

# 第46回NMR討論会

## 講演要旨集

会期 2007年9月11日(火)～9月13日(木)

会場 札幌コンベンションセンター

主 催

日本核磁気共鳴学会

共 催

日本薬学会・日本生物物理学会・日本生化学会・日本農芸化学会

日本分析化学会・高分子学会・日本蛋白質科学会

協 賛

日本物理学会

# 第 46 回 NMR 討論会

## 連絡先

〒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センター内大学院薬学研究院構造生物学研究室

稲垣 冬彦

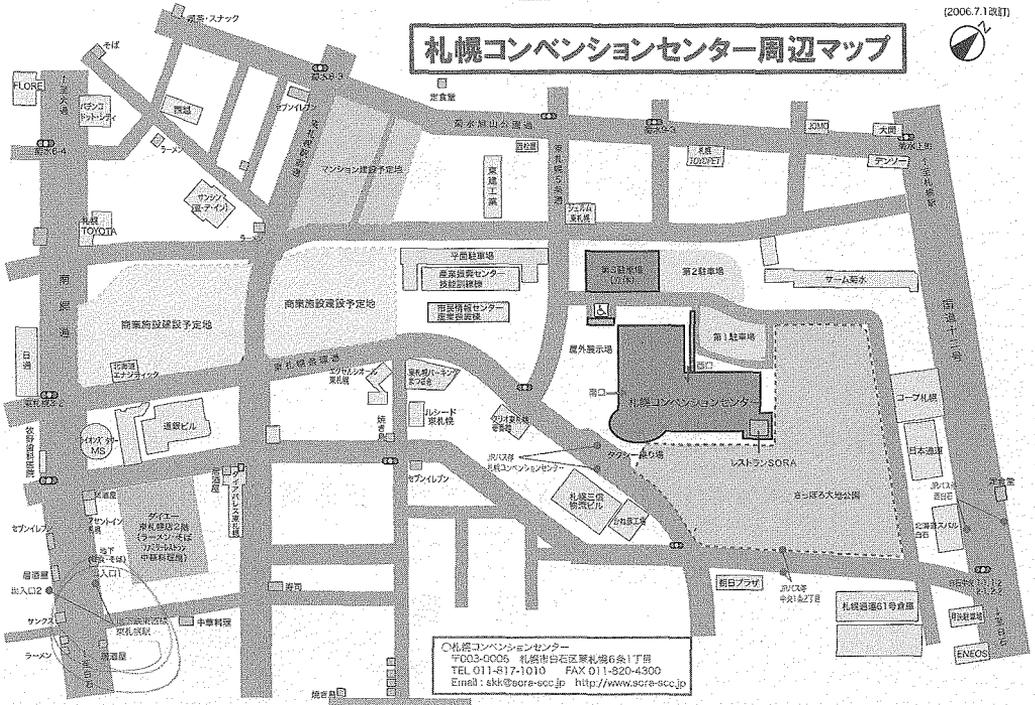
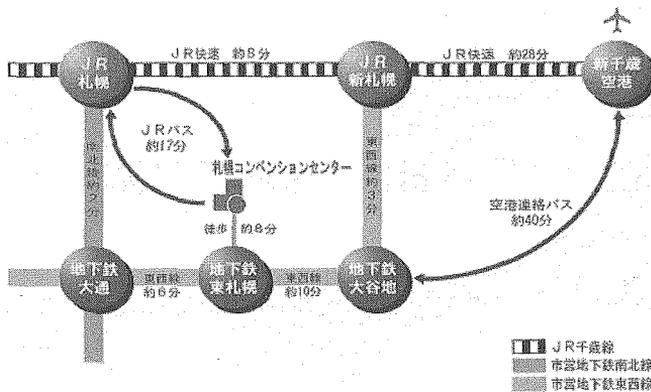
TEL 011-706-9011 mail [nmr46@protein.pharm.hokudai.ac.jp](mailto:nmr46@protein.pharm.hokudai.ac.jp)

<http://protein.pharm.hokudai.ac.jp/nmr46/>

## 会場案内

札幌コンベンションセンター（札幌市白石区東札幌 6 条 1 丁目 1-1）

●公共交通機関ご利用の場合



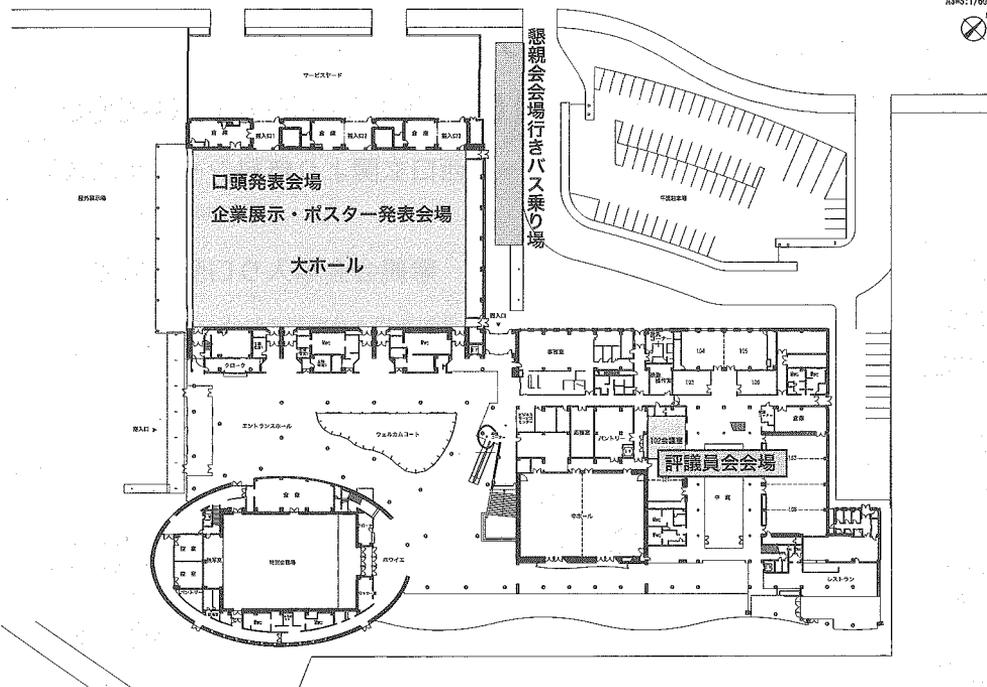
(2006.7.1改訂)

# 札幌コンベンションセンター内案内図

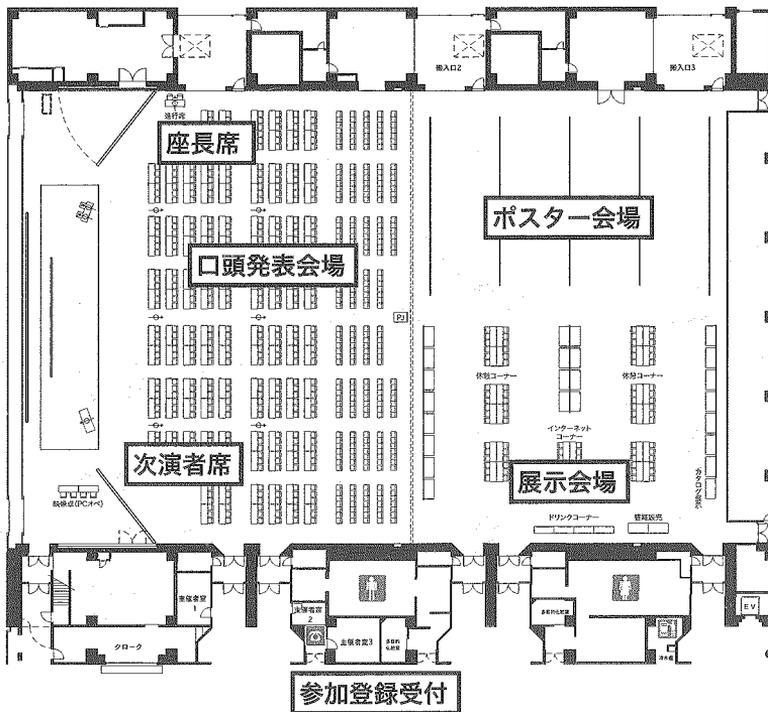
SAPPORO CONVENTION CENTER

全体平面図 1階

A3-S-1/600



## 口頭発表会場, 展示・ポスター会場内案内図



# 懇親会案内

9月12日(水) 18:30~

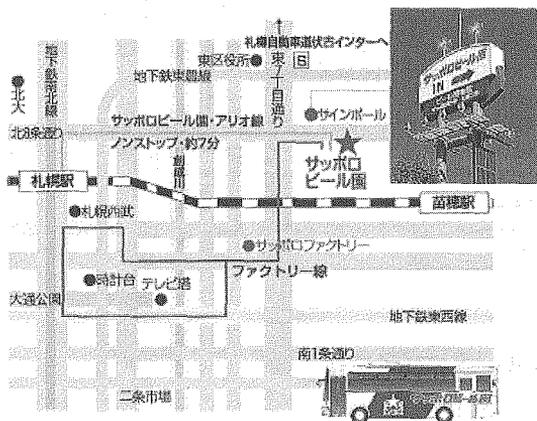
サッポロビール園 開拓使館 ケッセルホール

札幌市東区北7条東9丁目2-10 TEL 0120-150-550

討論会会場(札幌コンベンションセンター)西口玄関より無料シャトルバスにご乗車ください(17:50発)

ネームカード添付の懇親会参加証を切り取り、懇親会会場入り口受付にて、係員にお渡しください

## ルートマップ



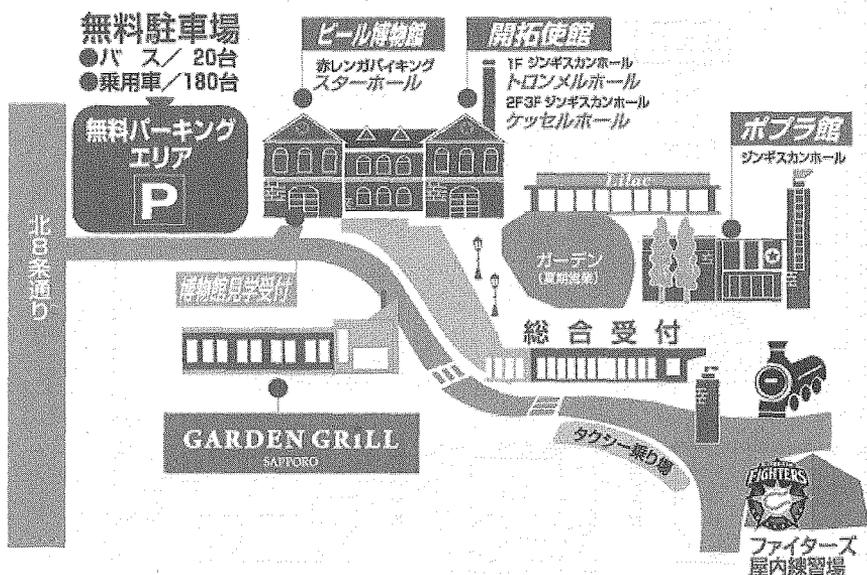
- サッポロビール園・アリオ線専用バス  
(土曜・日曜・祝日=20分間隔/月曜~金曜=30分間隔/有料)  
札幌駅北口・2番のりば(路線番号188) ←→ サッポロビール園
- ファクトリー線専用バス (20分間隔/有料)  
サッポロビール園 → サッポロファクトリー → バスセンター  
↑ サッポロファクトリー ← 時計台 ← 大通り公園 ↓

### 地下鉄・タクシー

- 地下鉄東豊線(東区役所前)下車(出口4番)徒歩約10分
- タクシー 札幌駅北口より8分

**サッポロビール園・アリオ線、  
ファクトリー線は、ビール園発着!!**

## サッポロビール園案内図



## 第46回 NMR 討論会

### The 46th Annual Meeting of The NMR society of Japan

会期 9月11日(火)~9月13日(木)

11-13 September 2007

会場 札幌コンベンションセンター

Sapporo Convention Center

第一日 9月11日(火)

Day 1: 11 September, Tuesday (Japanese session)

(9:25-9:30)

開会の挨拶 Opening remarks

(9:30-10:10)

座長 河野敬一

1L1 多次元NMR 測定における高速化と高感度化 2  
Jee JunGoo<sup>1</sup>, ○児嶋長次郎<sup>1</sup> (奈良先端大バイオサイエンス<sup>1</sup>)

1L2 非線形サンプリング法を用いた迅速な異種核多次元NMR測定法の開発と応用 4  
○伊藤隆<sup>1,2</sup>, Daniel Nietlispach<sup>3</sup>, 重光佳基<sup>1,2</sup>, 三島正規<sup>1</sup>, Markus Walchli<sup>4</sup> (首都大院理工<sup>1</sup>,  
CREST/JST<sup>2</sup>, Univ. of Cambridge<sup>3</sup>, プルカーバイオスピ<sup>4</sup>)

(10:10-10:50)

座長 神田大輔

1L3 NMR測定における蛋白質の凝集防止と安定化 6  
○若松馨<sup>1</sup>, 向壠<sup>1</sup>, 石井毅<sup>1</sup>, 細田和男<sup>1</sup>, 井上裕介<sup>1</sup>, 窪田健二<sup>1</sup>, 河野俊之<sup>2</sup> (群馬大院工<sup>1</sup>,  
三菱化学生命研<sup>2</sup>)

1L4 可変圧力NMRによる蛋白質の遅い構造揺らぎの検出 8  
○北原亮<sup>1</sup>, Christian Roumestand<sup>3</sup>, Carine van Heijenoort<sup>3</sup>, 赤坂一之<sup>1,4</sup> (理研SPring-8<sup>1</sup>,  
INSERM-Montpellier<sup>2</sup>, CNRS-Gif sur Yvette<sup>3</sup>, 近畿大生物理工<sup>4</sup>)

(10:50 - 11:05) —休憩— Coffee break

(11:05-12:05)

座長 赤坂一之

1L5 統合管理型NMR データ解析ソフトウェアKUJIRA による高度に自動化された溶液タンパク質NMR 12  
シグナルの帰属システム  
○小林直宏<sup>1</sup>, 枋尾尚哉<sup>1</sup>, 富沢忠<sup>1</sup>, 小柴生造<sup>1</sup>, 木川隆則<sup>1,3</sup>, 横山茂之<sup>1,2</sup> (理研GSC<sup>1</sup>, 東大院理<sup>2</sup>,  
東工大院総合理工<sup>3</sup>)

1L6 Dynamics based drug discovery - プリオン病治療薬開発への応用 16  
○桑田一夫<sup>1</sup>, 鎌足雄司<sup>1</sup>, 松本友治<sup>1</sup>, 西田教行<sup>2</sup>, 武藤(細川)淳二<sup>1</sup>, 児玉耕太<sup>3</sup>, 中村寛則<sup>1</sup>, 早野陽介<sup>1</sup>  
(岐阜大人獣感染防御研究センター<sup>1</sup>, 長崎大院医歯薬<sup>2</sup>, 福岡大薬<sup>3</sup>)

1L7 ヒト脳のフェリチンイメージング 20  
○三森文行<sup>1</sup>, 渡邊英宏<sup>1</sup>, 高屋展宏<sup>2</sup>, Michael Garwood<sup>2</sup> (国立環境研<sup>1</sup>, ミネソタ大<sup>2</sup>)

(12:05-12:30)

日本核磁気共鳴学会総会

Meeting of The NMR Society of Japan

(14:00-15:00)

若手ポスター賞ポスター発表審査

Poster presentations for Young Scientists Poster Awards

ポスターセッション(奇数番号)

Poster presentations (odd number)

若手ポスター賞口頭発表審査

Oral presentations for Young Scientists Poster Awards

(15:15-16:51)

座長 楠真一 稲垣冬彦

- YP01 HR-MAS を用いた生体超分子における分子認識機構を解明するNMR 手法の開発 100  
○豊永翔<sup>1</sup>, 大澤匡範<sup>1</sup>, 横川真梨子<sup>1</sup>, 嶋田一夫<sup>1,2</sup> (東大院薬<sup>1</sup>, 産総研生物情報解析研究センター<sup>2</sup>)
- YP02 効率的な区分安定同位体標識タンパク質調製手法 102  
○小橋川敬博<sup>1</sup>, 内藤雅人<sup>1</sup>, 久米田博之<sup>1</sup>, 原田幸祐<sup>1</sup>, 稲垣冬彦<sup>1</sup> (北大院薬<sup>1</sup>)
- YP03 大腸菌を用いた新規発現系の構築とNMRへの応用 106  
○林こころ<sup>1</sup>, 児嶋長次郎<sup>1</sup> (奈良先端大バイオサイエンス<sup>1</sup>)
- YP04 タンパク質分解系におけるユビキチン鎖の相互作用解析 108  
○住吉晃<sup>1,2</sup>, 坂田絵理<sup>1</sup>, 笹川拡明<sup>2</sup>, 武本映美<sup>1</sup>, 平尾武士<sup>1</sup>, 山口芳樹<sup>1</sup>, Wei Li<sup>3</sup>, Claudio A.P. Joazeiro<sup>3</sup>, 鈴木匡<sup>4</sup>, 加藤晃一<sup>1,2</sup> (名古屋市大院薬<sup>1</sup>, 分子研<sup>2</sup>, The Scripps Research Institute<sup>3</sup>, 阪大院医<sup>4</sup>)
- YP05 呼吸鎖末端酸化酵素に対するシトクロムcの電子輸送メカニズム 110  
○坂本光一<sup>1</sup>, 神谷昌克<sup>2</sup>, 伊藤(新澤)恭子<sup>3</sup>, 内田毅<sup>1</sup>, 相沢智康<sup>2</sup>, 出村誠<sup>2</sup>, 河野敬一<sup>4</sup>, 吉川信也<sup>3</sup>, 石森浩一郎<sup>1</sup> (北大院理<sup>1</sup>, 北大院生命科学<sup>2</sup>, 兵庫県大院生命理<sup>3</sup>, 北大院理<sup>4</sup>)
- YP06 小胞体ーゴルジ体間選択的セラミド輸送分子CERTのゴルジ体移行メカニズムの構造生物学的解析 112  
○杉木俊彦<sup>1,2</sup>, 寺沢宏明<sup>1</sup>, 熊谷圭悟<sup>3</sup>, 花田賢太郎<sup>3</sup>, 西島正弘<sup>3</sup>, 小野克輝<sup>2</sup>, 高橋栄夫<sup>4</sup>, 嶋田一夫<sup>1,4</sup> (東大院薬<sup>1</sup>, バイオ産業情報化コンソーシアム生物情報解析研究センター<sup>2</sup>, 国立感染研<sup>3</sup>, 産総研生物情報解析研究センター<sup>4</sup>)
- YP07 脂質膜との相互作用における茶カテキン類の動的挙動のNMR を用いた解析 114  
○植草義徳<sup>1</sup>, 上平美弥<sup>1</sup>, 中村浩蔵<sup>2</sup>, 中山勉<sup>1</sup> (静岡県大院生活健康科学<sup>1</sup>, 信州大農<sup>2</sup>)
- YP08 NMR緩和測定による拡張ナノ空間内の液体ダイナミクスと空間制限効果解析 116  
○塚原剛彦<sup>1,2</sup>, 火原彰秀<sup>1</sup>, 北森武彦<sup>1,2</sup> (東大院工<sup>1</sup>, JST-CREST<sup>2</sup>)

(16:51 - 17:10) —休憩— Coffee break

(17:10-18:46)

座長 朝倉哲郎 藤原英明

- YP09 固体NMR によるコレステロールを含む酸性混合脂質二重膜とACTH の相互作用解析 120  
○野口貴弘<sup>1</sup>, 明賀博樹<sup>1</sup>, 川村出<sup>1</sup>, 西村勝之<sup>2</sup>, 内藤晶<sup>1</sup> (横浜国大院工<sup>1</sup>, 分子研<sup>2</sup>)
- YP10 固体NMRによる膜表在性タンパク質PLC- $\delta 1$  PHドメインの局所運動性解析 124  
○上釜奈緒子<sup>1</sup>, 八木澤仁<sup>2</sup>, 辻暁<sup>2</sup>, 西村勝之<sup>1</sup> (分子研<sup>1</sup>, 兵庫県大院生命理<sup>2</sup>)
- YP11 固体NMR による抗菌ペプチドAlamethicin の脂質膜中での配向と動的構造解析 128  
○三島大輔<sup>1</sup>, 永尾隆<sup>1</sup>, 川村出<sup>1</sup>, 内藤晶<sup>1</sup> (横浜国大院工<sup>1</sup>)
- YP12 超高分子量ポリエチレンの熔融延伸過程における*in-situ*パルスNMR計測を用いた分子鎖絡み合い解析 132  
○攪上将規<sup>1</sup>, 上原宏樹<sup>1</sup>, 山延健<sup>1</sup> (群馬大院工<sup>1</sup>)
- YP13 NMR 計測を用いた栄養源変化に対する腸内細菌の代謝動態解析 134  
○中西裕美子<sup>1</sup>, 福田真嗣<sup>1,2</sup>, 近山英輔<sup>3</sup>, 木村悠一<sup>1</sup>, 大野博司<sup>1,2</sup>, 菊地淳<sup>3,4</sup> (横浜市大院国際総合科学<sup>1</sup>, 理研免疫アレルギー科学総合研究センター<sup>2</sup>, 理研植物科学研究センター<sup>3</sup>, 名大院生命農<sup>4</sup>)
- YP14 高温超伝導を用いた超1GHz NMRにおける磁場ロック機構 138  
○柳澤吉紀<sup>1,2</sup>, 中込秀樹<sup>2</sup>, 保母史郎<sup>3</sup>, 細野政美<sup>4</sup>, 濱田衛<sup>5</sup>, 木吉司<sup>6</sup>, 大塚昭弘<sup>6</sup>, 福崎智数<sup>1,7</sup>, 高橋雅人<sup>1</sup>, 山崎俊夫<sup>1</sup>, 前田秀明<sup>1,3</sup> (理研GSC<sup>1</sup>, 千葉大工<sup>2</sup>, 横浜市大<sup>3</sup>, 日本電子<sup>4</sup>, 神戸製鋼<sup>5</sup>, 物質材料研究機構<sup>6</sup>, 東京理大<sup>7</sup>)

- YP15 DDSのイメージ周波数とスーパーナイキストサンプリングを用いたデジタルNMR分光計の駆動周波数向上方法 140  
 ○根来誠<sup>1</sup>, 武田和行<sup>1</sup> (阪大院基礎工<sup>1</sup>)
- YP16 電源励磁による超伝導磁石の磁場安定化手法の開発 142  
 ○高橋雅人<sup>1</sup>, 柳澤吉紀<sup>2</sup>, 保母史郎<sup>3</sup>, 中込秀樹<sup>2</sup>, 細野政美<sup>4</sup>, 濱田衛<sup>5</sup>, 木吉司<sup>6</sup>, 山崎俊夫<sup>1</sup>, 前田秀明<sup>1,3</sup>  
 (理研GSC<sup>1</sup>, 千葉大工<sup>2</sup>, 横浜市大<sup>3</sup>, 日本電子<sup>4</sup>, 神戸製鋼<sup>5</sup>, 物質材料研究機構<sup>6</sup>)

## 第二日 9月12日(水)

### Day 2: 12 September, Wednesday (English session)

(9:30-10:10)

**Chairperson: Yoji Arata**

- 2L1 Invited lecture: Detecting early tumour responses to therapy using magnetic resonance imaging and hyperpolarized spectroscopy 24  
 ○Professor Kevin M. Brindle (University of Cambridge)

(10:10-10:50)

**Chairperson: Masatsune Kainosho**

- 2L2 Invited lecture: New NMR Approaches to Protein-Carbohydrate Interactions 26  
 ○Professor James H. Prestegard (University of Georgia)

(10:50 - 11:10) Coffee break

(11:10-11:50)

**Chairperson: Takehiko Terao**

- 2L3 Invited lecture: Indirect detected <sup>14</sup>N NMR of solids under MAS 28  
 ○Professor Zhehong Gan (National High Magnetic Field Laboratory)

(11:50-12:30)

**Chairperson: Isao Ando**

- 2L4 Honored lecture: New Developments in Solid-State NMR 30  
 ○Professor Fumitaka Horii (Kyoto University)

(14:00-15:00)

**Chairperson: Ichio Shimada**

- 2L5 NMR investigation of protein-protein interactions in transcription and signal transduction 32  
 ○Mitsu Ikura<sup>1</sup> (Ontario Cancer Institute<sup>1</sup>)
- 2L6 Protein structure analysis using the orientation dependent TROSY shift changes 34  
 ○Shin-ichi Tate<sup>1,2</sup> (Hiroshima University<sup>1</sup>, PRESTO/JST<sup>2</sup>)
- 2L7 Mechanisms underlying biological activities of RNA/DNA-binding proteins, examined on the basis of the combination of structure and relaxation analyses 36  
 Takako Ohyama<sup>1</sup>, Ayako Furukawa<sup>1</sup>, Tatsuya Miyoshi<sup>1</sup>,  
 Yusuke Takada<sup>1</sup>, Shota Ogara<sup>1</sup>, Kazuyuki Hiratsuka<sup>2</sup>, Takao Imai<sup>3</sup>, Hideyuki Okano<sup>3</sup>,  
 Hitoshi Nakagama<sup>4</sup>, Takashi Nagata<sup>1</sup>, OMasato Katahira<sup>1,5</sup> (Yokohama City University<sup>1</sup>,  
 Yokohama National University<sup>2</sup>, Keio University<sup>3</sup>, National Cancer Center Research Institute<sup>4</sup>,  
 PRESTO, JST<sup>5</sup>)

(15:00–15:40)

**Chairperson: Masahiro Shirakawa**

- 2L8 NMR structural biology of protein quality control in cells **38**  
○Koichi Kato<sup>1,2,3,4</sup> (Nagoya City University<sup>1</sup>, Institute for Molecular Science<sup>2</sup>,  
Ochanomizu University<sup>3</sup>, CREST, JST<sup>4</sup>)
- 2L9 N-terminal SAP and PHD-finger domains of SUMO ligase Siz1 from *Oryza sativa* are **40**  
essential for recognition of methylated histone as well as DNA binding  
○Toshimasa Yamazaki<sup>1</sup>, Rintaro Suzuki<sup>1</sup>, Akira Tase<sup>1</sup>, Yuji Nishiuchi<sup>2</sup>, Heisaburo Shindo<sup>1</sup>  
(National Institute of Agrobiological Sciences<sup>1</sup>, Peptide Research Inc.<sup>2</sup>)

(15:40 - 16:00) Coffee break

(16:00–16:40)

**Chairperson: Yoshifumi Nishimura**

- 2L10 In-Cell NMR in Eukaryotic cells **42**  
○Hidehito Tochio<sup>1</sup>, Tomomi Sakai<sup>2</sup>, Ryuji Igarashi<sup>1</sup>, Kosuke Inomata<sup>1</sup>, Takeshi Tenno<sup>3</sup>,  
Toshiaki Tanaka<sup>4</sup>, Hidekazu Hiroaki<sup>3</sup>, Yutaka Ito<sup>5</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>1,6</sup> (Kyoto University<sup>1</sup>,  
Yokohama City University<sup>2</sup>, Kobe University<sup>3</sup>, Tokyo Institute of Technology<sup>4</sup>,  
Tokyo Metropolitan University<sup>5</sup>,CREST<sup>6</sup>)
- 2L11 <sup>19</sup>F NMR of Hemoproteins Possessing Fluorinated Hemes **44**  
○Yasuhiko Yamamoto<sup>1</sup>, Satoshi Nagao<sup>1</sup>, Kazuya Mizuseki<sup>1</sup>, Shin Kawano<sup>1</sup>,  
Shigenori Nagatomo<sup>1</sup>, Akihiro Suzuki<sup>2</sup> (Univ. of Tsukuba<sup>1</sup>, Nagaoka Natl. Coll. of Tech.<sup>2</sup>)

(16:40–17:20)

**Chairperson: Hideo Akutsu**

- 2L12 Relativistic calculation of nuclear magnetic shielding tensors **46**  
○Hiroyui Fukui<sup>1</sup>, Yuusuke Ootani<sup>1</sup>, Hitoshi Maeda<sup>1</sup> (Kitami Institute of Technology<sup>1</sup>)
- 2L13 Location and contact of peptides with basic and aromatic residues in the membrane **50**  
bilayers  
○Xin Zhao<sup>1</sup>, Saburo Aimoto<sup>1</sup>, Steven O. Smith<sup>1,2</sup> (Osaka Univ.<sup>1</sup>, Stony Brook Univ.<sup>2</sup>)

(17:50) Banquet (Sapporo Beer Garden)

### 第三日 9月13日(木)

#### Day 3: 13 September, Thursday (Japanese session)

(9:30–10:10)

**座長 藤原敏道**

- 3L1 固体NMR によるレチナル異性化にตอบสนองするタンパク質主鎖の局所構造変化の解析 **54**  
○川村出<sup>1</sup>, 田辺純子<sup>1</sup>, 木原尚樹<sup>1</sup>, 和田昭盛<sup>2</sup>, 辻暁<sup>3</sup>, 内藤晶<sup>1</sup> (横浜国大院工<sup>1</sup>, 神戸薬大<sup>2</sup>, 兵庫県大<sup>3</sup>)
- 3L2 脂質膜結合型生体分子運動性解析のための新規固体NMR測定法開発 **58**  
○西村勝之<sup>1</sup> (分子研<sup>1</sup>)

(10:10–10:50)

**座長 平沖敏文**

- 3L3 無機固体酸塩Cs<sub>3</sub>(HSO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)の水素結合ネットワーク系におけるプロトンダイナミクス **62**  
尾身洋典<sup>1</sup>, 鈴木浩一<sup>1</sup>, 林繁信<sup>1</sup> (産総研計測フロンティア研究部門<sup>1</sup>)
- 3L4 21.8T高磁場NMR法によるハウケイ酸アルミニウム系ガラスの詳細構造解析 **64**  
○関庚薫<sup>1</sup>, 山本清<sup>1</sup>, 村上美和<sup>2</sup>, 丹所正孝<sup>2</sup>, 清水禎<sup>2</sup> (旭硝子<sup>1</sup>, 物質材料研究機構<sup>2</sup>)

(10:50 - 11:10) Coffee break

(11:10-11:50)

座長 神藤平三郎

- 3L5 調温・調湿下での固体高分子電解質中の水の拡散係数測定 68  
○貴傳名甲<sup>1</sup>, 竹岡裕子<sup>1</sup> (産総研固体高分子形燃料電池先端基盤研究センター<sup>1</sup>)
- 3L6 固体及び溶液NMRによるテトラフルオロエチレン-プロピレン交互共重合体の構造解析 70  
○黒木重樹<sup>1</sup> (東工大院理工<sup>1</sup>)

(11:50-12:30)

座長 堀井文敬

- 3L7 NMR法による高分子結晶の微細～高次構造解析 74  
○三好利一<sup>1</sup> (産総研ナノテクノロジー研究部門<sup>1</sup>)
- 3L8 <sup>10</sup>Bおよび<sup>11</sup>B高分解能NMRによるボロンドープダイヤモンドの研究 76  
○村上美和<sup>1</sup>, 清水禎<sup>1</sup>, 丹所正孝<sup>1</sup>, 高野義彦<sup>1</sup>, 石井聡<sup>1</sup>, E.A.Ekimov<sup>2</sup>, V.A.Sidorov<sup>2</sup>, 竹腰清乃理<sup>3</sup>  
(物質材料研究機構<sup>1</sup>, Russian Academy of Science<sup>2</sup>, 京大院理<sup>3</sup>)

(14:00-15:00)

ポスターセッション(偶数番号)

Poster presentations (even number)

(15:00-16:00)

座長 内藤晶

- 3L9 超微量用固体NMRプローブの開発 78  
○山内一夫<sup>1</sup>, 朝倉哲郎<sup>1,2</sup> (東京農工大院共生科学技術<sup>1</sup>, 東京農工大繊維博物館<sup>2</sup>)
- 3L10 NMRの高磁場化と高感度化 80  
○竹腰清乃理<sup>1</sup> (京大院理<sup>1</sup>)
- 3L11 新方式NMRの開発 82  
○岡田道哉<sup>1</sup>, 北口仁<sup>2</sup> (日立製作所<sup>1</sup>, 物質材料研究機構<sup>2</sup>)

(16:00 - 16:15) —休憩— Coffee break

(16:15-16:55)

座長 齋藤公兎 榛葉信久

- 3L12 酵素による食品素材の構造変化と食品物性- $\alpha$ グルコシダーゼやトランスグルタミナーゼを題材として- 86  
○榛葉信久<sup>1</sup>, 山口秀幸<sup>1</sup>, 品川麻衣<sup>1</sup>, 鈴木榮一郎<sup>1</sup> (味の素<sup>1</sup>)
- 3L13 植物バイオマスへの<sup>13</sup>C代謝動態・分解過程追跡の試み 88  
○菊地淳<sup>1,2,3</sup>, 森哲哉<sup>4</sup>, 雪真弘<sup>4</sup>, 守屋繁春<sup>3,4</sup>, 平山隆志<sup>3,4</sup> (理研PSC<sup>1</sup>, 名大院生命農<sup>2</sup>, 横浜市大院国際総合科学<sup>3</sup>, 理研環境分子<sup>4</sup>)

(16:55-17:35)

座長 齋藤公兎 榛葉信久

- 3L14 PFG-NMRによる固体高分子電解質中のイオン拡散挙動評価 92  
○橋本康博<sup>1</sup>, 堀池則子<sup>1</sup>, 山崎悟<sup>1</sup> (旭化成<sup>1</sup>)
- 3L15 Adsorption Characteristics of Electrolyte Ions Depending on Carbon Surfaces in Organic EDLC Using Solid State NMR 94  
○齋藤公兎<sup>1</sup>, 金泰坤<sup>2</sup>, 持田勲<sup>2</sup> (Nippon Steel Corporation<sup>1</sup>, Kyushu Univ.<sup>2</sup>)

(17:35-17:40)

閉会の挨拶 Closing remarks

ポスターリスト  
Poster list

- P001 SAIL 法を用いたタンパク質構造解析の新しい展開 146  
○武田光広<sup>1</sup>, Chung-ke Chang<sup>2</sup>, Ing-jye Jiang<sup>2</sup>, 中村健一郎<sup>3</sup>, 寺内勉<sup>4</sup>, 相本三郎<sup>3</sup>,  
Tai-huang Huang<sup>2</sup>, 甲斐荘正恒<sup>1,5</sup> (名大院理<sup>1</sup>, Academia Sinica<sup>2</sup>, 阪大院理<sup>3</sup>, SAIL<sup>4</sup>, 首都大院理<sup>5</sup>)
- P002 マルチサイトデカップリング 148  
○朝倉克夫<sup>1</sup>, 内海博明<sup>1</sup> (日本電子<sup>1</sup>)
- P003 DOSY法におけるT<sub>2</sub>フィルターの有効性 150  
○櫻井智司<sup>1</sup>, 末松孝子<sup>1</sup>, 戸田政明<sup>2</sup>, 雨宮晶子<sup>2</sup>, 内海博明<sup>1</sup> (日本電子<sup>1</sup>, 大日本インキ化学工業<sup>2</sup>)
- P004 DIORITE 法による高分子量蛋白質の分子形態変化解析 —試料調製技術の最適化 152  
○今田愛子<sup>1</sup>, 古川貴章<sup>1</sup>, 田中利好<sup>3</sup>, 河野俊之<sup>3</sup>, 楯真一<sup>1,2</sup> (広島大院理<sup>1</sup>, PRESTO/JST<sup>2</sup>,  
三菱化学生命研<sup>3</sup>)
- P005 3重共鳴4次元NMR測定への非線形サンプリングの応用 154  
○重光佳基<sup>1,2</sup>, 土江祐介<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>3</sup>, Markus Walchli<sup>4</sup>, 伊藤隆<sup>1,2</sup> (首都大院理工<sup>1</sup>,  
CREST/JST<sup>2</sup>, Univ. of Cambridge<sup>3</sup>, ブルカーバイオスピン<sup>4</sup>)
- P006 外部変動磁場B<sub>1</sub>の不均一性を利用した、水溶液の<sup>1</sup>H-1次元NMR測定における簡便かつ有効な  
溶媒信号消去 156  
○根本暢明<sup>1</sup> (日本電子<sup>1</sup>)
- P007 DI-MICCS-NMRによる簡易測定法の開発 158  
○高橋豊<sup>1</sup>, 櫻井智司<sup>1</sup>, 森園大輔<sup>2</sup>, 内海博明<sup>1</sup> (日本電子<sup>1</sup>, わかもと製薬<sup>2</sup>)
- P008 GB1タグと無細胞タンパク質合成系を利用した立体構造解析の迅速化 160  
○小椋賢治<sup>1</sup>, 斉尾智英<sup>1</sup>, 安達聡一郎<sup>1</sup>, 小橋川敬博<sup>1</sup>, 久米田博之<sup>1</sup>, 稲垣冬彦<sup>1</sup> (北大院薬<sup>1</sup>)
- P009 タグ分子を利用したペプチド発現系における融合タンパク質の解析 162  
○梅津喜崇<sup>1</sup>, 相沢智康<sup>2</sup>, 島本怜史<sup>1</sup>, 上島達朗<sup>2</sup>, 多々見文恵<sup>1</sup>, 神谷昌克<sup>2</sup>, 出村誠<sup>2</sup>, 河野敬一<sup>1</sup>  
(北大院理<sup>1</sup>, 北大院生命科学<sup>2</sup>)
- P010 構造基盤解析に向けたミトコンドリアTom20-プレ配列ペプチド複合体の安定化 164  
○齊藤貴士<sup>1,2</sup>, 井倉真由美<sup>1</sup>, 尾瀬農之<sup>1</sup>, 帯田孝之<sup>1</sup>, 小島理恵子<sup>1</sup>, 前仲勝実<sup>1</sup>, 神田大輔<sup>1</sup> (九大生医研<sup>1</sup>,  
九大デジタルメディスン・イニシアティブ<sup>2</sup>)
- P011 共発現を利用した不溶性顆粒の新規大量発現量法 166  
○北條江里<sup>1</sup>, 相沢智康<sup>2</sup>, 神谷昌克<sup>2</sup>, 宮沢光博<sup>3</sup>, 加藤祐輔<sup>3</sup>, 出村誠<sup>2</sup>, 河野敬一<sup>1</sup> (北大院理<sup>1</sup>,  
北大院生命科学<sup>2</sup>, 農業生物資源研<sup>3</sup>)
- P012 ウイルスベクターと植物細胞を利用した試料調製法 168  
○大木進野<sup>1</sup>, 土肥浩二<sup>2,3</sup>, 森正之<sup>2,3</sup> (北陸先端大<sup>1</sup>, JST<sup>2</sup>, 石川県大<sup>3</sup>)
- P013 ミミズ由来R型レクチンのC末端糖結合ドメインの糖との相互作用に関する研究 170  
○逸見光<sup>1</sup>, 久野敦<sup>2</sup>, 伊藤茂泰<sup>2,3</sup>, 鈴木龍一郎<sup>2,3</sup>, 長谷川典巳<sup>3</sup>, 平林淳<sup>2</sup> (食総研<sup>1</sup>,  
産総研糖鎖医学研究センター<sup>2</sup>, 山形大理<sup>3</sup>)
- P014 Jumonji AT-rich interaction domain (ARID)のNMR構造解析 172  
○楠英樹<sup>1</sup>, 竹内隆<sup>1</sup>, 河野俊之<sup>1</sup> (三菱化学生命研<sup>1</sup>)
- P015 MAP3K12 binding inhibitory protein 1 (MBIP)の構造生物学的研究 174  
○佐藤昌彦<sup>1</sup>, 長土居有隆<sup>1</sup>, 西村善文<sup>1</sup> (横浜市大院国際総合科学<sup>1</sup>)

