。さらに混合時間が 15.36ms 以上になると **A** 残基では C1/C4、C1/C6、**B** 残基では C1' /C4'、C1' /C6' 核間の相関が観測され、核間距離で約 0.4nm 程度までの双極子カップリングが観測可能であった。現在までに報告されているセルロースの原子間距離によると、同一残基内の C1/C4 核間距離が 0.28nm、隣接残基の C1/C4 核間が 0.24nm である。もし二種類の残基 **A**、**B** が同一分子鎖、且つ交互にグリコシド結合を介して存在 (**ABAB**) するのであれば、Fig. 2 (Left, 107ppm) では C4 (残基内 C1/C4) よりも C4' (隣接残基間 C1/C4) の相関強度が、Fig. 2 (right, 105ppm) では C4' よりも C4 の積分強度が高くなると考えられる。また、混合時間 20.48ms のスペクトルでは同一残基内 C1/C6、C1' /C6' (核間距離: 0.36nm) の相関が確認できていることから、セルロース II が **ABAB** 繰り返し構造を持つのであれば、C1/C4'、C1' /C4 (核間距離: 0.28nm) という隣接残基間の相関が必ず観測されるはずである。しかし、全てのスライススペクトルにおいて、**A**、**B** 構成残基間の相関は観測されなかった。この結果から、二種類の残基は独立した分子鎖 (**AAAA**、**BBBB**) を形成し、分子鎖中 **ABAB** 繰り返し構造は存在しないことが確認⁵された。

以上の結果から、1) セルロース II は独立した分子鎖から構成され、2) その分子鎖の C6 水酸基はほぼ同一コンフォメーションであり、互いに異なる骨格構造を有していることが明らかになった。本研究結果は Langan らが提案したセルロース II の構造と一致する。当日は本研究結果に加え、天然に存在する 2 種類の結晶多形 (I_{α} と I_{β}) の構造解析についても報告する。

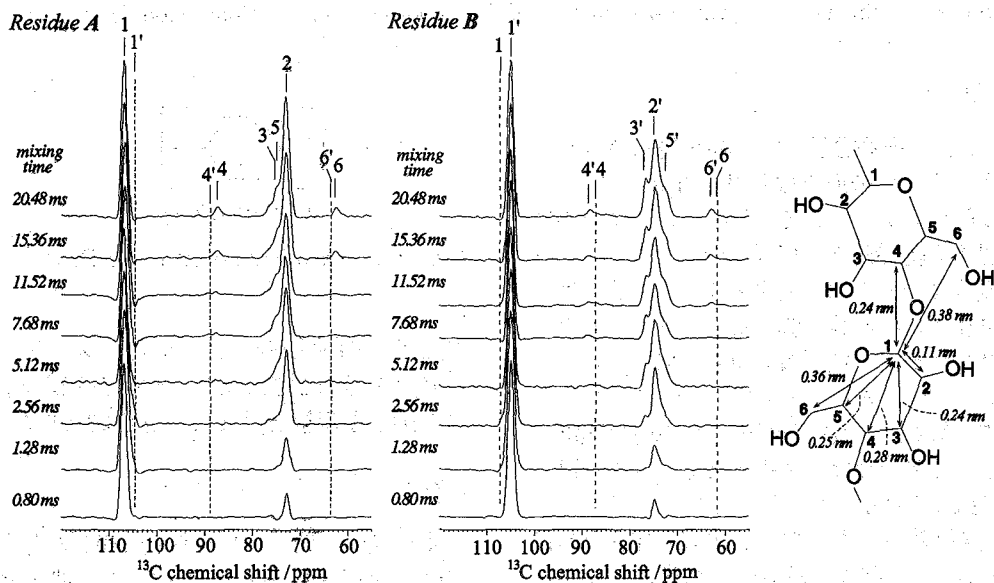


Fig.2 The series of 1D slice spectra along the horizontal axis of the 2D spin-exchange spectra recorded with different mixing times. These slices were taken at the diagonal peak of C1 resonance of residue A (107 ppm, left) and C1' of B (105 ppm, right).

<参考文献>

- (1) Langan P, Nishiyama Y, Chanzy, H. *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 9940-9946, *Biomacromolecules* **2** (2001) 279-286.
- (2) Kolpak F. J., Blackwell J. *Macromolecules* **9** (1976) 273-278.
- (3) Sternberg U., Koch F.-Th., Prieß W., Witter R. *Cellulose* **10** (2003) 189-198.
- (4) Kono H., Numata Y., Erata T., Takai M. *Macromolecules* **37** (2004) 5310-5316.
- (5) Kono H., Numata Y. *Polymer* **45** (2004) 4541-4547.

1P121★ パイ共役系高分子ガラスのダイナミクス

(東工大院生命理工)○大平学, 浅川直紀,
(東工大資源研) 山本隆一, (東工大院生命理工) 井上義夫

Dynamics of π -conjugated Polymer Glass

Manabu Ohira*, Naoki Asakawa, Takakazu Yamamoto, and Yoshio Inoue

Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology, 4259

Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, JAPAN,

email: nasakawa@bio.titech.ac.jp, Phone: 045-924-5796, FAX: 045-924-5827

The dynamics of poly(*p*-phenylene) were investigated by ^1H solid-state NMR spectroscopy. The differential scanning calorimetry (DSC) shows the existence of glass transition point (T_g) at ambient temperature. For the results of the temperature dependence of ^1H spin-lattice relaxation time (T_1) at the resonance frequency of 400MHz, we were able to observe the wide temperature region including T_g with dramatically short T_1 , inferred the existence of cooperative critical slowing down associated with the glass transition. The frequency dependence of ^1H spin-lattice relaxation time at ambient temperature shows the $T_1^{-1} \sim \omega^{-\frac{1}{2}}$ dependence, which might be due to the one-dimensional diffusion-like motion of the backbone conformational modulation.

[緒言]

π 共役系高分子はその特徴的な物性を応用するための研究は数多くなされている。しかしながら一方で、それらの物性発現に関する基礎的な研究は不十分である。 π 共役系高分子の物性発現を担っているのは非局在化した π 電子雲であり、分子ダイナミクスとその π 電子雲の動きは密接に関わっている。つまり、分子のダイナミクスに関する知見は π 共役系高分子の物性を理解する上で欠かせない情報である。我々の研究で扱っているポリパラフェニレン(PPP)は π 共役系高分子の中でも比較的構造が単純であり、 π 共役系高分子の代表例の一つである(Figure 1)[1]。また、PPPはその静的な分子構造はX線回折等で明らかになっているものの[2]、動的な分子構造については未だ明らかにされていない。そこで本研

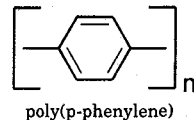


Figure 1. Chemical structure of PPP

究では、PPPの分子ダイナミクスに関する知見を得ることにより、 π 共役系高分子に共通する理解を得ることを目的とした。

[実験]

本研究では、まず示差走査熱量測定(DSC)を行った。次に、 ^1H スピン-格子緩和時間(T_1)の温度依存性および周波数依存性を測定し、分子ダイナミクスについての考察を行った。

*パイ共役系高分子, スピン-格子緩和時間, ガラス転移, 臨界減速 / おおひらまなぶ, あさかわなおき, やまもとたかかず, いのうえよしお

[結果・考察]

DSCの結果から、室温付近で熱力学的ガラス転移温度 (T_g) が観測された。

^1H の共鳴周波数 400MHz T_1 の温度依存性の結果から、 T_g を跨ぐ広い温度範囲で緩和の速い領域が観測された (Figure 2)。また、この緩和の速い領域の高温端はガ

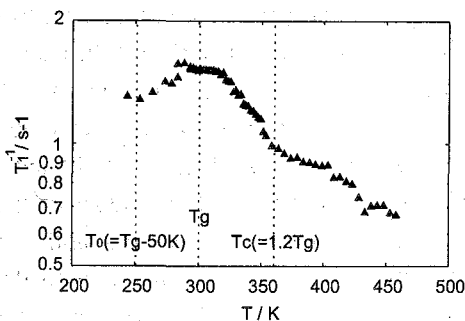


Figure 2. The temperature dependence of ^1H 400MHz spin-lattice relaxation rate for PPP

ラス転移のダイナミクスを扱った理論であるモード結合理論の予言する臨界温度 ($T_c \approx 1.2T_g$) [3,4] に一致した。さらに、低温端は Vogel-Fulcher 温度 ($T_0 \approx T_g - 50\text{K}$) [5] に一致した。この緩和の速い領域では、ガラス転移に伴う臨界挙動が起きている可能性が高い。

^1H の T_1 の測定周波数依存性からは $T_1^{-1} \sim \omega^{-1/2}$ という関係が得られ (Figure 3)、NMR 緩和を記述する古典的理論である BPP 理論 [6] から予想される $T_1^{-1} \sim \omega^{-2}$ とは大きく異なる挙動を示すことがわかった。BPP 理論では局所磁場の揺らぎが三次元に等方的で、かつ、その減衰が指数関数 (ローレンツ関数) であることを仮定している。今回得られた $T_1^{-1} \sim \omega^{-1/2}$ という関係は、一次元の環境揺らぎを仮定した一次元酔歩モデルから導くことができる [7]。このことから、PPP の主鎖に沿って隣り

合うフェニル基の捻れ運動が一次元的に拡散しているのではないかと考えられる。

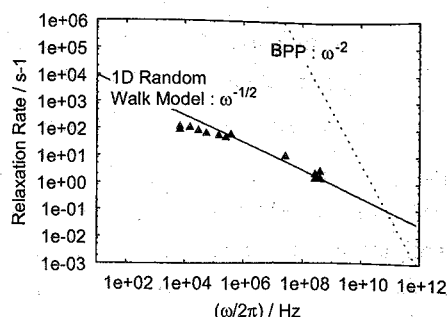


Figure 3. The frequency dependence of ^1H spin-lattice relaxation rate for PPP at ambient temperature.

REFERENCES

1. T.Yamamoto, A.Morita, Y.Miyazaki, T.Maruyama, H.Wakayama, Z.Zhou, Y.Nakamura, T.Kanbara, S.Sasaki, and K.Kubota, *Macromolecules*, **25**, 1214 (1992)
2. S.Sasaki, T.Yamamoto, T.Kanbara, A.Morita, and T.Yamamoto, *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **30**, 293 (1992)
3. W.Götze, *Z. Phys.*, **B60**, 195 (1985)
4. E.Leutheusser, *Phys. Rev.*, **A29**, 2765 (1984)
5. J.D.Ferry, *Viscoelastic Properties of Polymers*, 3rd ed. (Wiley, New York, 1980)
6. N.Bloembergen, E.M.Purcell, and R.V.Pound, *Phys. Rev.*, **73**, 679 (1948)
7. M.Nechtschein, F.Devreux, F.Genoud, M.Guglielmi, and K.Holczer, *Phys. Rev. B*, **27**, 61 (1983)

PAA/水ガラス複合素材の
固体高分解能 ^{13}C , ^{29}Si NMR法による研究

(防大応化) ○浅野敦志、村田義文、黒津卓三

Solid-State ^{13}C and ^{29}Si NMR Study of PAA/water-glass composites
Atsushi Asano, Yoshifumi Murata, Takuzo Kurotsu

Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Japan

PAA/sodium silicate (water glass, wg) organic-inorganic composites are studied by solid-state ^{13}C and ^{29}Si NMR. It is well known that a water glass is polymerized with an acid like a HCl solution and becomes a rigid and white three-dimensional cross-linked solid. Instead of a low-molecular acid, mixing polymeric acid, PAA with wg makes a transparent gel. The ^{29}Si DDMS NMR spectra of PAA/wg show that a wg is polymerized by mixing with PAA, because the chemical shift of the peaks observed in a wg changes towards higher field and the peak widths become broader after mixing with PAA. The chemical shift (CS) values of those broad peaks are accord with so-called Q_2 , Q_3 , and Q_4 peaks, and the CS values of Q_2 and Q_3 are different from those obtained from wg/HCl. The peak area of Q_2 and Q_3 increases with PAA, while that of Q_4 decreases. This shows that the PAA interacts with a wg in PAA/wg composites.

【はじめに】有機/無機複合材料は、新規材料として現在注目されている材料であり、今後さらなる発展が期待されている分野の一つである。京大中條研の稲倉らは、ポリアクリル酸とケイ酸ナトリウムを用いて、容易に透明な有機/無機複合材料が作成できることを報告した(第51回高分子討論会 予稿集2002, 51(7), p.1478)。本研究では、ポリアクリル酸(PAA)とケイ酸ナトリウム(水ガラス、wg)を混合し、ゲル状の複合材料を作成した。ゲル状態では多量の水を含んでいるが、これを乾燥することでPAA/wg複合材料とした。このゲル状複合材料中でのPAAとwgとの相互作用について、固体高分解能 ^{13}C NMR法と ^{29}Si NMR法を用いて考察したので報告する。

【実験】ポリアクリル酸(PAA)は、Scientific Polymer Products, Inc.社の分子量75万を用いた。ケイ酸ナトリウム(水ガラス、wg)は、wgの含有量52-57%、 $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}=2.06-2.31$ の和光純薬製試薬一級をそのまま用いた。PAA/wg複合材料ゲルは、それぞれを純水10mlに0.5gを溶解した溶液を混合し攪拌することにより作成した。攪拌はシンキー(株)のThinky AR-250を用いて公転2000rpm、自転800rpmの速度で1分~10分間行い、ゲル状になった時点で攪拌を終了した。混合は重量比で行いwg/PAA = $r = 1.00, 1.25, 1.50, 1.75$ を作成した。また、これとは別にPAA/wg=3/7, 1/1, 7/3の複合体を、ゾル状のまま乾燥して薄いフィルムを得た。乾燥状態を測定するために、メトラートレド社のHG53を用いて105°Cで加熱し、水分率を測定した。固体高分解能NMRスペクトルはBruker DMX500分光光度計を用い、 ^{13}C 核と ^{29}Si 核の測定を行った。マジック角回転(MAS)下で交差分極(CP)法と双極子デカップリング(DD)法の両方でスペクトルを測定した。

Keywords : ポリアクリル酸(PAA)、水ガラス ($\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$)、固体 ^{13}C NMR、固体 ^{29}Si NMR

著者ふりがな : あさのあつし、むらたよしふみ、くろつたくぞう

【結果と考察】

PAA/wgゲル状態ではwgの比率が増加する ($r=1.50$ と 1.75) と透明度が低くなり、また硬い固形となるが、wgの比率が減少する ($r=1.00$ と 1.25) と非常に透明性がよくなり、また非常に軟らかいゲルとなる。しかし、乾燥した状態ではwgの比率に関係なく、若干黄色がかった透明な材料となり、硬くなる。図1に $r=1.75$ のゲル状のPAA/wg複合材料の写真を示す。図1の左側は作成した直後のゲルであり、wgの比率が高いので、不透明な硬いゲルである。右側は、ガラス板を用いて圧力をかけて左図のゲルを板状に成形し、1週間ほどかけてゆっくり乾燥した後の写真であるが、比較的透明なゲルへ変化している。乾燥したゲルは、まだ水分を含むが、このゲルを N_2 ガス雰囲気下でさらに乾燥し、水分量を2wt%以下として ^{29}Si NMRスペクトルを観測した。

図2にDDMAS ^{29}Si NMRスペクトルを示した。DDMAS法ではピーク面積は存在比に比例するが、CPを併用すれば、 $-92ppm$ と $-101ppm$ 付近のピーク強度が相対的に増大し、逆に $-110ppm$ 付近のピーク強度は大幅に減少する。化学シフト値とこれらの変化から、ピークの帰属は低磁場側から Q_2 、 Q_3 、 Q_4 であることがわかる。 Q_1 は観測されない。図2から、 Q_3 ピークの相対強度はPAAの比率が多くなる ($r=1.75$ から $r=1.00$)と増大し、 Q_4 ピークでは逆に減少している。このことは、 Q_2 と Q_3 ピークはPAAと相互作用している3次元架橋体であることを示している。また、wgをHClと反応させて3次元架橋体とした試料からも同様なスペクトルが観測される。しかし、 Q_2 と Q_3 のピークがPAAで作成したゲルのピークに比べて $1ppm$ 程低磁場側にシフトしている。さらに、HClで作成した3次元架橋体は白い粉末である。

図3に、 $r=1.75$ のPAA/wg複合材料の ^{29}Si のCP接触時間依存性をプロットした。 Q_2 と Q_3 の ^{29}Si - 1H 間の交差緩和時間 (T_{SIH}) が $0.7ms$ であるのに対し、 Q_4 のそれは $2ms$ と3倍長い。また Q_2 の方が Q_3 の $T_{1\rho}$ よりも約2倍速いことがわかった。相互作用しているHはPAAのカルボン酸由来であるが、 Q_2 では2分子のカルボン酸、 Q_3 は1分子のカルボン酸が相互作用しており、この 1H の数が $T_{1\rho}$ の違いに反映している。また、 T_{SIH} の長さから距離を推測し議論した。

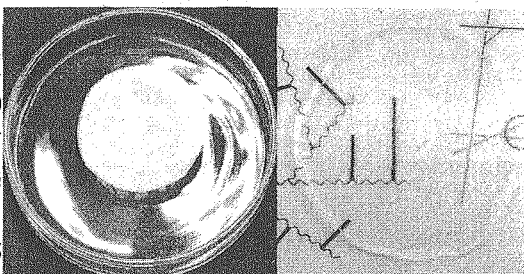


Figure 1. Photo pictures of PAA/wg nanocomposite ($r=1.75$). Left; just after a mixing of PAA and wg. Right; after drying for 1 week, thickness is ca. 3mm.

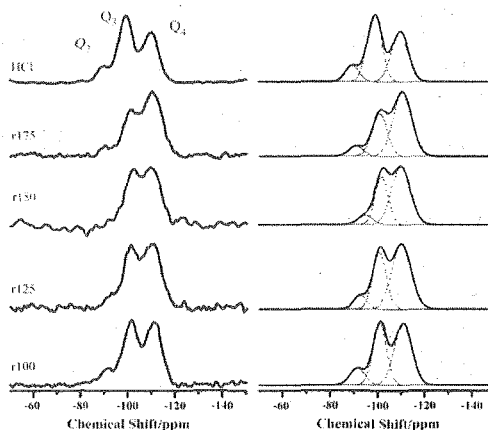


Figure 2. Observed (left) and Decomposed (right) ^{29}Si DDMAS NMR spectra of PAA/wg nanocomposites under MAS=5kHz. The letter of "HCl" means that wg three-dimensional network is created by HCl solution.

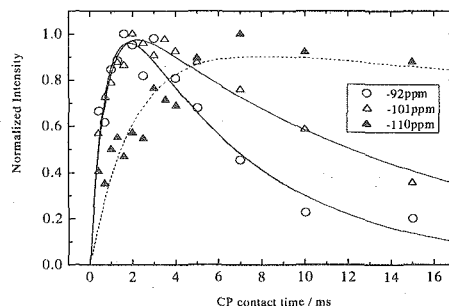


Figure 3. ^{29}Si - 1H CP contact time dependence of PAA/wg nanocomposite at $r=1.75$.

(東工大院理工¹、高分子センター²、農工大工³)

○中澤靖元^{1,2}、茂呂ふみか³、木塚三津子³、朝倉哲郎³、安藤勲^{1,2}

Determination of the Precise Structure of Silk Fibroin Model Peptide studied with Solid-State NMR

Yasumoto Nakazawa, Fumika Moro, Mitsuko Kizuka, Tetsuo Asakura and Isao Ando

¹Dept of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, 152-8552, JAPAN ²Dept of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, JAPAN Tel&Fax, 042-383-7733 e-mail: ynakazawa@polymer.titech.ac.jp

The structure of the model peptide from *B. mori* silk fibroin, (Ala-Gly)₁₅ with silkII form was studied with solid state NMR in detail. The selective ¹³C labeling of Ala Cβ carbon was performed by introducing the labeled Ala residue in the process of peptide synthesis. The fraction of the peak at 16.6ppm in the Ala Cβ peak increased at both N- and C- terminals; especially at the N-terminal site. At the inner part of the peptide, the fraction increased at 11th and 19th positions. These data indicate the appearance of the lamellar structure having turn structure at these two positions although the position of turn was distributed along the chain.

【Introduction】

Ala と Gly の交互共重合体を代表的なモチーフとして有する家蚕絹フィブロインは、繊維化前(Silk I 型)と繊維化後(Silk II 型)で立体構造が著しく異なることが知られている。その結晶部のモデルペプチド(Ala-Gly)₁₅はギ酸溶解後、風乾すると、β-sheet 構造を中心とした Silk II 型構造を形成する。以前の本研究室の固体NMR 研究から、我々は家蚕絹フィブロイン結晶部のモデル化合物(Ala-Gly)₁₅について、固体 NMR を用いて、その Silk II 型構造の解析を行ってきた。その結果、分子間配置の異なる2種類の逆平行β-sheet 構造とβ-turn 構造が混在した不均一構造を取ることが明らかになった。(Figure 1)^{1,2}。しかし、その不均一構造の詳細についてはわかっていない。そこで本研究では、(AG)₁₅ペプチドの Ala 残基に各々順次、安定同位体ラベルを施した15種類のペプチドを合成し、¹³C CP/MAS NMR および、スピン-格子緩和時間(T₁)の測定によって、各 Ala 残基の局所構造および運動性の情報を選択的に得、(AG)₁₅ペプチドの不均一構造の詳細検討をした。

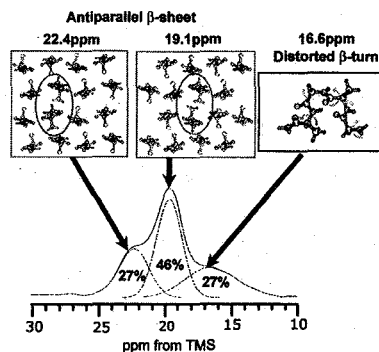


Figure 1. Expanded Ala Cβ peak in ¹³C CP/MAS NMR spectrum of naturAla abundance (AG)₁₅ in the silk II form. The assignment has been reported in ref.(1)

【Materials and Methods】

Fmoc 固相合成法により、[3-¹³C]Ala をラベルした15種のラベル(Ala-Gly)₁₅を合成した。合成したペプチドを Figure 2 に示す。得られたペプチドは、ギ酸に溶解後、風乾させたものを Silk II 型処理試料とした。固体 ¹³C CP/MAS NMR 測定は CMX 400 NMR(Chemagnetics 社製)を用いて行なった。スペクトルの解析は、特に Ala Cβ に着目して行い、差スペクトルによってノンラベルの寄与を除いたものについて行った。

東工大院理工 ○龍野 宏人、相見 敬太郎、安藤 慎治

Solid-state ^{19}F MAS and $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS NMR Analysis on PCTFE/PVDF Blend

Hiroto Tatsuno, Keitaro AIMI, and Shinji ANDO (Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1-S1-21, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, 152-8552, Japan)

Tel: +81-3-5734-2889, Fax: +81-3-5734-2889, htatsuno@polymer.titech.ac.jp

Abstract: Variable-temperature solid-state ^{19}F MAS NMR spectroscopy has been used to investigate the molecular mobility and conformational changes in poly(chlorotrifluoroethylene) (PCTFE). The temperature dependence of $T_{1\rho}^{\text{F}}$ revealed that the segmental motion in the amorphous domain of PCTFE becomes vigorous around the β -relaxation temperature, while that of the crystalline domain also occurs even much below the melting temperature. The DFT calculations of ^{19}F shieldings suggest that the high frequency shifts of the crystalline signals observed above 100°C can be ascribed to conformational changes of the main chains that increase the proportion of *gauche* conformers. $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS NMR spectroscopy was applied to PCTFE / poly(vinylidene fluoride) (PVDF) [90/10] blend, and the structural information on PVDF was selectively obtained in spite of the small content. The crystalline morphology of the PVDF (predominantly α -form) stays unchanged by blending. The amorphous domains of both PCTFE and PVDF in the blends are more mobile than those in the homopolymer, and they are immiscible in nanometer-scale size.

【緒言】 ポリクロロトリフルオロエチレン (PCTFE) は、低温や紫外線照射下でも優れた機械特性を有する半結晶性高分子である。しかし、溶融粘度が高く成形温度範囲も狭いことから加工が難しいため、Kel-F として知られる共重合体や他の高分子とのブレンドがより広く使われている。これまでに ^{19}F MAS NMR 法を用いて Kel-F の一次構造を解析した例¹⁾はあるが、上記物性との関連が深い PCTFE 分子鎖のコンホメーションや運動性について分光学的に解析した報告は見あたらない。そこで我々は PCTFE に対して固体 ^{19}F MAS NMR 法を適用し、温度上昇に伴う結晶および非晶中での PCTFE 分子鎖コンホメーションと運動性の変化を解析した。また固体 $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS NMR 法により PCTFE/PVDF ブレンド中の少量成分である PVDF を選択的に観測し、その結晶形や分子運動性を調べた。

【実験】 PCTFE はダイキン工業 (株) から提供された膜厚 100 μm のプレス成形フィルムをそのまま用いた。示差走査熱量測定 (DSC) から得られた融点は 211.9°C であり、結晶化度は 33%であった。PCTFE/PVDF ブレンドは PCTFE 粉末 (Aldrich) と PVDF 粉末 (呉羽化学, KF1100) を 90:10 の質量比で、300°Cのもと 5 分間溶融混練後、急冷したものを用いた。PCTFE 及び PVDF の融点は DSC からそれぞれ 210.8°C, 173.9°C であった。固体 ^{19}F MAS NMR 測定は、日本電子製 EX データシステム (^{19}F 共鳴周波数 282.65 MHz) と Chemagnetics 社製 APEX F/H 二重共鳴プローブ及び温度可変ユニットにより MAS 回転数 (ω_r) 16 kHz で行った。 ^{19}F の 90°パルス幅は 2.5 μs 、回転系のスピナー格子緩和時間 $T_{1\rho}^{\text{F}}$ の測定は 100 kHz のスピナーロック強度で行った。 $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS 実験における ^1H 及び ^{19}F の r.f. 強度は Hartmann-Hahn first-sideband matching 条件 ($\omega_{\text{H}} = \omega_{\text{F}} - \omega_r = 83$ kHz) を満たすように設定した。PCTFE のコンホメーション解析のため、最近接の Cl 原子同士の立体配置 (*meso*, *racemic*) を考慮した 6 種類の 4 量体モデル $\text{CF}_3-(\text{CF}_2\text{CFCl})_4-\text{CF}_3$ (*mmmm*, *mmr*, *mrmm*, *rrmm*, *rrr*) の密度汎関数計算を行った。B3LYP/6-311G(d,p) による構造最適化の後、B3LYP/6-311+G(2d,p) で得られた磁気遮蔽定数の等方平均値のうち、分子鎖中央の 3 つのフッ素 (CF_2CFCl) の値を ^{19}F NMR スペクトルの解釈に用いた。

^{19}F MAS, $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS, PCTFE, 分子運動性, コンホメーション

○たつの ひろと、あいみ けいたろう、あんど う しんじ

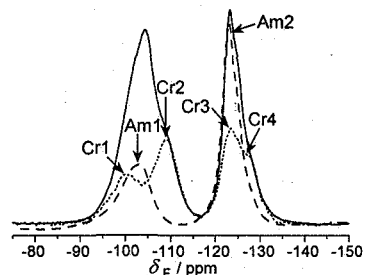


Fig. 1. ^{19}F MAS NMR spectra of PCTFE at 100°C. Solid line: direct polarization (non-selective), Dotted line: crystalline region selective, Broken line: amorphous region selective.

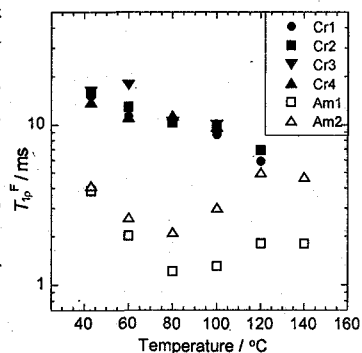


Fig. 2. Temperature dependence of $T_{1\rho}^{\text{F}}$ value for each peak in Fig. 1.

【結果・考察】 100°CにおけるPCTFEの ^{19}F MAS NMRスペクトルをFig. 1に示す。実線は全ての ^{19}F 核の寄与を含む直接励起スペクトルであり、-104 ppmにピークをもつ信号は CF_2 に、-124 ppmにピークをもつ信号は CFCl に帰属される。点線は、20 msのスピロックにより $T_{1\rho}^{\text{F}}$ の短い ^{19}F 核の寄与を排除した $T_{1\rho}$ フィルタスペクトルであり、分子運動の拘束された結晶部が優先的に観測されていると考えられる。得られた結晶部由来の信号を、低磁場側からCr1, Cr2, Cr3, Cr4とする。Fig. 1の破線で示したのは、運動性の高い領域が優先的に観測される双極子フィルタ法²⁾により得られたスペクトルである。PCTFEのガラス転移点は52°C³⁾と報告されていることから、同スペクトルで観測されているのは分子運動が活発化した非晶部に由来する信号と考えられ、これらを低磁場側からAm1, Am2と呼ぶ。スピロック法による $T_{1\rho}^{\text{F}}$ 測定を行うと、Cr信号とAm信号が重なっていることに起因してCr1, Cr2およびCr3の減衰曲線はいずれも2成分の指数関数の和で表された。減衰の速い成分を非晶部由来としてプロットした結果をFig. 2に示す。結晶部の $T_{1\rho}^{\text{F}}$ が昇温に伴って低下していることから、融点より100度近く低温でも、100 kHz程度の遅い分子運動が結晶部で起きていると考えられる。また非晶部の $T_{1\rho}^{\text{F}}$ は80°Cから100°Cにかけて極小となるが、これは β 分散温度が95°Cであるという動的粘弾性の報告⁴⁾と一致し、この温度域で非晶部のセグメント運動が活発化していると言える。Fig. 3に示したのは $T_{1\rho}$ フィルタスペクトルの温度変化である。100°C以上で明確となる-122 ppm付近の鋭い信号は、非晶(ゴム)領域の CFCl に起因し、140°Cでは立体規則性を反映して2本に分裂している。これに対し、結晶部の信号は $T_{1\rho}^{\text{F}}$ の減少に伴って強度が次第に低下し、さらに100°C以上では2~3 ppmの低磁場シフトを示した。立体規則性を考慮した4量体モデル化合物の遮蔽定数計算を行ったところ、相対的に安定な*rrr*及び*rrm*連鎖は結晶部信号Cr2及びCr3に寄与し、*meso*連鎖を多く含む場合はCr1及びCr4に寄与することが示唆された(図は非表示)。さらに $\text{C}-\text{CF}_2\text{CFCl}-\text{C}$ で定義される主鎖二面角を最安定構造からわずかに変化させて再計算すると、*meso*連鎖を多く含むモデルが二面角の小くなる方向、すなわちゴーシュ方向にねじれた場合に低磁場シフトを示した。 ^{19}F の化学シフトは一般にわずかなコンホメーション変化を敏感に反映し、この場合も実測に合致するのは5°程度のねじれであった。以上のことから、結晶部においても100°C以上では、少なくとも*meso*連鎖を多く含む部位で、主鎖がゴーシュ方向にねじれる(またはゴーシュ分率が增加する)コンホメーション変化が起こっていると考えられる。Fig. 4はPCTFE/PVDFブレンド及び各単体の直接励起スペクトルである。Fig. 4(b)より、ブレンド中のPCTFEは単体よりもAm1信号の寄与が高く結晶化度が低いことがわかる。またPCTFE信号の $T_{1\rho}^{\text{F}}$ の値はいずれも単体の場合より小さな値を示し、ブレンドにより分子運動が活発化したことを示している。一方、ブレンド中の微量成分であるPVDFに関する情報はFig. 4にほとんど含まれていないが、 $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS法によりPVDFのみを選択的に観測できることを見出した(Fig. 5)。PVDFの α 型結晶に由来する-79 ppm及び-93 ppmの広幅信号⁵⁾がブレンド試料の場合にも観測され、結晶化度は低いながら結晶形は単体同様に α 型が支配的であることがわかった。一方、-89 ppmに観測されるVDF連鎖の非晶部信号⁵⁾の半値幅が単体の場合より狭いことから、非晶部中VDF連鎖の分子運動が単体の場合より活発化していることが示唆され、 $T_{1\rho}^{\text{F}}$ 測定からも同様の結論を得た。しかし、ブレンド中PCTFEとPVDFの $T_{1\rho}^{\text{F}}$ の値は互いに一致しなかったことから、両者はnmオーダーでは非相溶と考えられる。

1) S. F. Dec, et al, *Macromolecules*, **20**, 2754 (1987). 2) K. Aimi, et al, *Magn. Reson. Chem.*, **42**, 577 (2004). 3) J. D. Hoffman, et al, *J. Polym. Sci. C*, **14**, 173 (1966). 4) N. G. McCrum, *J. Polym. Sci.*, **60**, S3 (1962). 5) S. Ando, et al, *Magn. Reson. Chem.*, **40**, 97 (2002).

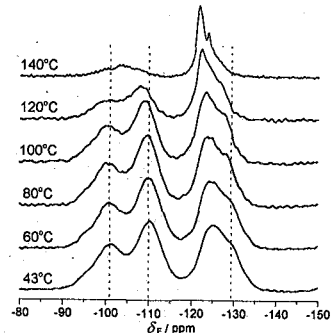


Fig. 3. $T_{1\rho}$ filter ^{19}F spectra obtained by varying temperatures from 43°C to 140°C. The durations of spin-lock were 20 ms below 120°C and 5 ms at 140°C.

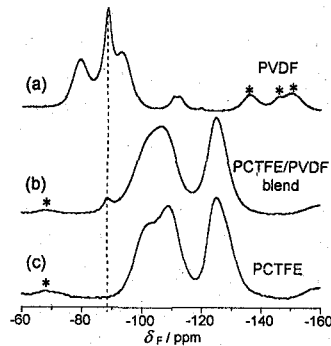


Fig. 4. ^{19}F DP spectra of (a), PVDF homopolymer (b) 90/10 PCTFE/PVDF blend, and (c) PCTFE homopolymer at 68°C. The peaks shown with asterisks are spinning sidebands.

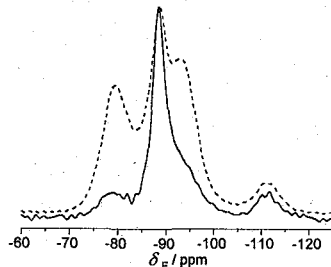


Fig. 5. $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$ CP/MAS spectra of PVDF in the blend (solid line) and that of homopolymer (dotted line) at 68°C. The contact time used was 0.5 ms.

固体 ^{19}F MAS NMR 法を用いた PVDF 及び VDF オリゴマーの
結晶構造及び相転移挙動の解析

東工大院理工 ○小関佑、相見敬太郎、奥居徳昌、安藤慎治

Analysis of Crystal Morphology and phase transition mechanism of
PVDF and VDF oligomer using Solid State ^{19}F MAS NMR

Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology

Yu Koseki, Keitaro Aimi, Norimasa Okui, Shinji Ando

The crystal structures and molecular mobility of PVDF and VDF oligomer were analyzed using solid-state ^{19}F MAS NMR. PVDF samples containing crystalline α -, β -, γ -forms were prepared, and the spectral lineshape of each sample was analyzed. PVDF takes β -form with a distribution of conformation in PVDF/PMMA=65/45 blend. In contrast, PVDF takes mainly γ -form in annealed and gelled sample. A small α -form signal is observed in the former, whereas almost disappears in the latter. In addition, the much broader signals in gel suggests that PVDF γ -form was crystallized with a large distribution of conformation. The crystalline-selective observation of VDF oligomer reveals that it contains β - and γ -form crystallites at 45°C. The apparent increase in T_1^{F} with an increase in temperature indicates that the mobility of $-\text{CF}_2\text{Cl}$ end-group was accelerated by heating. The mobility of regular structures closely located at regio-irregular sequence is more easily activated than that far located from regio-irregular parts.

[緒言] われわれは Harris らと共同でポリフッ化ビニリデン(PVDF)の種々の結晶構造(α -, β -, γ -form)が固体 ^{19}F MAS NMR スペクトルにより明確に判別できることを報告してきた^{[1],[2]}。本研究では各種 PVDF 試料のスペクトル形状及び緩和時間測定を行い、結晶中での分子鎖コンホメーション及び分子運動性の解析を行った。また、PVDF のモデル化合物として、PVDF よりも低温域でコンホメーションと運動性に変化が現れる VDF オリゴマー(OVDF)の構造解析を行った。

[実験] 試料として(a) PVDFフィルム試料(呉羽化学KF-850 のDMAc溶液からキャストで調製)、(b) 延伸電場配向フィルム試料(呉羽化学KF-ピエゾフィルム)、(c) PVDF/PMMAブレンドフィルム試料(KF-850 とPMMA (Aldrich)のDMAc溶液から調製)、(d) アニール試料 (KF-1100 のDMAc溶液からの製膜試料を 170°Cで 12 時間熱処理)^[2]、(e) 乾燥ゲル(KF-850 の γ -butyrolactone溶液を 180°Cで 1 時間加熱後、24 時間水冷してゲル形成後に乾燥)^[3]、(f) OVDF試料(呉羽化学: $\text{CCl}_3-(\text{CH}_2\text{CF}_2)_n-\text{Cl}$ ($n \approx 9$)のacetone溶液からキャスト)を用いた^[4]。NMR測定は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 (^{19}F 共鳴周波数 282.65 MHz) (日本電子製EXデータシステム)、 ^1H $\pi/2$ パルス幅 3.0 μs 、 ^{19}F $\pi/2$ パルス幅 2.5 μs 、積算回数 32 回(CPを用いた結晶部選択測定では 512 回)、MAS回転数 16 kHzで測定した。通常の測定は室温(68°C)において、温度可変測定は 45°Cから 120°Cの範囲で行った。化学シフト基準は C_6F_6 (-163.6 ppm)を外部基準として用いた。

[結果と考察] スピンロック法により各試料の結晶部を強調して観測した固体 ^{19}F MASスペクトルをFig. 1 に示す。(a) PVDFフィルムにおいて α 結晶相(tg^+tg^- 連鎖)に由来する信号(\blacktriangle : -79 ppm及び \bullet : -94 ppm)、非晶相(\circ : -88 ppm)、異種結合部(*head-to-head*及び*tail-to-tail*)に由来する信号(\diamond : -110 ppm及び \triangle : -112 ppm)が観測される。(b) 延伸電場配向フィルム試料において β 結晶相(*all-trans*連鎖)に由来する信号が α 結晶の高磁場側の信号とほぼ同じ位置(\bullet)に観測される^[1]。一方、(c) ブレンドフィルムにおいて β 結晶相に由来する信号(\bullet)が観測されるが、(a)の α 結晶相の信号(\bullet)の半値幅と比較してブレンドフィルムにおけるそれは 1.5 倍だけ広幅化している。これはこの試料中で生成する β 結晶相の分子鎖コンホメーションにねじれや分布が存在することを示している。これはモデル化合物を用いた磁気遮蔽定数計算の結果からも支持される。(d) アニール試料においては γ 結晶相($\text{t}_3\text{g}^+\text{t}_3\text{g}^-$)に特徴的な信号(\blacksquare : -85 ppm、 \blacklozenge : -91 ppm、 \bullet : -94 ppm、 \blacktriangledown : -102 ppm)が観測され

キーワード: 固体 NMR、 ^{19}F 、PVDF、VDF oligomer、相転移

こせき ゆう、あいみ けいたろう、おくい のりまさ、あんど う しんじ

る^[2]。一方、(e) 乾燥ゲル試料においてはアニール試料と同じ位置に結晶性の信号が観測されるが、その半値幅はアニール試料のそれと比較して約 1.3 倍広幅化している。また、アニール試料においては α 結晶相の信号(\blacktriangle)が観測されるが、乾燥ゲル試料では観測されない。これらより PVDF の乾燥ゲル化により α 結晶相が高い割合で γ 結晶相に変換しているが、生成した γ 結晶相の分子鎖コンホメーションの構造にはかなりの分布が存在すると考えられる。この結果は DSC や広角 X 線回折の結果とも対応している。

Fig. 2 は OVDF 試料の (a) NMR スペクトル、(b) CP/MAS 法を用いてコンタクト時間を 0.1 ms として結晶部を選択的に観測したスペクトルである。(a) において -46 ppm 付近の 2 つの信号 (A, B) は鎖末端の $-\text{CF}_2\text{Cl}$ に、-88 ppm 付近の 5 つの信号 (F, G, H, I, J) は *head-to-tail* 結合の $-\text{CF}_2-$ に、-93 ppm 付近の信号 (K) は鎖末端近くの $-\text{CF}_2-\text{CH}_2\text{CF}_2-\text{Cl}$ に、-94 ppm 付近の信号 (L) は $\text{CCl}_3-\text{CH}_2\text{CF}_2-$ に、-112 ppm 付近の 2 つの信号 (C, D) は異種結合部 (*head-to-head* or *tail-to-tail*) の $-\text{CF}_2-$ にそれぞれ帰属される^{[4], [5]}。また、-90 から -110 ppm にかけて広幅な信号成分 (E) があるが、これが結晶部に特徴的な信号に帰属されると考えられる。実際に結晶部を強調して観測したスペクトル (b) を見ると、-94 ppm 付近 (1) に β 及び γ 結晶相に特徴的な信号が、また -85 ppm 付近 (2) と -102 ppm 付近 (3) に γ 結晶相に特徴的な信号が観測された。これより、OVDF 試料の結晶部中には β 及び γ 結晶相が共存していると考えられる。

OVDF 試料の分子運動性を解析するために、75°C、100°C、120°C における分子鎖中の各フッ素核の T_1^F を測定したものを Fig. 3 に示す。温度上昇に伴い鎖末端のフッ素核 (A, B) の T_1^F は大きく増加しており、鎖末端の運動性は活発化するが、鎖末端の炭素核から 2 つだけ内側の炭素核に結合するフッ素核 (K, L) の運動性は温度が上昇しても活発化しないことが分かる。また、*Head-to-tail* 結合部の 5 つの信号 (F, G, H, I, J) のうち、信号 J (異種結合に近傍の $-\text{CF}_2-$) の T_1^F は温度上昇に伴って他の 4 つの信号の T_1^F に比べて大きく増加している。これらのことから、温度上昇に伴って OVDF では鎖末端と異種結合部近傍のフッ素核の運動性がより活発化すると考えられる。

[参考文献]

- 1) S. Ando, R. K. Harris, S. Reinsberg *Magn. Reson. Chem.*, 2002; **40**(2); 97.
- 2) J. W. Park, Y. A. Seo, I. Kim, K. Aimi, S. Ando, C. S. Ha *Macromolecules* 2004; **37**(2); 429.
- 3) M. Tazaki, R. Wada, M. Okabe, T. Homma *J. Appl. Sci.*, 1997; **65**; 1517.
- 4) Herman, T. Uno, A. Kubono, S. Umemoto, T. Kikutani, N. Okui *Polymer* 1997; **38**(7); 1677.
- 5) P. Wormald, D. C. Apperley, F. Beaume, R. K. Harris *Polymer* 2003; **44**; 643.

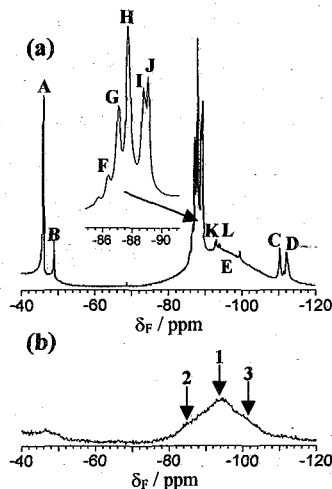


Fig. 2 Solid-state ^{19}F MAS NMR (a) Total spectrum, (b) Crystalline selective spectrum. (CP contact time=0.1 ms)

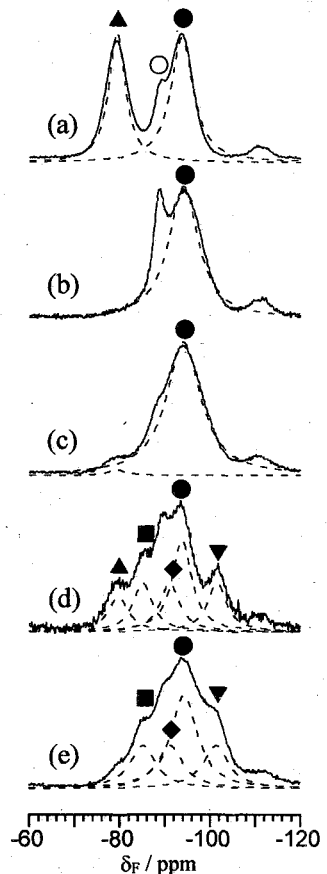


Fig. 1 Crystalline selective (spin locking time=20 ms) spectra of (a) PVDF spin-coated film, (b) electropoled film, (c) PVDF/PMMA=65/45 blend sample, (d) annealed -PVDF film, (e) gel-PVDF sample.

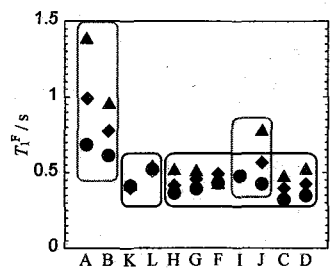


Fig. 3 The plots of T_1^F for each fluorine in the chain. \bullet : 75°C, \blacklozenge : 100°C and \blacktriangle : 120°C.

原子間距離測定によるヒトカルシトニンアミロイド線維構造の解析
 (横浜国大院工¹、オックスフォード大生化学²、姫路工大院理³)
 ○内藤 晶¹、上平美弥²、井上良三³、遠藤弘史¹、伊藤有希¹、大道寺謙悟¹

**Structural analysis of amyloid fibril in human calcitonin based
 on the measurements of interatomic distances**

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, ²Department of Biochemistry,
 Oxford University, ³Graduate School of Science, Himeji Institute of Technology
 Akira Naito¹, Miya Kamihira², Ryozo Inoue³, Hiroshi Endo¹, Yuki Itoh¹, Kenngo Daidoji¹

Fibril structure of human calcitonin (hCT) from aqueous solution at pH 7.0 was examined by observing the interatomic distances between amide nitrogen and carbonyl carbon of neighboring chains of ¹³C, ¹⁵N-labeled hCT and a model pentapeptide (DFNKF) using ¹³C REDOR methods by taking into account its dipolar interaction analyzed by the 3 spin system. A unique chain packing of the antiparallel β -sheet was proposed as a dominant fibril structure, although the possibility of a contribution of chain packing consisting of sliding one or two residues perpendicular to the fibril direction cannot be ruled out. In addition, it appears that the phenyl rings of Phe16 are aligned on the same side of the β -sheet and make the β -strand stable by forming π - π interaction between the β -strands. This interaction may play an important role in forming amyloid fibril in hCT.

【はじめに】ヒトカルシトニンは膵臓で分泌されて破骨細胞に存在するカルシトニン受容体に結合してカルシウムの溶出を抑制する作用をもつペプチドホルモンである。ヒトカルシトニンは中性溶液中で容易にアミロイド線維を形成することが知られている。我々はこれまでの研究で、固体 NMR による構造解析の情報から、中性条件では逆平行 β -シート構造をとり、酸性条件では平行 β -シートと逆平行 β -シートの混合であることを提唱してきた^{1,2)}。また反応速度の解析から線維形成は線維の核ができる1段階目の反応とその核から線維が伸長する2段階目の自己触媒反応過程からなる2段階反応機構であることを明らかにした¹⁾。本研究ではカルシトニンの二重標識された同位体の原子間距離を正確に測定し、この距離情報を基にカルシトニン線維のパッキングの様子を解析することを試みた。さらにこのヒトカルシトニンの中で中央部の5アミノ酸残基のフラグメントが線維形成の最小単位であることが分かってきたので³⁾、この短いフラグメントを用いて、線維構造およびパッキングの様子を精密原子間距離測定から決定したので報告する。

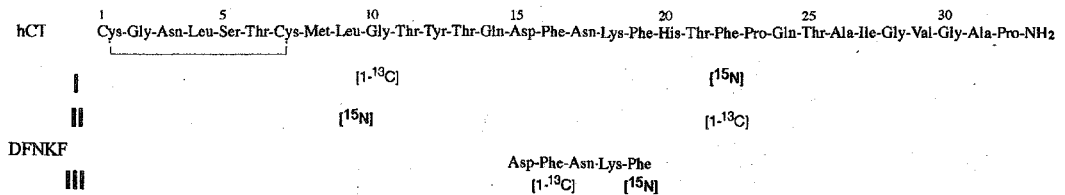
【実験】 [¹³C]Gly¹⁰, [¹⁵N]Phe²²-hCT (I), [¹⁵N]Leu⁹, [¹³C]Phe²²-hCT (II), Asp-[¹³C]Phe-Asn-Lys

REDOR、アミロイド線維、原子間距離、逆平行 β -シート、自己触媒反応

ないとう あきら、かみひら みや、いのうえ りょうぞう、えんどう ひろし、
 いたう ゆき、だいどうじ けんご

- ^{15}N]Phe(DFNKF) (III)は固相法により合成し、逆相 HPLC により精製した。合成ペプチドは pH7 の溶液に溶かして充分長い時間放置して線維を形成した。線維成分を濾過し、モノマー成分を除いて乾燥後、試料管に充填して NMR 測定を行った。NMR 測定は Varian CMX Infinity 400 NMR 分光器に三重共鳴プローブ装備してを行った。 ^{13}C REDOR 信号(S_{REDOR})と Full echo($S_{\text{full echo}}$)信号は REDOR 展開時間 NcTr を 5 ms から 30 ms に変化してそれぞれ信号を 2000 回から 16000 回積算した。ここで Nc はローター周期数で Tr は周期を表す。

Scheme 1 : Amino Acid Sequence of hCT.



【結果と考察】 Fig. 1 に試料 II の NcTr=30 ms における REDOR 信号と Full echo 信号ならば $\Delta S/S_0 = (S_{\text{full-echo}} - S_{\text{REDOR}})/S_{\text{full-echo}}$ の NcTr に対するプロットを示す。Fig. 1 に示すように、わずかながら REDOR 効果が観測された。試料 II の二重標識試料を天然存在比の試料 II で希釈した場合の差スペクトルを Fig. 1C に示す。希釈した場合には REDOR 効果が減少することから、REDOR 効果を与える双極子相互作用は分子間由来であることが明らかになった。この REDOR 効果の解析には線維構造が典型的な逆平行 β -シート構造をとると仮定して、Fig. 1(Top)で示すように次の3つの場合に分けて3スピンス系⁴⁾として解析した。(1) j ストランドの C_j が水素結合を形成する i ストランドの N_i ともう一方の k ストランドの N_k が標識された場合の REDOR 効果を $C_j \cdots N_i = 4.2 \text{ \AA}$, $C_j \cdots N_k = 5.2 \text{ \AA}$, $\angle N_i C_j N_k = 180^\circ$ として計算した。この REDOR 曲線を(a)に示す。(2) C_i と水素結合を形成するアミノ酸残基から 1 残基ずれた N_{i+1} と N_{k+1} が双極子結合を持つ場合の REDOR 効果を $C_j \cdots N_{i+1} = 5.7 \text{ \AA}$, $C_j \cdots N_{k+1} = 6.0 \text{ \AA}$ として計算した。この REDOR 曲線を(b)に示す。(3) C_i と水素結合を形成するアミノ酸残基から 2 残基ずれた N_{i+2} と N_{k+2} が双極子結合を持つ場合の REDOR 効果を $C_j \cdots N_{i+2} = 5.7 \text{ \AA}$, $C_j \cdots N_{k+2} = 6.0 \text{ \AA}$ として計算した。この REDOR 曲線を(b)と表す。この結果、実測点はアミノ酸が 2 残基ずれた曲線(c)が最もよくフィットすることから、標識位置の β -ストランド少なくとも水素結合の位置から 2 残基程度ずれていることを示している。

次にカルシトニンがアミロイド線維を形成する最小単位である NFDKF ペプチドの線維について同様に REDOR 測定を行った (Fig. 2)。この場合、実測の REDOR 効果は曲線(b)と曲線(c)の中間に現れたので、曲線(b)と曲線(c)が 70%と 30%で混合しているとして計算した曲線を(d)に示す。この結果、曲線(d)が最もよく実測点とフィットした。このような距離を示

すことから、NFDKFは Fig. 3 に示す逆平行 β -シート構造が主たる構造であると考えられる⁹⁾。この構造では Phe¹⁶ のベンゼン環が互いに隣接しており、 π - π 相互作用が線維の安定化に寄与することを示唆する結果となった。実際、Phe を Leu に置き換えた hCT では線維成長速度が 100 倍以上遅くなったことからベンゼン環の相互作用が線維形成速度に寄与していることが明らかになった。この構造が hCT アミロイド線維においても形成されるとした場合の線維構造を Fig. 3 (bottom) に示す。この構造では試料 I および試料 II の REDOR 効果が水素結合の位置から 2 残基程度ずれていることを説明できる構造であることが分かった。

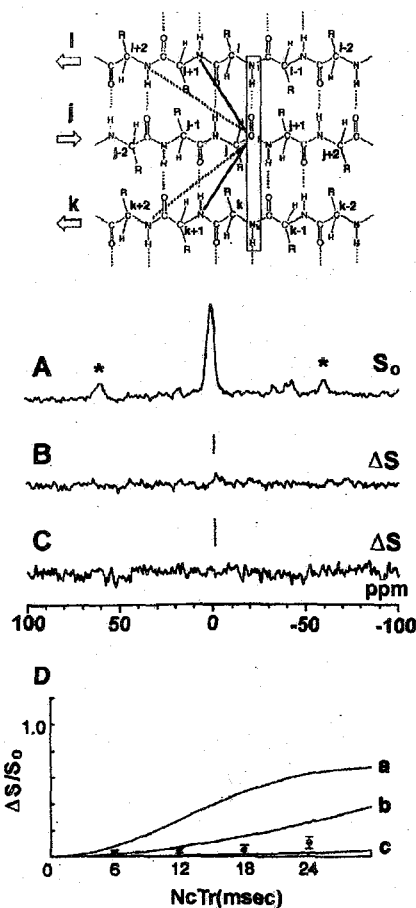


Fig. 1 Top: molecular packing of antiparallel β -sheet structure. Middle: ¹³C REDOR spectra of [1-¹³C]Gly¹⁰, [¹⁵N]Phe²²-hCT at NcTr = 18 ms. Bottom: plot of $\Delta S/S_0$ against NcTr values.

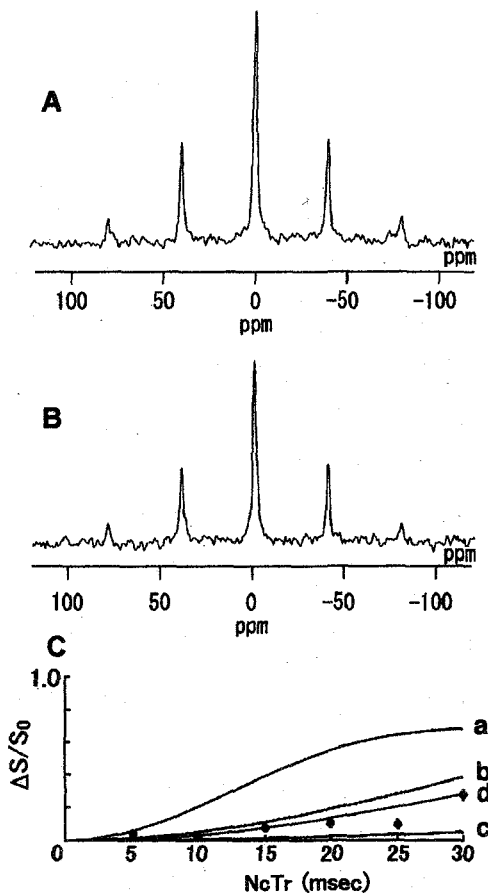


Fig. 2 (A) Full echo and (B) ¹³C REDOR spectra of Asp-[1-¹³C]Phe-Asn-Lys-[¹⁵N]Phe at NcTr = 30 ms and (C) the plot of $\Delta S/S_0$ against NcTr values.

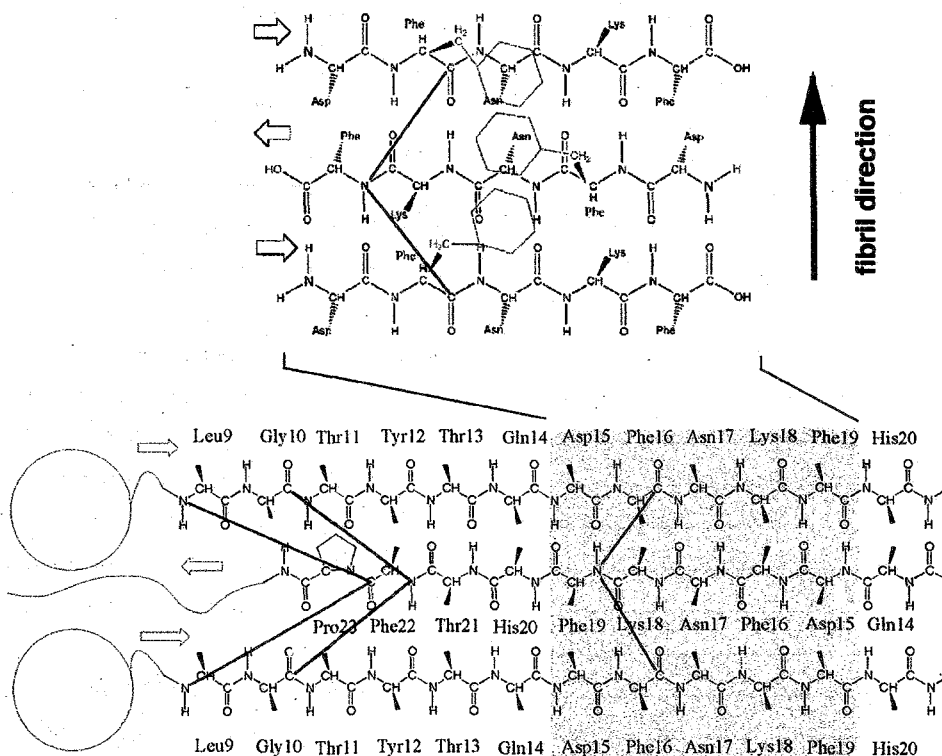


Fig. 3. Schematic representation of fibril structure of DFNKF (top) and hCT (bottom). The solid lines show the $^{13}\text{C}\cdots^{15}\text{N}$ interatomic distances measured in the ^{13}C REDOR experiments.

【まとめ】 REDOR 法を用いた原子間距離測定の結果、hCT アミロイド線維の構造が逆平行 β -シート構造をとることが明らかになった。この線維構造では中央部に位置する Phe 残基のベンゼン環が π - π 相互作用を形成し線維構造の安定化に寄与していることが示唆される。このベンゼン環の π - π 相互作用は線維伸長反応に重要な役割を果たすことが本実験で明らかになった。

【文献】

- 1) M. Kamihira, A. Naito, S. Tuzi, Y.A. Nosaka, H. Saito, *Protein science*, 9, 867-877 (2000).
- 2) M. Kamihira, Y. Ohshiro, S. Tuzi, Y.A. Nosaka, H. Saito, A. Naito, *J. Biol. Chem.* 278, 2859-2865 (2003).
- 3) M. Rechtes, Y. Porat, E. Gazit, *J. Biol. Chem.* 277, 35475-35480 (2002).
- 4) A. Naito, K. Nishimura, S. Tuzi, H. Saito, *Chem. Phys. Lett.*, 229, 506-511 (1994).
- 5) A. Naito, M. Kamihira, R. Inoue, H. Saito, *Magn. Reson. Chem.*, 42, 247-257 (2004).

膜表在性タンパク質 PLC- δ 1 の脂質膜結合に由来する 動的な構造変化とドメイン間相互作用の解析

(兵庫県立大・院生命理)

○上釜 奈緒子, 岡田 雅司, 八木澤 仁, 辻 暁

Analysis of the Conformation and Inter-domain Interaction of PLC- δ 1 at the Membrane Surface

(Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo)

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

Phospholipase C- δ 1 (PLC- δ 1) hydrolyzes PI(4,5)P₂ at the membrane surface to produce second messengers involved in the cellular signal transduction pathways. The five domains involved in PLC- δ 1 are expected to have mutual interaction that would affect the conformation and the function of PLC- δ 1. In this work, we applied the solid-state ¹³C NMR spectroscopy to investigate the interaction between the PH domain and the EF-hand domain at the membrane surface. The solid state ¹³C NMR spectra of the [3-¹³C] Ala and [1-¹³C] Phe labeled PH domain, EF-hand domain and PH-EF domain revealed structural characteristics of those domains at the membrane surface induced by the lipid-protein interaction and the inter-domain interaction.

<序論> 細胞内情報伝達系に含まれる膜表在性タンパク質 Phospholipase C- δ 1 (PLC- δ 1)は異なる5つのドメインから構成されるマルチドメイン構造を持つ。これらのドメインは PLC- δ 1 内部で互いに相互作用すると予測され、PLC- δ 1 の動的構造および機能発現に大きな影響を与えるものと考えられる。当研究室では固体高分解 NMR 分光法を用い、PLC- δ 1 の N 末端に位置する PH domain について脂質二重膜系における動的構造変化の解析を行い、PLC- δ 1 の機能発現の場である脂質二重膜上において PH domain の立体構造変化が誘起されることを見出した。本研究ではこの変化が隣接する EF-hand domain とどのように相関するかを調べるため、PH-EF domain フラグメントを用いて脂質二重膜系における動的な構造変化とドメイン間相互作用の解析を行った。

<実験> ラット由来 PLC- δ 1PH domain(residues 1-140)および PH-EF domain (residues 1-225)は *E. coli* 発現系を用いて GST 融合タンパク質として M9 培地中で発現させ、[3-¹³C]Ala/[1-¹³C]Phe 安定同位体標識導入を行った。得られたタンパク質はアフィニティーレジンを用いて精製し、thrombin 切断によって目的 domain フラグメントを単離した。各 domain 試料は PH domain の結合基質である PI(4,5)P₂ を含む脂質二重膜の懸濁液と混合して脂質膜ベシクルに結合させ、超遠心により濃縮した後、NMR 試料管に導入して測定を行った (protein : PIP₂ : PC = 1 : 2 : 40, mole ratio)。

固体 ¹³C NMR 測定は CPMAS 法および DDMAS 法を用いて Chemagnetics CMX Infinity-400 により 20°C で行った。

キーワード : 固体 NMR, 膜表在性タンパク質, 脂質二重膜, PLC- δ 1, 動的構造

うえかま なおこ, おかだ まさし, やぎさわ ひとし, つじ さとる

〈結果と考察〉 Fig. 1に脂質膜ベシクル結合状態における PLC- δ 1 PH domain、EF-hand domain および PH-EF domain 試料の DDMAS スペクトルを示す。PH domainが膜表面に結合したとき、PH domain中の各アラニン残基は Fig. 1Cに示すように二次構造に対応して異なる化学シフト値を示すピークを与える。これに対し、EF-hand domain 単独の試料(Fig. 1B)では脂質膜上において 16.7 ppm にCPMAS法により観測されない運動性の高い残基由来の信号を与える。このことから、EF-hand domain は EF-hand 構造をとりうる一次構造を有するにもかかわらず、単独のフラグメントとして脂質二重膜上に局在したときその主要な構造はランダムコイルであることが見出された。PH-EF domain では、EF-hand domain は PH domain の C-末端側に結合している。Fig. 1A の PH-EF domain のスペクトルで観測される 16.7 ppm の強度の大きい信号は、EF-hand domain 領域の主要な構造が PH-EF domain 中においてもランダムコイルであることを示している。15.6および 15.8 ppm のピークは PH domain 単独のスペクトル(Fig. 1C)中の Ala116 および Ala118 のピークと一致しており、PH domain 中のこれらの残基に由来すると考えられる。Ala 116 および Ala118 は EF-hand domain と連結する PH domain の C 末端部に位置する α -helixに含まれていることから、一次構造上 EF-hand domain に隣接する PH domain の局所構造は EF-hand domain の共存下でも保持されていることが示された。これに対して、PH-EF hand domain で見られる 17.8 ppm のピークは PH domain(Fig. 1C)、EF-hand domain(Fig. 1B)のスペクトル中に対応するピークが見られない点から EF-hand domain-PH domain 間の相互作用により生じた新たな構造に由来すると考えられる。

これらの知見から、PLC- δ 1EF-hand domain は PH domain と共存した時にも主にランダムコイル構造をとるが、同時に domain 間の相互作用による新たな構造の形成を誘起していることが示唆される。PH-EF domain において見られる 17.8 ppm の信号は水溶性基質である IP₃ 結合時および負電荷脂質を含む膜に結合したときにみられる PH domain 中の Ala88 由来の信号の化学シフト値と一致しており、この残基の構造変化に由来する可能性が考えられる。Ala88 は脂質膜との疎水的相互作用に関与すると考えられる PH domain 中の β 5/ β 6 ループ中の両親水性 α -helixに含まれることから、EF-hand domain の共存によりこの部位の構造または脂質膜との相互作用が変化している可能性がある。

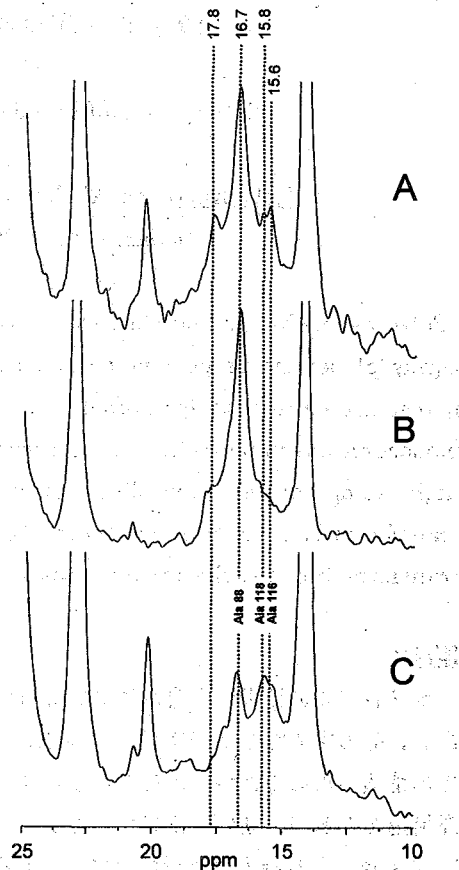


Fig. 1 DDMAS NMR spectra of the [3- 13 C] Ala labeled PLC- δ 1 PH-EF domain (A), EF-hand domain (B) and PH domain(C) at the lipid bilayer surface.

(1) Tuzi, S., Uekama, N., Okada, M., Yamaguchi, S., Saito, H., and Yagisawa, H.(2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 28019-28025

Solid-state NMR study of monoclinic form of polyethylene

Keiko Kano, Hiroki Uehara, Takeshi Yamanobe, Tadashi Komoto

Department of Chemistry, Gunma University

Polyethylene has two stable crystal structures. One is orthorhombic form in which all-trans zigzag planes are perpendicular to each other, the other is monoclinic form in which those planes are parallel to each other. Orthorhombic form is more stable crystal structure than monoclinic one in polyethylene. Monoclinic form is produced by drawing and compression. At high temperature, monoclinic form is transformed to orthorhombic one. During transformation, monoclinic-orthorhombic interface is observed. The mechanism of phase transformation and the domain sizes are discussed.

【緒言】

ナノレベルの技術が注目されている近年において、その評価技術を確立することは大変重要である。その中で固体 NMR は、材料そのものの状態で測定が可能であり、非晶、動的情報についての情報も得ることができることから非常に有用な手法である。ポリエチレンは通常斜方晶の結晶構造をとるが、延伸や圧縮などにより単斜晶が生成することが知られている。生成機構については X 線により詳細な解析がなされているが消失および単斜晶のサイズについての情報はあいまいな点が多い。そこで本研究では様々な固体 NMR の測定法により、ポリエチレンの結晶型の一つである単斜晶の生成と消失についての機構を検討した。

【実験】

試料：超高分子量ポリエチレン 分子量 2.0×10^6

熔融結晶化フィルム：180℃で熔融、圧縮した後徐冷しフィルムを作成

延伸：延伸速度 30mm/min, 延伸温度 120℃, 延伸倍率 9 倍

圧縮：室温にて 52 から 520MPa まで圧縮

測定： ^{13}C 固体 NMR (Bruker AVANCE DSX300WB)、CPMAS 法にて測定

繰り返し時間：5s

ローター回転数：約 4kHz

接触時間：2ms

キーワード：Solid-state NMR, Polyethylene, Monoclinic

著者ふりがな：かのうけいこ、うえはらひろき、やまのべたけし、こうもとただし

[結果と考察]

単斜晶は延伸<圧縮<延伸・圧縮の順に多く生成し、さらに延伸倍率、圧力とともに増加することが明らかになった。図1に熱処理をした延伸・圧縮試料(9倍延伸後520MPaで圧縮)の固体高分解能NMRスペクトルを示した。図からわかるように熱処理温度上昇とともに単斜晶が減少している。特に60℃から単斜晶は急激に減少している。しかし、90℃で熱処理した試料でも単斜晶の存在が確認された。

図2に熔融結晶化フィルムと熱処理したフィルムのNMRスペクトルをピーク分離した結果を示す。熔融結晶化フィルムでは非晶、斜方晶、単斜晶のピークが存在する。熱処理した延伸・圧縮試料では非晶、斜方晶、単斜晶に加えて約33ppmに単斜晶と斜方晶の中間相を確認することができた。

図3にピーク分離により得られた各ピークの割合の熱処理温度変化を示した。室温と40℃では各成分比はほとんど変化していない。50℃では全体的にピークの広幅化が起こり、単斜晶の割合が減少している。60℃、70℃では単斜晶はさらに減少して、33ppmの中間相が急激に増加している。80℃以上では斜方晶が増加し、中間相、単斜晶はかなり少なくなっている。単斜晶が急に減少する60℃、70℃はポリエチレン主鎖のすべりが生じ始める温度である。単結晶ポリエチレンではこの温度でラメラの厚化が生じ、結晶化度の増加が観測されている。このことからポリエチレンの主鎖のすべりの開始とともに単斜晶から斜方晶への転移が生じると考えられる。90℃の熱処理において単斜晶が存在することから分子鎖のすべりが生じている状態でも残る単斜晶が存在することがわかる。このことは歪みの解消しきれない部分において単斜晶が残っていると考えれば解釈できる。

単斜晶から斜方晶への転移についてのモデルを図4に示した。生成された単斜晶は昇温につれエネルギー準位の低い斜方晶へと転移する。しかし延伸や圧縮により局部的に歪みが存在する場合には斜方晶も高エネルギーな状態があると考えられる。高温で転移した成分も歪みが原因で室温まで冷却すると、単斜晶へ戻る成分がある。ゆえに90℃で熱処理しても2%残っていたのだと考えられる。また、中間成分はそのような高エネルギーの斜方晶から単斜晶まで転移しきれない成分なのではないかと考えられる。

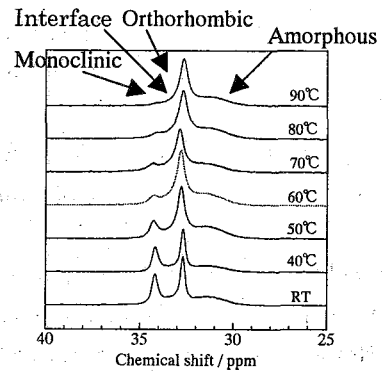


Fig1. NMR spectra of heat-treated sample as a function of thermal treatment temperature.

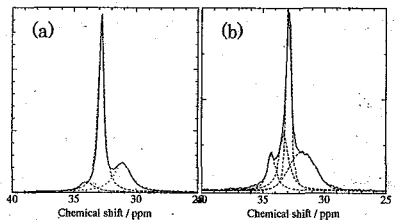


Fig2. Peak fitting of NMR spectra of (a) Melt-crystallized film, (b) Heat-treated sample.

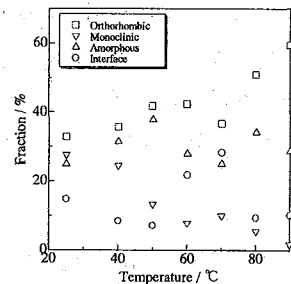


Fig3. Fraction of phases for heat-treated sample.

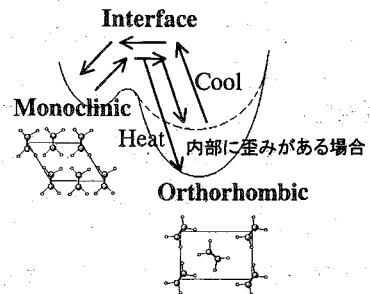


Fig.4 Mechanism of transformation from Monoclinic to Orthorhombic forms.

ポリフェニレンエーテルの熱処理による構造変化に関する研究
(群馬大工) ○寺尾綱哲、志田裕幸、五十嵐昭、上原宏樹、山延健、甲本忠史
Study of structural change of heat-treated poly(phenylene) ether

Motoaki Terao, Hiroyuki Shida, Hiroki Uehara, Takeshi Yamanobe, Tadashi Komoto
Department of chemistry, Gunma University

Polymer alloy containing poly(phenylene ether) have many good properties. One reason for these properties originate from the fact that poly(phenylene ether) easily produce cross-linking. However this reaction decreases flowability of the polymer, and makes the polymer difficult to be molded. In this study the effect of thermal treatment on the structure of poly(phenylene ether) is investigated by ^{13}C solid and solution NMR. ^1H pulse NMR measurements was carried out in order to discuss the motility. These experimental results indicate the occurrence of cross-linking reaction during heat treatment.

[緒言]

ポリフェニレンエーテルを主としたポリマーアロイは、優れた絶縁性、耐薬品性、耐衝撃性、耐熱性などを有することから、これまでに広い分野に用いられてきた。しかしながらポリフェニレンエーテルの持つ特有な分解反応の生じ易さ、および架橋反応の生じやすさから射出成形を含む成形加工等に多くの問題点を抱える。近年、ポリフェニレンエーテルを含むポリマーアロイの機械的物性の研究は報告例が多いが、ポリフェニレンエーテル自体の構造研究は少なく、ポリフェニレンエーテルの熱処理による構造変化を解明することは、成形加工時にこのポリマーがどのような挙動を示すのかを知るのに非常に重要である。

本研究においては、ポリフェニレンエーテルの熱処理による構造変化を液体、および固体高分解能 NMR により解明することを目的とした。

[試料]

試料 (A) : ポリフェニレンエーテル重合パウダー

試料 (B) : (A)を 300℃で一時間熱処理

試料 (C) : (A)を 300℃で二時間熱処理

溶液 NMR 測定時にはクロロホルムにより不溶成分を抽出することにより試料を得た。

[測定]

装置 : Bruker AVANCE DSX300WB

JEOL JNM MU25

キーワード ポリフェニレンエーテル、熱処理、架橋

著者ふりがな : たらお もとあき、しだ ひろゆき、いがらし あきら、うへはら ひろき、やまのべ たけし、こうもと ただし

[結果と考察]

試料(A)、(B)、(C)の固体¹³C-NMR測定結果をFig.1に示す。各炭素のピーク帰属は図中に示した。未処理試料(A)ではピークの線巾は比較的狭く、フェニル基全ての炭素のピークが現れている。未処理試料である(A)に対し(B)、(C)はピークが広巾化し、芳香環に由来するピークの裾が広がり、純粋な構造とは異なると考えられる成分を観測することができる。Fig.2に液体¹³C-NMRスペクトルを示した。(A)ではほぼ純粋なポリフェニレンエーテルのピークしか観測されない。これに対して(B)、(C)には約31、125、147、152ppmに新しいピークが観測される。

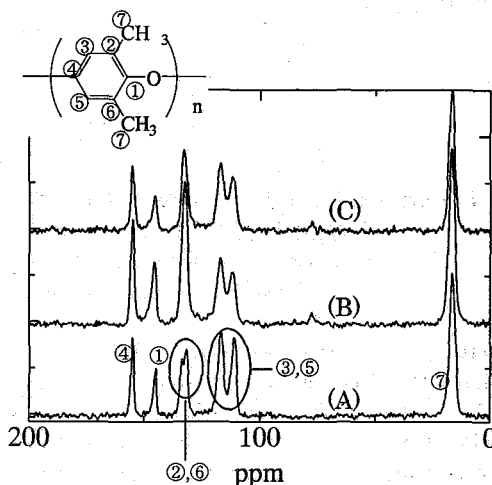


Fig.1 ポリフェニレンエーテルの固体¹³C-NMR スペクトル

31ppmのピーク以外は固体NMRスペクトルの裾の成分に相当する部分である。溶媒に不溶の成分であることを考慮すると、フェニル基部分の新しいピークは架橋点に対応した構造を反映していると考えられる。

熱処理により架橋が進行すると、熔融状態においても運動性の変化が観測されるはずである。そこで、300℃における¹HパルスNMRより求めた緩和時間の変化を測定した。¹HパルスNMRにより測定した結果をFig.3に示す。解析の結果、硬い成分と軟い成分が観測された。軟い成分はあまり変化が見られないものの、硬い成分はわずかであるが時間とともに運動性の低下が見られた。この硬い成分の運動性の低下は、熱による架橋反応が生じ、ポリフェニレンエーテルの硬い成分の運動性を低下させていると考えられる。溶液NMRの結果では架橋と考えられるピークの強度は非常に低く、架橋点自身の数が多くないことを考慮すると、この運動性の低下は妥当なものと考えられる。より詳細な解析結果を報告する予定である。

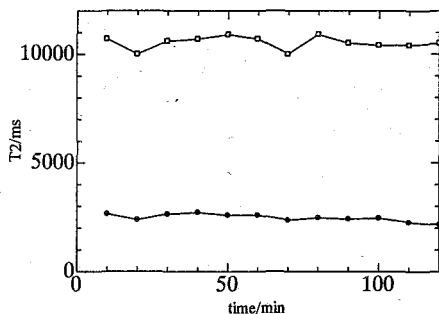


Fig.3 熱処理によるポリフェニレンエーテルの運動性の変化

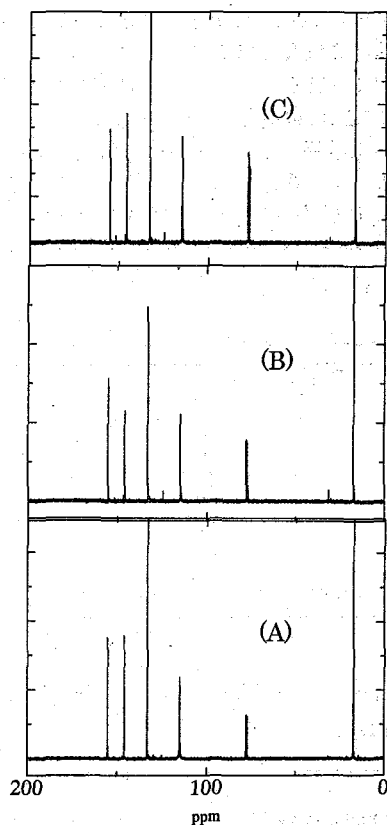


Fig.2 熱処理によるポリフェニレンエーテルの液体¹³C-NMR スペクトル

(東工大院理工・高分子セ) ○大橋淳史・山根祐治・黒木重樹・安藤勲

Properties of the Highly Oriented PBLG with Channel of a Micro Order by Solid State NMR

Atsushi OHASHI, Yuji YAMANE, Shigeki KUROKI and Isao ANDO

Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology,
International Research Center of Macromolecular Science

Abstract: Poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG) gels with long channels are prepared by ethylenediamine as cross-linker in 1,4-dioxane in the presence of the strong magnetic field of an NMR magnet with the strength of 10.5 T. These gels have long channels with mode diameter of ca.70 μm , which are formed by phase separation between cross-linked PBLGs and solvent. Moreover, these gels have a structural color. The structural color is a color which appears according to special structure. On the other hand, poly(N-hydroxyethyl L-glutamine) (PHEG) hydrogels have no structural colors are prepared by aminolysis of highly-oriented PBLG gels with 2-aminoethanol. Then, by ^{13}C CP/MAS NMR method, we will discuss the structures of polymers are different between PBLG and PHEG for the reason of with and without a structural color.

【緒言】

poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG)は、ジオキサンなどの良溶媒中でリオトロピック液晶を形成し、PBLG液晶は磁場及び電場中で PBLG 鎖が高配向することが知られている。この特徴を用いて、我々は高磁場中で PBLG 同士を化学的に架橋した、高配向高分子ゲルを調整した。このゲルは、nm スケールの間隔で PBLG 鎖が配向し、さらに μm スケールのチャンネルが発現することを既に報告している¹⁾。最近、この化学架橋 PBLG ゲルは構造色を発現することが明らかとなった。しかしながら、どのような構造によって、構造色が得られているのか明らかになっていない。そこで、本研究では、これらの channel を有するゲルのより詳細な構造検討を行うことを計画した。

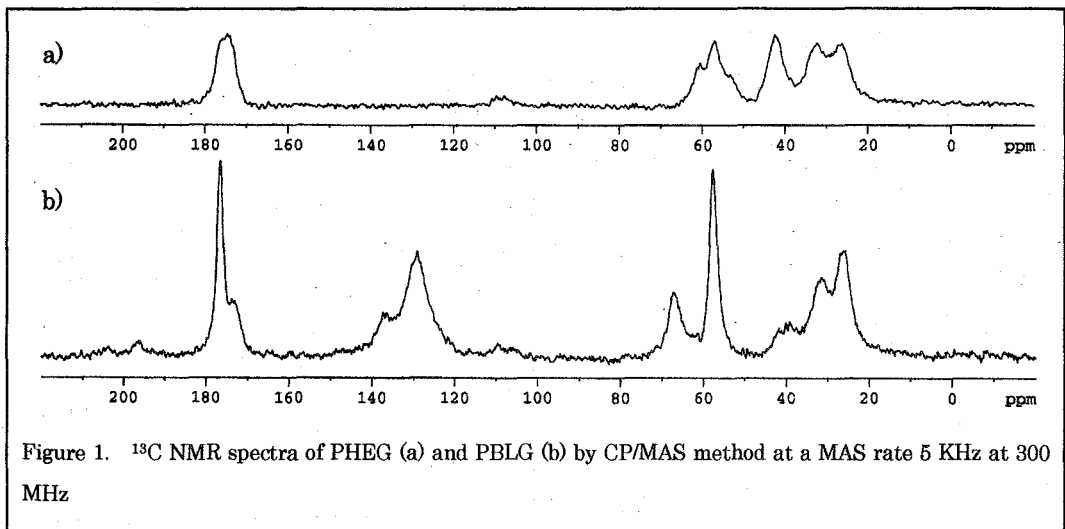


Figure 1. ^{13}C NMR spectra of PHEG (a) and PBLG (b) by CP/MAS method at a MAS rate 5 KHz at 300 MHz

Channel Cavity / PBLG Gel / Phase Separation / Solid State CP/MAS NMR Method

おおはしあつし、やまねゆうじ、くろきしげき、あんどういさお

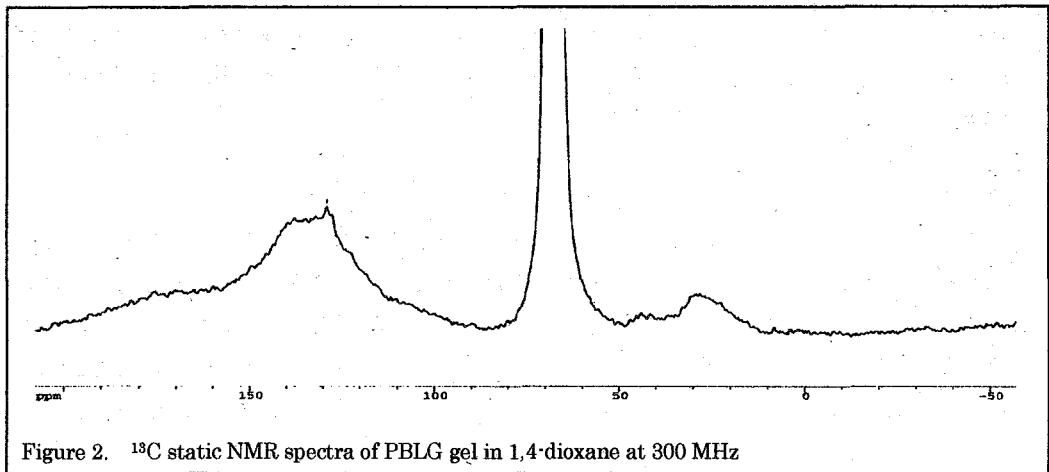
【実験】

具体的には、構造色の発現機構を解明する対照実験として、化学架橋したPBLGのベンジル基をヒドロキシル基に置換した、poly(*N*-hydroxyethyl L-glutamine) (PHEG)ハイドロゲルを調整した。このPHEGと様々な調製条件下で調製したchannelを有するPBLGのキャラクタリゼーションを高磁場固体NMR法により行った。最初に、PBLGとPHEGのゲルを減圧乾燥によって乾固させ、固体CP/MAS NMR測定を行った。測定には、Bruker社製分

Table 1. ^{13}C NMR chemical shift of PHEG and PBLG in the solid state and in liquid crystalline state in 1,4-dioxane.

sample	^{13}C NMR Chemical Shift / ppm		
	C=O(amide)	C=O(ester)	Ca
PHEG	176.7	172.7	57.3
PBLG	176.8	172.4	57.3

光器 Advance 300 に 4 mm MAS プローブを用い、 ^{13}C NMR スペクトルによって高配向高分子ゲルの測定を行った。測定条件は、それぞれ CP/MAS 法で、MAS 回転 5 KHz、繰り返し時間 5 sec でスペクトルを測定した (Figure 1)。これらのスペクトルは、Table 1. に示すように帰属することができた。次に、PBLG ゲルを static ^{13}C NMR 法で測定した (Figure 2)。



【結果・考察】

ベンジル基をアルコール基に置換した PHEG では、構造色が発現しないことが明らかとなった。また、ゲルの膨潤度も PBLG に対して PHEG が大きく膨潤していることから、構造色の発現要因である規則構造は、PHEG になることにより崩れて、構造色を発現しなくなったと考えられる。構造色が channel に由来するものであった場合、発現は光の入射方向に対して垂直になるはずである。しかしながら、今回観測されている発光は、光の入射方向の 45° 程度であることから、PBLG に channel 以外にも何らかの規則構造が存在することを示唆している。固体 NMR 法によって、それらの規則構造などの物性について報告する予定である。

1) Y.Yamane, M.Kanekiyo, S.Koizumi, C.Zhao, S.Kuroki and I.Ando *J.Appl.Polym.Sci.*, **92**, 1053-1060(2004).

2P131

主鎖中に芳香環を有する芳香族ポリアミドの結晶化に関する研究
(群馬大工) ○志田裕幸、寺尾綱哲、五十嵐昭、上原宏樹、山延健、甲本忠史

The study of crystallization behavior of aromatic polyamide.

○Shida Hiroyuki, Terao Motoaki, Igrasi Akira

, Uehara Hiroki, Yamanobe Takeshi, Komoto Tadashi

(Department of Chemistry, Gunma University)

Poly(*m*-xylylen adipamide) (MXD6) is the polyamide which contains phenylene ring in the main chain. Rigid phenyl group improve the thermal and mechanical properties compared with aliphatic polyamide such as nylon6. Polarized optical microscope, ^1H -pulse NMR, solid state high resolution ^{13}C -NMR and TEM observation were carried out in order to investigate crystallization behavior of MXD6. The result indicate that the rate of crystallization is fastest at 170°C , the dynamics and the change of conformation and crystalline structure are discussed based on the relaxation times and chemical shift of solid state ^{13}C -NMR.

【序論】

ポリ(*m*-キシリレンアジパミド)(MXD6)は剛直なベンゼン環によってナイロン 66、もしくはナイロン 6 に比べて熱的性質や機械的性質に優れており、繊維やフィルムに用いられている。このポリアミドは立体障害の大きい *m*-置換ベンゼン環を持つにもかかわらず結晶性である。本研究では種々の温度におけるポリ(*m*-キシリレンアジパミド)(MXD6)に対し ^1H -パルス NMR、および固体高分解能 ^{13}C -NMR 等を用いてその結晶化について検討した。

【実験】

偏光顕微鏡観察

オリパス製 BX50

METTLER TOLEDO 社製 FP900 サーモシステム

測定温度 $160-210^\circ\text{C}$

^1H -パルス NMR

JEOL JNM Mu25

測定温度 $160-240^\circ\text{C}$

固体高分解能 NMR

BRUKER AVANCE DSX300WB

キーワード：芳香族ポリアミド 結晶化 ^1H -パルス NMR 固体高分解能 ^{13}C -NMR

しだひろゆき、てらおもとあき、いがらしあきら、うへはらひろき、やまのべたけし、こうもとただし

【結果・考察】

図1に280℃で融解後170℃で結晶化した偏光顕微鏡写真を示した。時間とともに球晶が成長し、約8分で球晶の成長が止まることがわかる。これよりもとめた球晶成長速度は170℃で最大値をとることがわかった。DSC測定の結果から180℃付近に結晶化ピークがあり、偏光顕微鏡観察と一致した。

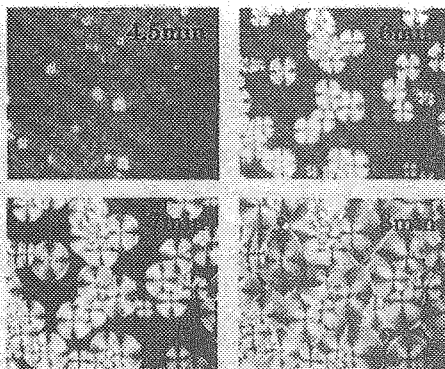


Fig.1 Photographs of polarized microscope

図2に¹H-パルスNMRより求めたMXD6の170℃の結晶化時間に伴う、結晶、非晶、中

間相のT₂と成分比の変化を示した。図2(a)より結晶化時間が約5分までには結晶成分は急激に増加していることがわかる。偏光顕微鏡の結果においても8分で球晶成長が終了しており、NMRの結果と一致する。結晶化

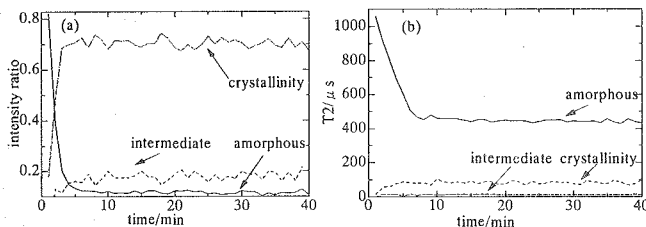


Fig.2 Time dependence of crystallinity, intermediate and amorphous phases of MXD6 on crystallization time, (a) fraction (b) T₂

速度が非常に速いために結晶成分の割合は0.7と非常に高くなっている。非晶の割合は5分以降さらに徐々に減少し、中間層が徐々に増加している。図2(b)より、非晶のT₂は約5分までの急激な減少の後に、徐々に減少していることがわかる。OM観察より球晶成長は約8分で終わることから、それ以降のT₂成分比の変化は二次結晶化によるものと考えられる。

図3にMXD6のCPMASスペクトルを示した。各ピークの帰属

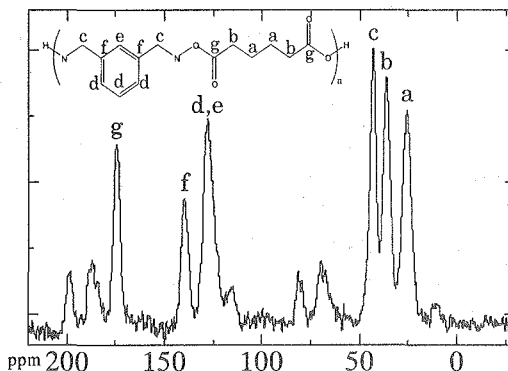


Fig.3 Solid state high resolution ¹³C-NMR spectrum of Poly(m-xylylen adipamide)

を図中に示した。フェニル基の水素に結合した2種類の炭素を除いて各炭素が別々のピークとして現れていることがわかる。結晶化温度が変化すると化学シフトが変化することが観察された。結晶、非晶、中間相の結晶化に伴う構造変化について報告する予定である。

Precise Structure Analysis of an Amorphous Material by Two-Dimensional Double-Quantum Solid-State NMR Spectroscopy

Junya SHIMADA,¹ Hironori KAJI,^{1,2} Fumitaka HORII¹ (¹Institute for Chemical Research, Kyoto University, ²PRESTO, JST)

The molecular packing analysis of amorphous poly(ethylene terephthalate) (PET) has been carried out by two-dimensional double-quantum (2D DOQSY) solid-state NMR spectroscopy. The experimental 2D DOQSY spectrum of a phenylene-ring quaternary carbon ¹³C-labeled amorphous PET (¹³CQ-aPET) sample with a double quantum excitation time of 0.5 ms showed elliptical ridges characteristic of π -stacking with in-plane orientation of $\theta = 0$ and 35° . The two contributions corresponding to $\theta = 0$ and 35° are considered to be related to the trans and gauche conformations of ethylene-glycol O-CH₂-CH₂-O segments.

[緒言] 非晶性材料の構造は、回折法等では精密に解析することが極めて困難である。特に、分子間パッキングの解析は赤外吸収等でも難しく、固体 NMR での解析法を確立することは極めて重要かつチャレンジングな問題である。我々がこれまでコンホメーション解析に用いてきた二次元二量子 (2D DOQSY) 固体 NMR 法は、双極子相互作用を利用し、同位体ラベルした 2 つの原子核間の配向相関を観測するものであり、複雑な構造を持つ非晶状態の分子間パッキングに対してもその相関を観測することが可能である。本研究では、非晶ポリエチレンテレフタレート (aPET) の分子間パッキング構造を 2D DOQSY 法により測定した。

[実験] 1 位のフェニレン環四級炭素が ¹³C 同位体ラベルされたジメチルテレフタル酸とエチレングリコールのエステル交換反応により ¹³C 同位体ラベル PET 試料 (¹³CQ-PET) を合成した。得られた試料を窒素雰囲気下、280 °C で 10 分間溶解し、溶解状態から急冷することで、非晶ラベル試料 (¹³CQ-aPET) を得た。固体 NMR 測定は Chemagnetics CMX-400 分光計により 9.4 T の静磁場で行い、実測スペクトルとシミュレーションスペクトルとを比較することで分子間パッキング構造の解析を行った。

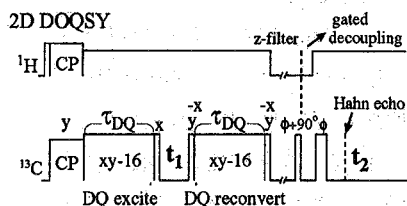


Fig. 1. Pulse sequence of 2D DOQSY experiment.

[結果・考察] 図 1 に 2D DOQSY 法のパルス系列を示す。この手法では、二量子励起時間 τ_{DQ} の間に励起した二量子コヒーレンスを t_1 の間、時間発展させ、一量子にリコンバートした後、FID を観測する。ここでは MAS を行っていないため、同位体ラベル部位の化学シフト異方性(CSA) とその二量子の相関を観測している。 $\tau_{DQ} = 0.5$ ms では、およそ 4 Å 以内の局所的な分子間パッキングの相関を観測することが可能である。図 2(a)に $\tau_{DQ} = 0.5$ ms の条件下で得られた実測スペ

キーワード: 非晶材料, ポリエチレンテレフタレート, 固体 NMR, 二次元二量子 NMR

著者ふりがな: しまだじゅんや, かじひろのり, ほりいふみたか

クトル示す。以前に我々が報告した $\tau_{DQ} = 2$ ms の場合[1]では、非晶 PET におけるテレフタル残基の分子間パッキング構造は主に π スタッキング構造をとり、結合軸方向 θ が約 35° ずれた位置を中心とし、標準偏差 $\delta_\theta = 25^\circ$ で分布をしていると仮定したシミュレーションスペクトルにより実測スペクトルがうまく再現されたが、図2(b)に示した、 $\theta = 35^\circ$ の配向に特徴的な楕円形は確認されなかった。今回の測定では、 $\theta = 35^\circ$ の配向に特徴的な楕円形が明確に確認された。現状における best-fit シミュレーションスペクトルを図 2(c) および (d) に示す。これらのシミュレーションにおいては、 $\theta = 0^\circ$ と $\theta = 30^\circ$ 以上に存在確率が現れている。一方、非晶 PET のエチレングリコール部分の O-CH₂-CH₂-O コンホメーションは、trans : gauche = 12-14 : 88-86 であることが明らかにされている [2]。 θ に関する2つの成分は、これらエチレングリコール部分のコンホメーションに依存していると現在推測している。すなわち、gauche コンホメーションの場合、立体障害のために $\theta = 0^\circ$ の状態がとりにくいものと考えられる。発表当日は、より詳細なシミュレーション解析の結果を示し、非晶 PET の局所構造について検討を行う予定である。

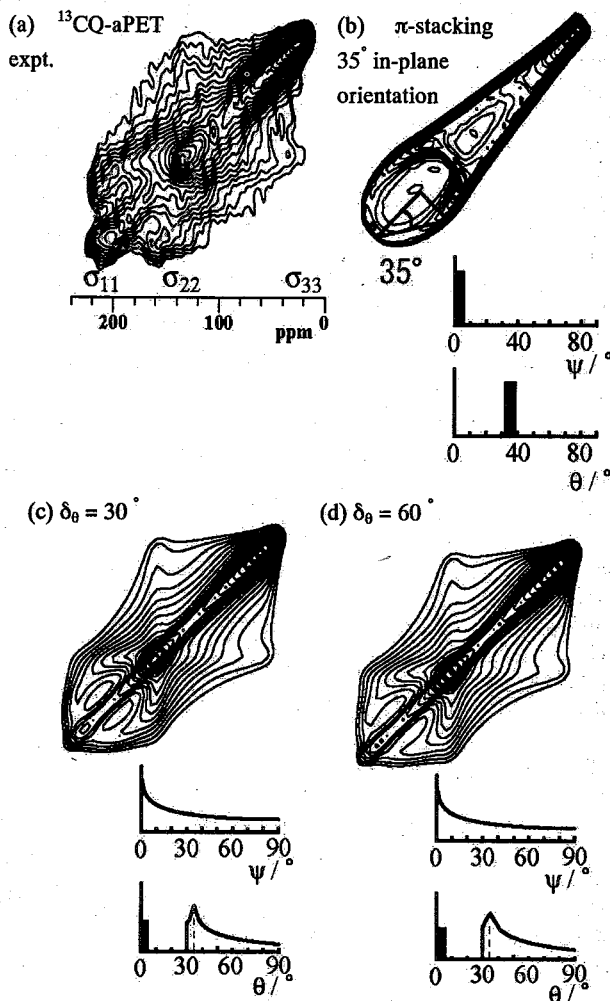


Fig. 2. (a) Experimental and (b-d) simulated sheared 2D DOQSY spectra of ^{13}CQ -aPET. The parameters of ψ and θ used for the simulations are shown for each spectrum.

[1] Kaji, H. *Polym. Prepr. Jpn.*, **2003**, Vol.52, No.1, 58.

[2](a) Schmidt-Rohr, K.; Hu, W.; Zumdulyadis, N. *Science*, **1998**, 280, 714. (b) Kaji, H.; Schmidt-Rohr, K., *Macromolecules*, **2002**, 35, 7993.

二次元二量子固体 NMR 法による
有機 EL 用正孔輸送材料の分子間パッキング解析

¹京大化研 ²科学技術振興機構さきがけ ○塚本 直樹¹・梶 弘典^{1,2}・堀井 文敬¹

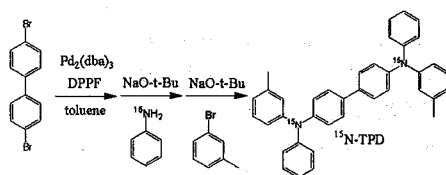
Molecular Packing Analysis of a Hole-Transport Material for Organic EL Devices by Two-Dimensional Double-Quantum Solid-State NMR Spectroscopy

Naoki TSUKAMOTO¹, Hironori KAJI^{1,2}, Fumitaka HORII¹ (¹Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, JAPAN, ²PRESTO, JST, 4-1-8 Honcho Kawaguchi, Saitama, JAPAN)

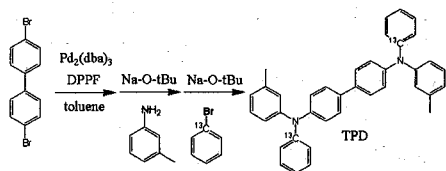
Molecular packing of amorphous *N,N'*-diphenyl-*N,N'*-di(*m*-tolyl)benzidine (TPD) has been investigated by solid-state ¹⁵N and ¹³C NMR spectroscopy. For ¹⁵N-labeled amorphous TPD, ¹⁵N two-dimensional double quantum spectroscopy (2D DOQSY) can be obtained. However, the one-dimensional chemical shift anisotropy (1D CSA) spectrum is very narrow and thus, the molecular packing cannot be analyzed in detail. Therefore, we synthesized ¹³C-labeled TPD. For phenyl-ring quaternary carbon ¹³C-labeled amorphous TPD (¹³C-TPD), the ¹³C-¹⁴N dipolar splitting of 1.45 ± 0.1 kHz is obtained for the 1D ¹³C CSA spectrum and the ¹³C-¹⁴N distance is determined to be 0.144 ± 0.004 nm. A ¹³C 2D DOQSY spectrum of the amorphous ¹³C-TPD, from which the intermolecular packing can be precisely analyzed, is successfully obtained. The experimental spectrum is different from the simulation spectrum for random intermolecular orientational correlations. The detailed analysis is now in progress.

【序】有機 EL は、フラットディスプレイや面発光照明など様々な応用に注目されている。有機 EL 材料の構造、ダイナミクスと特性には相関関係があると考えられ、それらを明らかにすることにより、さらに性能のよい材料の開発、設計が期待される。しかし、これらの素子において非晶状態の材料が用いられるため、その詳細な構造は明確になっていない。本研究では、非晶状態における精密構造解析を目的として、特定部位を ¹⁵N あるいは ¹³C 同位体ラベルした *N,N'*-diphenyl-*N,N'*-di(*m*-tolyl)benzidine (TPD) の二次元二量子固体 NMR (2D DOQSY) 測定を行った。この方法では、ラベルした核の化学シフト異方性 (CSA) とその二量子の相関を観測することにより、ラベル核間の配向相関を解明できる。

【実験】トルエンをナトリウムベンゾフェノンケチルとともに、二日間加熱還流した後、蒸留した。それを用いてスキーム 1 にしたがって、ジプロモビフェニルと ¹⁵N アニリン、プロモトルエンから ¹⁵N を同位体ラベルした TPD (¹⁵N-TPD) を合成した。また、同様にスキーム 2 にしたがって、ジプロモビフェニルとトルイジン、¹³C プロモベンゼンからフェニル基の四級炭素を ¹³C に同位体ラベルした TPD (¹³C-TPD) を合成した。これらをトルエン、次にヘキサンを展開溶媒としてショートカラムに通した後、二日間減圧乾燥して精製した。これらの試料を 200°C に加熱し、溶融状態から急冷することにより非晶 TPD 試料を作製し、減圧乾燥した。固体 ¹⁵N、¹³C NMR 測定は Chemagnetics CMX-400 分光計により 9.4 T の静磁場下にて行った。



Scheme 1. Synthesis of ¹⁵N-TPD



Scheme 2. Synthesis of ¹³C-TPD

$\tau_{DQ} = 15$ ms

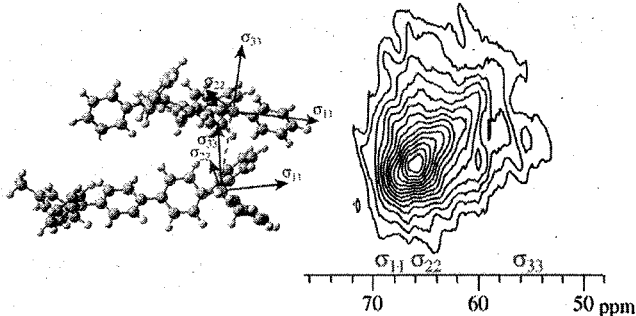


Figure 1. Sheared ¹⁵N 2D DOQSY spectrum of amorphous ¹⁵N-TPD.

キーワード: 有機 EL / 正孔輸送材料 / TPD / 固体 NMR / 二次元二量子 NMR

つかもと なおき かじ ひろのり ほりい ふみたか

【結果および考察】 図1に、非晶¹⁵N-TPDの¹⁵N 2D DOQSY スペクトルを示す。¹⁵N-¹⁵N 双極子カップリングが弱いにもかかわらず¹⁵N 2D DOQSY スペクトルを得ることができた。しかし、¹⁵N 核の CSA の広がりには 15ppm と狭い。このことは、¹⁵N 核まわりの電子による遮蔽が球対称に近いことを示している。また、この CSA 幅からコンホメーション解析を行うことができる[1]。一方、2D DOQSY スペクトルの解析に対して、CSA 幅が狭いことは角度分解能が十分でないことを意味する。

そこで、十分な角度分解能を得るため、スキーム2で合成した非晶¹³C-TPDの測定を行った。図2(a)に実測の一次元 CSA スペクトルを示す。この実測スペクトルでは σ_{11} が3段に分裂している。この分裂は、¹³C-¹⁴N の双極子カップリングによるものである。図2(b)に、¹³C-¹⁴N 双極子カップリングを考慮した最適シミュレーション CSA スペクトルを示す。この最適スペクトルより¹³C-¹⁴N の双極子カップリングが 1.45 ± 0.1 kHzと得られ、その結果、¹³C-¹⁴N の結合距離は 1.44 ± 0.04 Åと決定された。これは量子化学計算による結果(1.42 Å)とほぼ一致している。図2(c)に示した¹⁴N 核を考慮しない場合のシミュレーションスペクトルでは実測スペクトルと明確に異なってしまうことから、下記の¹³C 2D DOQSY スペクトルに対しても、¹³C-¹⁴N の双極子カップリングを考慮したシミュレーションを行った。なお、この系では化学シフトテンソルの主値、 σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} を明確に決定でき、精密構造解析が可能である。

図3(a)に¹³C-TPDの実測2D DOQSY スペクトルを、図3(b)には完全に無秩序な状態を仮定した場合のシミュレーションスペクトルを示す。このスペクトル $S_{2D}(\omega_1, \omega_2)$ は、図2(b)のスペクトルを $S(\omega)$ とした場合、

$$S_{2D}(\omega_1, \omega_2) = S(\omega_1) \cdot S(\omega_2)$$

となることを用いて計算した。実測とシミュレーションスペクトルを比較すると、中心の(σ_{22} , σ_{22})から対角線方向(σ_{33} , σ_{33})にかけて、実測では、なだらかに下がっているのに対し、シミュレーションでは中心から急激に下がり、100 ppmあたりから緩やかになっている。この相違などから非晶 TPD が局所的には完全に無秩序ではないことがわかる。発表当日には、このスペクトルに対する詳細な解析結果を示すとともにピフェニルの1位に¹³Cを同位体ラベルした TPD に対する結果も報告する予定である。

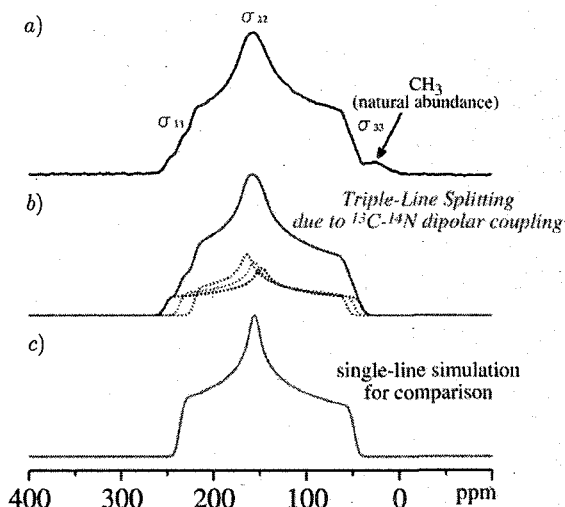


Figure 2. Experimental (a) and best-fit simulated (b) one-dimensional CSA spectra of amorphous ¹³C-TPD. A simulated spectrum without considering ¹³C-¹⁴N dipolar coupling is also down in (c)

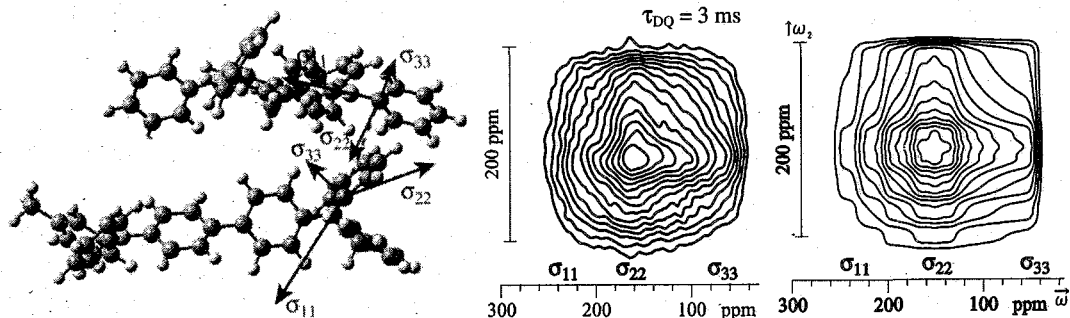


Figure 3. Experimental (a) and simulated (b) sheared ¹³C 2D DOQSY spectra of amorphous ¹³C-TPD.