P016	NMR Structures and Self-Sumoylation of the N-terminal SAPdomains of SUMO ligase PIAS/Siz Family ○Rintaro Suzuki <sup>1</sup> , Heisaburo Shindo <sup>1</sup> , Akira Tase <sup>1</sup> , Toshimasa Yamazaki <sup>1</sup> (農業生物資源研 <sup>1</sup> )	178
P017	シトクロムcの塩酸グアニジンによる変性過程で生じる非天然ヘム配位構造の常磁性NMR 研究 ○太虎林 <sup>1</sup> , 高山真一 <sup>1</sup> , 河野慎 <sup>1</sup> , 長友重紀 <sup>1</sup> , 山本泰彦 <sup>1</sup> (筑波大院数理物質科学 <sup>1</sup> )	180
P018	基本転写因子TFII E 全長のNMRによる構造解析 ○片岡雅之 <sup>1</sup> , 長土居有隆 <sup>1</sup> , 奥田昌彦 <sup>1</sup> , 明石知子 <sup>1</sup> , 西村善文 <sup>1</sup> (横浜市大院国際総合科学 <sup>1</sup> )	182
P019	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Atg8の立体構造解析 ○渡部正博 <sup>1</sup> , 野田展生 <sup>1</sup> , 横地政志 <sup>1</sup> , 久米田博之 <sup>1</sup> , 小橋川敬博 <sup>1</sup> , 藤岡優子 <sup>1</sup> , 中戸川仁 <sup>2</sup> , 大隅良典 <sup>2</sup> , 稲垣冬彦 <sup>1</sup> (北大院薬 <sup>1</sup> , 基生研 <sup>2</sup> )	184
P020	AML1 Runt domain に結合するRNA アプタマーの構造解析 ○野村祐介 <sup>1,2</sup> , 富士原和也 <sup>1,2</sup> , 千葉学 <sup>1</sup> , 飯淵宏昭 <sup>1</sup> , 田中卓 <sup>1,2</sup> , 田中陽一郎 <sup>2,3</sup> , 福永淳一 <sup>2,3</sup> , 神津知子 <sup>2,3</sup> , 中村義一 <sup>2,4</sup> , 河合剛太 <sup>1</sup> , 坂本泰一 <sup>1,2</sup> (千葉工大 <sup>1</sup> , JST・CREST <sup>2</sup> , 埼玉県立がんセンター <sup>3</sup> , 東大医科研 <sup>4</sup> )	186
P021	出芽酵母Bem1p SH3-CIDドメインの立体構造解析 ○高久朋之 <sup>1</sup> , 小椋賢治 <sup>1</sup> , 久米田博之 <sup>1</sup> , 山口佳洋 <sup>2</sup> , 伊藤隆司 <sup>2</sup> , 稲垣冬彦 <sup>1</sup> (北大院生命科学 <sup>1</sup> , 東大院新領域創成科学 <sup>2</sup> )	188
P022	相互作用に基づく光合成循環的電子伝達の機構解明 ○野本直子 <sup>1</sup> , 上田卓見 <sup>1,2</sup> , 嶋田一夫 <sup>1,3</sup> (東大院薬 <sup>1</sup> , JBIRC, JBIC <sup>2</sup> , BIRC, AIST <sup>3</sup> )	190
P023	Cvt経路関連タンパク質Atg8とAtg19 C末の複合体構造解析 ○久米田博之 <sup>1</sup> , 足立わかな <sup>2</sup> , 小椋賢治 <sup>1</sup> , 野田展生 <sup>1,2</sup> , 藤岡優子 <sup>2</sup> , 中戸川仁 <sup>3</sup> , 大隅良典 <sup>3</sup> , 稲垣冬彦 <sup>2</sup> (北大院薬 <sup>1</sup> , 北大院生命科学 <sup>2</sup> , 基生研 <sup>3</sup> )	194
P024	タキプレシン I のDPCおよびLPSとの相互作用解析 杉田圭太郎 <sup>1</sup> , ○神谷昌克 <sup>2</sup> , 大久保知行 <sup>1</sup> , 上島達郎 <sup>2</sup> , 島本怜史 <sup>1</sup> , 多々見文恵 <sup>2</sup> , 相沢智康 <sup>1</sup> , 水口峰之 <sup>3</sup> , 川畑俊一郎 <sup>4</sup> , 出村誠 <sup>2</sup> , 河野敬一 <sup>1</sup> (北大院理 <sup>1</sup> , 北大院生命科学 <sup>2</sup> , 富山大薬 <sup>3</sup> , 九大院理 <sup>4</sup> )	196
P025	RIG-I C 末端側ドメインの機能解析 ○高橋清大 <sup>1</sup> , 米山光俊 <sup>2</sup> , 西堀達哉 <sup>1</sup> , 久米田博之 <sup>1</sup> , 成田亮 <sup>2</sup> , 平井玲子 <sup>2</sup> , 藤田尚志 <sup>2</sup> , 稲垣冬彦 <sup>1</sup> (北大院薬 <sup>1</sup> , 京大ウイルス研 <sup>2</sup> )	198
P026	出芽酵母カルモジュリンのCa <sup>2+</sup> 結合体の構造解析 ○吉田良輔 <sup>1</sup> , 伊藤浩之 <sup>1</sup> , 久米田博之 <sup>1</sup> , 小椋賢治 <sup>2</sup> , 高橋清大 <sup>2</sup> , 矢澤道生 <sup>3</sup> , 稲垣冬彦 <sup>1,2</sup> (北大院生命科学 <sup>1</sup> , 北大院薬 <sup>2</sup> , 北大院理 <sup>3</sup> )	200
P027	新規亜鉛フィンガーモチーフCYRドメインの構造機能解析 ○磯貝信 <sup>1</sup> , 有吉真理子 <sup>1</sup> , 朽尾豪人 <sup>1</sup> , 池上貴久 <sup>2</sup> , 伊藤隆 <sup>3</sup> , 菅野新一郎 <sup>4</sup> , 安井明 <sup>4</sup> , 白川昌宏 <sup>1</sup> (京大院工 <sup>1</sup> , 阪大蛋白研 <sup>2</sup> , 首都大院理工 <sup>3</sup> , 東北大加齢研 <sup>4</sup> )	202
P028	NMRによって解明されたOsCnfU-1AドメインI, IIの鉄-硫黄クラスター受け渡しにおける協調した機能 ○斉尾智英 <sup>1</sup> , 久米田博之 <sup>1</sup> , 小椋賢治 <sup>1</sup> , 横地政志 <sup>1</sup> , 朝山宗彦 <sup>2</sup> , 加藤静恵 <sup>3</sup> , 加藤悦子 <sup>3</sup> , 手島圭三 <sup>4</sup> , 稲垣冬彦 <sup>1</sup> (北大院薬 <sup>1</sup> , 茨城大農 <sup>2</sup> , 農業生物資源研 <sup>3</sup> , 広島大院生物圏科学 <sup>4</sup> )	204
P029	オキシステロール結合タンパク質OSBPの小胞体局在モチーフと小胞体膜貫通タンパク質VAP-Aからなる複合体の立体構造解析 ○古板恭子 <sup>1</sup> , Jee JunGoo <sup>1</sup> , 深田はるみ <sup>2</sup> , 三島正規 <sup>1</sup> , 児嶋長次郎 <sup>1</sup> (奈良先端大バイオサイエンス <sup>1</sup> , 大阪府大院生命環境科学 <sup>2</sup> )	206
P030	T <sub>2</sub> 緩和分散法を用いたアミノ酸変異の酵素反応に対する遠隔作用の解析 ○古川貴章 <sup>1</sup> , 大前英司 <sup>1</sup> , 齋藤貴士 <sup>2,3</sup> , 神田大輔 <sup>2</sup> , 月向邦彦 <sup>1</sup> , 楯 真一 <sup>1,4</sup> (広島大院数理分子生命理 <sup>1</sup> , 九大生医研 <sup>2</sup> , 九大デジタルメディシンイニシアティブ <sup>3</sup> , PRESTO/JST <sup>4</sup> )	208

P031	溶液NMRを用いた出芽酵母Ire1p RNaseドメインの解析 ○河原郁美 <sup>1</sup> , Jee JunGoo <sup>1</sup> , 河野俊之 <sup>2</sup> , 箱嶋敏雄 <sup>3</sup> , 今川佑介 <sup>1</sup> , 河野憲二 <sup>1</sup> , 児嶋長次郎 <sup>1</sup> (奈良先端大バイオサイエンス <sup>1</sup> , 三菱化学生命研 <sup>2</sup> , 奈良先端大情報科学 <sup>3</sup> )	210
P032	VCIP135 の構造学的研究 ○岩津宇洗 <sup>1</sup> , 中田善三郎 <sup>2</sup> , 枋尾尚哉 <sup>3</sup> , 木川隆則 <sup>3</sup> , 横山茂之 <sup>3</sup> , 廣明秀一 <sup>4</sup> , 枋尾豪人 <sup>1</sup> , 白川昌宏 <sup>1</sup> (京大院工 <sup>1</sup> , 阪大蛋白研 <sup>2</sup> , 理研 <sup>3</sup> , 神戸大院医 <sup>4</sup> )	212
P033	複製開始制御因子Sld2 のリン酸化による機能制御の解析 ○倉富博康 <sup>1</sup> , 池上貴久 <sup>2</sup> , 荒木弘之 <sup>3</sup> , 枋尾尚哉 <sup>4</sup> , 木川隆則 <sup>4</sup> , 横山茂之 <sup>4</sup> , 有吉真理子 <sup>1</sup> , 枋尾豪人 <sup>1</sup> , 白川昌宏 <sup>1</sup> (京大院工 <sup>1</sup> , 阪大蛋白研 <sup>2</sup> , 国立遺伝研 <sup>3</sup> , 理研 <sup>4</sup> )	214
P034	可変圧力NMRを用いたT4リゾチームのキャピティに基づいた構造揺らぎの検出 ○前野寛大 <sup>1,2</sup> , 北原亮 <sup>2</sup> , 横山茂之 <sup>3,4</sup> , Frederick W. Dahlquist <sup>5</sup> , Frans A.A.Mulder <sup>6</sup> , 赤坂一之 <sup>1,2</sup> (近畿大院生物理工 <sup>1</sup> , 理研播磨 <sup>2</sup> , 理研GSC <sup>3</sup> , 東大院理 <sup>4</sup> , Univ. of Oregon <sup>5</sup> , Univ. of Groningen <sup>6</sup> )	216
P035	フィトクロムBヒスチジンキナーゼ様ドメインの構造解析 ○西ヶ谷有輝 <sup>1</sup> , Jee JunGoo <sup>1</sup> , 小林俊達 <sup>1</sup> , 三島正規 <sup>1</sup> , 三浦純 <sup>2</sup> , 加藤悦子 <sup>2</sup> , 高野誠 <sup>2</sup> , 山崎俊正 <sup>2</sup> , 児嶋長次郎 <sup>1</sup> (奈良先端大バイオサイエンス <sup>1</sup> , 農業生物資源研 <sup>2</sup> )	218
P036	アメロジェニンのNMR解析 ○熊本康裕 <sup>1</sup> , 相沢智康 <sup>2</sup> , 神谷昌克 <sup>2</sup> , 出村誠 <sup>2</sup> , 水口峰之 <sup>3</sup> , 河野敬一 <sup>1</sup> (北大院理 <sup>1</sup> , 北大院先端生命科学 <sup>2</sup> , 富山大院医薬 <sup>3</sup> )	220
P037	微小管プラスチン集積因子CLIP-170 と $\alpha$ -tubulin のC 末端ペプチド複合体の構造解析 ○三島正規 <sup>1</sup> , 前崎綾子 <sup>2</sup> , 笠美由希 <sup>2,4</sup> , 渡辺崇 <sup>3</sup> , 深田正紀 <sup>3</sup> , 貝淵弘三 <sup>3</sup> , 箱嶋敏雄 <sup>2,4</sup> (首都大院理工 <sup>1</sup> , 奈良先端大情報科学 <sup>2</sup> , 名大院医 <sup>3</sup> , CREST <sup>4</sup> )	222
P038	GPVI とコラーゲン及び結合リガンドとの相互作用解析 ○小野克輝 <sup>1</sup> , 吉澤良隆 <sup>1</sup> , 加藤こずえ <sup>1</sup> , 赤澤大輔 <sup>1</sup> , 高橋栄夫 <sup>2</sup> , 嶋田一夫 <sup>2,3</sup> (JBiC生物情報解析研究センター <sup>1</sup> , 産総研生物情報解析研究センター <sup>2</sup> , 東大院薬 <sup>3</sup> )	226
P039	転写コアクチベーターMBF1 の構造解析 ○永井義崇 <sup>1</sup> , 広瀬進 <sup>2</sup> , 白川昌宏 <sup>3</sup> , 伊藤隆 <sup>1</sup> , 三島正規 <sup>1</sup> (首都大院理工 <sup>1</sup> , 国立遺伝研 <sup>2</sup> , 京大院工 <sup>3</sup> )	228
P040	催涙因子合成酵素 Lachrymatory factor synthase の NMR構造解析 ○大橋若奈 <sup>1</sup> , 中村安里 <sup>2</sup> , 林文晶 <sup>1</sup> , 正村典也 <sup>3</sup> , 柘植信昭 <sup>3</sup> , 今井真介 <sup>3</sup> , 廣田洋 <sup>1,2</sup> (理研ゲノム科学総合研究センター <sup>1</sup> , 横浜市大院 <sup>2</sup> , ハウス食品 <sup>3</sup> )	230
P041	Rho-kinase のsplit PH ドメインの構造解析 ○佐藤明子 <sup>1</sup> , 寺脇慎一 <sup>2</sup> , 伊藤隆 <sup>1</sup> , 天野睦紀 <sup>3</sup> , 貝淵弘三 <sup>3</sup> , 箱嶋敏雄 <sup>2,4</sup> , 三島正規 <sup>1</sup> (首都大院理工 <sup>1</sup> , 奈良先端大情報科学 <sup>2</sup> , 名大院医 <sup>3</sup> , CREST <sup>4</sup> )	232
P042	NMR 法を用いたLC3 と標的分子の相互作用解析 ○佐藤健次 <sup>1</sup> , 久米田博之 <sup>2</sup> , 野田展生 <sup>2</sup> , 小椋賢治 <sup>2</sup> , 藤岡優子 <sup>2</sup> , 水島昇 <sup>4</sup> , 大隅良典 <sup>3</sup> , 稲垣冬彦 <sup>2</sup> (北大院生命科学 <sup>1</sup> , 北大院薬 <sup>2</sup> , 基生研 <sup>3</sup> , 東京医科歯科大院 <sup>4</sup> )	234
P043	NMRを用いたRAGE (receptor for AGE) 可変領域様ドメインの立体構造解析 ○松本篤幸 <sup>1</sup> , 吉田卓也 <sup>1</sup> , 村田紘子 <sup>1</sup> , 山本博 <sup>2</sup> , 小林祐次 <sup>1,3</sup> , 大久保忠恭 <sup>1</sup> (阪大院薬 <sup>1</sup> , 金沢大院医 <sup>2</sup> , 大阪薬大 <sup>3</sup> )	236
P044	Structure and orientation of a voltage sensor toxin in lipid membranes Hyun Ho Jung <sup>1</sup> , Hoi Jong Jung <sup>1</sup> , Mirela Milesco <sup>2</sup> , Hyun Jin Kim <sup>1</sup> , Dong-kyun Kang <sup>1</sup> , Wang Taek Hwang <sup>1</sup> , Hyo Jeong Kim <sup>1</sup> , Song Yub Shin <sup>3</sup> , Kenton J Swartz <sup>2</sup> , OJae Il Kim <sup>1</sup> (Gwangju Institute of Science and Technology <sup>1</sup> , National Institutes of Health <sup>2</sup> , Chosun Univ. <sup>3</sup> )	238

P045	高等動植物の構造プロテオミクス ○木川隆則 <sup>1,2</sup> , 武藤裕 <sup>1</sup> , 林文昌 <sup>1</sup> , 山崎和彦 <sup>1,3</sup> , 廣田洋 <sup>1</sup> , 山崎俊夫 <sup>1</sup> , Peter Guentert <sup>1</sup> , 前田秀明 <sup>1</sup> , 好田真由美 <sup>1</sup> , 白水美香子 <sup>1</sup> , 田仲昭子 <sup>1</sup> , 横山茂之 <sup>1,4</sup> (理研ゲノム科学総合研究センター <sup>1</sup> , 東工大院総合理工 <sup>2</sup> , 産総研年齢軸生命工学研究センター <sup>3</sup> , 東大院理 <sup>4</sup> )	240
P046	Assignment of silylated polyphenols by long-range triple-resonance H/Si/C experiments at natural abundance ○Michal Malon <sup>1</sup> , Shunya Takahashi <sup>1</sup> , Hiroyuki Koshino <sup>1</sup> (RIKEN <sup>1</sup> )	242
P047	腫瘍マーカーに対する糖鎖修飾が誘導する立体構造変化 ○藤谷直樹 <sup>1</sup> , 黒河内政樹 <sup>1</sup> , 高暁冬 <sup>1</sup> , 松下隆彦 <sup>1</sup> , 比能洋 <sup>1</sup> , 篠原康郎 <sup>1</sup> , 西村紳一郎 <sup>1</sup> (北大院先端生命科学 <sup>1</sup> )	246
P048	水くらげから抽出した新規ムチンのNMRによる構造研究 ○鵜澤洵 <sup>1,2</sup> , 馬場崇行 <sup>1</sup> , 関宏子 <sup>3</sup> , 丑田公規 <sup>1</sup> (理研環境ソフトマテリアル研究ユニット <sup>1</sup> , 千葉大分析センター <sup>2</sup> )	248
P049	DPFGSE 照射技術を使った糖鎖の解析 ○久保田由美子 <sup>1</sup> , 堀浩 <sup>2</sup> , 関宏子 <sup>3</sup> , 赤松穰 <sup>1</sup> , 鵜澤洵 <sup>3,4</sup> (微化研センター <sup>1</sup> , 玉川大農 <sup>2</sup> , 千葉大分析センター <sup>3</sup> , 理研環境ソフトマテリアル <sup>4</sup> )	252
P050	DOSY 法によるヘテロダイマーカプセルのゲスト包接の解析 ○末松孝子 <sup>1</sup> , 内海博明 <sup>1</sup> , 小林健二 <sup>2</sup> (日本電子 <sup>1</sup> , 静岡大理 <sup>2</sup> )	256
P051	Analysis of Plant Metabolites by DNP-NMR Steven Reynolds <sup>1</sup> , ○Takamasa Abe <sup>2</sup> , Jun Kikuchi <sup>3,4</sup> (Oxford Instruments <sup>1</sup> , オックスフォード・インストゥルメンツ <sup>2</sup> , 理研植物科学研究センター <sup>3</sup> , 名大院生命農 <sup>4</sup> )	258
P052	DPFGSE 法を用いたMacarbomycin の立体構造の解析 ○澤竜一 <sup>1</sup> , 久保田由美子 <sup>1</sup> , 梅沢洋二 <sup>1</sup> , 梅北まや <sup>1</sup> , 五十嵐雅之 <sup>1</sup> , 高橋良和 <sup>1</sup> , 赤松穰 <sup>1</sup> , 鵜澤洵 <sup>2</sup> , 関宏子 <sup>3</sup> (微化研センター <sup>1</sup> , 理研環境ソフトマテリアル <sup>2</sup> , 千葉大分析センター <sup>3</sup> )	260
P053	イセエビから抽出したカロテノイド含有脂質へのDOSYの適用 ○都出千里 <sup>1</sup> , 眞岡孝至 <sup>2</sup> , 杉浦真喜子 <sup>1</sup> (神戸薬大 <sup>1</sup> , 生産開発研 <sup>2</sup> )	264
P054	D <sub>2</sub> O 溶媒中での Warfarin の H-D 交換反応 ○杉浦真喜子 <sup>1</sup> , 都出千里 <sup>1</sup> , 岩川精吾 <sup>1</sup> , 辰見明俊 <sup>1</sup> (神戸薬大 <sup>1</sup> )	266
P055	HMBC 法の新しい応用測定 ---Selective-J-resolved-HMBC 法について--- ○降旗一夫 <sup>1</sup> , 瀬戸治男 <sup>2</sup> (東大院農学生命科学 <sup>1</sup> , 東京農大 <sup>2</sup> )	270
P056	<sup>13</sup> C DNP of fullerenes ○Steven Reynolds <sup>1</sup> , Alan Kook <sup>1</sup> , Devendra Babu Nama <sup>1</sup> , Andrew Illsley <sup>1</sup> (Oxford Instruments Molecular Biotools <sup>1</sup> )	274
P057	米飯老化の検出とその抑制 ○山口秀幸 <sup>1</sup> , 杉原文徳 <sup>2</sup> , 榛葉信久 <sup>1</sup> , 品川麻衣 <sup>1</sup> , 岡本武 <sup>1</sup> , 若林秀彦 <sup>1</sup> , 白川昌宏 <sup>3</sup> , 鈴木榮一郎 <sup>1</sup> (味の素 <sup>1</sup> , 横浜市大院国際総合科学 <sup>2</sup> , 京大院工 <sup>3</sup> )	276
P058	マルチレシーバを用いた固体NMR多核種同時測定 ○芦田淳 <sup>1</sup> , Boban K. John <sup>2</sup> , David M. Rice <sup>2</sup> (バリアンテクノロジーズジャパン <sup>1</sup> , Varian Inc. <sup>2</sup> )	278
P059	<sup>14</sup> Nオーバートーン照射による選択的近接 <sup>13</sup> C線幅増大を利用したペプチド二次構造解析 ○深澤隼 <sup>1</sup> , 竹腰清乃理 <sup>1</sup> , 莊司顯 <sup>2</sup> (京大院理 <sup>1</sup> , 群馬大工 <sup>2</sup> )	280
P060	固体 <sup>1</sup> H MQNMRを用いた原子核の空間分布の研究 ○石川洋土 <sup>1</sup> , 福地 将志 <sup>1</sup> , 最上 祐貴 <sup>1</sup> , 竹腰 清乃理 <sup>1</sup> (京大院理 <sup>1</sup> )	282

P061	固体NMRによる溶媒和の研究 ○最上祐貴 <sup>1</sup> , 石川 洋土 <sup>1</sup> , 福地 将志 <sup>1</sup> , 竹腰 清乃理 <sup>1</sup> (京大院理 <sup>1</sup> )	286
P062	発表取り消し	
P063	固体NMR によるウシラクトフェリシンの抗菌活性中心と酸性リン脂質二重膜との相互作用解析 ○梅山万左子 <sup>1</sup> , 吉良敦史 <sup>2</sup> , 内藤晶 <sup>1</sup> (横浜国大院工 <sup>1</sup> , アルバック <sup>2</sup> )	288
P064	アラニンオリゴマーの平行および逆平行 $\beta$ シート構造に関する固体NMR 構造解析 ○堀口紅実子 <sup>1,4</sup> , 池永万希子 <sup>2,4</sup> , 山内一夫 <sup>3</sup> , 朝倉哲郎 <sup>3,4</sup> (東京農工大院工 <sup>1</sup> , 東京農工大工 <sup>2</sup> , 東京農工大院共生科学技術 <sup>3</sup> , 東京農工大繊維博物館 <sup>4</sup> )	292
P065	固体NMR を用いたアミロイド $\beta$ 凝集体の立体構造解析 ○中西粹 <sup>1</sup> , 大橋竜太郎 <sup>1</sup> , 竹腰清乃理 <sup>1</sup> , 増田裕一 <sup>2</sup> , 上村諭子 <sup>2</sup> , 入江一浩 <sup>2</sup> (京大院理 <sup>1</sup> , 京大院農 <sup>2</sup> )	294
P066	高磁場固体 <sup>1</sup> H及び <sup>17</sup> O-NMR法によるアラニンオリゴマーの構造解析と化学シフト計算 ○鈴木悠 <sup>1</sup> , 山内一夫 <sup>1</sup> , 黒子弘道 <sup>3</sup> , 清水禎 <sup>3</sup> , 丹所正孝 <sup>2</sup> , 朝倉哲郎 <sup>1</sup> (東京農工大院工 <sup>1</sup> , 奈良女子大生活環境学 <sup>2</sup> , 物質材料研究機構 <sup>3</sup> )	296
P067	<sup>13</sup> C完全標識分子集合系についてマジック角回転条件 <sup>13</sup> C-スピン拡散法で得られる核間距離情報 ○江川文子 <sup>1</sup> , 阿久津秀雄 <sup>1</sup> , 藤原敏道 <sup>1</sup> (阪大蛋白研 <sup>1</sup> )	298
P068	水溶性およびカルシウム結合性を付与した新規絹フィブロインモデルペプチドの固体NMR構造解析 ○佐藤博彦 <sup>1,2</sup> , 菊池有加 <sup>1</sup> , 山口恵理香 <sup>1</sup> , 中澤靖元 <sup>1</sup> , 朝倉哲郎 <sup>1</sup> (東京農工大院工 <sup>1</sup> , 日産化学工業 <sup>2</sup> )	302
P069	固体NMR によるアミロイド形成ペプチドのアミロイド線維形成機構と線維阻害機構の解明 ○内藤晶 <sup>1</sup> , 大道寺謙吾 <sup>1</sup> , 藤田英樹 <sup>1</sup> , 伊藤ひかり <sup>1</sup> , 山根衣寿美 <sup>1</sup> , 川村出 <sup>1</sup> (横浜国大院工 <sup>1</sup> )	304
P070	固体NMRを用いた脂質ラフトにおける分子間相互作用の解析 ○松森信明 <sup>1</sup> , 岡崎宏紀 <sup>1</sup> , 野津浩平 <sup>1</sup> , 大石徹 <sup>1</sup> , 村田道雄 <sup>1</sup> (阪大院理 <sup>1</sup> )	308
P071	固体NMR によるポリグルタミン酸金属錯体の構造研究 ○藤江正樹 <sup>1</sup> , 畠山盛明 <sup>2</sup> , 齋藤公児 <sup>3</sup> , 平冲敏文 <sup>1</sup> (北大院工 <sup>1</sup> , 日鐵テクノリサーチ <sup>2</sup> , 新日本製鐵 <sup>3</sup> )	310
P072	エラストマーの固体高分解能NMRスペクトルに及ぼすMAS速度の効果 浅野敦志 <sup>1</sup> , ○堀俊祐 <sup>1</sup> , 黒津卓三 <sup>1</sup> , 芦田淳 <sup>2</sup> (防衛大 <sup>1</sup> , バリアンテクノロジーズジャパン <sup>2</sup> )	312
P073	PBLAの二次構造転移の研究: 高速SASS法による <sup>13</sup> C化学シフト異方性の測定 ○神原孝之 <sup>1</sup> , 水野敬 <sup>2</sup> , 中西粹 <sup>1</sup> , 竹腰清乃理 <sup>1</sup> , 莊司顕 <sup>3</sup> (京大院理 <sup>1</sup> , 日本電子 <sup>2</sup> , 群馬大工 <sup>3</sup> )	314
P074	Poly(methyl propiolate)の動的構造の研究 ○荒樋周 <sup>1</sup> , 鈴木晃生 <sup>1</sup> , 馬渡康輝 <sup>2</sup> , 田畑昌祥 <sup>2</sup> , 平冲敏文 <sup>1</sup> (北大院工 <sup>1</sup> , 室蘭工大 <sup>2</sup> )	316
P075	固体高分解能NMRによる微生物産生高分子ポリ( $\epsilon$ -L-リジン)/カルボキシメチルセルロースブレンドフィルム の分子構造解析 前田史郎 <sup>1</sup> , ○加藤久美子 <sup>1</sup> , 佐々木千鶴 <sup>2</sup> , 国本浩喜 <sup>3</sup> (福井大院工 <sup>1</sup> , 徳島大工 <sup>2</sup> , 金沢大院自然科学 <sup>3</sup> )	318
P076	固体 <sup>15</sup> N-MAS NMRにおける <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N/ <sup>15</sup> N- <sup>15</sup> N リカプル法を用いた構造研究 ○福地将志 <sup>1</sup> , 竹腰清乃理 <sup>1</sup> , 莊司顕 <sup>2</sup> , 石塚智也 <sup>3</sup> , 古田弘幸 <sup>4</sup> (京大院理 <sup>1</sup> , 群馬大院工 <sup>2</sup> , 分子研 <sup>3</sup> , 九大院工 <sup>4</sup> )	320
P077	固体NMRによる微生物産生高分子ポリ( $\epsilon$ -リジン)/ポリアクリル酸複合体の分子構造解析 前田史郎 <sup>1</sup> , ○藤原康博 <sup>1</sup> , 佐々木千鶴 <sup>2</sup> , 国本浩喜 <sup>3</sup> (福井大院工 <sup>1</sup> , 徳島大工 <sup>2</sup> , 金沢大院自然科学 <sup>3</sup> )	322
P078	固体NMR による乳酸系ポリマーアロイの材料機能評価 ○西田雅一 <sup>1</sup> , 早川由夫 <sup>1</sup> , 田中利幸 <sup>2</sup> , 西村美郎 <sup>2</sup> (産総研中部センター <sup>1</sup> , 愛知県産業技術研究所 <sup>2</sup> )	324
P079	固体NMRによる $\alpha$ -キチンおよび $\beta$ -キチン由来キトサンの静的動的分子構造解析 前田史郎 <sup>1</sup> , ○藤本侑子 <sup>1</sup> , 桜井謙資 <sup>1</sup> (福井大院工 <sup>1</sup> )	326

P080	高温in-situ $^{27}\text{Al}$ NMRによるカルシウムアルミノシリケートガラス・融体の構造とダイナミクス ○金橋康二 <sup>1</sup> , Jonathan F. Stebbins <sup>2</sup> (新日本製鐵 <sup>1</sup> , Stanford Univ. <sup>2</sup> )	328
P081	発表取り消し	
P082	固体高分解能NMR で見る一次元磁性銅(II)錯体の磁気的性質 ○山田哲也 <sup>1</sup> , 丸田悟朗 <sup>1</sup> , 武田定 <sup>1</sup> (北大院理 <sup>1</sup> )	332
P083	固体NMRで見たデカメチルフェロセン・アセナフテンキノン錯体の相転移前後におけるダイナミクス ○中村英章 <sup>1</sup> , 桑原大介 <sup>1</sup> , 持田智行 <sup>2</sup> (電気通信大 <sup>1</sup> , 東邦大理 <sup>2</sup> )	334
P084	$^{25}\text{Mg}$ 3QMAS NMR法による珪酸塩ガラス中のマグネシウムの構造解析 ○下田景士 <sup>1</sup> , 齋藤公児 <sup>1</sup> , 根本貴宏 <sup>2</sup> (新日本製鐵 <sup>1</sup> , 日本電子 <sup>2</sup> )	336
P085	$^{19}\text{F}$ -NMRによる非晶質フルフェナム酸の結晶化過程の解析 ○阿曾幸男 <sup>1</sup> , 吉岡澄江 <sup>1</sup> , 川西徹 <sup>1</sup> (国立衛研 <sup>1</sup> )	338
P086	固体NMRによる配位高分子錯体 $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz}]_n$ への重水素吸蔵状態の解明 ○武内大隼 <sup>1</sup> , 丸田悟朗 <sup>1</sup> , 武田定 <sup>1</sup> , 高見澤聡 <sup>2</sup> (北大院理 <sup>1</sup> , 横浜市大院国際総合科学 <sup>2</sup> )	340
P087	固体NMRによる $[\text{Fe}(\text{bpy})_2(\text{CN})_4\text{Cu}_2]$ のスピנקロスオーバー現象の研究 ○黒島寛之 <sup>1</sup> , 丸田悟朗 <sup>1</sup> , 武田定 <sup>1</sup> (北大院理 <sup>1</sup> )	342
P088	ポリマー被覆された反強磁性体ナノ粒子の表面スピンによる磁気的特異性 ○中村泰規 <sup>1</sup> , 鷲谷隆太 <sup>1</sup> , 丸田 吾朗 <sup>1</sup> , 武田 定 <sup>1</sup> (北大院理 <sup>1</sup> )	344
P089	$\text{MgB}_2$ の常伝導相に関する固体NMRによる研究 ○山路俊樹 <sup>1</sup> , 村上美和 <sup>2</sup> , 清水禎 <sup>2</sup> , 竹腰清乃理 <sup>1</sup> (京大院理 <sup>1</sup> , 物質・材料研究機構 <sup>2</sup> )	346
P090	超偏極 $^{129}\text{Xe}$ NMRによるLow-k膜用多孔質シリカ材料のポア評価 ○服部峰之 <sup>1</sup> , 早水紀久子 <sup>1</sup> , 平賀隆 <sup>1</sup> , 山本典孝 <sup>1</sup> , 高田省三 <sup>2</sup> , 秦信宏 <sup>2</sup> (産総研光技術研究部門 <sup>1</sup> , 産総研次世代半導体研究センター <sup>2</sup> )	348
P091	二次元NMR 法による常磁性試料の固体重水素MAS NMRスペクトルの分離 ○水野元博 <sup>1</sup> , 鈴木陽 <sup>1</sup> , 遠藤一央 <sup>1</sup> , 村上美和 <sup>2</sup> , 丹所正孝 <sup>2</sup> , 清水禎 <sup>2</sup> (金沢大院自然科学 <sup>1</sup> , 物質・材料研究機構 <sup>2</sup> )	354
P092	$^{133}\text{Cs}$ -NMR study of the metastable bilayer-hydrate of $\text{Cs}_x\text{CoO}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ Ming-YuanLiao <sup>1</sup> , Chung-Chin Lin <sup>1</sup> , Chia-Wei Su <sup>2</sup> , Jean-Lien Liu <sup>2</sup> , Horng-Yi Tang <sup>2</sup> (National Chung Hsing Univ. <sup>1</sup> , National Chi Nan Univ. <sup>2</sup> )	356
P093	液晶物質CBOOA のスメクチック相形成時における分子ダイナミクス ○萩原祥子 <sup>1</sup> , 岩間陽子 <sup>1</sup> , 藤森裕基 <sup>1</sup> (日本大院総合基礎科学 <sup>1</sup> )	358
P094	イメージングによるヒト脳の $T_1$ 緩和時間の迅速測定と解析 ○高屋展宏 <sup>1</sup> , 渡邊英宏 <sup>1</sup> , 三森文行 <sup>1</sup> (国立環境研 <sup>1</sup> )	360
P095	マンガン増感MRIに対する高速 $T_1$ 定量マッピングの検証 ○米山操 <sup>1</sup> , Jeff Kershaw <sup>1</sup> , 菅野巖 <sup>1</sup> , 青木伊知男 <sup>1</sup> (放医研 <sup>1</sup> )	362
P096	唾液成分のNMR:微分絶対強度の評価 ○高橋征三 <sup>1</sup> , 荻野孝史 <sup>2</sup> , 山口行治 <sup>3</sup> (日本女子大理 <sup>1</sup> , 国立精神・神経センター <sup>2</sup> , ファイザー <sup>3</sup> )	364
P097	Simultaneous quantitation of glutamate and GABA in the human brain using localized 2D CT-COSY : 2nd report ○渡邊英宏 <sup>1</sup> , 高屋展宏 <sup>1</sup> , 三森文行 <sup>1</sup> (国立環境研 <sup>1</sup> )	368

P098	異種核多次元NMRを用いた細胞内大量発現蛋白質の解析 ○榊原大介 <sup>1,2</sup> , 佐々木敦子 <sup>1,2</sup> , 飯島亜季 <sup>1</sup> , 末永智子 <sup>1</sup> , 小山博子 <sup>1</sup> , 浜津順平 <sup>1</sup> , 吉益雅俊 <sup>3</sup> , 林宣宏 <sup>4</sup> , 三島正規 <sup>1,2</sup> , 伊藤隆 <sup>1,2</sup> (首都大院理工 <sup>1</sup> , CREST/JST <sup>2</sup> , 理研 <sup>3</sup> , 藤田保健衛生大 <sup>4</sup> )	372
P099	ラット脳における高偏極キセノン縦緩和時間推定に与える肺動態の影響 ○中村和浩 <sup>1</sup> , 近藤靖 <sup>1</sup> , David Wright <sup>1</sup> , 三浦修一 <sup>1</sup> , 木下俊文 <sup>1</sup> , 若井篤志 <sup>2</sup> , Jeff Kershaw <sup>2</sup> , 菅野巖 <sup>2</sup> (秋田県立脳血管研究センター <sup>1</sup> , 放医研 <sup>2</sup> )	374
P100	NMRメタボロミクスを用いた出血性ショック時の病態解析 ○平川慶子 <sup>1</sup> , 佐野哲孝 <sup>3</sup> , 増野智彦 <sup>3</sup> , 小池薫 <sup>2,3</sup> , 小野寺謙吾 <sup>3,5</sup> , 植草協子 <sup>1</sup> , 佐藤格夫 <sup>3</sup> , 鈴木崇生 <sup>3</sup> , 相星淳一 <sup>3,4</sup> , 大野曜吉 <sup>1,5</sup> , 山本保博 <sup>3,5</sup> (日本医大 <sup>1</sup> , 京大院医 <sup>2</sup> , 日本医大 <sup>3</sup> , 東京医科歯科大 <sup>4</sup> , 日本医大院 <sup>5</sup> )	376
P101	RELOSY(RELaxation Ordered Spectroscopy)による <sup>1</sup> H-NMRの重畳シグナルの分離と運動性解析 ○中村文彦 <sup>1</sup> , 川口高広 <sup>1</sup> (花王 <sup>1</sup> )	378
P102	Automated Structure Determination of SAIL Ubiquitin Using the SAIL-FLYA System ○Tepei Ikeya <sup>1</sup> , Hitoshi Yoshida <sup>1</sup> , Tsutomu Terauchi <sup>1</sup> , Peter Guntert <sup>1,2</sup> , Masatsune Kainosho <sup>1,3</sup> (首都大院理工 <sup>1</sup> , フランクフルト大 <sup>2</sup> , 名大院理 <sup>3</sup> )	382
P103	リアルタイム自動帰属プラットフォームの開発 ○横地政志 <sup>1</sup> , 小橋川敬博 <sup>1</sup> , 関口真二 <sup>1</sup> , Eriks Kupce <sup>2</sup> , Ray Freeman <sup>3</sup> , 稲垣冬彦 <sup>1</sup> (北大院薬 <sup>1</sup> , Varian Ltd. Oxford <sup>2</sup> , Cambridge University <sup>3</sup> )	384
P104	新しいNMR分光法:時間周波数NMR分光法の試み ○近山英輔 <sup>1</sup> , 菊地淳 <sup>1</sup> (理研植物科学研究センター <sup>1</sup> )	386
P105	高磁場DNPのための高出力サブミリ波発生装置(ジャイロトロン)の開発 ○高橋大樹 <sup>1</sup> , 出原敬孝 <sup>2</sup> , 小川勇 <sup>2</sup> , ラ・アグス <sup>2</sup> , 印牧知廣 <sup>2</sup> , 光藤誠太郎 <sup>2</sup> , 斉藤輝雄 <sup>2</sup> , 江川文子 <sup>1</sup> , 阿久津秀雄 <sup>1</sup> , 藤原敏道 <sup>1</sup> (阪大蛋白研 <sup>1</sup> , 福井大遠赤外領域開発研究センター <sup>2</sup> )	388
P106	新方式NMR用多核プローブの開発 ○田中秀樹 <sup>1</sup> , 長谷川学 <sup>1</sup> , 岡田道哉 <sup>1</sup> , 北口仁 <sup>2</sup> (日立製作所 <sup>1</sup> , 物質・材料研究機構 <sup>2</sup> )	392
P107	新たな評価関数を用いた磁場ロック装置の開発 ○朴ミンソク <sup>1</sup> , 岡田道哉 <sup>1</sup> , 北口仁 <sup>2</sup> (日立製作所 <sup>1</sup> , 物質・材料研究機構 <sup>2</sup> )	396
P108	新方式NMR用低温プローブの開発 ○福田祐三 <sup>1</sup> , 川崎健一 <sup>1</sup> , 土屋 貢俊 <sup>1</sup> , 椎野俊之 <sup>1</sup> , 萩原修哉 <sup>1</sup> , 岡田 道哉 <sup>1</sup> , 山本浩之 <sup>2</sup> , 齊藤 和夫 <sup>2</sup> , 田中 弘之 <sup>3</sup> , 佐保 典英 <sup>3</sup> , 北口仁 <sup>4</sup> (日立製作所 <sup>1</sup> , 日立製作所 <sup>2</sup> , 日立製作所 <sup>3</sup> , 物質・材料研究機構 <sup>4</sup> )	400
P109	新方式NMR用600 MHz超電導磁石の均一磁場特性 ○椎野俊之 <sup>1</sup> , 和久田毅 <sup>2</sup> , 土屋貢俊 <sup>1</sup> , 牧晃司 <sup>1</sup> , 岡田道哉 <sup>1</sup> , 田中弘之 <sup>2</sup> , 佐保典英 <sup>2</sup> , 木戸修一 <sup>3</sup> , 塚本英雄 <sup>3</sup> , 竹内一浩 <sup>3</sup> , 北口仁 <sup>4</sup> (日立製作所 <sup>1</sup> , 日立製作所 <sup>2</sup> , 日立製作所 <sup>3</sup> , 物質・材料研究機構 <sup>4</sup> )	404
P110	新方式NMR用高感度プローブの開発 ○川崎健司 <sup>1</sup> , 福田 祐三 <sup>1</sup> , 土屋貢俊 <sup>1</sup> , 椎野俊之 <sup>1</sup> , 岡田道哉 <sup>1</sup> , 山本浩之 <sup>2</sup> , 斉藤和夫 <sup>2</sup> , 北口 仁 <sup>3</sup> (日立製作所 <sup>1</sup> , 日立製作所 <sup>2</sup> , 物質・材料研究機構 <sup>3</sup> )	408
P111	Cryo-Coil MAS プローブの開発 ○水野敬 <sup>1,4</sup> , 樋岡克哉 <sup>1,4</sup> , 藤岡耕治 <sup>2</sup> , 竹腰清乃理 <sup>3,4</sup> (日本電子 <sup>1</sup> , クライオウェア <sup>2</sup> , 京大院理 <sup>3</sup> , CREST/JST <sup>4</sup> )	410
P112	超電導スプリット型マグネットNMRシステム向けの循環型滴定計測システム ○北川功 <sup>1</sup> , 田中秀樹 <sup>1</sup> , 岡田道哉 <sup>1</sup> , 高妻孝光 <sup>2</sup> , 北口仁 <sup>3</sup> (日立製作所 <sup>1</sup> , 茨城大院理工 <sup>2</sup> , 物質・材料研究機構 <sup>3</sup> , 日立製作所 <sup>4</sup> )	414

- P113 極めて高精度なNMR試料回転制御とその応用 416  
○山崎千春<sup>1</sup>, 朝倉克夫<sup>1</sup>, 田中良二<sup>1</sup>, 岡地淑夫<sup>1</sup>, 山腰良晃<sup>1</sup>, 穴井孝弘<sup>1</sup> (日本電子<sup>1</sup>)
- P114 新方式NMR用300MHz超電導磁石の開発 418  
○土屋貢俊<sup>1</sup>, 和久田毅<sup>2</sup>, 牧晃司<sup>1</sup>, 椎野俊之<sup>1</sup>, 田中弘之<sup>3</sup>, 佐保典英<sup>3</sup>, 塚本英雄<sup>2</sup>, 竹内一浩<sup>2</sup>, 岡田道哉<sup>1</sup>, 北口仁<sup>4</sup> (日立製作所<sup>1</sup>, 日立製作所<sup>2</sup>, 日立製作所<sup>3</sup>, 物質・材料研究機構<sup>4</sup>)
- P115 発表取り消し
- P116 生体高分子のNMRデータベース:BMRBの新登録ウェブインターフェイス(ADIT-NMR)の日本サイト公開 422  
○中谷英一<sup>1,2</sup>, 原野陽子<sup>1</sup>, 阿久津秀雄<sup>1</sup>, 中村春木<sup>1</sup>, 藤原敏道<sup>1</sup> (阪大蛋白研<sup>1</sup>, 科学技術振興機構<sup>2</sup>)
- P117 揺動磁場下での高分解能NMR II 424  
○飯島隆広<sup>1</sup>, 竹腰清乃理<sup>2</sup> (分子研<sup>1</sup>, 京大院理<sup>2</sup>)
- P118 <sup>129</sup>Xe NMRによる微孔微粒子の吸着特性評価:ゼオライトへの応用 426  
○佐治修吾<sup>1</sup>, 安達裕子<sup>1</sup>, 河田陽子<sup>1</sup>, 木村敦臣<sup>1</sup>, 藤原英明<sup>1</sup> (阪大院医<sup>1</sup>)
- P119 高精度定量を目指したERETIC信号の安定化への取り組み 428  
○齋藤剛<sup>1</sup>, 井原俊英<sup>1</sup>, 衣笠晋一<sup>1</sup> (産総研計測標準研究部門<sup>1</sup>)
- P120 理化学研究所・横浜研究所 NMR施設の共用化 430  
○好田真由美, 木川隆則<sup>1</sup> (理研ゲノム科学総合研究センター<sup>1</sup>)
- P121 NMR緩和法による圧密粘土材料中の空隙構造の評価 432  
○大窪貴洋<sup>1</sup>, 山口真<sup>2</sup> (原子力機構<sup>1</sup>, 産業創造研究所<sup>2</sup>)
- P122 <sup>19</sup>F-NMRを用いたコラーゲンモデルペプチドのフォールディング機構の研究 434  
○河原一樹<sup>1</sup>, 根本暢明<sup>2</sup>, 元岡大祐<sup>3</sup>, 西義則<sup>3</sup>, 土井正光<sup>4</sup>, 内山進<sup>5</sup>, 中沢隆<sup>6</sup>, 西内祐二<sup>7</sup>, 吉田卓也<sup>1</sup>, 大久保忠恭<sup>1</sup>, 小林祐次<sup>1,3</sup> (阪大院薬<sup>1</sup>, 日本電子<sup>2</sup>, 大阪薬大<sup>3</sup>, 和歌山高専<sup>4</sup>, 阪大院工<sup>5</sup>, 奈良女子大理<sup>6</sup>, ペプチド研<sup>7</sup>)



# 口頭発表要旨

Lecture Abstracts



第一日

9月11日(火)

日本語セッション

Day 1: 11 September, Tuesday

(Japanese session)

Fast Data Acquisition and Sensitivity Optimization for Multidimensional NMR

*Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology*

JunGoo Jee and ○Chojiro Kojima

Linear sampling by Nyquist frequency is necessary for discrete Fourier transformation of all NMR data. On this method, the decrease of the number of sampling points is directly related to the decrease of the resolution of the obtained NMR spectrum. Recently, non-linear sampling method keeping the spectral resolution has been reported. Here we applied this non-linear sampling method to the multidimensional NMR data acquisition, and succeeded to measure the HNC0 spectrum within 10 minutes without losing resolution. This technique was also applied to a 0.017 mM protein sample, and a very nice HNCA spectrum was obtained within 5 hours. Thus, the non-linear sampling method will be useful for most protein samples, especially for triple-resonance experiments for very low conc. samples.

### はじめに

多次元 NMR スペクトルは時間軸データをデジタル化して測定し、周波数スペクトルに変換することで得られる。通常周波数スペクトルへの変換には離散フーリエ変換 (Discrete Fourier Transform, DFT) が用いられており、サンプリング間隔はサンプリング定理によりナイキスト周波数で規定される一定間隔でなければならない (線形サンプリング)。ナイキスト周波数は通常の NMR 測定で用いられる直交位相検波法 (Quadrature Detection, QD) ではスペクトル幅の逆数に相当する。DFT には高速フーリエ変換 (FFT) として知られる高速アルゴリズムがあり、高い計算能力を要求する NMR データ処理では必須と考えられてきた。しかし近年のコンピュータ性能の大幅な向上により、最大エントロピー法 (Maximum Entropy Method, MEM) などフーリエ変換以外の方法が現実的となった。MEM などのサンプリング間隔に制限がない変換法を選択することで多次元 NMR 測定において測定ポイント数の削減が可能となり、測定時間が短縮されるなどの現実的なメリットがある。最近、2D MEM など2つ以上の間接測定軸で非線形サンプリングした多次元 NMR データのプロセスが可能となり、

---

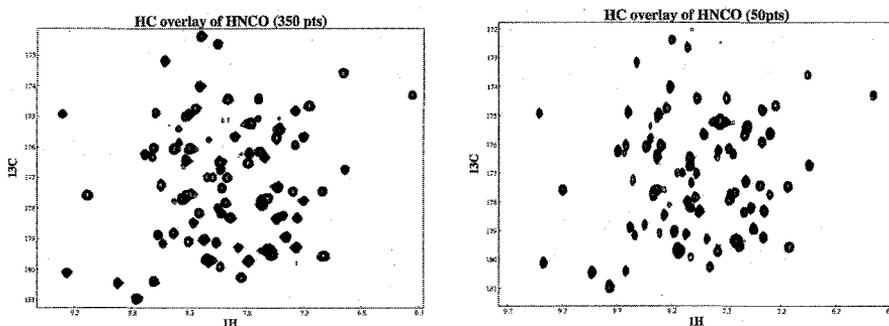
キーワード：多次元非線形サンプリング、多次元 MEM、タンパク質、極低濃度サンプル

ジー ジュンゲー、こじま ちょうじろう

サンプリング数を大幅に削減することが可能となってきた。本研究ではこれら多次元非線形サンプリングのスケジューリングを改良し、タンパク質の3次元 HNCО 測定を分解能を損なうことなく 10 分未満で達成した。またこの技術を 0.017 mM のタンパク質に適用し、3次元 HNCA を約 5 時間で測定することに成功した。

### 多次元非線形サンプリング

3D HNCО の 2 つの間接測定軸 (C' と N) に 3 つの非線形サンプリング法 (ランダムサンプリング、指数関数サンプリング、ガウシアンサンプリング) を適用した。パルスプログラムは Wagner Lab (Harvard Medical School) のものを一部改変して使い、クライオプローブ付き Bruker Avance 500 NMR 装置で測定した。サンプリングスケジュールは自作プログラム (Jee, unpublished) で発生させたものを用いた。周波数スペクトルへの変換には Rowland NMR Toolkit を用いた。線形サンプリング (通常の測定) とガウシアンサンプリングを分子量 1 万のタンパク質に適用した結果を図 1 に示す。図 1 はスペクトルの分解能を損なうことなく非線形サンプリングにより測定ポイント数 (測定時間を) を 1/7 に削減できることを示している。また同様に他の主鎖帰属のための NMR 測定でも分解能を損なうことなくスペクトルを得ることに成功している。このことから一般的に多次元 NMR 測定では非線形サンプリングにより測定ポイント数の大幅な削減が可能であると考えられる。



**Fig. 1** 2D projection spectra of 3D HNCО. Linearly (left) or non-linearly (right) sampled spectrum in both C' and N dimensions with total 350 or 50 complex points, respectively. Total experimental times are 60 and 9 mins for left and right spectra, respectively.

### 低濃度サンプルの測定

非線形サンプリングではスペクトルの分解能を損なうことなく測定ポイント数を大幅に削減できる。そこでこのテクニックを低濃度サンプルに適用した。サンプルには低濃度かつ低塩強度で安定な分子量 2 万の 0.017 mM タンパク質を用い、NMR モニター制度を利用して理研横浜研究所のクライオプローブ付き Bruker Avance 800 NMR 装置で測定した。約 5 時間で良好な 3D HNCA スペクトルが得られ、非線形サンプリングが低濃度サンプルにおいても極めて有効であることが示された。発表では低濃度サンプル測定における感度の最適化についても述べたい。

## 非線形サンプリング法を用いた迅速な異種核多次元 NMR 測定法の開発と応用

(<sup>1</sup>首都大学東京, <sup>2</sup>CREST/JST, <sup>3</sup>ケンブリッジ大学, <sup>4</sup>ブルカー・バイオスピン)

○伊藤 隆<sup>1,2</sup>, Daniel Nietlispach<sup>3</sup>, 重光佳基<sup>1,2</sup>, 三島正規<sup>1,2</sup>,  
Markus Wälchli<sup>4</sup>

### Heteronuclear 3D/4D NMR with nonlinear sampling and maximum entropy reconstruction: optimisation and application to "difficult" protein samples

Yutaka Ito<sup>1,2</sup>, Daniel Nietlispach<sup>3</sup>, Yoshiki Shigemitsu<sup>1,2</sup>, Masaki Mishima<sup>1,2</sup>  
and Markus Wälchli<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; <sup>2</sup>CREST, JST;  
<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK; <sup>4</sup>Bruker Biospin

Nonlinear sampling for indirectly acquired dimensions in combination with maximum entropy (MaxEnt) reconstruction has been shown to provide significant time savings in the measurement of multidimensional NMR experiments. In this presentation we report our recent applications of this scheme to some of our "difficult" samples, the C-terminal nucleotide-binding domain of the human mitochondrial ABC transporter ABCB6 (ABCB6-C), a 56kDa *E. coli* nickel binding protein NikA, a 59 kDa *Salmonella typhimurium* periplasmic oligopeptide binding protein OppA, etc. We also present In-Cell NMR studies of proteins in living *E. coli* cells, in which the nonlinear sampling scheme played crucial role in rapid acquisition of triple-resonance NMR spectra.

**【序】** 近年, 迅速な多次元 NMR 測定のための様々な手法が開発され, 高分解能 NMR 法を用いて解析が可能な試料の範疇が, 高分子量, 低溶解度, 低安定性といった, より「困難な」性質を持つ蛋白質に拡大されつつある。様々な手法の中で, 非線形サンプリング法を用いる方法は, 最も「堅実な」アプローチと言ってもよい。間接観測軸に対して非線形サンプリングを用い, 最大エントロピー法を用いてデータ処理を行う方法は, 1980 年代後半に Laue らによって既に提案されていたが, 異種核多次元 NMR 法に対する適用については, 1990 年代半ばから Wagner らによって精力的に研究が進められてきた。

われわれは今回, 非線形サンプリング法を用いた 3 次元 3 重共鳴 NMR 測定法について, Wagner らが確立した方法にさらに検討を加え, また初めて 4 次元 NMR 法への応用も行い, その有用性の実証を行ったので報告する。さらに, この手法を適用した, いくつかの「困難な」蛋白質や細胞内蛋白質の解析例も併せて紹介する。

**【実験, 結果】** 「困難な」蛋白質試料としては, ①ヒト・ミトコンドリア ABCB6 の C 末端可溶性ドメイン, ②大腸菌 Ni 結合蛋白質 NikA (56kDa), ③サルモネラ・オリゴペプチド結合蛋白質 OppA (59kDa) 等を取り上げ, 非線形サンプリング法を用いた 3 次元 3 重共鳴 NMR ス

異種核多次元 NMR, 非線形サンプリング, 最大エントロピー法, 高分子量蛋白質, In-Cell NMR

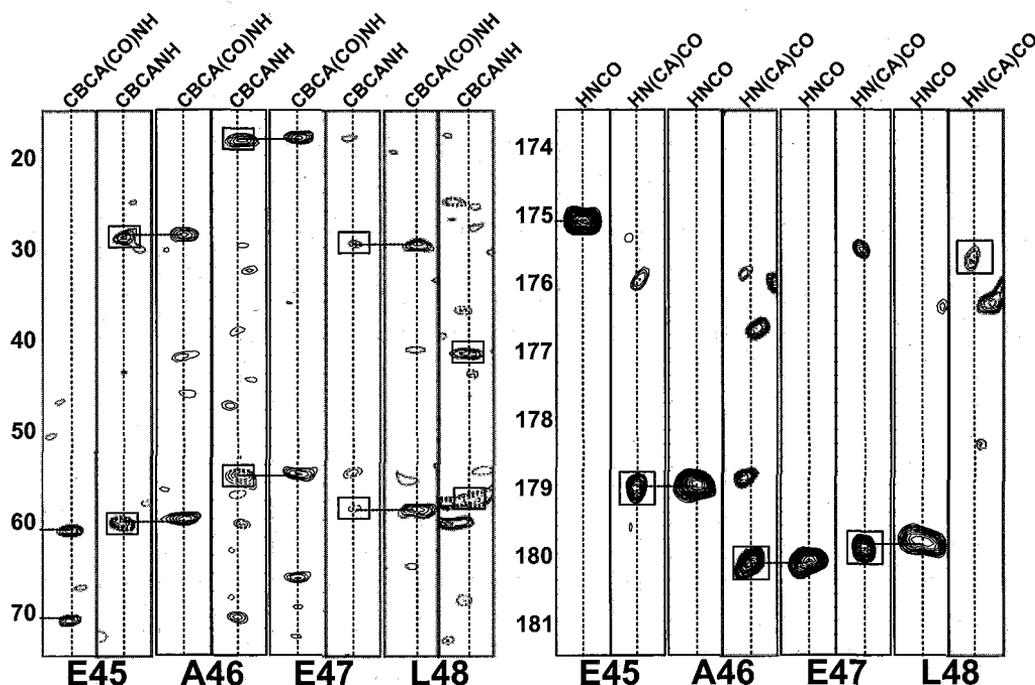
いとう ゆたか, だにえる にーとりすばっは, しげみつ よしき, みしま まさき,  
まるくす うえるひり

ペクトルの測定を行った。いずれの試料についても、従来法に比べて 1/3~1/8 の時間で同程度の感度・分解能をもつスペクトルを得ることができた。また、従来法に比して単位時間内の積算回数を増やすことが可能であるため、溶解度の低い試料の解析も可能になる。実際に、0.1mM 以下の濃度の蛋白質試料について測定を行い、主鎖 NMR シグナルの帰属が可能であることも確認した。ミセル中の膜蛋白質試料に対しても良好な結果を得つつある。

つづいて、HCC(CO)NH, HNCOCA 等の 4 次元 NMR 測定に非線形サンプリングを適用し、有用性の検証を行った。この結果、1/4~1/8 程度の測定時間で同程度の感度・分解能をもつスペクトルを得ることができた。また、従来法に比して間接観測軸の最大観測時間を延ばすことが可能であるため、より高分解能のスペクトルを得ることも成功した。

細胞内蛋白質の解析への応用としては、主として大腸菌内発現系を用い、カルモジュリン (CaM) 等の試料の In-Cell NMR 測定を試みている。現在までに、CaM N 末端ドメインの主鎖 NMR シグナルの帰属に成功している。Figure には、CaM N 末端ドメインの In-Cell 3 重共鳴スペクトルを示した。

**【今後の展望】** 今回報告した非線形サンプリングを用いた迅速な異種核多次元 NMR 測定法に加えて、少ない構造情報から効率よく高次構造解析を行う手法の開発などの他の要素技術の開発研究を行っていくことによって、これまで解析が困難であった不安定な試料や細胞内試料の高次構造解析を目指していきたい。



**Figure:**

2D  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  stripes of 3D CBCA(CO)NH/CBCANH (left panel) and 3D HNCO/HN(CA)CO (right panel) spectra measured on the calmodulin N-terminal domain in living *E. coli* cells. A nonlinear sampling scheme was utilised for the indirectly observed  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  dimensions. Sequence specific assignments for E45-L48 stretch are shown. Intraresidue correlations are indicated with boxes.

**Prevention of protein aggregation during NMR measurements**

(<sup>1</sup>Faculty of Engineering, Gunma University, <sup>2</sup>Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences)  
 Kaori Wakamatsu<sup>1</sup>, Long Xiang<sup>1</sup>, Takeshi Ishii<sup>1</sup>, Kazuo Hosoda<sup>1</sup>, Yusuke Inoue<sup>1</sup>, Kenji Kubota<sup>1</sup>, Toshiyuki Kohno<sup>2</sup>

In solution NMR, better sensitivity and resolution are obtained by raising sample temperature, but proteins aggregate at a too high temperature due to thermal denaturation. Because pharmaceutically important proteins tend to aggregate more easily than housekeeping proteins, prevention of protein aggregation is one of challenging tasks in protein NMR. Here we report the application of NDSB (non-detergent sulphobetaine) for protein NMR. NDSB enables acquisition of protein NMR spectra at higher temperatures by stabilizing proteins. Sample precipitation and time-dependent decrease in NMR signals due to higher temperature were prevented by supplementing NDSB in several protein samples. This enabled unambiguous assignment of several signals in a 40-kDa protein without deuteration by triple-resonance spectroscopy.

**【緒言】**

溶液NMRにおいては測定温度を上げるとシグナルの感度と分解能が向上するが、蛋白質の場合、温度を上げ過ぎると熱変性により凝集してしまい、スペクトルが得られなくなる。また、ヒトのガン関連蛋白質のように創薬のターゲットとなるような蛋白質ほど凝集しやすい事が知られている。そこで凝集の防止は蛋白質のNMR測定で重要な課題である。本発表では、NDSB (non-detergent sulphobetaine) が蛋白質の凝集を防止するとともに熱安定性を高めることによって、分子量が比較的大きな蛋白質の高温でのNMR測定を可能にする事を示す。分子量の増大とともに横緩和時間は短くなるので、高温での測定は大きなメリットになる。高濃度のNDSBを加えてもNMR測定に殆ど支障をきたさない事も報告する。

**【結果】**

(1) NDSBによるタンパク質の熱安定性の向上:

Gil  $\alpha$  は分子量4万と大きく、室温では15N HSQCシグナルの得られる残基は限られていた。しかし、高温では凝集沈殿してしまうので測定温度を20℃よりも上げられなかった。Gil  $\alpha$  のサンプルにNDSBを加えたところ、40℃で42時間経っても沈殿は殆ど生じず、シグナルの減少も殆ど起きなかった。一方、NDSBの非存在下では凝集沈殿によりシグナルが速やかに減少した (Fig. 1)。

20℃と40℃におけるGil  $\alpha$  の2D HSQCスペクトルをFig.2に示す。温度の上昇に伴

凝集 安定性 高温測定 NDSB

わかまつかおり こうりゅう いしいたけし ほそだかずお  
 いのうえゆうすけ くぼたけんじ こうのとしゆき

0.05 M ArgHCl

$\gamma(7) = \alpha(1)$

い、スペクトルの質が劇的に向上している事が分かる。15N-Pheでアミノ酸選択的にラベルしたサンプルについてHSQCスペクトルの温度変化を調べたところ、30°Cでは19残基あるPheのうち5残基しか観測されなかったが、40°Cでは全て観測される事が確認された。

また、15N-Pheと1-13C-Valでアミノ酸選択的にダブルラベルされたGi1 $\alpha$ についてHNCOを測定したところ、Gi1 $\alpha$ のアミノ酸配列中に一ヶ所しかないVal335-Phe336ペアに由来するシグナルを帰属する事ができた。この部分は、レセプターによる活性化に伴って構造が変化すると予想されていたが、マストパンによる活性化に伴ってシグナルがシフトすることが確認された。

### (2) 高濃度のNDSBがNMR測定に及ぼす影響：

NDSBは0.5 Mの濃度でも水溶液の粘度をあまり上げず、重水とほぼ同じ粘度である。また、両イオン性なので、NaClとは異なり、パルス幅を長くすることもなく、サンプルの加熱も引き起こさない。更に、水の線形にも影響を与えない。NDSB由来のプロトンシグナルを効率的に除去できれば、NMR測定に悪影響を及ぼさないと考えられる。

### (3) NDSBが凝集を防止する機構

NDSBは種々の蛋白質の変性温度を上昇させている事が濁度の温度変化測定によりわかった。また、蛋白質に結合している事がX線小角散乱測定により確認された。NDSBが蛋白質のどの部分に結合するのか、NDSBが蛋白質の運動性にどのような影響を与えるのかを現在解析しており、それについても報告する予定である。

### 【結語】

蛋白質のNMR測定は今後、より大きな分子量の物がターゲットとなってくると予想されるが、蛋白質が大きくなればなるほど、凝集や熱安定性が問題となる。NMR測定に悪影響を与えないNDSBは凝集を防止すると共に熱安定性を高めるので、今後、蛋白質のNMR測定を大いに推進すると期待される。

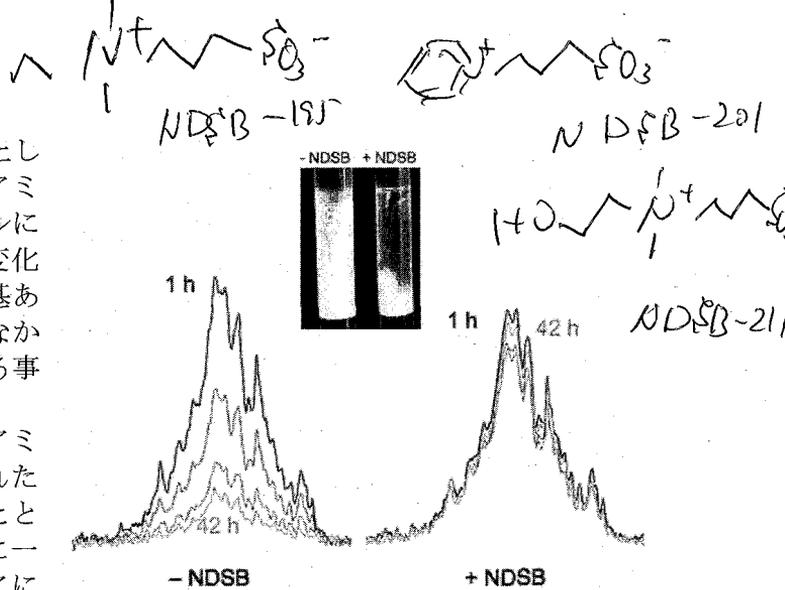


Fig. 1: Prevention of heat-induced aggregation of Gi1 $\alpha$  by NDSB. 1D 15N-1H HSQC spectra at various time points in the absence (left) and presence (right) of 0.5 M NDSB are shown.

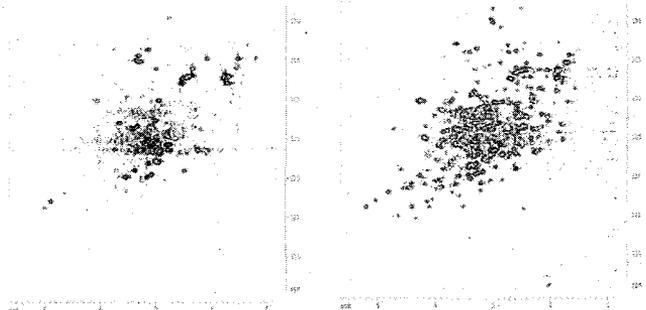


Fig. 2: HSQC spectra of Gi1 $\alpha$  at 20 °C (left) and 40 °C (right) in the presence of 0.5 M NDSB.

## 1L4 可変圧力NMRによる蛋白質の遅い構造揺らぎの検出

(理研播磨<sup>1</sup>、CNRS & INSERM<sup>2</sup>、CNRS-ICSN<sup>3</sup>、近大生物理工<sup>1,4</sup>)

○北原亮<sup>1</sup>、Christian Roumestand<sup>2</sup>、Carine van Heijenoort<sup>3</sup>、赤坂一之<sup>1,4</sup>

### Detection of Slow Conformational Transitions in proteins by Variable Pressure NMR

*Ryo Kitahara<sup>1</sup>, Christian Roumestand<sup>2</sup>, Carine van Heijenoort<sup>3</sup>, Kazuyuki Akasaka<sup>4</sup>*  
*<sup>1</sup>RIKEN Spring-8 Center, Japan, <sup>2</sup>CNRS, INSERM, Montpellier, France <sup>3</sup>CNRS-ICSN, Gif-syr-Yvette, France, <sup>4</sup>Kinki University, Japan*

Variable pressure NMR spectroscopy has been used for studying conformational fluctuation of proteins. Generally, pressure shifts the equilibrium distribution of relative conformers through volume differences among them and also changes the rates of transitions through activation volumes, giving changes in NMR spectra. Therefore, variable pressure NMR allows one to explore protein dynamics in a wider conformational space and timescale [1-3]. So far, we have shown structural characteristics of semi-stable conformations of many globular proteins, and suggested a functional relevance of them [1-3].

The present paper proposes variable pressure NMR for detecting and analyzing slow conformational transitions in proteins (ubiquitin and D1 domain of annexin 1 [4]). The conformational transition of the proteins was clearly detected as NMR measurements were carried out under high pressure. It is considered that pressure significantly retards the conformational transition of the protein and domain because pressure increases the relative population of the semi-stable conformation and the activation volume is positive for the transitions. Therefore, in general, the detection of intermediate-to-slow time scale motions in proteins would become much easier with increasing pressure.

### Introduction

分子認識やシグナル伝達、アロステリック制御など蛋白質の機能は、マイクロ秒～ミリ秒でおきるその立体構造変化と密接に関係する。NMR法は、立体構造解析のみならず、幅広い時間域で生じる蛋白質の構造変化を原子レベルで検出できる方法論としても有効である。例えば、マイクロ秒～ミリ秒の蛋白質の運動は、NMRスペクトルのピーク線幅、すなわち横緩和時間の変化として敏感に検出できるし、ミリ秒より十分遅い運動は、異なる信号として別々に検出できる。しかし、一般に生理的条件下(常温・常圧)においては、自由エネルギー的に不安定で“マイナー”な構造は、分光学的に捉えることが困難である。これは、状態間の自由エネルギー差と分布率とは指数関数で結ばれるため、状態間のわずかな自由エネルギーの差が、大きな分布率の差をもたらすためである。可変圧力NMR法では、加圧により効果的に分布率或いは化学交換速度を変え、スペクトル解析することが可能である[1-3]。膜結合蛋白質であるアネクシン 1 のD1 ドメイン(81 残基)とユビキチン(76 残基)について、分布率及び構造転移速度に対する圧力効果と、<sup>15</sup>N relaxation dispersion NMR 法から得られた解析結果との比較について議論する。

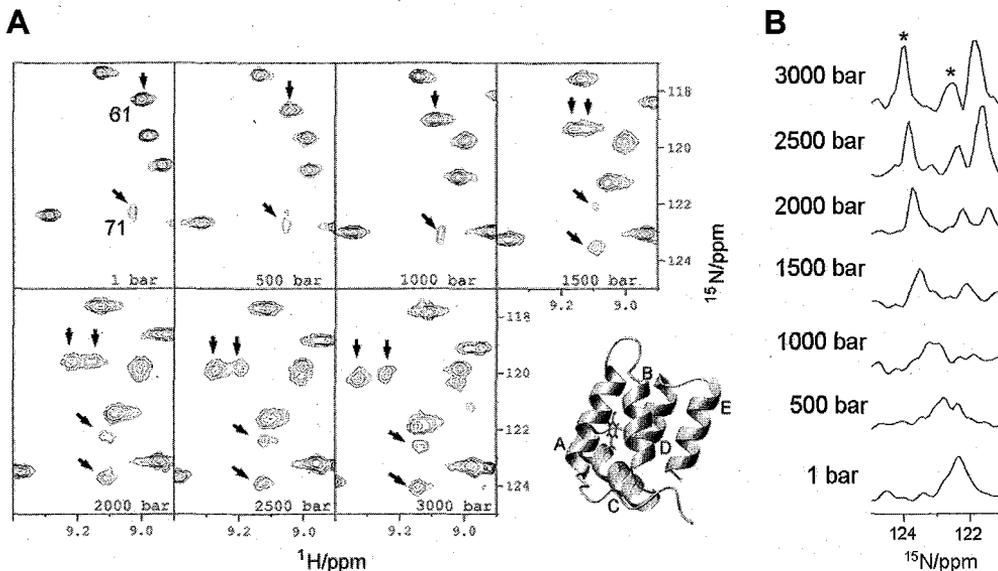
キーワード: 圧力、ダイナミクス、蛋白質、緩和、遅い揺らぎ

きたはらりょう、クリスチャン・ルーマスタンド、カリーナ・ファンノールト、あかさかかずゆき

## Results & Discussions 1

膜結合蛋白質であるアネクシン1のD1ドメイン(A1D1)について、1-3000気圧の圧力下で2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  HSQC-NMR測定( $^1\text{H}$ -500, 800 MHz, 293 K, pH 4.4)を行なった。興味深いことに、加圧に伴いに多くのNMR信号の線幅が増加し、窒素軸或いは水素軸で2つに分裂した(図1)。この結果は、このドメインは少なくとも2つの熱力学的に定義できるフォールド状態をもち、その構造転移が加圧とともに遅くなったことを意味する。各圧力について2つの状態の化学シフト値と分布率が直接得られ、外挿により常圧下の値を見積もることができる。窒素軸の信号の分裂は、主にB, D, Eヘリックス(図1)からなる特定の部分で生じていることが分かった。常圧下でのマイナーコンフォメーションの分布率は、どの残基についても約40%程度であった。得られた $\Delta\omega_N$ 値は、常圧下で行なわれた $^{15}\text{N}$  relaxation dispersion NMR法( $^1\text{H}$  500-800 MHz) [4]から得られた値(2状態転移、分布率50%-50%を仮定)と良く一致したことから、2つの測定法が蛋白質の遅い構造揺らぎを検出する方法として妥当である事を示している。ただし、可変圧力NMR法で得られる情報(状態数、分布率、 $\Delta\omega_N$ )を用いることにより、より精度の高い $^{15}\text{N}$  relaxation dispersion NMRデータの解析が可能となる(e.g. res71,  $p_A=57\%$ ,  $p_B=43\%$ ,  $\Delta\omega_N=1.29$  ppm;  $R_{ex}=54$  Hz  $\rightarrow$   $k_{AB}=630$  Hz,  $k_{BA}=830$  Hz,  $\tau_{ex}=0.68$  ms)。

水素軸の信号線幅の増加と分裂は、B, D, Eヘリックス以外ではA, Cヘリックスでも観測された。A, Cヘリックスは、蛋白質内部に存在するTry52からの環電流効果を強く受けているため、線幅への影響は、それらのTry52側鎖芳香環に対する配向が異なるか、Try52側鎖芳香環自身が2つのコンフォメーションを持つことを示している。常圧下のマイナーコンフォメーションの分布率も、窒素軸の結果と同様に約40%であったことから、B, D, Eヘリックスで生じている主鎖コンフォメーション変化は協調して生じていると考えられる。



**Fig. 1** (A) Splitting of HSQC cross-peaks of D1 domain of annexin 1 at  $^1\text{H}$ -800MHz, pH4.4 and 293 K under different pressures. The cross-peak of residue 71 splits in N-axis, while that of residue 61 splits in H-axis with increasing pressure. Three dimensional X-ray structure of the domain is shown in the panel. Tyr52 is drawn by stick. (B) Slice spectra of residue 71 in N-axis under different pressures. Asterisks show major and minor peaks.

## Results & Discussions 2

ユビキチンについて、1-3000 気圧の圧力下で、横緩和測定  $^{15}\text{N}$ -  $R_2$  ( $^1\text{H}$ -800 MHz、pH4.6、293 K)を行なった。常圧下では、Hahn-Echo (single echo) 実験を併せて行なった ( $^1\text{H}$ -400 MHz、pH4.6、293 K)。観測される化学交換の寄与 ( $R_{ex}$ )は、Hahn-Echo 実験 ( $\nu_{\text{CPMG}} \approx 0$  Hz) は最大で、CPMG 実験 ( $\nu_{\text{CPMG}} = 500$  Hz) は最小である。Hahn-Echo  $R_2$  値と CPMG  $R_2$  値の比 ( $R_2^{\text{HE}} / R_2^{\text{CPMG}}$ )をとることにより、化学交換の有無を定性的に議論することができる。常圧下の実験から得られた  $R_2^{\text{HE}} / R_2^{\text{CPMG}}$  値は、 $1.08 \pm 0.03$  (s.t.d) と低い。C末端側領域 (res28, 33, 34, 42, 70, 72, 73) やループ及びターン部分 (res60, 63, 64, 66 など) で  $1.11$  (ave.  $\pm$  s.t.d.) を超える値が観測されたものの、構造の全体に亘り、常圧下では化学交換の寄与は小さかった。

一方、加圧により、C末端側領域 (res28, 33, 34, 39 42, 70) で  $R_2$  値の顕著な増加が生じた (図 2A, B)。この局所的な  $R_2$  値の増加は、それらの部位で  $R_{ex}$  が増加したことを示す。大変興味深いことに、ユビキチン様蛋白質で、ユビキチン同様に翻訳後修飾に関わり、E1-E3 相互作用系を持つ NEDD8[2] や Ufm1[5] では、常圧下でもほぼ同様な部位で  $R_{ex}$  が観測されている。これらの蛋白質のC末端側は、E1 及び E2 との相互作用部位を含んでおり、共通に保存された構造揺らぎが、機能すなわち E1, E2 との相互作用に何らかの役割を果たしていることは容易に想像できる。図 2C, D は、C末端側領域 (res28, 33, 34, 39 42, 70) とその他の部分 (res22, 23, 25) における  $R_2$  値の圧力依存性を示した。C末端領域の残基については、加圧とともに指数関数様に増加傾向が見られた。速い化学交換の場合、その速度定数は、下記のように示される。

$$R_{ex} = P_1 P_2 (\Delta\omega)^2 / (k_{12} + k_{21}) \quad (1),$$

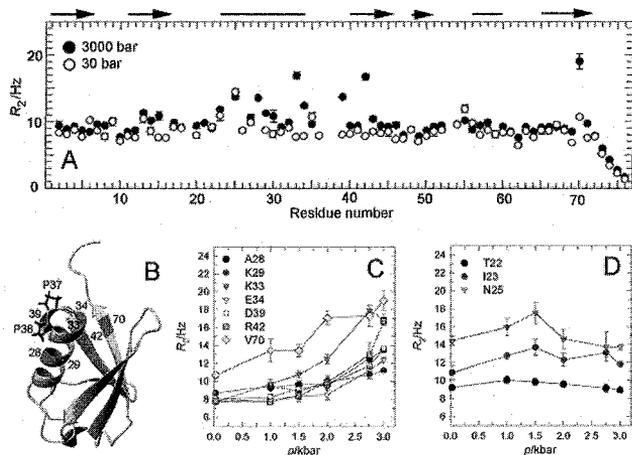
$P_1, P_2$  は分布率、 $\Delta\omega$  は化学シフト差、 $k_{12}, k_{21}$  は状態  $1 \rightarrow 2, 2 \rightarrow 1$  の交換速度定数。また交換速度定数  $k_{12}, k_{21}$  は、それぞれ下記のように表される。

$$k_{12(21)}^p = k_{12(21)}^0 \times \exp(-p\Delta V_{12(21)}^\ddagger / RT) \quad (2),$$

$k_0$  は常圧下での速度定数、 $\Delta V^\ddagger$  は活性化体積。C末端領域の残基については、圧力に対する  $R_{ex}$  値の増加が、ほぼ同様な圧力範囲で生じていることから、協同的な構造変化であることが示唆された。 $R_{ex}$  値の指数関数様の増加は、 $k_{ex} (= k_{12} + k_{21})$  の増加により説明できる。すなわち、 $R_{ex}$  の増加は、加圧による分布率の変化 ( $\Delta G = -RT \ln K = p\Delta V$ ) に加え、正の活性化体積をもつ転移反応 ( $N_2 \rightarrow N_1$  或いは  $N_2 \rightarrow N_1$ ) が遅くなったこと ( $\Delta G^\ddagger = -RT \ln k = p\Delta V^\ddagger$ ) に起因する。

## Conclusion

蛋白質の変性状態からの折れ畳みを含む多くの disorder  $\rightarrow$  order 転移は、正の活性化体積をもつため、加圧下ではその転移速度は低下する。A1D1 では、加圧による信号線幅の増加に続き分裂が観測され、状態数と各状態の分布率、化学シフト値の直接観測が可能となった。ユビキチンでは、加圧による線幅の増加を、CPMG- $R_2$  測定により観測した。何れも常圧下では、検出困難な蛋白質の遅い揺らぎ (マイクロ秒—ミリ秒) を、高圧下で明確に検出した例である。圧力は、部分モル体積の小さな準安定状態の分布率を増加させるとともに、正の活性化体積をもつ disorder  $\rightarrow$  order 転移を遅くすることにより、NMR スペクトルに変化をもたらす。可変圧力 NMR 法は蛋白質の遅い揺らぎを検出する方法として有効である。



**Fig. 2** (A)  $^{15}\text{N}$  spin-spin relaxation rates  $R_2$  measured at 30 bar (open circle) and at 3 kbar (closed circle), at pH 4.6 and 20 °C versus the ubiquitin sequence. The CPMG  $\pi$ -pulse repetition is set to be a 0.9 ms. The  $R_2$  values were obtained for all non-proline residues except for E24 and G53 due to severe line-broadening, for D21 and A28 due to spectral overlap at 30 bar, for E16 and V26 due to spectral overlap at 3 kbar, and for I36 due to signal disappearance at 3 kbar. (B) Residues showing an exponential type increase in  $R_2$  with pressure are colored in black on the three-dimensional NMR structure of ubiquitin (PDB code: 1D3Z). The side-chains of Pro37 and Pro38 are drawn with black sticks. (C)  $R_2$  pressure dependence for residues 28, 29, 33, 34, 39, 42 and 70. (D)  $R_2$  pressure dependence for residues 22, 23 and 25. Except for residues previously mentioned, a similar pattern was observed for most residues in ubiquitin.

## References

- [1] Ryo Kitahara, Shigeyuki Yokoyama and Kazuyuki Akasaka, NMR snapshots of a fluctuating protein structure. Ubiquitin at 30 bar-3 kbar, *J. Mol. Biol.* 347, 277-285 (2005).
- [2] Ryo Kitahara, Yoshiki Yamaguchi, Eri Sakata, Takeshi Kasuya, Keiji Tanaka, Koichi Kato, Shigeyuki Yokoyama, Kazuyuki Akasaka, Evolutionally conserved intermediates between ubiquitin and NEDD8, *J. Mol. Biol.* 363, 395-404 (2006).
- [3] Kazuyuki Akasaka, Probing conformational fluctuation of proteins by pressure perturbation, *Chem. Rev.* 106, 1814-1835 (2006).
- [4] Matthieu Gallopin, Analyse par RMN et dichroïsme circulaire de la dynamique, de la stabilité et du repliement du domaine 1 de l'annexine 1 humaine, Ph D thesis, Université Paris XI (2007).
- [5] Sasakawa, H., Sakata, E., Yamaguchi, Y., Komatsu, M., Tatsumi, K., Kominami, E., Tanaka, K., and Kato, K, Solution structure and dynamics of Ufm1. a ubiquitin-fold modifier 1, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 343, 21-26 (2006).

1L5 統合管理型 NMR データ解析ソフトウェア KUJIRA による高度に自動化された溶液タンパク質 NMR シグナルの帰属システム

(1 理研 GSC、2 東工大・院総理工、3 東大・院理)

○小林直宏<sup>1</sup>、梶尾尚哉<sup>1</sup>、富沢忠<sup>1</sup>、小柴生造<sup>1</sup>、木川隆則<sup>1,2</sup>、横山茂之<sup>1,3</sup>

The highly automated assignment system of KUJIRA, the integrated software package of modules for NMR analysis

Naohiro Kobayashi<sup>1</sup>, Naoya Tochio<sup>1</sup>, Tadashi Tomizawa<sup>1</sup>, Seizo Koshiba<sup>1</sup>, Takanori Kigawa<sup>1,2</sup> and Shigeyuki Yokoyama<sup>1,3</sup>

1RIKEN Genomic Sciences Center, Yokohama 230-0045, Japan

2Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8502, Japan

3University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

Until now, a lot of algorithms, programs and softwares have been developed for the automated analysis of solution NMR. Together with the development of the database for protein structure and chemical shifts and other NMR related data, it would be in the not far distance future that the programs automatically analyze the new protein sample or confirm the reproducibility of the analysis. As of this fiscal year, our research group has determined more than 1200 protein structures by NMR techniques, as a part of the RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI) for the "Protein 3000" Project. In almost all the structure studies, our software KUJIRA [1], a package of integrated modules for systematic and interactive analysis of NMR data, was used. In the presentation, new functions that we have developed for highly automated analysis of solution NMR will be shown.