Completely random intermolecular correlations are assumed in the simulation (b).

[1] 山田知典、梶弘典、塚本直樹、日下康成、堀井文敬、第43回NMR討論会、1P136.

$^1\text{H}\rightarrow^{19}\text{F}$ CP ダイナミクス解析による
含フッ素全芳香族ポリイミドの分子鎖パッキングの評価

東工大院理工 ○相見敬太郎、安藤慎治

Analysis of inter-chain packing of fully aromatic polyimide using solid state $^1\text{H}\rightarrow^{19}\text{F}$ CP/MAS NMR

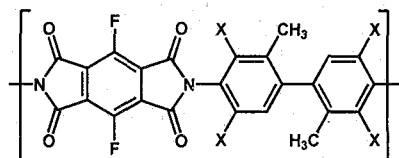
Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology

Keitaro Aimi and Shinji Ando

For investigating the variations in the intermolecular chain packing states in a rod-like fluorinated polyimide (PI: P2FDA/DMDB) films cured at $T_{\text{cure}} = 240, 300,$ and 350°C , the dipolar coupling constants between ^1H and ^{19}F nuclei (D_{HF}) were estimated from the transient oscillations observed in the variable contact time $^1\text{H}\rightarrow^{19}\text{F}$ CP curves. The values of D_{HF} decrease with increasing T_{cure} , indicating that the diamine moiety containing ^1H and the dianhydride moieties containing ^{19}F moved apart with elevating T_{cure} . No changes are observed between the solid-state $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$ CP/MAS NMR spectra for the films cured at 240 and 350°C , revealing that chain conformation did not change by curing at higher temperatures. In addition, the intensities of fluorescence and the refractive indices increase with elevating T_{cure} , suggesting that molecular aggregation became denser and charge transfer (CT) interactions became significant. These facts strongly suggest the formation of more ordered preferred layer packing of PI polymer chains at higher T_{cure} .

【緒言】 芳香族ポリイミド(PI)は、繰り返し単位の分子構造が酸無水物部分(電子受容体)とジアミン部分(電子供与体)からなるため、分子内及び分子間に電荷移動(CT)相互作用の存在が示唆されている。最終イミド化温度が高いほどCTに由来する蛍光スペクトルの強度が強くなることが知られており、これは分子鎖のコンホメーションあるいは凝集状態の変化に起因すると考えられている[1]。本研究では、最終イミド化温度の異なるPI試料における凝集構造の変化の解明を目指し、固体 $^1\text{H}\rightarrow^{19}\text{F}$ CP/MAS NMR法を用いて、CP曲線の解析から酸無水物部分にフッ素基を導入した含フッ素全芳香族ポリイミドにおけるH-F間の双極子カップリング定数を算出し、分子鎖間パッキングの評価を行った。

【実験】 試料には、最終イミド化温度(T_{cure}) $240, 300, 350^\circ\text{C}$ で作製したP2FDA/DMDBフィルム(I) (PI-240, PI-300, PI-350、膜厚 $29\sim 32\ \mu\text{m}$)及びジアミン(DMDB)部を部分重水素化したP2FDA/d-DMDBフィルム(II) (dPI-240, dPI-300, dPI-350、膜厚 $6.7\sim 7.7\ \mu\text{m}$)を用いた。固体 $^1\text{H}\rightarrow^{19}\text{F}$ CP/MAS NMR測定は、 68°C 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 $300.4\ \text{MHz}$ (JEOL EXデータシステム)、 ^1H 90° パルス幅 $3.0\ \mu\text{s}$ 及び ^{19}F 90° パルス幅 $2.4\ \mu\text{s}$ (sideband matching条件: $\omega_{1\text{H}} =$



- (I) X = H: P2FDA/DMDB
(II) X = D: P2FDA/d-DMDB

Scheme 1 Structure of polyimides.

$\omega_{1\text{F}} - \omega_{\text{r}} = 83\ \text{kHz}$)、積算回数 32 回、MAS回転数 $\omega_{\text{r}} = 16\ \text{kHz}$ の条件で行った。コンタクトタイム(t_{CP})可変 $^1\text{H}\rightarrow^{19}\text{F}$ CP測定では t_{CP} を 0 から $10\ \text{ms}$ まで変化させて測定を行った。化学シフト基準は $\text{C}_6\text{F}_6(-163.6\ \text{ppm})$ を外部基準に用いた。

【結果と考察】 図1は T_{cure} の異なる3種のP2FDA/DMDBの励起蛍光スペクトルである。630 及び725 nm に2つの蛍光ピークが観測され、蛍光寿命の測定からそれぞれ局所励起(LE)及び電荷移動(CT)性のピークと帰属される[2]。LE性の蛍光強度は T_{cure} にほとんど依存しないのに対し、CT性ピークの強度は T_{cure} が高いほど増大している。一方、図2はPI-240とPI-350の ^{13}C CP/MASスペクトルである。ジアミン部のベンゼン環炭素核の化学シフトはPI主鎖コンホメーションの変化に敏感であるが[3,4]、両者

キーワード: ^{19}F CP/MAS NMR、CP ダイナミクス、芳香族ポリイミド、核間距離、分子間パッキング
あいみ けいたろう、あんどう しんじ

のスペクトルが完全に一致していることから、主鎖コンホメーションは変化していないと考えられる。これらのことから、 T_{cure} の上昇に伴うCT性の蛍光強度の増大は、分子鎖の凝集が密になり分子間CT性が高まったことに起因すると考えられる。

図3に $dPI-350$ (実線) 及び結晶性モデル化合物 (P2FDA/*m*-toluidine(T), 点線) の $^1H \rightarrow ^{19}F$ CP MAS NMR スペクトルを示す。 $dPI-350$ は -116.5 ppm に幅広なピーク(半値幅:4005 Hz)が観測されたのに対して P2FDA/*m*-T では -114.8 ppm に鋭いピーク(半値幅:572 Hz)が観測された。これらのピークの半値幅は MAS 回転数や 1H デカップリングの有無、及び PI-350 との比較において変化が見られなかったことから、 $dPI-350$ の広幅の原因は、パッキングの秩序性が低く、化学シフトに分布があるためと考えられる。図4に T_{cure} の異なる3種の dPI フィルムの $^1H \rightarrow ^{19}F$ CP 曲線 (0.5 ms までの拡大) を示す。いずれの試料についても CP 曲線の初期段階に磁化交換によるオシレーションが観測された。P2FDA/DMDB は非晶性であるがそのガラス転移温度は 200°C 以上であるため、測定温度 (68°C) では分子鎖のセグメンタルな運動はほぼ凍結していると考えられる。従って、信号強度 $M(t)$ は、双極子相互作用が強くオシレーションを示す最近接の 1H からの寄与 $S_{\text{osc}}(t)$ と、双極子相互作用が弱い離れた 1H からの寄与 $S_{\text{net}}(t)$ との和 ($M(t) = xS_{\text{osc}}(t) + (1-x)S_{\text{net}}(t)$) と仮定した。オシレーション挙動を含む CP 曲線の解析は、Bessel 関数による近似を用いた理論式によりフィッティングを行った[5]。算出した CP パラメータを表1に示す。オシレーションの減衰が速い (T_{damp} が短い) が、これは主に秩序性が低く H-F 距離に分布があることや同核間の双極子相互作用に起因すると考えられる。 T_{cure} が高いほど D_{HF} の値の減少がみられ、H-F 間の双極子相互作用が弱まっていることを示す。 ^{13}C CP/MAS スペクトルから PI 主鎖のコンホメーションは変化していないと考えられるため、 D_{HF} の変化は分子間での酸無水物とジアミン間距離の変化に対応する。従って、 D_{HF} の増加は酸無水物部分とジアミン部分が遠ざかることを意味し、 T_{cure} が高いほど酸無水物同士あるいはジアミン同士が重なる「PLP スタッキング」を形成しやすく、これにより分子間 CT が増大すると考えられる。

Tab.1 Estimated CP parameters obtained by fittings of CP curves

Sample	$D_{\text{HF}} / \text{Hz}$	$T_{1\rho}^* / \text{ms}$	$T_{\text{CP}}^* / \text{ms}$	$T_{\text{damp}} / \text{ms}$	x
$dPI-240$	6960 ± 223	50	0.93	0.27	0.67
$dPI-300$	6577 ± 240	43	0.78	0.28	0.73
$dPI-350$	6187 ± 292	30	0.76	0.27	0.71

References

- 1) E.D. Wachsman and C.W. Frank. *Polymer*, 1988;29:1191.
- 2) H. Sekino, Y. Urano, M. Asano, Y. Kaizu, S. Ando. *Polym. Prep. Japan*, 2004;53:4670.
- 3) K. Aimi, A. Yamane, S. Ando. *J. Mol. Struc.* 2001;602-603:417.
- 4) K. Aimi, T. Fujiwara, S. Ando. *J. Mol. Struc.* 2001;602-603:405.
- 5) C.A. Fyfe, D.H. Brouwer, A.R. Lewis, J.M. Chézeau. *J. Am. Chem. Soc.* 2001;123:6882.

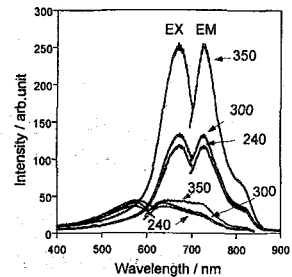


Fig.1 Fluorescence excitation and emission spectra of PI-240, PI-300 and PI-350 at excitation/ emission wavelengths of 565 /630, nm and 670/725 nm.

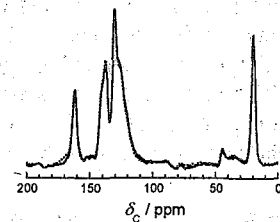


Fig.2 $^1H \rightarrow ^{13}C$ CP/MAS NMR spectra of PI-240 (dotted line) and PI-350 (solid line).

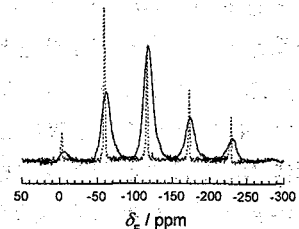


Fig.3 $^1H \rightarrow ^{19}F$ CP/MAS NMR spectra of $dPI-350$ (solid line) and P2FDA/*m*-T (dotted line). Contact time was 2 ms.

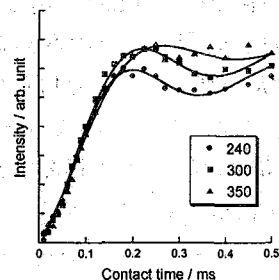


Fig.4 Initial build-up of $^1H \rightarrow ^{19}F$ CP curves. The fitting curves are also incorporated with solid lines.

Hydrogen Bonding Structure and Stability of α -Chitin Studied by Solid-State NMR and FT-IR Spectroscopy

T.Kameda¹, M.Miyazawa¹, I.Maeda², H.Ono² and M.Yoshida²

1) National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, 305-8634, Japan

2) National Food Research Institute, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

The structure and stability of hydrogen bonds in the α -form of chitin were investigated by variable-temperature ^{13}C solid-state NMR and FT-IR spectroscopy. A careful examination of the C=O carbon peak in the ^{13}C CP/MAS NMR spectrum showed the presence of a shoulder peak on the side of the main peak. The peak at 175.8 ppm was assigned to "double hydrogen bonds", whereas the peak at 173.5 ppm was assigned to single hydrogen bonds. A change in the chemical shift between the peaks at 175.8 and 173.5 ppm, which originates from structural exchange of the two manners of hydrogen bonding, was observed at 65°C and above. Moreover, the results of FT-IR measurements were remarkably consistent with the results of the solid-state NMR.

【緒言】 キチンの α 型結晶構造については、X 線回折、IR、熱力学的手法などによって古くから研究されており、水素結合構造に関する知見も多く得られている。Minke と Blackwell¹⁾ によって提案された α 型キチンの水素結合構造モデルでは、カルボニル基はアミド NH 基のみと分子間水素結合するパターンと、アミド NH 基との分子間水素結合と同時に、C(6)OH 水酸基との分子内水素結合を形成しているパターンの 2 種類の水素結合が 1:1 で存在している (Fig.1)。また Kim ら²⁾ は、アミド基の β 緩和が 143°C で生じると報告している。一方、固体 NMR によるキチンの構造研究例も幾つかあるが、水素結合構造を解析する観点で使用された例はない。固体 NMR 化学シフトは水素結合構造を敏感に反映することから³⁾、水素結合構造に関する新たな知見が得られる可能性がある。そこで本研究では、 α 型キチンの水素結合構造を固体 NMR 化学シフトから解析することを試みた。また、固体 NMR の結果を支持する FT-IR スペクトルも観測されたので、その結果についても報告する。

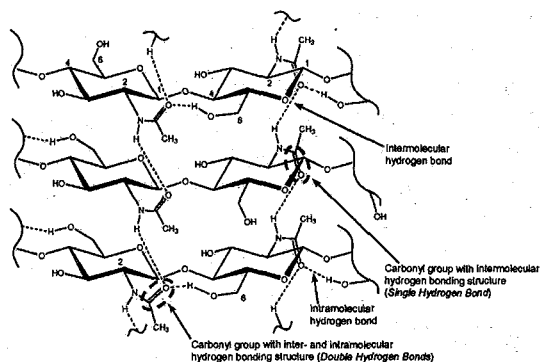


Fig.1 Diagram of the hydrogen bonding structure of the *ac* projection for α -chitin. There are two types of C=O hydrogen-bonding structure: exclusively intermolecular hydrogen bonding (*Single Hydrogen Bond*), and a combination of intermolecular and intramolecular hydrogen bonding (*Double Hydrogen Bonds*).

固体 NMR、 α キチン、水素結合構造、ダイナミクス

かめだ つねのり、みやざわ みつひろ、まえだ いくこ、おの ひろし、よしだ みつる

【実験】試料となるキチンはセミの抜け殻から抽出した。セミの抜け殻を 100°C 1N 塩酸水溶液中で 20 分間還流してカテコールを除き、その後、80°C の 1N 水酸化ナトリウム水溶液中で 24 時間と 0.4%炭酸ナトリウム水溶液中で 20 時間還流してタンパク質成分を除いた。比較のために、市販のキチン（東京化成、および和光純薬）も用いた。固体 NMR は Chemagnetics CMX300(森林総研、つくば)、および Bruker AVANCE800(食総研、つくば)を用いた。また、FT-IR は Jasco Herschel-350 を用いた。

【結果および考察】セミの抜け殻から抽出したキチンは、市販のキチンと同様に α 型であることが固体 ^{13}C CP/MAS NMR の化学シフト値からわかった。CP/MAS スペクトルの C=O、C(6)、および C(2) 炭素領域の拡大を Fig.2 に示す。図では、45~95°C で測定したスペクトル(実線)の各々に、45°C で測定したスペクトル(点線)を重ねて表示した。45°C と 55°C では目立った違いは観測されず、C=O 炭素は非対称なピークとなっている。C=O ピークを分離した結果、175.8ppm と 173.5ppm にピークトップを有する 2 成分がほぼ 2:3 の割合で重なっていることがわかった。2:3 の成分比は、 $T_1\rho$ 緩和時間の 5 倍以上を繰り返し時間に設定して測定した Direct Polarization スペクトルにおいても同じ結果が得られた。また、このような分裂挙動は市販の α 型キチン試料でも同様に観測された。Tanner ら⁴⁾ は、 β 型キチンも C=O 炭素ピークの分裂が観測され、その分裂は隣接するアミド窒素の ^{14}N 四極子相互作用に起因すると説明している。一方、我々が観測した α 型キチンの C=O 炭素ピークの分裂は、分裂幅の大きさ、および分裂幅の磁場強度依存性の検討から ^{14}N 四極子相互作用によるものではなく、異なる 2 種類の構造が存在し、それらが異なった化学シフト値を与えたことに起因すると考えた。さらに、分子軌道計算から、C=O 基が形成する 2 つの水素結合パターンが 173.5ppm と 175.8ppm にピークを与えたと解釈した。また、65°C 以上の温度域では、化学シフト交換と考えられる C=O 炭素ピークの線形変化と同時に C(6)ピークの線幅減少が観測された。このことは、 α 型キチンの水素結合は、65°C 付近から C(6)OH 側鎖の回転運動が盛んになり、2 つの水素結合パターンの間で交換が起ることを示唆している。また、FT-IR スペクトルでは、C=O 伸縮振動に帰属できる吸収帯において、分子内水素結合が関与している 1632cm^{-1} の吸収強度が温度の上昇とともに減少し、NMR の解釈を支持するものであった。

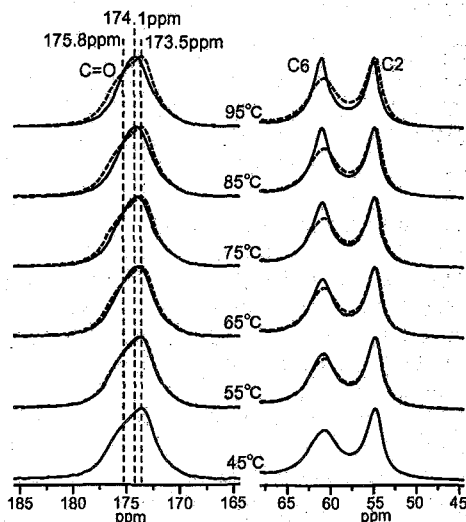


Fig.2 The expansions of the C=O and C(6)/C(2) regions of 75.4 MHz ^{13}C CP/MAS spectra at various temperatures. The spectra for α -chitin at 45 °C are shown by dotted lines. The solid lines show the spectra observed at the indicated temperatures.

【参考文献】 [1] R.Minke & J.Blackwell, *J.Mol.Biol.*, **120** (1978) 167. [2] S.S.Kim et al., *Polymer* **35**(1994)3212. [3] T.Kameda et al., *J.Biomol.NMR* (2004) **29**, 281. [4] S.F.Tanner et al., *Macromolecules* **23** (1990) 3576.

¹京大化研、²科学技術振興機構さきがけ
○山田知典¹、梶弘典^{1,2}、塚本直樹¹、日下康成¹、堀井文敬¹

Conformation and Electron Structure Analysis of a Hole-Transport Material in Organic EL Devices by Solid-State ^{13}C , ^{15}N NMR and Quantum Chemical Calculations

¹Institute for Chemical Research, Kyoto University, ²PRESTO, JST
Tomonori YAMADA,¹ Hironori KAJI,^{1,2} Naoki TSUKAMOTO,¹ Yasunari KUSAKA,¹ Fumitaka HORII¹

N,N'-diphenyl-*N,N'*-di(*m*-tolyl)benzidine (TPD) is widely used as a hole transport material in organic light emitting devices. We have analyzed the conformations and the electron structures of neutral, cationic and dicationic TPD utilizing solid-state ^{15}N , ^{13}C NMR and quantum chemical calculations. The ^{15}N NMR measurements revealed that the ^{15}N chemical shift anisotropy (CSA) spectrum for amorphous TPD is as narrow as $\sigma_{11} - \sigma_{33} = 15$ ppm, which agrees well with the result of the DFT calculations. Since $\sigma_{11} - \sigma_{33}$ of ^{15}N CSA largely depends on its conformation, we can conclude that the DFT-optimized structure is in good agreement with a structure of amorphous TPD by comparing the results of the ^{15}N CSA measurements and the DFT calculations. Although no ^{15}N NMR signals could be observed for cationic TPD due to the dipolar interaction between the nuclear and electron spins, we were able to observe the signal for dicationic TPD. The isotropic chemical shift was 104 ppm downfield shifted compared to the neutral amorphous TPD and a significantly wide CSA spectrum with $\sigma_{11} - \sigma_{33} = 181$ ppm was obtained. We can conclude that the electron shielding around the nitrogen is almost isotropic for neutral TPD whereas it turns to be anisotropic for dication.

[緒言] 有機 EL 素子に用いられる正孔輸送材料の構造や電子状態は、その正孔輸送特性と密接な相関をもっていると考えられる。したがって、高い正孔輸送特性の発現原因を明らかにし、さらに特性の高い材料を設計するためには、その構造や電子状態の解析を行うことが重要である。しかし、正孔輸送材料は非晶状態で用いられるために解析が困難であり、その詳細は明確にされていない。また、正孔輸送過程においては中性およびカチオンの状態をとるため、中性のみならずカチオンの状態についても検討を行う必要がある。本研究では、固体 NMR 測定ならびに量子化学計算を用いトリフェニルアミン系の正孔輸送材料である *N,N'*-diphenyl-*N,N'*-di(*m*-tolyl)benzidine (TPD) (図 1) の中性、カチオン、ジカチオン状態におけるコンホメーションおよび電子状態について検討を行った。

[実験] TPD と SbCl_5 は Aldrich から、 CHCl_3 は Nacalai Tesque から購入したものをを用いた。非晶 TPD 試料は、TPD を溶融状態から 0°C に急冷することにより得た。また、化学ドープした試料は、窒素雰囲気下でそれぞれ CHCl_3 に溶解した TPD と SbCl_5 を、1:1 および 1:3 のモル比で混合した後、攪拌、真空乾燥することにより得た。

以上の操作で得られた試料をそれぞれ T1S0、T1S1、T1S3 とし、CP/MAS ^{15}N 、 ^{13}C NMR 測定および ^{15}N 化学シフト異方性 (CSA) 測定を行った。なお、 ^{15}N 核の測定の際には ^{15}N 同位体ラベルした試料を用いた。すべての測定は Chemagnetics CMX-400 分光計を用い 9.4 T の静磁場下、室温にて行った。また、 ^{15}N 、 ^{13}C 化学シフトはそれぞれ NH_4Cl 結晶の ^{15}N 共鳴線、TMS の ^{13}C 共鳴線を基準 (0ppm) とした。

量子化学計算は Gaussian98 を用い DFT B3LYP 6-31G(d) 基底にて行った。TPD の中性、カチオン、ジカチオンの構造の最適化を行った後、それぞれの状態について GIAO 法により ^{15}N 、 ^{13}C の等方化学シフト σ_{iso} および CSA テンソルの主値 σ_{11} 、 σ_{22} 、 σ_{33} を計算した。

[結果・考察] TPD に SbCl_5 をドーピングし、真空乾燥した結果、T1S1 からは濃赤色、T1S3 からは光沢のある濃赤色の沈殿が得られた。これらの試料と T1S0 について CP/MAS ^{15}N NMR 測定を行った結果を図 2 に示す。T1S3 の固体 NMR 測定からは T1S0 と比較して 104 ppm 低磁場シフトした共鳴線が得られた。T1S1 からは共鳴線が観測できなかった。ESR 測定ではシグナルが得られたことから、T1S1 はラジカルカチオンであり、不対電子のスピンと ^{15}N 核スピンの双極子相互作用のために ^{15}N NMR 共鳴線の観測ができなかったものと考えられる。また、

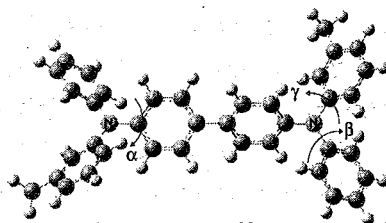


Fig. 1. Structure of TPD.

Table 1. Torsion angles of optimized TPD.

	neutral	cation	dication
α	40°	26°	26°
β	42°	49°	47°
γ	43°	49°	47°

キーワード: 有機 EL, 正孔輸送材料, TPD, 固体 NMR, 量子化学計算

著者ふりがな: やまだともりのり, かじひろのり, つかもとなおき, くさかやすなり, ほりいふみつか

^{15}N CSA 測定を行った結果を図 3 に示す。T1S0 からは $\sigma_{11}-\sigma_{33}$ が約 15 ppm の非常に狭い CSA が得られ、T1S3 からは非常に幅の広い CSA ($\sigma_{11}-\sigma_{33}=181$ ppm) が得られた。

量子化学計算により TPD の中性、カチオン、ジカチオンについて ^{15}N 核の等方化学シフト σ_{iso} および CSA テンソルの主値 σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} を計算した結果をそれぞれ図 2, 3 に縦線で示した。T1S0 および T1S3 の実測のスペクトルはそれぞれ中性およびジカチオンについての量子化学計算の結果とほぼ一致していることがわかる。

以上のことから、T1S1 はラジカルカチオンであり、T1S3 はジカチオンであること、さらに、TPD はジカチオンに変化する際に等方化学シフトが大きく低磁場シフトし、CSA が大幅に広がることが明らかになった。このことは、ジカチオンでは N 核周りの電子密度が減少し、遮蔽の異方性が増大することを意味している。また、実測のスペクトルと量子化学計算との間で、ジカチオンの σ_{11} に明確な不一致が認められるが、これは量子化学計算において考慮していない、分子間相互作用やアニオンの存在によるものと推定される。今後、これらの影響を考慮した検討を行う必要がある。

また、量子化学計算による TPD 単一分子の構造最適化の結果を図 1、表 1 に示す。中性の TPD においては N 原子とこれに結合する 3 つの C 原子が平面をなしており、その平面に対してすべての C-N 結合が約 40° のねじれ角をもっているという結果が得られたが、これはこれまでの報告とほぼ一致している。中性 TPD の ^{15}N 核の $\sigma_{11}-\sigma_{33}$ のねじれ角 α および β 依存性(ここでは、量子化学計算による構造最適化の結果に基づき $\beta = \gamma$ と仮定した)の計算結果を図 4 に示す。 $\sigma_{11}-\sigma_{33}$ はねじれ角に大きく依存しているため、その値からねじれ角を決定することができる。T1S0 の $\sigma_{11}-\sigma_{33}$ の実測値(約 15 ppm) との比較から、非晶 TPD は単一分子の最適化構造と同じくすべてのねじれ角がほぼ 40° であり、また、この最適化構造のねじれ角は $\sigma_{11}-\sigma_{33}$ が最小となる状態に対応していることが明らかになった。同様に、N 核周りの平面性に対する $\sigma_{11}-\sigma_{33}$ の変化を調べたところ、N 核周りが平面構造からピラミッド型に近づくにつれその値が増大することが明らかとなり、実測のスペクトルとの比較から、N 核周りは最適化構造と同じく平面構造であると結論づけた。一方、カチオン、ジカチオンについて構造最適化を行ったところ、N 核まわりの平面性は保たれているが、中性の TPD と比較して N 原子-ピフェニレン間の C-N 結合のねじれ角が大きく減少し、キノイド型に近づくという結果が得られた。上述したように、本研究においては実測の等方化学シフトおよび CSA スペクトルが量子化学計算の結果とほぼ一致しており、このことはこの構造変化の妥当性を支持しているものと考えられる。

発表当日は固体 ^{13}C NMR 測定の結果も合わせ、TPD ジカチオンのコンホメーションおよび電子状態についてより詳細に報告する予定である。

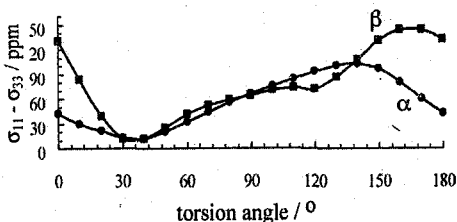


Fig. 4. Plots of $\sigma_{11}-\sigma_{33}$ of ^{15}N versus torsion angles, α and β .

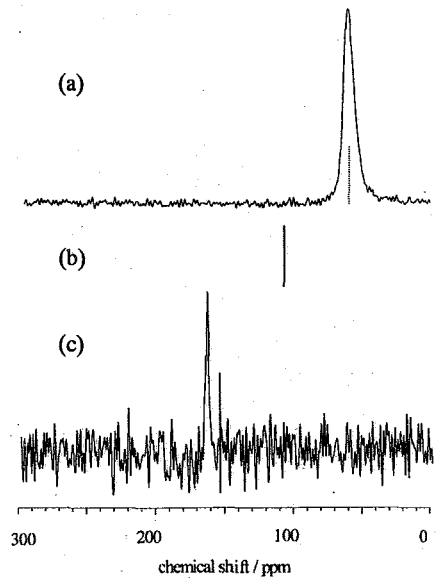


Fig. 2. CP/MAS ^{15}N spectra of T1S0(a) and T1S3 (c). Vertical lines are σ_{iso} of neutral (a), cationic (b), and dicationic (c) TPD acquired by quantum chemical calculations.

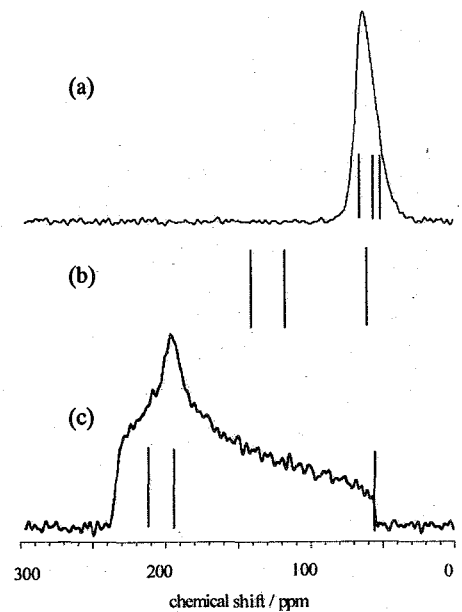


Fig. 3. ^{15}N CSA spectra of T1S0 (a) and T1S3 (c). Vertical lines are σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} of neutral (a), cationic (b), and dicationic (c) TPD acquired by quantum chemical calculations.

A Study on Thermal Expansion of Rubbery Polymers by ¹²⁹Xe NMR

Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Hiroaki Yoshimizu, Seiko Ando, Shigeru Okamoto, Yoshiharu Tsujita

In this study, the ¹²⁹Xe NMR spectra of the Xe atoms in acrylonitrile-butadiene copolymer rubber (NBR) membranes with various acrylonitrile contents were measured at various temperatures to clarify the relationship between ¹²⁹Xe NMR chemical shift and temperature dependence of free volume of rubbery polymers. The ¹²⁹Xe NMR chemical shift of ¹²⁹Xe nuclei in NBR sample was linearly decreased with increasing the both fractional free volume and temperature. Thermal expansion coefficient decreased with increasing acrylonitrile contents. These ¹²⁹Xe NMR results were consistent with the results obtained from the dilatometry measurements. It was, therefore, demonstrated that the ¹²⁹Xe NMR spectroscopy is one of the methods to estimate thermal expansion coefficient of rubbery polymers.

【はじめに】

¹²⁹Xe 核は、比較的 NMR 検出感度が高く、高分子中に吸着した微量成分であってもその NMR スペクトルを容易に観測できる。我々はこれまでに高分子中に溶解又は収納された Xe 原子の示す ¹²⁹Xe NMR 化学シフト値が、系の自由体積の情報を反映することを報告してきた。本研究では、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(NBR)ゴムを用い、水銀ディラトメリーと ¹²⁹Xe NMR 化学シフト値からゴム状高分子における自由体積の温度依存性を検討した。

【実験】

NBR(JSR(株)より供与)の AN 含有率は、15, 29, 37, 48%の4種である。試料膜は、溶液キャスト法により調製し、密度測定(浮沈法)、DSC 測定、¹²⁹Xe NMR 測定、水銀ディラトメリー測定を行った。

【結果と考察】

高分子系では一般に $\delta = \delta(S) + \delta(Xe)$ で表される。ここで $\delta(S)$ は Xe 原子と空孔内壁、つまり高分子鎖表面との相互作用による項であり、 $\delta(Xe)$ は Xe 原子同士の相互作用による項である。試料に種々の圧力下で Xe を吸着させて、¹²⁹Xe NMR 測定を行った結果、¹²⁹Xe NMR 化学シフト値は Xe 吸着量の増加に伴い若干であるが線形的に低磁場シフトした。これは、Xe 吸着量の増加に伴い試料中の Xe 密度が上昇し、Xe 原子同士の衝突頻度が増加したため、 $\delta(Xe)$ 項の寄与が幾分増加した結果と解釈できる。しかし、その増加分はガラス状高分子に見られる観測結果とは異なり、無視し得るほどに小さい。高分子鎖がセグメント単位で活発なマイクロブラウン運動をしているゴム状態では、Xe 原子同士の衝突よりも Xe-高分子鎖間の衝突の方がはるかに高い頻度で生じている結果、相対的に Xe 原子間の相互作用の寄与が小さいためと考えられる。

¹²⁹Xe NMR 化学シフト / ディラトメリー / ゴム状高分子 / 自由体積 / 熱膨張
よしみずひろあき, あんどうせいこ, おかもとしげる, つじたよしはる

一方、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値を Xe 収着量 0 に直線外挿した値である δ (S) 値は、高分子鎖表面と Xe 原子の相互作用に起因し、両者の空間・時間的平均距離が短いほど大きな値をとるので、その値は試料の自由体積部分、即ち分子鎖間隙の空間・時間的平均距離と相関があるはずである。我々はこれまでにガラス状高分子に見られる高分子鎖間隙の特徴が、ゴム状高分子のそれと比較すると空間・時間的に固定されたと見て良いことに着目し、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値からその平均距離を、球形を仮定した“マイクロポイド”の直径として算出したところ、微小空間のサイズ評価法として有力視されている陽電子消滅法(PALS)から得られた値とほぼ一致する事実を報告してきた。これに対し、ゴム状高分子で得られる ^{129}Xe NMR 化学シフト値から同様に平均径を算出しても、これは PALS 法で決定された値より小さい。これらの実験事実は、ゴム状高分子鎖のマイクロブラウン運動速度と高分子鎖間隙の平均サイズ評価に用いた手法の観測タイムスケールを考慮しなければならないことを意味している。別の表現をすれば、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値を介して分子鎖間隙の長短を評価する場合、Xe 原子が感じるゴム状高分子の分子占有体積はその激しい分子運動の故に見かけ上膨らんで見えているといえる。

我々は幾つかの測定結果から、高分子試料中にある ^{129}Xe 核の示す NMR 化学シフト値は、ガラス転移温度(T_g)を境に区別して整理する必要性を提案している。そして、その値とゴム状高分子試料の自由体積分率(FFV)に相関が見られた(Fig. 1)ため、各温度における δ (S) 値から FFV を決定し、熱膨張係数を決定する方法論を提案する。各試料膜の FFV を $T-T_g$ に対してプロットし、Fig. 2 に示した。いずれの試料も $T-T_g=0$ つまり T_g において FFV がほぼ同じ値を示した。また、このプロットの傾きは自由体積の熱膨張係数 α_f である。Table 1 に各試料の α_f を、 T_g における FFV とともにまとめた。添え字の NMR は ^{129}Xe NMR 化学シフト値から決定した値であることを意味し、D はディラトメリーのそれである。 α_f は AN 含有率の増加に伴い減少し、 T_g における FFV が同程度となる傾向はディラトメリーから得られた結果と同じであった。以上の結果から、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値からゴム状高分子の自由体積分率及び自由体積の熱膨張係数が評価可能である。

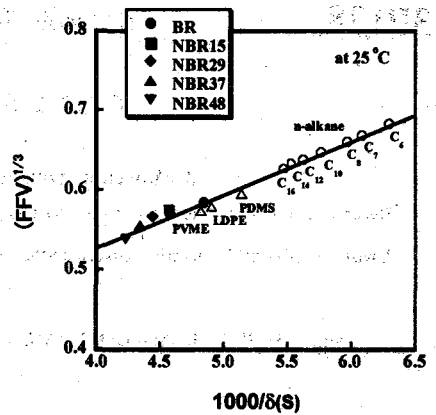


Figure 1 The relationship between fractional free volume and ^{129}Xe NMR chemical shift, δ (s), at 25 °C.

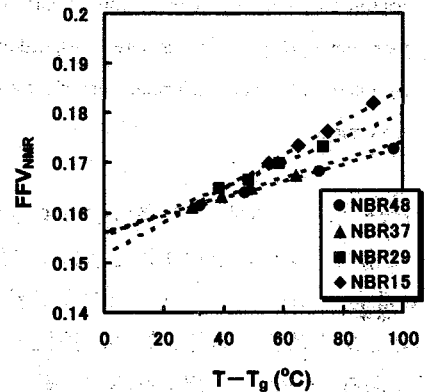


Figure 2 Plots of fractional free volume (FFV) vs. temperature, $T-T_g$ for NBR membranes by ^{129}Xe NMR.

Table 1 FFV at T_g and thermal expansion coefficient of free volume (α_f) for NBR membranes

sample	α_f^{NMR} $\times 10^4$ (K^{-1})	FFV _{NMR}	α_f^{D} $\times 10^4$ (K^{-1})	FFV _D
NBR15	3.4	0.151	4.94	0.147
NBR29	2.5	0.155	4.73	0.147
NBR37	1.8	0.156	4.58	0.141
NBR48	1.7	0.156	4.07	0.137

References:

1. T.Suzuki, H.Yoshimizu, et al., *Polymer J.*, **33**, 934(2001),
2. T.Suzuki, H.Yoshimizu, et al., *Macromolecules*, **34**, 3805(2001),
3. T.Suzuki, H.Yoshimizu, et al., *Polymer J.*, **34**, 891(2002),
4. T.Suzuki, H.Yoshimizu, Y.Tsujita, *Desalination*, **148**, 359(2002),
5. T.Suzuki, H.Yoshimizu, Y.Tsujita, *Polymer*, **44**, 2975(2003),
6. H.Yoshimizu, T.Suzuki, et al., *J.Mol.Struct.*, in press.

A Molecular Structural Analysis of Microbial Poly(ε-L-lysine) and its Derivatives

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering, Fukui University 3-9-1, Bunkyo, Fukui 910-8507, Japan

Division of Material Engineering, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa

920-1192, Japan

Shiro MAEDA¹, Junnosuke MURANAKA¹, Katsunori MUTO¹ and Chizuru SASAKI², Ko-Ki KUNIMOTO²

The molecular structure and conformation of microbial poly(ε-L-Lysine) (ε-PL) produced by a variant of *Streptomyces albulus* and its derivatives, in which azo dye was attached to the side chain α-amino group of ε-PL, were studied by using high-resolution solid state ¹³C and ¹⁵N NMR spectroscopy. ¹³C spin-lattice relaxation times (T₁) for ε-PL and ε-PL/HCl measured by the method of Torchia (TICP experiments) exhibited two kinds of values, which shows existence of two components. These components were assigned to a crystalline and an amorphous component and their spectra were measured separately. All peaks of aliphatic parts of amorphous component were broad because of the heterogeneity of the molecular conformation.

【はじめに】 微生物由来の生分解性高分子ポリ(ε-L-リジン) (ε-PL) は必須アミノ酸のL-リジンがα-カルボキシル基とε-アミノ基でアミド結合した直鎖状の構造を持つ塩基性ポリアミノ酸である。ε-PLは側鎖に反応性の高いα-アミノ基

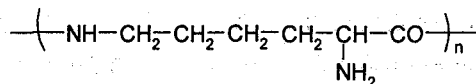


Figure 1 Poly(ε-L-lysine)

があり化学修飾により誘導体を容易に合成できることから、さらなる機能性を付加させた機能性材料としての利用が期待される。私たちは、ε-PLおよびε-PL/HClの相構造を明らかにするために、¹³C T₁緩和時間測定[1]および¹³CT_{1ρ}緩和時間測定を行った。また、ε-PL/アゾ色素複合体を合成し、¹³Cおよび¹⁵N NMRを用いて分子構造解析を行ってきた[2]。

【試料】 試料はε-PLと、その塩酸塩(ε-PL/HCl)、ε-PL/アゾ色素複合体として側鎖α-アミノ基にMethyl Orange, Dabsyl Chlorideを化学修飾したもの(それぞれε-PL/MO, ε-PL/DC)を使用した。ε-PLの重合度は32である。

【装置】 固体高分解能¹³C NMRおよび¹⁵N NMR測定は、Chemagnetics CMX Infinity 300を用いて75.56MHzで測定した。¹³C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とした。¹⁵N化学シフトは、グリシンを液体NH₃(25°C)から32.5ppmとした。

キーワード：固体¹³C NMR, ポリ(ε-リジン), 微生物産生高分子, 固体¹⁵N NMR

まえだしろう, むらなかじゅんのすけ, むとうかつのり, ささきちづる, くにもとこうき

【結果と考察】

Figure 2 に ϵ -PL および ϵ -PL/HCl の T1 ρ^C 緩和時間測定の結果を用いて作成した緩和遅延時間 τ に対するピーク強度のプロットを示す。それぞれのピークは 2 つの指数減衰関数にフィットすることができ 2 つの相 (結晶相および非晶) が存在することがわかった。

同様なプロットより得られた T1 ρ^C を Table 1 に示す。短い T1 ρ^C は非晶相成分を示しており、長い T1 ρ^C は結晶相成分を示している。

ϵ -PL の結晶相より ϵ -PL/HCl の結晶相は T1 緩和時間が短い。 ϵ -PL/HCl は主鎖 CH₂ の化学シフトが高磁場シフトしていることから、 ϵ -PL のような平面ジグザグ鎖ではなく、一部ゴーシュコンフォメーションをとっていると考えている [1] が、それに加えて、 ϵ -PL よりも分子運動が大きいと考えられる。

Figure 3 に ϵ -PL-アゾ色素誘導体 (ϵ -PL/MO, ϵ -PL/DC) の固体 ¹³C NMR スペクトルを示す。低磁場側にアゾ色素の芳香

族ピークが、高磁場側に脂肪族ピークが現れている。発表では、これらのスペクトルパターンの違いと ¹⁵N NMR 測定結果をあわせて ϵ -PL-アゾ色素誘導体の分子構造についても議論する。

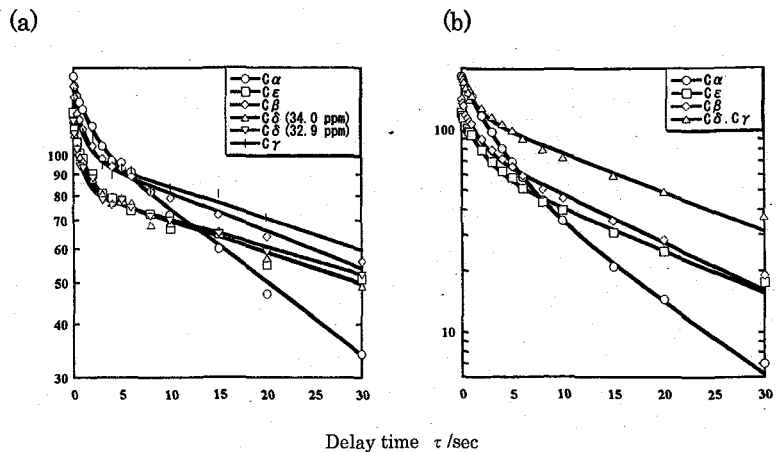


Figure 2 Plots of peak intensity versus delay times in the ¹³C T1 ρ^C experiments for (a) ϵ -PL and (b) ϵ -PL/HCl

Table 1 ¹³C spin-lattice relaxation time in rotate frame T1 ρ^C of ϵ -PL and ϵ -PL/HCl.

T1 ρ^C / msec.		carbon types				
		C α	C β	C γ	C δ	C ϵ
ϵ -PL	amorphous	10.1	4.56	5.08	4.96, 5.46	4.40
	crystalline	115	40.0	36.7	38.9, 39.5	41.2
ϵ -PL/HCl	amorphous	7.90	6.30		4.96	7.84
	crystalline	90.3	59.0		53.9	66.0

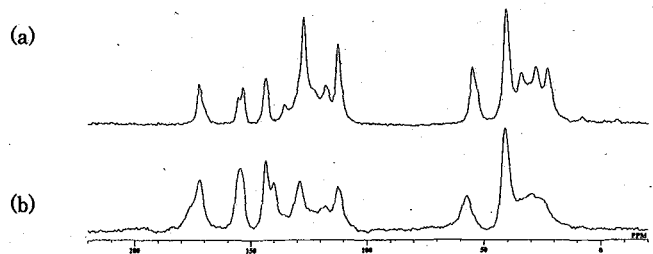


Figure 3 ¹³C NMR spectra of (a) ϵ -PL/MO and (b) ϵ -PL/DC

[1] S. Maeda, K. Kunimoto, C. Sasaki, A. Kuwae, and K. Hanai, *J. Mol. Struct.*, 655, 149-155 (2003); S. Maeda, T. Mori and Ko-Ki Kunimoto, *Polym. Prep., Jpn.*, 51, 1073 (2002); 前田史郎・森貴志・佐々木千鶴・国本浩喜, 第 41 回 NMR 討論会講演要旨集, P109, 334-335 (2002. 11) [2] S. Maeda, et al., submitted for publication; 前田史郎・森貴志・佐々木千鶴・国本浩喜, 第 42 回 NMR 討論会講演要旨集, 1P34, 188-189 (2003. 11)

Adsorption Properties of Porous Coordination Polymers by Solid State NMR Analysis
 Satoshi HORIKE, Ryotaro MATSUDA, Susumu KITAGAWA
 Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto 615-8510

Solid state NMR for monitoring the dynamics of guest molecules in Cu (II) porous coordination polymers were measured using deuterium NMR method for paramagnetic materials. Deuterium NMR analyses showed that the each molecular motions adsorbed in micropore are strongly depend on pore size and/or shape, and anisotropic motions are observed even small guest molecules like methanol or benzene. Powder X-ray diffraction analysis of coordination polymer with guests also showed that anisotropic guests adsorption.

【緒言】

遷移金属イオンと有機配位子から組みあがる金属錯体集積体の中には、それらを自己集積的に結合させることによりナノサイズの細孔を持つ多孔性錯体を合成することができる。これまでそのマイクロ孔を利用したガス吸着やイオン交換、低分子配列などの機能発現が報告されてきた¹⁾。それら機能は多孔性錯体の持つ細孔の形状やサイズに大きく依存するため、細孔中に吸着された分子の運動性や構造情報は必須である。本研究では銅(II)からなる多孔性錯体に様々な分子を吸着させ、その状態を常磁性に対応した固体NMR測定と粉末X線を用いて解析した。

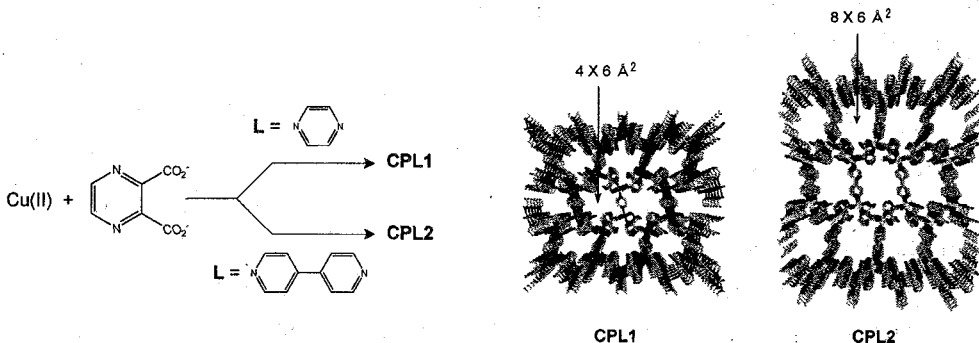
【実験】

多孔性錯体の合成および吸着実験

銅(II)多孔性錯体の合成は文献に従って行った²⁾。これらは銅(II)イオンとピラジンジカルボン酸からなる二次元シート構造がさらに架橋配位子 L で連結された三次元構造を取る。L がピラジンの時の多孔性錯体を CPL1、4,4'-ピピリジンのときを CPL2 とし、それぞれの合成スキーム (Scheme 1) と結晶構造 (Fig. 1) を下に示す。吸着実験は室温、大気圧下で乾燥させた多孔性錯体粉末とゲスト蒸気との共存、あるいは多孔性錯体の粉末とゲスト溶液を懸濁させたのちろ過し、一日室温にて真空乾燥させたものを用いた。

固体NMR測定

測定は Chemagnetics 社製 CMX-300 (²H 観測周波数 45.8250 MHz) を用いて行った。²H NMR 測定は常磁性に対応した四極子エコー法を用いて行った。



Scheme 1.

Fig. 1 Crystal structure of CPL1 (left) and CPL2 (right).

キーワード：多孔性錯体、吸着挙動、常磁性

ほりけさとし、まつだりょうたろう、きたがわすすむ

【結果および考察】

CPL1はFig. 1に示すように細孔径が $4 \times 6 \text{ \AA}^2$ の一次元細孔が空いている。このマイクロ孔にメタノール- d_3 を吸着させ、その ^2H NMRスペクトルを293 Kから173 Kの温度領域で測定した(Fig. 2)。常磁性に対応したシミュレーションを行うと、293 KではCPL1の細孔内でメタノールは主軸のC-O軸が細孔方向に対して角度 $\theta = 41.4^\circ$ のぶれ運動を伴いながらメチル基が C_3 軸周りの速い回転運動を取っていることが分かった。温度を下げると $\theta = 17.3^\circ$ を取るメタノールが支配的になるが、メチル基の運動は速い回転のままであった³⁾。

一方細孔径が $8 \times 6 \text{ \AA}^2$ と大きなCPL2を用いると、取り込まれたメタノール- d_3 はほぼ等方的な運動を取る。しかし細孔径から、芳香族分子は強い束縛を伴いながら吸着すると考えられる。そこでベンゼン- d_6 、トルエン- d_8 、 p -キシレン- d_{10} をそれぞれ吸着させ、細孔中における運動状態を比較評価した。それぞれの298 Kにおける ^2H NMRスペクトルをFig. 3に示すが、最も小さなベンゼン- d_6 では線幅が約64.7 kHzのダブルレットパターンを示し、細孔内で C_6 軸周りの速い回転運動を取っているのに対し、トルエン- d_8 はメチル基によりそのような運動はできず、メチル基の C_3 軸周りの速い回転運動を取りながら芳香環が振動していることがわかった。最も大きな p -キシレン- d_{10} では、線幅約33.7 kHzのダブルレットパターンを取るメチル基が観測され、 p -キシレン分子が一次元細孔内で主軸方向に配列しながらメチル基が速い回転運動のみを取っていることが分かった。これらの結果からCPL2の細孔内ではサイズのわずかに違う芳香族ゲストを吸着させた際、その分子構造に依存した異方的な吸着挙動を取ることが分かる。

特にCPL2に吸着したベンゼンの運動(C_6 軸周りの回転運動)はいくつかのゼオライトにおける酸点での吸着挙動と同じである。つまりこの吸着ポテンシャルは低くホスト-ゲスト相互作用

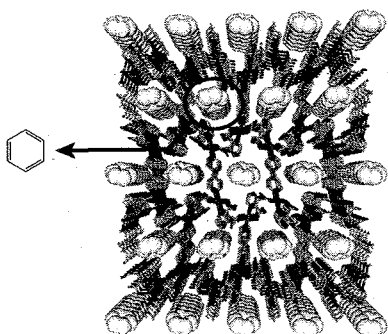


Fig. 4 Crystal structure of CPL2 with benzene.

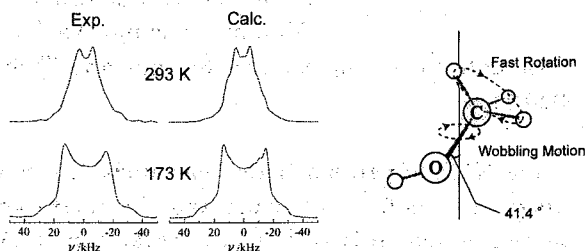


Fig. 2 (left) ^2H NMR spectra of CD_3OH adsorbed in CPL1 at 293 K and 173 K. (right) Schematic illustration of CD_3OH adsorbed in CPL1 at 293 K.

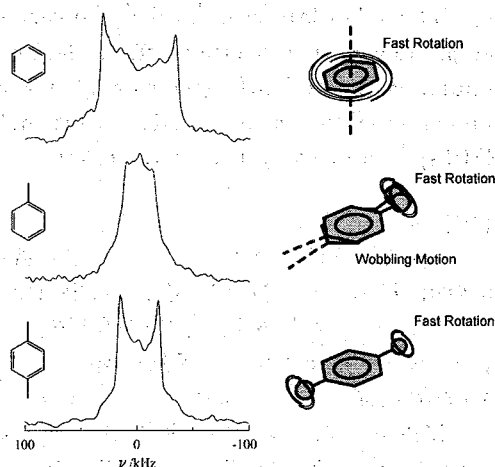


Fig. 3 (left) ^2H NMR spectra of each aromatic guests adsorbed in CPL2 at 298 K. (right) Schematic illustrations of guest behavior adsorbed in CPL2.

が強いと考えられるため、ベンゼンを吸着したCPL2の粉末X線を測定し、そのリートベルト解析を行った。その結果、Fig. 4に示すように分子間力で密にパッキングし、一次元細孔に整然と配列していることが明らかとなった。また吸着したベンゼンの回転運動の活性化エネルギーを温度-スピン格子緩和時間(T_1)プロットからフィッティングしたところ、約 4.3 kJ mol^{-1} であることが見積もられた。この値はゼオライトと比較しても小さく、異方的に吸着しながらもその回転障壁は小さいことが示唆された。

- 1) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2334. (Review)
- 2) *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 140.
- 3) *Chem. Commun.* **2004**, in press.

Analysis of solid-state deuterium NMR spectrum affected by paramagnetic relaxation

Motohiro Mizuno, Naohisa Itakura, Youji Aoki, and Kazunaka Endo

Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kanazawa 920-1192

For NMR of paramagnetic compounds, the magnetic field produced by unpaired electrons affects the shift of spectrum and the relaxation. We have studied the motions of water molecules and $[M(H_2O)_6]^{2+}$ ions in paramagnetic $[M(H_2O)_6][SiF_6]$ ($M = Ni^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}$) crystals using the simulation of 2H NMR spectrum including the effects of the quadrupole interaction and the paramagnetic shift. The spin-lattice relaxation time (T_1) of these compounds were $300 \mu s \sim 30 ms$. For $[Mn(H_2O)_6][SiF_6]$, the very short T_1 (ca. $70 \mu s$) was observed. In such a case, the paramagnetic relaxation affects the line shape of 2H NMR spectrum. We performed the simulation of 2H NMR spectrum of paramagnetic compounds including the effect of T_1 dominated by the paramagnetic relaxation. The effect of very short T_1 on the line shape of 2H NMR spectrum was appeared remarkably in the slow motion range.

【序】

常磁性化合物の NMR において不対電子スピンのつくる磁場はスペクトルのシフトや緩和時間に影響する。我々は $[M(H_2O)_6][SiF_6]$ ($M = Ni^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}$) 結晶の 2H NMR スペクトルについて核四極相互作用と常磁性シフトの影響をとり入れたシミュレーション解析を行い、水分子や錯イオンの運動を調べてきた [1,2]。これらの化合物の 2H NMR のスピン-格子緩和時間 (T_1) は $300 \mu s$ から $30 ms$ であった。これに対し、 $[Mn(H_2O)_6][SiF_6]$ においては Mn^{2+} のスピン量子数 ($S=5/2$) が大きいことや電子スピンの速い緩和機構が存在しないことから 2H の T_1 は約 $70 \mu s$ の非常に短い値となる。常磁性緩和により T_1 が非常に短くなると、スペクトルの解析に常磁性シフトだけでなく常磁性緩和の影響も考慮しなければならなくなる。本研究では常磁性シフトと常磁性緩和の寄与をとり入れた固体 2H NMR スペクトルのシミュレーションを行い、 T_1 や分子運動によるスペクトルの変化を調べた。

【計算】

2H NMR のエコ-信号は、 90° パルスの間隔を τ とすると、以下のようにあらわされる。

$$G(t) = P \cdot \exp(\hat{A}t) \exp(\hat{A}\tau) \exp(\hat{A}^* \tau) \cdot 1$$

2 サイトジャンプでは、 $P=(1/2, 1/2)$, $1=(1, 1)$, マトリックス \hat{A} は

$$\hat{A} = \begin{pmatrix} i\omega_1 - k - R_1 & k \\ k & i\omega_2 - k - R_2 \end{pmatrix}$$

重水素 NMR, 常磁性緩和, スペクトルシミュレーション

みずの もとひろ, いたくら なおひさ, あおき ようじ, えんどう かづなか

となる。 $\omega_i (i=1,2)$ は i 番目のサイトの ^2H の周波数で、核四極相互作用の寄与 ω_{Qi} と常磁性シフトの寄与 ω_{pi} を用いて $\omega_i = \pm\omega_{Qi} - \omega_{pi}$ とあらわされる。 R_i は i 番目のサイトの ^2H における常磁性緩和速度で、以下のようにあらわされる。

$$R_i = \frac{3}{2} \gamma_D^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1) \sum_j \left\{ \frac{1}{9} |F_{ij}^{(0)}|^2 \frac{\tau_e}{1 + (\omega_D - \omega_e)^2 \tau_e^2} + 2 |F_{ij}^{(1)}|^2 \frac{\tau_e}{1 + \omega_D^2 \tau_e^2} + |F_{ij}^{(2)}|^2 \frac{\tau_e}{1 + (\omega_D + \omega_e)^2 \tau_e^2} \right\}$$

$$|F_{ij}^{(0)}|^2 = (1 - 3 \cos^2 \theta_{ij})^2 r_{ij}^{-6}, \quad |F_{ij}^{(1)}|^2 = (\sin^2 \theta_{ij} \cos^2 \theta_{ij}) r_{ij}^{-6}, \quad |F_{ij}^{(2)}|^2 = (\sin^4 \theta_{ij}) r_{ij}^{-6}$$

ω_D と ω_e はそれぞれ ^2H と電子スピンの角周波数、 τ_e は電子スピンの相関時間をあらわす。 $G(t)$ に有限のパルス幅の寄与を加えて空間平均をとり、フーリエ変換することにより粉末平均の ^2H NMR スペクトルを得た。座標変換に用いるオイラー角や常磁性イオンと ^2H の距離は $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{SiF}_6]$ の中性子回折で得られた結晶パラメーターを用いて計算し、常磁性緩和速度と常磁性シフトについては 81 個の常磁性イオンからの寄与をとり入れた。

【結果】

Fig.1 にシミュレーションで得られた ^2H NMR スペクトルの T_1 や水分子の 180° フリップ運動による変化を示す。(a) と (b) は 90° パルス間隔を変え、それぞれ $\tau = 40 \mu\text{s}$ と $\tau = 20 \mu\text{s}$ でシミュレーションを行なった

結果である。 90° パルスの幅は $3 \mu\text{s}$ とし、 H-O-H 角は 109° であった。Fig.1 (a) と (b) の上は水分子の 180° フリップが遅いとき ($k=1.0 \text{ s}^{-1}$)、下は 180° フリップが速いとき ($k=1.0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) のスペクトルを示す。実線、破線、一点鎖線はそれぞれ T_1 の空間平均値 $(T_1)_{\text{av}} = (R_i^{-1})_{\text{av}} = 70 \mu\text{s}$, $200 \mu\text{s}$, 200 s でシミュレーションした結果である。速い水分子の 180° フリップが起こっているとき、 $(T_1)_{\text{av}}$ が短くなるとスペクトル強度の減衰はみられたが線形には大きな変化があらわれなかった。これに対し、水分子の 180° フリップが遅いときは $(T_1)_{\text{av}}$ が短くなるとスペクトル強度が減衰するだけでなく、スペクトルの線形が著しく変化した。

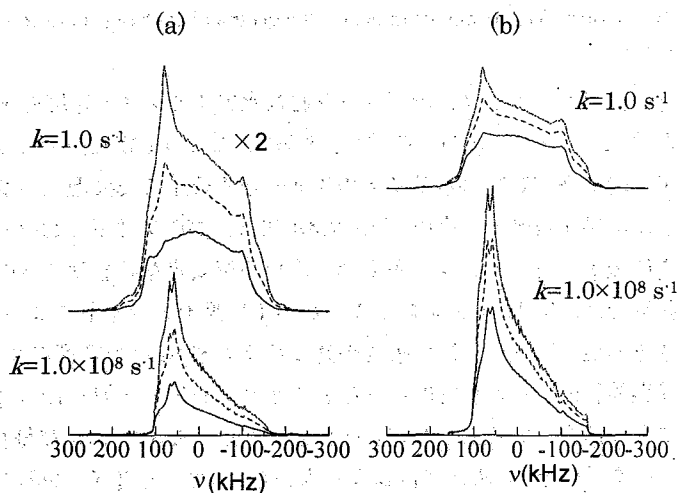


Fig.1 Simulated ^2H NMR spectra showing the effects of 180° flips of water molecules and T_1 . (a) and (b) are corresponding to $\tau=40 \mu\text{s}$ and $\tau=20 \mu\text{s}$, respectively. Two jumping rates were used, corresponding to $k=1.0 \text{ s}^{-1}$ and $k=1.0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ as shown. Solid, broken and dash-dotted lines show the spectra simulated by using $(T_1)_{\text{av}} = 70 \mu\text{s}$, $200 \mu\text{s}$, and 200 s , respectively. The quadrupole parameters, $e^2Qq/h=220 \text{ kHz}$, $\eta=0.1$ were used.

[1] M. Mizuno, T. Iijima, and M. Suhara, J. Phys. Condens. Matter **12**, 7261 (2000).

[2] T. Iijima, M. Mizuno, and M. Suhara, Z. Naturforsch. **55a**, 173 (2000).

High-pressure ^{129}Xe NMR Study of Xenon Absorption into HY-ZeolitesKuniyoshi Maezawa¹, Takahiro Ueda^{1,2}, Keisuke Miyakubo¹, Taro Eguchi^{1,2}¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,²The Museum of Osaka University

The ratio of Si to Al (Si/Al) in zeolites leads to the modification of the pore size and the electric field in the pore, and affects the adsorption behavior of guest molecules and the catalytic properties of host compounds. In the present study, we examine the effect of change in Si/Al of HY-zeolites (Si/Al = 1.8, 4) on the pore size and the dynamical behavior of the adsorbed xenon molecules by means of high-pressure ^{129}Xe NMR measurements. At pressures below 1 MPa, the pressure dependence of ^{129}Xe chemical shift for adsorbed xenon can be interpreted by the Langmuir type adsorption behavior. In the pressure range from 1 MPa to 6 MPa, the observed chemical shift values decrease and then increase above 6 MPa with increasing the pressure. This behavior indicates the chemical exchange between free and adsorbed xenon.

【序】ゼオライトは、沸石水を含む含水アルミノケイ酸塩である。その構造は、 TO_4 (T = Si または Al) が 3 次元的に連結し、Si/Al 比によって細孔径および電場が変化する。これは、エネルギー的に準安定な吸着サイトの生成や吸着分子の交換過程の変化をもたらし、吸着特性や触媒特性に影響を及ぼす。高圧 ^{129}Xe NMR 法は、高圧条件下における吸着分子を追跡できるため、細孔内に吸着したキセノン分子間相互作用や準安定な吸着サイトの生成を調べるのに有効である。本研究では、Si/Al 比が異なる 2 種類の HY 型ゼオライトについて、 ^{129}Xe 化学シフト値の圧力依存性を測定し、キセノンの吸着挙動に及ぼす Si/Al 比の影響について検討した。

【実験】東ソーより提供された HY ゼオライト (Si/Al = 1.8, 4) は、粉末 X 線回析および IR 測定により同型であることが確認された。また、Si/Al 比および細孔容積は、それぞれ ^{29}Si MAS NMR スペクトルと N_2 吸着等温線から求めた。400°C で真空・加熱処理した粉末試料について、研究室自作の圧力可変プローブを装着した Bruker MSL200 分光計により、298 K のもと圧力範囲 0.01 - 8 MPa にわたって ^{129}Xe NMR スペクトル (共鳴周波数 55.6 MHz) を *in situ* 測定した。

【結果と考察】 $P = 0.01$ MPa では、共存する Xe ガスとゼオライト細孔内に吸着した Xe に対応する 2 本の共鳴線がそれぞれ 0 ppm と 50 - 60 ppm 付近に分離して観測された。Fig.1 は、それぞれの共鳴線に対応する ^{129}Xe 化学シフト値の圧力依存性である。Xe ガスの化学シフト値は、

キーワード：高圧 ^{129}Xe NMR、物理吸着、化学シフト、圧力依存、Si/Al 比

まえざわ くによし、うえた たかひろ、みやくぼ けいすけ、えぐち たろう

$P = 6$ MPa 付近で超臨界流体 ($P_c = 5.8$ MPa) への転移により急激に増加する。一方、細孔内に吸着した Xe では、共鳴線が 0.5 MPa 以上で 2 本に分裂し、2 種類の吸着サイトの存在を示唆している。さらに、1 MPa 以上では、圧力の増加による化学シフトの減少が見られた。これは、ゼオライト細孔内に吸着した Xe と粒界近傍の Xe ガスとの化学交換によるものと考えられる。そこで、2 サイトジャンプモデルを用いて化学シフトの実験値と線幅から両者の間の交換速度を見積もったところ、低磁場側のピークから得られたキセノンの脱着速度の圧力依存性が Si/Al 比に依存することがわかった (Fig.2 (a))。これから、低磁場側のピークを与える Xe は、ゼオライト骨格内に形成されるスーパーケージへの吸着に関与していると結論できる。一方、高磁場側のピークに対する Xe の脱着速度は Si/Al 比によらず、二つの試料でほぼ同じ圧力変化を示した (Fig.2 (b))。これは、高磁場側のピークを与える Xe が、ゼオライト粒子を構成する微結晶の間に形成された結晶粒界などのマクロ孔への吸着に関与している可能性を示唆している。

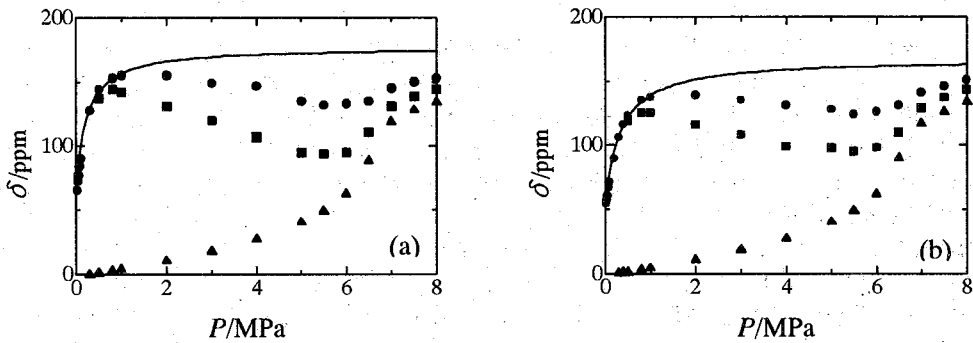


Fig.1 Pressure dependence of ^{129}Xe chemical shift values for Xe gas (\blacktriangle) and Xe (\bullet , \blacksquare) confined in HY zeolites of Si/Al = 1.8 (a) and 4 (b).

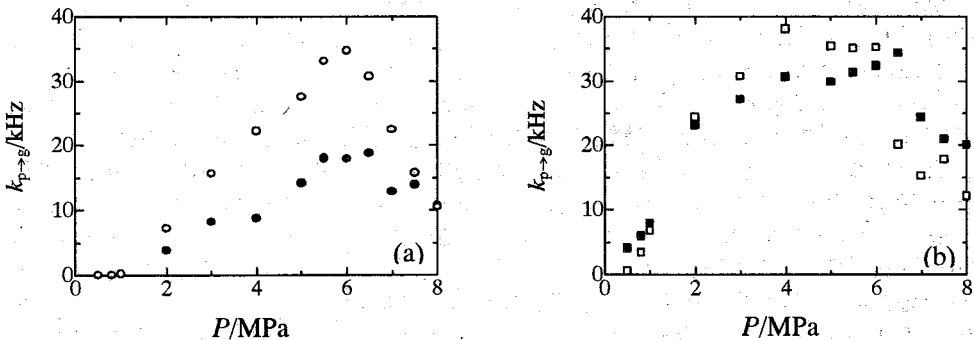


Fig. 2 Exchange rate of Xenon from pore to gas in HY zeolites of Si/Al = 1.8 (\bullet , \blacksquare) and 4 (\circ , \square)

High-resolution solid-state NMR in compound semiconductor InP

Takahiro Iijima, Kenjiro Hashi, Atsushi Goto, Tadashi Shimizu, Shinobu Ohki¹

National Institute for Materials Science

¹CREST, Japan Science and Technology Agency

The impurity dependence of ³¹P NMR MAS spectra of compound semiconductor InP has been measured. The indirect spin-spin coupling tensor (J^{iso} , J^{aniso}) of the heteronuclear neighboring ^{113,115}In-³¹P spins was obtained from the spectra in the semi-insulating sample of Fe-doped InP. By simulating the spectra, the values (J^{iso} , J^{aniso}) were estimated as (224 ± 5 Hz, 1790 ± 130 Hz) or (-224 ± 5 Hz, 810 ± 130 Hz). In the spectra of S-doped *n*-type and Zn-doped *p*-type InP samples with the carrier density of the order of 10¹⁸ cm⁻³, the line shift was found to be caused by the distribution of the strength of the electron-nuclear interaction due to the shallow electron states.

半導体は電子デバイス、光デバイス、光集積回路などの基本材料として用いられているが、近年、半導体を量子計算機のデバイス材料として利用する提案がされている。量子計算機に半導体を用いるメリットは、高度に発達したプロセス技術を利用できる点や、光ポンピングにより核スピンの偏極を大幅に増大でき量子ビットの初期化に資する点である。提案例としては、Kane によるシリコン基板上で動作する ³¹P NMR 量子計算機がある[1]。この計算機では ³¹P 不純物がシリコン基板の表面直下にドーピングされており、量子計算を行うためにゲート電圧によりドナー電子の波動関数を歪ませ核スピン相互作用を変化させている。また、清水らは ¹¹¹Cd-¹²³Te-¹¹³Cd-¹²⁵Te の順に成長させた CdTe 同位体超格子による NMR 量子計算機を提案している[2]。これらの量子計算機では、2 量子ビットの量子ゲートに間接核スピン相互作用を用いている。従って、固体 NMR 量子計算機実現のためには、様々な半導体について間接核スピン結合を見積もることやその相互作用のメカニズム、不純物効果などを明らかにすることが肝要であると考えられる。本研究では III-V 化合物半導体である InP を試料とし、magic-angle spinning (MAS) や ¹¹³In→³¹P 及び ¹¹⁵In→³¹P の cross polarization (CP) を行い ³¹P NMR スペクトルのキャリヤ濃度依存性を測定し、最近接の ^{113,115}In-³¹P 間の間接核スピン結合テンソル (J^{iso} , J^{aniso}) やドナー、アクセプターの不純物状態を調べた。

InP 半導体は 291 K で $a = 5.87 \text{ \AA}$ の zinc blende 結晶構造をとっており、³¹P ($I = 1/2$, $N_A = 100\%$), ¹¹³In ($S = 9/2$, $N_A = 4.2\%$), ¹¹⁵In ($S = 9/2$, $N_A = 96.8\%$) の 3 種類の核スピンから構成されている。測定に用いた試料は S-doped (*n*-type, $N_D = 6 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$), Fe-doped (semi-insulating, $N_D = 7 \times 10^7 \text{ cm}^{-3}$), Zn-doped (*p*-type, $N_D = 5 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$) の 3 種類の InP 半導体である。NMR 測定は 11.7 T の静磁場で Tecmag 社製 APOLLO 分光器を用い、共鳴周波数 $\nu_0(^{31}\text{P}) = 202.435 \text{ MHz}$, $\nu_0(^{113}\text{In}) = 109.433 \text{ MHz}$, $\nu_0(^{115}\text{In}) = 109.683 \text{ MHz}$ で行った。Fig. 1(a), 1(b) にそれぞれ ¹¹⁵In→³¹P, ¹¹³In→³¹P の CP を用いた時の ³¹P NMR スペクトルを示す。測定は高速 ($\nu_r = 10 \text{ kHz}$) 及び低速 ($\nu_r = 1.1 \text{ kHz}$) MAS 下で行った。また、観測時は ¹¹⁵In のデカップリングを行っている。Fe-doped InP 試料の ³¹P NMR スペクトルに寄与する核スピン相互作用は、同種核間 (³¹P-³¹P) 及び異種核間 (¹¹³In-³¹P) の磁気双極子相互作用及び間接核スピン-スピン相互作用である[3]。¹¹³In は希薄であるため、¹¹⁵In→³¹P の CP を行った場合は ¹¹³In-³¹P の相互作用は無視できる。従って、Fig. 1(a) のスペクトルに寄与するのは ³¹P-³¹P の磁気双極子相互作用であり、低速 MAS スペクトルではスピニング・サイドバンドが現れたが高速 MAS スペクトルはシャープなピー

³¹P NMR, 化合物半導体, 間接核スピン-スピン結合, キャリヤ濃度

いいじまたかひろ、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

クとなった。 $^{113}\text{In} \rightarrow ^{31}\text{P}$ のCPを行った場合は、 $^{113}\text{In}-^{31}\text{P}$ の相互作用が強調され、特に高速MAS下では ^{113}In に隣接した ^{31}P だけが観測される。Fig. 1(b-i)のスペクトルの等間隔の10本のピークは等方的な $^{113}\text{In}-^{31}\text{P}$ の間接核スピン相互作用によるものである。低速MASスペクトルについては上記の相互作用を考慮してスペクトル・シミュレーションを行った(Fig. 1(c))。その結果、(J^{iso} , J^{aniso})は(224 ± 5 Hz, 1790 ± 130 Hz)または(-224 ± 5 Hz, 810 ± 130 Hz)であると見積もられ、どちらの場合においても J^{aniso} は J^{iso} よりかなり大きな値であることが分かった。間接核スピン結合は、以下の電子-核相互作用の2次摂動で与えられる：(i)

Fermi 接触相互作用, (ii) 電子軌道-核スピン相互作用, (iii) 電子スピン-核スピン双極子相互作用。このうち、(iii)項の寄与はInPでは結晶対称性のためゼロとなる。また、(i), (ii)項ではそれぞれ主にs軌道、p、d軌道が用いられる。InPのfirst conduction bandはs-likeであるため(i)項からの寄与が主となるが、この寄与は J^{iso} に対してのみである。一方、second conduction bandはp-likeであり、エネルギー準位はfirst conduction bandの準位と接近している。従って、InPの間接核スピン相互作用には(ii)項を用いたvalence bandとsecond conduction bandの間のバンド間遷移が大きく寄与していると考えられる。

Fig. 2(i), 2(ii)にFig. 1(a-i)に対応するS-, Zn-doped InP試料の ^{31}P MAS ($\nu_r = 10$ kHz) NMRスペクトルをそれぞれ示す。スペクトルの線形は左右非対称となり、Fe-doped InPのスペクトルと比べピーク位置がシフトした。キャリア濃度が上がると、電子-核相互作用の大きさが変化する。結果として、その1次摂動エネルギーや化学シフトの大きさが変化し、スペクトルに影響を与えたと考えられる。そこで、n-typeのS-doped InPではスペクトルがshallow donor中心の周りに非局在化した波動関数を持つ電子と ^{31}P 核とのFermi接触相互作用によるものと仮定し、有効質量近似のもとで理論スペクトルを計算した(Fig. 2(iii))。試料のキャリア濃度より若干低いものの約 $2 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ の濃度を考慮することで実測スペクトルをほぼ再現することができた。Fig. 2(ii)のスペクトルはFig. 2(i)のスペクトルと比較して、シフト量は小さいものの線形は類似している。従ってこの場合も電子-核相互作用の大きさがshallow acceptorのために分布していると分かる。InPのvalence bandはp-likeであるため、p-typeのZn-doped InPではFermi接触相互作用に加え電子軌道-核スピン相互作用もシフトに大きく寄与していると考えられる。

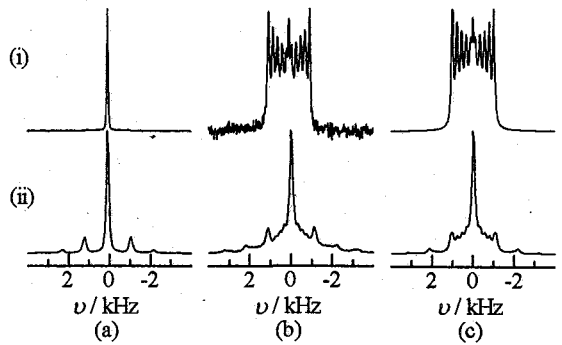


Fig. 1: ^{31}P NMR spectra of the powder sample of Fe-doped InP at the MAS frequency of (i) $\nu_r = 10$ kHz and (ii) $\nu_r = 1$ kHz (a) and (b) show the spectra measured with CP of $^{113}\text{In} \rightarrow ^{31}\text{P}$ and $^{113}\text{In} \rightarrow ^{31}\text{P}$, respectively. (c) shows the simulated spectrum for (b).

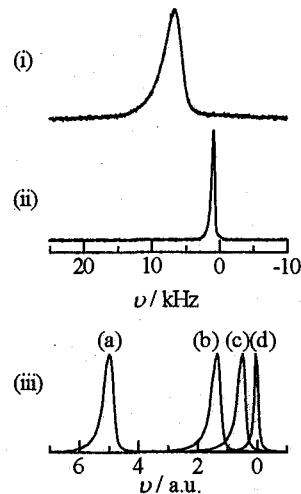


Fig. 2: ^{115}In -decoupled ^{31}P NMR MAS ($\nu_r = 10$ kHz) spectra of the powder sample of InP doped with (i) S and (ii) Zn. (iii) shows calculated spectra with the carrier density of (a) $8.5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$, (b) $2.5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$, (c) $1.1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ and (d) $3.3 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$.

[1] B. Kane, Nature 393, 133 (1998).

[2] T. Shimizu, A. Goto, K. Hashi, and S. Ohki, Superlattice. Microst. 32, 313 (2002).

[3] T. Iijima, K. Hashi, A. Goto, T. Shimizu, S. Ohki, J. Phys. Soc. Jpn. 73, 1045 (2004).

固体相関 NMR による化学結合および空間を通じた無機化合物中の連鎖構造解析

(新日鐵先端研¹、日本電子²)

○金橋康二¹、根本貴宏²、齋藤公児¹

Information on Connectivity between Heteronuclei in Solid State Inorganic Materials using Through-bond and Through-space Correlation NMR

Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Laboratories¹, JEOL Ltd.²

○Koji Kanehashi¹, Takahiro Nemoto², Koji Saito¹

It is very important to estimate connectivities between heteronuclei in solid-state materials as well as solutions. The internuclear correlation spectra in solid-state NMR provide detailed information on chemical bonding and chemical structure of solid state materials. Although the through-space technique, such as cross-polarization (CP), via strong dipolar couplings with the range of kHz was mainly used to obtain internuclear correlations, more recently, some experiments based on J -couplings (through-bond) with the range of a few tens of Hz have been proposed. In this study, we applied both techniques of through-bond and through-space to analysis of connectivity between a quadrupolar nucleus (^{27}Al) and a spin-1/2 nucleus (^{31}P) via bridging oxygen in amorphous aluminophosphate ($\alpha\text{-AlPO}_4$), and compared two methods.

【はじめに】

異種核間の相関 NMR スペクトルを得ることは、測定対象材料の連鎖構造情報を得るために有効な手段である。しかしながら、これまでに四極子核を含んだ固体相関 NMR に関しては、世界的にも測定例があまり多くないのが実情である[1-4]。今回、四極子核とスピン 1/2 の核の連鎖構造に着目し、 J 結合を利用した through-bond 的な相関 NMR と、双極子相互作用を利用した through-space 的な相関 NMR を用いて、無機酸化物材料の連鎖構造解析を実施し、それらの手法の比較と有効性について検討した。

【実験】

NMR スペクトル測定には、JEOL ECA-700 (^{27}Al ; 182.4 MHz, ^{31}P ; 283.4 MHz, 4mm ϕ JEOL 製 X-Y ダブルチャンネルプロブ、試料回転速度; 18 kHz) を使用した。測定に用いた試料は、 ^{17}O ラベルされた $\alpha\text{-AlPO}_4$ ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 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) を用いた。固体相関 NMR の測定では、CP HETCOR シーケンス (through-space) (Fig. 1(a)) および MAS J -HMQC シーケンス (through-bond) (Fig. 1(b)) [3] を用いた。 ^{27}Al 及び ^{31}P 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、(NH₄)₂HPO₄; 1.33 ppm とした。

固体相関 NMR、through-bond、through-space、連鎖構造

かねはしこうじ、ねもとたかひろ、さいとうこうじ

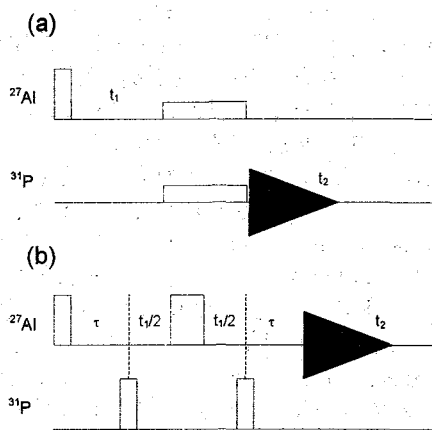


Fig. 1 Pulse sequence of (a) CP HETCOR and (b) MAS J -HMQC.

【結果・考察】

まず、 α - AlPO_4 の ^{27}Al MAS 及び ^{31}P MAS スペクトルを測定したところ、 ^{27}Al MAS スペクトルでは、主に3本のブロードなピークが観測されており、低磁場側から4, 5, 6配位のAlに対応している。 ^{27}Al MQMASの実験により、このブロードな線幅はアモルファス構造に由来する化学シフトの分布によるものであることがわかった。また、 ^{31}P MAS スペクトルも同様にブロードなシグナルを示しており、若干低磁場側に裾を引いていることから、複数のサイトの存在が示唆された。

そこで、結合を介した連鎖構造情報を得るために、MAS J -HMQC の測定を実施した。結果をFig. 2に示す。Fig. 2を見ると、4, 5, 6配位のAlの全てがPとの相関ピークを示していることがわかる。この結果から、 α - AlPO_4 にはXRDで観測されるような長周期的な構造は存在しておらず、4, 5, 6配位のAlがランダムに存在しているものの、ミクロの視点から見れば AlPO_4 の基本骨格構造であるAl-O-P (P^2)の結合様式は保持していることがわかった。

アモルファス材料においては、構造の長周期的な規則性が欠如しているため、結合を介した連鎖構造ばかりでなく、空間的な連鎖構造情報を得ることが重要であると考え、 $^{27}\text{Al} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP HETCOR スペクトル測定を実施した。その結果、Fig. 3に示すように4配位Al、5配位Al、6配位Alはそれぞれ1個、2個、1個の相関ピークを示し、Fig. 2とは異なった相関シグナルが得られた。特に興味深いのは、5配位Alが2種類の Q^2 (-15 ppm, 31 ppm)と空間的に近いことである。through-bondの結果と合わせて考えると、 α - AlPO_4 はAl-O-Pの結合状態を持ちながらも、3次元的に複雑なネットワーク構造となっていると考えることができる。

【まとめ】

今回、through-space 及び through-bond を利用した固体無機酸化物材料の連鎖構造解析を行った。無機材料においては、連鎖構造はその材料の物性に大きく影響する。そこで、MQMAS法によって得られるOやAl等の直接の化学構造情報[5]の他に、まず結合を介した情報を得て、さらに空間的な情報を合わせて考察することが重要であり、長周期構造を持たない無機系材料の化学構造解析に対して有効な知見を与えるものと考えられる。

【文献】

- [1] C. A. Fyfe, K. C. Wong-Moon, Y. Huang and H. Grondy, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 10397.
- [2] C. A. Fyfe, H. Meyer zu Altenschildesche, K. C. Wong-Moon, H. Grongey and J. M. Chezeau, *Solid State NMR*, **9** (1997) 97.
- [3] D. Massiot, F. Fayon, B. Alonso, J. Trebosc and J.-P. Amoureux, *J. Magn. Reson.*, **164** (2003) 160.
- [4] J. W. Wiench and M. Pruski, *Solid State NMR*, **26** (2004) 51.
- [5] K. Kanehashi and K. Saito, *Chem. Lett.*, **7** (2002) 668.

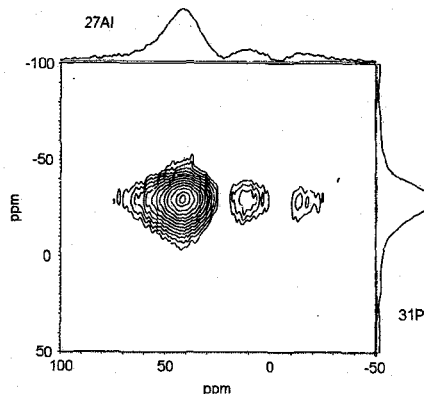


Fig. 2 MAS J -HMQC (^{31}P) ^{27}Al spectrum of α - AlPO_4 , $\tau = 5.0$ ms.

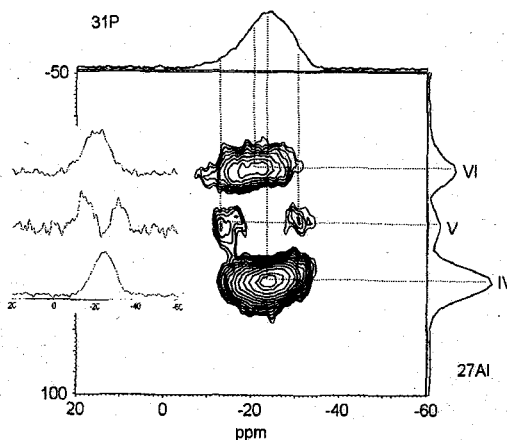


Fig. 3 $^{27}\text{Al} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP HETCOR spectrum of α - AlPO_4 , contact time: 3 ms, ^{27}Al irradiated position: 20 ppm.

(日鐵テクノロジー) ○ 畠山盛明
 (新日鐵 先端研) 齋藤公児、金橋康二
 (日本電子) 根本貴宏

Solid-State ^{25}Mg NMR of Various Inorganic Compounds

(Nippon Steel Techno Research) Moriaki Hatakeyama

(Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Lab.) Koji Saito, Koji Kanehashi
 (JEOL Ltd.) Takahiro Nemoto

Magnesium has an important role in various inorganic compounds, such as minerals, glasses and ceramics as well as biochemical compounds. Because NMR is a very useful technique for structural analysis of non-crystalline compounds, ^{25}Mg NMR is considered effective in characterization of these industrial compounds. However, solid-state ^{25}Mg NMR has disadvantages of second-order quadrupolar broadening and considerable low frequency. Therefore, The application of ^{25}Mg NMR is limited to simple compounds. In this study, we have tried to apply ^{25}Mg NMR to more complicated compounds, such as slag. Moreover, we successfully obtained ^{25}Mg 3QMAS spectra in several industrial compounds.

1. はじめに

Mg は生体系ばかりでなく、天然鉱物やガラス、セラミックス等の物質科学の分野において、非常に重要な元素である。NMR は X 線と異なり、結晶性の低い材料の測定も可能であることから、実用材料中の Mg の存在状態解析にも有効であると考えられる。しかしながら、固体 ^{25}Mg NMR の測定には、①四極子核であること ($I=5/2$)、②低共鳴周波数であること (18.4 MHz at 7.0 T) が原因で、従来は比較的核四極子結合定数 C_Q が小さく、単純な材料系の測定に限られてきた[1]。そこで今回は、高磁場 NMR(16.4 T)を用いて、より C_Q の大きい実用材料系への固体 ^{25}Mg NMR の展開を図ることを目的とした。さらに、いくつかの材料系に対して ^{25}Mg 3QMAS 法を適用した結果、より詳細な構造情報を得ることができたので報告する。

2. 実験

測定に用いた試料および主な元素の化学組成を Table 1 に示した。モンモリロナイト (月布) および合成サポナイトは、粘土学会より提供されたものを用いた。

NMR 測定には、日本電子製 ECA-700 (16.4 T, ^{25}Mg : 42.85 MHz) を使用し、試

料管は 4mm 管を使用した。回転数は 18 kHz とした。 ^{25}Mg NMR の化学シフトの基準は外部基準として： MgSO_4 飽和水溶液を 0 ppm とした。また、測定には日本電子製の低周波数対応プローブ (30.0~68.5 MHz at 16.4 T) を使用した。シーケンスは MAS および echo 法を採用した。3QMAS スペクトル測定では、z-filter 型の 3 パルスシーケンスを用いた。測定試料によって T_1 が大きく異なることから、パルス繰り返し時間は 1 (Montmorillonite) ~148 (MgO) s に設定した。

Table 1 Chemical composition of samples.

Sample	SiO ₂ /%	Al ₂ O ₃ /%	MgO/%	CaO/%
Saponite	46.6	4.7	25.3	0.1
Montmorillonite	55.3	19.9	3.4	0.5
Slag-A	28.6	8.0	15.1	37.7
Slag-B	24.6	16.4	14.7	37.0
Phlogopite	40.2	13.2	25.7	0.2
Vermiculite	37.9	14.7	22.3	5.8

低周波核、 ^{25}Mg 、高磁場固体NMR、無機化合物、エコー法

はたけやまもりあき、さいとうこうじ、かねはしこうじ、ねもとたかひろ

3. 結果

Fig.1 に示すように MgO および Mg₂Si は C_Q ~ 0 MHz であり、非常にシャープなシグナルを示した。²⁷Al NMR スペクトルと同様に、²⁵Mg NMR スペクトルの化学シフトの値と配位数の間に相関が見られており、26.6 ppm の MgO は 6 配位 Mg、62.0 ppm の Mg₂Si は 4 配位 Mg に相当している。また、Mg(OH)₂ のスペクトル(Fig.1)は四極子分裂のパターンを示しており、3QMAS スペクトル(Fig.2)によって Mg は 1 サイトであることが確認された。また、層状粘土鉱物であるモンモリロナイトは Mg の濃度が低いいため、多数の積算を要し、T₂が短いためプローブリングの影響を受けるが、echo 条件を最適化することによって良好なスペクトルが得られた。既報と比較すると[2]、高磁場の効果によって、シグナルは明らかに先鋭化している。また、その化学シフト値から、Mg の配位数は 6 配位と推定され、結晶構造に矛盾しない結果が得られた。

次に複雑な構造を有すると考えられるスラグへの適用を行った。Fig.1 に示すようにスラグ B 中の Mg はほぼ Mg(OH)₂ と MgO の混合物として存在しているのに対し、スラグ A はよりブロードなピークを示しており、それら以外の構造の存在が示唆されたことから、3QMAS スペクトル(Fig.2)の測定を実施した。積算には約 8 日間を要したが、Mg(OH)₂ や MgO 以外の化学構造が存在することを初めて証明できた。スラグ A のピークの C_Q は Mg(OH)₂ より大きくなっておりスラグの有する複雑な構造に起因していると考えられる。

以上のように、高磁場 NMR を用いることによって、従来測定対象外と考えられていた Mg のような低周波数核の測定も可能となった。さらに、高 rf 対応のプローブを用いれば、3QMAS 法によって ²⁷Al 等と同様に、詳細な構造解析が可能になることがわかった。Mg は有機、無機を問わず、重要な元素であることから、今後より幅広い材料系に展開が期待される。

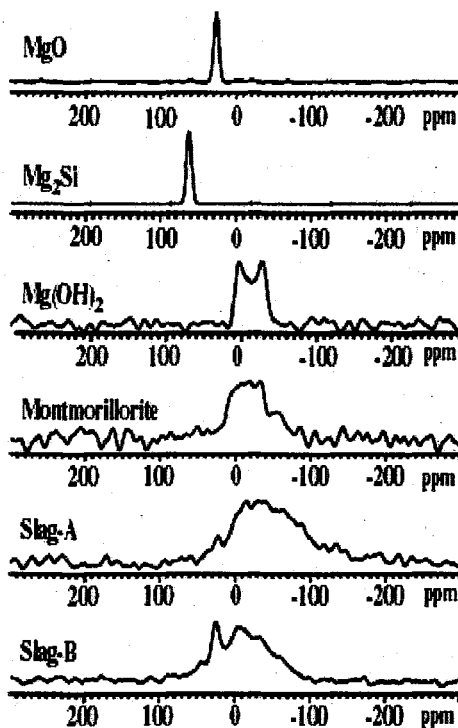


Fig.1 ²⁵Mg spectra of various inorganic compounds

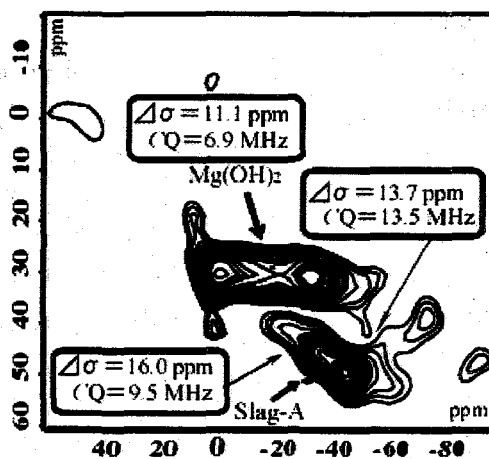


Fig.2 ²⁵Mg 3QMAS spectrum of Mg(OH)₂ and Slag-A

文献

- [1] R. Dupree and M. E. Smith, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1988) 1483.
 [2] K. J. D. MacKenzie and R. H. Meinhold, *Amer. Mineralogist*, 79 (1994) 250.

Structure analysis of B-C-N materials using ^{11}B and ^{10}B MAS NMR(Tsukuba Univ.¹, NIMS²)Yasuhiro Tobu^{1,2}, Takahiro Iijima², Tansyo Masataka², Shimizu Tadashi², Kishimoto Naoki^{1,2}, Taniguchi Takashi², Nakano Satoshi²

BCN has been expected for light-fine material having high-performances both about carbon materials and BN materials. However, research and development of BCN is not easy because structure analysis by X-ray diffraction is difficult.

This study try to measure ^{11}B , ^{10}B MAS NMR by 11.7 T high-resolution NMR in order to analyze BCN structure.

1、背景

炭素および窒化ほう素は、結晶構造のよく似た共有結合性の多形を有する。ダイヤモンド、黒鉛などの代表的で有用な炭素材料に対し、構造的に類する立方晶窒化ほう素 (以下 cBN)、六方晶窒化ほう素 (以下 hBN) は、同様の高い性能を示す。一方、ダイヤモンドは高温において鉄と反応するが cBN は反応しない、あるいは黒鉛は半金属であるが hBN は絶縁体であるなどの異なる物性も示す。

このような高性能を示す両物質の長所を併せ持ち、短所を補い新しい性質を産み出すことが期待される三元系物質に、炭窒化ほう素 (以下 BCN) がある。BCN は古くから合成が試みられ、その焼結体で黒鉛、BN に優る性質が報告されている。また BCN はいくつかの合成法により BC_2N 、 BC_4N 等の組成を持つ化合物が得られることが知られている。中でも結晶性の良い BC_2N の組成比を持つ完全な立方晶構造の物質が得られれば、BN・ダイヤモンドと同様高硬度を持ち、高温における金属との反応性についても新奇な物性を示すことが期待される。しかしながら、一般的な構造の決定、及び評価法である X 線回折法は、BCN 化合物に用いることが困難であり研究の進行を難しくしている。

本研究では NMR の元素識別能に着目し、 ^{11}B 、 ^{10}B MAS NMR 測定を行い、BCN 化合物の構造解析、評価法の確立のためのアプローチを試みた。

キーワード：固体高分解能、四極子核、炭窒化ほう素

とうぶ やすひろ、いじま たかひろ、たんしょ まさたか、しみず ただし、たにぐち あきら、なかの さとし

2、実験

測定は粉末状の試料を用いた。hexagonal系 BC_2N (以下 $h'BC_2N$) は Chemical Vapor Deposition (CVD) 法で合成した。cubic系 BC_2N (以下 $c'BC_2N$) はそれを高温高压処理して得られた。

NMR スペクトルは Tecmag 社製 APOLLO 分光器を用い、11.7 T の静磁場下で Chemagnetics 4 mm MAS プローブにより測定した。共鳴周波数は $^{11}B = 160.455$ MHz、 $^{10}B = 53.735$ MHz であり、MAS 速度は cBN 、 $c'BC_2N$ で $\nu_r = 16$ kHz、 hBN 、 $h'BC_2N$ で $\nu_r = 8$ kHz であった。

3、結果と考察

cBN 、 $c'BC_2N$ の ^{11}B MAS NMR 測定の結果について結果を Fig.1 に示す。 cBN では測定核が四極核であるにもかかわらず、比較的シャープなスペクトルが得られている。これは B のサイトが単一であり、また測定核周囲の電場勾配が小さいためである。対して $c'BC_2N$ のスペクトルはややブロードであるが、メインピークのケミカルシフトに cBN との違いがほとんど見られなかった。これは cBC_2N の合成に用いた cBN が多く残っているためであると思われる。

hBN 、 $h'BC_2N$ の結果を Fig.2 に示す。 hBN では四極核特有の構造をもったスペクトルが得られているが、 $h'BC_2N$ ではブロードで構造をもたないスペクトルが得られた。 hBN では構造上、測定核の周囲に大きな電場勾配を持つことが容易に予想されるが、 $h'BC_2N$ でも同様であり、そのために cBN 、 $c'BC_2N$ よりブロードなスペクトルが示されたと考えられる。さらに、 hBN では化学結合は B-N の一種類であり、B のサイトは単一であると考えられるが、 $h'BC_2N$ では C-B 間の結合により化学結合が多種類存在し、B のサイトおよびその電場勾配が複数存在すると考えられるが、得られたスペクトルからは、見出すことはできなかった。よって、 $h'BC_2N$ の複雑な構造を決定するためにより高分解のスペクトルを得る必要があり、高磁場 NMR を用いるか、MQMAS 測定が必要であると考えられる。

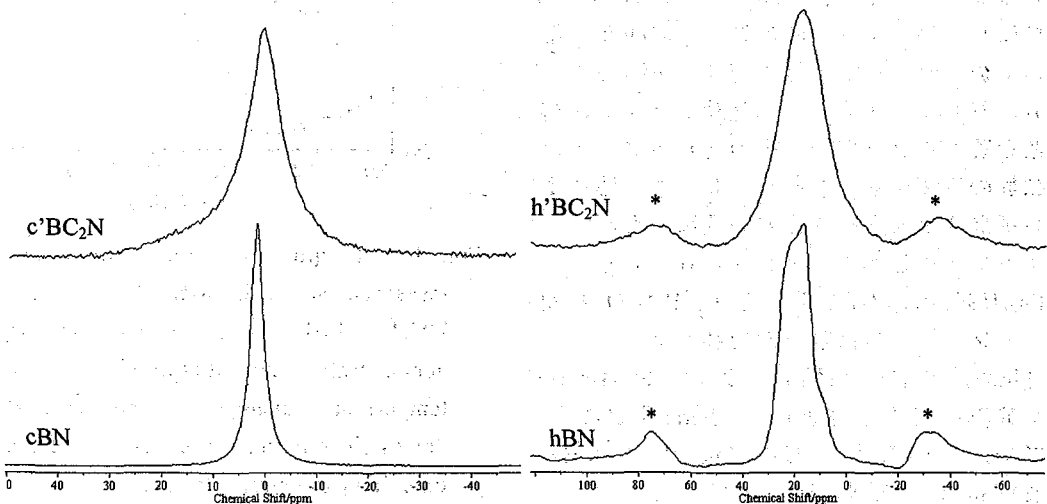


Fig.1: 160.455 MHz ^{11}B MAS NMR spectra of the cBN and $c'BC_2N$. The MAS speed was $\nu_r = 16$ kHz.

Fig.2: 160.455 MHz ^{11}B MAS NMR spectra of the hBN and $h'BC_2N$. The MAS speed was $\nu_r = 8$ kHz. *: spinning side band.

Proton relaxation and dynamics in $\text{Cs}_2(\text{HSO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)$

(Research Institute of Instrumentation Frontier, Nat'l Inst. of Adv. Ind. Sci. and Tech. (AIST))

Shigenobu Hayashi and Masagi Mizuno

$\text{Cs}_2(\text{HSO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)$ shows a large thermal history. The high-temperature phase (phase HT) is retained for a considerably long period on cooling. The original room-temperature phase (phase RT) does not recover on cooling from phase HT, and another room-temperature phase (phase RT2) is produced. ^1H NMR spectra indicate that reorientation of the SO_4/PO_4 tetrahedron takes place in phases RT and RT2 and that protons diffuse translationally in phases RT2 and HT. In all the phases the mean residence time of protons has a distribution, being demonstrated by ^1H spectral line shapes and ^1H spin-lattice relaxation times. Protons diffuse with the inverse of the frequency factor (τ_0) of 0.90×10^{-13} s and the activation energy (E_a) of 36 kJ/mol in phase HT, being obtained from analysis of the ^1H spin-lattice relaxation times. Reorientation of the SO_4/PO_4 tetrahedron limits the proton transport in phase HT as well as in phase RT2.

【序】 CsHSO_4 を初めとする無機固体酸塩では AO_4 型の四面体イオンが水素結合のネットワークを形成している。これらの物質は、水分を含まず、かつ 100°C 以上の高温で高いプロトン伝導を示すことから、燃料電池の電解質層の有力な材料として注目されている。我々は既に、 CsHSO_4 の II 相および I 相におけるプロトンの運動を ^1H NMR を用いて調べ報告した^{1,2)}。いずれの相においても、四面体イオンの回転運動がプロトン拡散を助けるとともに、その運動がプロトン拡散の律速過程であった。今回は、陰イオンが混合組成を持ち比較的低温でも高いプロトン伝導を示すことが知られている $\text{Cs}_2(\text{HSO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)$ を取り上げ、 ^1H NMR を用いてプロトンの拡散挙動を調べた。

【実験】試料は、硫酸セシウム(CsSO_4)とリン酸(H_3PO_4)から合成した。NMR測定には、ブルカーASX200(共鳴周波数 200.13 MHz)及びmq20 (19.65 MHz) を用いた。

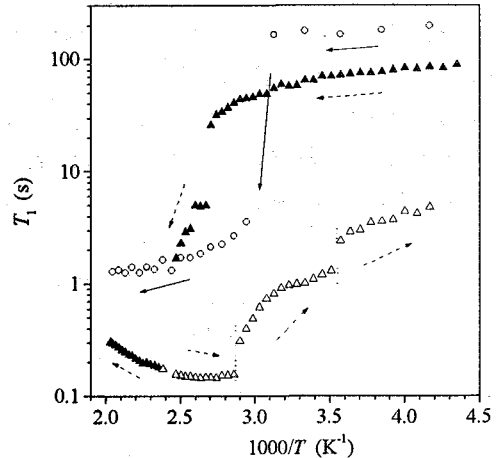


Fig. 1. ^1H spin-lattice relaxation times, measured at 19.65 MHz ($\blacktriangle \triangle$) and 200.13 MHz (\circ). The arrows demonstrate the direction of the temperature change. The vertical dotted lines indicate the position of the time delay of about half day.

固体NMR、プロトン拡散、超プロトン伝導、無機固体酸、水素結合

はやし しげのぶ、みずの まさぎ

【結果および考察】 示差走査熱量、 ^1H NMR スペクトルおよびスピン-格子緩和時間の測定結果から、試料が大きな熱履歴を示すことがわかった。Fig. 1には ^1H スピン-格子緩和時間の測定結果を示した。試料を最初冷却した後、昇温しながら測定を行い、HT相に到達した後は降温しながら測定した。図中の矢印は測定順序を表している。室温相 (RT相) の試料を昇温すると350K付近から相転移が始まり390Kに完全に高温相 (HT相、超プロトン伝導相) に転移する。一度HT相に転移した試料は転移温度以下に冷却してもしばらくはHT相を維持する。また、時間とともに元にもどる様子を示すが、完全には元にもどらない。この室温相をRT2相とする。Fig. 1において降温時のデータが不連続になっている点では測定の時間間隔があいている。

^1H スペクトルの線幅から、RT相及びRT2相では SO_4/PO_4 四面体の回転運動が起きていること、RT2相及びHT相ではプロトンの並進拡散が起きていることが示された。

試料の熱履歴を考慮してHT相の緩和時間を選び出し、Fig. 2に示したように解析した。磁場依存性が共鳴周波数の2乗より小さかったため、通常のBPP式では解析できず、相関時間にlog-normalの分布を入れて解析を行った。また、化学シフトの異方性の寄与も考慮した。Fig. 2中の線は計算値を示し、そこから、 $\tau_0 = 0.90 \times 10^{-13}$ s、 $E_a = 36$ kJ/molの値を得た。Fig. 3に平均滞在時間の温度依存性を示した。3本の平行線で示したが、両側の線はガウス型分布の半値全幅を示す。RT相やRT2相の ^1H スペクトルでも2成分以上の存在が示されており、単一成分の運動ではないと考えられる。Fig. 3には CsHSO_4 のI相の値も示した。 $\text{Cs}_2(\text{HSO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)$ と CsHSO_4 はほぼ同レベルのプロトン拡散を示すことがわかった。また、スペクトルの線幅や T_1 の極小値からHT相及びRT2相におけるプロトン拡散の律速過程が SO_4/PO_4 四面体の回転運動であることがわかった。

- 1) M. Mizuno, S. Hayashi: Solid State Ionics, 167 (2004) 317.
- 2) S. Hayashi, M. Mizuno: Solid State Ionics, 171 (2004) 289.

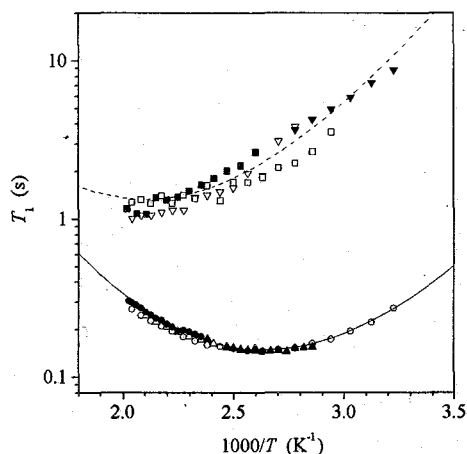


Fig. 2. Simulated results for the ^1H spin-lattice relaxation times in phase HT. Marks in the upper part and the lower part correspond to the observed results at 200.13 and 19.65 MHz, respectively.

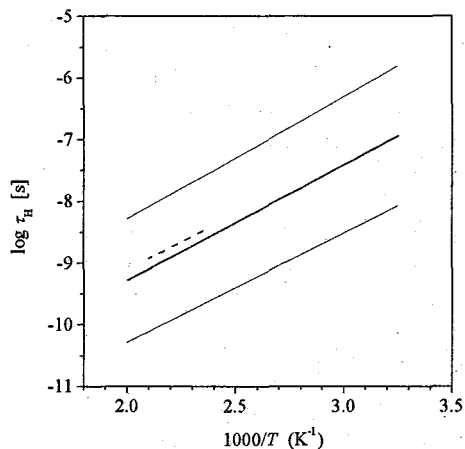


Fig. 3. The mean residence time of protons. The solid line and the chain line correspond to phase HT of $\text{Cs}_2(\text{HSO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)$ and phase I of CsHSO_4 [2], respectively. The three parallel lines indicate the distribution.

Development of a 4 Kelvin Cryogenic Probe for 500 MHz NMR

(¹GSC, RIKEN Yokohama Inst; ²Grad. Sch. Integ. Sci., Yokohama City Univ; ³Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo; ⁴Cell. Sign. Lab., RIKEN Harima Inst.)