1. はじめに

今日まで溶液 NMR のデータ解析を自動化することを目的としたアルゴリズムあるいはプログラム、ソフトウェアが数多く開発されてきた。これら自動化された解析プログラムの高度化により新規に解析されるタンパク質の効率化が図られるばかりでなく、インターネット上でのデータベースの発達等により既存の NMR データの再現性等を完全自動的に検証できるプログラムが登場し、活躍する時代も遠い将来の

キーワード：主鎖シグナル、側鎖シグナル、自動帰属、ゲノムプロジェクト

著者：こばやし なおひろ、とちお なおや、とみざわ ただし、こしば せいぞう、きがわ たかのり、よこやま しげゆき

話ではなくなるかもしれない。

一方で近年のポストゲノム時代におけるタンパク質の溶液 NMR による解析ではスペクトル実験方法の多様化や、同時並行で行なわれる分子生物学的研究などの要請もあり、NMR 研究者一人が負担すべき NMR データ解析のための時間はますますシビアなものとなりつつある。現在最も重要となる解析の行程は NMR シグナルの帰属であるが、この部分を高速、かつ高精度に効率化する自動化技術に対する要望は年々増している。

昨年度までに理研におけるタンパク 3000 プロジェクトにより決定された NMR 構造は優に 1200 個を超え、そのほぼ全解析過程に我々が独自に開発した統合管理型 NMR データ解析ソフトウェアである KIJIRA [1] が利用された。本発表においては、最近我々が開発し KIJIRA に搭載した、NMR データプロセスのための NMRPipe マクロの自動作成、ピーク検出からスタートする主鎖および側鎖シグナル完全自動化機能、化学シフトの最適化機能について NMR シグナル帰属を完全自動化することを目標とした新機能群について説明する。

## 2. 自動解析システムの構成

”NMRPipe スクリプト自動作成モジュール”はサーバー上にある NMR スペクトルの測定データを自動的に探索する。現時点では Bruker 社製の NMR 装置のデータ構造に対応するようプログラムされている。測定データに用いられたパルスプログラムごとに用意されたテンプレートを元に、データ処理に必要なパラメータ群と共にマクロファイルが自動作成される。

”主鎖シグナル自動解析モジュール”は用意された主鎖帰属用のスペクトル群を調査し、実行される自動帰属スキームを構築する。2 次元、あるいは 3 次元スペクトル群に対して自動ピーク検出を行ない、全スペクトルのピーク群を得る。得られたピーク群に対してニューラルネットによるピー

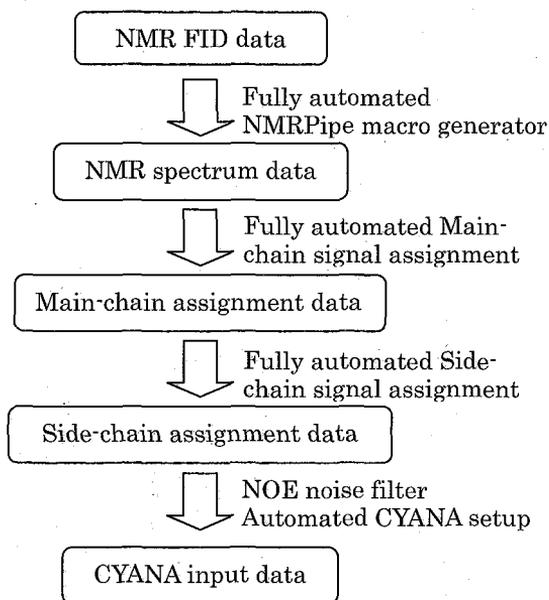


Fig. 1: Schematic representations of the highly automated NMR data analysis and the related modules in KIJIRA

クの信頼度の検定を行ない、ピーク群のクラスタリング、および主鎖シグナル連鎖帰属に必要な  $C\alpha(i)$ 、 $C\alpha(i-1)$ シグナル等の化学シフト値の決定、 $C\alpha/C\beta$ シグナル化学シフト値によるアミノ酸タイプの同定を行なう。 $C(CO)NH$  が利用可能である場合のみ、アミノ酸タイプの同定には後述のニューラルネットによるパターン認識法を併用する。側鎖シグナルの帰属は3D HCCH-TOCSY および3D  $^{13}C$ -edited NOESY スペクトル上に出現するピーク群に対して、既に決定された主鎖帰属データを元に側鎖方向へのシグナルパターンを進展させていく方法により実現する。帰属されたシグナルは3D  $^{15}N$ -edited NOESY および3D  $^{13}C$ -edited NOESY スペクトルより自動検出後にクラスタリングされたピーク群を元に化学シフト値が自動的に微調整される。微調整後にそれら3次元スペクトルの2次元プロジェクションをマスクデータとするノイズフィルターを実行し、CYANA 計算に必要な NMR データ群を自動的にセットアップする。

### 3. シグナル帰属自動化アルゴリズム

KUJIRA には3層型の誤差逆伝播法により学習させることが可能なニューラルネットを構築するサブルーチンを内蔵している。ピークの信頼度検定では検出されたピーク群の周囲におけるピークの混み具合などのスペクトル上での状況をパラメータ化し、ピークとしての真偽を判断させる。実際の判定精度は60-70%程度であるが、他のパラメータと組み合わせることで高い精度で主鎖帰属のためのシグナル同定に役立てることができる。

$C(CO)NH$  を利用したアミノ酸タイプ同定には  $C(CO)NH$  および  $CBCA(CO)NH$  スペクトルより入力用の合成スペクトルデータセットを作成する。作成されたデータ

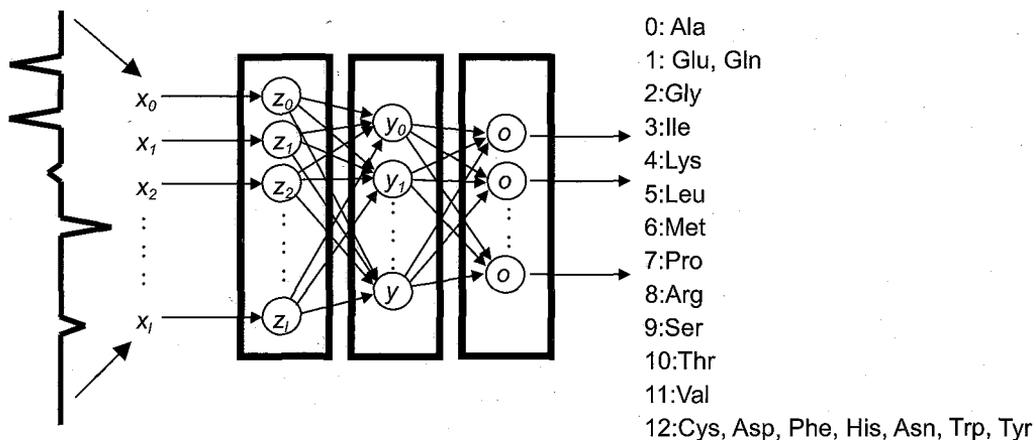


Fig.2. Three layer forward neural network for the amino acid type recognition from the generated input data set. The input data sets,  $x_i$ , are derived from  $C(CO)NH$  and  $CBCA(CO)NH$  spectrum data sets.

セットを入力とし誤差逆伝播法により学習させた 3 層型ニューラルネットによりアミノ酸タイプを 13 のタイプとして認識する。認識の精度は 70-80%程度であるが上述のピークの信頼度検定などのパラメータ群とともに用いることで主鎖帰属のためのシグナル同定を高精度に実行することができる。

主鎖シグナルの自動連鎖帰属においては以下に示すペナルティー関数を用いたアニーリング計算を使用する。

$$P_{ID} = \sum_{j=1}^N (1 - \sum_{i=1}^M a_{i,j})^2 \quad P_{RN} = \sum_{i=1}^M (1 - \sum_{j=1}^N a_{i,j})^2 \quad P_{RT} = \sum_{i=2}^N \sum_{j=1}^M a_{i,j} s_{i,j} + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^M a_{i,j} i_{i,j}$$

$$P_{CN} = \sum_{i=2}^N \prod_{j=1, j \neq k}^M \prod_{k=1, k \neq j}^M (1 - a_{i-1,k} a_{i,j} c_{j,k})$$

$$P_{total} = k_{ID} P_{ID} + k_{RN} P_{RN} + k_{RT} P_{RT} + k_{CN} P_{CN}$$

$$\begin{cases} K = \exp\{-(P_1 - P_0)/k_B T\} & (P_1 - P_0) > 0.0 \\ K = 1.0 & (P_1 - P_0) \leq 0.0 \end{cases}$$

各残基における  $H_N$ - $N\alpha$  相関ピークごとに用意されたピーク ID,  $i$  に対して帰属される残基番号  $j$  に対応する帰属行列  $a_{ij}$  を定義する。各ピーク ID に対して 1 つの帰属が成立した場合 0 になる関数  $P_{ID}$ 、各残基番号に 1 つのピーク ID が帰属された場合 0 になる関数  $P_{RN}$ 、sequential および intra-residual の  $C\alpha$ 、 $C\beta$  シグナルにより決定されるアミノ酸タイプ決定確率  $s_{ij}$  および  $i_{ij}$  を用いアミノ酸タイプの適合性により決定される関数  $P_{RT}$ 、ピーク ID 同士が連結できる条件により決定される関数  $P_{CN}$  により、それぞれ重み係数を掛けて合算させた  $P_{total}$  を計算する。 $P_{total}$  をペナルティー関数としたメトロポリス基準  $K$  によるアニーリングを実行し、最終的な帰属行列を得る。このアニーリング法による連鎖帰属法では従来取り扱いが困難であったマイナーピークの混在、化学交換等により同定できないピーク ID の存在による帰属結果の影響が少ないため重大な帰属ミスを生じる危険性が低くなる。

ソフトウェア KUJIRA の入手先:

kujira@jota.gsc.riken.go.jp

<http://www.protein.gsc.riken.jp/Concept/kujira.html> (under construction)

[1] KUJIRA, a package of integrated modules for systematic and interactive analysis of NMR data directed to high-throughput NMR structure studies. Kobayashi, N, Iwahara, J., Koshiha, S., Tomizawa, T., Tochio, N., Güntert, P., Kigawa, T. and Yokoyama, S. *J. Biomol NMR* (2007) in press.

## Dynamics based drug discovery – プリオン病治療薬開発への応用

<sup>1</sup>岐阜大学人獣感染防御研究センター、<sup>2</sup>長崎大学大学院医歯薬学総合研究科、<sup>3</sup>福岡大学薬学部

○桑田一夫<sup>1</sup>、鎌足雄司<sup>1</sup>、松本知治<sup>1</sup>、西田教行<sup>2</sup>、武藤（細川）淳二<sup>1</sup>、児玉耕太<sup>3</sup>、中村寛則<sup>1</sup>、早野陽介<sup>1</sup>

## Dynamics based drug discovery – application to prion diseases

<sup>1</sup>Center for Emerging Infectious Diseases (CEID), Gifu University, <sup>2</sup>Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, <sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Kazuo Kuwata<sup>1</sup>, Yuji O. Kamatari<sup>1</sup>, Tomoharu Matsumoto<sup>1</sup>, Noriyuki Nishida<sup>2</sup>, Junji-Hosokawa Muto<sup>1</sup>, Kota Kodama<sup>3</sup>, Hironori Nakamura<sup>1</sup>, Yousuke Hayano<sup>1</sup>

Prion proteins are key molecules in transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), but the precise mechanism of the conversion from the cellular form (PrP<sup>C</sup>) to the scrapie form (PrP<sup>Sc</sup>) is still unknown. We previously uncovered slowly fluctuating residues in PrP<sup>C</sup> distributed diffusely at B & C helices using high pressure NMR and CPMG relaxation dispersion measurements. Applying a dynamics-based drug design (DBDD) strategy, we discovered a compound GN8 efficiently reduced PrP<sup>Sc</sup> in a TSE-infected cell culture model. Subsequently, administration of GN8 was found to prolong the survival of TSE-infected mice. Heteronuclear NMR showed that the critical binding sites include A-S2 loop (N159), helix B (V189, T192 and K194) and B-C loop, indicating that the intercalation between the A-S2 loop and the B-C loop hampers the pathogenic conversion process. Our results demonstrate that the pathogenic conversion is a rare event emanated from the slow conformational fluctuation occurring around the hot spots in PrP<sup>C</sup>. Furthermore, DBDD focusing on the hot spots of PrP<sup>C</sup> will open the way to the development of novel anti-prion drugs.

## はじめに

タンパク質におけるマイクロ秒からミリ秒のタイムスケールで観測される遅い揺らぎの機能的な或いは病原的な役割に関しては、その本態があまりよく分

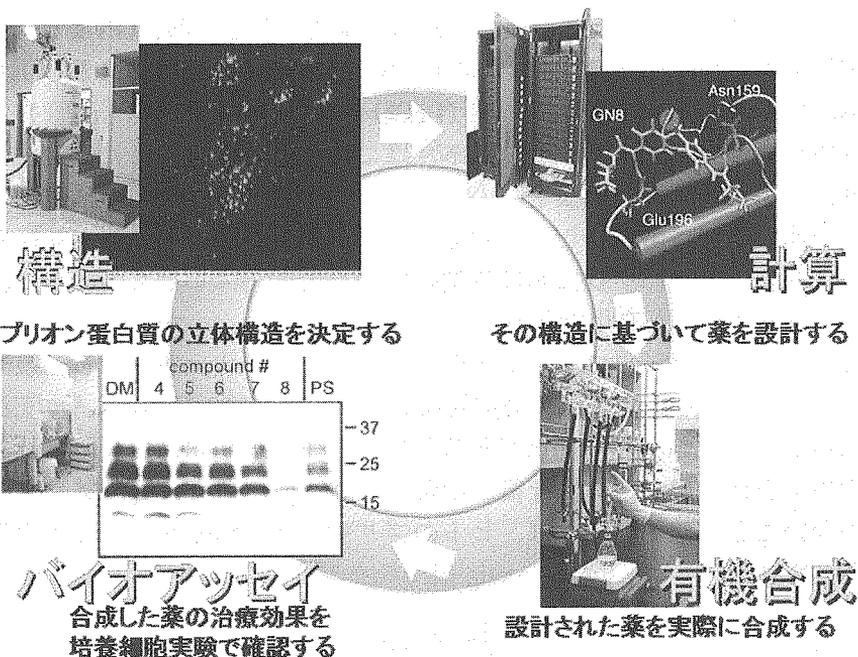
かっていない。これから考察するプリオンタンパク質では、変性状態から天然状態への巻き戻り時間が、100 $\mu$ 秒程度であり、遅い揺らぎの時間内に、タンパク質が変性したり、巻き戻ったりすることも可能である。

実際の観測では、遅い揺らぎは、特定の残基に見られる。プリオンタンパク質のHSQCでは、これらの残基のピークが極めて小さいか、或いは分裂している。これらのピークは主にミリ秒のオーダーに近い揺らぎを行っており、短い $\beta$ シートのセグメントに分布していた。これに対し、マイクロ秒のオーダーで揺らいでいる残基は、CPMG緩和時間分散法により測定可能であったが、プリオンの主要な結合ポケットの周辺に位置していた。

これらの遅い揺らぎを行っている残基は、タンパク質の機能や病原性に、深い関わりを有しているのだろうか？（文献1参照）。

## 1. 論理的創薬法とは？

論理的創薬法とは蛋白質のコンフォーメーション（立体構造）及びダイナミクス（動き）情報に基づいて、コンフォーメーションを制御する低分子化合物をデザインし、開発するための方法論的基盤のことである。特に、蛋白質の天然立体構造が崩壊し異常立体構造に転換することにより生ずるプリオン病のような病気に対して特に有効であろう、と考えられる。



論理的創薬法は、上図に示すように、4つの工程より成る。(1) X線回折法、NMR法により、標的タンパク質の立体構造を決定し、ダイナミクスに関する情報を収集する。(2) 立体構造やダイナミクス情報に基づいて、低分子化合物を計算機シミュレーションにより、設計・デザインする。(3) 設計された低分子化合物を有機合成する。(4) 有機合成された化合物を、疾患モデル細胞に投与し、その効果を検証する。更に、動物実験によりその効果を確認する。有効であれば、(1)に戻り、化合物と標的タンパク質との複合体構造を明らかにする。

(2)ではその複合体構造に基づいて、低分子化合物の化学構造を最適化する。このように、これら4つの工程を、ベルトコンベアーのように繰り返すことにより、さらに最適化された化合物の創製が可能となる。

## 2. 抗プリオン物質開発への応用

我々は、この論理的創薬法を実際にプリオン病に応用した(文献2参照)。まず(1)プリオンタンパク質において、マイクロ秒のオーダーで揺らいでいる部位が正常プリオンの分子構造の中で異常化しやすい部位であることに着目した。(2)そこでこの部位を保護する低分子有機化合物(GN8)をコンピュータで設計した。(3)さらに、GN8及びその類縁体を有機合成した。(4)細胞培養実験、及び感染動物治療実験において、GN8を異常プリオンに感染したマウスに投与したところ治療効果が見られ、投与期間を長くすると生存期間も延長された。さらに(1)に戻り、複合体構造を確認したところ、GN8の特徴的な結合部位が明らかになった。すなわちGN8が水素結合するN159及びE196間の距離は、正常プリオンタンパク質(PrP<sup>C</sup>)では15Åである。一方、異常プリオン(PrP<sup>Sc</sup>)では45Åと広がる。GN8はこれらの距離を15Åに固定することにより、異常型への構造変換を防いでいるのであろう、と考えられる。このように、一連の研究により得られた知見は、プリオン病治療薬の基本骨格のみでなく、プリオンタンパク質における創薬標的を明らかにしたものであり、今後の新規治療薬開発にも有用である。

これまで人のクロイツフェルト・ヤコブ病等のプリオン病に対し、幾つかの治療薬候補が試みられてきたが決定的なものはまだない。GN8は、皮下注射でも脳に運ばれやすいなどの利点があるため、現在はより効果を高められる細部の化学構造を検討中である。今後、前臨床試験、臨床研究、臨床試験などで副作用のないことが確認できれば、ヒトのプリオン病の治療薬として実用化できると期待される。

## 3. コンフォーメーションの制御可能性

プリオン病のみでなく、タンパク質のコンフォーメーション変化が原因とな

って起きる病気は多い。例えば、アルツハイマー病などの神経変性疾患、がん、糖尿病など、従来の手法では、根本的な治療が難しい疾患がほとんどである。これらの疾患に関与するタンパク質もかなり同定されており、立体構造が既に解明されているものもある。論理的創薬法は、これらの疾患に対する有効な治療薬の創製に寄与できる可能性がある。

プリオンの論理的創薬研究により、今まで全く不明であったプリオンの構造変換機構に対し、ヒントを与えることができた。N159とE196間のような離れたアミノ酸残基を架橋することにより、コンフォーメーションの揺らぎやその変化を抑え、結果として異常構造への変換反応が抑制できる、ということがわかった。この事実は、GN8のような低分子化合物の創製により初めて明らかとなったのであり、単にプリオンタンパク質そのものを観測していても、多分、分からなかったのではないかとと思われる。

タンパク質は、典型的な複雑系であり、溶液中に浮遊しているその姿を、単に観測しても、その生理機能を理解するには限界がある。タンパク質のダイナミクスを制御するため、戦略的に設計された低分子化合物を有機合成し、タンパク質に送り込むことにより、その振る舞いの違いを構造生物学的及び生物学的に評価することにより、逆にタンパク質の機能が明らかになる可能性がある。自動車を道路から眺めていてもその機能を理解するのは難しいが、中に入って運転してみるとよく理解できるのと似ている。

論理的創薬は、このような低分子化合物によるタンパク質のダイナミクスの制御を行う。タンパク質のダイナミクスを自在に制御することによりその生理機能や病原性を理解するとともに、異常な病態に対しては、分子レベルでの正しい治療を行うことが今後可能になると考えられる。また、生命のような複雑系では、観測による解析（守りのサイエンス）のみではその理解は困難であり、構造やダイナミクスに基づく積極的な制御（攻め）を行うことにより、観測者の関与も含めたより具体的な理解が可能となるのではないだろうか。

#### 文献

1. 桑田一夫、素数とプリオン、数理科学、499、45-53、2005
2. Kazuo Kuwata et al., Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 11921-11926 (2007)

プリオン、論理的創薬、ダイナミクス、in silico スクリーニング、有機合成

くわたかずお

(国立環境研<sup>1</sup>, ミネソタ大学<sup>2</sup>) ○三森文行<sup>1</sup>, 渡邊英宏<sup>1</sup>, 高屋展宏<sup>1</sup>,  
Michael Garwood<sup>2</sup>

### Imaging ferritin molecule in human brain

(National Institute for Environmental Studies<sup>1</sup>, Minnesota University<sup>2</sup>)

F.Mitsumori<sup>1</sup>, H.Watanabe<sup>1</sup>, N.Takaya<sup>1</sup>, Michael Garwood<sup>2</sup>

We measured accurate  $T_2^\dagger$  values in various regions of human brain in vivo at 4.7T using a multi-echo adiabatic spin echo (MASE) sequence. The obtained transverse relaxation rate ( $1/T_2^\dagger$ ) is linearly correlated with published levels of non-haemin iron concentrations, [Fe] with  $r = 0.97$ . Furthermore, the linear coefficient obtained at 4.7T with those reported at six different static fields ( $B_0$ ) demonstrated a strong linear dependence on  $B_0$  ( $r = 0.99$ ) suggesting superparamagnetism of ferritin iron as a predominant source of the transverse relaxation of the water molecule in human brain. Ferritin iron mapping was attempted based on the obtained relationship between  $1/T_2^\dagger$  and [Fe].

【はじめに】フェリチンは24個のポリペプチド(分子量~450,000)からなる外殻と最大4000個にも及ぶ3価鉄イオンのポリマーからなるコアを有する巨大タンパク質であり、生体において鉄の貯蔵、調節に係わる機能を有することが知られている。一方、ヒト脳内におけるフェリチン鉄は出生直後には皆無で、成長に伴って20~30歳代まで増大することから、脳の発達・形成に何らかの関与をすると考えられている。また、Parkinson病をはじめとする脳変性疾患では、大脳基底核や黒質部位におけるフェリチン鉄の増大が認められ、これらの疾患の発症との関わり、診断の可能性から興味が持たれている。しかし、分子の巨大さ故、生体内においては構造はおろか、その存在も脳組織を切り出した後にはじめて分析できる状態である。我々は平成17年度の本大会において断熱RFパルスを用いるMASE法を提案し、脳内の見かけの $T_2$  ( $T_2^\dagger$ ) を正確に測定できることを示し、脳内各部位の $T_2^\dagger$ が鉄と相関することを示した。今回の報告では、さらに解析を進め、得られた横緩和速度 $R_2^\dagger$  ( $= 1/T_2^\dagger$ )から脳内白質部のフェリチン濃度を定量的に評価できることを示す。

【方法】MRI測定にはOxford Magnet Technology社の4.7T磁石(ボア径925mm)を接続したVarian Inova分光計を用いた。信号検出器は口径30cmの頭部用<sup>1</sup>H TEM型検出器を用いた。国立環境研究所医学研究倫理審査委員会の認めた健常被験者についてMRI測定を実施し、全頭の3次元MDEFT画像、高速スピンエコー画像、 $T_1$ ,  $T_2$ 分布画像等の測定を行った。 $T_2^\dagger$ の測定に用いるMASE (multi-echo adiabatic spin echo)法については一昨年の学会で報告した[1]。測定には7msのhyperbolic secant型の180°パルスを2個用いて偶数番目のエコーのみを収集し、1回の励起で6エコーを測定した。パルス繰り返し時間は4秒、最小のエコー間隔(echo spacing)は13ms、エコータイム(TE)は26~156msである。

【結果と考察】12名の男女被験者(男性6名, 28-55歳, mean±SD; 48.3±10歳, 女性6名, 26-57歳, mean±SD; 42.3±12歳)から得た脳組織 $T_2^\dagger$ 値は38~69msと部位により大きく異なり、鉄が多いとされる淡蒼球で最も短い。各部位の横緩和速度( $= 1/T_2^\dagger$ )を対応する部位の非ヘム鉄濃度[R2]と対比すると、図1に示すきわめて高い1次の相関関係が得られた。この相関関係は

$$1/T_2^\dagger \text{ (s}^{-1}\text{)} = 0.551 [\text{Fe}] \text{ (mg/100 g fresh wt.)} + 14.1 \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

と表され、その相関係数 $r = 0.97$ であった。これまでも、より低磁場の測定で同様の関連が指摘されているが、傾きの大きさ、相関係数ともに今回得られた値が最大のものである。こ

キーワード：フェリチン、脳、 $T_2^\dagger$ 緩和時間、高磁場MRI、分子イメージング

みつもり ふみゆき、わたなべ ひでひろ、たかや のぶひろ、まいける がうっど

れは、単位量あたりの鉄の横緩和効果が高磁場により増進していること、MASE法により正確な横緩和速度が得られていることによると考えられる。

鉄の横緩和効果の磁場依存性を調べるために、これまで *in vitro* で得られた結果との比較を行った。上記の非ヘム鉄濃度と横緩和速度の相関の大きさを表す係数を  $k_2$  とし、0.05~1.5T の6点の磁場強度で得られた  $k_2$  値 [3] を  $B_0$  に対してプロットした結果を図2にあげる。同図に我々が今回得た4.7Tでの測定値をプロットすると、より低磁場で得られた6点ときれいな直線関係を示し、 $k_2$  値が  $B_0$  に対して一次の依存性があることが明らかである ( $r=0.99$ ) [4]。赤血球内のヘモグロビン鉄が示す横緩和効果は  $B_0$  に対して二次の依存性を示すことが知られており [5]、ここで得られた一次の依存性は、超常磁性を有するフェリチン鉄が示す磁場依存性と一致する [6]。

横緩和速度と非ヘム鉄濃度のきわめて高い相関および一次の磁場依存性より、得られた  $T_2^\dagger$  を用いて脳皮質のフェリチン鉄濃度を推定することが可能であると考えられる。式1を用いて  $T_2^\dagger$  マップより計算したフェリチン鉄濃度マップの1例を図3に示す。

【結語】4.7T高磁場MRIによりヒト脳で測定された横緩和速度は局所非ヘム鉄濃度と高い相関を示し、その磁場依存性からフェリチンの超常磁性鉄が主として寄与している。脳の横緩和速度より、脳内フェリチンマッピングが可能である。

【参考文献】

- [1] F.Mitsumori, H.Watanabe, N.Takaya, M.Garwood: The 1st Asia-Pacific NMR Symposium, BLS12 (2005).
- [2] B.Hallgren, P.Sourander: J. Neurochem., 3, 41-51 (1958).
- [3] J.Vymazal, R.A.Brooks, C.Baumgarner, V.Tran, D.Katz, J.W.M.Bulte, E.R.Bauminger, G.D.Chiro: Magn. Reson. Med., 35, 56-61 (1996).
- [4] F.Mitsumori, H.Watanabe, N.Takaya, M.Garwood: Magn.Reson.Med., in press.
- [5] K.R.Thulborn, J.C.Waterton, P.M.Matthews, G.K.Radda. Biochim. Biophys. Acta, 714, 265-270 (1982).
- [6] A.Bizzi, R.A.Brooks, A.Brunetti, J.M.Hill, J.R.Alger, R.S.Miletich, T.L.Francavilla, G.D.Chiro: Radiology, 177, 59-65 (1990).

Fig.3. Ferritin iron mapping in the human brain calculated from  $T_2^\dagger$  map using equation 1.

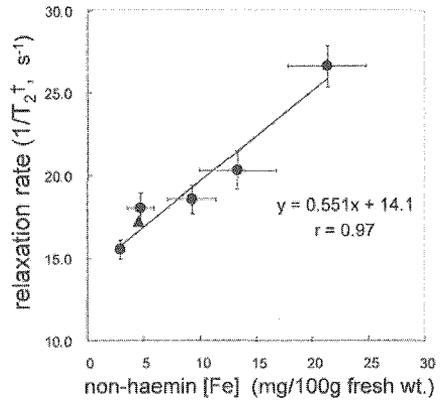


Fig.1. Correlation between  $1/T_2^\dagger$  in five GM regions in human brain and the non-haemin iron concentration [Fe] reported in [2].

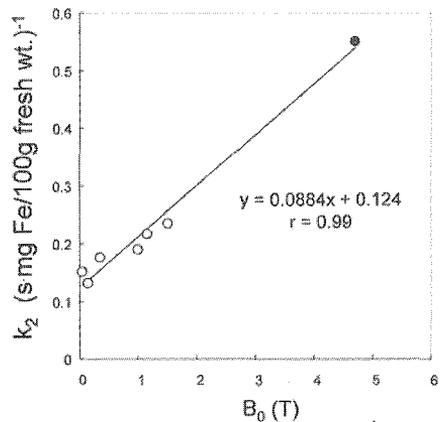
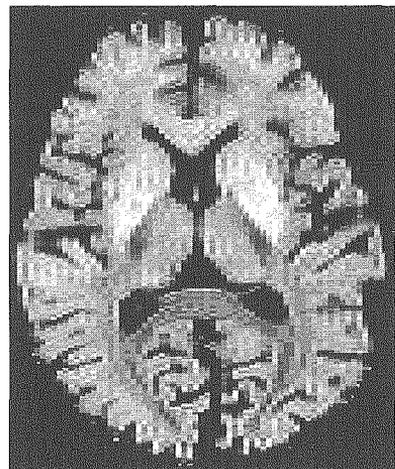


Fig.2. Linear coefficient ( $k_2$ ) of  $1/T_2^\dagger$  vs. the Fe concentration obtained at 4.7T *in vivo* (closed circle) plotted with six  $k_2$  values (open circle) obtained *in vitro* [3] against  $B_0$  where the measurement was performed.





Day 2: 12 September, Wednesday

(English session)

Detecting early tumour responses to therapy using magnetic resonance imaging  
and hyperpolarized spectroscopy

Kevin M. Brindle

Department of Biochemistry, University of Cambridge, Tennis Court Road,  
Cambridge CB2 1GA and Cancer Research UK Cambridge Research Institute  
Li Ka Shing Centre, Robinson Way, Cambridge CB2 0RE

We have been developing non-invasive and clinically applicable magnetic resonance-based methods for detecting the early responses of tumours to therapy. A primary focus has been on the development of methods for detecting tumour cell death, since the level of tumour cell death immediately after drug treatment has been shown, in preclinical and clinical studies, to be a good prognostic indicator for treatment outcome. Thus an oncologist may get an indication of whether a particular drug is working very early during treatment, possibly within 24-48 hours, and long before there is any evidence of tumour shrinkage.

The primary focus of our work has been the development of a targeted MRI contrast agent that binds to dying cells and recent progress with this agent will be described.

More recently, we have started to work with dynamic nuclear polarization (DNP) of  $^{13}\text{C}$ -labelled cell substrates, which offers gains in sensitivity of more than  $10^4$ -fold, allowing sub second acquisition of  $^{13}\text{C}$  spectral data *in vivo*. Using DNP MRSI we have studied the metabolism of hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$  pyruvate in an EL-4 lymphoma cells and in implanted EL-4 tumors, before and after treatment with the chemotherapeutic drug, etoposide. There was a significant reduction in lactate dehydrogenase-catalyzed exchange of  $^{13}\text{C}$  label between pyruvate and lactate in tumors 24 h after drug treatment. Images of intratumoral  $^{13}\text{C}$  pyruvate and  $^{13}\text{C}$  lactate showed a marked reduction in intensity in lactate/pyruvate ratiometric images. The decrease in exchange can be explained by a reduction in the lactate concentration in the tumor, a reduction in cellularity, and possibly decreases in intracellular coenzyme (NAD(H)) and lactate dehydrogenase concentrations. The absence of any background  $^{13}\text{C}$  signal means that specific images of enzyme activity can be acquired. The lack of ionizing radiation, the use of an endogenous metabolite and a single imaging modality makes DNP  $^{13}\text{C}$  MRI an attractive potential tool for imaging the early responses of tumours to treatment in the clinic.

C2A conjugated a paramagnetic probe

↳ PS specific. (apoptosis specific)

bioRxiv: C2A / Avdir. Ed.

## **New NMR Approaches to Protein – Carbohydrate Interactions**

James H. Prestegard

*Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens GA 30602, USA*

[jpresteg@ccrc.uga.edu](mailto:jpresteg@ccrc.uga.edu)

Carbohydrates found at the surfaces of cells in the form of glycoproteins, glycolipids, and glycosaminoglycans are primary mediators of communication between a cell and its environment. The proteins that recognize these cell-surface carbohydrates play roles in inflammation, cell migration, signaling, and pathogen invasion. It is clear that a structural understanding of the interactions between protein and carbohydrate will be important to our ability to combat disease. NMR can play a role in providing this structural understanding, but there are many challenges to overcome. The proteins are often large and themselves glycosylated. The carbohydrates can be complex and present spectra that are difficult to resolve.

New approaches to resonance assignment and structure determination will be presented. Isotopically labeled forms of glycosylated proteins are most conveniently produced by expression in eukaryotic hosts using selectively labeled amino acids. The resulting sparse labeling requires new assignment strategies and new sources of structural data for these proteins. The assignment strategy is based on correlation of amide proton for amide deuteron exchange in the folded protein and in sequenced peptides derived from the protein. Structural data comes from resonance perturbation by ligands and tags containing paramagnetic sites, as well as orientation data from residual dipolar couplings. Isotopically labeled forms of carbohydrate ligands are produced using specialized synthetic strategies. Structural data on bound ligand geometry then comes from a combination of paramagnetic perturbation and orientational data drawn from residual dipolar couplings and chemical shift anisotropy offsets.

Illustrations of the new methods will be drawn from work on donor and acceptor ligands interacting with the glycosyltransferase, ST6Gal1, work on galactose terminated ligands interacting with the mammalian lectin, Galectin-3, and glycosaminoglycans interacting with the chemokine, CCL5. Each of these systems presents different problems in terms of protein production, extraction of data on just the bound state of the ligands, and introducing isotopic labels into complex carbohydrate products.

ST6Gal

MW - 36 kDa + 4 kDa ?

150-F

29 consecuo sequales

Glycosylated (2)

NVS

NTT

CMP-carbox TLEPO

13C acetyl

NH<sub>2</sub>CO Cl<sub>3</sub>

2L3

## Indirect detected $^{14}\text{N}$ NMR of solids under MAS

Zhehong Gan

*National High Magnetic Field Laboratory, Tallahassee, FL 32312*

gan@magnet.fsu.edu

Nitrogen atom constitutes one of the most important elements in organic, inorganic and biological molecules and there are great interests in  $^{14}\text{N}$  NMR for this highly abundant isotope and for the capability of measuring electric-field-gradient (EFG) not accessible by conventional  $^{15}\text{N}$  NMR. This talk presents recent works on indirect detected  $^{14}\text{N}$  NMR of solids under magic-angle spinning (MAS) condition. Indirect detection via sensitive spin-1/2 nuclei like  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  under MAS greatly enhances the sensitivity and resolution for  $^{14}\text{N}$  NMR, and it opens up new opportunities of using the highly abundant spin-1 isotope which has been rarely studied in the past due to the difficulties from the low- $\gamma$  and large quadrupolar broadening.

$$\int_Q^{iso} = \frac{1}{20} \left( \frac{\chi_f}{\nu_0} \right)^2.$$

less  $T_2'$  for

Fumitaka Horii

*Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan*

### 1. Introduction

Since the development of the CP/MAS method by Schaefer *et al.* in 1975,<sup>1)</sup> more than 30 years have passed with many remarkable progresses in hardware and software for high-resolution solid-state NMR spectroscopy. I started high-resolution solid-state <sup>13</sup>C NMR studies of solid polymers including different types of native celluloses in 1981 by using a JEOL FX-100 spectrometer, operating at an electromagnetic field of 2.35 T, equipped with a CP/MAS probe newly developed at that time by Fujito in JEOL. Since then, we have been contributing to the clarification of the crystalline-noncrystalline structure of crystalline polymers, structure and structure formation of native cellulose, the conformation and hydrogen bonding in poly(vinyl alcohol) materials with different tacticities, and dynamics of polymers in the crystalline and noncrystalline states. It may be important to review these investigations but, in this presentation, we focus our attention on new solid-state NMR analyses developed on the basis of them in these 2-3 years.

### 2. Homo-nuclear cross polarization and 1D assignments of solid-state NMR spectra

INADEQUATE (incredible natural abundance double quantum transfer experiment) is also available for the assignment of resonance lines in solid-state NMR spectra. However, the sensitivity for the measurements is not still enough for natural abundant solid materials even under a super-high magnetic field. The <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C homo-nuclear cross polarization (HNCP) was examined to develop a new one-dimensional (1D) assignment method.<sup>2)</sup> In this case the magnetization of a given <sup>13</sup>C resonance line is selectively excited by employing the DANTE and soft pulses and spin-locked to induce the <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C HNCP for the first and second neighboring <sup>13</sup>C nuclei depending on the contact time. Dipolar coupling and *J*-coupling are both found to contribute to the HNCP process and the latter coupling may be dominant under higher magic angle spinning. We could successfully apply this method to the assignment of resonance lines for natural abundant threonine crystals and so on.

### 3. Surface high-resolution (SURHIR) NMR

Conventional solid-state NMR is not suitable for the selective characterization of the surface structure of solid materials. However, we have recently developed a new solid-state NMR method, which will be called surface high-resolution (SURHIR) NMR spectroscopy, to characterize the surface structure by combining the <sup>1</sup>H spin diffusion process with the CP/MAS method.<sup>3)</sup> In this case, <sup>1</sup>H spins are allowed to diffuse from a surrounding medium such as water to a solid material dispersed in the medium through the surface and the resulting <sup>1</sup>H magnetization is <sup>13</sup>C-detected as a high-resolution spectrum by the CP/MAS technique as a function of the distance *L* from the surface.

SURHIR NMR was first applied to the characterization of the surface structure for native cellulose nano-rods, which are recently very important as environmentally friendly building blocks or as such reinforcing materials for nanocomposites.<sup>3)</sup> CP/MAS <sup>13</sup>C NMR spectra of the cellulose nano-rods were successfully obtained as a function of the spin diffusion time (*t<sub>d</sub>*) that is related to the distance *L* from the surface by the equation of  $L=1.1t_d^{1/2}$  in this system. As a result, the disordered component is found to be distributed in an area less than about 5

nm from the surface, whereas the well-ordered crystalline component exists as a core of each nano-rod in an area of about 1-10 nm from the surface. It is also found that a somewhat disordered crystalline component exists within about 1 nm from the surface. Similar surface characterization is possible for other nano-scale structure entities as well as fibers and films having specific surface functionalities.

#### 4. Double quantum solid-state NMR

Double quantum transitions for dipolar-coupled spin pairs are indirectly observed by the two-dimensional NMR method (2D DOQSY)<sup>4)</sup> and very precise structural information is obtained even for noncrystalline or disordered materials by analyzing the 2D spectra. We measured 2D DOQSY spectra for 10% CO-<sup>13</sup>C labeled poly(ethylene terephthalate) films that were quenched from the melt to ice water.<sup>5)</sup> By the comparison between the observed and simulated 2D DOQSY spectra, the averaged distance between the neighboring phenylene rings, Eulerian angles  $\theta$  and  $\psi$ , which define the relative orientation of the neighboring two phenylene rings, and their distributions were precisely determined even in the noncrystalline state. Within an average distance of about 0.5 nm, most preferable orientation of the phenylene rings is found to be parallel stacking but the relative location of the phenylene rings is rotated by about 35 ° around the axis perpendicular to the phenylene plane. 2D DOQSY will be combined with SURHIR NMR for the detailed characterization of surface structure of polymer materials.

#### 5. Super-high field solid-state NMR

A 930 MHz solid-state NMR spectrometer operating under a static magnetic field of 21.8 T was developed in National Institute of Materials Science (NIMS) in 2005. We are using it to characterize hydrogen bonding in organic materials by high-resolution solid-state <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H or <sup>17</sup>O NMR. Unfortunately, <sup>1</sup>H spectral resolution is not appreciably increased even at 21.8 T mainly due to the low amplitude of the <sup>1</sup>H radio frequency available at present for the 4 mm CP/MAS probe. This problem will be solved by the development of a 2.5 mm or 2 mm probe.

In contrast, much higher resolution can be obtained in high-resolution solid-state <sup>2</sup>H NMR recently developed.<sup>6)</sup> Characteristic <sup>2</sup>H spectra of different O<sup>2</sup>H groups were clearly observed for two crystal forms, which are called cellulose I<sub>α</sub> and I<sub>β</sub>, in OH-deuterated native celluloses.<sup>7)</sup> The assignment of the resonance lines is also very important for the further detailed characterization of hydrogen bonding that may be associated with the difference in crystal structure between cellulose I<sub>α</sub> and I<sub>β</sub>. To this end, <sup>2</sup>H-<sup>13</sup>C hetero-nuclear dipolar correlation (HETCOR) experiments are in progress for OH-deuterated and <sup>13</sup>C-enriched bacterial cellulose by using the <sup>1</sup>H/<sup>2</sup>H/<sup>13</sup>C triple resonance probe.

<sup>17</sup>O NMR is also applied to the characterization of hydrogen bonding for O5- or O6-<sup>17</sup>O labeled glucose crystals. In the case of glucose monohydrate crystals, <sup>1</sup>H decoupling irradiation was found to induce the <sup>17</sup>O-<sup>16</sup>O exchange between the O5 site and H<sub>2</sub>O. The preliminary results obtained by <sup>17</sup>O NMR will be also shown.

- 1) J. Schafer, E. O. Stejskal, R. Buchdahl, *Macromolecules*, **8**, 291 (1975); J. Schafer, E. O. Stejskal, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1031 (1976).
- 2) Q. Luo, Y. Shimoikeda, H. Kaji, F. Horii, *Abst. 45th Ann. Meet. NMR Soc. Japan*, p.184, 2006.
- 3) F. Horii, *Proc. Soc. Solid-State NMR Mat.*, No.41/6, p.17, 2007.
- 4) K. Schmidt-Rohr, *Macromolecules*, **29**, 39751 (1996).
- 5) H. Kaji, N. Inui, F. Horii, *Polym. Prepr., Japan*, **52**, 544 (2003).
- 6) T. Mizuno *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 9683 (2006).
- 7) Q. Luo *et al.*, *Abst. 45th Ann. Meet. NMR Soc. Japan*, p.342, 2006.

## NMR investigation of protein-protein interactions in transcription and signal transduction

Mitsu Ikura

Division of Signaling Biology, Ontario Cancer Institute and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, TMDT-MaRS 4-408, 101 College St., Toronto, Ontario, M5G 1L7, Canada.

Protein-protein interaction plays a pivotal role in many, if not all, cellular signaling pathways. Understanding the nature and properties of the molecular interactions involved in cell signaling is crucial to decoding the mechanisms underlying various signaling processes. Despite the numerous challenges faced by NMR investigators during sample production and preparation prior to insertion into the NMR magnet, we have successfully revealed the structure of a number of protein complexes involved in gene transcription and cellular signaling. Biochemical techniques particularly useful to our study of protein-protein complexes by NMR include: (i) limited proteolysis, (ii) protein-protein fusion, and (iii) buffer optimization. In addition, the use of residual dipolar coupling and paramagnetic probes proved extremely valuable in positioning two interacting protein partners, as exemplified in various complexes of calmodulin with peptides derived from calmodulin-dependent protein kinases (T. Mal *et al. Biochemistry* **41**, 12899-12906, 2002; *JACS* **124**, 14002-14003, 2002). In more recent years, we have investigated the acute myeloid leukemia fusion protein, AML1-ETO, which functions as a transcriptional silencer *via* E-protein inhibition (M. Plevin *et al. PNAS* **103**, 10242-10247, 2006). The interaction of the TAFH domain of AML1-ETO with the AD1 domain of HEB (which has a moderate affinity (0.1-1  $\mu$ M)) was characterized by various NMR techniques including paramagnetic relaxation enhancement, residual dipolar coupling measurement, and protein engineering approach (Plevin *et al.*, in preparation), together refining the structure of the TAFH-AD1 complex. Finally, we have successfully constructed a chimeric construct between the TATA binding protein (TBP) and the TAF1 N-terminal domain, which enabled us to closely investigate the interaction between those key subunits within TFIID in regulation of basal transcriptional activity (Mal *et al.*, *J. Biol. Chem.* In press). These studies demonstrate the utility of NMR spectroscopy in the study of protein-protein complexes with a molecular weight up to 40 kDa.