○ Masato Takahashi^{1,2}, Takashi Horiuchi^{1,2}, Jun Kikuchi^{1,2}, Shigeyuki Yokoyama^{1,3,4} and Hideaki Maeda^{1,2}

A 4K cryogenic probe system has been developed for higher sensitivity gain than commercial system. When a RF coil of NMR is cooled down to 4K, higher sensitivity, temperature stability at the RF coil against large heat input can be achieved. The stability of the 4K cryogenic cooling system with a GM/J-T cryocooler and the quality factor of the RF coil in a cryogenic probe model have been investigated and a ¹H liquid probe for 500MHz NMR has been developed as a first step.

緒言

NMR 法の弱点である感度を向上させるために 4 ケルビン極低温プローブの開発を行っている⁽¹⁾。RF コイルを 4 ケルビンに冷却することで、従来の GM 冷凍機のみ利用の極低温プローブに比べて更なる高感度化が期待できるとともに、RF パルスによる発熱に対する温度変化が小さくなるためより高性能な極低温プローブが実現可能である。したがって、今後より高感度化が必要とされているメタボロミクスなどにも利用できる。現在、GM/J-T 冷凍機を用いて大きな発熱に対してもプローブを長期間安定に 4 ケルビンに冷却できる冷却システムと、500MHz NMR 用極低温プローブ本体の開発を行っている。極低温プローブでは、設計・製作した RF コイルを模擬試験装置で評価し、そのコイルを使って第一段階として ¹H プローブを製作している。最終的には 920MHz NMR 用の極低温プローブを製作することを目標とする。

冷却技術の開発

Fig. 1 は現在開発中の 500MHz 用極低温プローブとその冷却システムである。4 ケルビンでの冷却方式の違いを調べるために極低温プローブを接続せずに異なる冷媒で冷却試験を行った⁽²⁾。冷媒として①J-T 膨張によって得られる液体ヘリウムを利用する場合、②超臨界ヘリウムの場合、③多くの極低温プローブで使われているヘリウムガスの場合、の 3 条件で比較した。Fig. 2 にこ

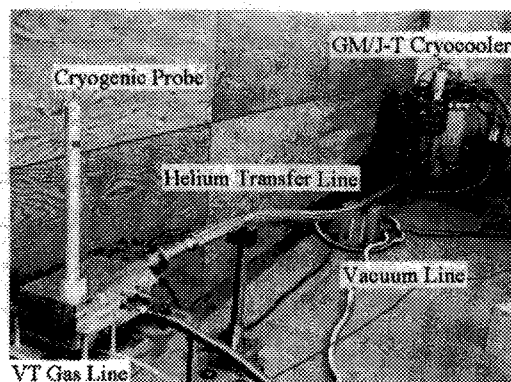


Fig. 1. 500 MHz Cryogenic probe

キーワード：極低温プローブ 4 ケルビン冷却 液体ヘリウム潜熱 高感度化

たかはしまさと、ほりうちたかし、きくちじゅん、まえだひであき、よこやましげゆき

れら3条件の冷却システムを比較した実験結果を示す。RF コイルは温度が変わると表面抵抗が変わり Q 値などの特性が変わってしまうため、この点に着目すると熱入力の変化に対してもっとも温度変化が小さいのは液体ヘリウムを利用した J-T 膨張システムであることがわかる。したがって、J-T 膨張によって発生した液体ヘリウムの潜熱を用いる冷却方式は他の方法と比較して安定した冷却が可能であり、温度制御の負担が少なくてすむ。

実際に極低温プローブを接続して液体ヘリウムを用いて冷却した実験結果を Fig. 2 に示す。プローブを接続しない場合に比べ冷凍能力が低下した。しかし、予想している RF パルスによる発熱約 1.5W に対し、J-T 膨張による液体ヘリウムの冷却システムでは、冷却温度 5.1 ケルビンにおいて冷凍能力 2.89W が得られた。したがって、より大きな発熱が発生する固体 NMR プローブでも本方式で対応可能である。

RF コイルの開発

500MHz 極低温プローブ製作のために、充分な B_1 磁場の均一度が得られるよう 3 次元電磁界シミュレータと実験の結果を比較しながら最適化設計を行い、RF コイルを製作した。このとき B_0 磁場を乱さないように構成材料についても検討を行った。製作した RF コイルの冷却試験の結果を Fig.3 に示す。本実験ではプローブ模擬試験装置全体の Q 値について測定を行った。冷却によって共振回路内の電気抵抗が減少して損失が減るほか、模擬試験装置内の同軸ケーブルの特性も向上する。室温で Q 値は約 130 であったが、冷却によって Q 値は大きくなり、10 ケルビンでは3倍の約 390 になった。このように冷却によって Q 値は向上するが、温度依存性が大きい。このため、RF パルスなどの短期的、局所的な発熱による温度上昇への対策が必要となる。また、サンプルでの損失は 500MHz の場合小さいが、サンプル調整などについても検討が必要となる。

参考文献

- (1) Yokota, H., Okamura, T., Ohtani, Y., Kuriyama, T., Takahashi, M., Horiuchi, T., Kikuchi, J., Yokoyama S. & Maeda, H. *Advances in Cryogenic Engineering*, (2004) **49** p. 1826-1833.
- (2) 高橋雅人ら 第 70 回春季低温工学・超電導学会概要集, (2004) p. 123

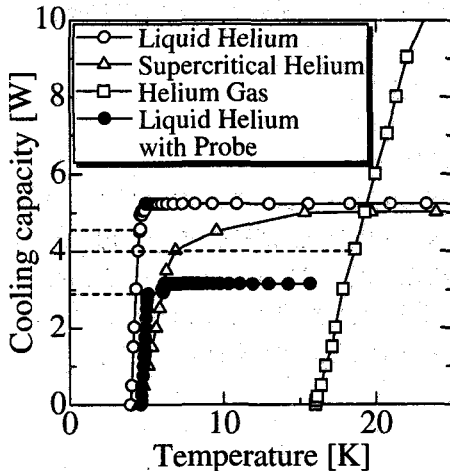


Fig. 2. Cooling capacity of various cooling systems

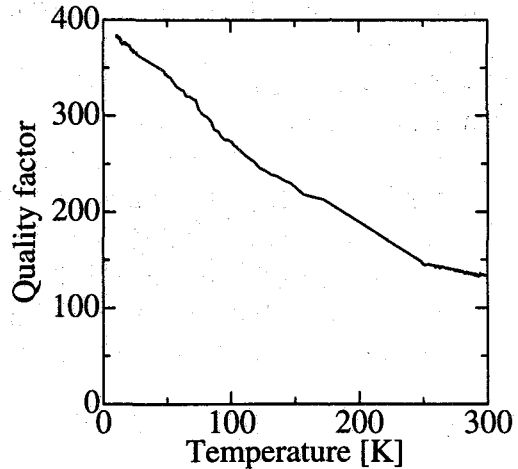


Fig. 3. Quality factor of 500MHz cryogenic probe model

Development of Crogen-free Superconducting Magnets for NMR

(JASTEC¹、Kobe Steel Ltd²)OYoshio Okui¹; Akihiro Otsuka¹; Ryouichi Hirose¹; Shinichi Fukumizu¹; Seiji Hayashi¹;
Satoshi Ito²

We designed and developed two types of superconducting magnets for NMR which eliminate the need for liquid nitrogen and liquid helium refilling. Both magnets are cooled with a pulse-tube(PT) cryo-cooler which features low-vibration to enable high resolution NMR use. One magnet is the recondensing type and the other one is the cryo-cooler cooled type. This report presents specifications of these magnets and outlines of developments.

1. 開発の経緯

近年、高磁場を用いた研究や産業分野で無冷媒タイプの超電導マグネットが普及している。その理由としては、簡単な操作で手軽に磁場が得られることやわずらわしい寒剤の補給が不要であることが挙げられる。特に寒剤の補給が不要であることはランニングコストの面から有利であり、また、寒剤の入手が困難な地域でも超電導マグネットが使用可能になるなど利点は多い。そこで我々は寒剤補給が不要なNMR用超電導マグネットとして2種類の試作機を開発した。一つは、冷凍機により液体ヘリウムを再凝縮するゼロボイルオフタイプであり、もう一つは、冷凍機のみでマグネットを冷却する無冷媒タイプである。

2. パルスチューブ冷凍機

無冷媒タイプの超電導マグネットでは、一般的にギフォード・マクマホン(GM)冷凍機を採用している。しかし、GM冷凍機はその構造から振動が大きいと、測定波形への影響を懸念してNMR用超電導マグネットでは採用されなかった。今回の試作機ではGM冷凍機に比べて低振動のパルスチューブ(PT)冷凍機を採用し、その影響を最小限としている。

3. マグネットの概要と仕様

3.1 ゼロボイルオフタイプ

試作機の模式図をFigure 1. に、主な仕様をTable1. 示す。

本タイプは従来のNMR用超電導マグネットと同様に液体ヘリウムによってマグネットを冷却している。しかし、冷凍機の2ndステージがヘリウム槽の上部に直結しており、その部分で蒸発したヘリウムを再凝縮して液化させるので、外部への液体ヘリウムの蒸発量はほとんどゼロである。また、液体窒素の代わりとして冷凍機の1stステージで冷却する輻射シールドを設けている。よって、寒剤の補給なしに運転を継続できる。

マグネット、寒剤、蒸発量

おくいよしお

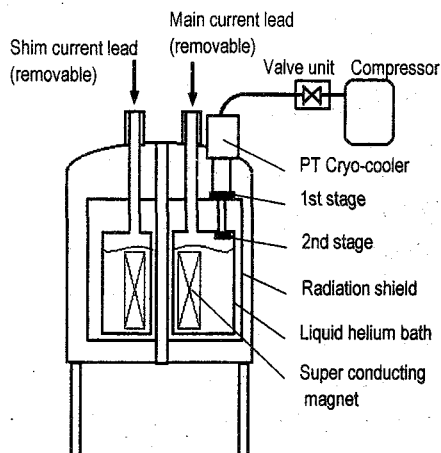


Figure 1. Model of the recondensing type

Table 1. Specifications of the recondensing type

Magnet specifications

Magnet type:	Actively shielded, Vertical bore
Central magnet field:	9.40 Tesla (400MHz ¹ H)
Filed Stability:	< 0.01 ppm/h (4 Hz/h)
Operating current:	95A
Filed homogeneity:	< 0.1 ppm/10mm sphere (Using S/C shim coils)
5 gauss stray field	Horizontal: < 1.0 m Vertical: < 1.5 m

Cryostats specifications

RT bore diameter:	53.84 mm
Overall height:	1577 mm (without stand)
Overall diameter:	795 mm

3.2 無冷媒タイプ

試作機の模式図をFigure 2. に、主な仕様をTable2. 示す。

本タイプは従来の無冷媒タイプと同様に冷凍機のみでマグネットを冷却しているため、元々寒剤は不要である。冷凍機の2ndステージは冷却板を介してマグネットに接続しており、1stステージは輻射シールドに接続している。

一方、PT冷凍機はGM冷凍機より冷凍能力が劣るので、励磁時の発熱に対し十分な冷凍能力を得ることができない。そのため、励磁時は補助冷却用に液体ヘリウムを用いる方式を採用した。励磁完了後、永久電流モードに移行すると発熱はなくなる。よって、補助冷却用の液体ヘリウムは不要となり、完全無冷媒の状態 で運転を継続できる。

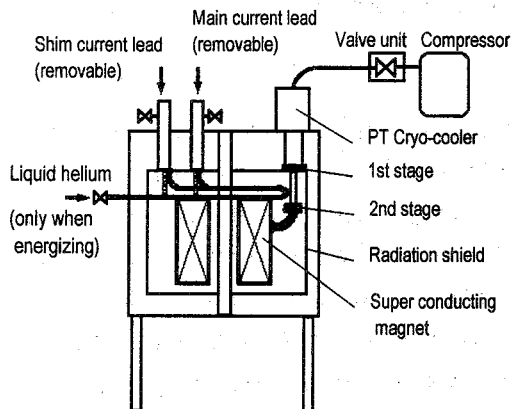


Figure 2. Model of the cryo-cooler cooled type

Table 2. Specifications of the cryo-cooler cooled type

Magnet specifications

Magnet type:	Actively shielded, Vertical bore
Central magnet field:	9.40 Tesla (400MHz ¹ H)
Filed Stability:	< 0.01 ppm/h (4 Hz/h)
Operating current:	90A
Filed homogeneity:	< 0.1 ppm/10mm sphere (Using S/C shim coils)
5 gauss stray field	Horizontal: < 0.8 m Vertical: < 1.4 m

Cryostats specifications

RT bore diameter:	53.84 mm
Overall height:	1137 mm (without stand)
Overall diameter:	745 mm

4. まとめ

寒剤の補給が不要なNMR用超電導マグネットを開発した。発表では本マグネットを用いて測定したデータも合せて報告する。

○若井篤志^{A,B}、中村和浩^{A,B}、Jeff Kershaw^{A,B}、David Wright^{A,B}、菅野巖^A

A:秋田県立脳血管研究センター

B:あきた産業振興機構

Hyperpolarized Xe-129 gas system by freezing within a high magnetic field

Akita Research Institute of Brain and Blood Vessels,

Akita industrial promotion foundation

Atsushi Wakai, Kazuhiro Nakamura, Jeff Kershaw, David Wright, Iwao Kanno

Abstract: To research the brain function by hyperpolarized ^{129}Xe , we devised a xenon gas system capable of supplying a large volume gas (over 500cc) by freezing within a high magnetic field. For human inhalation, the combined system of the optical pumping technique for the diluted xenon gas by the large volume helium and the freeze concentration of the polarized xenon by using liquid nitrogen has been used in low magnetic field (0.01~0.1T) since before. However, the polarizations of the gas decrease until about 1/3 of the beginnings. As a cause of the decrease, a short relaxation time of Xe in the temperatures close to the melting point had been indicated. We made the gas system using the main magnetic field of the 4.7T MR apparatus to suppress the polarization decrease. It is possible for our system to make gas again by rapidly heating from the solid Xe in the liquid nitrogen temperature within the field. The freeze tests of xenon in it are presented.

1、はじめに：

光ポンピング法による高偏極キセノンの生体内MR計測実験には、主にラット等の小動物が使用されてきたが、近年は、ヒトへの導入およびその脳組織からの計測もいくつかのグループで試みられている。しかしながら、ヒトへの導入は、偏極率の向上だけでなく、一度に導入できるガス体積の要請も強い。ラットの50ccに対し、ヒトの場合は0.5リットル以上が必要となる。通常この場合、キセノンにヘリウムを大量に加えた(98%以上)希釈ガスを偏極処理し、この中のキセノンを、液体窒素による氷結装置で氷結させ、必要とするガス量が蓄積されたところで、加熱ガス化して取り出す手法が採られている。ヘリウムはキセノンのスピン偏極に対してはバッファガスとして働くため、偏極率は65%以上にまで上げることも不可能ではない[]。しかしながら、この手法の欠点は、キセノンの相変化における偏極率の低下にある。非常によく注意された実験においても、取り出したキセノンの偏極率は22%である[1]。

キーワード: Hyperpolarized Xe, Laser polarized Xe, ^{129}Xe , 氷結濃縮、超偏極

著者: わかいあつし、なかむらかずひろ、じえふかーしょう、でびつどらいと、かんのいわお

この低下の原因のひとつとして、低温時の固体キセノンの融点近辺での緩和速度の上昇にある[2]。これは、従来使用されている磁場強度 0.1T を 1T 以上にすることにより改善される。そのため、4.7T 動物用 MRI 装置の磁場内で偏極および氷結濃縮させる偏極キセノンガス生成装置を製作した。

2: 装置構造

内容積 490cc の偏極用セルに氷結装置を接続し、4.7T 動物用 MRI 装置 (Varian, INOVA) のボア内 (226mmφ) にコンパクトにまとめた (図 1)。混合ガスは、キセノン、窒素およびヘリウムを任意の混合比で混合することができ、9気圧以下

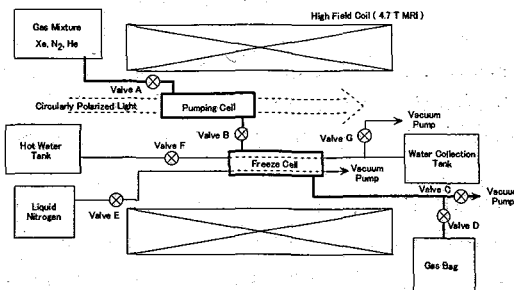


Fig.1 : Schematic of the optical pumping system.

で、この偏極装置に供給される。アルカリ金属としてルビジウムを使用し偏極セルの手前の配管内に事前に封入しておく。偏極ガス生成時には、周辺に巻いたリボンヒータにより、偏極セルとともに 100℃程度に加熱し混合ガス内にその蒸気をつくる。偏極のためのレーザー光として、強度 80W、波長 794.8nm の円偏光 (Coherent Inc, DUO FAP system) を使用している。

偏極したキセノン混合ガスは、液体窒素を用いた氷結装置により氷結蓄積される (図 2)。キセノンの流れる中央の銅パイプに液体窒素ラインをらせん状に巻き銀蝟溶接させている。外界とは、断熱真空により熱的に遮断されている。

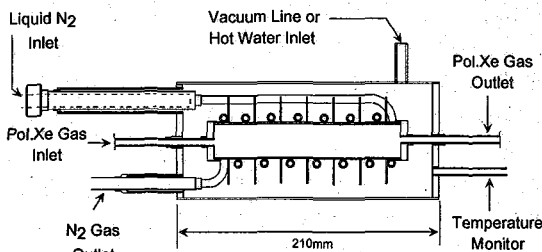


Fig.2 : Schematic of freeze cell.

3時間から6時間かけて偏極および氷結を連続的におこない、必要とする量のキセノンを蓄積する。その後、図 1 中のバルブ B を閉じ、断熱真空ラインと真空ポンプとの間バルブを閉じ、この断熱真空のエリアに温水を流しこむ。このとき図 2 中央のキセノンガスラインに接続されている多数のパッフル板が、効果的に氷結キセノンに温水の熱を伝える。

3、結果：製作後の動作確認テストとして、キセノンの氷結テストをおこなった。混合ガス (He 92%、N₂ 4% + Xe 4%) を、流量 25cc/分で連続的に供給し、4時間かけて氷結処理をおこない、その後、加熱再ガス化を試みた。氷結の前後でのガス成分を四重極質量分析計 (Prisma QMS200F2, Pfeiffer Vacuum) を使って計測したところ、濃度 4% のキセノンは、氷結処理により 34% となっていた。この装置は、氷結装置としての有効に機能していることが判明した。今後は、偏極の最適化に取り組む予定である。

(JST 地域結集型共同研究事業研究成果)

1 J.Fukutomi et al., "Analysis of the effect of foreign gases in the production of hyperpolarized ¹²⁹Xe gas on a simple system working under atmospheric pressure", JMR 160 (2003) 26-32.

2 N.N.Kuzma, B.Patton, K.Raman and W.Happer, "Fast Nuclear Spin Relaxation in Hyperpolarized Solid ¹²⁹Xe", Phys.Rev.Lett. 88 (2002) 147602.

3P150 NMR 信号を用いた高温超伝導バルク磁石の評価

((独) 理化学研究所¹、(株) イムラ材料開発研究所²)

○仲村 高志¹、越野 広雪¹、吉川 雅章²、伊藤 佳孝²

Evaluation of High T_c Superconducting Bulk Magnet By NMR signals

¹RIKEN, ²IMURA Material R&D CO., LTD.

Takashi Nakamura¹, Hiroyuki Koshino¹, Masaaki Yoshikawa², Yoshitaka Itoh²

We showed the NMR magnet by using High T_c Superconducting (HTS) bulk material last year. This work was evaluation of HTS bulk magnet using NMR signals. Our magnet was designed for NMR measurements. Its operated field strength 3T and 4.7T, bore size 5mm with the method that used stacked by 3 HTS bulks (60mm diameter, 10mm thickness X 2, 60mm diameter, 14mm thickness, 14mm was placed middle). HTS bulk magnet drove a 42K using the pulse tube refrigerator. And we measured signal stability and signal homogeneity by ¹H signal of silicon rubber. We determine field stability of this magnet is 0.4Hz/hour and field homogeneity is 12ppm/hhlw. This result indicates HTS bulk magnet has capability of NMR measurements.

【序論】 高温超伝導の発見により開始された研究の中に、いままでの金属超伝導体では応用、実用化がされなかった形態であるバルク（固まり）での応用がある。金属超伝導体は超伝導転移温度(T_c)が低く、比熱が小さいためピン止めが安定に出来ず超伝導状態が崩壊する現象（クエンチ）が知られている。バルク状態は、特に比熱の影響が大きく、金属超伝導体ではまったく実用化できなかった。しかし、高温超伝導体は T_c が高い(90K)ため、バルク体としての実用化が可能となり、新規の研究分野が開拓された。昨年、富田らによって高温超伝導バルクによる磁石が静磁場着磁によって 17.24T に達することが報告され¹⁾、この素材が大きく注目されている。例えば、永久磁石では達成できなかった強力な磁石部品（蓄電用の大型フライホイールの軸受け、磁気分離用の磁石、磁気浮上列車の磁石等）での応用研究が始まっている。昨年、我々はこのバルク体で磁石を作成し、NMR 信号の世界初の観測に成功したことを報告した。本年は、この磁石が高分解能 NMR 用の磁石として実用化が可能かどうかを NMR の信号で評価したので、これを報告する。

【実験】 熔融法 (melt-growth) で作成した直径 60mm のバルク体の中心に 10mm の穴をあけ、このバルク体を 3 組 (上下段 10mm 厚、中段 14mm 厚) 同軸上に積算することにより、現在の超伝導磁石と同様の構造である真空容器に室温ボア空間をもつ磁石を設計した。これはバルク体を NMR 用の超伝導磁石で静磁場着磁する為である。バルク体の着磁方法には静磁場着磁以外にパルス磁場を用いたパルス着磁も用いられるが、2 段以上のバルク体を積算した構造を持つ磁石ではパルス磁場がバルク体を均等に磁化できず、結果として均一磁場領域が形成できないことを我々は確認しており、均一磁場の必要な NMR 用磁石には静磁場着磁が必須条件なのである。今回、我々は作成した磁石を JASTEC 社製 JRTC-300/89(7T, Wide Bore)で磁場中冷却法(Field Cooling Method FCM)により、昨年と同じ 3T とプロトンの共鳴周波数が 200MHz に相当する 4.7T に着磁した。図 1 は、着磁後のそれぞれの Z 軸方向の磁場分布をホール素子(F.W.BELL 6010 型ガウスメーター)で測定したものである。与えた外部磁場の強度に関係なく、Z 軸方向に磁石内部に均一な磁場空間が形成されていることが分かる。

キーワード：超伝導磁石、高温超伝導体、バルク体

なかむら たかし、こしの ひろゆき、よしかわ まさあき、いとう よしたか

この均一な磁場空間内で NMR 信号の観測が可能となる。図 2 に 3 T での磁場安定性の実験の結果を示す。自作の直径 3mm ソレノイド型プローブに角 1mm、長さ 4mm のシリコンゴムを挿入し、シングルパルスで観測した。Z 軸方向に位置をずらしながら NMR 信号の確認をし、信号強度、信号の分解能が最良の位置を決定した(磁石最上部より 92.5mm)。この位置でパルス幅 1.3 μ sec、繰り返し時間 15sec、積算回数 240 回に設定し、24 日間プローブ位置を固定してデータ収集した。もともとの分解能が良くないが、磁場の安定度は NMR 装置として十分な安定度といえる。バルク磁石は、超伝導線材の接続点等のある現在の超伝導磁石と異なり、本質的な磁場の減衰の原因になる要素がない。今回の測定結果で明らかにされた磁場減衰の原因はバルク内部の自己閉回路内の熱損失と考えるのが妥当だが、高温超伝導バルクの物性を知る興味深い現象で今後の研究課題と考えられる。

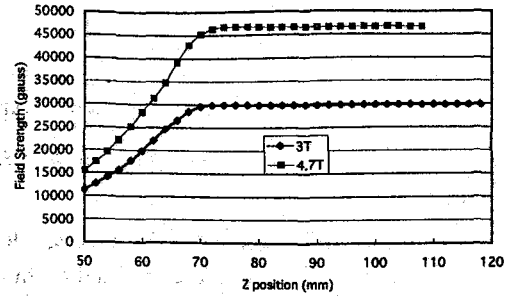


Fig.1 Trapped magnetic field of Z-axis distribution

磁場安定性が充分実用化可能となれば、NMR にとって必要なのは、感度と分解能である。このために磁場強度を 3T から核磁気共鳴装置として 200MHz に相当する 4.7T に変更し、実験を試みた。高温超伝導体は酸化物であるので磁化されることで内部磁場の電磁力を受け、その応力で自壊してしまう。このため昨年より大型のバルクを使用している今回の実験ではバルクの円周部をより厚いステンレスでカバーし、強化している。自壊することなく 4.7T で安定した磁石に対して、200MHz に調整した自作プローブでプロトンの共鳴信号の観測を行った。図 3 が 4.7T で感度、分解能の最良点で観測したスペクトルである。パルス幅 1.6 μ sec、繰り返し時間 4sec、積算回数 24 回でデータ収集した。昨年と比べて感度は飛躍的に向上した。半値幅は 12ppm とバルクの大型化、Z 方向にはバルクの積算を増やすことによって実用化にあと少しのレベルに迫った。

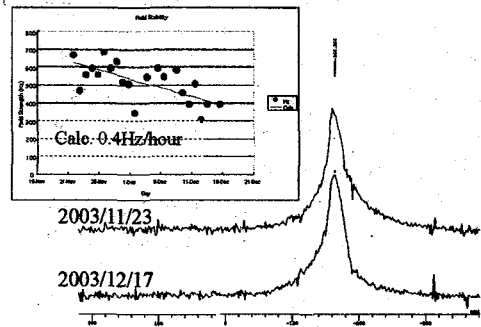


Fig.2 The HTS bulk magnet Field stability experiment for 24 days.

【考察】 昨年の結果を踏まえ、バルク体の大型化(直径 36mm から直径 60mm)やバルクの増加(2 個から 3 個)で核磁気共鳴観測用の磁石としての安定性と感度を得られた。分解能はまだ実用化のレベルにないので、さらに改良が必要である。このような小型の磁石に最適化した磁場補正装置の開発が必須で、今後の開発課題である。これらの課題をクリアすれば小型で冷媒の必要のない超伝導磁石が開発できるであろう。

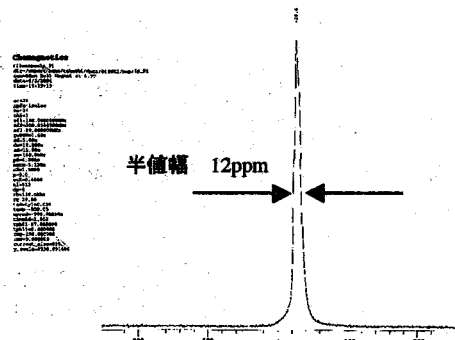


Fig.3 NMR Spectra of ^1H silicone rubber at 4.7T HTS bulk magnet.

1) Tomita M, Murakami M, Nature, 517, 421(2003)

1P151★ 1GHz 級 CPMAS プロブの開発

(日本電子㈱)

○根本 貴宏、長谷川 憲一、杉沢 寿志、樋岡 克哉、志野 英雄、下池田 勇一、神成 さらら

Development of 1GHz-class CPMAS probe

JEOL Ltd.

T.Nemoto, K.Hasegawa, H.Sugisawa, K.Hioka, H.Shino, Y.Shimoikeda, S.Kannari

A balanced circuit double-tuned solid-state NMR probe was developed for ultra high field magnet. We built this probe and tested the fundamental performance using 700MHz NMR system (JNM ECA700). We will report some basic NMR data on JNM ECA700

【はじめに】

超高磁場固体 NMR 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。そこで、我々は、超高磁場固体 NMR に対応すべく、ナローボア(NB)用高磁場固体プロブを製作し、第 41 回 NMR 討論会において、NB 高磁場固体ダブルチューニングプロブの可能性を示した。^{1) 2) 3)} 今回は、700MHz ^{13}C - ^1H のダブルチューニングプロブを製作し、改良、最適化を加えながら、基本的な NMR データの取得を試みた。また、700MHz の実験を基に、930MHz のダブルチューニング回路も製作し、ベンチテストのレベルで評価した。

【製作】

電気回路は耐圧を重視した平衡共振回路とし、円筒フレームを採用した。Fig.1 に回路の概略図を示す。平衡共振回路の特徴は、以下の通りである。

① B_1 強度分布 均一性の向上

HF、LF とも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_1 強度も最大になり、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を 0 となるので、電気回路に加わる電圧は不平衡回路の半分となる。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。

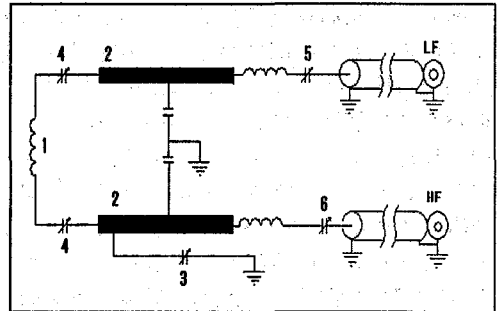


Fig.1 Double-tuned probe circuit using balanced circuit
(1:Sample Coil 2:Resonator 3:HF tune 4: LF tune 5: LF matching 6:HF matching)

【実験】

700MHz CPMAS プロブ

第 41 回 NMR 討論会で発表した回路にトランスミッションラインの最適化を行った 4mm CPMAS プロブを製作し JNM ECA700(NB)を用いて、パルス幅、感度の測定をおこなった。Rotor は、外径 4mm 窒化珪素試料管を用い、最高 20kHz の安定した回転を得ることができた。また分光計 JNM-ECA700 は、LF 出力は 1kW、HF は出力 500W であった。パルス幅の測定(^{13}C , ^1H)には、Adamantane (ADM)を用い測定し、感度の測定には、ヘキサメチルベンゼン(HMB)を用い測定した。

【結果】

JNM ECA-700 を用い、製作したプロブの NMR 測定を行った。また得られた ADM のニューテーションデータを Fig.2、HMB のスペクトルを Fig.3 に示す。

キーワード：CPMAS 2重共振 平衡共振回路 高磁場NMR

ねもとたかひろ、はせがわけんいち、すぎさわひさし、ひおかかつや、しもいけだゆういち、しのひでお、かなりさらら

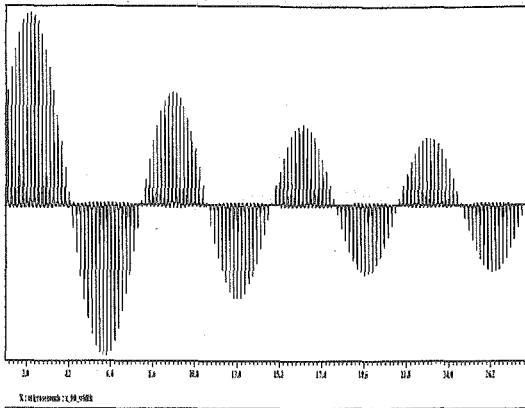


Fig.2 ^1H Nutation spectrum of adamantane under $P_w(90)=2.0\mu\text{sec}$ with 220W power at probe

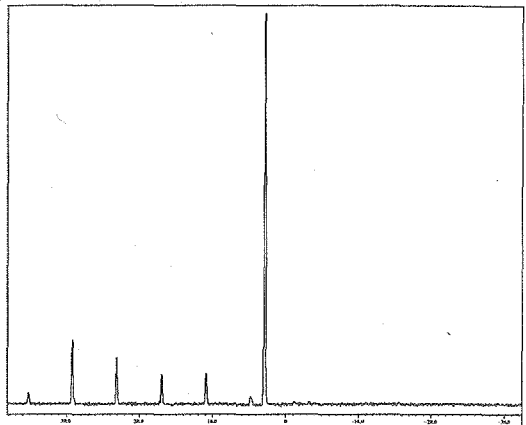


Fig.3 ^{13}C CP/MAS NMR spectrum of hexamethylbenzene (HMB) illustrating the best S/N(=400:1) achieved for 37mg of HMB using a 4mm rotor with 8scans, a contact time of 5ms for the Hartman-Hahn match, a relaxation delay of 30s.

930MHz CPMAS プローブ

不平衡共振回路では、高磁場なほど、サンプルコイル長に対して波長が無視できなくなり、サンプルコイルに発生する高周波磁場強度分布のバランスが取りづらくなる。一方、平衡共振回路では、周波数に関係なく高周波磁場強度分布のバランスが取れるという特徴がある。そこで、930MHz という高磁場で、平衡共振回路が動作することを確認するため、700MHz 平衡共振回路の最適化から得られた知見を活かし、トランスミッションラインを930MHz 向けに最適化した CPMAS プローブを製作した。今回製作したプローブの全体写真を Fig.4 に示す。また、ベンチテストで得られた結果を Table1 に示す。

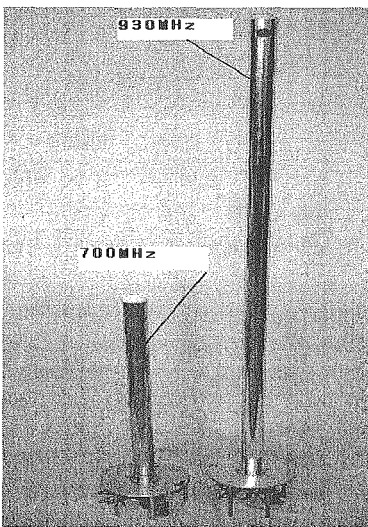


Fig.4 Probe picture of 930MHz CPMAS probe (Compare to 700MHz CPMAS probe)

	Freq(MHz)	Q	RL(dB)	iso(dB)
^{13}C	230	170	-35	-45
^1H	930	220	-40	-60

Table1 Electric data for 4mm ^{13}C - ^1H balanced circuit probe for a 930MHz Narrow Bore Magnet

この結果から、本プローブは 700MHz CPMAS プローブと同程度の 90° パルス幅が得られると、期待される。

【結び】

平衡共振回路を用い、高磁場対応の CPMAS プローブを作成し、NMR データの取得に成功した。今後は、930MHz CPMAS プローブの NMR データ取得を試みる。

引用文献

- 1) 長谷川憲一 他 第41回 NMR 討論会講演要旨集 P136 「ナローボア用固体高磁場固体ダブルチューニングプローブの開発 1」
- 2) 志野英雄 他 第41回 NMR 討論会講演要旨集 P137 「ナローボア用固体高磁場固体ダブルチューニングプローブの開発 2」
- 3) Hasegawa Kenichi US. patent No.6686741 「Multiple-tuned circuit and probe for NMR spectrometer」

Development of a functional distributed
and accumulated pulse generator
(Institute for Molecular Science) Osamu OISHI

The pulse generator which can extend the number of output channels was manufactured using the pulse generator modules and the microcomputer for module control. The pulse generator module manufactured using the RISC type microcomputer (50MHz) has the following performances. (1) The minimum pulse width is 400ns. (2) The time resolution is 20ns. (3) The number of pulse outputs is 16 channels. The shape of the output waveform of this pulse generator is smaller than 1ns, and can be used as a pulse generator for NMR.

【序論】

発表者らは以前、TTL回路で16チャンネルのパルスジェネレーターを自作し、パルス磁場勾配NMRの実験に用いてきた^{1,2)}。しかしながら、NMR装置の発達と共に、RFパルスの他、磁場勾配パルスやデジタル-アナログ変換を通した任意波形の出力等により、多チャンネルのパルスジェネレーターが用いられるようになってきたため、パルスジェネレーターもまた測定条件によって機能を変換、増設できる事が望まれる。一方で最近の組み込みマイコンの持つ性能と扱いやすさの向上、及び低価格化により、特化した機能を持つ複数のパルスジェネレーターユニットを組み合わせる最適なNMRパルス系列を構築する事が可能になった。そこで、多チャンネルのパルス出力が可能なパルスジェネレーターを高速マイコンを用いてモジュールとして製作し、パルスジェネレーターモジュールを任意に増設可能なように、制御用マイコンを経てコンピューター制御できるようにした。

【モデル】

パルスジェネレーターは、Figure 1に示すように制御用コンピューターでパルスジェネレーターモジュール制御用マイコンを制御し、制御用マイコンが複数のパルスジェネレーターモジュールを制御する構造にしている。この構造では制御コンピューターの通信線は1本ですべて行くと同時に、制御用マイコンを経由させずとも単独のパルスジェネレーターモジュールはコンピューターで直接制御できる。複数制御はパルスジェネレーターモジュールの通信線をリレースイッチで切り替える事で可能で、制御用マイコンのI/O出力でパルスジェネレーターモジュールのリセットをコンピューター側からかけることも可能である。

通常のパルスジェネレーターの時間安定性と時間分解能は、水晶発信機の精度とカウンタが1ループに要する時間で決まるが、待ち時間を1クロックづつずらしたサブルーチンをカウンタが1ループに要する時間の分だけ用意した構造では、1クロックの時間分解能を持たせる事が可能である。また同一の外部クロックを分配供給する事でモジュール間の完全同期も可能である。

【製作】

NMRに用いられるパルスジェネレーターに要求される条件は(1)水晶発振機かそれ以上の精度の安定性、(2)100ns以下の時間分解能、(3)1 μ s以下~1秒以上のパルス幅、(4)同じ基準クロックを用いるこ

キーワード：パルスジェネレーター・組み込みマイコン

おおいし おさむ

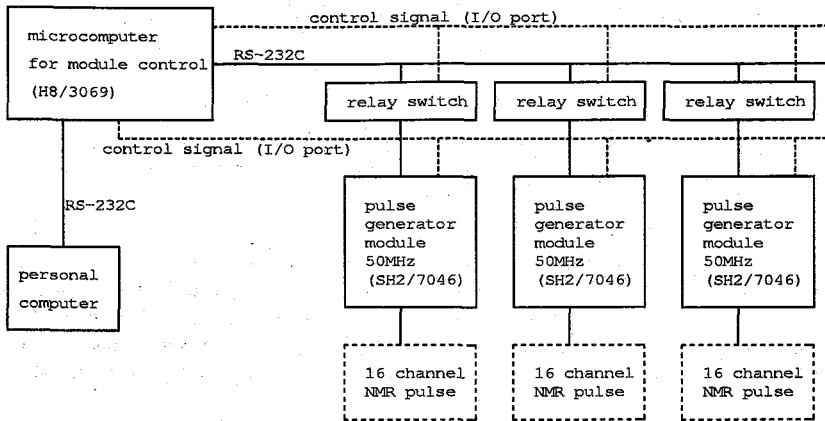


Figure 1. The model of pulse generator

とによる、出力チャンネル間のパルスの同期性、(5)1モジュールあたり8~32bitの同期的I/O出力、(6)100パルス以上のパルス系列を蓄えられる事、が上げられるが、現在市販されている組み込み用マイコンの性能はこれらの条件を総て満たす物が既に存在している。

今回は日立製SH/7046を用いたマイコンボードをパルスジェネレーターモジュールに使用し、複数のパルスジェネレーターモジュールをコントロールするマイコンとして日立製H8/3069を用いたマイコンボードを使用した。SH/7046は50MHz駆動、12kbyteのSRAMと256kbyteのフラッシュROMを内蔵するRISC型の32bitマイコンであり、NMRのパルスジェネレーターに要求される条件を満たしている。今回製作したパルスジェネレーターの出力はコネクタ数などの関係から16bit(16チャンネル)の出力にしている。またH8/3069は25MHz駆動、16kbyteのSRAMと512kbyteのフラッシュROMを内蔵するSISC型16bitマイコンであり、外部に2MbyteのDRAMを乗せたマイコンボードを用いた。

これら二種類のマイコンを用いてFigure 1に示すモデルの通りパルスジェネレーターを製作し、パルスジェネレーター全体の制御はパーソナルコンピューターで行えるようにした。使用した2種類のマイコンはシリアル通信機能(RS232C)を2個ずつ持っているので、3線式のシリアル通信で、コンピューター及びマイコン間の通信を同時に行うことができる。また、通信線をリレースイッチで切り替えることにより、制御用マイコンのI/Oポートの数だけ、パルスジェネレーターモジュールを増設して、制御することが可能である。開発環境にはOSとしてPC-UNIXのNetBSDを用い、開発言語にGNUのC言語コンパイラであるGCCとアセンブラを使用した。プログラム言語の使い分けは、クロック単位の時間分解能の待ち時間を作るカウント部分はアセンブラを用い、コンピューターとの通信部分はC言語を用いた。

【結果及び考察】

パルスジェネレーターの特性の中で、最小パルス幅は用いたプログラムのアルゴリズムで決まり、時間分解能は用いたクロックの周波数で決まるが、今回製作したパルスジェネレーターの最短時間をオシロスコープで観察すると約400nsであり、また時間分解能は用いたクロック50Mhzと同じ20nsであったので、NMRのパルスジェネレーターとして使用可能な最小パルス幅とパルス波形を持っていた。そして、200MHzのオシロスコープで観察する限りにおいては出力パルスの波形の時間的な揺れ、複数のパルス間の違いは観測されなかった。以上の結果から、今回製作したパルスジェネレーターモジュールの性能はNMRのパルスジェネレーターとして用いることが可能である。

1)Tomonori TOYODA, Hisashi YOSHIDA, Osamu OISHI, and Seiichi MIYAJIMA, Rev. Sci. Instrum. 68, 3140-3142 (1997)

2)Osamu OISHI and Seiichi Miyajima, J. Magn. Reson. A, 123, 64-71 (1996)

Kazuyuki Takeda

Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Japan

In the spirit of bringing a breakthrough into solid-state NMR, low cost, palm-top-sized probes are designed and fabricated which are capable of ^{13}C NMR measurements under ^1H decoupling whose irradiation intensity is as strong as 1 MHz.

Solid-state NMR using microcoil is appealing in the sense that very strong RF irradiation is available even with conventional power amplifiers, so that one may explore interesting phenomena such as spin-decoupling dynamics and second-order effects. The impact of the work by Yamauchi et al. on development of a microcoil probehead for solid-state NMR[1] stimulated me so much that I began to design and fabricate microcoil-based probes to realize solid-state ^{13}C NMR under very strong ^1H decoupling. The purpose of this work is to present its strategy and show some preliminary experimental results.

Fig. 1(a) describes one of standard circuits for ^1H - ^{13}C double resonance experiments[2]. Intending to perform NMR experiments in a magnetic field of 11.7 T (500 MHz and 125 MHz for ^1H and ^{13}C spins, respectively), I built this circuit onto a piece of board whose size is $24 \times 24 \times 1.6$ mm, as shown in Fig. 1(b). The point of building not only probehead but also *probe itself* into such a compact size is that lead-wire lengths become very short compared to the wavelengths of the relevant resonance frequencies, so that losses due to lead-wire resistance and inductance are reduced. Moreover, the cost of developing such small probes was found to be quite tiny!

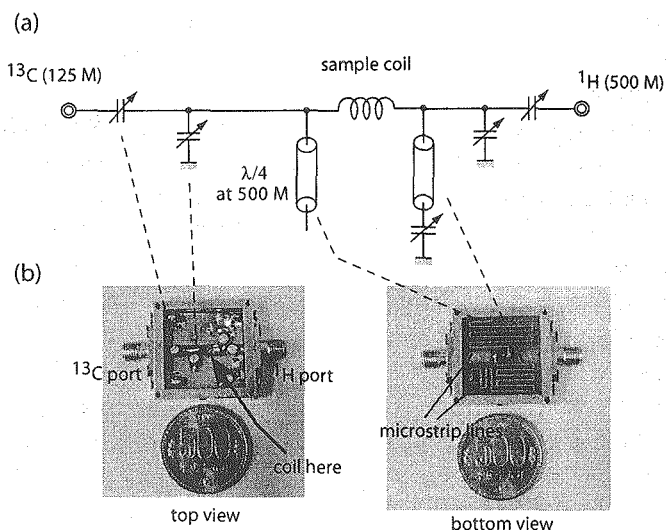


FIG. 1: (a) A circuit diagram for ^1H - ^{13}C double resonance NMR. (b) A palm-top-sized probe for ^1H (500 MHz)- ^{13}C (125 MHz) double resonance experiments, into which the circuit described in (a) is built. A solenoid coil was wound with $50 \mu\text{m}$ ϕ copper wire with the coil diameter of 0.8 mm, the coil length of 1.6 mm, and the number of turns of 14. The inductance of the coil is *ca.* 60 nH. The coil is placed at the center of a $24 \times 24 \times 1.6$ board with its axis normal to the board plane. Microstrip lines were designed and fabricated on the board for the transmission lines, and the surface mount trimmer capacitors were used for impedance matching.

Fig. 2 shows nutation frequencies at the ^1H and ^{13}C channels as a function of the input RF power. For both channels, the data were well fitted with square root functions. This is reasonable from the viewpoint of energy conservation, because magnetic energy is proportional to the square of field amplitude. This data indicates that ^1H irradiation frequency of as strong as ~ 1 MHz is possible with an input power of *ca.* 100 W.

Shown in Fig. 3 is a CP ^{13}C spectrum of a single crystal sample of $\text{U-}^{13}\text{C}$ - ^{15}N -labeled l-alanine doped in nonlabeled l-alanine with a concentration of 10%, measured under ^1H decoupling with an intensity of 460 kHz. The sample weight was 0.1 mg, and the signal was accumulated over 1000 times. Although the number of the labeled molecules is only *ca.* 7×10^{16} , signal-to-noise ratio of the spectrum is pretty good. Fig. 4 shows the heights of the peak marked with an asterisk in Fig. 3 for various ^1H -decoupling intensities. It demonstrates that

キーワード： マイクロコイル、手のひらサイズプローブ、固体NMR

ただかざゆき

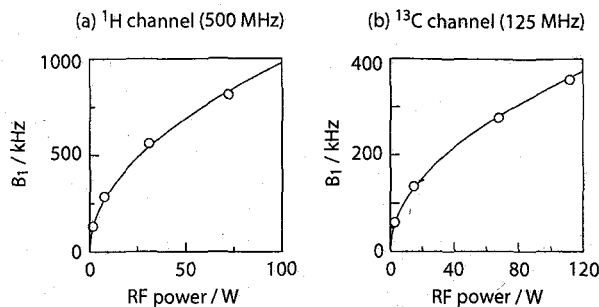


FIG. 2: Input RF power dependences of the nutation frequencies for (a) ^1H and (b) ^{13}C channels.

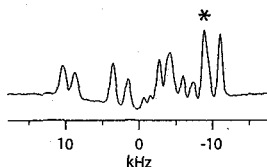


FIG. 3: ^{13}C CP spectrum of a 0.1 mg single crystal sample of U- ^{13}C - ^{15}N -labeled l-alanine doped in nonlabeled l-alanine with a concentration of 10%. The signal was measured under ^1H decoupling of an intensity of 460 kHz, and was accumulated over 1000 times.

the ^1H -decoupling efficiency increases as the decoupling gets stronger, and interestingly, this is also the case for decoupling intensities of as large as ~ 500 kHz, which have been beyond the specification of conventional NMR systems. This result implies that there may be cases in which an overlapped spectrum would be resolved with the probe developed in this work.

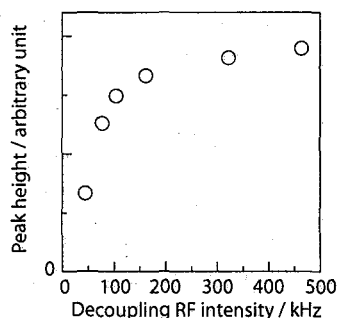


FIG. 4: ^1H -decoupling RF intensity dependence of the height of the marked peak in Fig. 3.

To summarize, microcoil-based probes can bring a breakthrough into solid-state NMR in that very strong RF fields are available. Development of a sample-spinning system that is attachable to the palm-top-sized probes is currently under progress, which will be presented elsewhere.

- [1] K. Yamauchi, H. Janssen, J. van Bentum, A.P.M. Kentgens The 42th NMR conference 1L3 (2003).
 [2] R.W. Martin, E.K. Paulson, K.W. Zilm, Rev. Sci. Instrum. **74** (2003) 3045.

1P154★ ハイブリッド磁石を用いた強磁場NMRの開発

物質・材料研究機構

○端健二郎、清水禎、後藤敦、飯島隆広

JST-CREST

大木忍

Development of a high field NMR with a hybrid magnet

National Institute for Materials Science

○K.Hashi, T.Shimizu, A.Goto, T. Iijima

JST-CREST

S.Ohki

Field profile and stability of the hybrid magnet installed in the National Institute for Materials Science (NIMS) were measured by NMR at 30 T in order to check its ability for solid-state NMR measurements. The field profile shows that the field homogeneity is 186 ppm in the region of ± 5 mm from the field center. Time dependence of the magnetic field of 30 T shows the presence of fluctuations with a total amplitude of about 30 G (100 ppm). The fluctuations with frequencies of 50 Hz and its second harmonic are attributed to a power supply.

NMRは本来、多くの原子核に対して適用可能であるが、実際にはスピン1/2の核をプローブとすることが多い。これは、立方対称以外の位置にあるスピン1以上の四極子核においては四重極相互作用により線幅が広がり分解能を上げることが容易ではないためである。四重極相互作用による線幅は磁場に反比例して減少するため、強磁場化は分解能を向上させるもっとも有効な方法であると考えられる。四極子核はスラグや触媒など機能性無機物に含まれているため、強磁場固体高分解能NMRが求められていた。このようなことを背景に、我々は物材機構が保有する40T級ハイブリッド磁石を用いた強磁場NMRの開発を開始した。今回はマグネットの特性を測ることを目的として室温において銅粉を標準試料としたNMR測定を行った。図1に定常磁場30T(公称値)において測定したシングルショットの ^{63}Cu FT-NMRスペクトル例を示す。このようなスペクトルを用いて磁場のプロファイル、揺らぎ等の測定を行った。図2に磁場プロファイルを示す。プロファイルを二次関数にフィットすることにより、磁場中心における磁場の公称値30Tは30.33T、均一度は186ppm/10mmDSVであることがわかる。

キーワード : 強磁場 ハイブリッド磁石 磁場プロファイル 揺らぎ ^{63}Cu

○はしけんじろう、しみずただし、ごとうあつし、いいじまたかひろ、

おおきしのぶ

また、スペクトルのシングルショット測定を一定時間ごとに行うことによって磁場の時間変化 (図 3 (a))、およびそれをフーリエ変換することによって揺らぎの周波数スペクトル (図 3 (b))を得た。これらの測定結果から磁場は 30 Tにおいて約 30 Gの振幅 (peak to peakで100ppm)で揺らいでおり、その揺らぎには、電源からの影響と思われる 50 Hzと 100 Hzの特徴的な周波数が含まれることが明らかになった。30Hz以下の周波数成分をもつ揺らぎの原因は今のところ明らかではないが、今後、固体高分解能NMRを行うためには、揺らぎの大きさを現在の1/100程度以下にする必要があり、電源の改造などを行うことによって軽減することが期待される。

文献

K. Hashi et al, Jap. J. Appl. Phys., 43, L1020 (2004).

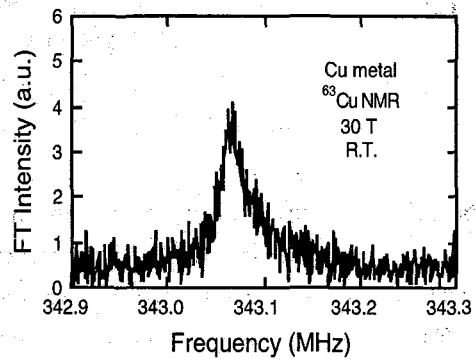


Fig. 1 An example of single shot ^{63}Cu FT-NMR spectrum of Cu metal at 30 T

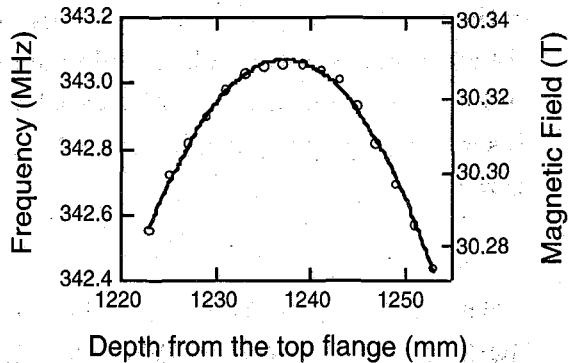


Fig. 2. Field profile of the hybrid magnet at a nominal field of 30 T along the z axis

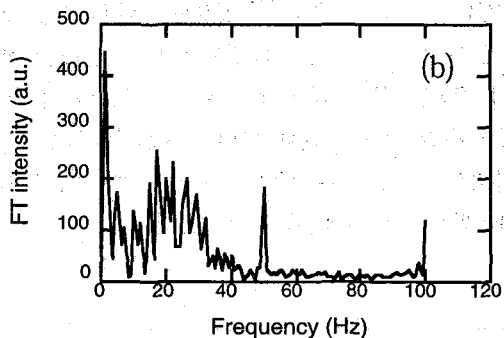
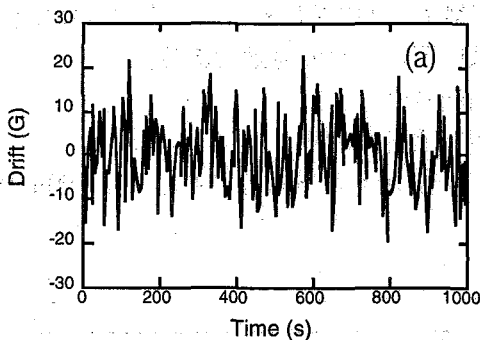


Fig. 3. (a) Stability of the field at 30 T and (b) FT-power spectrum of the field fluctuation at 30 T.

The effects of liquid sample rotation and ultrasonic vibration on resonance lines of solid-state NMR spectra for quadrupolar nuclei(The University of Electro-Communications, Department of Applied Physics and Chemistry¹The University of Electro-Communications, Center for Instrumental Analysis²)○Isao Ito¹, Yuya Yamazaki¹, Shinichi Hatanaka¹, Shigeo Hayashi¹, Daisuke Kuwahara²

We examined the effects of some physical motions of samples on resonance lines of solid-state NMR spectra for quadrupolar nuclei.

In the present study, motions investigated were the following :

- (i) rotation of solid sample added to organic solvent,
- (ii) ultrasonic vibration applied to solid sample in organic solvent.

Resonance line modifications of ²³Na in solid-state sodium sulfate in *n*-hexane were observed.