Fast exchange.

$$> 10^1 \text{ s}^{-1}$$

$$K_d > 10^4 \text{ M}$$

Intermediate exchange

$$10^1 - 10^3 \text{ s}^{-1}$$

$$10^{-6} - 10^{-8} \text{ M}$$

Slow exchange

$$< 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$< 10^{-7} \text{ M}$$

TR activation-coordination  
signaling.

Enzyme-ligand

HADDOCK

## Protein structure analysis using the orientation dependent TROSY shift changes

Shin-ichi Tate<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Mathematical and Life Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, <sup>2</sup>PRESTO/JST

**Abstract:** We have demonstrated that the orientation dependent TROSY shift changes can be used for elucidating the molecular alignment tensor for the protein in a weakly aligned state, as an alternative for the conventional approaches based on the residual dipolar couplings (RDCs). This approach is named as DIORITE (Determination of the Induced ORientation by TroSY Experiments) for convenience. In this presentation, I am going to discuss the DIORITE applications under various field strengths. I will also mention to the experimental optimizations to obtain the appropriate alignment of a protein, particularly for the proteins over 30kDa.

The use of anisotropic spin interactions, including the residual dipolar couplings (RDCs) and chemical shift anisotropies, has now become common and vital in solution NMR experiments. The use of the RDCs, however, is sometimes hard to be applied to large size proteins, due to the signal overlaps and rapid transverse spin relaxation of the signals essential for elucidating the RDCs. Our approach using the orientation dependent TROSY shift changes for determining of the molecular alignment tensor can be an alternative for overcoming the problems in the conventional RDC-based approaches. In this approach, the only TROSY shift changes are considered for the tensor calculation and thus this approach shows high tolerance against the molecular weight. This approach is named as DIORITE for convenience.

The orientation induced TROSY shifts contains two anisotropic spin interactions from the RDCs and the chemical shift anisotropies for the amide <sup>15</sup>N nuclei. In the DIORITE analysis, the chemical shift anisotropy (CSA) tensor values are assumed for each residue. For ubiquitin, we demonstrated that the alignment tensor values determined using the average CSA tensor values, where the residue dependent variations were not considered, were consistent with those determined using the residue-by-residue CSA tensors that were determined by Bodenhausen and co-workers using a set of cross correlated spin relaxation experiments. In the analysis, we used the data collected on a 500MHz spectrometer,

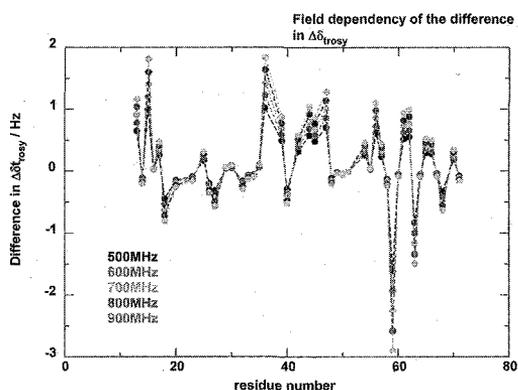
**Keywords:** anisotropic spin interactions, molecular alignment, deuterium labeling, TROSY

たて しんいち

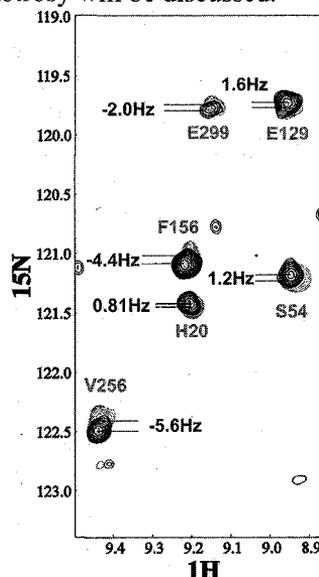
whose lower magnetic field alleviated the effects caused by the residue dependent CSA variations. This prompted us to elucidate the effect of the CSA tensor values that vary to the local conformation and chemical environments, which will become apparent in higher magnetic field experiments. The simulation using the Saupe order matrix determined by the 500MHz DIORITE analysis on ubiquitin has shown the field dependent variations in the difference in the  $\Delta\delta_{\text{Trosy}}$  values

using residue dependent CSA tensors and the average CSA tensor values ( $\Delta\delta=-168.1\text{ppm}$ ,  $\eta=0.19$ ,  $\beta=17.7\text{deg.}$ ); the  $\Delta\delta_{\text{Trosy}}$  difference increases according the field strength. This means that the high field DIORITE experiments require consideration of the local CSA variations. The CSA values from the quantum chemical calculation should be needed for the DIORITE analysis on the high field data. The present simulation has also shown that the observed absolute values of  $\Delta\delta_{\text{Trosy}}$  become smaller under the magnetic fields ranging from 700MHz to 900MHz. Instead, the strengths less than 600MHz or over 1GHz are preferable choices for the DIORITE experiments. In expecting for the TROSY effect for alleviating the transverse relaxation of the signals, 600MHz would be practically the most appropriate field strength for the DIORITE experiments. The details in this regard will be described. In the presentation, further aspects on the field dependencies of the  $\Delta\delta_{\text{Trosy}}$  will be discussed.

In practice, the achievement of protein alignment in an appropriate extent is very important part of the sample preparation. Liquid crystalline media require the strict solution conditions for the phase transitions, which are not always applied to the proteins you are working with. With intention to achieve the weak alignment experiments for any types of protein at any experimental conditions, particularly larger proteins, we have been focusing on the optimization of the preparation for the aligning media made up of acrylamide. The details in the preparation will be mentioned in the presentation and the relating poster presentation from our group.



**Fig1: Field dependent differences in  $\Delta\delta_{\text{Trosy}}$  values**



**Fig2: Orientation dependent Trosy shift changes induced for the 38kDa protein in compressed acrylamide gel.**

## Mechanisms underlying biological activities of RNA/DNA-binding proteins, examined on the basis of the combination of structure and relaxation analyses

Takako Ohyama<sup>1</sup>, Ayako Furukawa<sup>1</sup>, Tatsuya Miyoshi<sup>1</sup>, Yusuke Takada<sup>1</sup>, Shota Ogara<sup>1</sup>, Kazuyuki Hiratsuka<sup>2</sup>, Takao Imai<sup>3</sup>, Hideyuki Okano<sup>3</sup>, Hitoshi Nakagama<sup>4</sup>, Takashi Nagata<sup>1</sup>, and Masato Katahira<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University, 1-7-29 Suehiro, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan, <sup>2</sup>Yokohama National University, <sup>3</sup>Keio University, <sup>4</sup>National Cancer Center Research Institute, and <sup>5</sup>PRESTO, JST

On the basis of the combination of structure and relaxation analyses, the mechanisms underlying the biological activities have been examined for three proteins involved in the regulation of transcription (GT-1), translation (Musashi) and telomere elongation (hnRNP A1). Difference in  $T_2$  between wild and phosphorylation-mimicking mutant GT-1 has given a hint on the origin of increase of the affinity to DNA through phosphorylation of GT-1. Long-range structural information obtained from residual dipolar couplings (RDCs) and paramagnetic relaxation enhancement (PRE) helps to determine the structure of two tandem domains of Musashi in complex with its target RNA, suggesting the recognition mechanism. Comparison in line width of hnRNP A1 between a free state and a complex state with telomeric DNA reveals that the stoichiometry of the complex in solution is different from that observed in crystal. Chemical shift perturbation suggests the formation of the ternary complex of hnRNP A1 with telomeric DNA and telomerase RNA, which implies that hnRNP A1 helps telomerase to function through the recruitment of telomerase to telomeric DNA.

### GT-1 protein

A GT-1 protein is an activator of transcription and involved in light-responsive regulation of plant genes such as *rubisco*. When GT-1 is phosphorylated in the course of signal transduction, its affinity to DNA increases and transcription is switched-on. T133 of GT-1 is a phosphorylation site. We found from gel retardation experiments and DNA-titration experiments with HSQC that a T133D mutant protein, in which Thr133 is replaced by Asp, exhibits higher affinity to DNA than a wild protein and that thus the mutant protein can mimic the phosphorylated wild protein. We have examined the structure, dynamics and interactions with DNA of both wild and phosphorylation-mimicking T133D mutant proteins to obtain the insight on the increase of DNA-binding affinity through phosphorylation.

Structures of wild and mutant GT-1 were determined by NMR. Rmsds for backbone heavy atoms were 0.42 Å and 0.45 Å, respectively. Two structures were similar to each other. Dynamics of wild and mutant GT-1 were assessed with <sup>15</sup>N  $T_1$ ,  $T_2$  and NOE, both in a free state and in the complex state with DNA. These three parameters were similar for wild and mutant GT-1 in a free state. In the complex state, however,  $T_2$  values of mutant GT-1 were shorter than those of wild GT-1. Particularly,  $T_2$  values were shorter for residues of the third helix of mutant GT-1 in the complex. Interactions of wild and mutant GT-1 with the target DNA were studied with a chemical shift perturbation method. The third helix was identified to be the main interactive surface with DNA. Thus, comparison in dynamics and interactive surface with DNA between wild and mutant GT-1 has given some insight on the origin of the increase of the affinity to DNA through phosphorylation.

PRE, relaxation analysis, structure-function correlation, nucleic acids-binding protein, complex

## **Musashi protein**

A Musashi protein is expressed in the developing central neural system. Musashi is involved in maintenance of the character of progenitor cells. Musashi binds to the 3' untranslated region of the target mRNA and represses translation. Musashi has two tandem RNA-binding domains. We reported the structures and interactions with RNA of each isolated tandem domain (1, 2). Here, we have tried to determine the arrangement of the two domains in a linked state, as in nature, in the complex with the target RNA. In order to obtain the long-range structural information needed to determine the arrangement, RDCs and PRE were utilized.

Structures of two tandem RNA-binding domains of Musashi in complex with the target RNA were determined by NOEs. On the basis of intrinsically long-range structural information deduced from RDCs, the arrangement of two RNA-binding domains in the complex was determined. Incorporation of another kind of long-range structural information deduced from PRE was also intended. For this purpose, all Cys residues of Musashi were replaced by Ala residues and then the replacement by a Cys residue was carried out for four selected residues, respectively. NO radical was attached to the single Cys residue for four mutant Musashi proteins and PRE measurements were tried. These analyses have suggested the way how two tandem RNA-binding domains of Musashi recognize its target RNA.

## **hnRNP A1 protein**

hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) A1 has multi functions. It binds to mRNA and regulates stability and transport. hnRNP A1 also binds to DNA and can unfold quadruplex to a single strand. This unfolding activity has certain biological significance in DNA replication and telomere elongation (3, 4). hnRNP A1 has two tandem nucleic acid-binding domains. It was suggested on the basis of biochemical data that hnRNP A1 can simultaneously binds to telomeric DNA and telomerase RNA with the two domains (5). Here, we have studied the interactions with DNA and RNA of hnRNP A1 by NMR in detail in order to examine the idea that hnRNP A1 can recruit telomerase to telomeric DNA through the simultaneous binding.

Backbone resonance assignments for two tandem nucleic acid-binding domains of hnRNP A1 were accomplished from a series of triple resonance experiments. As to the complex formation of hnRNP A1 with telomeric DNA (12-mer), 2:2 stoichiometry was suggested on the basis of crystal structure. However, line width analysis of hnRNP A1 on complex formation reveals that the stoichiometry is 1:1 in solution. Interactions of the binding domains with telomeric DNA were examined by the chemical shift perturbation method with the titration of telomeric DNA. Interactions were detected for many residues of the binding domains. Interactions with telomerase RNA were also examined by the same method with the titration of telomerase RNA. Interactions were detected for fewer residues. Finally, the perturbations were obtained under the co-existence of telomeric DNA and telomerase RNA. The results have suggested that hnRNP A1 can simultaneously bind to telomeric DNA and telomerase RNA with its two binding domains. This implies that hnRNP A1 can recruit telomerase to telomeric DNA. Thus, hnRNP A1 may help telomerase to function through the recruitment activity in addition to already identified quadruplex-unfolding activity.

1. Nagata et al., *J. Mol. Biol.*
2. Miyanoiri et al., *J. Biol. Chem.*
3. Fukuda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
4. Enokizono et al., *J. Biol. Chem.*
5. Fiset et al., *Nucleic Acids Res.*

○Koichi Kato<sup>1, 2, 3, 4</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

<sup>2</sup>Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama Myodaiji, Okazaki 444-8787, Japan

<sup>3</sup>The Glycoscience Institute, Ochanomizu University, 2-1-1 Ohtsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

<sup>4</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan

The fates of proteins in cells are determined through a variety of post-translational modification processes such as glycosylation and ubiquitination. Cumulative evidence demonstrates that many of proteins are covalently linked to sugar chains, which play crucial roles in keeping order in the ‘protein society’ in the living system. In particular, *N*-glycans contribute to folding, transport, and degradation of proteins in cells through interactions with a variety of intracellular lectins that operate as molecular chaperones, cargo receptors, and ubiquitin ligases. Ubiquitination is also an important fate-determining process of proteins doomed to proteasomal degradation.

To elucidate the underlying mechanisms for protein quality control governed by these modifications, we conduct NMR studies of carbohydrate-protein and protein-protein interactions involved in folding and degradation of proteins and glycoproteins in cells by use of an NMR spectrometer operating at a 21.6 T magnetic field.

#### ***Domain-domain interaction in substrate recognition by PDI***

Protein disulfide isomerase (PDI) is a major protein in the endoplasmic reticulum, acting as an essential folding catalyst and molecular chaperone for disulfide-containing proteins, by catalyzing the formation, rearrangement, and breakage of their disulfide bridges. We determined solution structures of the *b*' and *a*' domains of thermophilic fungal PDI, which are primarily responsible for substrate binding, and further provided a three-dimensional structure model of these domains linked to each other on inspection of the NMR data combined

*Keywords:* domain-domain interaction, quality control, glycoprotein, molecular recognition

with the small-angle X-ray scattering (SAXS) data. The 3D model of  $b'$ - $a'$  in solution thus obtained exhibits a more compact as compared with the corresponding portion of the crystal structure of yeast PDI (Figure 1). On the basis of the NMR data, we propose a mechanistic model in which the  $a'$  domain transfers its own disulfide bond into the unfolded protein accommodated on the exposed hydrophobic surface and consequently becomes a 'closed' form liberating the oxidized substrate.

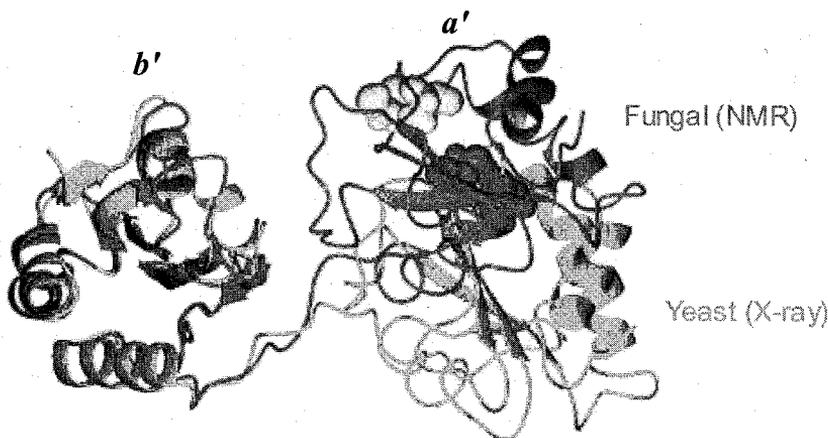


Figure 1 The NMR-derived model of  $b'$ - $a'$  of thermophilic fungal PDI superimposed on the corresponding region in the crystal structure of yeast PDI. The cysteine pair in the active site is shown in space-filling representation.

### ***Structural basis of interplay between ubiquitination and deglycosylation***

Using isotopically labeled glycopeptides, we have revealed that the sugar-recognizing ubiquitin ligase  $SCF^{Fbs1}$  interacts with the carbohydrate-polypeptide junction of its substrates. This portion is generally shielded in a native glycoprotein but is likely to be exposed in unfolded glycoproteins as targets of proteasomal degradation. The exposed sugar-polypeptide junction could also be recognized by cytoplasmic peptide:*N*-glycanase (PNGase), which removes the *N*-glycans of substrate prior to its proteasomal degradation. On the basis of the NMR and biochemical data, we propose a model of a functional interplay between  $SCF^{Fbs1}$  and PNGase in the ubiquitin/proteasome-mediated glycoprotein degradation system.

## **N-terminal SAP and PHD-finger domains of SUMO ligase Siz1 from *Oryza sativa* are essential for recognition of methylated histone as well as DNA binding**

<sup>1</sup>Protein Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences,  
<sup>2</sup>Peptide Research Inc., Protein Research Foundation

Toshimasa Yamazaki<sup>1</sup>, Rintaro Suzuki<sup>1</sup>, Akira Tase<sup>1</sup>, Yuji Nishiuchi<sup>2</sup>, and Heisaburo Shindo<sup>1</sup>

### **Introduction**

The ubiquitin (Ub)-related protein SUMO functions by becoming covalently attached to other proteins as a post-translational modification, and SUMO conjugation, so-called sumoylation, is essential for viability of eukaryotic cells. Like Ub, SUMO is attached to certain lysine residues in substrates through an amide bond between the C-terminus of SUMO and the  $\epsilon$ -amino group of the lysine residue. Sumoylation is involved in many cellular processes, such as transcription, nuclear transport, signal transduction, maintenance of chromatin and so on. The effect of sumoylation could be diverse. It can affect the localization, or regulate the activity or the binding properties of the target proteins. In contrast to ubiquitination, however, sumoylation does not promote protein degradation, and in some cases, it can even antagonize ubiquitination and lead to protein stabilization. Sumoylation, like ubiquitination, is also carried out by the sequential action of three enzymes: an activation enzyme (E1), a conjugating enzyme (E2) and a ligase (E3). In all of the organisms examined so far, a single E1 and E2 but multiple E3s have been detected. Thus, E3s are likely the determinants of substrate specificity.

The Siz/PIAS family, one of the three types of SUMO ligases, is found in all eukaryotes and shares a relatively conserved ~400 amino acid N-terminal region that contains several distinct domains, including the SP-RING and SAP domains while Siz proteins in plants comprise another unique domain, PHD finger. The SP-RING is described as a recognition region for the conjugating enzyme E2, whereas the SAP and PHD are not well characterized yet. In the present studies, several independent yet related questions regarding the structure and function of the Siz/PIAS family protein Siz1 from rice, OsSiz1, are addressed by NMR spectroscopy. First, the three-dimensional (3D) structure of the SAP domain from rice was determined. Second, DNA binding ability of OsSiz1 was examined. Third, the 3D structure of the PHD finger and its binding ability to various methylated histone tails were investigated. The results lead to conclusion that the N-terminal SAP and PHD-finger domains of the SUMO ligase Siz1 from rice play crucial roles in recognizing the methylated histone as well as DNA.

### **Materials and Methods**

His-tagged N-terminal SAP domain, OsSiz1(1-107), and GST-tagged PHD finger, OsSiz1(107-172) of Siz1 from rice were expressed in *E. coli*. and purified after the removal of the tags.

**Keywords:** sumoylation / SUMO ligase / DNA binding / methylated histone

All NMR spectra were acquired on a Bruker DMX750 spectroscopy. Resonance assignments and NOE-based structure calculations were carried out using the standard strategy. A self-complement DNA 16-mer, d(CAAAAATATATTTTTG)<sub>2</sub>, was used for DNA binding experiments. Unmodified and lysine-methylated histone fragments used for NMR titration experiments were prepared by solid-phase syntheses using the standard Fmoc strategy.

## Results and Discussion

### *Solution Structure of SAP and Its Interaction with A/T-rich DNA*

The SAP domain of OsSiz1 folds into a four-helix bundle structure ( $\alpha$ 1, residues 4-18;  $\alpha$ 2, 22-31;  $\alpha$ 3, 40-49;  $\alpha$ 4, 70-84) with a right-handed twist and a topology of up-down-extended loop-down-up. Two loops connecting the two pairs of helices ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3- $\alpha$ 4) are crossed over. This bundle structure is quite similar to that of the SAP domain of human PIAS1 [1], with the exception of the relatively long loop connecting  $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4 helices. The two  $\alpha$ -helices composed of the SAP motif,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3, run nearly parallel to each other. All of the hydrophobic residues conserved in the SAP motif form the hydrophobic core, which stabilizes the helix bundle. A gel shift mobility assay and NMR chemical shift perturbation experiment provided evidence that OsSiz1(1-107) binds to A/T-rich DNA. The observation pattern of the chemical shift perturbations indicates that the protruding edges formed by the N-termini of the  $\alpha$ 2- and  $\alpha$ 3-helices binds to DNA, but rules out the possible existence of a recognition helix such as that found in the helix-turn-helix DNA binding motif. The DNA binding mode of OsSiz1 is essentially the same as that of the human PIAS1 [1], but is slightly different from the yeast Siz1 which has an extra helix.

### *Solution Structure of PHD and Its Binding to Methylated Histone Tails of H3 and H4*

The PHD finger of OsSiz1 assumes a typical PHD fold composed of extended loops with a short two-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet (residues 129-130 and 139-141) and a C-terminal  $\alpha$ -helix (residues 164-170). The two Zn<sup>2+</sup> atoms, required for proper folding and located at opposite ends of the  $\beta$ -sheet, are separated by ca. 15 Å and are coordinated by the conserved Cys<sub>4</sub>HisCys<sub>3</sub> sequence motif in a cross-brace manner. Among the various lysine-methylated and unmodified histone tails examined, the PHD finger of OsSiz1 specifically recognizes histone H3 with tri- and dimethylated lysine at position 4 (H3K4me3 and H3K4me2). Essentially no bindings to monomethylated H3K4me1 and unmethylated H3 were observed. The NMR titration experiments revealed that the H3K4me3 interacts with OsSiz1 through an antiparallel  $\beta$ -sheet formed on the surface of the PHD finger. A recent report suggests that the SUMO ligase Siz is required for sumoylation of the core histones within chromatin [2]. Taken these results together, we conclude that the PHD finger of the SUMO ligase Siz1 from rice serves as the methylated histone binding domain, at least in part.

## References

- 1) S. Okubo et al., J. Biol. Chem., 279: 31455-31461 (2004).
- 2) D. Nathan et al., Genes Development, 20: 966-976 (2006).

○Hidehito Tochio<sup>1</sup>, Tomomi Sakai<sup>2</sup>, Ryuji Igarashi<sup>1</sup>, Kosuke Inomata<sup>1</sup>, Takeshi Tenno<sup>3</sup>, Toshiaki Tanaka<sup>4</sup>, Hidekazu Hiroaki<sup>3</sup>, Yutaka Ito<sup>5</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto

<sup>2</sup>Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University, Yokohama

<sup>3</sup>Graduate School of Medicine, Kobe University, Kobe

<sup>4</sup>Tokyo Institute of Technology, Yokohama

<sup>5</sup>Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami Osawa, Hachioji, Tokyo

<sup>6</sup>CREST, Japan Science and Technology Corporation, Saitama

## Introduction

In-cell NMR allows us to study protein conformation inside living cells. However, the technique has been limited to only bacterial cells such as *E. coli*. We are developing in-cell NMR techniques in various eukaryotic cells aiming to fill the gap between structural biology and cell biology. In this talk, our recent studies performed on living *Xenopus laevis* oocytes will be presented.

## Methods

*Preparation of Xenopus laevis oocytes.* Stage V-VI oocytes were prepared from mature female frogs. Healthy oocytes were selected under a dissecting microscope based on morphology and pigmentation, and stored at 18°C not more than 2 days prior to use.

*Injection of labeled proteins.* <sup>15</sup>N-labeled proteins were prepared using *E. coli* expression system prior to injection. Each oocyte was injected with 25 nL of typically 5 mM <sup>15</sup>N-labeled proteins. The final concentration of proteins in oocytes was estimated to be approximately 0.1 mM. For the ubiquitin aldehyde treatment, each oocyte was pre-injected with approximately 20 nL of 2.9 ng/nL ubiquitin aldehyde or water (control) 30 min prior to injection of the labeled proteins.

## キーワード

In-Cell NMR, ubiquitin, *Xenopus laevis*, oocyte

著者ふりがな

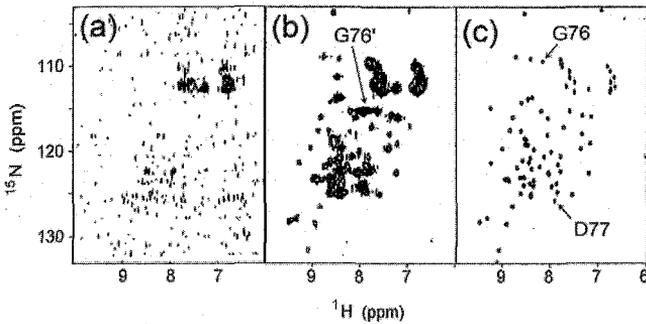
とちおひでひと、さかいともみ、いがらしりゅうじ、いのまたこうすけ、てんのたけし、たなかとしあき、ひろあきひでかず、いとうゆたか、しらかわまさひろ

*NMR experiments.* Typically, about 200 oocytes were provided for one HSQC experiment. All NMR data were acquired at 18 °C on Bruker DRX-500/700 spectrometer equipped with a 5 mm TCI CryoProbe.

## Results and Discussion

In-cell  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of ubiquitin and its derivatives were measured. As shown in Figure 1(a) & 1(b), NMR signals of wild-type ubiquitin (wt-Ub) was

considerably weaker than that of a ubiquitin derivative ((L8A, I44A, V70A)-D77) that is lacking affinity to ubiquitin-binding proteins. This observation suggested that extensive interactions between wt-Ub and endogenous ubiquitin-interacting proteins caused the broadening of the NMR signals, whereas the derivative was free from those interactions as a result of deficiency of binding affinity and thus behaved essentially as an



**Figure 1.** The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of *Xenopus laevis* oocytes injected with  $^{15}\text{N}$  labeled wt-Ub (a) and (L8A, I44A, V70A)-D77 Ub (b). The *in vitro*  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of  $^{15}\text{N}$  (L8A, I44A, V70A)-D77 Ub (c). Cross-peaks of G76, D77 and G76' (G76 after the cleavage of the peptide bond) are indicated.

isolated molecule.

In Figure 1(b), the cross-peak of G76 was observed at the position of G76 of wt-Ub (indicated as G76'). In addition, the cross-peak of D77 was missing. These observations suggested that the peptide bond between those residues was cleaved in the cells. This spectral change did not occur when we treated the oocyte with ubiquitin aldehyde in advance, which is a specific inhibitor of DUB (deubiquitinating enzyme), indicating that the cleavage of the peptide bond was caused by endogenous DUB activity. We also measured the time course of the reaction by continuously acquiring in-cell HSQC spectra.

## Reference

“In-cell NMR spectroscopy of proteins inside *Xenopus laevis* oocytes.”, T. Sakai et al., *J Biomol NMR*, **36**, 179-88 (2006).

ヘム側鎖にフッ素をもつヘムタンパク質の  $^{19}\text{F}$  NMR(筑波大院数物<sup>1</sup>、長岡高専物質工<sup>2</sup>)○ 山本泰彦<sup>1</sup> 長尾 聡<sup>1</sup>、水関和哉<sup>1</sup>、河野 慎<sup>1</sup>、長友重紀<sup>1</sup>、  
鈴木秋弘<sup>2</sup> $^{19}\text{F}$  NMR of Hemoproteins Possessing Fluorinated Hemes<sup>1</sup>Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Dept. of Materials Eng., Nagaoka Natl. Coll. of Tech.○ Yasuhiko Yamamoto<sup>1</sup>, Satoshi Nagao<sup>1</sup>, Kazuya Mizuseki<sup>1</sup>, Shin Kawano<sup>1</sup>,  
Shigenori Nagatomo<sup>1</sup>, and Akihiro Suzuki<sup>2</sup>

Owing to the absence of interfering background signals, the introduction of fluorine atom(s) into specific site(s) of the proteins facilitates the observation of well-resolved  $^{19}\text{F}$  NMR signals in all the accessible oxidation, spin, and ligation states of *b*-type hemoproteins, which provide potential spectroscopic probes for characterizing the heme active site. An analysis of the effects of the introduced fluorine atom(s) on the nature of the protein often provides valuable information about the protein architecture. The method provides a new means for the detailed characterization of the heme electronic structure in various *b*-type hemoproteins to delineate their structure-function relationships.

## 序 論

私共は、 $^{19}\text{F}$  NMR の利点を最大限に利用して、ヘムタンパク質の構造解析を高感度で行う手法の構築を目指している。様々なヘムタンパク質が生体内で示す機能の多様性は、ヘムとタンパク質との相互作用により生み出されている。つまり、ヘム鉄の反応性などの機能は、ヘムの電子構造が近傍のアミノ酸残基との相互作用により変化することにより調節されている。したがって、ヘムタンパク質の構造解析において、ヘム近傍の構造化学的性質とヘムの電子構造との関係を解明することが重要である。私共は、ヘム側鎖として  $\text{CF}_3$  や  $\text{F}$  をもつフッ素化ヘムをタンパク質に組み込んでタンパク質のフッ素標識を行い、ヘムの電子構造を  $^{19}\text{F}$  NMR により解析する手法の可能性について検討している。

## 実 験

Fig. 1 の Proto と Meso を除く様々なフッ素化ヘムをミオグロビン (Mb) やヘモグロビンのアポタンパク質に組み込み、ヘム鉄の様々な酸化状態、スピン状態、配位状態の試料を調製して、Bruker AVANCE-500 により  $^{19}\text{F}$  NMR 測定を行った。化学シフト値はトリフルオロ酢酸 ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) を基準として示した。

## 結果と考察

2, 8-DPF 再構成 Mb の  $^{19}\text{F}$  NMR

2, 8-DPF を組み込んだ Mb の一連の配位状態の  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。CO 結合型 ( $\text{MbCO}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $S = 0$ )),  $\text{CN}^-$  結合型 ( $\text{MbCN}^-$  ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $S = 1/2$ )),  $\text{N}_3^-$  結合型 ( $\text{MbN}_3^-$  ( $\text{Fe}^{3+}$ , 主に  $S = 1/2$ )), Deoxy 型 (DeoxyMb ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $S = 2$ )),  $\text{H}_2\text{O}$  結合型 ( $\text{MbH}_2\text{O}$  ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $S = 5/2$ ))

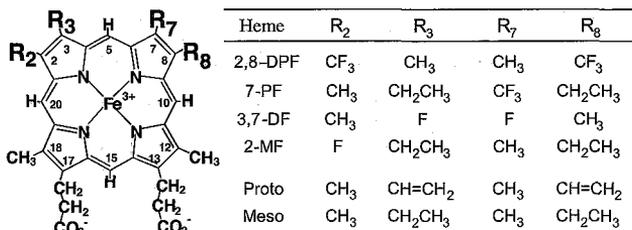


Fig. 1. Molecular structures and numbering system of hemes used in the study.

Keyword :  $^{19}\text{F}$  NMR、常磁性シフト、電子構造、フッ素化ヘム、ミオグロビン

やまもと やすひこ、ながお さとし、みずせき かずや、かわの しん、ながとも しげのり、  
すずき あきひろ

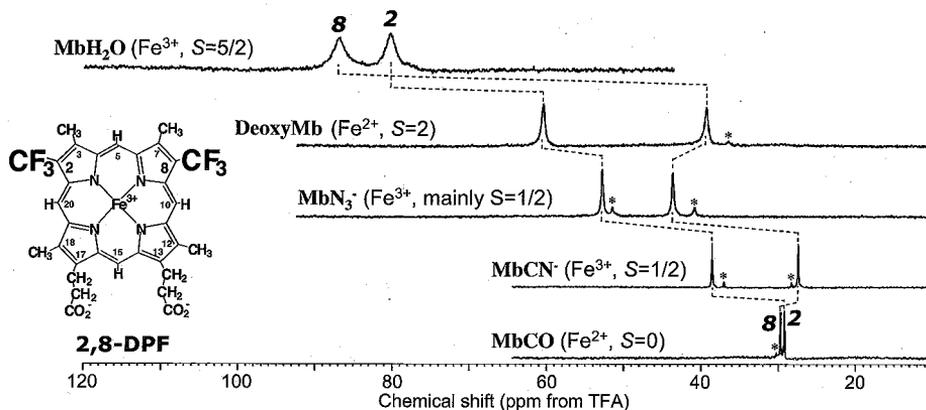


Fig. 2.  $^{19}\text{F}$  NMR spectra of Mb reconstituted with 2,8-DPF, pH 7.0, in various states, at 25 °C. The signal assignment is indicated with the spectra.

それぞれのスペクトルには、シグナル2つが観測されている。基本的に、常磁性シフトの大きさは不対電子の数に依存するため、不対電子をもたない MbCO のシグナルを基準として、 $S$  の増大に伴ってシグナルの低磁場シフトが大きくなっていることがわかる。また、分子構造が  $C_2$  対称軸をもつ 2,8-DPF の2つの  $\text{CF}_3$  に由来する  $^{19}\text{F}$  NMR シグナルが非等価になるのは、2,8-DPF の電子構造の対称性が Mb 内部における様々な構造化学的要因により歪むからである。MbCO のスペクトルにおける2つのシグナルの分離幅 (0.47 ppm) には Mb のヘムポケットの非対称性が反映されていると考えられる(後述)。一方、常磁性 Mb のスペクトルにおける2つのシグナルの分離幅には、ヘムポケットの非対称性に加えて、不対電子の非局在化の偏りも反映される。MbCN $^-$  のシグナルの分離幅 (11.13 ppm) が MbCO の値の 20 倍以上であることから、後者の寄与の大きさが見てとれる。また、MbN $_3^-$  のシグナルの場合は、常磁性シフトは MbCN $^-$  のシグナルよりも大きいにもかかわらず、分離幅 (9.16 ppm) が小さいのは、基底状態における鉄原子の  $3d$  軌道の電子配置と不対電子が存在する軌道からポルフィリン環のピロール窒素の  $p_z$  軌道への不対電子の非局在化が両者で異なることに起因する。さらに、DeoxyMb におけるシグナルの大きな分離幅 (21.08 ppm) は、基底状態の電子配置が  $^5\text{E} (d_{xz})^2(d_{yz})(d_{xy})(d_z^2)(d_{x^2-y^2})$  であるので、不対電子スピンは特定のピロール環の  $\pi$  電子系へ優先的に非局在化するからである。一方、MbH $_2\text{O}$  の電子配置は  $(d_{xz})(d_{yz})(d_{xy})(d_z^2)(d_{x^2-y^2})$  であるので、不対電子スピンは鉄原子からすべてのピロール環の  $\pi$  電子系へほぼ均等に非局在化するため、常磁性シフトの大きさに反して、分離幅 (6.64 ppm) はきわめて小さい。このように、 $^{19}\text{F}$  NMR シグナルはヘムの電子構造に鋭敏である。

### ヘム配位構造の解析

上述の通り、2,8-DPF の電子構造の  $C_2$  対称性は Mb に組み込まれることにより消失する。MbCO と同様に不対電子をもたない  $\text{O}_2$  結合型 (MbO $_2$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $S=0$ )) の  $^{19}\text{F}$  NMR シグナルを MbCO のシグナルと比較することにより、Mb のヘムポケットの非対称性が解析できる (Fig. 3)。天然 Mb における両結合型の X 線結晶構造では、両者のヘム近傍の立体構造は、外部配位子が異なることを除いては、ほぼ同一であることが明らかとなっていることを考慮すると、MbO $_2$  のシグナルの分離幅 (1.52 ppm) が MbCO の値 (0.47 ppm) より大きいのは、MbO $_2$  における Fe-O-O は曲がっているのに対して、MbCO の Fe-C-O はほぼ直線状であるので、ヘムの電子構造の非対称性が前者でより大きいことが反映されていると考えられる。

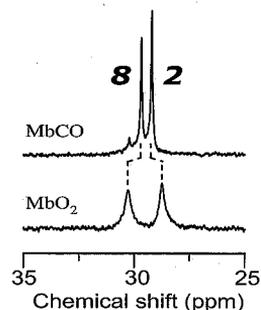


Fig. 3.  $^{19}\text{F}$  NMR spectra of MbCO and MbO $_2$  reconstituted with 2,8-DPF, pH 7.0, at 25 °C.

Relativistic calculation of nuclear magnetic shielding tensors

Kitami Institute of Technology

○ Hiroyui Fukui, Yuusuke Ootani, and Hitoshi Maeda

**Abstract:** A two-component relativistic theory accurately decoupling the positive and negative states of the Dirac Hamiltonian is derived. The derived theory eliminates all of the odd terms originating from the nuclear attraction potential  $V$  and the first-order odd terms originating from the magnetic vector potential  $\vec{A}$ , which connect the positive states to the negative states. The decoupling is exact for the magnetic shielding calculation. The calculation of the diamagnetic property requires both the positive and negative states of the unperturbed ( $\vec{A} = 0$ ) Hamiltonian. The derived theory is applied to the relativistic calculation of nuclear magnetic shielding tensors of HX (X=F, Cl, Br, I) systems at the Hartree-Fock level. The results indicate that such an exact decoupling calculation well reproduces the four-component Dirac-Hartree-Fock results.

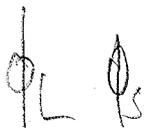
## I. INTRODUCTION

Due to recent developments in the relativistic quantum theory and its applications, the accuracy of the quasirelativistic theory, i.e., the two-component Hamiltonian method for calculating the relativistic effects on molecular properties, has greatly increased. There are two approaches to incorporate relativistic effects on the molecular properties in the two-component framework. One approach is a treatment using nonrelativistic wave functions and incorporating relativistic effects as passive or active perturbations, which are obtained from the Breit-Pauli Hamiltonian. The other approach is a variational treatment that involves calculating the stationary states of a quasirelativistic Hamiltonian. The latter approach is separated into a unitary decoupling transformation method based on the Douglas-Kroll-Hess (DKH) transformation [1] and a method of eliminating the small component (ESC) [2]-[4], which sometimes uses the regular approximation.

There are only two basic types of properties that might occur within a four-component Hamiltonian. Electric or electric-field-like properties are generally described by an even, i.e., diagonal block, perturbation Hamiltonian  $H_E$ . In contrast to the electric properties, the magnetic or magnetic-field-like properties are described by an odd, i.e., off-diagonal block, perturbation Hamiltonian  $H_O$ . Therefore, in order to evaluate the diamagnetic part of a magnetic shielding tensor in the two-component scheme, the four-component interaction Hamiltonian has to be magnetically decoupled and a quadratic operator with respect to the vector potential  $\vec{A}$  has to be obtained. In our previous study[1], the nuclear attraction potential  $V$  is completely decoupled, but the decoupling of the vector potential  $\vec{A}$  is incomplete. An odd term of the first order with respect to  $\vec{A}$  remains in the unitary

キーワード ; nuclear magnetic shielding tensor, relativistic effect

○ふくいひろゆき、おおたにゆうすけ、まえだひとし



$$m/c = \sqrt{2} / 137$$

$$E = 0, -20^2$$

transformed Hamiltonian and the neglected odd term will lead to an error of electronic energy of second order with respect to  $\vec{A}$ . In the present study, we derive a theory to decouple all of the scalar potential terms of  $V$  and the first-order vector potential term of  $\vec{A}$ . The decoupling will yield an exact magnetic energy for the calculation of magnetic shieldings. The magnetic shielding tensor components are easily computed via an analytical differentiation of the electronic energy of the system.

has above

## II. RESULTS AND DISCUSSION

The present calculation uses experimental atomic distances [5] and a point-like nuclear model. We perform the shielding tensor calculation for HX (X=F, Cl, Br, I) systems at the Hartree-Fock level. The common gauge origin  $\vec{R}_0$  is placed on the halogen nuclei. The used basis sets are as follows: (12s10p2d) for H, (15s15p10d4f) for F, (17s17p12d8f) for Cl, (21s21p12d8f2g) for Br, and (25s25p18d10f3g) for I. The obtained results are shown in Table I. The present decoupling calculation results are shown in the sixth column of Table I as the infinite-order two-component (IOTC) values. The IOTC results are compared with other calculation results in Table I. The nonrelativistic (NR) results in the fourth column and the infinite-order DKH (DKH $\infty$ ) results in the fifth column are both taken from Ref. [1]. The four-component Dirac-Hartree-Fock (DHF) results taken from Refs. [6] are shown in the seventh column as the benchmark. Finally, the normalized elimination of the small component calculation results at the level of the second-order regular approximation (NESC-SORA), taken from Ref. [4] are listed in the last column in Table I.  $\Delta\sigma$  is defined by  $\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$ . As shown in Table I, the IOTC results agree better with the DHF values than the DKH $\infty$  results do. However, somewhat larger differences remain between the IOTC and DHF values for the proton shieldings than for the halogen shieldings. This may arise from the fact that the present IOTC calculation treats the two-electron interactions non-relativistically. The two-electron spin-orbit (SO2) interaction effects, which are important in the proton shieldings [3], are neglected in the IOTC calculation.

EQ

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by the Japanese Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan (Grant No. 18550003).

## References

shad of coefficient of  $\vec{A}$  one

- [1] K. Kudo, and H. Fukui, J. Chem. Phys. **123**, 114102 (2005); **124**, 209901 (E) (2006).
- [2] K. Kudo, H. Maeda, T. Kawakubo, Y. Ootani, M. Funaki, and H. Fukui, J. Chem. Phys. **124**, 224106 (2006).
- [3] Y. Ootani, H. Yamaguti, H. Maeda, and H. Fukui, J. Chem. Phys. **125**, 164106 (2006).
- [4] H. Maeda, Y. Ootani, and H. Fukui, J. Chem. Phys. **126**, 174102 (2007).
- [5] *Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions, Supplement* (The Chemical Society, London, 1965).
- [6] P. Manninen, K. Ruud, P. Lantto, and J. Vaara, J. Chem. Phys. **122**, 114107 (2005); **124**, 149901 (E) (2006).

Table I. Calculated nuclear magnetic shielding tensor components (in ppm) in HX (X=F, Cl, Br, I) systems.