1. 緒言

半整数スピンを持つ四極子核に対して広く用いられている DOR 法や DAS 法、MQ-MAS 法などは 特別な装置を必要としたり、感度が悪い、緩和時間や核四極子相互作用の大きさによっては満足した結果が得られないといった欠点を抱えている。そこで我々は溶液 NMR に着目し、固体状態を保ったまま溶液の NMR 現象を再現できないかと考えた。そしてブラウン運動を固体状態のまま起こすことができれば四極子核 NMR 共鳴線に変化を与えることができるのではないかとこの考えに至った。そこでいくつかの物理的な運動が四極子核固体 NMR の共鳴線に対してどのように影響するのかを調べた。本研究で取り扱った運動は以下の 2 つの運動である。

- (i) 有機溶媒に固体試料を入れた溶液を試料回転させる
- (ii) 有機溶媒に固体試料を入れた溶液に超音波振動を加える

具体的には *n*-ヘキサンの中へ硫酸ナトリウム粉末を加えた試料溶液を用いて ²³Na の共鳴線の変化を観測した。

キーワード：固体、四極子核 NMR、共鳴線幅

○いとういさお、やまざきゆうや、はたなかしんいち、はやししげお、くわはらだいすけ

2. 実験

NMR 測定は 7.05T の静磁場中で行った (^{23}Na の共鳴周波数は 79.348MHz)。

(1) *n*-ヘキサンと硫酸ナトリウムが同量程度になるよう 7mm のロータへ加え、 ^{23}Na スペクトルの測定を行った。NMR 測定は Doty MAS 7mm NMR probe を用いて試料回転周波数は 6kHz で行った。

(2) *n*-ヘキサン約 2ml、硫酸ナトリウム約 0.1g を自作広幅 probe のガラス管に超音波振動子と一緒に入れ NMR 測定を行った。pulse 系列は single pulse + acquisition を用いた。pulse 系列に同期して超音波振動をかけるようにするため、外部トリガーを超音波の増幅器に接続した。また超音波振動が試料に確実にかかっている間に信号を取り込むためパルス系列の始めに delay time を置いた。

(delay time 200ms、繰り返し時間 5s)

3. 結果と議論

結果として下図の Figs. 1, 2 のスペクトルが得られた。

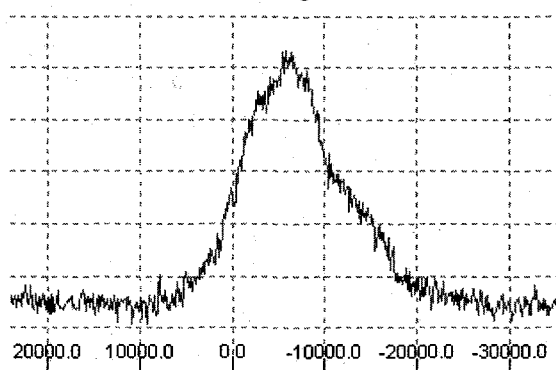


Fig.1 NMR spectrum without ultrasonic vibration.

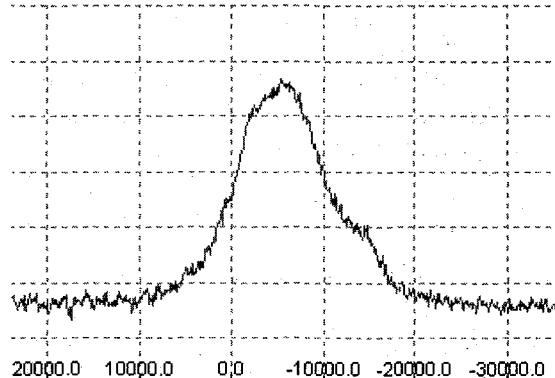


Fig.2 NMR spectrum with ultrasonic vibration.

Figs. 1, 2 からは超音波振動による線幅への影響は見る事ができなかった。超音波振動子から発生する振動は一定方向への振動であるため溶液中の硫酸ナトリウム微結晶が磁場に対する軸をほとんど変化させることなく並進運動をしていたのではないかと推測できる。しかし超音波振動をかけた時、見た目では激しく硫酸ナトリウムが攪拌されていた。そのため軸の回転なしに並進運動のみ起こったとは考えにくい。コンピュータシミュレーションなども含めさらに研究し、他の結果もあわせて詳細は会場にて報告する。

<参考文献>

- (1) A. Tomeda, S. Morisaki, K. Watanabe, S. Kuroki, I. Ando, Chem.Phys.Lett. 376(2003), 346-349.

(バリアンテクノロジーズジャパン)

芦田 淳

Measurements of Low-gamma Nucleus in Solid State NMR with T3™ Probe.

Jun Ashida

Varian Technologies Japan Ltd.

In these decades, the magnetic field of NMR superconductive magnets are becoming higher and higher. Higher magnetic field increases not only the signal intensities of ordinary nucleus, such as ^1H , ^{13}C , and ^{15}N , but also low-gamma nucleus. However, because of the limitation of the tuning range of standard probes, it was necessary to use a special probe to obtain spectra of low-gamma nucleus. In this work, the use of low-gamma accessory kit attached to T3 (Tuning Tube Technology) probe is presented as a very robust technique to obtain spectra of low-gamma nucleus. It should be emphasized that this accessory is cost saving compared with having a second probe.

【緒言】

近年 NMR の高磁場化は目覚しく、超伝導磁石では 21.6T、Hybrid 磁石では 40T 強の NMR 装置が稼動している。高磁場化の一番のメリットは感度向上である。通常よく測定されている ^1H , ^{13}C , ^{29}Si , ^{15}N における感度向上はいうまでもないが、このメリットを一番享受すると考えられるのが、これまでに低感度のため見向きされなかった低周波数核種であると思われる。

しかし、一般的に 1 本のプローブで観測できる周波数帯域は、プローブ内に使用されている可変コンデンサの容量によって制限があり、通常の市販の固体プローブでは、観測帯域はおおよそ $^{15}\text{N}\sim^{31}\text{P}$ となっており、それ以下の周波数核種を測定する場合には別途低周波数核種用特殊プローブを必要とした。

弊社では、これまでプローブ内部で使用されてきたチップコンデンサや可変コンデンサの代わりに Tuning Tube を用いて周波数同調をとる T3 (Tuning Tube Technology) プローブを開発してきた。T3 プローブは、発熱などにより放電の原因となってきたコンデンサを取り払ったことにより、より高出力のパルスにも耐えられる構造になっている。

本ポスターでは、この T3 プローブに低周波数核種測定用キット (low- γ キット) を装着して ^{15}N よりも共鳴周波数の低い核種の測定を試みたので報告す

固体 NMR、低周波数核種

あしだ じゅん、

る。

【実験】

NMR 測定は、Varian UNITY INOVA 600MHz(NB) 分光計、および 5mm T3 HX MAS プローブに low- γ キット (図 1) を装着して行った。

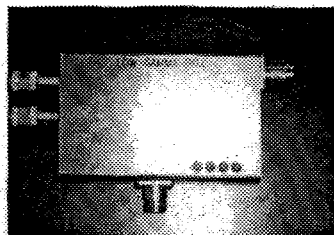


Fig.1 low-gamma accessory kit

【結果】

low- γ キットを使用するときは、図 1 の右のコネクタをプローブ側に、下のコネクタをケーブル〜プリアンプ側に接続するだけで、非常に簡単に装着できる。また、チューニング・マッチングは通常のプローブと同様に左のノブを回して調整する。また、キットの中には 4 つの容量の異なるチップコンデンサが入っており、それらの組み合わせの切替は右下の 4 つの黒いボタンで行う。

図 2、3 に ^{67}Zn (37.5MHz) および ^{109}Ag (28.0MHz) の MAS スペクトルを示す。

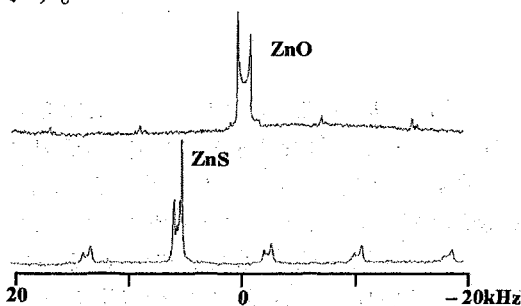


Fig.2 ^{67}Zn MAS spectra at resonance frequency of 37.5 MHz.

Pulse width is 3 μs . Sample spinning speed = 8kHz. Experiment time is 80min. (ZnO), and 35min. (ZnS), respectively.

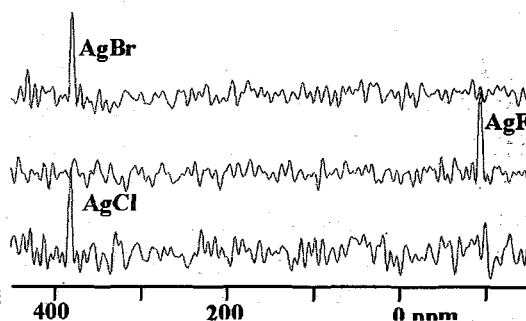


Fig.3 ^{109}Ag MAS spectra at resonance frequency of 28.0 MHz.

Pulse width is 10 μs . Sample spinning speed = 10kHz. Experiment time is 2h 40min. (AgBr), 1h 30min. (AgF), and 1h. (AgCl), respectively.

【考察】

このように、T3 プローブに low- γ キットを装着することで観測帯域を飛躍的に広げることができる。また、この low- γ キットは各プローブに共通なので、T3 プローブが複数本あれば全てのプローブでこのような低周波数核種の測定が可能になり、感度的に困難だとは思いますが三重共鳴の測定も原理的には可能である。今後は無機化合物だけでなく、 ^{25}Mg や ^{39}K などの生体系物質に含まれる低周波数核種の測定にも応用範囲が広がるものと期待される。

Effect of Dielectric Properties of Solvents on the Quality Factor for a 930 MHz Cryogenic Probe Model

(¹GSC, RIKEN Yokohama Inst.; ²Grad. Sch. Integ. Sci., Yokohama City Univ.; ³Cell. Sign. Lab., RIKEN Harima Inst.; ⁴Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo) ○Takashi Horiuchi^{1,2}, Masato Takahashi^{1,2}, Jun Kikuchi^{1,2}, Shigeyuki Yokoyama^{1,3,4} & Hideaki Maeda^{1,2}

The loss in a sample solution reduces the cryogenic probe sensitivity. It contains two contributions; one from the ionic conductivity and another from the dielectric loss. Here we investigated the effect of the dielectric loss on the quality factor of a 930 MHz cryogenic probe model; it deals with the ionic aqueous solutions and organic solvents commonly used for NMR in biological research and the chemistry of natural compounds. The result will be discussed in connection with the sensitivity.

1. 緒言

NMR の感度 (S/N) を向上させる上で極低温プローブが有効である。我々は、つくば物質・材料研究機構の 920-930MHz NMR に用いる極低温溶液プローブの開発を進めている。極低温プローブでは、サンプルの熱ノイズによる感度低下が問題になる。ノイズの要因は、イオン伝導ロスと誘電ロスに大別できる。Kelly 等¹は 500MHz NMR におけるイオン伝導ロスのメカニズムと低減対策を明らかにした。誘電ロスについては、未だ系統的な研究が行われていない。我々は、930MHz 極低温プローブを模擬したモデルを製作し、溶媒サンプル装荷時の Q 値の計測と高周波電磁場解析を実施して、誘電ロスの効果を明らかにしたので報告する。

2. 実験

930MHz 極低温プローブモデルを用いて、溶媒サンプル装荷時のプローブの Q 値 (以下 Q_L) を計測した。本モデルでは、直径 320mm、高さ 240mm の真空断熱容器に RF コイルを収め、液体ヘリウムによる間接冷却で 15 ケルビンに冷却し、底面からの操作でチューニング (930MHz) とマッチング (50Ω) の操作を行う。RF コイルの中心を貫く常温ボア (7mm 径) に 5mm NMR サンプル管を挿入し Q 値を計測する。サンプルとして、①水溶液溶媒 (水、NaCl 水溶液、バッファー水溶液)、②極性有機溶媒 (アルコール、アセトンなど)、③無極性有機溶媒 (ベンゼン、ペンタンなど) を使い、溶媒による差異を把握した。なお、NMR の感度 (S/N) は次式で与えられるので、求めた Q_L 値は感度に直結する値である。

$$S/N = \frac{S_0}{\sqrt{4k(R_c T_c + R_s T_s)} \Delta f} \quad Q_L = \frac{\omega L}{R_c + R_s}$$

ここで、 S_0 信号強度、 k ボルツマン定数、 R_c コイル抵抗、 T_c コイル温度、 R_s サンプルの有効直列抵抗、 T_s サンプル温度、 Δf はバンド幅、 L はインダクタンスである。

キーワード : 極低温 NMR プローブ 高感度化 誘電率 誘電ロス

ほりうちたかし、たかはしまさと、きくちじゅん、よこやましげゆき、まえだひであき

3. 結果と検討

Q_L 値とサンプルの有効導電率 ($\sigma_{eff} = \sigma_{ion} + \omega \epsilon'' \epsilon_0$: 第1項はイオン導電率、第2項は誘電ロス)の関係を図1に示す。

水溶液 (●) の場合: 高周波に伴う水の誘電ロスにより、純水の場合でも Q_L がサンプル非装荷時 (○) の73%に低下する。予想される感度は、サンプルノイズが無視できる場合の理想感度の34%でしかない。他の水溶液では、これにイオン伝導ロスが加わるので、 Q_L が更に低下する。

有機溶媒の場合: 極性有機溶媒 (□) の内アルコール類の σ_{eff} は純水に近いが、 Q_L 値ははるかに低い。例えばメタノールの Q_L 値はサンプル非装荷時の Q 値の42%であり、感度は理想感度の19%である。 σ_{eff} が1桁小さいピリジンでは、 Q_L 値の低下ははるかに少なく (86%)、感度は理想感度の48%になる。無極性有機溶媒であるペンタンでは、 Q_L 値の低下はほとんど無く、感度も理想値にほぼ一致する。

有機溶媒の特異な振る舞いを解析するために、高周波電磁場解析ソフト (MS-Studio) でプローブモデルのRF電磁場、サンプル電流密度、 Q 値などを求めた。結果を図2に破線で示す。縦軸はサンプルロスによる Q 値 ($Q_s = \omega L/R_s$)、横軸はサンプル複素比誘電率の実部 (ϵ') である。 Q_s は ϵ' と共に増加し、 $\epsilon' > 100$ では飽和する。飽和値は、 σ_{eff} に反比例する。

図の $\epsilon' < 100$ では、 ϵ' が小さいほどサンプルを横切るRF電場が増加して誘電ロスが増え、 Q_s が減る。実際、解析値 (○) は計測値 (●) とよく一致した (図2)。ピリジンや無極性有機溶媒の Q_s も同じ過程に支配されるが、導電率 σ_{eff} が小さいので Q_s は大きい。一方、 ϵ' が増加すると共にこの電場は減少し、 $\epsilon' > 100$ ではサンプル渦電流電場が支配的になる。この電場は ϵ' によらないので、 Q_s は飽和する。

以上、930MHz 極低温プローブでは、水の誘電ロスが大きく、水溶液によるサンプル調製法では十分な感度のゲインを得る事ができない。この意味で、ロスが少ない無極性有機溶媒を用いたり逆ミセルの利用が有効である。

参考文献

1 Kelly, A. E. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12013-12019.

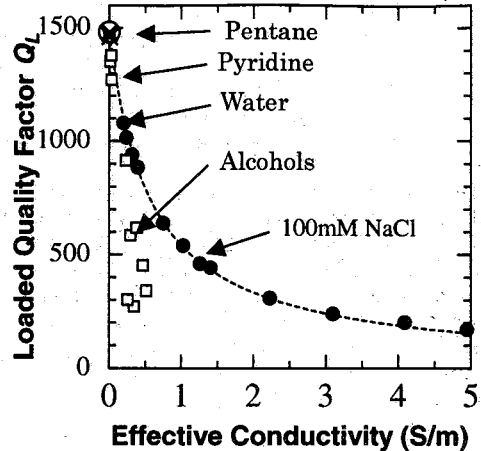


Figure 1 Effective conductivity dependence of the Q for the 930 MHz cryogenic probe model at 15 K for the unloaded case (○), aqueous solutions (●), polar organic solvents (□) and non polar organic solvents (x).

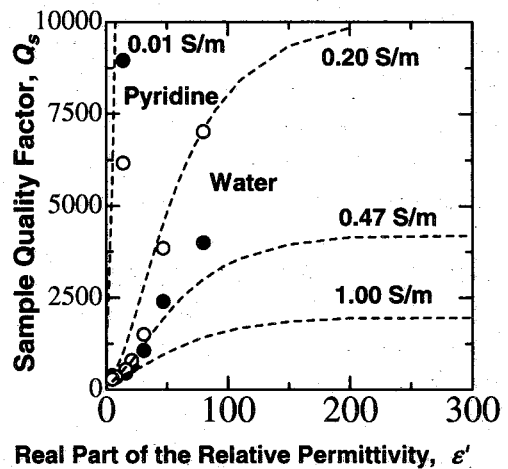


Figure 2. Q_s dependence on the ϵ' for polar organic solvents and water: the Q_s increases with ϵ' at first and then saturates, as shown by the simulation curve (the dashed line). The experimental results (●) agree with the simulation results (○).

Ultra-fast measurement in protein NMR: two dimensional simultaneous measurements to collect all information of HNCAHA/HACANH/HCCH-COSY. JEOL Ltd. ○Kenji Takasugi and Nobuaki Nemoto

In order to reduce total measurement time for resonance assignment of labeled proteins in solution, we developed a new pulse sequence featuring simultaneous acquisition of magnetization transfer pathways of HNCAHA, HACANH and HCCH-COSY. The technique to obtain the information of summation and subtraction of chemical shifts in the indirect axis of the two dimensional (2D) subset experiment was further developed. These made it possible to assign chemical shifts of $^1\text{H}_\text{N}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}_\alpha$, $^1\text{H}_\alpha$ and other side-chain $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ correlations by 2D spectra. In addition, by modification of the phase cycling of the sequence and nominal post-experimental signal processing for data separately saved, spectra with normal chemical shifts were also successfully obtained.

一般に溶液中の蛋白質の ^1H 核、 ^{13}C 核および ^{15}N 核の化学シフトを帰属する際には複数の多次元 NMR 測定を行い、観測される相関ピークの情報を組み合わせて解析する。従来、3次元測定を中心とするこれらの測定には長い測定時間が必要であった。今回我々は HNCAHA/HACANH/HCCH-COSY の 3 種類の実験に関する信号の同時観測用パルス系列と 2 次元スペクトルからの帰属によって、総測定時間短縮つまり帰属用測定の高速化を実現する方法を開発したので報告する。このパルスシーケンス(図 1)は、化学シフトによる間接展開期 2 つ (図 1 のブロック 2 と 3) とそれらに関連する INEPT による磁化移動ブロックから構成されている。HNCAHA, HACANH および HCCH-COSY の 3 種類の磁化移動経路に関して、それらの間接展開期 (図 1 のブロック 2 と 3) において、おのおのの磁化移動経路に対し 2 種類 (ブロック 2 と 3 における) 化学シフト情報を得ることができる。さらに、それら 2 つの間接展開期における変調を同時に行い化学シフトの和ないし差で展開することで 3 次元から 2 次元への低次元化を行い、2 次元スペクトル上での連鎖帰属が可能になった。またデータ取得方法と測定後の処理から、3 つの独立したスペクトルを再構築する方法も議論する。

①HNCAHA と HACANH の同時観測

今回報告するパルスシーケンスは、3 種類(HNCAHA, HACANH, HCCH-COSY)の経路で移動した磁化を同時に観測するように設計した(図 1)。まず、このうちの HNCAHA と HACANH の同時観測について説明する。このパルス系列は、4 つの基本ブロックから構成されている。

ブロック 1: $^1\text{H}_\text{N}$ (順位相)→ $^1\text{H}_\text{N}^{15}\text{N}$ (逆位相)への磁化移動と $^1\text{H}_\alpha$ (順位相)→ $^1\text{H}_\alpha^{13}\text{C}_\alpha$ (逆位相)への磁化移動

ブロック 2: $^1\text{H}_\text{N}^{15}\text{N}$ (逆位相)→ $^{15}\text{N}^{13}\text{C}_\alpha$ (逆位相)への磁化移動と $^1\text{H}_\alpha^{13}\text{C}_\alpha$ (逆位相)→ $^{13}\text{C}_\alpha^{15}\text{N}$ (逆位相)への磁化移動

さらに、 ^{15}N の化学シフト展開(HNCAHA の磁化移動経路)と $^{13}\text{C}_\alpha$ の化学シフト展開(HACANH の磁化移動経路)

ブロック 3: $^{15}\text{N}^{13}\text{C}_\alpha$ (逆位相)→ $^1\text{H}_\alpha^{13}\text{C}_\alpha$ (逆位相)への磁化移動と $^{13}\text{C}_\alpha^{15}\text{N}$ (逆位相)→ $^1\text{H}_\text{N}^{15}\text{N}$ (逆位相)への磁化移動

さらに、 $^{13}\text{C}_\alpha$ の化学シフト展開(HNCAHA の磁化移動経路)と ^{15}N の化学シフト展開(HACANH の磁化移動経路)

ブロック 4: $^1\text{H}_\alpha^{13}\text{C}_\alpha$ (逆位相)→ $^1\text{H}_\alpha$ (順位相)への磁化移動と $^1\text{H}_\text{N}^{15}\text{N}$ (逆位相)→ $^1\text{H}_\text{N}$ (順位相)への磁化移動

まず HNCAHA の磁化移動経路だけを考えた場合、最初の ^1H 90° パルスによりアミドプロトン $^1\text{H}_\text{N}$

キーワード： HNCAHA、HACANH、HCCH-COSY、同時測定、超高速測定

たかすぎけんじ、ねもとのぶあき

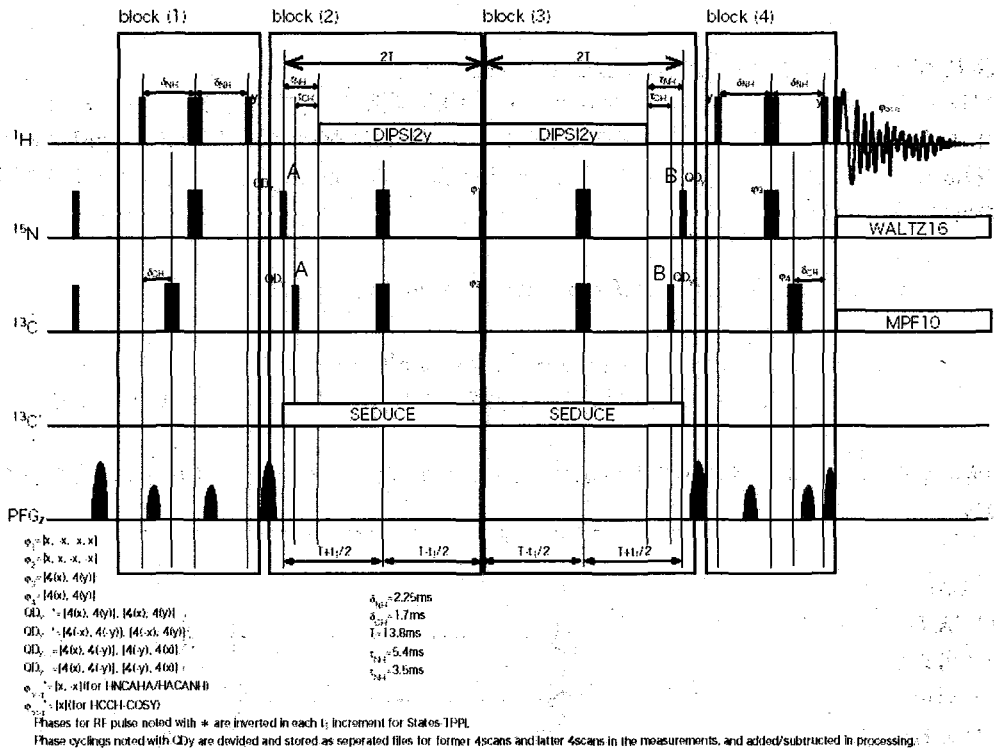


Fig.1 Pulse sequence diagram for acquiring HNCAHA/HACANA/HCCCH-COSY simultaneously. Narrow and wide pulses correspond to flip angles of 90° and 180° respectively. All pulse phases are x, unless specified otherwise. The offset frequency for ^1H , ^{15}N , ^{13}C and $^{13}\text{C}'$ are set as 4.66ppm, 120ppm, 47ppm and 170ppm respectively. $^{13}\text{C}'$ stands for carbon 13 channel except for carbonyl carbon.

の磁化が励起され、 $^1\text{H}_\text{N} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}_\alpha \rightarrow ^1\text{H}_\alpha$ と磁化移動し、 $^1\text{H}_\alpha$ の磁化を直接観測している。このとき、二つの間接展開期ではそれぞれ ^{15}N および $^{13}\text{C}_\alpha$ の化学シフトの情報を得るように設計されており、 $^1\text{H}_\alpha$ 、 ^{15}N および $^{13}\text{C}_\alpha$ の化学シフト情報を得ることができる。また、同様に HACANH の磁化移動経路の場合は、同様に $^1\text{H}_\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}_\alpha$ および ^{15}N の化学シフト情報が得られる。ブロック 2 および 3 において、 $^1\text{J}_{\text{NC}_\alpha}$ によるアミノ酸残基内の ^{15}N - $^{13}\text{C}_\alpha$ 間の磁化移動と $^2\text{J}_{\text{NC}_\alpha}$ アミノ酸残基間の ^{15}N - $^{13}\text{C}_\alpha$ 間の磁化移動は同時に起きるため、この測定の結果から主鎖連鎖帰属に必要な残基内・残基間の相関を得ることができる。

②HCCH-COSY の同時測定

図 1 のパルス系列は待ち時間等のパラメータが最適ではないが HCCH-COSY のパルス系列を含んでいる。CC 間の J カップリング定数 $^1\text{J}_{\text{CC}}$ は 30~40Hz 程度であり、 $^1\text{J}_{\text{NC}_\alpha}$ (11Hz) のほぼ 3 倍である。したがって、NC 間の磁化移動を行う INEPT ブロック中では、CC 間の磁化移動も同時に起こる。したがって、磁化移動の効率は悪いが HCCH-COSY の信号を同時に観測することが可能である (この場合にはブロック 2 とブロック 3 のブロック間のパルスの位相回しによるレシーバーの位相回しは不要である)。したがって、このことと①の結果から、図 1 に示すパルス系列により、HNCAHA、HACANH および HCCH-COSY の 3 種類測定を同時観測可能であることがわかる。

③3次元から2次元への低次元化：化学シフトの和

今回のパルス系列では、ブロック2とブロック3の間接展開期について図1中のパルスAとパルスBの位相を変えてcos変調またはsin変調を得ることで、間接観測軸のFIDをStates-TPPI法により直交検波している。さらに、3次元から2次元へ低次元化するためにブロック2とブロック3の展開を同時に行い、位相回しにより、

$$\cos(\omega_2 t) \times \cos(\omega_3 t) - \sin(\omega_2 t) \times \sin(\omega_3 t) = \cos[(\omega_2 + \omega_3)t]$$

と

$$\cos(\omega_2 t) \times \sin(\omega_3 t) + \sin(\omega_2 t) \times \cos(\omega_3 t) = \sin[(\omega_2 + \omega_3)t]$$

(ω_2 はブロック2で展開する化学シフト、 ω_3 はブロック3で展開する化学シフト)

の変調をうけた間接観測軸のFIDを観測することにより、化学シフトの和で変調を受けたFIDを直交検波している。

ここで、HNCAHAとHACANHについて考えると、二つの化学シフトによる展開を同時に行うことによって、 ^{15}N から $^{13}\text{C}\alpha$ へ移動した磁化と $^{13}\text{C}\alpha$ から ^{15}N へ移動した磁化に同じ変調をかけることができる。つまり、 $^1\text{H}_\text{N}$ の磁化の励起から

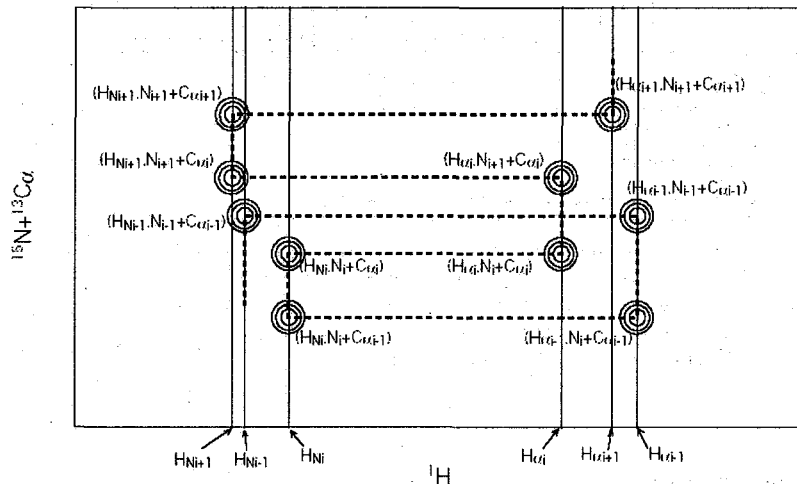


Fig.2 Schematic presentation of the expected peak patterns in 2D simultaneous-HNCAHA/HACANH measurements. Subscript "i" corresponds for the number of amino-acid residue in protein. The dotted line stands for the sequential connectivity.

始まった経路では、間接観測軸として、 ^{15}N の化学シフトと $^{13}\text{C}\alpha$ の化学シフトの和を得ることができ、 $^1\text{H}\alpha$ の磁化の励起から始まった経路では、 $^{13}\text{C}\alpha$ の化学シフトと ^{15}N の化学シフトの和を得ることができる。よって、 $^1\text{H}_\text{N}$ - ^{15}N - $^{13}\text{C}\alpha$ - $^1\text{H}\alpha$ の相関を2次元スペクトル上で得ることができ、残基内 $^1\text{H}_\text{N}$ - ^{15}N - $^{13}\text{C}\alpha$ - $^1\text{H}\alpha$ と残基間 $^1\text{H}_\text{N}$ - ^{15}N - $^{13}\text{C}\alpha$ - $^1\text{H}\alpha$ の相関をつないでいくことで、蛋白質主鎖の化学シフトの連鎖帰属ができるようになった(図2)。また、同様にHCCH結合についても連鎖的に側鎖を帰属できるので蛋白質中の ^{13}C および ^1H の化学シフトの帰属が可能である。

④データセット分割による化学シフトの和/差および通常の化学シフトの抽出

③では、位相回しの異なる2回のFIDを測定時に加算することにより、間接観測軸の情報として2つの化学シフトの和を得ている。ところで、異なる2回の位相回しによる測定結果を2つの別々のデータファイルとして保存し、測定後の処理においてFIDの加算をすることで同様の情報を得てもよい。さらに、個別のファイルとして測定されたデータに関し、測定後の処理としてFIDの加算ではなく減算をすることで、化学シフトの差を間接観測軸の情報として得ることができる。このようにして得ら

れた化学シフトの差の情報を持つスペクトルについて $^1\text{H}_N$ - ^{15}N - $^{13}\text{C}\alpha$ - $^1\text{H}\alpha$ の帰属を行う際には、 $^1\text{H}_N$ 領域または $^1\text{H}\alpha$ 領域の間接観測軸を反転させることで、化学シフトの和の情報を持ったスペクトルと同様に、化学シフトの差の情報を利用して連鎖帰属が可能である。したがって、化学シフトの和と化学シフトの差のスペクトル、2つのスペクトルを比較しながら連鎖帰属を行うことで、帰属の信頼度をあげることができる。また、異なる位相回しを別々のデータセットに分割し、測定後の処理で加算、減算することにより HNCAHA, HACANH, HCCH-COSY のスペクトルを別々に得ることも可能である(図3)。

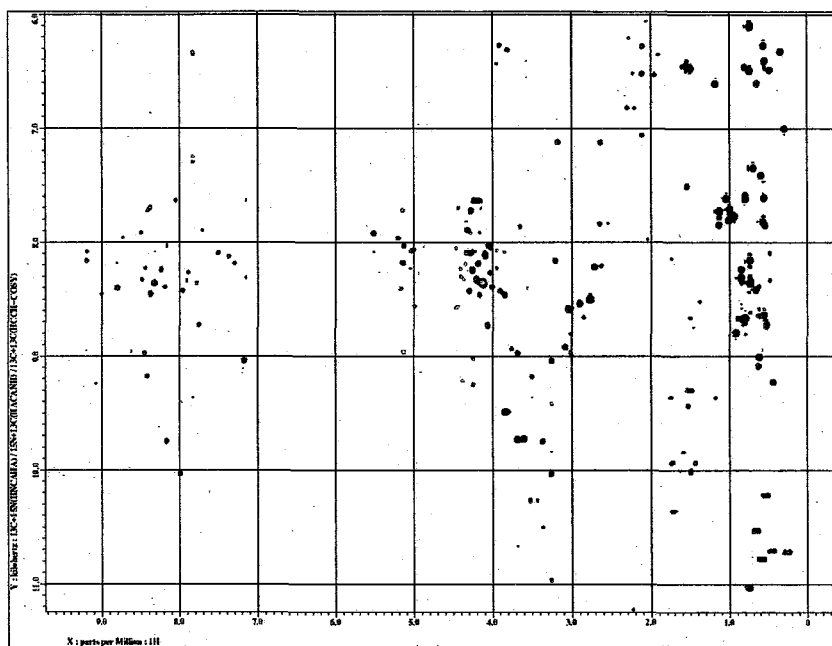


Fig.3 A 2D spectrum of chlorella ubiquitin acquired with the pulse sequence shown in Fig. 1. The time-domain data are separately stored in 8 files and the data-sets for HNCAHA, HACANH and HCCH-COSY are generated by adding or subtracting acquired 4 data files. Indirect axis stands for the sum of chemical shifts of ^{13}C and ^{15}N (for HNCAHA and HACANH) or ^{13}C and ^{13}C (for HCCH-COSY). Total measurement time is about 160 minutes.

以上のように、3つの磁化移動経路の同時観測、化学シフトの和/差情報を用いた2次元スペクトルによる帰属、さらに化学シフト情報抽出により、タンパク質溶液測定における信号の帰属に必要な2次元データセットを非常に高速に得ることが可能になった。

3P159 パルスレーザの整形による三重項状態への光励起の効率化

(阪大院基礎工¹、CREST²) ○山村猛^{1,2}、香川晃徳^{1,2}、武田和行^{1,2}、北川勝浩^{1,2}

Enhancement of the efficiency of photo-excitation to the triplet state
by re-formation of incident laser pulses

¹ Graduate School of Engineering Science, Osaka University.

1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka, 560-8531, Japan

²CREST, Japan Science and Technology Agency

○ Takeshi Yamamura^{1,2}, Akinori Kagawa^{1,2}, Kazuyuki Takeda^{1,2},
Masahiro Kitagawa^{1,2}

In order to improve photo-excitation efficiency to the triplet state, we have assembled an optical system composed of mirrors and beam-splitters, which is capable of re-forming an incident laser pulse into a pulse with less intensity but longer width. Through measurement of signal intensities of zero-field ESR in pentacene-doped *p*-terphenyl, we confirmed our theoretical prediction that the triplet-excitation efficiency would be improved by extending the width of a nano-second laser pulse.

光励起三重項状態を効率的に生成させることは、励起電子状態のESR分析や光励起三重項電子スピンを利用した動的核偏極実験にとって重要な要素技術である。実験対象として有効な試料体積を稼ぐためには、試料中の光の侵入長だけでなく、分子を三重項状態に励起することが可能な深さを最大にすることが望ましい。武田らは、ある与えられた分子の濃度、吸光係数、自然寿命、項間交差速度および三重項状態の寿命に対して試料表面からの三重項励起深さを最大にするレーザービーム強度とレーザーパルス幅の組み合わせを算出する理論を提案しており、理論の妥当性も実験的に検証している [1]。ところが、市販のパルスレーザ装置においてレーザービーム強度を調整することはたやすいものの、パルス幅は可変になっていないことが一般的で、必ずしも三重項励起深さを最大にできるようにはなっていない。そこで我々は、ナノ秒パルスレーザの出力を整形して実効的にパルス幅を長くすることで光励起三重項状態の生成効率を向上させる試みを行った。

図1に、ペンタセンを0.053mol%ドーブした *p*-テルフェニルに様々なパルス幅のレーザを照射したとき試料の厚みに対して三重項状態に移

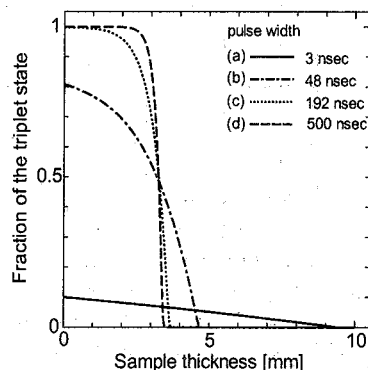


Figure 1: Calculated sample-thickness dependence of the fraction of the triplet state in a single crystal sample of 0.053 mol% pentacene-doped *p*-terphenyl for laser pulse widths of (a) 3 ns, (b) 48 ns, (c) 192 ns, and (d) 500 ns. The incident laser-beam intensities are (a) 1.0×10^{12} W/m², (b) 6.25×10^{10} W/m², (c) 1.56×10^{10} W/m², and (d) 6×10^9 W/m², and the net energies of the laser pulses are common (40 mJ/pulse) for (a)-(d).

キーワード：レーザパルス整形、光励起三重項状態、動的核偏極

○やまむら たけし、かがわ あきのり、たけだ かずゆき、きたがわ まさひろ

行しているペンタセン分子がどのように分布しているかを計算した結果を示す。ただし、入射光のパルス当りのエネルギーは一定としている。ナノ秒オーダーのレーザーパルス幅の場合、パルス幅がペンタセンの励起三重項状態の寿命 (~ 20 ns) に比べて短いため、三重項状態への項間交差のチャンスは一度しかなく、またビーム強度が大きすぎて誘導放出が項間交差を妨げるために光の侵入長は比較的長くなるものの三重項状態の生成効率は低い。図1に示す計算は、レーザーのパルス幅を長くすれば光励起三重項状態が効率的に生成されることを示唆している。そこで、我々は図2に示すようにビームスプリッターによりレーザービームを分割し、光路長に差をつけて再び結合させることで、実効的にパルス幅を増大させる光学系を作製した。そしてパルス当りの光子数を一定とした条件のもとで、ペンタセンの光励起三重項電子スピンのゼロ磁場 ESR 信号強度の測定を行った (図3)。その結果、レーザーのパルス幅とともに信号強度が増大し、したがって三重項状態へ光励起される分子の数も増大することを確認した。

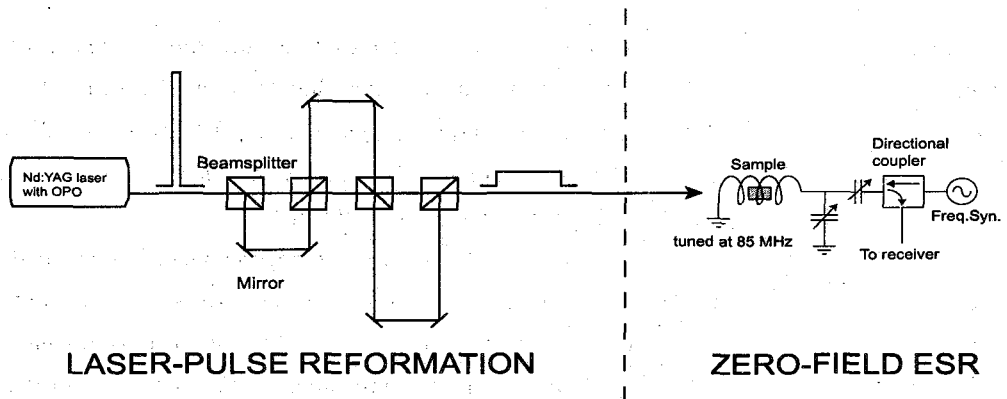


Figure 2: An experimental setup for zero-field ESR measurements of photo-excited triplet state of pentacene.

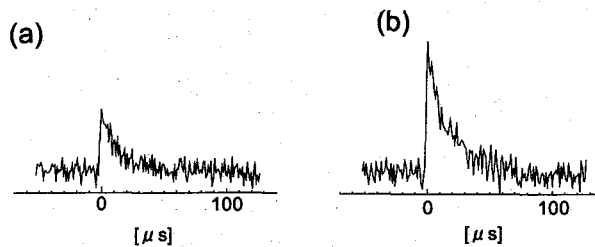


Figure 3: Zero-field ESR signals of the photo-excited triplet state of pentacene measured after applying laser irradiation with the effective pulse widths of (a) 3 ns and (b) 6 ns. The net pulse energies of the incident beams are 3.6 mJ/pulse.

Reference

- [1] Takeda et al. J. Chem. Phys. 117(2002) 4940.

超偏極Xeを利用したリグニン誘導体の吸着挙動の研究:
多孔性製剤との比較

(阪大院医・保¹、三重県科技セ工研²)

○木村敦臣¹、中野優美¹、藤原英明¹、小西和頼²

Adsorption Behavior of Hyperpolarized ^{129}Xe on Lignin Derivatives. Comparison with Porous Materials

Atsuomi Kimura¹, Yumi Nakano¹, Hideaki Fujiwara¹ and Kazuyori Konishi²

- 1) Division of Medical Physics and Engineering, Area of Medical Technology and Science, Course of Health Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2) Industrial Research Div., Mie Sci. Tech. C

The hyperpolarized ^{129}Xe -NMR spectroscopy of Xe adsorbed onto the surface of lignin derivatives has been applied to investigate the adsorption phenomenon. The sample used were Ligno-p-cresol (1,1-bis(aryl)propane type linear polymer, Lig(ϕOH)) prepared directly from the native lignin in Japanese cypress or cedar wood meal, the methylol derivative(Lig(ϕOCH_3)) and the o-hydroxy derivative(Lig($\phi,2\text{-OH}$)).

The adsorption energy was evaluated from the temperature-dependency of chemical shifts of adsorbed Xe and compared with the result of porous silica materials. The adsorption energy ranging from -9.2 kJ/mol to -19.2kJ/mol obtained for lignin derivatives was significantly larger than that of porous silica materials, indicating the preferred gas-containing ability of lignin. Thus, hyperpolarized ^{129}Xe NMR spectroscopy has proven to be a very powerful technique to investigate the adsorption behavior.

【序論】 レーザー励起により高感度化された超偏極希ガスを利用した NMR 信号検出法は、医学・工学などの分野での応用が期待されている。本研究では生体投与に必要と考えられる超偏極希ガスの有効な担体開発のための基礎データ収集の一環として、いくつかの多孔性物質を選び、Xe ガスの吸着特性を調べることにした。用いた試料は、植物由来の新規リグニン誘導体およびシリカ系多孔性微粒子である。

【実験】 擬フロー型超偏極希ガス製造装置は自作のものを用いた。 ^{129}Xe の NMR 測定は Varian INOVA-400WB を使用し、測定周波数は 110.7MHz、1 気圧にて行った。サンプルは新規リグニン系誘導体に加え、新規シリカ系メソポーラス微粒子である HMM-3(細孔径 3.0nm)、FSM-16(細孔径 2.1nm,3.0nm)及びシリカ系カラム充填剤であるポリゴースルを使用し、このサンプルに超偏極 ^{129}Xe を連続的に吹き込みながら NMR 測定を行った。測定温度は 213、233、253、273、297 K の 5 点の温度について行った。リグニン誘導体として用いたサンプルは、スギ及びヒノキのリグニンをクレゾール処理した Lig(ϕOH)である。これにはメチロール化(Lig(ϕOCH_3))、および

超偏極 ^{129}Xe 、リグニン、吸着挙動、多孔性製剤

きむらあつおみ、なかのゆみ、ふじわらひであき、ここにしかずより

フェノールの 2-位に OH を導入したもの(Lig(ϕ ,2-OH))も含まれる。

【結果】各種リグニン誘導体、及びシリカ系多孔性物質に吸着された ^{129}Xe の化学シフト温度依存性から吸着自由エネルギー(ΔE)、及び T_1 値を評価した結果を表 1 に示す。

Table 1. Adsorption energy(ΔE) and T_1 of adsorbed hyperpolarized ^{129}Xe

	Sample	$\Delta E(\text{kJ/mol})$	$T_1(\text{sec})$	
	Lig(ϕ OH)	purified from Japanese cedar	-19.2 ± 5.6	316 ± 38.1
	Lig(ϕ OCH ₃)	from Japanese cedar	-15.2 ± 0.9	614 ± 18.4
	Lig(ϕ ,2-OH)	from Japanese cypress	-11.5 ± 1.9	2098 ± 268
	Lig(ϕ -OCH ₃ ,2-OH)	from Japanese cypress	-9.2 ± 1.9	1268 ± 83
		HMM-3(3.0nm)	-2.10 ± 0.03	- ^{b)}
		FSM-16(2.1nm)	-2.19 ± 0.21	- ^{b)}
		FSM-16(3.0nm)	-2.45 ± 1.25	13.3 ± 1.7
Porous silica ^{a)}		POLYGOSIL60(6.0nm)	-6.15 ± 1.06	43.1 ± 0.2
		POLYGOSIL100(10.0nm)	-7.25 ± 0.66	770 ± 30
		POLYGOSIL300(30.0nm)	-9.81 ± 1.07	2300 ± 200
		POLYGOSIL500(50.0nm)	-9.92 ± 0.73	1930 ± 50

a) The pore diameter is given in the parenthesis.

b) The value was not determined.

【考察】本研究では、リグニン誘導体から構成される有機系多孔性物質における超偏極 ^{129}Xe の吸着挙動に関して、吸着自由エネルギー差 ΔE および緩和時間の観点から検討を行い、シリカから構成される無機系多孔性物質と比較した。その結果、リグニン系において吸着自由エネルギー差 ΔE は全体的にシリカ系におけるそれよりも絶対値が大きく、吸着された時の熱安定性が高い事が分かった。細孔サイズが大きいほど吸着力が大きいというシリカ系試料での結果から判断すると、ここで用いたリグニン誘導体の吸着サイトの細孔径は、ヒノキ由来サンプルの方がスギ由来よりも小さく、シリカ系の中では細孔径の大きな POLYGOSIL500 付近に相当することが分かる。吸着ピークの緩和時間(T_1)に関しても同様に、リグニン系においてシリカ系よりも延長傾向が認められるが、これは熱安定性を反映したものと考えられる。しかし、リグニン誘導体ではスギ由来のものよりヒノキ由来のものの方が長く、この T_1 値の傾向は吸着エネルギーの結果と矛盾することが明らかとなった。

【結論】超偏極 ^{129}Xe を用いることにより、植物由来の多孔性リグニン誘導体、およびシリカ系多孔性微粒子への吸着挙動を簡便に調べることができた。以上から、効率よい吸着および画像取得に適当な長さの緩和時間を有する超偏極希ガスの有効な担体を開発するための基礎データを収集することができた。

【参考文献】

J. Fukutomi, E. Suzuki, T. Shimizu, A. Kimura, and H. Fujiwara, *J. Magn. Reson.*, **160**, 26-32(2003).

Application of self-diffusion coefficient (Dsel) measurement by NMR to the selective analysis of polymer in cosmetics.

(Shiseido research center) ○Tomoko Kimura, Tadao Fukuhara, Kazuo Komatsu

In the last NMR Meeting, We reported NMR self-diffusion coefficient (Dsel) measurement was a useful tool to diagnose the bi-continuous phase or micellar solution, and the oil-wax gel that is half-solid state in the normal temperature. In this study, we applied this method to the analysis of the polymer in cosmetics that was complex mixture of the various materials. This method was able to identify the polymer in cosmetics selectively. Furthermore, quantitative analysis was achieved by using a standard polymer in capillary as an internal standard. The combination of these two techniques was useful for an easy analysis of the polymer in cosmetics.

【序】

我々はこれまでNMRによる自己拡散係数(Dsel)測定法の有効活用を目的に、物性評価法の応用として種々のミセル溶液、バイコンティニユアス相等の両親媒性分子会合体や常温で半固形状態であるオイルワックスゲルの状態解析を検討し、本討論会においてその有用性を報告してきた。今回はその一環として、化粧品の安定性や使用性等の調整を目的に配合される増粘性高分子成分をターゲットとして、Dsel値の差、即ち分子量差を利用することで、化粧品中の低分子成分あるいは高分子成分同士からの選択的分離法や、定量法について検討した。

その結果、構造が複雑且つ、添加量が微量であることが多いためにこれまで困難であった高分子成分の定性や定量について、毛細管に封入した高分子量の内部標準物質を試料溶液に共存させてDsel測定を行うことで可能であることを見出したので報告する。

【実験】

装置は、JNM ECA-400(日本電子)・共鳴周波数(^1H ; 399.0MHz)及び、高出力磁場勾配(FG)発生ユニット(最大磁場勾配発生強度; 23.3T/m)を用いた。測定は、DOSY スペクトルを測定する基本シーケンスである Stimulated-echo 法にエディーカレントによる位相の乱れを除去するために、データの取り込み待ち時間(T_e)を組み込んだSTE-LED法を用

キーワード: 磁場勾配 NMR、自己拡散係数、高分子、高分子の分離・定量

きむら ともこ、ふくはら ただお、こまつ かずお

いて、測定パラメータの基本条件を設定した。試料溶液の調製は、増粘性高分子を含んだ試料約 1~20mg を重水に溶解させ、40°C の温度条件で測定を行った。

【結果と考察】

モデル試料として下記の試料を各々 5mg/mL 重水となるよう調製し、分離条件を検討した。

①高分子と低分子混合溶液: ヒドロキシエチルセルロースとクエン酸 Na

②高分子混合溶液: プルラン (GPC 用標準試薬: 分子量: 23,700) とカチオン化ヒドロキシエチルセルロース (平均分子量: 約 350,000)

(1) NMR 測定条件の設定

①拡散時間 (Δ): 25ms、パルス長 (δ): 2ms、Gradient Recover: 1ms データ取り込み待ち時間 (T_e): 20ms、FG 強度: 6T/m でクエン酸 Na の信号を消去することが可能であった (Fig.1)。また、②の高分子同士であっても、主に FG 強度を調整することで、目的成分以外の信号を消去、分離できることがわかった。

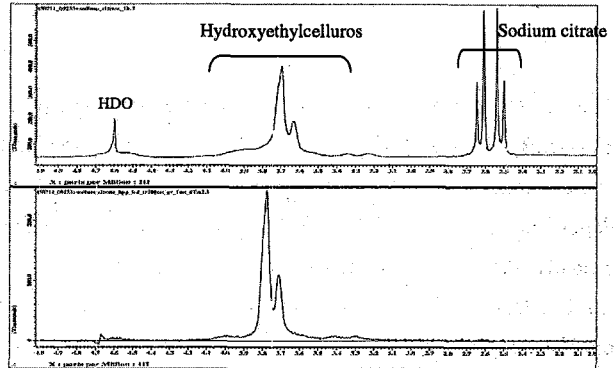


Fig.1 1H-NMR spectra of Hydroxyethylcellulose and Sodium citrate (lower: with FG pulse ;6T/m)

(2) 定量法の検討

原理的に分子量差を反映する D_{sel} 値の差を利用して分離する方法であることから、定量的な扱いとして通常の内部標準法等を用いることは信号強度の減衰等を考慮すると難しい。このため内部標準物質条件としては、①強い FG パルスをかけても消去されないこと。②対象となる高分子試料の信号と重ならないこと。③被検体試料溶媒に溶解するなどの制約がある。これらの条件に合致する汎用的な標準物質の入手は困難であったことから、通常の増粘性高分子では重複する可能性の少ないメチルシリコンの信号領域 (1H : 0ppm) を利用するために、水には溶解しない高重合ポリジメチルシロキサン (DMS: 平均分子量: 約 52 万) の重クロロホルム溶液を毛細管に封入して用いる (Fig.2) ことを検討した。その結果、拡散時間 (Δ): 30ms、パルス長 (δ): 1ms、Gradient Recover: 0.5ms データ取り込み待ち時間 (T_e): 20ms、FG 強度: 15T/m の測定条件を用いることで、プルランとカチオン化ヒドロキシエチルセルロース混合溶液中のカチオン化ヒドロキシエチルセルロースの定量性を見出すことができ、その再現性も良好であることがわかった。

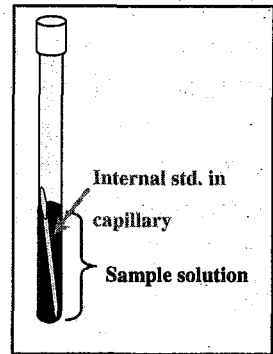


Fig.2 NMR sample tube containing internal standard substance in capillary.

D_{sel} 測定法と毛細管内封内部標準物質を併用することで、混合溶液中の高分子の分離・定量ができることを確認したが、本法は分子量の異なる混成分系での個々の分離・定量への応用拡大への発展性も考えられる。

【IPR - PDBj の BMRB データ登録サイト設立】

日本およびアジア地域の研究者からタンパク質の NMR データの登録を受け、データベース化を行うために IPR 内の PDBj にデータ登録サイトを設立する。BioMagResBank で開発されたソフトウェアを使用した、登録オペレーションシステムの体制を整える。本登録サイトでは ADIT-NMR および新システムを使用した登録処理業務を行う予定である。

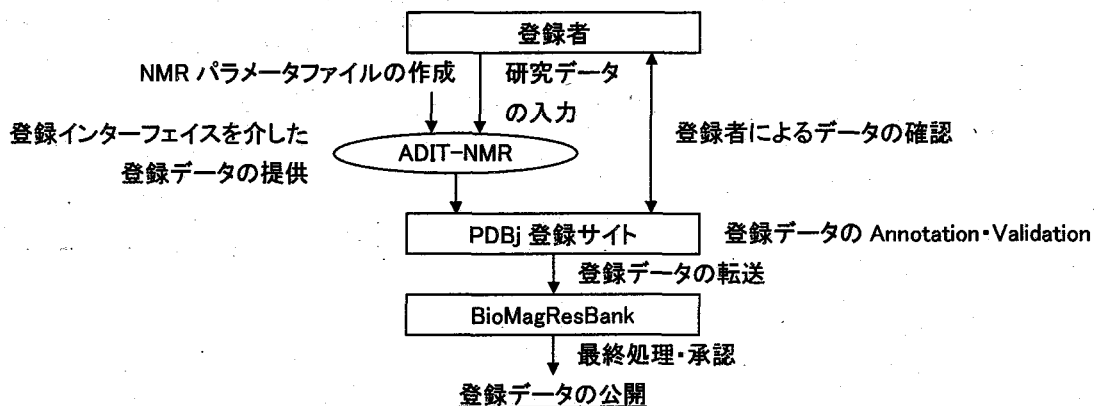
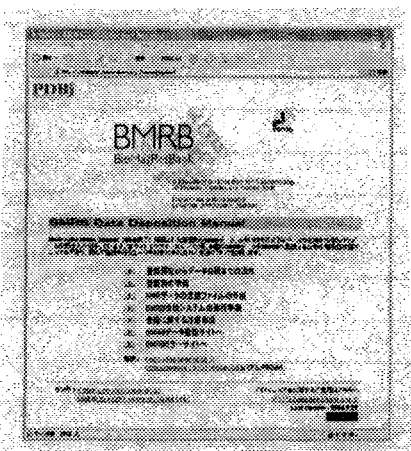


Fig.2 The flowchart of BMRB data deposition procedure at PDBj deposition site in IPR.



本サイトでは研究者に対して NMR データを BMRB に登録すること支援するために、ADIT-NMR の登録方法について記述したデータ登録ウェブマニュアル（日本語）の再整備を行った。ここでは NMR データを登録するための NMR パラメータファイルの作成方法や登録インターフェイスの使用方法について説明が行われている。

Fig.2 The top page of BMRB data deposition web manual which is written in Japanese.

URL: http://bmrdep.protein.osaka-u.ac.jp/manual_top.html

【統計】

近年、年間 300 件を超える登録が BMRB に対して行われており、今後もこの基調が変わることなく推移することが考えられる。登録に記述された引用情報から、登録総数に対する日本からの寄与は 2004 年 8 月の時点で 209 件 (6.7%) である。

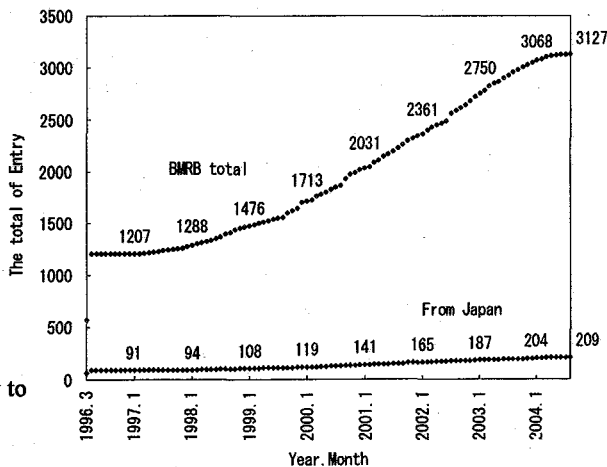


Fig.3 Time record of total number of entry to BMRB and the contribution from Japan.

日本電子株式会社 ○山崎千春、高杉憲司、栗本智充

Improvement of Pulse Width Determination Program with New Algorithm to Analyze complex spectra
JEOL Ltd. ○Chiharu Yamasaki, Kenji Takasugi and Tomomitsu Kurimoto

We reported an algorithm determining 90-degree pulse width with a nonlinear least square curve-fitting in the last meeting. This algorithm was improved by using complex integral of NMR spectrum. Analysis based upon both real and imaginary spectrum is related to Hilbert transform.

多核 NMR 測定などのマルチパルス系列を必要とする実験において、良好な感度の NMR 信号を得るために、適切に校正されたパルス幅に基づいた測定は非常に重要である。

昨年、我々は非線形最小自乗最適化計算によるパルス幅の決定方法について報告を行った。これまでの方法は、Nutation 実験(パルス幅を変化させて行った実験)から得られた一連のスペクトルを適切に処理し、その結果について非線形最小自乗最適化計算を行うことにより、目的としたパルス幅を決定するものであった。

今回、我々は位相補正処理を不要とした非線形最小自乗最適化法を開発し、最適なパルス幅を得ることができたので報告する。

NMR 法では、ある周波数に対する共鳴の強度をスペクトルとして得ているが、このときの共鳴周波数は共鳴エネルギーに比例する量である。したがって、共鳴エネルギーの分布はそのまま共鳴周波数の分布になり、その実数部の分布は偶関数で表される分布をとる。

このとき、NMR 法で観測する複素スペクトルの実数部 ($f(x)$)と虚数部 ($g(x)$)は次式のようにヒルベルト変換で表わされる(ρ はコーシーの主値積分)。

$$\begin{aligned} g(x) &= f(x) \frac{1}{\pi x} \\ &= \frac{1}{\pi} \rho \int_{-\infty}^{\infty} \frac{f(t)}{x-t} dt \end{aligned}$$

したがって、虚数部スペクトルと実数部スペクトルとは積分と微分の関係にあり、実数部スペクトルが偶関数のとき、虚数部スペクトルは奇関数になる。一般的に得られたスペクトルは偶関数で表わされるピークの重ね合わせとして表すことが可能なので、実数部と虚数部が偶関数と奇関数であるという関係は全てのスペクトルに対して成り立つ関係である。さらに、このスペクトル強度が規格化されている場合、スペクトルを積分した値は、

$$\begin{aligned} \int_{-\infty}^{\infty} f(x) dx &= 1 \\ \int_{-\infty}^{\infty} g(x) dx &= 0 \end{aligned}$$

となり、実際に観測したスペクトル($f(x), g(x)$)の位相が p_0 だけずれていた場合を考えると、

$$\begin{pmatrix} f'(x) \\ g'(x) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(p_0) & \sin(p_0) \\ -\sin(p_0) & \cos(p_0) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} f(x) \\ g(x) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} f(x) \cos(p_0) + g(x) \sin(p_0) \\ -f(x) \sin(p_0) + g(x) \cos(p_0) \end{pmatrix}$$

となる。

キーワード： 90度パルス、ニューテーション、非線形最小自乗法、位相補正、ヒルベルト変換

やまざきはる、たかすぎけんじ、くりもともみつ

よって、位相補正を行っていないスペクトル $f(x), g(x)$ の積分値は、

$$\int_{-\infty}^{\infty} f'(x)dx = \cos(p_0) \cdot \int_{-\infty}^{\infty} f(x)dx + \sin(p_0) \cdot \int_{-\infty}^{\infty} g(x)dx = \cos(p_0) \cdot \int_{-\infty}^{\infty} f(x)dx$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} g'(x)dx = -\sin(p_0) \cdot \int_{-\infty}^{\infty} f(x)dx + \sin(p_0) \cdot \int_{-\infty}^{\infty} g(x)dx = -\sin(p_0) \cdot \int_{-\infty}^{\infty} f(x)dx$$

となる。

このとき、上式中の積分項は、観測対象の磁化に比例する量であり、観測対象の磁化が同種の時は、強度の違う同種の磁化に対する実数部分と虚数部分を積分した値を複素平面上にプロットすることにより、磁化の大きさを定量することができる。

つまり、実数部分の積分値を横軸、虚数部分の積分値を縦軸としてプロットした直線の原点からの距離が、対象としているピークの強度に比例する値であり、この値はこれまでの方法で手動による位相補正を行って実数部分の積分値をとった場合と同値をとることになる。

図1は、実際にパルス幅を変化させることにより得られた Nutation 実験の結果であり、図2は、このスペクトルの実数部分の積分値と虚数部分の積分値を縦軸・横軸としてプロットしたものである。

このように、Nutation 実験の結果得られる積分値は、同一直線上にあらわれ、この直線上の位置に対して非線形最小自乗最適化計算を行うことにより、位相補正を行わずにパルス幅の決定を行うことができる。(図3)

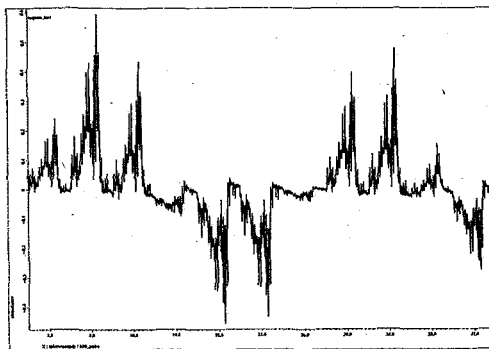


Fig. 1 The results of nutation experiments acquired with various ^1H pulse width. Each intensity with varied pulse width changes along the equation^{*1} we reported in the last year's meeting.
*1

$$I_t = A \sin(\omega t + B) \exp\left(-\frac{t}{C}\right) + D$$

I_t : Intensity with pulse width t .
 A, B, C, D, ω : Constants

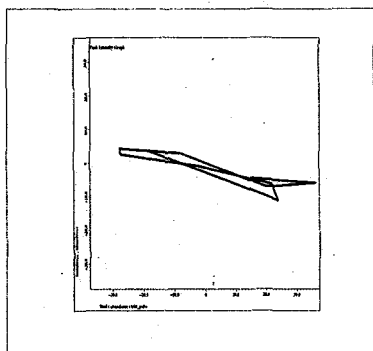


Fig.2 The plot of integral values of the results in fig.1. X and Y value for each point corresponds to the integral value of real part or imaginary part in the results of fig.1, respectively.

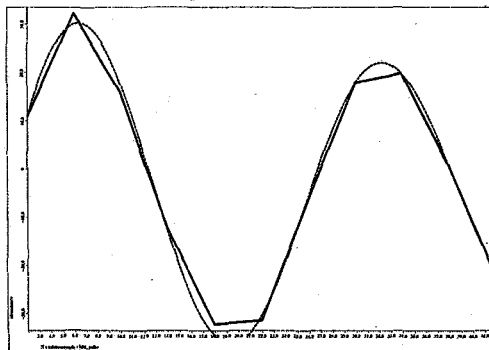


Fig.3 Fitting results with the method we reported in the last year's meeting, The positions in fig 2 were considered as intensity with each pulse width. From analyzing with the equation^{*1}, optimal 90 degree pulse width was determined as 6.57443us successfully.

キーワード索引

(数字・アルファベット)

¹H CRAMPS 3P075
¹H MRS 3L5
¹H-31P 交差分極 3L11
¹H-NMR 1P108★
¹H-X HMBC 1P070★
¹H→¹⁹F CP/MAS 1P124★
¹H スピン拡散 3L11
¹H 脱分極 3L11
²H NMR 2P089
¹³C 化学シフト異方性 1P022★
¹³C 検出 1L13
¹⁴N 1P112★
¹⁵N ケミカルシフト 2P017
¹⁵N 選択標識核酸 3P060
¹⁹F 2P125
¹⁹F CP/MAS NMR 2P134
¹⁹F MAS 1P124★
¹⁹F NMR 1P031★
²⁵Mg 3P144
³¹P NMR 3P042
³¹P NMR 1P142★
⁵¹V-NMR 3P078
⁶³Cu 1P154★
¹²⁹Xe 3P081
¹²⁹Xe 2P149
¹²⁹Xe NMR 2P137
 2,5-Dicyclopentylcyclopentanone 2P068
 2次元NMR 1P001★
 2重共振回路 1P151★
 3D 2P104
 3D-CT-HMBC 3P072
 3次元画像 1P106★
 4.7Tesla 1P106★
 4ケルビン 1P147★
 90度パルス 1P163
 (A)
 ABC 輸送体蛋白質 2P008
 ADIT-NMR 3P162
 Al-EDTA 錯体 2P080
 Alzheimer 病 2P023
 ATP 2P014
 automation 1P097
 (B)
 β-アミロイド 2P023
 βシート 2P113
 βラクトグロブリン 2P035
 beta-grasp fold 2P065
 Bloch-Torrey 方程式 1P091
 BMRB 3P162
 bulge 3P057
 (C)
 CAST/CNMR システム 3P069
 Cavity 3P084
 CH...O 水素結合 1P076
 Chemical shift assignment 1P097
 Claudin-5 1P3L4

conformation 3P057
 convergency 3P057
 CPMAS 1P151★
 CP ダイナミクス 2P134
 CSA 1L9
 CSA 1P109★
 CT COSY 3L5
 CT-HMBC 3P072
 Cu²⁺-IDA 1P004★
 CYANA 3P096
 CYANA 1P097
 cyclopentyl 基 2P068
 (D)
 digitoxin 1L12
 DNA 1P016★
 DNA との相互作用 3P021
 DNA 結合タンパク質 2P005
 DNA 結合ドメイン 3P018
 DNA 結合ドメイン 3P036
 DNA 相同組換え 1P013★
 DOSY 1P070★
 DPC 1P037★
 DPGFSE 1L12
 DTI 2P098
 DUF232 1P064
 Dynamic-NMR 2P080
 (E)
 EGCg 3P087
 (F)
 FA 2P098
 flagelliform silk 2P026
 FMO 法 1P094
 (G)
 G-4 重らせん 1P058★
 GABARAP 2P047
 GalII 1P040★
 GPCR 1P037★
 (H)
 Hadamard 1P115
 Hartmann-hahn 条件 3L12
 HCCH-COSY 2P158
 HNCAHA 2P158
 HNCANH 2P158
 hnRNP 1L5
 HSQC-NOESY 2P068
 HTH モチーフ 3P018
 Hyperpolarized 2P149
 (I)
 in vivo 1L11
 in vivo ³¹P NMR/MRI 3P102
 in vivo NMR 3L5
 In-Cell NMR 1L11
 INADEQUATE 3P075
 INADEQUATE 3P120
 (J)
 J(C-H) 1P076
 (M)
 MAP-LC3 2P047
 MAS 1P109★

MAS	2P116	RecA	2P029
mastoparan-X	1P052	REDOR	3P126
Maximum Entropy Reconstruction	1L13	REDOR 法	1P028★
MDEFT	1P106★	residual dipolar coupling	3P096
Microtubule-associated		RFDR	3P120
serine/threonine kinase	3P039	RNA	3P057
Molecular dynamics	2P095	RNA-蛋白質相互作用	3P024
MOVS	1P022★	RNA アプタマー	1L5
MQMAS	3L7	(S)	
MRI	3L3	SAIL	1L4
MRI	2P098	scalar coupling	1L12
MRI	1P103★	SH3 ドメイン	3P030
MRI	2P104	Si/Al 比	1P141★
MRI	3P105	simulation	2P095
MR マイクロスコープ	1P103★	SN	1P157★
mSin3	3P027	SNARE	2P044
MSP ドメイン	1P064	SPT	1L12
MXD6	2P131	structure calculation	1P097
Myb domain	1P049	SUMO ligase	2P020
(N)		SWIB ドメイン	3P051
n-パラフィン	3L10	(T)	
natural product	1L12	T1	1P106★
NDSB	2P053	T1 緩和時間	3L4
NikA	2P005	Tat	1L5
NMR	1L2	telomeres	1P049
NMR	3P021	TFIIE	1P040★
NMR	3P033	three helix bundle	2P044
NMR	1P055	three-helix bundle	1P034★
NMR イメージング	2P077	through-bond	2P143
NMR 構造	3P024	through-space	2P143
NMR 構造解析	2P020	TMVF (海綿骨体積率)	1P099★
NMR 試料調製	1P019★	Tom20	2P056
NMR 処理ソフトウェア	2P092	torsion angle dynamics	2P095
NMR 処理ソフトウェア	2P107	TPD	1P136★
NOE	2P011	TraR	3P018
NRSF/REST	3P027	TRF1	1P049
N 末端構造	2P047	TRF2	1P049
(O)		TRF2	1P058★
Orientation independent restraint	3P096	TRNOE	2P059
(P)		TROSY	1L9
PACAP	1P037★	(U)	
PAH1 ドメイン	3P027	UBA domain	1P034★
PAM	1P037★	ubiquitin	1P034★
PAS ドメイン	1L1	(V)	
PAS ドメイン	2P041	V-ペプチド錯体	3P078
π 共役系高分子	1P118★	VDF オリゴマー	2P125
PBLG	1P130★	vt1a	2P044
PCTFE	1P124★	(W)	
Pex19p	1P043★	wash-out 曲線	1P100★
photo-CIDNP	2P047	(X)	
PH ドメイン	2P119	X 線結晶構造	2P056
pH 依存性	2P035	(Z)	
PIAS1	2P020	Zellweger 症候群	1P043★
PLC- δ 1	1P127★	zf-AN1 domain	2P050
protein structure	2P095		
protein/DNA interactions	1P049		
PVDF	2P125		
(R)			
RDC	3P057		

(あ)
 アミド化合物の水和 1P076
 アミノ酸 1P007★
 アミノ酸選択標識 3L1
 アミロイドβ 2P110
 アミロイド線維 3P126
 アルコール 2P101
 アルツハイマー病 2P110
 亜鉛結合タンパク質 2P050
 圧力依存性 1P141★
 安定同位体標識 1L9
 安定同位体標識 1P019★
 安定同位体標識 1P108★

(い)
 イネ 1L1
 イネゲノム 3P054
 位相 1L14
 位相補正 1P163
 異常分散 1P118★
 遺伝子発現 3P102
 一次元拡散 1P118★

(う)
 運動 2P089

(え)
 エコー法 3P144
 エタン 1P088★
 エラスチン 1P028★
 エリスロマイシン 1L10
 塩酸塩 1P073★

(お)
 オーバートーン 1P112★
 オーバートーン 3P114
 オンライン高圧セル 1L8

(か)
 カイコ 3P036
 カップリング 1L13
 カテキン 3P087
 カラス転移 1P121★
 カリウムチャネル 2P032
 カリックスアレーン 1P007★
 横緩和時間 1P091
 化学シフト 3P093
 化学シフト 3P135
 化学シフト 1P141★
 化学シフトテンソル 3L9
 化学シフト異方性 1P031★
 化学シフト選択的イメージング 3P102
 化学シフト値 2P137
 化学シフト予測 3P069
 化学交換 1P061
 化学交換 3P081
 化合物半導体 1P142★
 加水分解 1P010★
 家蚕絹フィブロイン 3P123
 過渡的フォールディング 1P040★
 会合 2P053
 会合性高分子 2P083
 解剖学的基礎データ 1P103★
 外部複基準法 1P076

拡散 1P085★
 拡散 1P091
 拡散 1P130★
 拡散係数 3L10
 拡散係数 1P079
 拡散係数 3P084
 拡散係数 2P086
 拡散係数 1P088★
 拡散時間 2P077
 核間距離 2P134
 角度依存固体 NMR 2P023
 寒剤 1P148★
 完全長 cDNA 3L2
 感度 1L13
 緩和解析 2P056
 緩和試薬 3L4
 緩和時間 1P067
 緩和時間 1P082★
 緩和時間 2P083
 緩和時間 1P117★
 間接核スピン-スピン結合 1P142★

(き)
 キセノン 2P086
 キチン 3P135
 キャバシタ 3L7
 キャリヤ濃度 1P142★
 機能ドメイン 3L2
 機能と構造の相関関係 1L3
 機能性核酸 1L5
 機能分散型 2P152
 機能累積型 2P152
 帰属訂正 3P069
 偽コンタクトシフト 1P004★
 絹 3L9
 逆平行β-シート 3P126
 吸着 1P139
 吸着エネルギー 1P160
 球状ドメインの構造 3P021
 距離測定 2P113
 共鳴線幅 2P155
 強磁場 3P111
 強磁場 1P154★
 凝集機構 2P023
 局在化スペクトル 2P101
 局所磁場勾配 1P091
 均一同位体標識試料 2P062
 金属錯体 2P089

(く)
 クモ牽引糸 2P026
 クモ糸類似タンパク質 2P026
 グローバルフォールド 1P046★
 クロマチン再構築 3P051
 区分標識 1P025★
 組換え 1P016★
 繰り返し配列 3P036

(け)
 ケミカルシフト 3L6
 ケミカルシフト 1P082★
 ケミカルシフトの濃度依存性 1P076

ゲル 1P085★
 ゲル 1P130★
 計算化学 1P031★
 結合部位 1P055
 結晶構造 2P128
 結晶多形 3P120
 原子間距離 3P126
 (こ)
 コールドシップ 3L3
 コールドスプレーイオン化質量分析 1P079
 コハク 3P075
 ゴム 2P137
 コリネバクテリウム 1P019★
 コンパクト 2P104
 コンパクト 3P105
 コンパクト MRI 1P099★
 コンホメーション解析 1P067
 極低温 NMR プローブ 1P157★
 極低温プローブ 1P147★
 小麦胚芽抽出物 3L1
 固体 3P111
 固体 2P155
 固体 ¹³C NMR 3P138
 固体 ¹⁵N NMR 3P138
 固体 NMR 3L8
 固体 NMR 3L12
 固体 NMR 1P022★
 固体 NMR 2P029
 固体 NMR 2P062
 固体 NMR 3P087
 固体 NMR 1P108★
 固体 NMR 1P109★
 固体 NMR 2P110
 固体 NMR 1P115
 固体 NMR 2P116
 固体 NMR 1P117★
 固体 NMR 2P119
 固体 NMR 3P120
 固体 NMR 3P123
 固体 NMR 2P125
 固体 NMR 1P127★
 固体 NMR 1P130★
 固体 NMR 3P132
 固体 NMR 1P133★
 固体 NMR 3P135
 固体 NMR 1P136★
 固体 NMR 1P139
 固体 NMR 2P146
 固体 NMR 3P153
 固体 NMR 3P156
 固体高分解能 ¹³C NMR 法 2P122
 固体高分解能 ²⁹Si NMR 法 2P122
 固体高分解能 NMR 3L11
 固体高分解能 NMR 3P075
 固体高分解能 NMR 1P145★
 固体高分解能測定法 2P113
 固体相関 NMR 2P143
 枯草菌 3P003
 交換速度 1P061

交差緩和定数 1P007★
 交差分極 3L12
 光合成 3P012
 光合成細菌 1P010★
 光励起三重項状態 3P159
 好中球 3P030
 好熱菌 1P016★
 抗菌ペプチド 2P038
 抗菌ペプチド 3P042
 抗生物質 3P024
 抗微生物活性 3P078
 構造 2P089
 構造・機能解析 1P034★
 構造プロテオミクス 3L2
 構造プロテオミクス 1P034★
 構造プロテオミクス 3P039
 構造プロテオミクス 2P044
 構造プロテオミクス 2P050
 構造プロテオミクス 3P051
 構造プロテオミクス 3P063
 構造プロテオミクス 1P064
 構造プロテオミクス 2P065
 構造依存性化学シフト 2P026
 構造解析 1P109★
 構造訂正 3P069
 構造変調波 1P118★
 構造揺らぎ 1L8
 酵母 3P102
 香氣 2P068
 高圧 ²⁹Xe NMR 1P141★
 高圧 NMR 3P048
 高温超伝導 3P150
 高感度化 1P147★
 高次構造 1P124★
 高磁場 1P108★
 高磁場 MRI 2P101
 高磁場 MRI 1P106★
 高磁場 NMR 1P151★
 高磁場固体 NMR 3P144
 高速 MAS 1P117★
 高度好熱菌 1P013★
 高発現 1P019★
 高分子 2P116
 高分子 2P161
 高分子ゲル 3P084
 高分子の分離・定量法 2P161
 高分子量タンパク質 1L7
 高分子量タンパク質 1P001★
 高分子量タンパク質 1P046★
 高偏極 Xe 3L6
 骨密度計測 1P099★
 混合膜 3P042
 (さ)
 サソリ毒ペプチド 2P032
 サリノマイシン 1L10
 サンプリング 1L14
 細孔 3L7
 細胞 1L11
 細胞壁溶解酵素 3P003

三次元構造	1P055	スピンラベル	1P052
酸化還元電位	1L3	スピン拡散法	2P062
残余双極子結合	1P046★	スピン緩和	3P048
残余双極子効果	1L9	スピン結合定数	1L10
残余双極子相互作用	1P025★	スピン結合定数	2P014
(し)		スペクトルシミュレーション	2P140
シグナル完全帰属	1P001★	スペクトルの折り返し	3P006
シグナル完全帰属法	1L7	スペルミジン	2P014
シス・トランス異性体	1P073★	水素結合	1P079
ジスルフィド結合	2P038	水素結合	3P135
シトクロム _c	1L3	水素結合	2P146
シミュレーション	1P094	水素結合ドナーの酸性度	3P060
シム	3P105	水素結合を介したJ結合定数	3P060
シミュレーション	2P080	水中接着タンパク質	3P015
シラノール	1P082★	水和水	2P017
シリケートゲル	3P078	(せ)	
四極子	1P112★	セルロース	3P120
四極子核	3P111	ゼロボイルオフ	3L3
四極子核	1P145★	正孔輸送材料	1P133★
四極子核 NMR	2P155	正孔輸送材料	1P136★
脂質二重膜	3P042	赤色光受容体 phytochromeB	2P041
脂質二重膜	2P119	接合伝達	2P005
脂質二重膜	1P127★	折返し	1L14
脂質膜	3P087	線形解析	1L8
脂肪分布	2P104	線形解析	3P081
時間強度平均	3L12	線虫	2P038
磁気異方性効果	2P074	選択的プロトン標識	1P046★
磁場プロファイル	1P154★	選択的緩和法	1P067
磁場勾配 NMR	3L10	(そ)	
磁場勾配 NMR	1P085★	双極子相互作用	2P116
磁場勾配 NMR	1P088★	相互作用	1P016★
磁場勾配 NMR	2P161	相互作用	3P090
磁場勾配 NMR 法	3P084	相互作用解析	3P027
自己拡散係数	2P083	相互作用解析	1P058★
自己拡散係数	2P161	相対論の効果	3P093
自己触媒反応	3P126	相転移	2P125
自動最適化	2P002	相同 DNA 組換え	2P059
自動測定	2P002	測定パラメータ	2P002
自由体積	2P137	(た)	
修復	1P016★	ダイナミクス	3P135
重水素 NMR	2P140	タンパク 3000 プロジェクト	3L2
重水素化	1P046★	タンパク質-DNA 相互作用	2P029
重水素交換	3P009	タンパク質安定性	1L7
重水素標識	1L4	タンパク質合成	3L1
準秩序構造	1P118★	タンパク質微結晶	2P029
常磁性 NMR	1L3	タンパク質溶液 NMR	2P002
常磁性 NMR	3P045	多チャンネル	2P152
常磁性緩和	1P004★	多核固体 NMR	3L7
常磁性緩和	2P140	多核種 NMR	2P101
蒸発量	1P148★	多核多次元 NMR	2P002
色素配位	3P012	多孔質微粒子	1P160
食品	2P104	多孔性金属錯体	1P139
食品	3P105	多次元 NMR	3P006
新規フォールド	3P063	多次元 NMR	3P018
神経ペプチド	1P037★	多次元 NMR	2P041
神経伝達物質	3L5	多次元 NMR	1P115
(す)		多変量解析	2P092
スターポリマー	1P085★	多変量解析	2P107
ステロイド	1P079	唾液	3P090

対数正規分布	3P090	同時計測	3L5
代謝物プロファイリング	2P092	同時測定	2P158
代謝物プロファイリング	2P107	(な)	
大腸菌発現	1P010★	ナノチャンネル	1P082★
単斜晶	2P128	ナノ尿素チャンネル	3L10
単離不可能	1P070★	内部回転	2P071
炭化水素鎖間の引力的相互作用	3P066	難溶性タンパク質	1P001★
炭窒化ほう素	1P145★	(に)	
蛋白質	1L8	ニューテーション	1P163
蛋白質	1L9	二次元スピン拡散固体NMR法	2P026
蛋白質	1L11	二次元スピン拡散固体NMR法	1P028★
蛋白質間相互作用	1L11	二次元二量子 NMR	3L8
(ち)		二次元二量子 NMR	3P132
チャンネル	1P130★	二次元二量子 NMR	1P133★
チャンネルキャピティ-	1P088★	二次構造	3P033
チロシン	1L8	二次構造	1P112★
置換基効果	3P060	二量子遷移	3P090
遅延時間	1L14	二量体形成	2P035
中間体	1P070★	日内変動	3P090
中性子結晶構造解析	2P017	(ぬ)	
超プロトン伝導	2P146	ヌクレオソーム	3P021
超高速測定	3P006	(ね)	
超高速測定	2P158	熱安定性	1L3
超小型プローブ	3P153	熱安定性	2P053
超伝導磁石	3P150	熱処理	3P129
超偏極	3P081	熱膨張係数	2P137
超偏極	2P086	熱励起構造	3P048
超偏極	2P149	粘土ゲル	2P077
超偏極	1P160	(の)	
超偏極 Xe	3L7	脳	2P101
超偏極 Xe-129	1P007★	脳機能計測	2P149
超偏極 Xe-129	1P100★	脳機能診断	2P098
(て)		脳血液関門	3L4
データベース	3P069	脳血流	1P100★
データベース	3P162	脳血流計測	3L6
デザイン	2P011	脳組織縦緩和時間	3L6
テルペン	3P075	(は)	
テロメア	1L5	バイセル	1L10
テロメア	1P058★	バイセル	3P087
低コスト	1P019★	ハイブリッド磁石	1P154★
低周波核	3P144	パイ共役系高分子	1P121★
低周波数核種	3P156	バクテリオクロロフィルc	2P062
低濃度	1L7	バケット積分	2P092
鉄の恒常性	2P008	バナジウム	1P055
鉄硫黄タンパク質	3P054	パルスジェネレータ	2P152
転写	3P027	パルス磁場勾配	2P077
転写	1P040★	配向脂質二重層膜	2P023
転写因子	3P036	配向試料	3L9
電子構造	1P031★	配座解析	1L10
(と)		配置	1P052
トリグリセリド	3P066	白質病変	2P098
糖タンパク質	1L2	半整数スピン	3P114
糖鎖	1L2	(ひ)	
動的核偏極	3P159	ヒト胚子	1P103★
動的構造	2P071	ヒルベルト変換	1P163
動的構造	2P119	光センサー	1L1
動的構造	1P127★	光ポンピング	2P149
動的膜結合構造	1P022★	非金属タンパク質	1P004★
同位体標識	1P010★	非晶材料	3L8

非晶材料	3P132	芳香族溶媒	3P066
非晶材料	1P133★	芳香族溶媒	2P074
非線形最小自乗法	1P163	(ま)	
微小管	3P033	マイクロコイル	3L9
微生物産生高分子	3P138	マイクロコイル	3P153
微量サンプル	3L9	マイクロ化学システム	1P082★
表面ヒスチジン	1P004★	マウス cDNA	2P044
病態解析	2P107	マグネット	1P148★
品質管理	1L2	マジック角試料回転	1P108★
(ふ)		膜タンパク質	3P012
フィトクロム	1L1	膜タンパク質	1P117★
フィブロイン	3P036	膜環境	1P052
フィルタ	1L14	膜蛋白質	2P008
フーエリスペクトル法	1P091	膜表在性タンパク質	1P127★
フォールディング	3P009	膜表在性蛋白質	2P119
フォールディング	2P011	(み)	
フジツボ	3P015	ミオグロビン	3P045
プロテクション因子	3P009	ミトコンドリア	2P059
プロトン拡散	2P146	ミトコンドリア内膜	2P008
不均一構造	1P028★	水ガラス	2P122
不溶化	3P129	水分子	3L4
部位特異的安定同位体ラベル	3P123	(む)	
複素環	1P067	無機固体酸	2P146
物理吸着	1P141★	無細胞	3L1
分解能	1L13	無細胞タンパク質合成	1L4
分子運動性	1P124★	無細胞タンパク質合成	1L7
分子間パッキング	2P134	無細胞タンパク質合成	3L2
分子間構造	2P113	無細胞タンパク質合成	1P001★
分子間相互作用	2P074	無細胞タンパク質合成	3P039
分子間相互作用	1P094	無細胞タンパク質合成	2P050
分子軌道法	1P094	無細胞タンパク質合成	3P051
分子認識	1P139	(め)	
分枝状アルカン	2P074	メタボローム	2P092
粉末 X線解析	1P139	メタボローム	2P107
(へ)		メタン	1P088★
ペプチド	2P011	メチル化DNA結合タンパク質	1P061
ペプチド	2P110	(も)	
ペプチド	1P112★	モデルペプチド	3P123
ペプチド	2P113	キルフォロジー	2P131
ペプチドグリカン	3P003	(ゆ)	
ペプチド結合	2P017	有機 EL	3L8
ペプチド結合	1P073★	有機 EL	3P132
ヘムタンパク質	1P031★	有機 EL	1P133★
ペルオキシソーム	1P043★	有機 EL	1P136★
平均自乗拡散距離	3L10	有機無機複合素材	2P122
平衡共振回路	1P151★	誘電損失	1P157★
平衡定数	1P007★	誘電率	1P157★
(ほ)		揺らぎ	1P154★
ホヤ	1P055	(よ)	
ポリ (ε-リジン)	3P138	溶液 NMR	2P005
ポリ (アルキルプロピオレート)	2P071	溶液 NMR	3P012
ポリアクリル酸	2P122	溶液 NMR	2P032
ポリアミド	2P131	溶液 NMR	2P053
ポリエチレン	2P128	溶液構造	3P033
ポリエチレンテレフタレート	3P132	溶液構造	1P079
ポリフェニレンエーテル	3P129	溶液構造解析	2P041
包摂化合物	3P078	溶血活性ペプチド	1P022★
包摂化合物	3P081	溶媒効果	1P073★
芳香族ポリイミド	2P134	溶融結晶化	2P131

弱い相互作用	2P014
(ら)	
ラクタム	1P073★
ラクトフェリシン	3P042
ラメラ構造	3P123
(り)	
リガンド結合	2P035
リグニン誘導体	1P160
リゾチーム	3P009
リボソーム蛋白質	3P024
リンカーヒストン	3P021
立体化学	2P068
立体構造	3P015
立体構造	3P030
立体構造	2P032
立体構造	2P038
立体構造解析	3P018
立体構造解析	2P110
立体構造決定	1L4
立体整列同位体標識	1L4
立体配座解析	2P014
量子化学計算	3L8
量子化学計算	1P136★
臨界挙動	1P121★
(れ)	
レーザパルス整形	3P159
レクチン	1L2
レチノイン酸	1P067
連鎖構造	2P143
(ろ)	
漏洩磁場	3L3
(わ)	
ワトソン-クリックAT塩基対	3P060

著者索引

(アルファベット)

Annala A. 2L2
 Arto Annala 3P096
 Blanca Lopez-Mendez 1P097
 Carninci P. 2P044
 David Wright 3L6
 Dimtri G.Fedorov 1P094
 Fredriksson K. 2L2
 Wolfram Gronwald 1L8
 Wolfgang Hengstenberg 1L8
 Jeff Kershaw 3L6
 Hans Robert Kalbitzer 1L8
 Khetrapai C. L. 1L6
 Kimmo Paakkonen 3P096
 Kumar P. 1L5
 Eriks Kupce 1P115
 Li Dai 2P032
 Louhivuori M. 2L2
 Markley J. L. 2L7
 Marta Andriantsiferana 2P032
 Michael Williamson 2P023
 Nagana Gowda G. A. 1L6
 Permi P. 2L2
 Peter Güntert 2P095
 Peter Güntert 2P044
 Peter Güntert 3L2
 Peter Güntert 1L4
 Peter Güntert 3P096
 Peter Güntert 1P097
 Reay Paul 1L1
 Tjandra N. 2L4
 Yi-Jan Lin 2P005
 カーショウ ジェフ 2P149
 ライト デービッド 2P149
 (あ行)
 相沢智康 2P038
 相沢智康 3P036
 相見敬太郎 2P134
 相見敬太郎 1P124★
 相見敬太郎 2P125
 相根岳志 2P014
 青木雅昭 1P034★
 青木雅昭 3P039
 青木雅昭 2P065
 青木雅昭 3P063
 青木雅昭 3P051
 青木雅昭 2P044
 青木雅昭 1P064
 青木雅昭 2P050
 青木陽二 2P140
 明石知子 1P058★
 赤木香予 2P041
 赤坂一之 3P048
 赤坂一之 1L8
 秋庭健吾 2P062
 阿久津秀雄 3P162
 阿久津秀雄 1P108★

阿久津秀雄 1P025★
 阿久津秀雄 3L11
 阿久津秀雄 2P062
 浅川直紀 1P091
 浅川直紀 1P118★
 浅川直紀 1P121★
 朝倉克夫 2P002
 朝倉哲郎 2P050
 朝倉哲郎 3L9
 朝倉哲郎 1P028★
 朝倉哲郎 2P023
 朝倉哲郎 2P026
 朝倉哲郎 2P113
 朝倉哲郎 3P123
 浅沼三和子 1P055
 浅野敦志 2P122
 浅見由美 1P067
 朝山宗彦 3P054
 芦田淳 1P115
 芦田淳 3P156
 芦田淳 1P028★
 安達裕子 1P007★
 阿部孝政 2P044
 阿部孝政 1P034★
 阿部千景 3P045
 荒川貴博 2P044
 荒木望嗣 2P011
 有福和紀 2P092
 有福和紀 2P107
 安藤勲 2L6
 安藤勲 3L10
 安藤勲 1P085★
 安藤勲 1P088★
 安藤勲 1P130★
 安藤勲 2P023
 安藤勲 3P084
 安藤勲 3P123
 安藤慎治 2P134
 安藤慎治 1P124★
 安藤慎治 2P125
 安藤聖子 2P137
 飯島隆広 1P142★
 飯島隆広 1P145★
 飯島隆広 1P154★
 飯島隆広 3P111
 飯田奈智子 1P099★
 飯塚靖子 2P053
 五十嵐昭 3P129
 五十嵐昭 2P131
 井倉真由美 2P056
 池田泰久 2P077
 池田龍一 3P111
 石井毅 2P053
 石川冬木 1L5
 石川麗 3P060
 石崎逸子 1P004★
 石田信昭 2P104
 石津浩二 1P085★
 石部聡子 2P029

石丸臣一 2P089
 泉顕也 2P050
 泉顕也 1P034★
 板倉直久 2P140
 伊藤勲 2P155
 伊藤聡 1P148★
 伊藤允好 1P067
 伊藤有希 3P126
 伊藤隆 2P029
 伊藤隆 1P013★
 伊藤隆 2P008
 伊藤隆 1P016★
 伊藤隆 2P059
 伊藤隆 1L11
 伊藤佳孝 3P150
 稲岡齐彦 1P052
 稲垣冬彦 1P046★
 稲垣冬彦 3P030
 稲垣冬彦 3P054
 井上仁 1P013★
 井上仁 1P016★
 井上真 1P034★
 井上真 3P063
 井上真 3P039
 井上真 2P050
 井上真 3P051
 井上真 2P065
 井上真 2P044
 井上真 1P064
 井上義夫 1P091
 井上義夫 1P118★
 井上義夫 1P121★
 井上良三 3P126
 猪股晃介 1P061
 今田悌子 3L9
 井村桂子 3P090
 入江一浩 2P110
 岩崎了教 1P058★
 岩下孝 2P032
 岩下由紀 1L4
 岩波健太郎 3P045
 岩本典子 3L4
 岩谷奈央子 3P033
 上釜奈緒子 1P127★
 上釜奈緒子 2P119
 植木龍也 1P055
 植草協子 2P092
 植草協子 2P107
 上杉晴一 1L5
 上田貴洋 1P141★
 上田昌史 1P070★
 上野隆 2P047
 上林正己 1P094
 上原宏樹 2P128
 上原宏樹 3P129
 上原宏樹 2P131
 上山毅 1P100★
 上原毅 1L12
 鵜澤洵 3P027
 宇田広子

宇津澤慎	3P105	小野克輝	3P021	川村出	1P117★
内海博明	1P070★	小野真也	1P103★	川村純司	2P026
内海博明	1P079	小野裕嗣	3P135	神成さらら	1P151★
梅田雅宏	2P098	小原収	3P039	菅野巖	2P149
梅山万左子	3P042	帯田孝之	2P056	菅野巖	3L6
江川文子	2P062	(か行)		木川隆則	3L2
江口太郎	1P141★	甲斐荘正恒	1L4	木川隆則	1P034★
榎園能章	1L5	甲斐荘正恒	3L11	木川隆則	3P039
遠藤一央	2P140	甲斐荘正恒	1P108★	木川隆則	2P044
遠藤斗志也	2P056	甲斐荘正恒	2P005	木川隆則	2P050
遠藤弘	1P064	甲斐荘正恒	3P060	木川隆則	3P051
遠藤弘史	3P126	香川晃徳	3P159	木川隆則	3P063
遠藤弥重太	3L1	柿谷吉則	2P062	木川隆則	1P064
大石修	2P152	笠井信幸	1P040★	木川隆則	2P065
大石徹	2P014	笠井信幸	1L9	菊地淳	1P147★
大木出	1P040★	笠原浩司	3P102	菊地淳	1P157★
大木出	1P061	梶弘典	3L8	菊池慶実	1P019★
大木忍	1P154★	梶弘典	1P133★	岸本直樹	1P145★
大木忍	1P142★	梶弘典	1P136★	奇世媛	3P102
大木忍	3P111	梶弘典	3P132	北浦和夫	1P094
大久保征治	2P020	加治屋勝子	3P087	北川進	1P139
大窪貴洋	2P077	春日久栄	2P068	北川宏	2P089
大久保忠恭	3P024	片岡正和	3P018	北川勝浩	3P159
大郷耕輔	1P028★	片岡義朝	1L11	北野実智子	1P001★
大郷耕輔	2P026	片平正人	1L5	北原亮	3P048
大竹陽介	1P103★	片山由貴子	1P034★	北森武彦	1P082★
大塚昭弘	1P148★	加藤悦子	3P120	木塚三津子	3P123
大塚昭弘	3L3	加藤悦子	1L1	木吉司	2P050
大友征宇	3P012	加藤悦子	3P054	金善美	3L10
大友征宇	1P010★	加藤悦子	2P041	木村敦臣	1P160
大貫裕之	1P034★	加藤健一	3P003	木村敦臣	2P086
大野曜吉	2P092	加藤晃一	1L2	木村敦臣	1P100★
大野曜吉	2P107	加藤晃一	1P043★	木村敦臣	1P007★
大橋淳史	1P130★	加藤静恵	3P054	木村朋子	2P161
大橋淳史	3P084	加藤博章	1P043★	木村友美	3P057
大橋肅	1L5	加藤祐子	2P080	木村英昭	3P075
大橋竜太郎	2P110	加藤祐輔	2P038	木村英昭	1P031★
大平学	1P121★	金澤健治	1P094	木村英昭	1L3
大嶺将人	1P117★	金子暎里	2P086	木村雅也	3P009
小笠原富夫	3L1	金子暎里	1P007★	日下康成	1P136★
岡田あずさ	3P102	金田晃一	3P003	工藤正人	1P010★
岡田美美	1P099★	金橋康二	2P143	工藤倫子	1L5
岡田雅司	1P127★	金橋康二	3L7	国本浩喜	3P138
岡田雅司	2P119	金橋康二	3P144	窪田健二	2P053
岡村英保	1P058★	狩野圭子	2P128	熊木康裕	3P036
岡本邦彦	3P009	鎌足雄司	1P034★	熊木康裕	2P038
岡本茂	2P137	上口憲陽	1P085★	熊澤茂則	3P087
岡本大	3P114	紙野圭	3P015	久米田博之	3P054
小川誠二	2L8	上平美弥	3P126	倉科昌	3P081
萩野孝史	3P090	亀田篤司	2P035	倉島かおり	2P008
奥居徳昌	2P125	亀田恒徳	3P135	倉光成紀	3P024
奥井良夫	1P148★	亀田恒徳	1P109★	栗崎敏	2P080
小椋賢治	3P030	河合純	2P044	栗本智光	1P163
小椋賢治	1P046★	河合剛太	3P057	栗本智充	2P002
小椋賢治	3P054	川口恭輔	3P036	黒木重樹	1P085★
小此木美智	2P113	川瀬泰司	2P026	黒木重樹	3L10
尾瀬農之	2P056	河野敬一	2P047	黒木重樹	3P084
小野晶	3P060	河野敬一	2P038	黒木重樹	1P130★
小野明	1L4	川原俊一	3P060	黒木重樹	1P088★

黒津卓三	2P122	小松千江子	3P018	清水光弘	3P021
桑原大介	3P114	小松千江子	1P001★	下池田勇一	1P151★
桑原大介	2P155	駒野照弥	2P005	下竹敦哉	1P061
小池薫	2P107	木南英紀	2P047	莊司顯	1P112★
小池薫	2P092	古明地勇人	1P094	莊司顯	3P075
小池芳雄	3P078	古家野宏行	3P114	白井文晴	2P068
神田大輔	2P056	小山泰	2P062	白川昌宏	2L1
合田名都子	3P033	近藤靖	3L6	白川昌宏	1P037★
河野隆英	2P047	(さ行)		白川昌宏	3P033
河野俊之	1L7	才川和也	3P030	白川昌宏	1P061
河野俊之	1P004★	斎藤一功	3L3	白川昌宏	3P102
河野俊之	2P053	齋藤公児	3L7	白川昌弘	1P004★
河野俊之	1P052	齋藤公児	3P144	白水美香子	1P034★
河野俊之	3P018	齋藤公児	2P143	白水美香子	3L2
河野俊之	1P001★	齋藤講平	2P050	白水美香子	3P024
河野俊之	3L1	齋藤講平	1P034★	白水美香子	2P065
甲野裕之	3P120	齋藤隆通	1P076	白水美香子	3P063
甲本忠史	2P128	齋藤肇	3P087	白水美香子	1P064
甲本忠史	3P129	齋藤肇	1P117★	白水美香子	3P039
甲本忠史	2P131	酒井伸也	2P041	白水美香子	2P044
後閑和孝	3P012	酒井伸也	1L1	白水美香子	3P051
古久保哲朗	3P102	坂本恵子	3P009	白水美香子	2P050
小暮広行	2P053	坂本泰一	3P057	秦旭栄	2P065
越野広雪	3P069	櫻井一正	2P035	神藤平三郎	3P021
越野広雪	3P150	櫻井智司	1P070★	神藤平三郎	2P020
小柴生造	3P039	櫻井博	1P040★	榛葉信久	1L13
小柴生造	2P050	笹川拓明	1P043★	榛葉信久	1P019★
小柴生造	3P051	佐々木千鶴	3P138	須貝真理子	3P018
小柴生造	2P044	佐藤和志	3P012	菅瀬謙治	2P032
小柴生造	1P034★	佐藤寛子	3P069	杉浦眞喜子	1P067
児嶋長次郎	1L14	佐藤衛	1P058★	杉沢寿志	1P151★
児嶋長次郎	3P060	佐藤満	1P085★	杉田多喜男	2P119
児嶋長次郎	3P003	三本木至宏	1L3	杉原文徳	3P102
児嶋長次郎	2P041	塩田浩平	1P103★	杉森望	1L4
児嶋長次郎	1P004★	敷井和彰	1P079	鈴木秋弘	1P031★
小菅哲	1P010★	志田敏夫	3P003	鈴木榮一郎	1P019★
巨瀬勝美	3P105	志田裕幸	2P131	鈴木咲良	2P020
巨瀬勝美	1P099★	志田裕幸	3P129	鈴木知彦	3P045
巨瀬勝美	1P103★	品川麻衣	1P019★	鈴木壮幸	3P087
小関佑	2P125	篠崎一雄	1P034★	鈴木悠	2P023
小塚心尋	2P071	篠崎一雄	3P051	鈴木倫太郎	3P015
後藤敦	1P154★	篠崎一雄	2P050	鈴木倫太郎	1L1
後藤敦	1P142★	篠崎一雄	2P065	住本英樹	3P030
後藤敦	3P111	篠原和也	3P078	清宮恭子	3P057
後藤祐児	2P035	志野英雄	1P151★	瀬尾芳輝	3L4
小西和頼	1P160	柴田武彦	2P008	瀬川新一	3P009
小西由紀	1L5	柴田武彦	2P059	関英子	1P034★
小林学	3P066	柴田武彦	1P013★	関英子	2P065
小林邦子	3P018	柴田武彦	1L11	関英子	3P039
小林邦子	1P001★	柴田武彦	2P029	関英子	3P063
小林俊達	2P041	柴田武彦	1P016★	関英子	3P051
小林俊達	1P004★	柴田洋之	1P043★	関英子	1P064
小林直宏	1P055	嶋田一夫	2L3	関英子	2P044
小林正幸	3P012	嶋田純也	3P132	関英子	2P050
小林正幸	1P010★	清水禎	3P111	関口順一	3P003
小林祐次	3P024	清水禎	1P154★	関宏子	1P079
小日山輝泉	2P071	清水禎	1P142★	関原明	1P034★
小松一男	2P161	清水禎	1P145★	関原明	3P051
小松一男	2P083	清水真人	3L1	関原明	2P050

関原明 2P065
 瀬戸治男 3P072
 千本木裕 2P008
 徐みんす 1L5
 染谷龍彦 3P057
 (大行)
 太虎林 1L3
 大道寺謙悟 3P126
 田井真由理 1L4
 高杉憲司 2P002
 高杉憲司 3P006
 高杉憲司 2P050
 高杉憲司 2P158
 高杉憲司 1P163
 高野誠 1L1
 高野誠 2P041
 高橋政三 3P090
 高橋大樹 1P108★
 高橋雅人 1P147★
 高橋雅人 1P157★
 高屋展宏 1P106★
 高屋展宏 3L5
 高屋展宏 2P101
 高山真一 1L3
 高山俊夫 3P078
 滝谷重治 3P036
 竹腰清乃理 1P112★
 竹腰清乃理 2P110
 武田和行 3P153
 武田和行 3P159
 田代桜子 2P020
 田代桜子 3P021
 龍野宏人 1P124★
 立石雄一 2P080
 立石幸寛 1P037★
 楯真一 1L9
 楯真一 1P040★
 田所誠 2P089
 田仲昭子 3L2
 田仲昭子 1P064
 田仲昭子 2P065
 田仲昭子 3P039
 田仲昭子 3P051
 田仲昭子 2P050
 田仲昭子 2P044
 田中剛史 3P018
 田中剛史 1P001★
 田中忠蔵 2P098
 田中弘文 2P020
 田中利好 1P001★
 田中利好 3L1
 谷生道一 3P087
 谷口尚 1P145★
 谷田以誠 2P047
 田畑昌祥 2P071
 田畑亮 2P041
 田村厚夫 2P011
 田村裕介 1L5
 丹所正孝 3P111

丹所正孝 1P145★
 千葉かおり 2P017
 千葉かおり 1P073★
 陳偉萍 2P098
 中條利一郎 3P075
 趙晨華 1P034★
 塚原好美 3P075
 塚原剛彦 1P082★
 塚本直樹 1P133★
 塚本直樹 3L8
 塚本直樹 1P136★
 月田承一郎 3L4
 辻暁 3P087
 辻暁 2P119
 辻暁 1P127★
 辻暁 1P117★
 辻田義治 2P137
 辻本拓哉 1P025★
 津田栄 2P038
 土田有紀 2P020
 土屋征司 1L4
 堤遊 1P073★
 堤遊 2P017
 出村哲夫 2P014
 出村誠 3P036
 出村誠 2P038
 寺内勉 1L4
 寺内勉 1P108★
 寺内勉 2L5
 寺尾武彦 1P112★
 寺尾武彦 1P109★
 寺尾武彦 2P110
 寺尾武彦 2P131
 寺尾綱哲 3P129
 寺田貴帆 1P034★
 寺田貴帆 2P050
 寺田貴帆 3P024
 寺田貴帆 2P065
 寺田貴帆 3P063
 寺田貴帆 2P044
 寺田貴帆 1P064
 寺田貴帆 3P039
 寺田貴帆 3P051
 天野剛士 1P004★
 藤部康弘 1P145★
 藤部康弘 3P111
 栃尾尚哉 3P039
 3P051
 栃尾豪人 1P061
 栃尾豪人 1P037★
 栃尾豪人 3P102
 戸所泰人 3L11
 富澤忠 2P050
 富澤忠 2P044
 富澤忠 1P034★
 富羽貞範 1P099★
 鞆康子 3P039
 鞆康子 3P051
 鞆康子 2P050

虎谷秀一 1P022★
 鳥飼真之介 3P030
 鳥澤拓也 1L4
 (な行)
 内藤晶 1P022★
 内藤晶 3L12
 内藤晶 3P042
 内藤晶 3P087
 内藤晶 1P117★
 内藤晶 3P126
 内藤成弘 2P104
 内藤猛章 1P070★
 長尾聡 1P031★
 長尾祐樹 2P089
 中越雅道 1P070★
 中澤靖元 3P123
 中澤靖元 2P023
 中澤靖元 2P113
 中嶋暉躬 2P032
 長島敏雄 3P063
 中筋一弘 2P089
 中谷英一 3P162
 長土居有隆 1P049
 長友重紀 1P031★
 長友重紀 1L3
 中西洋志 1P073★
 中西洋志 2P017
 中野智志 1P145★
 中野智志 2P038
 中野学 2P038
 中野優美 1P160
 中村和彦 1P073★
 中村和浩 3L6
 中村和浩 2P149
 仲村高志 3P150
 中村春木 3P162
 中村良平 2P089
 中山勉 3P087
 成瀬昭二 2P098
 南条文雄 3P087
 西川忠輝 1P058★
 西原寛 3P081
 西村勝之 3L12
 西村勝之 1P022★
 西村勝之 3P042
 西村勝之 1P117★
 西村伸太郎 2P098
 西村光広 3P024
 西村善文 3P027
 西村善文 1P049
 西村善文 1P058★
 西山裕介 1P109★
 仁木國雄 3P066
 仁木國雄 2P074
 新田勝利 3P036
 新田勝利 2P038
 新田武弘 3L4
 沼田ゆかり 3P120
 根本貴宏 1P151★
 根本貴宏 3P144

根本貴宏 2P143
根本直 1P094
根本暢明 2P002
根本暢明 2P050
根本暢明 2P158
野口聡子 3P057
野口真路 1P052
野澤庸則 3P012
野澤庸則 1P010★
野田康夫 3P009
野中香織 2P014
野村誠 1P004★
野村充 3P027

(は行)