Molecule	Nucleus	Property	NR <sup>a</sup>	DKH <sub>∞</sub> <sup>b</sup>	IOTC <sup>c</sup>	DHF <sup>d</sup>	NESC-SORA <sup>e</sup>
HF	F	$\sigma_{\perp}$	378.5	384.0	386.7	384.9	386.7
		$\sigma_{\parallel}$	478.8	483.0	485.6	485.6	485.7
		$\sigma^{\text{iso f}}$	412.0	417.0	419.6	418.4	419.7
		$\Delta\sigma^{\text{g}}$	100.3	99.0	98.9	100.7	99.0
	H	$\sigma_{\perp}$	18.6	18.93	20.22	20.10	20.24
		$\sigma_{\parallel}$	42.9	42.89	43.97	43.90	44.04
		$\sigma^{\text{iso f}}$	26.7	26.92	28.13	28.03	28.17
		$\Delta\sigma^{\text{g}}$	24.3	23.96	23.75	23.80	23.80
HCl	Cl	$\sigma_{\perp}$	857.4	892.6	891.0	888.5	890.2
		$\sigma_{\parallel}$	1144.6	1178.3	1176.7	1176.7	1176.9
		$\sigma^{\text{iso f}}$	953.1	987.8	986.2	984.5	985.7
		$\Delta\sigma^{\text{g}}$	287.2	285.7	285.7	288.2	286.7
	H	$\sigma_{\perp}$	22.8	23.56	24.49	24.07	24.38
		$\sigma_{\parallel}$	44.5	44.41	45.45	45.39	45.35
		$\sigma^{\text{iso f}}$	30.1	30.51	31.47	31.18	31.37
		$\Delta\sigma^{\text{g}}$	21.7	20.85	20.97	21.32	20.97
HBr	Br	$\sigma_{\perp}$	2375.0	2758.3	2753.1	2738.1	2730.4
		$\sigma_{\parallel}$	3097.6	3400.0	3394.0	3402.1	3378.5
		$\sigma^{\text{iso f}}$	2615.9	2972.2	2966.7	2959.4	2946.4
		$\Delta\sigma^{\text{g}}$	722.6	641.7	640.9	664.0	648.1
	H	$\sigma_{\perp}$	20.3	29.26	30.61	29.82	30.11
		$\sigma_{\parallel}$	48.5	47.85	48.59	47.93	48.05
		$\sigma^{\text{iso f}}$	29.7	35.46	36.61	35.86	36.09
		$\Delta\sigma^{\text{g}}$	28.2	18.59	17.98	18.11	17.94
HI	I	$\sigma_{\perp}$	4054.9	5726.1	5595.3	5571.9	5547.2
		$\sigma_{\parallel}$	5505.4	6710.4	6591.2	6597.1	6581.6
		$\sigma^{\text{iso f}}$	4538.4	6054.2	5927.3	5913.7	5892.0
		$\Delta\sigma^{\text{g}}$	1450.6	984.2	995.9	1025.2	1034.4
	H	$\sigma_{\perp}$	20.5	48.11	49.62	46.92	49.15
		$\sigma_{\parallel}$	52.0	46.73	47.49	47.31	45.95
		$\sigma^{\text{iso f}}$	31.0	47.65	48.91	47.05	48.08
		$\Delta\sigma^{\text{g}}$	31.5	-1.38	-2.13	0.39	-3.20

<sup>a</sup> Nonrelativistic results taken from Ref. [1].

<sup>b</sup> Infinite-order Douglas-Kroll-Hess calculation results taken from Ref. [1].

<sup>c</sup> Present infinite-order two-component method results.

<sup>d</sup> Four-component Dirac-Hartree-Fock results taken from Ref. [6].

<sup>e</sup> Normalized elimination of the small component calculation results at the level of the second-order regular approximation, taken from Ref. [4].

f  $\sigma^{\text{iso}} = \frac{1}{3}(2\sigma_{\perp} + \sigma_{\parallel})$ .

g  $\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$ .

## Location and contact of peptides with basic and aromatic residues in the membrane bilayers

Xin Zhao<sup>1,\*</sup>, Saburo Aimoto<sup>1</sup> and Steven O. Smith<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan*

<sup>2</sup>*Department of Biochemistry and Cell Biology, Centre for Structural Biology, Stony Brook University, Stony Brook, NY 11794-5115, USA*

\**xin.zhao@protein.osaka-u.ac.jp*

Contact and association of hydrophilic peptides and proteins with cellular membranes are widely found through the sequence motifs which contain basic and aromatic amino acid residues. Those sequence motifs are not only critical for protein binding, but also important for local disruption and penetration of membranes, for recruitment of lipids, and for membrane fusion (1-7).

Solid-state NMR is a powerful technique to study protein structure, ligand binding and conformational dynamics of membrane proteins and peptides within the fluid lipid bilayer environment (8-12). Due to the fast axially rotation and segmental motion of membrane lipids in the liquid crystalline phase, high-resolution <sup>1</sup>H spectra of membrane lipids could be obtained under the slow MAS frequencies (13) which has resulted in the rapid application of using NOESY type (14) of solution NMR method to study peptide-membrane interactions in various cases under MAS condition (15-17).

In this work, we present some latest results of high-resolution <sup>1</sup>H MAS NMR on several basic and aromatic amino acid methyl esters and designed model peptides to probe the contacts and locations of those amino acid residues in the lipid bilayers. All experiments are performed on either the Varian *InfinityPlus* 600 or 700 wide-bore solid-state NMR spectrometers using a 4mm T3 triple resonance probe with the single channel configuration. A proton rf power of 40-50 kHz is used in the experiments. A MAS speed of 6.25 kHz is maintained in all experiments, and the experimental temperature is regulated at 30°C, above the phase transition temperature of the lipid bilayers. For the two-dimensional <sup>1</sup>H MAS NOESY and <sup>1</sup>H FRDR (18) experiments, the spectra are obtained using a series of mixing time from 25 to 400 ms with 512 to 1024 *t*<sub>1</sub> increments. TPPI method (19) is used for phase-sensitive detection in the indirect dimension. 2D data are processed using a sine-bell window function in both dimensions. Linear prediction is performed in the indirect dimension to the same points as experimentally implemented. All spectra are referenced externally to TMS.

Local contacts between the peptide domain and lipid domain and within each domain have been closely examined through the <sup>1</sup>H MAS NOESY and <sup>1</sup>H FRDR experiments. Figure 1 shows the <sup>1</sup>H 1d

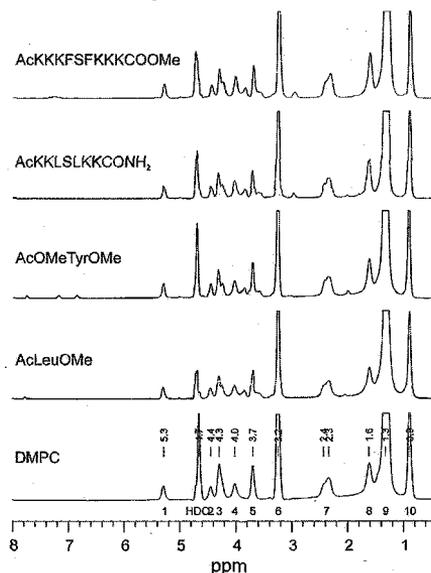
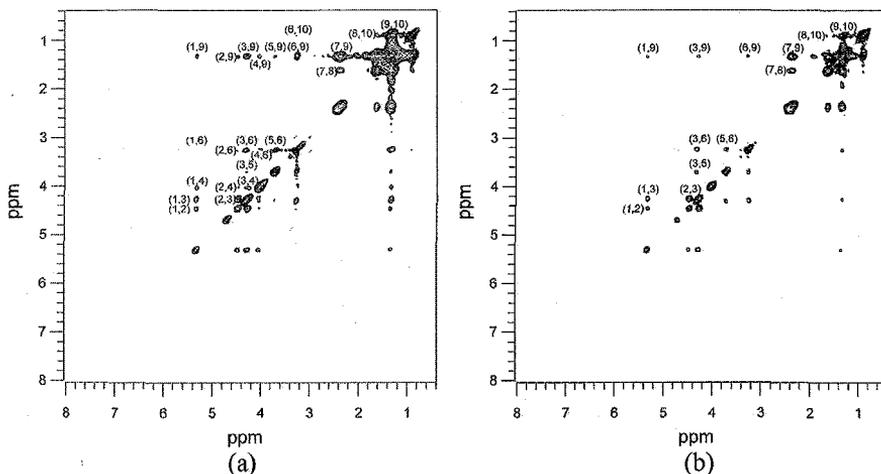


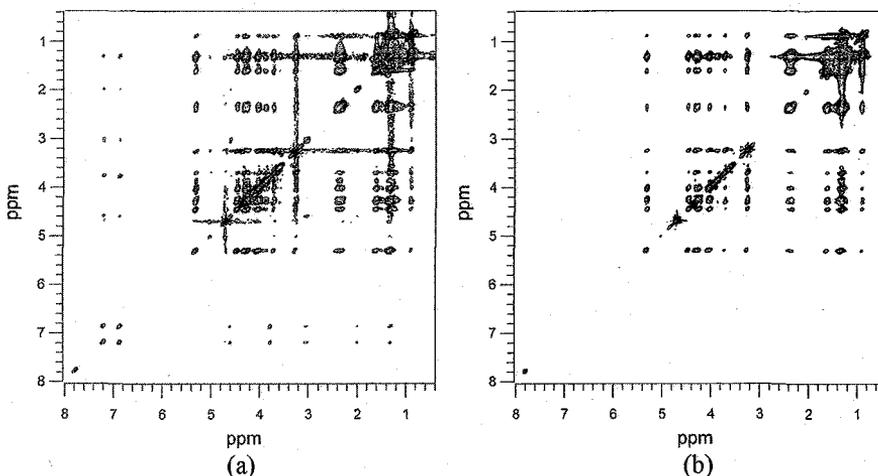
Figure 1. <sup>1</sup>H 1d spectra by direct excitation

spectra of the DMPC lipids, methyl esters and model peptides at 30°C and the MAS speed of 6.25 kHz by the direct excitation scheme. Figure 2 shows the  $^1\text{H}$  2d correlation spectra by NOESY scheme with 100 ms mixing time (a) and FRDR with 20 ms mixing time (b). Due to the different magnetization transfer mechanism, the RFDR experiment gives a better picture on the proton network in space.



**Figure 2.**  $^1\text{H}$  2D spectra of DMPC by NOESY (a) and RFDR (b)

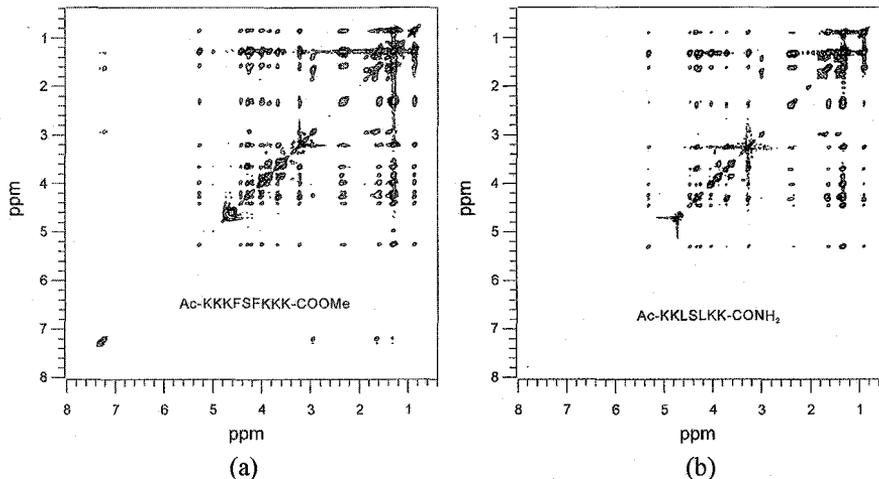
Figure 3 shows the  $^1\text{H}$  2d NOESY spectra on N-acetyl-O-methyl-L-tyrosine methyl ester (a) and N-Acetyl-L-leucine methyl ester (b) bound to DMPC/DMPG lipids (10:3) with a molar ratio of 1:20. A mixing time of 400 ms is used in the experiments. Figure 4 shows the



**Figure 3.**  $^1\text{H}$  NOESY 2D spectra of AcOMeTyrOMe (a) and AcLeuOMe (b)

RFDR spectra on peptides AcKKKFSFKKKCOOMe (a) and AcKKLSLKKCONH<sub>2</sub> (b) with the mixing time of 100 ms. The molar ratio between peptide and lipid is 1:50. Both experiments show that the aromatic residues Tyr and Phe locate in the hydrophobic core of

the lipid bilayers and interact only with the fatty acyl side chains, while as the basic residue Leu stays on the membrane surface and contacts with the lipid hydrophilic head-group.



**Figure 4.**  $^1\text{H}$  RFDR 2D spectra of AcKKKFSFKKKCOOMe (a) and AcKKLSLKKCONH<sub>2</sub> (b)

#### Reference:

- Hurley, J. H., and Misra, S. (2000) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 49-79
- Cho, W. H., and Stahelin, R. V. (2005) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 119-151
- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**(1), 585-590
- Zimmerberg, J., and McLaughlin, S. (2004) *Curr. Biol.* **14**(6), R250-R252
- Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2000) *Biopolymers* **55**(1), 4-30
- Tamm, L. K., Han, X., Li, Y. L., and Lai, A. L. (2002) *Biopolymers* **66**(4), 249-260
- Hong, H., Park, S., FloresJimenez, R. H., Rinehart, D., and Tamm, L. K. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129**(26), 8320-8327
- Bechinger, B., Aisenbrey, C., and Bertani, P. (2004) *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1666**(1-2), 190-204
- Huster, D. (2005) *Progress in NMR Spectroscopy* **46**(2-3), 79-107
- Baldus, M. (2006) *Angew Chem Int Ed Engl* **45**(8), 1186-1188
- Hong, M. (2006) *Structure* **14**(12), 1731-1740
- Zhang, W., Sato, T., and Smith, S. O. (2006) *Progress in NMR Spectroscopy* **48**, 183-199
- Oldfield, E., Bowers, J. L., and Forbes, J. (1987) *Biochemistry* **26**, 6919-6923
- Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., and Ernst, R. R. (1979) *J. Chem. Phys.* **71**(11), 4546-4553
- Davis, J. H., Auger, M., and Hodges, R. S. (1995) *Biophys. J.* **69**, 1917-1932
- Huster, D., Kuhn, K., Kadereit, D., Waldmann, H., and Arnold, K. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**(6), 1056-1058
- Zhang, W., Crocker, E., McLaughlin, S., and Smith, S. O. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**(24), 21459-21466
- Bennett, A. E., Ok, J. H., Griffin, R. G., and Vega, S. (1992) *J. Chem. Phys.* **96**, 8624-8627
- Marion, D., and Wuthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**(3), 967-974

第三日

9月13日(木)

日本語セッション

Day 3: 13 September, Thursday

(Japanese session)

## タンパク質主鎖の局所構造変化の解析

(1 横浜国立大、2 神戸薬科大、3 兵庫県立大)

○川村 出<sup>1</sup>、田辺 純子<sup>1</sup>、木原 尚樹<sup>1</sup>、和田 昭盛<sup>2</sup>、辻 暁<sup>3</sup>、内藤 晶<sup>1</sup>**Protein Backbone Conformations Corresponding to Retinal Configurations as Studied by Solid-State NMR**○ Izuru Kawamura<sup>1</sup>, Junko Tanabe<sup>1</sup>, Naoki Kihara<sup>1</sup>, Akimori Wada<sup>2</sup>, Satoru Tuzi<sup>3</sup>, Akira Naito<sup>1</sup><sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Yokohama National University,<sup>2</sup>Kobe Pharmaceutical University, <sup>3</sup>Department of Life Science, University of Hyogo

Backbone conformations near Tyr residues in bacteriorhodopsin (BR) corresponding to *all-trans* and *13-cis*, *15-syn* state in the dark were investigated for Tyr-X peptide bonds by using double amino acid labeling with [<sup>13</sup>C]Tyr, [<sup>15</sup>N]X-bR by means of REDOR-filtered experiments. We successfully detected <sup>13</sup>C NMR peaks deduced from Tyr26, 57, 64, 79, 150, 185 etc. In particular, two <sup>13</sup>C NMR peaks were observed for REDOR-filtered spectra of Tyr57, 79, and 185 in the dark, respectively. These two signals are attributed to the bR with *all-trans* and *13-cis* retinal. *All-trans* peak intensity was increased in the light adapted state as revealed by photo-illumination experiments, while the *13-cis* was increased for pressure-adapted state. These results clearly indicate that protein structures depend on the retinal configurations.

【序論】バクテリオロドプシン(BR)はプロトンポンプ機能をもつ高度好塩菌由来の膜タンパク質であり、7本の膜貫通ヘリックスと発色団レチナールで構成されている。BR中のレチナールは暗順応状態で *All-trans* 型と *13-cis*, *15-syn* 型が 1:1 で存在し、明順応状態では *All-trans* 型レチナールのみで存在する。また圧力順応状態では *13-cis*, *15-syn* 型レチナールの割合が増加する(Figure 1)。レチナールの異性化に対するタンパク質の応答は機能発現を理解する上で重要である。固体 NMR の REDOR 法を用いてレチナールの異性化によるタンパク質主鎖の構造変化を観測した。

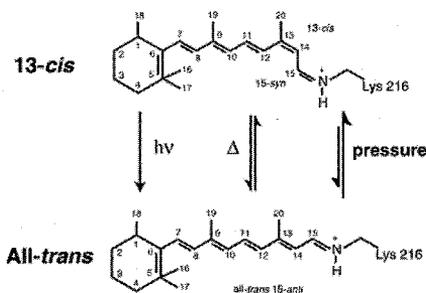


Figure 1. Isomerization pathways between *13-cis*, *15-syn* and *all-trans* retinal configurations in BR.

固体 NMR、REDOR Filter、レチナール、Backbone Conformation、膜タンパク質

かわむら いずる、たなべ じゅんこ、きはら なおき、わだ あきもり、つじ さとる、ないとう あきら

【実験】 同位体標識試料には、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}/[^{15}\text{N}]\text{Trp}$ -,  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}/[^{15}\text{N}]\text{Leu}$ -,  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}/[^{15}\text{N}]\text{Gly}$ -,  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}/[^{15}\text{N}]\text{Phe}$ -,  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}/[^{15}\text{N}]\text{Pro}$ -BR などの 7 試料をそれぞれ調製した。 $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  同位体標識した試料に異種核間の磁気双極子相互作用を選択的に復活させる REDOR 法を適用して、強い磁気双極子相互作用を有するタンパク質内のアミノ酸配列に由来する  $^{13}\text{C}$  NMR 信号を選択して観測した (REDOR Filter) [1]。測定は Chemagnetics CMX Infinity-400 FT-NMR 分光器、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  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  が直接結合している場合に REDOR 効果による信号の減衰が特に速くなり、多重標識試料からも他のアミノ酸と区別できるため、信号の帰属が可能となる。BR の明順応状態の測定には NMR に外部から導入したファイバーとジルコニア NMR 試料管にファイバーキャップを装着させることで、MAS 回転条件下で光を試料管内部に非接触に照射できるシステムを用いた[1-3]。この測定によって、BR のレチナルをすべて All-*trans* 型に異性化させた試料の測定から、All-*trans* 型に由来する Tyr の  $^{13}\text{C}$  NMR 信号を帰属した。

【結果と考察】 BR 中に存在する 11 の Tyr 残基の C 末端側に結合するアミノ酸の種類を考慮すると、単一の Tyr-X 配列をもつ Tyr が数多く存在する (Figure 2)。 $[^{15}\text{N}]\text{Phe}$ , Gly または Pro などの  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}-[^{15}\text{N}]\text{X}$ -BR 試料を用いて、REDOR Filter により C 末端側に各々のアミノ酸が結合した単独の Tyr のカルボニル炭素の  $^{13}\text{C}$  NMR 信号を観測した (Figure 3)。

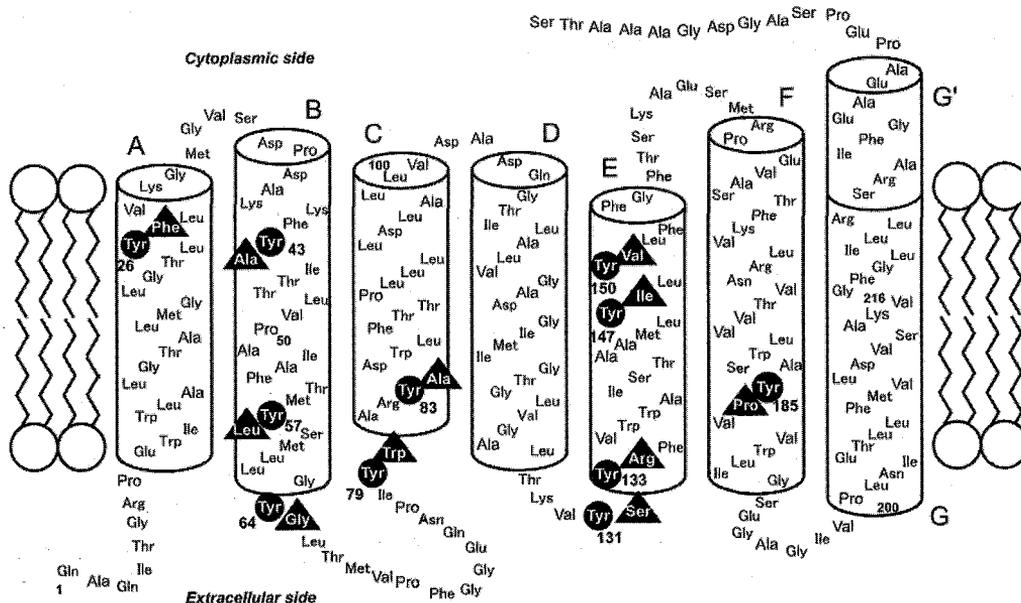


Figure 2. A schematic representation of the secondary structures in BR. The filled marks are shown as the consecutive sequence positions of  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}-[^{15}\text{N}]\text{X}$  in REDOR filtered experiments.

REDOR Filter による主な測定結果を Figure 4 に示す。Tyr26, 64, 150 に関してはそれぞれ 1 本の信号が得られた(Figure 4 A and B)。一方、Tyr185 の  $^{13}\text{C}$  NMR の信号は REDOR によって選択したにもかかわらず、177.7 ppm と 173.4 ppm の 2 本の信号が観測された (Figure 3, Figure 4 C)。この結果は暗順応状態ではほぼ同量存在する BR 中の 2 種類のレチナールに依存して、局所的に構造変化していると考えられる。このほかに Tyr57, 79 においても 2 本の信号が観測された。

BR のレチナールの配座は明順応状態と圧力順応状態によってコントロールでき、それぞれ All-trans と 13-cis, 15-syn 型の割合を増加させることができる (Figure 1)。レチナールを異性化させるために、MAS を利用した圧力印加と光照射システムを用いた。MAS の回転速度に依存して試料にかかる圧力でレチナールが 13-cis, 15-syn 型に異性化することがわかっており [2]、この異性化に伴い、Tyr185 の信号の 173.4 ppm の割合が増加する(Figure 4 D)。また明順応状態と暗順応状態で CP-MAS の差スペクトルを作ると、173.4 ppm から 177 ppm を含む領域に信号がシフトしていることがわかる(Figure 4 E)。この結果から、レチナールを異性化させた場合に Tyr57, 79, 185 はその異性化に応答して構造変化することがわかった。

Tyr57, 79, 185 の  $^{13}\text{C}$  NMR 信号が 2 本の信号を与えたこととそれらがレチナールの異性化に依存する理由をまとめる。レチナール近傍に Tyr185 が位置し、BR のレチナール結合部位から細胞外側へ伸びる水素結合ネットワークに Tyr57, 79 などが含まれ [4]、レチナールの異性化がネットワークを通してタンパク質の主鎖のコンフォメーションに影響を及ぼしていることが示唆された。レチナール近傍の Tyr を変異させるとプロトン輸送効率が減少することや 13-cis, 15-syn 型レチナールではプロトンポンプができないことなどを考えると、これらの Tyr が結ぶ水素結合のネットワークは機能に非常に重要であると示唆される。

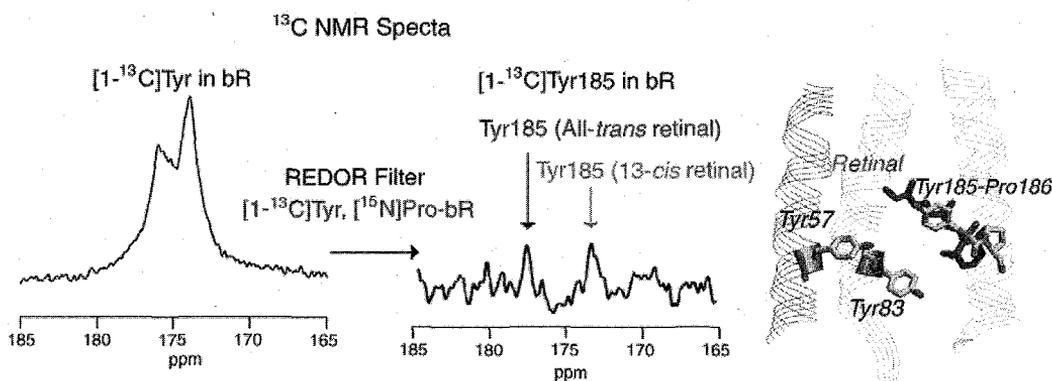


Figure 3.  $^{13}\text{C}$  CP-MAS spectrum of  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$ -bR, REDOR filtered signals of Tyr185 and structure of BR in the vicinity of retinal. The peak obtained from difference spectra between UNREDOR (Full Echo) and REDOR experiments can distinguish unique isotropic signal to directly bonded  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  from others using short  $\text{NcTr} = 2$  ms.

[1]

また BR のヘリックスバンドル外側にその側鎖を向けている Tyr26, 64, 150 [4] に関してはレチナールの異性化に敏感ではないことが明らかとなった。これらの結果から異性化に応答するタンパク質の構造変化は局所的であり、その変化は機能に重要であることが判明した。

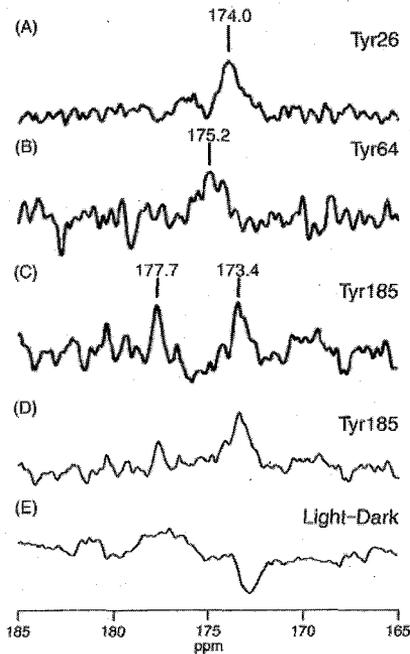


Figure. 4  $^{13}\text{C}$  REDOR filtered spectra of (A)  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}/[^{15}\text{N}]\text{Phe-bR}$ , Tyr26; (B)  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}/[^{15}\text{N}]\text{Gly-bR}$ , Tyr64; (C)  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}/[^{15}\text{N}]\text{Pro-bR}$ , Tyr185; and (D)  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}/[^{15}\text{N}]\text{Pro-bR}$  with pressure following longer accumulation, Tyr185(13-*cis* retinal rich). (E)  $^{13}\text{C}$  CP-MAS difference NMR spectra of  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$  between light and dark. [1]

【まとめ】 REDOR Filter 法を用いた BR の Tyr 主鎖の局所構造の解析結果から、BR 中の Tyr185, 57, 79 は暗順応状態の 2 つのレチナールの配座に対応して、2 つのコンフォメーションを取っていることを明らかにすることができた。この結果、BR のプロトン輸送経路に関わる Tyr のコンフォメーションはレチナールの異性化に強く依存し、プロトンポンプ機能において重要な局所構造変化と示唆された。

#### 【参考文献】

- [1] I. Kawamura et al. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129** 1016-1017.
- [2] I. Kawamura et al. (2007) *Photochem. Photobiol.* **83** 339-345.
- [3] 第 45 回 NMR 討論会講演要旨集、(2007) 京都、3LJ10 188-189.
- [4] H. Luecke et al. (1999) *J. Mol. Biol.* **291** 899-911.

## 脂質膜結合型生体分子運動性解析のための 新規固体 NMR 測定法開発

分子科学研究所 ○ 西村 勝之

Developments of New Solid State NMR Techniques to Study the Dynamics of  
Membrane Proteins and Lipid Bilayers under Physiological Sample Condition

Institute for Molecular Science, ○ Katsuyuki Nishimura

New solid state NMR techniques and approaches have been developed to study the dynamics of membrane protein and lipid bilayers under physiological sample condition on fully hydrated liposome. Motionally averaged weak  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronuclear dipolar interactions of peripheral membrane protein and lipids were accurately determined based on developed techniques of amplified observation of local field. Local mobility of proteins and lipids were analyzed in terms of dynamic order parameters for well resolved signals.

### <緒言>

固体 NMR を用いた膜タンパク質研究では微結晶や低水和率試料を用いた研究例が多い。しかし、膜表在性タンパク質は十分な水和率の試料条件下でなければ分子間凝集を生じ、本来の構造をとり得ない。本研究では十分に水和された極めて運動性の高い膜タンパク質および脂質膜中の脂質分子の運動性を定量的に解析するための新規固体 NMR 測定法開発を試みた。

完全水和されたマルチラメラベシクルに結合した生体分子の分子運動性を解析するために、分子運動により著しい平均化を受けた弱い  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  核間磁気双極子相互作用を MAS 下で復活させ、増幅して観測することにより、精度良く残留磁気双極子相互作用を決定する方法を開発した<sup>1)</sup>。実験的に決定した磁気双極子結合を静止値で規格化して、オーダーパラメーターを決定することにより、分子の運動性の定量化が可能である。発表では極めて運動性の高い完全水和条件下のマルチラメラベシクル中の脂質分子のオーダーパラメーターおよびマルチラメラベシクルに結合した膜表在性タンパク質の解析例<sup>2)</sup>を示す。

### <測定法>

本研究では低速 MAS 下での磁気双極子相互作用を増幅観測する固定時間型双極子磁場分離法(SLF)の開発を行った。Fig. 1 に等方化学シフトを再結像させるのに必要な最低

---

新規測定法 固体 NMR 脂質膜 運動性 水和

にしむら かつゆき

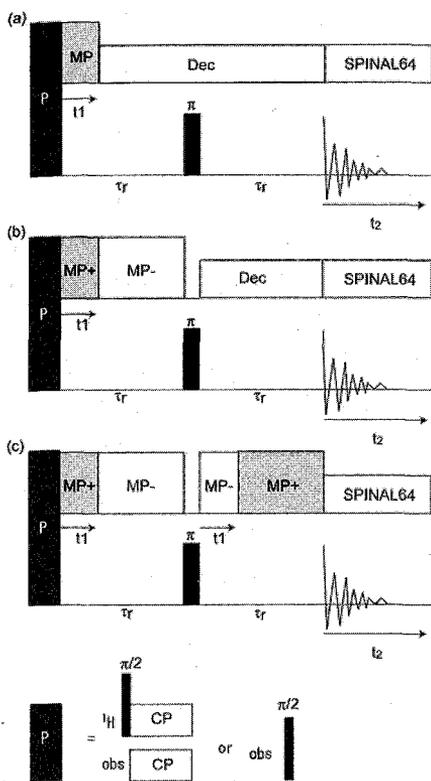


Fig.1 Constant time SLF pulse sequences under MAS for (a) conventional, (b) 2-fold, and (c) 4-fold amplified observation. MP+/- represents multiple-pulse for  $^1\text{H}$  homonuclear dipolar decoupling sequence to produce same form of average Hamiltonians for heteronuclear dipolar interaction with opposite signs. "P" indicates preparation pulse sequence such as CP or single pulse excitation.

倍に増強されたスペクトルが得られる。しかし本研究で対象とする著しく弱い磁気双極子相互作用では有意な磁気双極子相互作用スピニングサイドバンドは得られない。本研究では最小周期に対応する FID 数点を測定し、F2 側のみフーリエ変換する方法で信号強度の変化を反映するスライススペクトルを得た。この信号強度の変化に理論曲線を適用することにより、完全な 2 次元スペクトルを測定する場合に比べて著しく短時間に磁気双極子相互作用

ローター一周である 2 ローター周期を双極子発展期とした場合の一般的(a)、および今回開発した磁気双極子相互作用の時間推進を見かけ上(b)2 倍増幅、(c)4 倍増幅して観測する MAS 下での時間固定型双極子磁場分離法パルスシーケンスを示す。本測定法は試料回転による発熱、および遠心効果が無視できる低速 MAS を対象としている。MP は  $^1\text{H}$  同種核間磁気双極子相互作用を消去するマルチパルスであり、+/- は生じる異種核間磁気双極子相互作用の平均ハミルトニアンが同じ形で符号が反転する組み合わせを用いる。これには藤原らによって開発された BLEW12+/-<sup>3)</sup>等、目的に応じて同様な方法が使用可能である。一般的な方法(a)はリカップリングではない。一方(b)は MAS の回転と異種核間磁気双極子相互作用の符号が干渉してリカップリングを生じる。MP+ の時間推進と共に MP- が減少するために正味 2 倍の磁気双極子相互作用の時間推進が得られる。そのため(a)と比較して 2 倍の歳差角速度が得られる。これと同様な効果を持つものが Hong らによってすでに報告されている<sup>4)</sup>。さらに(c)では前者で時間推進に用いられていないスピンエコー以後の部位で同時に時間推進させることによりさらに 2 倍の歳差角速度が得られ、(a)と比較して 4 倍の歳差角速度となる。これにより同じ時間で磁気双極子相互作用による 4 倍の時間推進が得られる。Hong らによって(c)に相当する測定法が同様に報告されているが<sup>4)</sup>、本方法はそれと比較して半分の発展時間で同じ結果が得られる。 $T_2$  が短い試料で特に有効である。さらに、(b)、(c)共に  $^1\text{H}$  側で 180 パルスを用いないため、有限パルス幅の影響が回避できる。本測定法で FID 取り込み時期を試料回転周期の整数倍で増やして測定し、2次元フーリエ変換することにより磁気双極子相互作用に起因するスピニングサイドバンドが 2 倍、4

用が解析可能である。これ以上の増幅観測が必要な場合、発展時間を増加させて同様なシーケンスを追加することにより対応可能である。より高速な回転を用いても試料に影響が存在しない場合は異なるアプローチが存在する。

### <実験>

生体脂質膜のモデルとして不飽和脂質 POPC を用いて、1mM DTT、pH 7.4 20mM Tris、20mM NaCl、0.025% NaN<sub>3</sub> の緩衝液で完全水和マルチラメラベシクルを調製し固体 NMR 測定に用いた。試料調製の操作は脂質の酸化を防ぐために全て窒素雰囲気下で行った。POPC 観測には <sup>13</sup>C の磁化を直接励起した。測定には Varian 社製 INOVA400 分光器に日本電子製ナローボア固体 MAS 6mm プローブを用いた。温度調節はプローブ側のヒーターの仕様変更とアタッチメントの装着によって INOVA 溶液用温度調節器で行った。測定は 20 ± 0.2°C で行った。MAS の回転は日本電子社製のカウンターからの出力を Varian 社製の回転コントローラーへ導入し、MAS 回転速度は 2577 ± 2Hz で行った。繰り返し時間 4 s、各 FID は 5000 回ずつ積算し、測定はローター周期を 8 分割した 9 点の FID の取り込みを 2次元モードで行った。上述のように F2 側のみフーリエ変換する方法で信号強度の変化を反映するスライススペクトルを得た。<sup>1</sup>H デカップリングには SPINAL64<sup>2)</sup>、ラジオ波強度 28 kHz を用いた。MP には BLEW12+/-を用いた<sup>2)</sup>。

### <結果・考察>

完全水和したマルチラメラベシクルは極めて運動性が高く磁気双極子相互作用が平均化を受けており、CP 法を用いた場合アシル鎖の CH<sub>2</sub> 信号を除いて十分な信号が観測されないため天然存在比 <sup>13</sup>C 同位体の磁化をシングルパルスで直接励起して観測した。既存の報告例より高分解能なスペクトルが得られている。Fig.2 に4倍増幅型(a)、(b)、および通常型(c)、(d)を適用した場合の磁気双極子発展時間 0 のスペクトルおよび試料回転周期の中間の最も信号強度が減衰したスペクトルを各々示す。通常型の方法を用いた場合では多くの信号で(c)(d)間で差が見られない。一方 4 倍増幅型の(a)(b)間ではほぼ全ての信号で十分な信号減衰が観測された。低速型の SLF を近年一般的な 9.4T 以上の磁場下で結晶のような分子運動性の低い試料に適用すると化学シフト異方性に起因する多くのスピニングサイドバンドが生じ、スペクトルが煩雑になる。これを避けるためにはより高速な試料回転が必要であるが、MP の周期と試料回転周期が近くなるため現方法は適用できない。一方、生体分子が本来その活性を保持するような試料条件では、タンパク質、脂質共に極めて運動性が高く、異方的な相互作用は著しい平均化を受けており、このような問題は生じないため高速な試料回転は不要である。むしろ弱い外部振動を用いるほうが試料の状態の変化を回避できる。測定したスペクトルの信号減衰を CH 基、CH<sub>2</sub> 基、CH<sub>3</sub> 基は各々、2 スピン系、I<sub>2</sub>-S 3 スピン系、C3 軸周りの回転を考慮した 2 スピン系での解析を行った。既存の方法では解析が困難であった脂質の精密なオーダーパラメーターを局所的に解析し、運動性を評

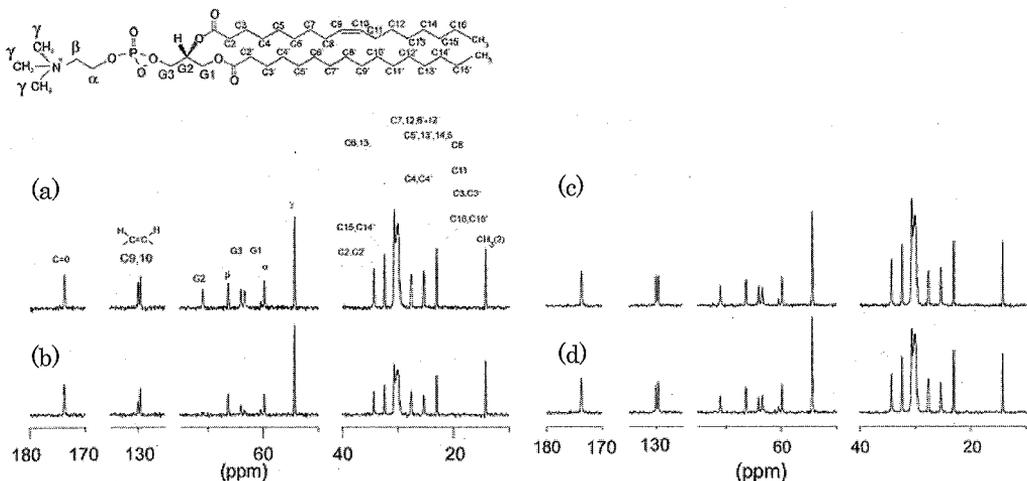


Figure. 2 The  $^{13}\text{C}$ -NMR slice spectra of fully hydrated POPC multi-lamella vesicles obtained from 4-fold amplified SLF (a), (c) and conventional SLF (c), (d), under MAS, respectively. Control experiment ( $t_1=0$ ) (a), (c) and maximum signals reductions ( $t_1=\tau_r/2$ ) (b), (d).

価した。発表では分離した全ての POPC の信号に対して決定したオーダーパラメーターの結果を報告する<sup>1)</sup>。

また本測定法は極めて運動性の高い膜タンパク質でも極めて有効な解析であり<sup>2)</sup>、発表では膜表面タンパク質 PLC- $\delta 1$  PHドメインへ適用した例も報告するが、この詳細は上釜らのポスター発表においても報告する(詳細は上釜の予稿を参照)。このように膜タンパク質へ本測定法を適用することにより、膜タンパク質の局所運動性、および相互作用している脂質分子の局所運動に関する知見が同時に得られる。

#### 参考文献

- 1) K. Nishimura, submitted 2007.
- 2) A. Uekama, M. Okada, H. Yagisawa, and S. Tuzi, K. Nishimura, submitted 2007
- 3) T. Fujiwara, T. Shimomura, and H. Akutsu, *J. Magn. Reson.* **124**, 147–153 (1997)
- 4) M. Hong, J. D. Gross, C. M. Rienstra, R. G. Griffin, K. K. Kumashiro, and K. Schmidt-Rohr, *J. Magn. Reson.* **129**, 85–92 (1997)

## ワーク系におけるプロトンダイナミクス

(産総研計測フロンティア) 尾身 洋典、鈴木 浩一、○林 繁信

Proton dynamics in the hydrogen bond network system of inorganic solid acid salt  $\text{Cs}_3(\text{HSO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)$ 

(Research Institute of Instrumentation Frontier, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

Hironori Omi, Koh-ichi Suzuki and Shigenobu Hayashi

Inorganic solid acid salts have much attracted attention as candidates for solid electrolytes in fuel cells. In the present study,  $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$  CP/MAS NMR spectra of  $\text{Cs}_3(\text{HSO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)$  were measured at room temperature in order to assign the complicated  $^1\text{H}$  MAS NMR spectra. The highest frequency peak was assigned to P-O-H-O-P, which was consistent with the crystal structure. The stronger hydrogen bond of P-O-H-O-P suppresses the  $\text{PO}_4$  reorientation, rather than other hydrogen bonds do.