拝師智之 3P105
拝師智之 2P104
拝師智之 1P103★
拝師智之 1P099★
端健二郎 1P154★
端健二郎 1P142★
端健二郎 3P111
長谷川憲一 1P151★
長谷川淳 1L3
島山盛明 3P144
島山盛明 3L7
畑中信一 2P155
島中秀樹 2P020
畑中稔 2P029
初田美砂紀 2P074
八田玲子 1P064
服部峰之 1L8
服部峰之 3P081
花岡慎悟 1P049
花岡慎悟 1P058★
馬場清喜 3P057
濱田季之 1P055
濱田季之 1P034★
濱田衛 3L3
林崎良英 3L2
林崎良英 1P064
林崎良英 2P050
林崎良英 2P044
林茂雄 2P155
林繁信 2P146
林征治 1P148★
林征治 3L3
林宣宏 1L11
林文昌 3L2
林文晶 2P065
林文晶 3P063
林文晶 1P064
林文晶 1P055
林文晶 1P034★
早水紀久子 3P081
原一公 2P062
原田英里砂 3L11
原太志 2P020
半田晋也 1P103★
半田晋也 3P105

樋岡克哉 1P151★
樋口雄一郎 1P034★
火原彰秀 1P082★
平井佑紀 1P031★
平冲敏文 2P071
平尾優佳 1P058★
平賀隆 3P081
平川慶子 2P107
平川慶子 2P092
廣明秀一 3P033
広瀬量一 1P148★
廣田洋 3L2
廣田洋 1P034★
廣田洋 3P039
廣田洋 2P044
廣田洋 2P050
廣田洋 3P051
廣田洋 1P055
廣田洋 3P063
廣田洋 1P064
廣田洋 2P065
付凱 1P088★
深澤隼 1P112★
福井洋之 3P093
福永雅喜 2P098
福原忠雄 2P083
福原忠雄 2P161
福水伸一 1P148★
藤川昭彦 2P098
藤倉由紀子 3P039
藤倉由紀子 3P051
藤倉由紀子 2P050
藤倉由紀子 2P050
藤瀨良弘 3P045
富士原和也 3P057
藤原健一朗 1P004★
藤原健一朗 1P061
藤原敏道 1P108★
藤原敏道 3L11
藤原敏道 2P062
藤原英明 2P086
藤原英明 1P160
藤原英明 1P100★
藤原英明 1P007★
藤原正子 2P092
藤原正子 2P107
藤原正子 3P072
降旗一夫 3L4
古瀬幹夫 3L4
古家健 1P099★
古屋伸久 2P005
星野宏和 2P038
星野大 2P035
細田和男 1P052
堀井文敬 1P133★
堀井文敬 3L8
堀井文敬 1P136★
堀井文敬 3P132
堀内崇 1P147★
堀内崇 1P157★

堀毛悟史 1P139
本多賢吉 1P016★
本多賢吉 1P013★
本多賢吉 2P029
(ま行)
前澤国芳 1P141★
前田育子 3P135
前田史郎 3P138
前田秀明 1P147★
前田秀明 1P157★
前田秀明 3L2
前仲勝実 2P056
増田ときは 2P059
増田裕一 2P110
増本秀史 1P103★
松井政徳 1P088★
松尾洋 2P044
松上明正 1L5
松木陽 3P162
松崎光隆 2P113
松田貴意 1P034★
松田貴意 2P044
松田貴意 3P063
松田貴意 2P065
松田貴意 1P064
松田知己 2P095
松田善正 1P103★
松田亮太郎 1P139
松成一朗 2P098
松野めぐみ 2P074
松原清彦 1P091
松森信明 1L10
松森信明 2P014
松山俊文 1P004★
丸本佳代子 1L5
丸吉京介 2P014
馬渡康輝 2P071
三浦和紀 2P038
三上真一 1L3
美川務 1L11
美川務 1P013★
美川務 1P016★
美川務 2P029
美川務 2P059
三木孝史 3L3
三島正規 1P004★
三島正規 3P003
三島正規 2P041
水口峰之 2P047
水越利巳 1P019★
水野和子 1P076
水野正城 2P146
水野元博 2P140
溝口正 2P062
三田肇 1P031★
三田肇 1L3
三田肇 3P045
三田肇 3P075
道端齊 1P055

三森文行 3L5
 三森文行 1P106★
 三森文行 2P101
 宮内真悟 2P023
 宮久保圭祐 1P141★
 宮澤光博 1P109★
 宮澤光博 2P038
 宮澤光博 3P135
 宮田興子 1P070★
 三好利一 2P116
 武藤勝紀 3P138
 武藤裕 3L2
 村井清人 3P027
 村上一馬 2P110
 村田道雄 1L10
 村田道雄 2P014
 村田義文 2P122
 村中淳之介 3P138
 持田勲 3L7
 森内寛 1L9
 守誠一朗 1P118★
 森田勇人 3L1
 森望 3P027
 森本晃 2P110
 森陽一 3P015
 諸岡篤 1L10
 茂呂ふみか 3P123

(や行)

八木澤仁 1P127★
 八木澤仁 2P119
 八木宏昌 1P025★
 矢嶋一賀 2P098
 安室憲一 2P044
 矢吹一人 3P003
 矢吹考 1P034★
 矢吹孝 3P039
 矢吹孝 2P044
 矢吹考 2P050
 矢吹考 3P051
 矢吹孝 2P065
 矢吹孝 3P063
 矢吹孝 1P064
 山内一夫 3L9
 山内一夫 2P113
 八巻健 3P036
 八巻武 3P045
 山口行治 3P090
 山口健太郎 1P079
 山口悟 1P117★
 山口芳樹 1P043★
 山崎和彦 3L2
 山崎俊夫 3L2
 山崎向太 3P009
 山崎千春 1P163
 山崎俊夫 1P109★
 山崎俊夫 1P025★
 山崎俊夫 2P029
 山崎俊正 1L1
 山崎俊正 3P021

山崎俊正 3P015
 山崎俊正 2P041
 山崎悠弥 2P155
 山路奈保子 2P032
 山田格 3P045
 山田知典 1P136★
 山田知典 3L8
 山田博昭 1L8
 山根祐治 3P084
 山根祐治 1P130★
 山根祐治 1P088★
 山野井慶徳 3P081
 山延健 2P128
 山延健 3P129
 山延健 2P131
 山村猛 3P159
 山本一男 1P004★
 山本隆一 1P118★
 山本隆一 1P121★
 山本泰彦 3P075
 山本泰彦 1P031★
 山本泰彦 1L3
 山本泰彦 3P045
 行木信一 3P051
 湯澤聰 3P030
 油谷克英 2P017
 横山茂之 1P034★
 横山茂之 1P147★
 横山茂之 1P157★
 横山茂之 2P020
 横山茂之 3P024
 横山茂之 3P039
 横山茂之 2P044
 横山茂之 3P048
 横山茂之 2P050
 横山茂之 3P051
 横山茂之 1P055
 横山茂之 3P063
 横山茂之 1P064
 横山茂之 2P065
 横山貴男 1L9
 横山拓史 2P080
 吉川雅章 3P150
 吉田克典 2P083
 吉田茂男 1L12
 吉田慎一 1P046★
 吉田卓也 3P024
 吉田均 2P005
 吉田賢右 1P025★
 好田真由美 3L2
 好田真由美 1P034★
 好田真由美 3P039
 好田真由美 2P044
 好田真由美 2P050
 好田真由美 3P051
 好田真由美 2P065
 好田真由美 3P063
 好田真由美 1P064
 吉田充 3P135

吉益雅俊 1P016★
 吉益雅俊 1L11
 吉益雅俊 2P059
 吉水広明 2P137
 米澤徹 3P081
 米山操 3P051
 楊明英 2P026

(ら行)

李相益 3L7
 李華 1L8
 李映周 3P081
 凌楓 2P059

(わ行)

若井篤志 2P149
 若井篤志 3L6
 若松馨 1P052
 若松馨 2P053
 若山哲也 1P100★
 脇田久伸 2P080
 和田昭盛 1P067
 渡邊清 3P102
 渡辺順次 1P088★
 渡邊英宏 3L5
 渡邊英宏 2P101
 渡邊英宏 1P106★

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
Paakkonen	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丁目7-22	045-503-9465 kimmo@gsc.riken.jp	045-503-9343
Pantoja-Uceda	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丁目7-22	045-503-9465 dpantoja@gsc.riken.jp	045-503-9343
WAELEHLI M	ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮3-21-5	029-852-1234(212) markus.waelchli@bruker-biospin.jp	029-858-0322
Lopez Mendendez	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丁目7-22	045-503-9465 blanca@gsc.riken.jp	045-503-9343
相沢 智康	北海道大学 大学院理学研究科 〒060-0810 札幌市北区北10西8	011-706-3806 aizawa@sci.hokudai.ac.jp	011-706-3806
相見 敬太郎	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-S1-21	03-5734-2889 kaimi@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
赤坂 一之	近畿大学・生物理工学部 理研播磨研究所 〒649-6493 和歌山県那賀郡打田町西三谷930	0736-77-0345(4110) akasaka@bio.waka.kindai.ac.jp	0736-77-4754
阿久津 秀雄	大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 吹田市山田丘3-2	06-6879-8597 akutsu@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
朝倉 克夫	日本電子株式会社 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2	042-542-2241 kasakura@jeol.co.jp	042-542-3132
朝倉 哲郎	東京農工大学 大学院共生科学技術研究部 〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16	042-383-7733 asakura@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733
浅野 敦志	防衛大学校応用化学科 〒239-8686 横須賀市走水1-10-20	0468-43-6478(3596) gongon@syd.odn.ne.jp	0468-44-5901
浅野間 文夫	奈良先端科学技術大学院物質創成科学研究科 〒630-0101 奈良県生駒市高山町8916-5	0743-72-6174 ft1023@ybb.ne.jp	0743-72-6009
芦田 淳	バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド 〒108-0023 東京都港区芝浦4-16-36	03-5232-1238 jun.ashida@varianinc.com	03-5232-1264
安達 裕子	大阪大学医学部保健学科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-7	06-6879-2577(2577) kimura@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-6879-2577
阿部 孝政	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-21	045-503-9212 tabe@gsc.riken.jp	045-503-9210

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
阿部 真之	協和発酵工業株式会社医薬研究センター 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188	055-989-2030 masayuki.abe@kyowa.co.jp	055-989-2073
荒木 貴宏	(株)三菱化学科学技術研究センター 横浜分析センター 有機分析グループ 〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000	045-963-3166(3166) 045-963-4261 araki.takahiro@mg.m-kagaku.co.jp	
荒木 望嗣	神戸大学大学院自然科学研究科 〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1	078-803-5692 023d805n@y04.kobe-u.ac.jp	078-803-5692
荒田 洋治	自宅	arata@blue.ocn.ne.jp	
有福 和紀	日本電子データム株式会社共通技術本部システム G 〒196-0022 東京都昭島市中神町 1156	042-542-1306 karifuku@jeol.co.jp	042-542-4059
安藤 勲	東京工業大学大学院理工学研究科物質科学専攻 〒152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1	03-5734-2139 iando@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
飯島 隆広	物質・材料研究機構強磁場研究センター 〒305-0003 茨城県つくば市桜 3-13	029-863-5570(5483) 029-863-5571 IIJIMA.Takahiro@nims.go.jp	
池田 博	東京工業大学大学院生命理工学研究科 〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259	045-924-5758 hikeda@bio.titech.ac.jp	045-924-5833
池谷 鉄兵	産業技術総合研究所 生命情報科学研究センター 〒135-0064 東京都江東区青海 2-43 青海フロンティアビル 17 階	03-3599-8066 ikeya-t@aist.go.jp	03-3599-8081
石井 毅	群馬大学工学部生物化学工学科生物機能第二 〒376-0052 群馬県桐生市天神町 1-5-1	0277-30-1439 ishii@jig.ce.gunma-u.ac.jp	0277-30-1439
石川 麗	東京都立大学大学院理学研究科 〒192-0364 東京都八王子市南大沢 1-1	0426-77-1111(3538) ishikawa@nmr.chem.metro-u.ac.jp	
石田 信昭	独立行政法人食品総合研究所分析科学部 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12	029-838-8057 nobu@nfri.affrc.go.jp	029-838-7996
石丸 臣一	筑波大学数理物質科学研究科 〒305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1	029-853-4482 ishimaru@chem.tsukuba.ac.jp	029-853-6503
射手園 佳子	中外製薬(株)鎌倉研究所 〒247-8530 鎌倉市梶原 200	0467-47-2209 itezonoyks@chugai-pharm.co.jp	0467-45-6815
出田 圭子	九州大学先端物質化学研究所 研究支援センター 〒816-8580 福岡県春日市春日公園 6-1	092-583-8898 keiko@cm.kyushu-u.ac.jp	092-583-8898

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
井上 匡子	理化学研究所 横浜研究所 GSC タンパク質構造・機能研究グループ 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1丁目7-22	045-503-9462(5155) kyokoino@gsc.riken.jp	045-503-9641
井上 仁	横浜国立大学大学院 総合理学研究科 生体超分子システム分子生理学研究室 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7224 jinoue@postman.riken.go.jp	045-508-7364
猪股 晃介	横浜国立大学大学院総合理学研究科 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7213 inomata@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7316
井町 美佐子	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	029-852-1234(220) misako.imachi@bruker-biospin.jp	029-858-0322
岩下 孝	(財)サントリー生物有機科学研究所 機器分析室 〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1	075-962-6044 iwashita@sunbor.or.jp	075-962-2115
岩瀬 由紀子	福岡大学 薬学部 〒810-0180 福岡市城南区七隈3-19-1	092-871-6631(6651) wase@fukuoka-u.ac.jp	092-863-0389
岩田 健太郎	大阪大学蛋白質研究所蛋白質溶液学研究部門 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2 大阪大学蛋白質研究所	06-6879-8615 kentaro@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8616
岩谷 奈央子	横浜国立大学大学院総合理学研究科 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7201 iwa-nao@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
上釜 奈緒子	兵庫県立大学大学院生命理学研究科 生体物質構造学Ⅱ講座 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1	0791-58-0182(515) ri04q003@stkt.u-hyogo.ac.jp	0791-58-0182
植木 定雄	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	029-852-1234(443) sadao.ueki@bruker.jp	029-858-0322
上田 貴洋	大阪大学総合学術博物館 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-16	06-6850-5791 ueda@museum.osaka-u.ac.jp	06-6850-5785
上山 毅	大阪大学医学部保健学科 医用物理工学講座 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-7	06-6879-2577(2577) kimura@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-6879-2577
鶴澤 洵	理化学研究所植物科学研究センター 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	048-462-1111(5573) juzawa@postman.riken.go.jp	048-467-4959
内田 健一	帝京大学理工学部バイオサイエンス学科 〒320-8551 栃木県宇都宮市豊郷台1-1	028-627-7265 kuchida@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp	
梅山 万左子	横浜国立大学大学院工学府 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4231 d03ga202@ynu.ac.jp	

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
江川 文子	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 e-ayako@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
江口 太郎	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 eguchi@museum.osaka-u.ac.jp	06-6850-5785
大石 修	分子科学研究所 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38 番地	0564-55-7427 oishi@ims.ac.jp	0564-54-2254
大窪 貴洋	東京工業大学原子炉工学研究所 〒152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1-N1-34	03-5734-3061 tohkubo@nr.titech.ac.jp	03-5734-3061
大郷 耕輔	東京農工大学工学部朝倉研究室 〒184-0012 東京都小金井市中町 2-24-16	042-388-7025 ohgo@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733
大島(坂本)曜子	東邦大学・薬学部 中央機器室・NMR 〒275-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1	047-472-1282 sakamoto@phar.toho-u.ac.jp	047-472-1282
大友 征宇	東北大学工学研究科バイオ工学専攻 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉	022-217-7278 wang@biophys.che.tohoku.ac.jp	022-217-7278
大野 綾子	財団法人木原記念 横浜生命科学振興財団 横浜市立大学 総合理学 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29	045-508-7215(7215) ayako@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
大野 靖	日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 〒569-1125 大阪府高槻市紫町1-1	072-681-9700 yasushi.ono@ims.jti.co.jp	072-681-9725
大橋 淳史	東京工業大学理工学研究科物質科学専攻 〒152-8552 目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2880 aohashi@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
大橋 竜太郎	京都大学理学研究科 化学専攻分子構造化学 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4012 ryu@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
大橋 若奈	理化学研究所 GSC タンパク質構造昨日研究グループ 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22	045-503-9212 wohashi@gsc.riken.jp	045-503-9210
大平 学	東京工業大学大学院生命理工学研究科 〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259	045-924-5796(5796) ohira@cherry.bio.titech.ac.jp	
岡田 明彦	住友化学筑波研究所 〒300-3294 つくば市北原6番	029-864-4182 okadaa@sc.sumitomo-chem.co.jp	029-864-4746
岡野 恵聖子	上智大学理工学部化学科 〒102-8554 千代田区紀尾井町 7-1	03-3238-4164 e-okano@sophia.ac.jp	03-3238-3361

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
小川 潔	ライフサイエンス総合研究所 創薬第一研究所 〒410-2321 静岡県田方郡大仁町三福632-1	0558-76-7085 ogawa.kg@om.asahi-kasei.co.jp	0558-76-2947
荻野 孝史	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(5252) ogino@ncnp.go.jp	042-342-7521
奥井良夫	JASTEC マグネット事業部技術部 〒651-2271 神戸市西区高塚台 1-5-5	078-992-5720(直通) okui-jastec@kobelco.jp	078-992-5721
小椋 賢治	北海道大学大学院薬学研究所 構造生物学分野 〒060-0812 札幌市北区北12条西8丁目	011-706-9009 ogura@pharm.hokudai.ac.jp	011-706-4979
小野 明	東京都八王子市南大沢1-1 化学専攻有機構造生物化学講座 〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1	0426-77-1111(3526) ono@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2525
帯田 孝之	生体防御医学研究所ワクチン開発構造生物学分野 〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1	092-642-6969 obita@bioreg.kyushu-u.ac.jp	092-642-6764
甲斐荘 正恒	東京都立大学大学院理学科 〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1	0426-77-2544(3537) kainosho@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-2544
垣田 信吾	協和発酵工業株式会社 東京研究所 〒194-8533 東京都町田市旭町 3-6-6	042-725-2555(2220) skakita@kyowa.co.jp	042-726-8330
笠井 信幸	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 kasai@beri.or.jp	06-6872-8210
笠原 亜希子	第一製薬株式会社 研究技術センター 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西 1-16-13	03-3680-0151(2113) hidaiajt@daiichipharm.co.jp	03-5696-8334
梶 弘典	京都大学化学研究所分子材料化学研究領域 〒611-0011 宇治市五ヶ庄	0774-38-3149 kaji@scl.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
春日 久栄	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 hisae_kasuga@takasago.com	0463-25-2090
片平 正人	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 masakata@ynu.ac.jp	045-339-4264
片平 律子	協和発酵工業(株)東京研究所 〒194-8533 町田市旭町 3-6-6	042-725-2555(2211) rkatahira@kyowa.co.jp	042-726-8330
加藤 晃一	名古屋市立大学大学院薬学研究所 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1	052-836-3447 kkato@phar.nagoya-cu.ac.jp	052-836-3447

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
加藤 祐子	東和大学工業化学科 〒815-8510 福岡市南区筑紫丘1-1-1	092-541-1512 yukato@tohwa-u.ac.jp	092-552-2707
門原 寛	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 〒532-0004 大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-9 テラサキ第二ビル2	06-6394-8989 hiroshi.kadohara@bruker-biospin.jp	06-6394-9559
門 良一	京都産業大学理学部物理科学科 〒603-8555 京都市北区上賀茂本山	075-705-1634 kador@cc.kyoto-su.ac.jp	075-705-1640
金子 暁里	大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 医用工学講座藤原(英)研究室 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-7	06-6879-2577(2577) kaneko@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-6879-2577
金橋 康二	新日本製鐵(株) 端技術研究所 解析科学研究部 〒293-8511 千葉県富津市新富20-1	439-80-2264 nehasi@re.nsc.co.jp	439-80-2746
狩野 圭子	群馬大学大学院工学研究科材料工学専攻 〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	0277-30-1331 keiko_kanou@polymer.chem.gunma-u.ac.jp	0277-30-1333
上口 憲陽	東京工業大学大学院 理工学研究科物質科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(2880) kkamiguc@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
亀田 篤司	大阪大学蛋白質研究所蛋白質溶液学研究部門 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2	06-6879-8615 atkame@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8616
亀田 恒徳	農業生物資源研究所(生物研) 〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2	029-838-6213 kamedat@affrc.go.jp	029-838-6159
狩谷 英里	エーザイ(株)分析研究所 構造解析室 〒300-2635 茨城県つくば市東光台5-1-3	0298-47-5652 e-kariya@hhc.eisai.co.jp	
川島 裕之	産業技術総合研究所 〒305-8569 つくば市小野川16-1	029-861-8413 h.kawashima@aist.go.jp	029-861-8408
川村 出	横浜国立大学工学府機能発現工学専攻 〒240-8500 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5 大学院棟303	045-339-4231 d04sa202@ynu.ac.jp	045-339-4251
木川 隆則	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9203 kigawa@jota.gsc.riken.jp	045-503-9643
菊地 淳	理研 GSC 横浜市大院総理 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7207 kikuchi@gsc.riken.jp	045-508-7360
橘川 守	昭和電工株式会社 分析物性センター 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台1-1-1	043-226-5223(直通) Mamoru_Kitsukawa@sdk.co.jp	043-226-5222

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
金 善美	東京工業大学大学院理工学研究科 物質科学専攻 安藤勲研究室 〒152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1	03-5734-2880 smkim@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
木村 敦臣	大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-7	06-6879-2577 kimura@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-6879-2577
木村 朋子	㈱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 tomoko.kimura@to.shiseido.co.jp	045-590-6089
木村 英昭	筑波大学化学系生物無機化学研究室 〒305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1	029-853-7365 hkimura1@chem.tsukuba.ac.jp	
木村 雅晴	住友化学株式会社 有機合成研究所 研究グループ(分析物性) 〒554-8558 大阪市此花区春日出中 3-1-98	06-6466-5171(3704) kimuram5@sc.sumitomo-chem.co.jp	06-6466-5459
木村 由美子	日本大学薬学部 〒274-8555 千葉県船橋市習志野台 7-7-1	047-465-7362 kimura@pha.nihon-u.ac.jp	047-465-7362
清谷 多美子	昭和薬科大学 機器分析研究施設 〒194-8543 町田市東玉川学園 3-3165	042-721-1511 kiyotani@ac.shoyaku.ac.jp	
串田 克彦	バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド アプリケーション部 〒108-0023 港区芝浦 4-16-36 住友芝浦ビル8F	03-5232-1211	03-5232-1264
楠 英樹	三菱化学生命科学研究所 河野グループ 〒194-8511 東京都町田市南大谷 11	042-724-6289 kusunoki@libra.ls.m-kagaku.co.jp	
工藤 正人	東北大学工学研究科バイオ工学専攻 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉	022-217-7279 wang@biophys.che.tohoku.ac.jp	022-217-7278
熊澤 茂則	静岡県立大学食品栄養科学部 〒422-8526 静岡県静岡市谷田 52-1	054-264-5523 kumazawa@smail.u-shizuoka-ken.ac.jp	054-264-5523
久米田 博之	北海道大学大学院薬学研究科 〒001-0021 札幌市北区北 21 条西 11 丁目 北海道大学次世代ポストゲノム研究棟	011-706-9009 kumeta@pharm.hokudai.ac.jp	011-706-9012
倉島 かおり	理化学研究所 柴田遺伝生化学研究室 横浜市立大学大学院総合理化学研究科 生体超分子システム科学 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-29	045-508-7224 kurasima@postman.riken.go.jp	045-508-7364
栗田 順一	バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド アプリケーション部 〒108-0023 港区芝浦 4-16-36 住友芝浦ビル8F	03-5232-1211	03-5232-1264
黒木 重樹	東京工業大学 大学院理工物質科学専攻 〒152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1-S1-20	03-5734-2880 skuroki@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
黒子 弘道	人間文化研究科 共生自然科学専攻 〒630-8506 奈良女子大学大学院	0742-20-3461 kurosu@cc.nara-wu.ac.jp	0742-20-3461
黒田 幸夫	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	029-852-1236(333) yukio.kuroda@bruker-biospin.jp	029-858-0322
桑原 大介	電気通信大学 機器分析センター 〒182-8585 東京都調布市調布ヶ丘1-5-1	0424-43-5730(5730) kuwahara@cia.uec.ac.jp	0424-43-5501
河野 隆英	富山医科薬科大学薬学部 構造生物学研究室 〒930-0194 富山市杉谷 2630	076-434-7574 pd029003@st.toyama-mpu.ac.jp	
河野 俊之	三菱化学生命科学研究所 蛋白質立体構造研究グループ 〒194-8511 東京都町田市南大谷 11号	042-724-6285 tkohno@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
甲野 裕之	ブルカーバイオスピン株式会社 アプリケーション部 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	029-852-1235 hiroyuki.kono@bruker-biospin.jp	029-858-0322
小柴 生造	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22	045-503-9317 koshiba@postman.riken.jp	045-503-9643
児嶋 長次郎	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 生駒市高山町 8916-5	0743-72-5571 kojima@bs.naist.jp	0743-72-5579
小関 佑	東京工業大学大学院理工学研究科 〒152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1	03-5734-2889 ykoseki@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
小林 学	電気通信大学大学院電気通信学研究科量子・物質工学専攻 〒182-8585 東京都調布市調布ヶ丘 1-5-1	0424-43-5571 gaku@schneider.pc.uec.ac.jp	
小林 邦子	三菱化学生命科学研究所 蛋白質立体構造研究グループ 〒194-8511 東京都町田市南大谷 11号	042-724-6289 kuniko@libra.ls.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
小林 辰	キヤノン(株)先端技術研究本部 先端解析第二研究室 〒243-0193 神奈川県厚木市森の里若宮 5-1	046-247-2111(8586) kobayashi.shin@canon.co.jp	046-248-0306
小林 俊達	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 t-kobaya@bs.naist.jp	0743-72-5571
小林 将俊	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	06-6879-8598 mkobayas@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
小松 領平	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 ryohei@acbio2.acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8747

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
小森 佳彦	産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門 ナノ移動解析グループ 〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第5	029-861-4887 y.komori@aist.go.jp	029-861-4515
齋藤 公児	新日本製鐵(株)先端技術研究所 〒293-8511 富津市新富 20-1	0439-80-2270 saito@re.nsc.co.jp	0439-80-2746
齋藤 剛	(独)産業技術総合研究所 計測標準研究部門 〒305-8568 茨城県つくば市東 1-1-1 つくば中央 5	029-861-4618 takeshi.saito@aist.go.jp	029-861-4618
坂本 泰一	千葉工業大学工学部生命環境科学科 〒275-0016 千葉県習志野市津田沼2-17-1	047-478-0317 tsakamoto@pf.it-chiba.ac.jp	
佐久間 千勢子	東京薬科大学中央分析センター 〒192-0392 東京都八王子市堀の内 1432-1	0426-76-4041 sakumac@ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4041
櫻井 愛子	(株)三菱化学科学技術研究センター 横浜分析センター 〒227-8502 横浜市青葉区鴨志田町 1000	045-963-3166 sakurai.aiko@mp.m-kagaku.co.jp	045-963-4261
櫻井 一正	阪大・蛋白研 溶液学研究部門 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2 大阪大学蛋白質研究所	06-6879-8615 sakurai@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8616
櫻井 智司	日本電子株式会社応用研究センター 第2 応用研究センター 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2	042-542-2241 (直通) sasakura@jeol.co.jp	042-542-3132
笹川 拓明	名古屋市立大学薬学研究科 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1	052-836-3402 sasakawa@mailp.phar.nagoya-cu.ac.jp	
佐藤 滋夫	中外製薬富士御殿場研究所化学研究第一部 〒412-6728 静岡県御殿場市駒門 1-135	0550-87-6728 (直通) satosgo@chugai-pharm.co.jp	0550-87-5326
佐藤 一	ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮 3-21-5	029-852-1234 (225) hajime.sato@bruker-biospin.jp	029-858-0322
佐藤 秀紀	(株)日産アーケ 研究部 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 1番地	046-867-5283 sato_hi@nissan-arc.co.jp	046-866-5814
佐藤 寛子	国立情報学研究所 〒101-8430 東京都千代田区一ツ橋 2-1-1	03-4212-2501 hsatoh@nii.ac.jp	03-3556-1916
猿渡 敬志	(株)カネボウ化粧品 化粧品研究所 〒250-0002 神奈川県小田原市寿町 5-3-28	0465-34-8568 keishi-saruwatari@oda.cos.kanebo.co.jp	0465-34-1237
敷井 和彰	日産化学工業(株) 〒274-8507 千葉県船橋市坪井町 722-1	047-465-1117 shikii2003@yahoo.co.jp	047-461-0492

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
志田 裕幸	群馬大学大学院工学研究科材料工学専攻 〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1	0277-30-1331 hiropon_shidax@hotmail.com	0277-30-1333
品川 麻衣	ライフサイエンス研究所 〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1	044-244-7145 mai_shinagawa@ajinomoto.com	044-210-5872
篠原 正法	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 sinora@acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8747
嶋田 一夫	東京大学・大学院薬学系研究科 産総研・BIRC 〒113-0033 文京区本郷7-3-1	03-5841-4810 shimada@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp	03-3815-6540
嶋田 純也	京都大学化学研究所 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3149 junya.shimada@t04rhcp.mbox.media.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
清水 禎	物質・材料研究機構 強磁場研究センター 〒305-0003 茨城県つくば市桜3-13	029-863-5509 shimizu.tadashi@nims.go.jp	029-863-5571
白川 昌宏	横浜市立大学大学院総合理学研究科 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番29	045-508-7213 shira@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
秦 旭栄	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	045-503-9462 qin@gsc.riken.jp	045-503-9641
神藤 平三郎	東京薬科大学 〒192-0392 八王子市堀之内 1432-1	0426-76-4537 shindo@ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4537
榛葉 信久	ライフサイエンス研究所 〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1	044-244-7145 nobuhisa_shimba@ajinomoto.com	044-210-5872
杉浦 眞喜子	神戸薬科大学中央分析室 〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4 - 19 -1	078-441-7591 makiko-s@kobepharma-u.ac.jp	078-441-7591
杉原 文徳	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 1-7-29	045-508-7215 buntoku@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
鈴木 浩一	産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門 ナノ移動解析研究グループ 〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5	029-861-4506 suzuki-koh@aist.go.jp	029-861-4506
鈴木 倫太郎	農業生物資源研究所 生体高分子グループ 超分子機能研究チーム 〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2	029-838-7900 rsuzuki@nias.affrc.go.jp	029-838-7900
瀬尾 芳輝	獨協医科大学・生理学教室(生体制御) 〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880	0282-87-2125 yseo@dokkyomed.ac.jp	0282-86-7835

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
関 宏子	千葉大学 分析センター 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33	043-290-3810 seki@cac.chiba-u.ac.jp	043-290-3813
高杉 憲司	日本電子(株) 〒196-8558 東京都武蔵野市武蔵野 3-1-2	042-542-2236 ktakasug@jeol.co.jp	042-542-8068
高須 博敏	生体超分子計測科学研究室 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-29	045-508-7201 htakasu@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	
高橋 征三	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 t_seizo@fc.jwu.ac.jp	03-5981-3656
高橋 大樹	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	06-6879-8598 daiki@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
高橋 雅人	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22 C110	045-503-9111(5154) masatot@gsc.riken.go.jp	045-503-9641
高屋 展宏	国立環境研究所 環境ホルモンプロジェクト 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2	029-850-2862 takaya.nobuhiro@nies.go.jp	029-850-2880
高山 俊夫	神奈川大学工学部応用化学科 〒221-8686 横浜市神奈川区六角橋 3-27-1	045-481-5661(3889) takayt01@kanagawa-u.ac.jp	045-413-9770
瀧口 順子	富士写真フイルム株式会社 先進コア技術研究所解析技術センター 〒250-0193 南足柄市中沼 210	0465-73-7080 junko_takiguchi@fujifilm.co.jp	0465-73-7923
竹内 敦子	神戸薬科大学中央分析室 〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1	078-441-7592 takeuchi@kobepharma-u.ac.jp	
武田 和行	大阪大学大学院基礎工学研究科 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3 D421	06-6850-6320 takeda@qc.ee.es.osaka-u.ac.jp	06-6850-6321
田代 桜子	東京薬科大学薬学部 〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1	0426-76-4542 tashiro@ps.toyaku.ac.jp	0426-76-4542
龍野 宏人	東京工業大学大学院理工学研究科 〒152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1-S1-21	03-5734-2889 htatsuno@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
立石 幸寛	横浜国立大学大学院 総合理学研究科 計測科学研究室 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29	045-508-7215 tateishi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
楯 真一	生物分子工学研究所 〒565-0874 大阪府吹田市古江台6-2-3	06-6872-8218 tate@beri.or.jp	06-6872-8210

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
田中 剛史	三菱化学生命科学研究所 蛋白質立体構造研究グループ 〒194-8511 東京都町田市南大谷 11 号	042-724-6289 takeshi@libra.lis.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
田中 彬嗣	九州大学大学院薬学研究院 NMR 測定室 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1	092-642-6551 y.tanaka@adm.phar.kyushu-u.ac.jp	092-642-6551
田中 利好	三菱化学生命科学研究所 蛋白質立体構造研究グループ 〒194-8511 東京都町田市南大谷 11 号	042-724-6285 rikou@libra.lis.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
田中 亮	東横化学株式会社 研究開発室 〒211-8502 神奈川県川崎市中原区中丸子 1280	044-435-5866 tanaka-ryo@toyoko-jp.com	044-435-6678
谷生 道一	三菱化学生命科学研究所 蛋白質立体構造グループ 〒194-8511 東京都町田市南大谷 11 号	042-724-6293 tanio@libra.lis.m-kagaku.co.jp	042-724-6296
田之倉 優	東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1	03-5841-5165(25165) amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp	03-5841-802
田村 友美	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 〒532-0004 大阪府大阪市淀川区西宮原 1-8-29 テラサキ第二ビル	06-6394-8989 tomomi.tamura@bruker-biospin.jp	06-6394-9559
丹所 正孝	(独)物質・材料研究機構強磁場研究センター 〒305-0044 茨城県つくば市並木 1-1	029-860-4463 TANSHO.Masataka@nims.go.jp	029-852-7449
千葉 かおり	産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター つくば分子認識解析チーム 〒319-1195 つくば市東 1-1	029-282-6736(直通) kchiba@neutrons.tokaijaeri.go.jp	029-282-3822
塚原 剛彦	東京大学 大学院工学系研究科 応用化学専攻 〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1	03-5841-7233 ptsuka@icl.t.u-tokyo.ac.jp	03-5841-6039
塚本 直樹	京都大学化学研究所 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 tsukamoto.nawoki@h01.mbox.media.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
辻 暁	兵庫県立大学大学院生命理学研究科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1	0791-58-0180 tuzi@sci.u-hyogo.ac.jp	0791-58-0182
辻本 拓哉	大阪大学蛋白質研究所物性研究部門 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2	06-6879-8598(8598) tsujimon@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
堤 耀廣	北海道大学工学部 〒060-0817 札幌市北区北 17 条西 8 丁目	011-716-2111 a-tsutsumi@mub.biglobe.ne.jp	
堤 遊	産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター 東京理科大学 基礎工学研究科 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第6	029-861-6125 u-tsutsumi@aist.go.jp	029-861-6135

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
出村 誠	北海道大学 大学院理学研究科 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	011-706-2771 demura@sci.hokudai.ac.jp	011-706-2771
寺尾 武彦	京都大学大学院理学研究科化学教室分子構造化学 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	075-753-4011(4011) terao@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
寺尾 綱哲	群馬大学大学院工学研究科材料工学専攻 〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1	0277-30-1331 tera_jb777@msn.com	
藤部 康弘	筑波大学物質・材料研究機構 〒305-0003 茨城県つくば市桜3-13	029-863-5570(5079) TOBU.Yasuhiro@nims.go.jp	029-859-5010
堂本 竹雄	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	029-852-1234(442) takeo.domoto@bruker-biospin.jp	029-858-0322
栢尾 尚哉	独立行政法人 理化学研究所 横浜研究所 GSC タンパク質構造・機能研究グループ 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1丁目7-22	045-503-9317 tochio@gsc.riken.go.jp	045-503-9201
栢尾 豪人	横浜市立大学総合理学研究科 計測科学講座 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7215 tochio@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
富澤 忠	理化学研究所 ゲノム総合科学センター 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9317 tomizawa@gsc.riken.go.jp	045-503-9643
富羽 貞範	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	029-853-5214 tomiha@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	029-853-5205
虎谷 秀一	横浜国立大学大学院工学府 〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5	045-339-4231 toraya@ynu.ac.jp	
鳥澤 拓也	東京都立大学大学院理学研究科化学専攻 有機構造生物化学研究室 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	0426-77-1111(3552) torizawa@nmr.chem.metro-u.ac.jp	0426-77-4873
内藤 晶	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 naito@ynu.ac.jp	045-339-4251
長尾 聡	筑波大学大学院数理解物質科学研究科 数理解物質科学研究科化学専攻山本研究室 〒305-8571 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学	029-853-7369 s_nagao@dmb.chem.tsukuba.ac.jp	029-853-7369
中尾 佳範	神戸薬科大学大学院薬学研究科 〒658-8558 神戸市東灘区本山北町4丁目19-1	078-441-7592 je035157@st.kobepharma-u.ac.jp	078-441-7592
中澤 靖元	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 ynakazawa@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
長島 敏雄	RIKEN GSC タンパク質構造・機能研究グループ 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9462 toshion@gsc.riken.go.jp	045-503-9641
中谷 英一	大阪大学 蛋白質研究所 科学技術振興機構 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2	06-6879-4311(直通) 06-6879-8636 n-eiichi@protein.osaka-u.ac.jp	
中田 牧子	縷科学技術研究所 分析化学部 NMR/MS 測定グループ 〒140-0001 東京都品川区北品川3-10-2	03-3474-6629 manakada@ist.sankyo.co.jp	03-3474-6650
中野 学	北海道大学大学院理学研究科 〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目	011-716-2835 nakano@sci.hokudai.ac.jp	
中村 和浩	秋田県立脳血管研究センター 放射線医学研究部 〒010-0874 秋田県秋田市千秋久保田町6-10	018-833-0115(769) 018-833-2104 knam@akita-noken.go.jp	
仲村 高志	理化学研究所 中央研究所 先端技術開発支援センター 物質構造解析チーム 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1	048-467-9362 takashi.nakamura@riken.jp	048-462-4627
中村 義之	東京工業大学資源化学研究所 〒226-8503 横浜市緑区長津田町4259	045-924-5110 ynakamur@res.titech.ac.jp	045-924-5109
中山 登	中外製薬株式会社鎌倉研究所 化学研究第二部 〒247-8530 神奈川県鎌倉市梶原200	0467-47-2209 nakayamanbr@chugai-pharm.co.jp	0467-45-6815
名川 吉信	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つくば中央第4	029-861-3021 y-nagawa@aist.go.jp	029-861-3029
仁科 勇作	(株)日曹分析センター第一研究部 〒250-0216 神奈川県小田原市高田345	0465-42-3115 y.nishina@nippon-soda.co.jp	0465-42-3586
西村 勝之	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番5号	045-339-4224 nishimur@ynu.ac.jp	045-339-4224
西村 光広	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	06-6879-8222(8222) 06-6879-8221 nishimu@phs.osaka-u.ac.jp	
西山 隆司	帝国臓器製薬株式会社川崎研究所製品開発研究部 〒213-8522 神奈川県川崎市高津区下作延1604	044-812-8649 nishiyama-t@teikoku-hormone.co.jp	044-833-9110
西山 裕介	理化学研究所 GSC タンパクグループ 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	045-503-9229 nishi@gsc.riken.go.jp	045-903-9228
根本 貴宏	日本電子(株)第2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(3557) 042-543-8068 tnemoto@jeol.co.jp	

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
根本 直	産総研 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1 中央6	029-861-6126 tadashi.nemoto@aist.go.jp	029-861-6135
野口 真路	エム・アール・アイシステムズ株式会社 〒104-0053 東京都中央区晴海3-2-22	03-3536-5840(4129) snoguchi@mrisys.co.jp	03-3532-3796
野田 康夫	関西学院大学理工学部 〒669-1337 兵庫県三田市学園2丁目1番地	079-565-8511(8537) yasuonoda@kwansei.ac.jp	079-565-9077
野村 誠	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科生体高分子構造学講座 〒630-0101 奈良県生駒市高山町8916-5	0743-72-5572 m-nomura@bs.aist-nara.ac.jp	0743-72-5579
野村 充	横浜市立大学大学院総合理学研究科 生体超分子機能科学 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7218(7218) m-nomura@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7362
拝師 智之	エム・アールテクノロジー研究開発本部 〒300-2642 茨城県つくば市高野169番地1	029-847-8220 haishi@mrtechnology.co.jp	029-847-5205
端 健二郎	(独)物質・材料研究機構 強磁場研究センター 〒305-0003 茨城県 つくば市 桜3-13	029-863-5521 Hashi.Kenjiro@nims.go.jp	029-863-5571
畠山 盛明	かずさ事業所 解析センター 〒293-0011 千葉県富津市新富20-1	0439-80-2691(5302) moriaki@re.nsc.co.jp	0439-80-2767
畑中 稔	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(3601) minoruh@gsc.riken.go.jp	045-503-9228
服部 峰之	(独)産業技術総合研究所 光技術研究部門 デバイス機能化技術グループ 〒305-8568 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第二	029-861-5537 mhattori@ni.aist.go.jp	029-861-5540
花岡 慎悟	財団法人 木原財団 横浜生命科学振興財団 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-508-7247(7247) shana@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7371
浜島 斉	三和化学研究所 分析センター 〒551-0406 三重県いなべ市北勢町塩崎363	0594-72-6244(363) h_hamajima@mb4.skk-net.com	0594-82-0072
濱田 季之	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22 西研究棟 W103	045-503-9212(直通) thamada@jota.gsc.riken.go.jp	045-503-9210
林 繁信	産業技術総合研究所計測フロンティア研究部門 ナノ移動解析研究グループ 〒305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5	029-861-4515 hayashi.s@aist.go.jp	029-861-4515
林 文晶	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丁目7-22	045-503-9462 fhayashi@gsc.riken.jp	045-503-9641

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
原田 英里砂	大阪大学蛋白質研究所 物性部門 (社)バイオ産業情報化コンソーシアム 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2	06-6879-8598 harada@protein.osaka-u.ac.jp	06-6879-8599
樋口 雄一郎	横浜市立大学大学院総合理学研究科 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 丁目 7 番 29 b410	045-508-7236 yhiguchi@gsc.riken.jp	045-508-7368
平沖 敏文	北海道大学大学院工学研究科 量子物理工学専攻 〒060-8628 札幌市北区北 13 西 8	011-706-6640 hiraoki@eng.hokudai.ac.jp	011-716-6175
平尾 優佳	横浜市立大学大学院 総合理学研究科 生体超分子システム科学専攻生体超分子機能科学 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29	045-508-7218 yuuka@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7362
平川 慶子	日本医科大学 法医学講座・医用磁気共鳴分析施設 〒113-8602 東京都文京区千駄木 1-1-5	03-3822-2131 (5210) hirakawa@nms.ac.jp	03-5814-5680
廣明 秀一	横浜市立大学大学院総合理学研究科 生体超分子システム科学専攻 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-17-29	045-508-7214 (7214) hiroakih@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7361
廣田 洋	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ 〒230-0045 鶴見区末広町 1-7-22	045-503-9211 hirota@gsc.riken.jp	045-503-9210
深澤 隼	京都大学大学院理学研究科 〒606-8224 京都市左京区北白川追分町	075-753-4012 fukazawa@kuchem.kyoto-u.ac.jp	075-753-4000
福井 洋之	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 (9402) fukui@gaea.chem.kitami-it.ac.jp	0157-24-7719
福原 忠雄	資生堂リサーチセンター 〒224-8558 神奈川県横浜市都筑区早淵 2-2-1	045-590-6057 tadao.fukuhara@to.shiseido.co.jp	045-590-6089
藤川 昭彦	藤沢薬品工業(株) 財団法人先端医学薬学研究センター 〒925-0613 石川県羽咋市飯山町ヲ32	0767-26-3311 fujikawa@mprcf.or.jp	0767-26-3314
藤倉 一繁	パリアンテクノロジーズジャパンリミテッド アプリケーション部 〒108-0023 港区芝浦 4-16-36 住友芝浦ビル8F	03-5232-1211	03-5232-1264
藤田 春雄	京都大学工学研究科 〒615-8246 京都市西京区京都大学桂	075-383-2780 (2780) fujita@sbchem.kyoto-u.ac.jp	
藤原 健一郎	横浜市大総合理学研究科 〒230-0017 横浜市鶴見区末広 1-7-29	045-508-7215 (直通) gfujii@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	
藤原 英明	大阪大学医学系研究科保健学専攻 医用物理工学講座 〒565-0871 吹田市山田丘 1-7	06-6879-2573 (2573) fujiwara@sahs.med.osaka-u.ac.jp	06-6879-2573

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
藤原 正子	日本電子データム株式会社共通技術部 AIグループ 〒196-0022 東京都昭島市中神町 1156 番地	042-542-1182 masako@jeol.co.jp	042-542-4059
降旗 一夫	東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1	03-5841-5460 furihata@iam.u-tokyo.ac.jp	03-5841-8485
古田 浩祐	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(302) hirosuke.furuta@mb.kyorin-pharm.co.jp	0280-57-1293
逸見 光	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	029-838-8033 hemmi@nfri.affrc.go.jp	029-838-7996
細田 和男	群馬大学工学部生物化学工学科 生物機能第二 〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1	0277-30-1439 pen@jig.ce.gunma-u.ac.jp	0277-30-1439
堀井 文敬	京都大学 化学研究所 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0744-38-3150 horii@scl.kyoto-u.ac.jp	0744-38-3148
堀内 崇	横浜市立大学大学院総合理学研究科 理化学研究所横浜研究所 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	045-503-9111(5154) horiuchi@gsc.riken.go.jp	045-508-7360
堀毛 悟史	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 〒615-8510 京都市西京区京都大学桂	075-383-2734 horike@sbchem.kyoto-u.ac.jp	075-383-2732
本多 賢吉	横浜市立大学 総合理学研究科 分子生理学研究室 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29	045-508-7224 honda@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7364
前澤 国芳	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 kmaezawa@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5785
前田 史郎	福井大学工学部生物応用化学科 〒910-8507 福井市文京 3-9-1	0776-27-8635 maeda@acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8747
増田 勝彦	三菱ウェルファーマ基盤第二研究所創剤 Gr 〒227-0033 横浜市青葉区鴨志田町 1000	045-963-3347 Masuda.Katsuhiko@mk.m-pharma.co.jp	045-963-3353
増田 ときは	横浜市立大学大学院総合理学研究科 生体超分子システム科学専攻分子生理学 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 tokiha@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp	045-508-7364
益富 豊	日本新薬 〒305-0003 茨城県つくば市桜3-14-1	029-850-6241 y.masutomi@po.nippon-shinyaku.co.jp	
松井 政徳	東京工業大学大学院理工学研究科物質科学 〒152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1	03-5734-2880 mmatsui@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
松田 知己	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丁目7-22	045-503-0464 matsudat@gsc.riken.jp	
松田 善正	筑波大学大学院数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻 〒305-8573 茨城県つくば市天王台1-1-1	029-853-5214 matsuda@mrlab.bk.tsukuba.ac.jp	029-853-5205
松野 めぐみ	電気通信大学大学院 電気通信学研究科量子・物質工学専攻 〒182-8585 東京都調布市調布ヶ丘1-5-1	0424-43-5571 megu-ma@gk9.so-net.ne.jp	
松原 康史	三菱化学科学技術研究センター 横浜分析センター 〒227-8502 横浜市青葉区鴨志田町1000	045-963-3166 matsubara.koshi@mp.m-kagaku.co.jp	045-963-4261
丸吉 京介	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	06-6850-5790(5790) maru@ch.wani.osaka-u.ac.jp	06-6850-5774
三木 孝史	株式会社 神戸製鋼所 電子技術研究所 〒651-2271 兵庫県神戸市西区高塚台1-5-5	078-992-5652 t-miki@rd.kcrl.kobelco.co.jp	078-992-5650
水野 和子	福井大学工学部 〒910-8507 福井市文京3-9-1	0776-27-8759(直通) mizuno@acbio2.acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8747
水野 元博	金沢大学大学院自然科学 理学部化学 理学部化学科 〒920-1192 金沢市角間町	076-264-5686 mizuno@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp	076-264-5742
三森 文行	国立環境研究所 〒305-0053 茨城県つくば市小野川16-2	029-850-2862 mitumori@nies.go.jp	029-850-2880
宮内 康次	(株)UBE 科学分析センター 分析部 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 29687u@ube-ind.co.jp	0436-23-5449
三好 利一	産業技術総合研究所 ナノテクノロジー研究部門 〒305-8565 つくば市東1-1-1	029-861-9392 t-miyoshi@aist.go.jp	
武藤 勝紀	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 muto_k@acbio.fukui-u.ac.jp	0776-27-8747
村中 淳之介	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 k370628@icpc00.icpc.fukui-u.ac.jp	0776-27-8747
森内 寛	生物分子工学研究所 構造解析研究部 NMRグループ 〒565-0872 大阪府吹田市古江台6-2-3	06-6872-8218 moriuchi@beri.or.jp	06-6872-8210
守 誠一朗	東工大 大学院生命理工 〒226-8501 横浜市緑区長津田町4259	045-924-5796(5796) seimori@bio.titech.ac.jp	

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
森田 勇人	愛媛大学総合科学研究支援センター 分子構造機能解析分野 遺伝子解析領域 〒790-8566 愛媛県松山市樽味3-5-7	089-946-9968 ehmorita@dpc.ehime-u.ac.jp	089-946-9968
諸岡 篤	大阪大学大学院理学研究科 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山 1-16	06-6850-5569 mocha@chem.sci.osaka-u.ac.jp	06-6850-5569
八島 秀仁	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	029-852-1234(449) hidehito.yashima@bruker-biospin.jp	029-858-0322
矢吹 一人	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 生体高分子構造学講座 〒630-0101 奈良県生駒市高山町 8916-5	0743-72-5577 k-yabuki@bs.naist.jp	0743-72-5579
山内 一夫	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 kyamauch@cc.tuat.ac.jp	042-383-7733
八巻 武	筑波大学大学院数理物質科学研究科 〒305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1 理科系修士棟D402	029-853-7365(7365) yamakita@dmb.chem.tsukuba.ac.jp	
八巻 健	北大院理 〒060-0810 北海道札幌市北区北十条西8丁目	011-706-2985(2985) tyamaki@sci.hokudai.ac.jp	011-706-2771
山口 徹	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(5273) tohru.yamaguchi@shionogi.co.jp	06-6458-0987
山崎 憲一	第一製薬(株)研究技術センター 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1-16-13	03-5696-8018 yamaz33x@daiichipharm.co.jp	03-5696-8334
山崎 俊正	(独)農業生物資源研究所 〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2	029-838-7900(直通) tyamazak@nias.affrc.go.jp	029-838-7900
山路 奈保子	財団法人サントリ-生物有機科学研究所 〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1	075-962-6142 yamaji@sunbor.or.jp	075-962-2115
山田 知典	京都大学化学研究所環境物質化学研究系 分子材料化学 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄	0774-38-3152 t-yamada@t01.mbox.media.kyoto-u.ac.jp	0774-38-3148
山根 祐治	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 yyamane@polymer.titech.ac.jp	03-5734-2889
山延 健	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 yamanobe@chem.gunma-u.ac.jp	0277-30-1333
山村 猛	大阪大学大学院基礎工学研究科 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3	06-6850-6323 yamamura@qc.ee.es.osaka-u.ac.jp	06-6850-6321

氏名	勤務先 住所	TEL(内線) E-Mail	FAX
山本 泰彦	筑波大学大学院数理物質科学研究科 〒305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1	029-853-6521 yamamoto@chem.tsukuba.ac.jp	029-853-6521
横山 貴男	東京理科大学大学院理工学研究科 応用生物科学専攻生物有機化学研究室 〒278-0022 千葉県野田市山崎 2641	04-7124-1501(3420) blackjack@wind.email.ne.jp	
吉田 慎一	北海道大学大学院薬学研究科 生体分子薬学専攻 〒001-0021 札幌市北区北 21 条西 11 丁目 次世代ポストゲノム研究棟1階 NMR 測定室	011-706-9009(直通) yoshida@pharm.hokudai.ac.jp	無
吉田 均	東京都立大学大学院理学研究科 化学専攻有機構造生物化学講座 〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1	0426-77-1111(3511) 0426-77-4873 yoshida@nmr.chem.metro-u.ac.jp	
好田 真由美	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 c116	045-503-9642 myoshida@gsc.riken.jp	045-503-9641
吉田 充	独立行政法人食品総合研究所分析科学部 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12	029-838-8033 mitsuru@nfri.affrc.go.jp	029-838-8033
吉益 雅俊	理化学研究所 柴田遺伝生化学研究室 CREST/JST 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29	045-508-7224 yosimasu@postman.riken.jp	045-508-7364
吉水 広明	名古屋工業大学大学院 工学研究科 〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町	052-735-5272(直通) yoshimizu.hiroaki@nitech.ac.jp	052-735-5272
米山 操	理化学研究所 タンパク質構造研究チーム 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22	045-503-9317 yoneyama@gsc.riken.jp	045-503-9643
若井 篤志	秋田県立脳血管研究センター あきた産業振興機構 〒010-0874 秋田県秋田市千秋久保田町 6-10	018-833-0115(361) wakai@akita-noken.go.jp	018-833-2104
和田 武	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	029-852-1234(448) takeshi.wada@bruker-biospin.jp	029-858-0322
渡邊 永治	順天堂大学 医学部・化学 〒270-1695 千葉県印旛郡印旛村平賀学園台 1-1	0476-98-1001(392) eiji-jun@umin.ac.jp	0476-98-1011
渡部 徳子	青山学院女子短期大学 〒150-8366 東京都渋谷区渋谷 4-4-25	03-3409-7304(直通) tokuko@luce.aoyama.ac.jp	03-3409-7304
渡邊 英宏	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 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2	029-850-2138 hidewata@nies.go.jp	029-850-2880
渡辺 裕之	パリアンテクノロジーズジャパンリミテッド アプリケーション部 〒108-0023 港区芝浦 4-16-36 住友芝浦ビル8F	03-5232-1211	03-5232-1264