【序】  $\text{CsHSO}_4$  などに代表される無機固体酸塩では、 $\text{AO}_4$  型の四面体イオン ( $\text{A} = \text{S}, \text{P}$ ) 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、無加湿の状態、かつ  $100^\circ\text{C}$  以上の温度において高いプロトン伝導性を示すために中温作動型燃料電池の固体電解質の有力な候補として注目されている。我々のグループでは、これまでに幾つかの硫酸塩や硫酸-リン酸混合塩について研究を行い、 $\text{SO}_4$  ( $\text{PO}_4$ ) 四面体の回転運動がプロトン並進拡散の律速過程であることを明らかにしてきた。 $\text{Cs}_3(\text{HSO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)$  は  $408\text{K}$  で高温相に相転移するが、低温相において既にプロトン拡散が観測されている [1]。前回、 $^1\text{H}$  MAS NMR スペクトルの温度変化測定の結果を報告した [2]。スペクトルは複雑な線形の変化を示した。今回、 $^{31}\text{P}$  から  $^1\text{H}$  へのクロスポーラリゼーション測定を行ってスペクトルの帰属を試みたので、その結果について報告する。

【実験】 NMR 測定には、水溶液から合成した  $\text{Cs}_3(\text{HSO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)$  の粉末試料を  $350\text{K}$ 、真空排気下で加熱乾燥させたものを用いた。 $^1\text{H}$  および  $^{31}\text{P}$  MAS NMR の測定は、Bruker ASX400 (共鳴周波数  $^1\text{H}$ :  $400.13\text{MHz}$ 、 $^{31}\text{P}$ :  $161.98\text{MHz}$ ) を用いて行った。

【結果・考察】  $\text{Cs}_3(\text{HSO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)$  の H には結晶学的に非等価なサイトが 5 つあり、P-O-H-O-P が 2 つ、P-O-H-O-Si が 2 つ、S-O-H-O-Si が 1 つある。それに対応して、 $^1\text{H}$  MAS NMR スペクトルは複雑な線形を示す。 $^1\text{H}$  と  $^{31}\text{P}$  との相互作用の大きさの違いを

プロトンダイナミクス、固体 NMR、無機固体酸塩、水素結合、プロトン拡散

おみ ひろのり、すずき こういち、はやし しげのぶ

利用してシグナルの帰属が可能であると  
考えられる。そこで、 $^{31}\text{P}$  から  $^1\text{H}$  へのクロ  
スポーラリゼーション測定を行った。Fig.  
1 に、室温におけるスペクトルのコンタ  
クトタイム依存性を示した。2 ms ほどでシ  
グナルの強度、形ともにはぼ一定となっ  
た。

コンタクトタイムが短い領域における  
シグナル強度を詳細に見てみると、Fig. 2  
に示すような複雑な変化を示した。 $^1\text{H}$  濃  
度が比較的少ないため、 $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  のスピン  
ペアが孤立したような状態になっているた  
めに生じた現象と考えられる。シグナル強  
度が振動する現象は 15.65 ppm のシグナル  
にもっとも顕著に表れており、このシグナル  
が P-O-H-O-P であると推測される。

$^1\text{H}$  化学シフト値と水素結合距離(O-H  
...O)には式(1)のような相関があることが  
知られている。

$$\delta_{\text{iso}} = 79.05 - 255d(\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}) \quad (1)$$

ここで  $\delta_{\text{iso}}$  (ppm) は化学シフトの等方値、  
 $d(\text{O}-\text{H}\cdots\text{O})$  (nm) は O-H...O 距  
離である。結晶構造から、  
P-O-H-O-P 水素結合の方が、  
P-O-H-O-S や S-O-H-O-S 水素結合  
より O-H...O 距離が短い。この  
ことから、15.65 ppm が P-O-H-O-P  
に帰属され、上記の推測と一致し  
ている。以前に報告したスペクトル  
の温度変化は、P-O-H-O-P 水素  
結合の方が、P-O-H-O-S や  
S-O-H-O-S 水素結合よりも切断さ  
れにくいこと示している。

#### 【参考文献】

- [1] K. Suzuki and S. Hayashi, *Solid  
State Ionics*, **177**, 2873 (2006).  
[2] 尾身、鈴木、林、第 45 回 NMR  
討論会、京都 (2006).

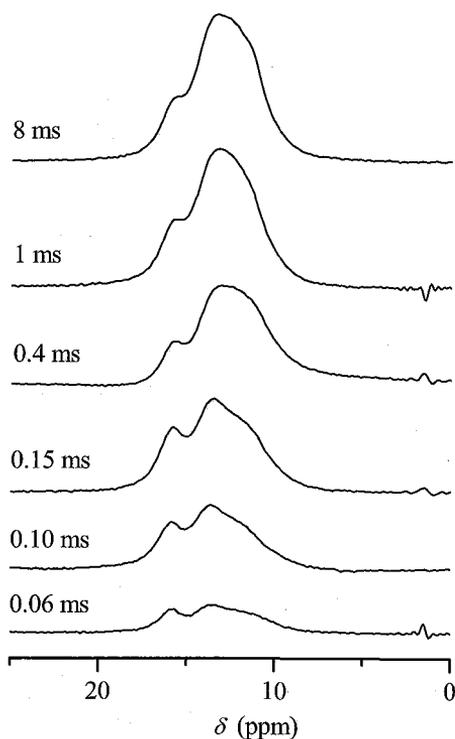


Fig. 1.  $^1\text{H}$  CP/MAS NMR spectra  
cross-polarized from  $^{31}\text{P}$ . The times  
in the figure are contact times.

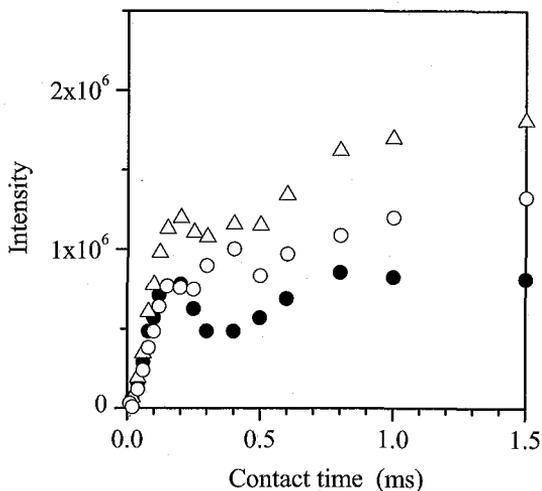


Fig. 2. Contact time dependence of the signal  
intensity in  $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$  CP/MAS NMR spectra.  
●: 15.65 ppm, △: 13.35 ppm, ○: 11.37  
ppm.

## ホウケイ酸アルミニウム系ガラスの詳細構造解析

旭硝子(株) ○関 庚薫、山本 清  
物質・材料研究機構 村上 美和、丹所 正孝、清水 禎

Coordination structure of boroaluminosilicate glasses  
studied by 21.8T high field NMR spectroscopy

Asahi Glass Co., Ltd.

Kyon Hun Min, Kiyoshi Yamamoto,

National Institute for Materials Science

Miwa Murakami, Masataka Tansho, Tadashi Shimizu

Coordination structures of boron and aluminum affect physical properties of boroaluminosilicate glass. Although solid state NMR is a powerful tool for their determination, the accuracy of their compositions has been insufficient. Both  $^{11}\text{B}$  and  $^{27}\text{Al}$  are quadrupole nuclei whose quadrupole coupling makes NMR peaks broadened and complicated. The influence of quadrupole coupling is suppressed by high field NMR. In this paper, we have studied the coordination structure of heat treated boroaluminosilicate glass ( $65\text{SiO}_2-25\text{B}_2\text{O}_3-5\text{Al}_2\text{O}_3-5\text{CaO}$ ) using 21.8T high field NMR. The contents of  $\text{BO}_{3\text{ring}}$  and  $\text{BO}_{3\text{non-ring}}$  show the local maximum and minimum at  $750^\circ\text{C}$ , respectively. The local minimum and maximum can be provided by a progress of phase separation and a ring opening of a boroxol group.

## 1. はじめに

ホウ素とアルミニウムの配位組成は、ガラス材料にとって重要な構造因子である。配位組成の解析は、従来から固体 NMR により行われてきた<sup>1)</sup>。しかしながら、ホウ素、アルミニウムの何れの核についても、四極子結合の存在により、その NMR スペクトルの線形が複雑化、広幅化する。このため、配位組成の解析における定量性が不足していた。四極子結合の影響は、一般的に高磁場の NMR を用いることで低減できる。ホウケイ酸アルミニウム系ガラスは、 $650^\circ\text{C}$ 以上で熱処理を行うことでケイ酸相とホウ酸相に分離し、また、より高温で処理することで相分離が進行することが知られてい

る<sup>2)</sup>。しかしながら、相分離に伴う配位組成の変化については、十分知られていない。本報では、21.8T 高磁場固体 NMR を用いることで、ホウケイ酸アルミニウム系ガラスについて、熱処理に伴う配位組成の変化を明らかにする。

## 2. 実験方法

試料の組成は、 $65\text{SiO}_2\text{-}25\text{B}_2\text{O}_3\text{-}5\text{Al}_2\text{O}_3\text{-}5\text{CaO}$ (mol)である。本試料は、 $600^\circ\text{C}$ 以上の温度で処理を行うことで分相する。試料は、そのまま、もしくは所定の温度で3hr加熱処理したものを測定に供する。処理温度は、 $600^\circ\text{C}$ 、 $700^\circ\text{C}$ 、 $750^\circ\text{C}$ 、 $800^\circ\text{C}$ 、 $875^\circ\text{C}$ の5水準とする。

NMR測定には、日本電子社製ECA930(21.8T)を用いた。観測核は、 $^{11}\text{B}$ および $^{27}\text{Al}$ である。 $^{11}\text{B}$ 核の観測条件は、共鳴周波数： $298.36\text{MHz}$ 、 $90^\circ$ パルス幅： $1.7\mu\text{s}$ 、フリップアングル： $30\text{deg}$ とする。データ積算における待ち時間： $10\text{s}$ 、ポイント数： $4,096$ 、MASの速さ： $約16\text{kHz}$ 、積算回数： $16$ 、フーリエ変換処理におけるBF値： $20\text{Hz}$ とする。 $^{27}\text{Al}$ 核の観測条件は、次の通り。共鳴周波数： $242.33\text{MHz}$ 、 $90^\circ$ パルス幅： $2.95\mu\text{s}$ であり、フリップアングル： $30\text{deg}$ 、データ積算における待ち時間： $1\text{s}$ 、ポイント数： $4,096$ 、MAS： $約16\text{kHz}$ 、積算回数： $256$ 、フーリエ変換処理におけるBF値： $100\text{Hz}$ 、とする。 $^{11}\text{B}$ 核化学シフトの一次基準には三フッ化ホウ素エチルエーテルを、二次基準は飽和ホウ酸水溶液( $19.6\text{ppm}$ )をそれぞれ用いた。 $^{27}\text{Al}$ 核化学シフトの基準には、 $1\text{mol/l}$ の硝酸アルミニウム水溶液を用いた。

## 3. 実験結果と考察

試料の典型的な $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを Fig. 1 に示す。 $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルは、ガウス型の理論曲線 3 本に分離可能であり、これらは、高磁場側から  $\text{BO}_4$ 、 $\text{BO}_{3\text{non-ring}}$ 、 $\text{BO}_{3\text{ring}}$  にそれぞれ帰属できる。3 配位ホウ素には、多くの場合四極子結合が存在し、複雑な $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルを示す。ガラス試料の場合、その構造を反映して化学シフトに分

布が存在する。21.8T と高磁場である装置により  $^{11}\text{B}$  NMR でスペクトルを取得する場合、化学シフトの分布に比べ、四極子結合による線幅の広がりとは十分小さい。このため、ガウス型の理論曲線でスペクトルの分離ができると考えられる。

$^{11}\text{B}$  NMR スペクトルのピーク強度比から配位組成を算出し、試料の処理温度との関係をプロットした (Fig. 2)。 $\text{BO}_4$  の比率は 5% であり、熱処理条件によらず一定している。これに対して、 $\text{BO}_{3\text{ring}}$  と  $\text{BO}_{3\text{non-ring}}$  の比率は、処理温度が  $750^\circ\text{C}$  の場合に、それぞれ極大および極小を示す。試料は、 $650^\circ\text{C}$  以上で熱処理を行うことでケイ酸相とホウ酸相に分離し、また、より高温で処理することで相分離が進行することが知られている<sup>2)</sup>。 $\text{BO}_{3\text{ring}}$  は、ホウ酸相の内部に多く、ケイ酸相との界面には少ないと考えられる。この考えに従えば、高温処理により相分離が進行すると、ホウ酸相のドメインサイズが巨大化し、 $\text{BO}_{3\text{ring}}$  が増大する。より高温で処理すれば、相分離は進行し、 $\text{BO}_{3\text{ring}}$  が増大すると推察される。実験事実は異なり、 $875^\circ\text{C}$  処理品は、 $800^\circ\text{C}$  処理品に比べ  $\text{BO}_{3\text{ring}}$  が少ない。これは、熱エネルギーによりホウ酸環化学結合が部分的に切断され、 $\text{BO}_{3\text{ring}}$  が  $\text{BO}_{3\text{non-ring}}$  に変化すると考えることが妥当である<sup>3)</sup>。この2つの現象を考慮すれば、 $750^\circ\text{C}$  の処理温度で、 $\text{BO}_{3\text{ring}}$  の比率が極大を示すことが説明できる。

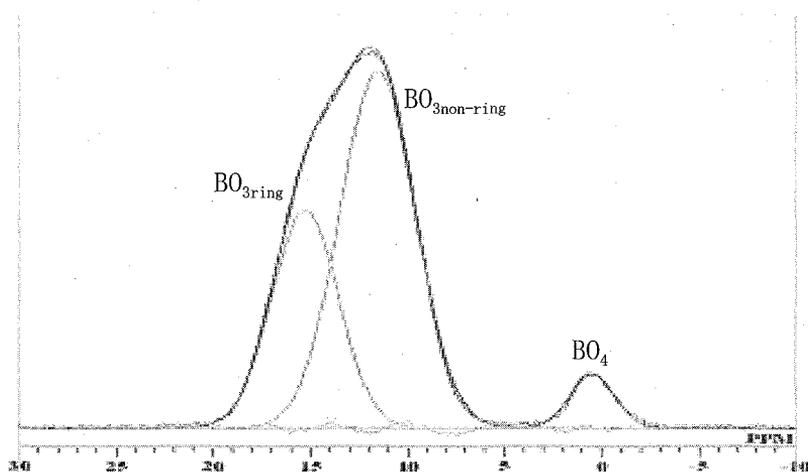


Figure 1  $^{11}\text{B}$  NMR spectrum of borosilicate glass. NMR spectrum is deconvoluted with gaussian curves.

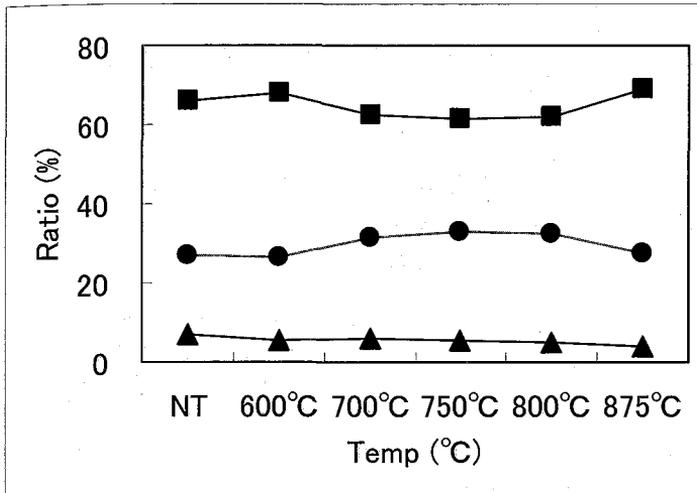


Figure 2 The composition of boron.

■, ●, ▲ denote BO<sub>3non-ring</sub>, BO<sub>3ring</sub> and BO<sub>4</sub> respectively.

#### 4. まとめ

ホウケイ酸アルミニウムについて、熱処理と配位構造の関係を明らかにした。21.8T 高磁場 NMR を用いることで、ホウ素の配位組成定量が、高い精度で実施できる。

#### 参考文献

- 1) A. H. Silver and P. J. Bray, J. Chem. Phys. 29 (1958) 5.
- 2) T. Nakashima, New Glass 3-3 (1989) 20.
- 3) J. Krogh-Moe, J. Non-Cry. Solids 1 (1969) 269.

キーワード boroaluminosilicate glass, coordination structure

著者ふりがな みんな きよんぶん、 やまもと きよし、 むらかみ みわ、 たん  
しよ まさたか、 しみず ただし

(独)産業技術総合研究所 固体高分子形燃料電池先端基盤研究センター(FC-Cubic) ○貴傳名 甲・竹岡 裕子

Diffusion coefficient measurement of water in polymer electrolyte membrane under controlled temperature and humidity

FC-Cubic, AIST ○Koh Kidena, Yuko Takeoka

Polymer electrolyte membrane (PEM) is one of the key materials in a polymer electrolyte fuel cell. One of the functions of the PEM is to pass proton which is produced electrochemical reaction of molecular hydrogen at the anode side. Therefore, behavior of proton in the membrane is one crucial topic of the research to understand functionality of the PEM. This study treats diffusion coefficient (D) of proton nuclei contained in the PEM as an important parameter. D was estimated under various temperature and humidity, in a systematic way. For the PEM, several kinds of samples were used. The effect of humidity on diffusion behavior, and anisotropy of D value will be discussed.

### 1. はじめに

固体高分子形燃料電池(PEFC)における鍵となる材料の一つである高分子電解質膜(PEM)にはさまざまな性能が要求される。その中でもプロトン伝導は燃料電池が作用するために欠かせない物性である。家庭用、車載用のPEFCの本格的な実用化に向けて鋭意、研究開発が進められているところであるが、我々はPEMの構造設計を基礎的知見から行うことを目的として種々分析を進めている。そのなかで、膜中に存在するプロトンの挙動は非常に重要であり、特にできるだけ燃料電池の操作条件における把握が重要である。本研究では、プロトン挙動を指し示す一つのパラメータとして自己拡散係数に着目し、パルス磁場勾配NMRを用いた測定を行った。測定は温度・湿度条件を幅広い範囲でコントロールし、いくつかのPEM試料を対象に行った。

### 2. 実験方法

パルス磁場勾配による自己拡散係数測定には日本電子製 ECA-500 を用い、典型的な条件として、拡散時間  $\Delta = 20\text{ms}$ 、磁場勾配パルス幅  $\delta = 1\text{ms}$ 、磁場勾配強度 = 可変(最大  $13.3\text{T/m}$ )として測定を行った。電解質膜を適切なサイズ、形状の切片に切り出し、 $3\text{mm}$   $\phi$  の試料管に充填したのち所定の温度・湿度に保ったチャンバー(Espec 製 SH-241)内にセットし、封入したものを  $5\text{mm}$   $\phi$  の試料管に入れ、測定に供した。NMRプローブ部に備えた温度可変機構によって試料管を所定温度に保ち、所定温度・湿度におけるデータを得た。

---

キーワード: 燃料電池、高分子電解質膜、パルス磁場勾配、拡散係数

著者ふりがな: きでな こう・たけおか ゆうこ

### 3. 結果および考察

市販品である、Nafion<sup>®</sup>について、フル加湿状態の試料二種類 (F-1,2) を用いて温度を変えて測定を行ったデータを Fig.1 に示す。同様の試料かつ温度領域で報告例 [1] があるとおり、拡散係数 (D) はこの範囲の温度に対して単調に増加し、 $1/T$  に対する  $\log D$  のプロットにより整理できる。今回測定した二種類の試料においては得られた値に大きな差異は見られなかった。この二種類の試料は化学構造が同一と考えられ、膜厚のみが異なるため、差は生じにくい。

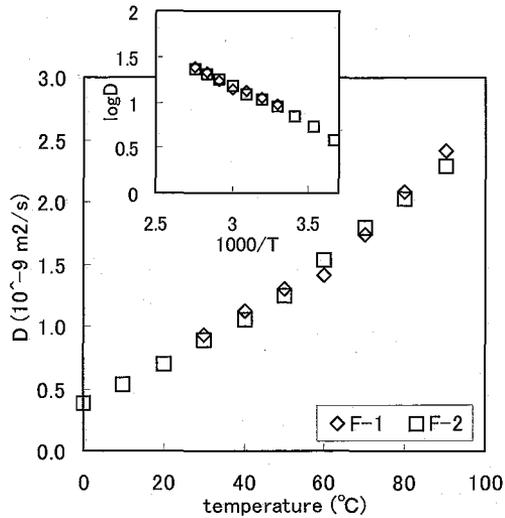


Fig.1 Diffusion coefficient for two kinds of Nafion<sup>®</sup> samples (fully humidized) at various temperature.

次に、炭化水素系を含めた五種類の電解質膜試料について、湿度コントロール条件下、プロトン拡散係数の測定を行った (Fig.2)。その結果、試料による差は顕著であり、特に炭化水素系 (HC-1,2,3) の差が大きいことがわかった。フッ素系 (F-1,3) については、それぞれ製膜方法が異なっており、低湿度部分において明確な差が見られた。フッ素系と炭化水素系については、化学構造はもとより、プロトンが移動する経路も大きく異なっていることから、このような差が現れたといえる。プロトンが移動する経路と関連してさらに以下の実験を行った。

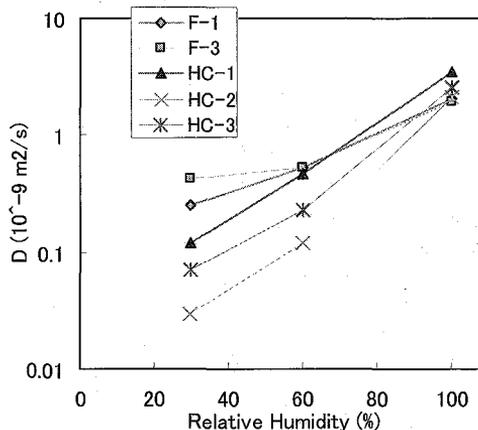


Fig.2 Diffusion coefficient for five kinds of PEMs at 80°C and various relative humidity.

測定試料の NMR 試料管へのサンプリング手法として、膜材料を細かくするなどして均一に充填する方法が多くの報告例において用いられているものと思われるが、本研究ではパルス磁場勾配の軸方向について、膜材料を方向をそろえて、垂直および水平方向に設置して測定を行った。このことにより、それぞれ膜厚および膜面方向の拡散係数を評価できるものと考えられる。それぞれの充填方法により測定を行った結果、値に差が見られる系があることを見出した。

#### 参考文献

[1] e.g., A.S.Arico *et al.*, *J. Memb. Sci.* 2006, 270, 221-227.

# 固体及び溶液 NMR によるテトラフルオロエチレン

## ープロピレン交互共重合体の構造解析

東京工業大学・院・理工 ○黒木重樹

Structural Investigation of Tetrafluoroethylene-Propylene Alternating Copolymer using Solid and Solution State NMR

Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology  
Shigeki Kuroki

Tetrafluoroethylene-propylene (TFE-P) alternating copolymers were the first fluoroelastomers where a non-fluorinated alkene comonomer was used. They were synthesized by radical copolymerization and possess the typical characteristics of this group of elastomers—high thermal and chemical resistances, good mechanical properties, excellent dielectric properties, etc.<sup>1</sup> Several authors have analyzed the microstructure of TFE-P copolymers by <sup>1</sup>H and <sup>19</sup>F NMR.<sup>2-4</sup> But the <sup>19</sup>F NMR spectra of TFE-P copolymers were very complicated mainly by F-F *J* couplings and an accurate signal assignment was very difficult. In the present work, the simplified <sup>19</sup>F NMR spectra of TFE-P copolymers in solution and solid state were measured by *J*-resolved technique and the signals were assigned accurately. Further, the conformation of TFE-P copolymers in solution and solid state were discussed with quantum chemical calculations.

【緒言】テトラフルオロエチレン

(TFE)ープロピレン (P) 交互共重合体 (Fig.1) は 1975 年旭硝子により上市されたフルオロエラストマーで、①230°C以上の連続使用温度を有する優れた耐熱性②高温下の強酸・強塩基にも耐える抜群の耐薬品性③10<sup>15</sup>—10<sup>16</sup>Ω/cm の体積固有抵抗を示す優れた電気特性、などの特徴<sup>1</sup>を有する。また、フルオロエラストマーの中でパーオキサイド加硫を可能にした最初の例である。

TFE-P 交互共重合体は、TEF および P モノマーの高度な交互連鎖から成り立ち、THF などの有機溶媒に可溶なことからその微細構造が溶液 <sup>19</sup>F NMR から調べられている。<sup>2-4</sup> しかしながら、そのスペクトルは F-F 間の *J* 結合などから大変複雑であり、帰属は困難を極めていた。また、溶液中においても溶媒や温度を変化させるとスペクトルが変化することから、溶液中においても平均的なコンホメーションの変化が起きていることが示唆されている。このようなことから、本研究では溶液および固体状態における NMR スペクトルを単純化し、各々の信号の帰属を容易にすることで、量子化学計算と組み合わせて、溶液および固体状態での TFE-P 交互共重合のコンホメー

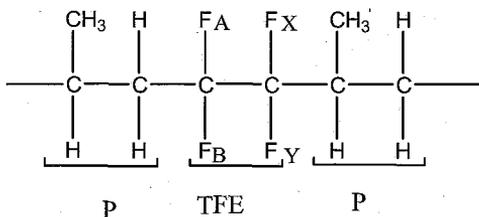


Fig.1 Chemical structure of TFE-P alternating copolymers

テトラフルオロエチレンープロピレン交互共重合体 / コンホメーション /  
<sup>19</sup>F および <sup>13</sup>C NMR

くろき しげき

ションを議論した。

[実験および計算]今回用いた試料 TEF-P 交互共重合体は、旭硝子(株)から購入した商標アプラス#100である。ガラス転移点は $-3^{\circ}\text{C}$  ~  $-13^{\circ}\text{C}$ である。溶液および固体 NMR スペクトルは BrukerBiospin 社 DSX300 分光器を用いて測定を行った。量子化学計算は Gammess を使い、6-31G(d,p)基底で構造最適化を行い、その構造を用いて NMR 遮蔽定数計算を行った。

[結果と考察] 溶液 NMR : Fig.2 (a) に室温で測定した THF 中の TEF-P 交互共重合体の  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトルを示す。前述したように、F-F 間の  $^2J$  結合の効果で信号が重なり合い複雑になっている。そこで、 $^{19}\text{F}$  同種核  $J$  分解法を用いてスペクトルを単純化した。その結果の 2 次元スペクトルを Fig.3 に、 $f_2$  軸の  $J$  結合フリーの 1 次元スペクトルを Fig.2 (b) に示す。Fig.2(b)のスペク

トルは Fig.2 (a) と比較してかなり単純化されており、小さな信号を除き、8 つのメインの信号が観測されていることがわかる。それらに高周波数側から 1~8 のようにインデックスをつけた。また、Fig.3 から各々の信号の F-F 間の  $^2J$  結合定数を求めることができる。過去の報告から、 $\text{CH}_2$  基に隣り合った  $\text{CF}_2$  (Fig.1 中の  $\text{F}_{\text{AB}}$ ) 間の  $^2J$  結合定数は 263Hz、 $\text{CH}(\text{CH}_3)$  基に隣り合った  $\text{CF}_2$  (Fig.1 中の  $\text{F}_{\text{XY}}$ ) 間の  $^2J$  結合定数は 271Hz ということがわかっている。したがって、高周波数側の 1,2,3 の信号は  $\text{F}_{\text{AB}}$  に帰属でき、4,5,6,8 は  $\text{F}_{\text{XY}}$  に帰属できる。7 は  $^2J$  結合は観測されていないので、TFE-TFE 連鎖からの信号であることがわかる。

つぎに、それぞれの信号の相関をみるため COSY 実験を行った。その結果、1 と

2,3 間および 4 と 8 間、5 と 6 間の強い相関が見られ、これは  $J$  分解法でも示された  $\text{F}_A\text{-F}_B$  間および  $\text{F}_X\text{-F}_Y$  間の  $^2J$  結合に帰属される。さらに 1 と 5、1 と 8、2 と 4、3 と 6 の間に弱い相関が見られた。これは  $\text{F}_{\text{AB}}\text{-F}_{\text{XY}}$  間の  $^3J$  結合に帰属できる。この結果から、1,2-4,8、1,3-5,6 の二組の  $\text{F}_A\text{F}_B\text{-F}_X\text{F}_Y$  が帰属でき、この二組は立体配座の違いによるものと考えられる。

同じ炭素に結合した F つまり、 $\text{F}_A$  と  $\text{F}_B$ 、 $\text{F}_X$  と  $\text{F}_Y$  の化学シフトが異なることは溶液中においても主鎖周りの運動が束縛されているところがあり、主鎖周りのコンホメーションの影響があることを意味

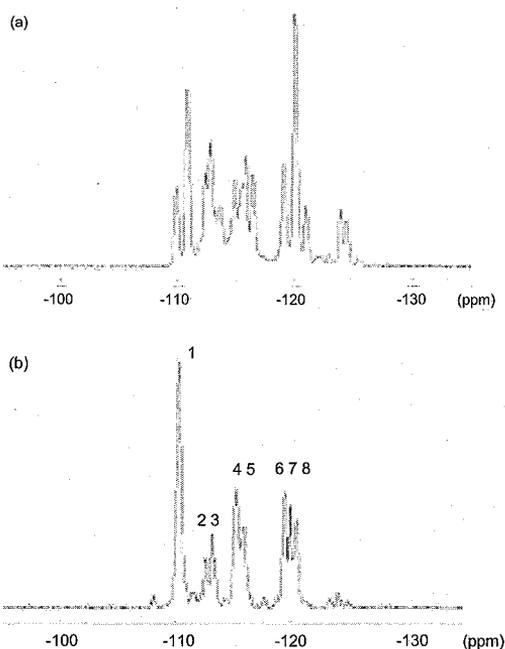


Fig.2  $^{19}\text{F}$  solution state NMR spectra of TFE-P alternating copolymer at room temperature by a simple single pulse experiment(a) and a  $J$  resolved experiment(b).

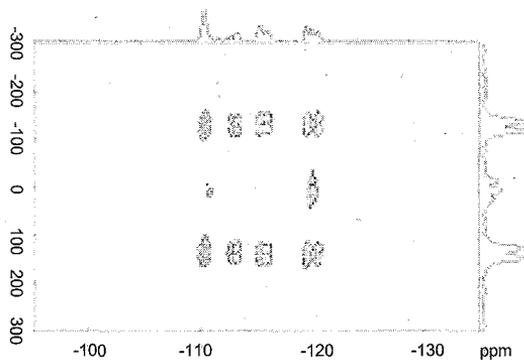


Fig.3  $^{19}\text{F}$  2D- $J$  resolved NMR spectrum of TFE-P alternating copolymer at room temperature.

している。

Fig.4に温度可変  $^{19}\text{F}$ J 分解 NMR スペクトルを示す。温度によって化学シフトが大きく変化している。特に1および8の信号が温度が低温になるにつれて低周波数側に大きくシフトしている。この変化は平均値としての高分子主鎖のコンホメーション変化を反映しているものと考えられる。

固体 NMR: Fig.5に室温および  $95^\circ\text{C}$ における TFE-P 交互共重合体の固体  $^{19}\text{F}$  34KHzMASNMR スペクトルを示す。固体状態、室温においても Fig.2の溶液 NMR スペクトルと同様の線形のスペクトルが得られているが、ガラス転移点よりも高温にもかかわらず、F-F間の双極子-双極子相互作用が消去されずに各々の信号が広幅化している。 $-80$  ppmの信号は  $\text{CF}_3$  末端に帰属される。最も強度の高い低周波数側の信号は TFE-TFE 連鎖からの信号である。一方、 $95^\circ\text{C}$ においては、F-F間の双極子-双極子相互作用が分子運動によって平均化され、溶液 NMR スペクトル同様に F-F間の  $^2\text{J}$ 結合の効果が見られている。

ここで、 $85^\circ\text{C}$ での  $^{19}\text{F}$ 同種核 J分解スペクトルを Fig.6に示す。 $f_1$ 軸のスペクトルは Fig.3の溶液スペクトルと比較すると、かなり広幅であるが、Fig.5(b)における多重線は F-F間の  $^2\text{J}$ 結合の効果によることが明らかである。

Fig.7に  $85^\circ\text{C}$ での  $^{19}\text{F}$ COSY スペクトルを示す。この結果も、溶液 COSY スペクトルと同様の帰属ができる。したがって、Fig.6および7の図中の1,2は  $F_{AB}$ に帰属でき、3,4は  $F_{XY}$ に帰属できる。6,7,8は TFE-TFE 連鎖および末端近傍の  $\text{CF}_2$ 基に帰属される。また、Fig.6の J分解スペクトルでは明らかでないが、Fig.7の COSY スペクトルでは1,2,3,4の信号が各々2本に分かれており溶液同様立体配座の違いの影響が観測されている。

量子化学計算：主鎖周りのコンホメーションの変化を評価するため、モデルとして  $\text{CF}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ を用いてエネルギー計算を行った。内部回転角として (a) $\text{CH}_2\text{-CF}_2$ 、(b) $\text{CF}_2\text{-CF}_2$ 、(c) $\text{CF}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)$ の3つを考慮した。その結果、トランス-トランス-トランス (ttt)を基準にして、(a),(b),(c)のいずれかのみをゴーシュ(g)にしたときのエネルギー差は各々(a)7.3kJ/mol、(b)18.3kJ/mol、(c)1.8kJ/molであった。回転ポテンシャルを算出し

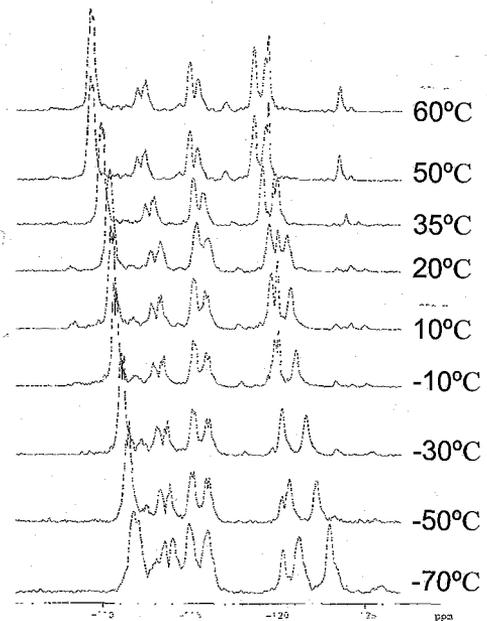


Fig.4  $^{19}\text{F}$  1D-J resolved NMR spectrum of TFE-P alternating copolymer at various temperatures.

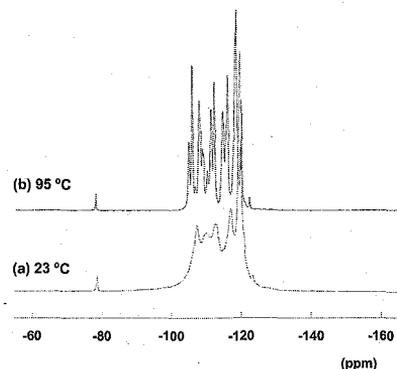


Fig.5  $^{19}\text{F}$  solid-state NMR spectrum of TFE-P alternating copolymer at room temperature and  $95^\circ\text{C}$  spun at 34kHz.

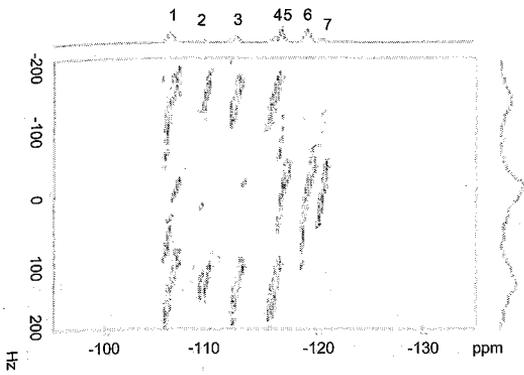


Fig.6  $^{19}\text{F}$  solid-state 2D- $J$ resolved NMR spectrum of TFE-P alternating copolymer at  $85^\circ\text{C}$  spun at 34kHz.

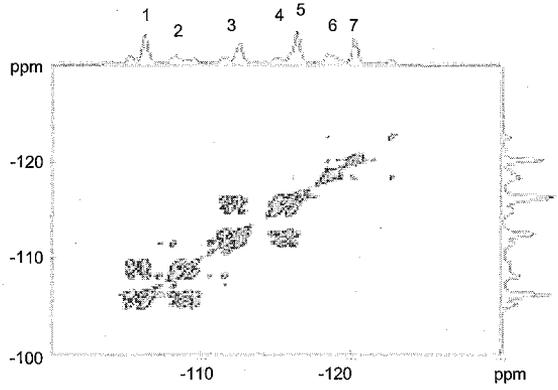


Fig.7  $^{19}\text{F}$  solid-state cosy NMR spectrum of TFE-P alternating copolymer at  $85^\circ\text{C}$  spun at 34kHz.

たわけではないが、(b)  $\text{CF}_2\text{—CF}_2$  間の回転はかなり束縛されていると考えるのが妥当である。したがって、(b)  $\text{CF}_2\text{—CF}_2$  間はトランス(*t*)に固定され、その他の回転のためこの高分子がエラストマー的性質を示すと考えられる。

そこで、コンホマーとして、*ttt*, *ttg*, *gtt*, *gtg* を考え、化学シフト計算を行った。その結果を Table.1 にまとめる。ここに示すのは磁気遮蔽定数であり、実験で得られた化学シフトとは符号が逆である。これらのコンホマーの平均であると考えたと実験結果をよく説明している。注目して欲しいのは内部回転角( $c$ )が *t* のときの  $F_y$  の大きな遮蔽定数で、これはいわゆる  $\text{CH}_3$  基からの  $\gamma$  ゴーシュ効果である。内部回転角( $c$ )が *t* のときは  $F_y$  に対して、モデル化合物における 2 つの  $\text{CH}_3$  基がゴーシュの位置にあたり、このような大きな遮蔽定数を与えている。一方、内部回転角( $c$ )が *g* のときは  $F_x, F_y$  各々に  $\gamma$  ゴーシュ効果をもたらす  $\text{CH}_3$  基が 1 つずつ存在するため、2 つの遮蔽定数は近い値を示している。Fig.4 における低温での化学シフト変化は *ttt* コンホマーの存在比が増加することによって由来すると考えると説明がつく。

Table 1. Calculated Fluorine nuclear magnetic shieldings of  $\text{CF}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CF}_2^{\text{AB}}\text{CF}_2^{\text{XY}}\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ .

Conformer	Calculating GIAO nuclear magnetic shieldings (ppm)			
	$F_A$	$F_B$	$F_X$	$F_Y$
<i>ttt</i>	364.12	368.30	362.64	378.40
<i>ttg</i>	363.34	365.26	365.50	365.92
<i>gtt</i>	348.98	362.84	362.40	376.39
<i>gtg</i>	354.34	355.57	362.16	363.64

参考文献

- 1) Y.Tabata et al. *J.Polym. Sci PartA*, 2 2235(1964).
- 2) K.Ishige et al. *Macromolecules* 6(4) 584 (1973).
- 3) E.G.Brame, Jr. et al. *Macromolecules*, 8(5) 604 (1975).
- 4) G. Kojima et al. *J.Polym. Sci. Polym. Chem.* 14 1317 (1976).

## Microstructure and Crystalline Structure of Polyolefins

Characterized by High-Resolution NMR

Toshikazu Miyoshi

Research Institute of Nanotechnology, AIST

High resolution melt-state and solid-state NMR techniques are applied for understanding microstructure of insoluble polymers and characterization of local chain correlations in polymer crystals, respectively. Melt-state NMR at very high temperatures of 315°C give information about end group, regiodeflect and stereoregularity of insoluble *isotactic*-poly(3-methyl-1-butene) (iP3M1B). In addition, proton driven  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  spin diffusion and  $^{13}\text{C}$  selective isotope labeling of one of two  $\text{CH}_3$  group of iP3M1B allow us to observe “inter-site” atomic correlations between neighboring sites in the polymer crystals. This information will reveal local chain arrangements of the polymer chains in polymer crystals.

< 融融NMRによる高分子の微細構造解析<sup>1, 2</sup> > 高分子構造を研究する手段としてNMR法は微細構造～高次構造に関して様々な情報を供給することができるが、十分に明らかになっていない構造情報も多く存在する。例えば、不溶性高分子に関しては、GPCや溶液NMRが利用できないために、分子量や微細構造の不均一構造情報は得ることができない。本研究では、融融NMR法を適用することにより、不溶性高分子の微細構造に関する知見を得たので報告する。図1はイソタクチックポリプロピレン(iPP)の溶液NMR (JEOL-EX 270)スペクトルとMAS法と $^1\text{H}$ デカップリング法を用いて得た融融NMRスペクトルである(BRUKER AVANCE 300)。実験条件は図1のキャプションに示す。融融NMR法では溶液NMR法により得られるシグナル強度と同程度のスペクトルを1/75程度の時間で得ることができた。融融NMR法では溶媒を必要としないのと、試料の体積が大きいためである。一方、両者のスペクトル分解能を比較したところ、融融状態のメチル炭素の<mmmm>に相

当する主成分シグナルの半値幅は4.5Hzであり、溶液の半値幅(1Hz)より、4倍程度幅広であることが明らかになった。図1(b)にメチル領域の拡大図を示す。溶液のスペクトル同様に、融融スペクトルにおいても立体規則性に基づくシグナルの分裂が観測された。両者のスペクトルの波形分離を行ったところ、融融NMR法で得られた立体規則性(<mmmm>=90.6%)は溶液NMR (<mmmm>=90.3%)とよく一致した。更に、融融NMRの優れたS/N比を利用して、繰り返し時間が信号強度へ及ぼす影響を調べることににより、NOEと緩和時間が及ぼす信号強度への影響を明らかにし、繰り返し時間が及ぼす立体規則性評価の定量性への影響を

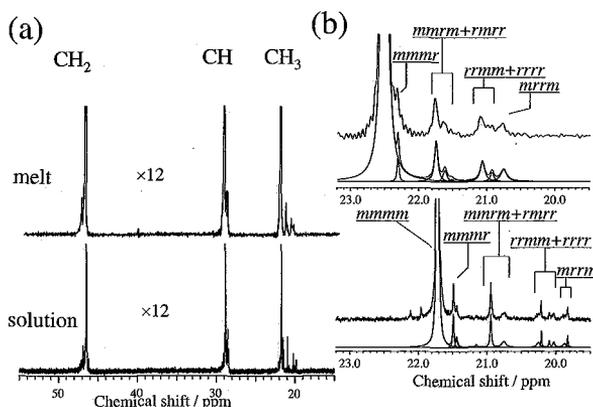


Figure 1. (a)  $^{13}\text{C}$  solution-state (JEOL EX-270, 5mm, 40mg, 8wt%, 145°C) and (b) melt-state NMR spectra (BRUKER Avance 300, 7mm, 120mg, 200°C) for iPP, and their expanded spectra for the  $\text{CH}_3$  region.

融融NMRの優れたS/N比を利用して、繰り返し時間が信号強度へ及ぼす影響を調べることににより、NOEと緩和時間が及ぼす信号強度への影響を明らかにし、繰り返し時間が及ぼす立体規則性評価の定量性への影響を

キーワード 結晶性高分子、不溶性高分子、微細構造、融融 NMR、パッキング構造

みよしとしかず

調べた。溶融 NMR 法を不溶性のイソタクチックポリ 3 メチル 1 ブテン (iP3M1B) の微細構造解析 (分子量、立体規則性など) に適用した結果についても報告する。

<固体 NMR 法による高分子結晶構造解析<sup>3)</sup>> 高分子の結晶構造に関しては、X線を中心とした散乱法が利用され、三次元的な長距離秩序構造を有する単位格子が報告されている。高分子は立体規則性やコンフォメーションなどの構造因子が複雑に絡みあい高分子鎖の構造を形成し、個々の分子鎖が集合体として高分子結晶を形成する。結晶のラメラの厚みは 10nm 程度であるので、高分子鎖はラメラの厚みよりも長くなるのが一般的である。そのため、高分子鎖はラメラの表面で折りたたまれ、結晶内部への再突入と表面でのループ構造の繰り返しにより結晶ラメラを形成すると考えられている。しかし、高分子鎖の詳細な折りたたみ構造に関する知見は得られていないのが現状である。

昨年の討論会では、我々は溶融状態から摂氏 280°C において等温結晶化した iP3M1B ( $T_m = 305^\circ\text{C}$ ) の固体高分解能スペクトルを測定することにより、側鎖炭素シグナルが多岐に分裂することを見出し、8 種類のパッキング構造が結晶内部に存在することを明らかにした。このパッキング構造の種類は散乱により提案されている無秩序構造で得られるパッキング数と一致するが、固体 NMR 法により得られた個々のパッキング構造の比率は、散乱で適用されている統計則により得られる比率 (12.5%) と一致しないことを示した。

本研究では、結晶内の分子鎖の異なる構造情報を獲得するために、iP3M1B のモノマーユニット内に存在する二つのメチル基の一つを  $^{13}\text{C}$  で選択的に同位体ラベルした iP3M1B を合成した。図 2 にエックス線で報告されている極限秩序構造の iP3M1B の単位格子と同位体ラベルした原子の空間配置を示す。同一サイト内の隣接モノマーユニット間の最近接、第二最近接原子間距離はそれぞれ 4.1 と 5.5 Å である。

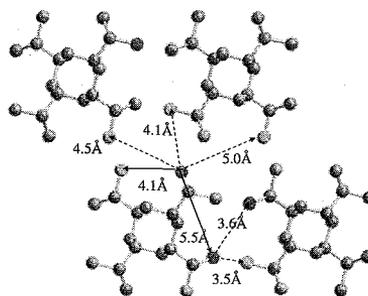


Figure 2. limit order model for iP3M1B. C4 and C5 carbons in the side-chain are colored by green and red, respectively. We showed some close distances for C5 C5 carbon with C4 and C5 carbons in intra-site and inter-sites.

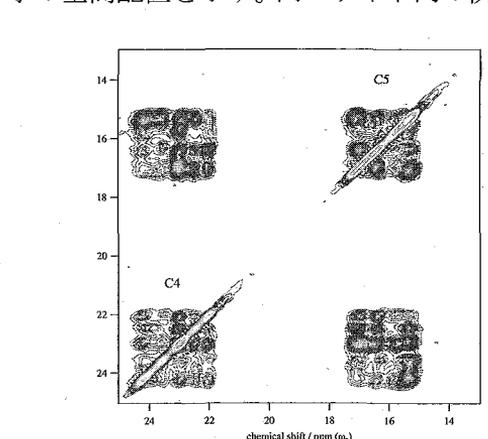


Figure 3. Proton driven  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  spin-diffusion spectrum for C4 or C5 labeled iP3M1B with a mixing time of 600 ms at 273 K.

な解析は現在行っているが、異なるパッキング構造が局所的に混ざり合っていることを反映していると推測される。

<リファレンス> 1) Hu, W., *et al*, *Macromolecules*, 2007, 40, 3505-3509. 2) Hu W., *et al*, *Macromolecules*, 2007, 40, 1763-1766. 3) Miyoshi, T., *et al*, *submitted to Macromolecules*.

## $^{10}\text{B}$ および $^{11}\text{B}$ 高分解能NMRによる ボロンドープダイヤモンドの研究

物質・材料研究機構<sup>1</sup>, Russian Academy of Science<sup>2</sup>,  
京大・理<sup>3</sup>

○村上美和<sup>1</sup>, 清水禎<sup>1</sup>, 丹所正孝<sup>1</sup>, 高野義彦<sup>1</sup>, 石井聡<sup>1</sup>,  
E.A.Ekimov<sup>2</sup>, V.A.Sidorov<sup>2</sup>, 竹腰清乃理<sup>3</sup>

### $^{10}\text{B}$ and $^{11}\text{B}$ High-resolution NMR studies on boron-doped diamond

National Institute for Materials Science<sup>1</sup>, Russian Academy of Science<sup>2</sup>,  
Graduate School of Science, Kyoto University<sup>3</sup>

M. Murakami<sup>1</sup>, T. Shimizu<sup>1</sup>, M. Tansho<sup>1</sup>, Y. Takano<sup>1</sup>, S. Ishii<sup>1</sup>,  
E.A.Ekimov<sup>2</sup>, V.A.Sidorov<sup>2</sup>, K. Takegoshi<sup>3</sup>

In 2004, Ekimov and co-workers discovered superconductivity at 2.3 K in heavily boron-doped diamond synthesized by the high-pressure and high-temperature method. In this work, we applied high-resolution solid-state NMR techniques to examine several boron-doped diamonds with different boron doping levels. The observed boron signals are broad and consist of several different boron sites. Signal assignment using  $^{10}\text{B}$  and  $^{11}\text{B}$  NMR observation as well as signal separation using  $T_1$  difference is described.

【序】絶縁体であるダイヤモンドに、ホウ素をわずかにドーピングするとホールのキャリアが導入されp型の半導体となることが知られている。さらにホウ素を添加していくと、電気伝導性が現れ美しいブルーになり、さらに高濃度になると黒色になる。ホウ素濃度が $3 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ に至ると、ダイヤモンドは非金属-金属転移を起こし金属的な物性を示す。さらにホウ素濃度が増加し、21乗付近以上の領域では、超伝導転移温度が2K以上の超伝導体となることが最近明らかになってきた。2004年にEkimovらが、高压合成法を用いてCと $\text{B}_4\text{C}$ の界面に生じたホウ素ドーピング多結晶ダイヤモンドが超伝導を示すことを発見した[1]。超伝導転移温度は2.3Kで、この温度以下でゼロ抵抗状態が達成される。本研究では、ボロンドープダイヤモンドの超伝導性とホウ素の関係を検討することを目的として $^{10}\text{B}$ および $^{11}\text{B}$  NMRによる解析を行った。

【実験】ボロンドープダイヤモンドの試料は高压法により合成した。原料としてはナフタレンとホウ素を用い、ホウ素添加量が0.75%、2.4%、5%である3種類の試料を得た。電気伝導性はホウ素添加量2.4%が最も優れ、次がホウ素添加量5%であり、ホウ素添加量0.75%は電気伝導性を示さない。NMR測定には、JEOL社製ECA930分光器(21.8 T)およびECA500分光器(11.7 T)を用いた。

boron-doped diamond, High Magnetic Field, MAS,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{10}\text{B}$

むらかみみわ・しみずただし・たんしょまさたか・たかのよしひこ・いしいさとし・えきもふ・しどろふ・たけごしきよのり

【結果と考察】図 1(a)に 11.7 T の静磁場下で測定したボロン添加量 5%の試料の  $^{11}\text{B}$  Magic Angle Spinning (MAS) NMR の測定結果を示す。

0ppm 付近のシャープなピークと 0-100ppm のブロードなピークが観測された。0ppm 付近のシャープなピークは、四極子が小さく対象性の良いことから、4 配位のホウ素ではないかと考えられる。ホウ酸ガラスや窒化ホウ素など他のホウ素の 4 配位の化合物の NMR との比較から考えても 4 配位ホウ素である可能性が高い。しかし、ブロードな部分については、これらのスペクトルからは判断できない。 $^{11}\text{B}$  は半整数スピン( $I=3/2$ )であり、中央遷移( $-1/2 \leftrightarrow 1/2$ )は四極子の 1 次の影響は受けず、2 次の影響により線形が幅広くなる。この 2 次の線幅は MAS で取り除くことができないが、磁場に反比例する為にできるだけ大きな磁場での測定が有利になる。一方、 $^{10}\text{B}$  はスピ

ンが整数( $I=3$ )であり、全ての遷移に四極子の 1 次の相互作用が影響する。従ってそのスペクトルは、四極子に敏感であり、MAS NMR では四極子による広がりやスピニングサイドバンドとして現れる。従って、四極子が大きいとスピニングサイドバンドに強度がとられてピークが見えにくくなるが、四極子が小さい場合には、MAS の中心ピークは、 $^{11}\text{B}$  と似たスペクトルになると考えられる。図 1(b)に 11.7 T の静磁場下で測定した  $^{10}\text{B}$  の MAS スペクトルを示す。 $^{11}\text{B}$  では 0-100ppm にブロードなピークが観測されるのに対して、 $^{10}\text{B}$  では 80ppm 付近の高周波数側の成分が観測されない。つまり、 $^{11}\text{B}$  で観測された 0-100ppm のブロードなピークには少なくとも 2 種類のホウ素成分があり、ひとつは 0-50ppm のピークで四極子が小さく、 $^{10}\text{B}$  で観測されなかった 80ppm 付近のブロードな成分は四極子が大きいと考えられる。また、 $^{11}\text{B}$  のパルス繰り返し時間を 100ms とし、緩和時間が短い成分のみを観測したスペクトルを図 1(c)に示す。観測されたスペクトルは  $^{10}\text{B}$  の測定結果と類似していることから、0-50ppm 付近のブロードなピークは他の成分と比較して緩和時間が短いことが分かる。これは伝導電子による緩和のためである可能性があり、現在物性の異なる複数のサンプルを測定して物性との関係を検討中である。

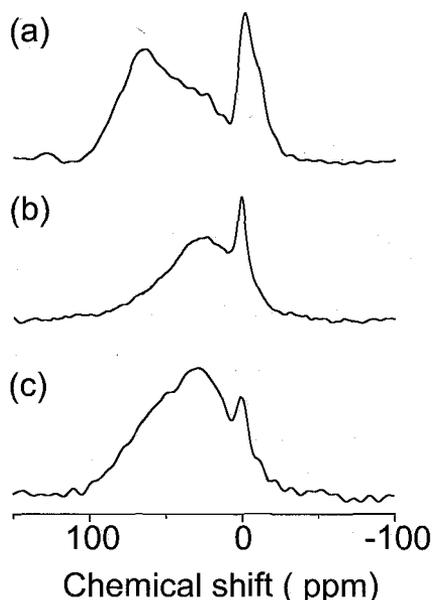


Figure 1.  $^{11}\text{B}$  (a&c) and  $^{10}\text{B}$  (b) MAS NMR spectra of boron-doped diamond (boron 5%) with different relaxation delay of (a) 10s, (b) 5s, and (c) 100ms.

[1] E. A. Ekimov et al. *Nature*, **428**, 542-545 (2004).

Development of Solid State NMR Probehead for Mass-Limited Samples  
 (<sup>1</sup>Department of Biotechnology, and <sup>2</sup>Museum of fiber Science and Technology,  
 Tokyo University of Agriculture and Technology)  
 °Kazuo Yamauchi<sup>1</sup> and Tetsuo Asakura<sup>1,2</sup>

The probehead is developed for high-resolution solid state NMR observation of mass limited samples. The rotors with 1mm o.d. or 0.5mm o.d. are developed. These have the capability of observation from sub-micro gram to 500 $\mu$ g of the sample. The probehead gives extremely high sensitivity of the spectra and improves the limit of detection for solid state NMR remarkably. The new 1mm $\Phi$  rotor system with 1mm turbine is also developed for targeting from 500 $\mu$ g to 1mg samples. Some of the spectra obtained with this system are present. This rotor system has the potential of the high speed spinning and the progress is discussed.

### 緒言

NMR の最大の弱点は他の分析機器と比較して、その感度の低さにある。実際、従来の固体 NMR 測定では、ミリグラム単位、マイクロリットル単位のサンプル量が必要であった。従って、例えば微量しか得られない

生体物質については、固体 NMR の測定が事実上、不可能となる場合もあった。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。

現在、NMR の高感度化技術は外部磁場の高磁場化など、いくつか行われているが、装置やサンプルの観点から汎用的に微量物質を感度よく測定する方法としてマイクロコイル NMR プローブを用いることは非常に有利である。我々は微量でも高感度・高分解能で観測可能な固体 NMR 用の piggy back style の microMAS プローブを開発し、1 $\mu$ g 程度から約 500 $\mu$ g までのサンプルについて S/N 比の向上を実現してきた<sup>1)-3)</sup>。今回、これらの技術を用いて、piggy back style でない 1mm ローターを開発し、回転させることにより、より汎用的に微量で試料を測定できるようにすることを目的とした。さらに、1mm ローターの利点を活かして高速回転への応用を試みた。

### プローブ・ステーター・ローター製作

マイクロコイルプローブは piggy back style と同じく <sup>13</sup>C 観測、<sup>1</sup>H デカップリングの CP/MAS を行うことができるシングルコイルダブルチューンの LC 回路で構成した。さらに、1mm のローターを用いるために、ソレノイド型の RF コイルは回転中

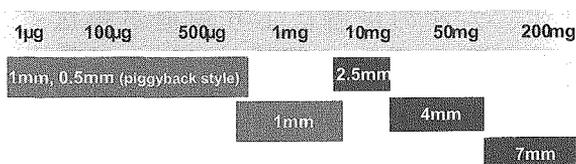


Fig.1 NMR sample scale and rotor diameters

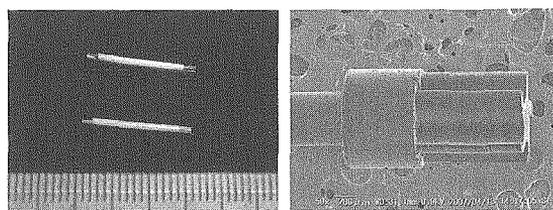


Fig.2 1mm $\Phi$  MAS rotor (left) and SEM image of rotor drive tip cap (right).

マイクロコイル・高速MAS・微量試料・高分解能固体NMR  
 やまうちかずお、あさくらてつお

ローターと接触し破損しないように 400 $\mu\text{m}$  の銅線でコイル内径 1.4mm のものを用いた。サンプル管は Fig.2 に示すような、ジルコニア製の外径 1mm 内径 500 $\mu\text{m}$  のものを使用した。ステータは、一般的なベアリング・ドライビングがそれぞれ支柱より供給される形のを製作した (Fig.3)。

### 測定・プローブ評価

[MAS 回転] 製作したローター・ステータを用いて回転をチェックしたところ、現在、18kHz までは恒常的に安定した回転が可能であることを確認した。このシステムを用いて測定した例を Fig.4 に示す。

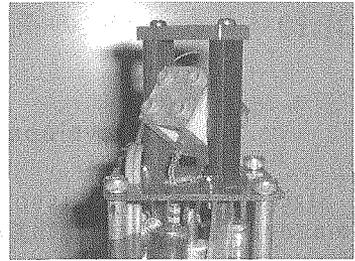


Fig.3 Photo of stator for 1mm $\phi$  rotor built in the home made probehead.

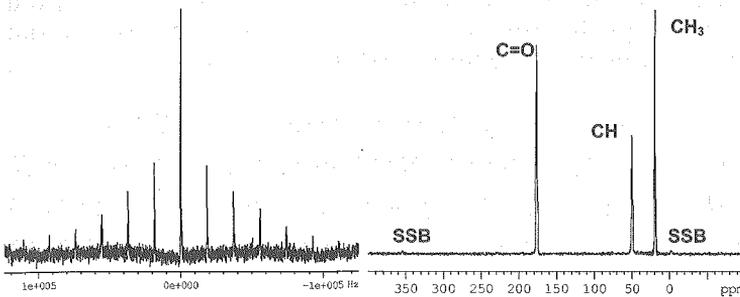


Fig.4

(Left)  $^{79}\text{Br}$  spectrum of KBr to check the magic angle and MAS frequency. The sample is rotating at 18kHz. (Right)  $^{13}\text{C}$  CP/MAS spectrum of  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{L-Alanine}$  (sample weight is 657 $\mu\text{g}$ ). The rotation speed is 18 kHz and 250 kHz RF field is applied for the CP and decoupling.

[RF Field 強度] 以前の piggy back style においては、コイルに 200 $\mu\text{m}$  の線材を用いていたが、今回ステータ内の空間的余裕があるため、以前より太い 400 $\mu\text{m}$  線材をコイルとして用いることができた。そのため、耐 RF 強度が増し、放電が起こりにくいプローブを製作できた。Fig.5 に CP スピンロック中、および、取り込み中のデカップルの RF 強度を変え測定したアラニン C $\beta$  領域の  $^{13}\text{C}$  CP/MAS スペクトルを示す。非常に強い RF 強度を用いることにより、プロトンとの双極子相互作用が十分に打ち消され、高分解能化、高感度化が実現されていることがわかる。

今後、ローター、ステータの形状を改良することにより安定した高速回転ができると期待される。発表では高 RF フィールドを用いたアプリケーションを含めて紹介する予定である。

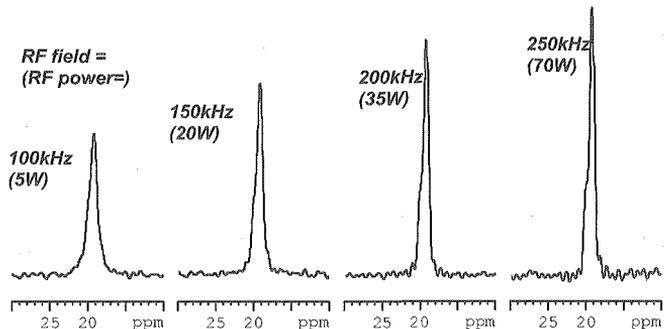


Fig.5  $^{13}\text{C}$  CP/MAS spectra of  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{L-Alanine}$  ( $\text{C}\beta$  region) with varying RF field strength.

### 謝辞

この開発は独立行政法人科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業による成果である。

### 参考文献

- 1) K. Yamauchi, J.W.G. Janssen A.P.M. Kentgens, *J. Magn. Reson.* **167**, 87. (2004).
- 2) K. Yamauchi, T. Imada, T. Asakura, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 17689. (2005).
- 3) K. Yamauchi, T. Asakura, *Chem. Lett.* **35**, 426. (2006).

## Development of high-field NMR and high-sensitive NMR

Kyoto University K. Takegoshi

Striving for better resolution and sensitivity, we have welcome increase of magnetic field strength, and nowadays it reaches ca. 22 T. In my talk, firstly I report our recent efforts to make use of hybrid magnets. A hybrid magnet can produce much higher field (>30T) than a superconducting magnet can do, but the stability is awful. Two reference deconvolution methods we have examined so far will be discussed and compared. Next topic is a cryo-coil MAS probe. Successful gain in sensitivity for a solution sample using a special probe whose coil/detection system kept at low temperature tempted us to develop a similar MAS probe for solids. The state of the art of the cryo-coil MAS probe developing in our group will be discussed.

## 1. NMRの高磁場化：磁場揺動下での高分解能 NMR 法の研究

Nb<sub>3</sub>Snなどの既存の超伝導線材を用いた NMR 用超電導磁石の大きさは 22T (<sup>1</sup>H の共鳴周波数換算で 1GHz 程度) あたりで頭打ちしている。これより大きな磁場を望むなら、現実的には、超伝導磁石と水冷銅磁石を組み合わせたハイブリッド磁石 (~40T) を NMR に使うことになる。しかし、既存のハイブリッド磁石の磁場安定度は高分解能 NMR を行うには充分でない。例えば、物質・材料研究機構に設置されているハイブリッド磁石では数 10 Hz の周波数成分で変化量が 30 Gauss 程度の磁場の揺らぎ (時間依存性) が観測されており、これを取り除くことが高分解能 NMR を行うための課題であった。これまでに、ピックアップ・コイルを用いた磁場揺動に伴う誘導起電力の測定を NMR 測定と同期測定することにより、NMR 信号における磁場揺動成分をより正確に補正する方法を提案した (文献 1)。この方法は補正に用いる磁場情報の出所 (ピックアップコイルの位置) を目的とする NMR 試料管の位置と完全に一致させることが難しい為に、補正出来る NMR 線形 (線幅) に限界がある。そこで、目的の NMR 信号の観測と同期して、同じ試料管内の別の核の NMR を参照用信号として測定し、この参照用の NMR 信号を用いて補正する方法を考案し実際に検討したので報告する。後者の方法で用いる参照用信号は磁場揺動以外の線幅がない方が良く、同じ試料管に存在する必要があるために、溶媒の信号などが使えるが、固体の試料に適用することは難しいと考えられる。従って、

## Hybrid magnet, Cryo-MAS

たけごしきよのり

上記の二つの方法は相補的であり（前者は固体 NMR 向き，後者は溶液 NMR 向き），これら二つの方法を用いることにより，溶液から固体まで様々な試料に対し 30 T 超のハイブリッド磁石での解能 NMR が可能となった。

## 2. NMR の高感度化：Cryo-coil MAS プローブ開発の現状と苦悩

溶液のクライオプローブと呼ばれるプローブでは検出コイルを 30 K 程度の低温にすることで感度向上を果たしている。大抵の固体高分解能実験に必要な MAS 下で同様のコイル冷却を実現するためには、

- 1) 冷たいガスで MAS をやることでサンプルごとコイルを冷やす；
- 2) コイルだけを冷却してサンプルは熱的に隔離する、という二つのアプローチが考えられる。1) ではサンプルの温度が下がることによる SN の向上もあるために、コイル冷却による SN の向上がうまくいかななくてもごまかせるという利点がある。しかし、試料の温度を下げたくない場合もあるだろうし、低温で MAS をやるための回転システムを新たに開発する必要がある。2) の方法は SN の向上が純粋に検出系冷却に因るために、感度向上効果の要因とその効果の切り分けが楽になり、そもそもこのような検出系の冷却というアプローチが理想的・具体的にはどの程度の感度向上をもたらさうのかという検証（これが本研究の目的である）が可能になる。そこで、我々は 2) を採用しプローブを作成した。第一号機のコイル内径は 13  $\phi$ 、MAS 試料管は 5  $\phi$  として、コイル温度 < 20 K、MAS 回転速度 4 kHz を達成している。講演では、プローブの構成と工夫どころ、温度によるコイル Q の変化などについて述べる。

## 3. 文献

[1] T. Iijima, et al., *J. Magn. Reson.*, 184 (2007) 258-262.

## 4. 謝辞 & ポスター紹介

揺動磁場の研究は、「磁場揺動下での高分解能 NMR 法の研究」は科学技術振興調整費による「新機能材料開発に資する強磁場固体 NMR」研究（研究代表：NIMS 清水禎博士）の一環として行った。実験・解析を行った飯島隆広博士（現・分子研）に感謝いたします。「Cryo-coil MAS」は CREST「材料開発に資する高感度多核固体 NMR 法の開発」研究として行っており、日本電子の水野敬博士の努力の結晶である。ここに感謝いたします。本講演の各パートは飯島・水野により個別にポスター発表を行っているので、詳しいことに興味をもたれた方はそちらを参照してください。

## 新方式NMRの開発

(株)日立製作所日立研究所<sup>1</sup>、物質・材料研究機構<sup>2</sup>○岡田道哉<sup>1</sup>、北口 仁<sup>2</sup>**A new configuration of high-resolution NMR spectrometer with cross-bore, split-magnet, and solenoidal probe coil**<sup>1</sup>Hitachi Research Laboratory, Hitachi, Ltd., <sup>2</sup>National Institute for Materials Science, Michiya Okada<sup>1</sup> and Hitoshi Kitaguchi<sup>2</sup>

A novel configuration of high-resolution NMR spectrometer will be presented. We have been developing a new NMR spectrometer having two special features; one is the superconducting split-magnet, and the other is the solenoid-shaped probing coil. We built a pair of superconducting split magnet with a room temperature *cross-bore* consisting with a horizontal and a vertical bore. A probe is inserted from the horizontal bore, while a sample is inserted from the top of vertical bore. The probe and the sample meet at the center of the *cross-bore*. The probe coil is wound by a *solenoid-shape*, being expected to get 1.5-2 times higher sensitivity as compared with the conventional *saddle-shaped* coil.

## 1. 緒言

超電導磁石が NMR 分光計に利用されるようになって以来、現在まで、その基本構成は変化していない。即ち、永久電流モードで運転される多層空芯ソレノイド電磁石により、鉛直方向に均一な磁場を発生させ、サドル形状のアンテナコイルで磁場と垂直方法に高周波磁場を印加して NMR 信号を観測する方法である<sup>1)</sup>。一方、超電導磁石が登場する以前は、スプリット方式の磁石の中に、ソレノイドプローブを挿入する方式が一般的であった<sup>1)</sup>。ソレノイドプローブはサドル方式と比較して Q 値とフィリングファクタの点で優れており、高い検出感度が得られやすいことは古くから知られていた<sup>1)</sup>。超電導磁石は、一般的な電磁石よりも一桁高い磁場強度を実現できるが、均一な磁場を出すことは容易ではない。しかし、超電導磁石を多層空芯ソレノイド方式にすれば、均一度の実現については難易度を下げることができる。この方法では、サドル型アンテナを採用せざるを得ず、検出感度が低下するが、それを補って余りある高い磁場強度を利用することができる。このようにして、超電導磁石を用いた現在の NMR 分光計は、超電導磁石の磁場強度を高めることで発展を続けてきた。

新方式 NMR スプリットマグネット 低温プローブ ソレノイド 高感度  
おかだ みちや きたぐち ひとし

途中、低温プローブの登場などにより、NMRの検出感度は更に向上してきたが、ここ数年、限界に達しつつある。その理由は、超電導磁石の発生磁場が20Tを超え、超電導材料の臨界磁界とほぼ同じ値になったためである。このため、これ以上の感度飛躍的向上には別のアプローチが必要である。

## 2. 新方式NMR

もし、ソレノイド方式の検出コイルを超電導磁石で利用できれば、超電導磁石の磁場強度を高めることなく検出感度の飛躍的な向上が期待できるはずである。しかしながら、この検出コイルを利用するにはスプリット方式のNMR磁石が必要である。スプリット方式超電導磁石は、磁場中心に最も近い位置に磁石端部があるために不整磁場を生じやすい。よって、不整磁場の抑制技術の開発が重要な課題である。更に、高感度計測を実現するにはソレノイド方式の低温プローブ開発が必要である。従来、サドル型の低温プローブは開発されているものの、5mm 管の溶液試料を計測可能な低温ソレノイドプローブについては開発例がない。本プロジェクトでは、標準的な溶液試料用 5mm 管を計測可能な高感度低温ソレノイドプローブ開発を実施することとした。

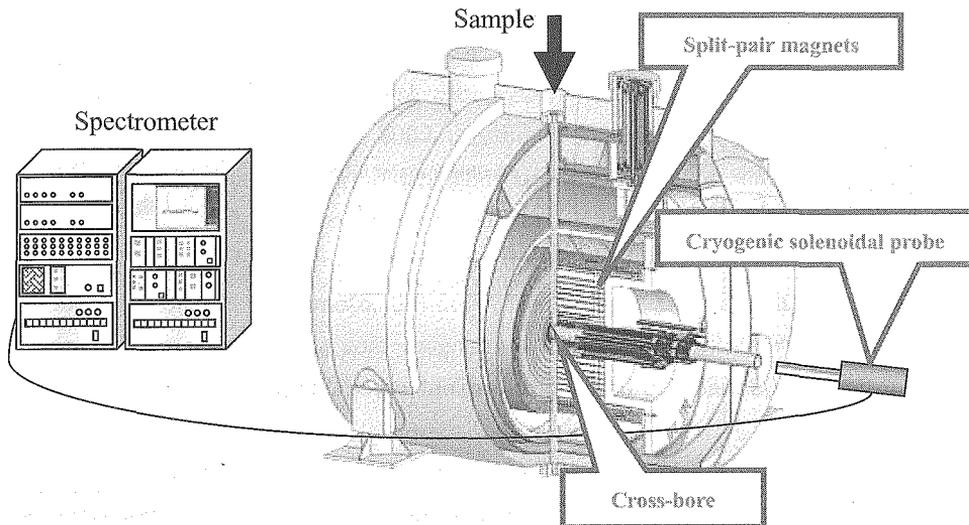


Fig.1. Schematic drawing of present NMR spectrometer with cross-bore.

## 3. 超電導磁石システム

新方式 NMR の基本構成を Fig.1 に示す。サンプルは磁石上部から挿入され、プローブは横方向から挿入される。磁場の方向は、水平方向である。従って、超電導磁石には、上下及び左右の貫通ボアが設置され、磁石中心で十字に結合されている(以下、十字ボアと称する)。超電導磁石は、この十字ボアの中心を左右から挟み込む形で構成されている。磁場の補正能力を十分に確保するため、超電導シムコイルは主コイルの内と外に配置されている。このような構造の超電導磁石は世界で初めてである<sup>2),3),4)</sup>。

この方式の超電導磁石は、これまでに3台製作された。最初の一台は、原理試作用 300MHz 機である。この磁石で基本設計の妥当性、原理確認検証を 05 年度までに成功裡

に終了した。その成果を受けて、600MHz 及び 300MHzプロトタイプ超電導磁石が製作され、それぞれ、06年6月及び10月から稼働を開始した。600MHz機は、新方式NMRによる世界最高感度の実証、300MHz機は十字ボアを応用した新しいアプリケーションの開発をミッションとして、研究開発が実施されている。

#### 4. 低温ソレノイドプローブ

新方式NMRの特徴は従来NMRでは到達できなかった高感度を実現することである。ソレノイド方式のアンテナは、フィリングファクタとQ値の点で、従来のサドル方式のアンテナに比べて高いS/N感度が期待できる。これまでの開発で、常温プローブでは、従来比で1.5～2倍程度のS/N感度が得られている。Table.1にこれまで開発した新方式NMR用プローブの仕様と、典型的なS/N測定結果を示す。現在、低温プローブの更なる感度向上へ向けて、アンテナの形状最適化などを進めながら性能向上に取り組んでいる<sup>2),3),5)</sup>。

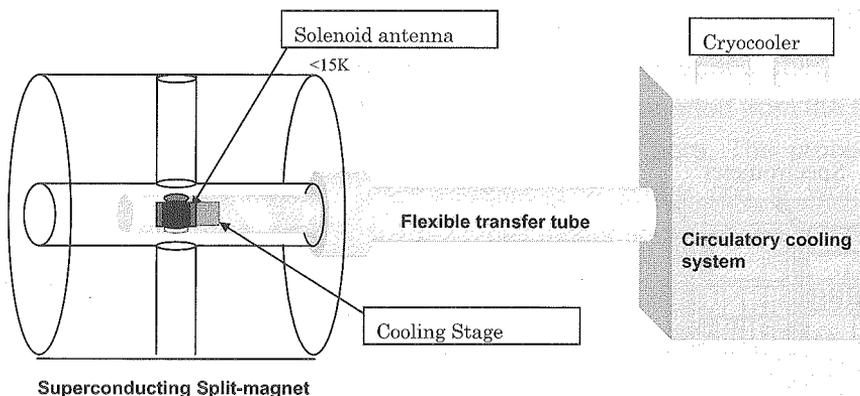


Fig.2. Schematic drawing of present cryogenic probe system.

Table. 1. Typical specifications for solenoidal NMR probe

			Standard Probe		Cryogenic Probe	
Frequency			300MHz	600MHz	600MHz	
Temperature of receiver coil			RT	RT	12K	
Equivalent Noise temperature			NT	NT	< 40K	
Line Shape	50%	Spin	0.28	NT	0.31	0.7
		Non-spin	NT	0.6	0.43	0.8
	0.11%	Spin	7.4	8	10.9	16
		Non-spin	NT	16	18.5	23.0
Target nuclei			H	HDC(N)Gz	H	
SNR			416	>200	1486	> 3559

## 5. 終わりに

このほか、新方式 NMR の第二の特徴である十字ボアを活用したアプリケーションの開発等、高感度と十字ボアという二つの特徴を生かした新しい NMR アプリケーションを開発し、最先端の研究開発ニーズに応じてゆく予定である<sup>6),7)</sup>。新方式 NMR は、日本オリジナルの新しい NMR 計測法として、今後、国内外のユーザと幅広く連携しながら計測システムとしての新たな地位を開拓していく計画である<sup>2),3)</sup>。

本研究の推進に際して、正田英介先生、木村錫一先生、神田大輔先生、森田勇人先生、高妻孝光先生のご指導を戴きました。

本研究の一部は、文部科学省科学技術振興費委託研究、18文科振489号)の一環として行われた。

## 5. 参考文献

(1)D.I.Hoult and R.E.Rechards, *J. Magn. Resonance* **24**, 71(1976).

(2)H.Kitaguchi, M.Okada, T. Kohzuma, H.Morita, T.Doi; *Development of a new high-resolution and sensitivity NMR spectrometer with cross-bore*, 48<sup>th</sup> Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, April 22-27, 2007, Daytona Beach, FL.

(3)M.Okada and H.Kitaguchi; *A new configuration of high-resolution NMR spectrometer with cross-bore, split-magnet, and solenoidal probe coil*, 48<sup>th</sup> Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, April 22-27, 2007, Daytona Beach, FL.

(4)M.Okada, T.Wakuda, H.Tsukamoto, S.Kido, K.Takeuchi, M.Tsuchiya, K.Maki, H.Kitaguchi; *Development of superconducting split-magnet for high-resolution NMR spectrometer*, 48<sup>th</sup> Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, April 22-27, 2007, Daytona Beach, FL.

(5)Y.Fukuda, M.Okada, K.Kawasaki, T.Shiino, M.Tsuchiya, N.Saho, H.Tanaka, K.Saitoh, H.Yamamoto, H.Kitaguchi, *Development of a cryogenic probe system for a NMR spectrometer consisting of a split-type superconducting magnet*, 48<sup>th</sup> Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, April 22-27, 2007, Daytona Beach, FL.

(6)H.Tanaka, M.Okada, H.Kitaguchi, *Fundamental characteristics of a solution NMR probe with solenoidal RF coil*, 48<sup>th</sup> Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, April 22-27, 2007, Daytona Beach, FL.

(7)I.Kitagawa, H.Tanaka, M.Okada, T.Kohzuma, H.Kitaguchi, *A new titration system of high-resolution NMR spectrometer with split-magnet, and cross-bore*, 48<sup>th</sup> Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, April 22-27, 2007, Daytona Beach, FL.

## 酵素による食品素材の構造変化と食品物性

- $\alpha$ グルコシダーゼやトランスグルタミナーゼを題材として—  
(味の素㈱) ○榛葉信久、山口秀幸、品川麻衣、鈴木榮一郎

Structural Analysis of Food Ingredients and Food Texture treated with Enzymes.

e.g.  $\alpha$ -glycosidase and transglutaminase

(Ajinomoto Co.) ○Nobuhisa Shimba, Hideyuki Yamaguchi, Mai Shinagawa,  
Ei-ichiro Suzuki

The texture of starch containing food gradually changes over time due to starch retrogradation.  $\alpha$ -glycosidase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of  $\alpha$ -1,4 linkages and transglucosylation to form  $\alpha$ -1,6 linkages. Analysis of starch retrogradation, using MRI T2 measurements, and investigations of sugar chain enzymatic reactions with NMR revealed that  $\alpha$ -glycosidase treatment preserves the original texture of steamed rice, a common dietary starch, for longer periods of time. On the other hand, incorporation of intermolecular covalent cross-links into food proteins with microbial transglutaminase (MTG) improves the physical and textural properties of many food proteins, such as tofu, boiled fish paste, and sausage. We have compared the transglutaminase activities for a small peptide, CBZ-Gln-Gly, and a protein substrate, ovalbumin, showing a difference for substrate recognition in MTG.

食品の物性改善に役立つ酵素の代表的な例として、澱粉素材に対する $\alpha$ グルコシダーゼや蛋白質素材に対するトランスグルタミナーゼが挙げられる。酵素の僅かな違いが物性に反映することもあり、これら酵素の評価やスクリーニングには、食品素材に近い、より高分子量の基質を用いることが望ましい。しかし、食品素材を基質として酵素反応をNMR解析する場合、安定同位体標識等の試料調製に制約がある上、生成物の不均一性により解析が困難となる。その点を克服すべく、系ごとに、より分子量の大きな糖鎖や蛋白質基質の構造変化を解析する方法を考案し、各酵素反応について解析を行った。

### 1. $\alpha$ グルコシダーゼ

$\alpha$ グルコシダーゼは米飯の老化防止作用を示す酵素であり、糖鎖の $\alpha$ -1, 4結合の切断活性と $\alpha$ -1, 6結合への転移活性を有することが知られている。しかし、単純な繰り返し構造をとる糖鎖の解析は容易ではなく、 $\alpha$ グルコシダーゼ反応による切断や転移の分子機構についてはほとんど報告されていない。一方、糖鎖のNMRスペクトル上に観測されるシグナルのうち、各糖単位のアノメリック位(1位)の化学シフトは非常に良く分離して観測されるた

**Keywords:** 酵素、食品素材、構造変化、物性

しんばのぶひさ、やまぐちひでゆき、しながわまい、すずきえいいちろう

め、 $\alpha$ -1, 4結合と $\alpha$ -1, 6結合の比率やグルコースの量を見積もることに活用されている。それに加えて、本研究では、アノメリック位以外の部位由来の分離したシグナルも活用することによって、各糖単位の存在比率を算出する方法を確立し、 $\alpha$ グルコシダーゼの反応機構解析へ応用した。

Fig.1 に典型的な糖鎖の NMR シグナルパターンを示す。2糖（マルトース）～7糖（マルトヘプタオース）を基質とし、①～⑭に対応するシグナル強度を測定し、各糖単位の存在比を算出した。その結果、 $\alpha$ グルコシダーゼが糖鎖に作用すると、非還元末端より $\alpha$ -1, 6結合が生成され、徐々に $\alpha$ -1, 6結合で挟まれた糖単位の存在比率が増加することが明らかとなった (Fig.2)。また、糖鎖が長いほど、生成された $\alpha$ -1, 6結合の切断反応が進行しにくいことが判明し、高分子量糖鎖では生成された $\alpha$ -1, 6結合が長時間保持されることが示唆された。

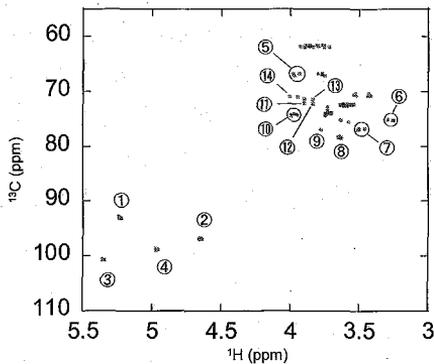


Fig.1 Signal dispersion in the HSQC spectrum of a sugar chain

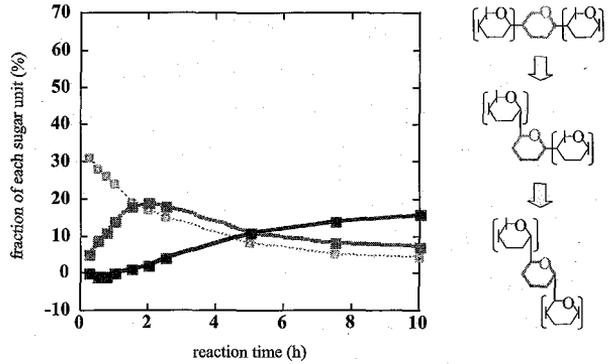


Fig.2 Time course of each sugar unit in sugar, reacted with  $\alpha$ -glucosidase

## 2. トランスグルタミナーゼ

トランスグルタミナーゼを食品中のタンパク質に作用させると、分子間および分子内の架橋が形成され、さまざまな食品、例えば、豆腐、かまぼこ、ソーセージの食感が向上することが知られている。通常、CBZ-Gln-Gly のような低分子量基質を用いて各種トランスグルタミナーゼの活性が評価されている。

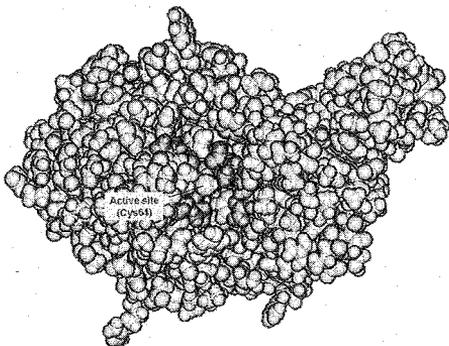


Fig.3 Alanine mutagenesis experiment to show a difference for substrate recognition for CBZ-Gln-Gly (red) and ovalbumin (red + yellow)

しかしながら、トランスグルタミナーゼは、食品中の高分子量蛋白質を基質とするため、その評価結果が食感に反映されないことも多い。そこで、NMR を用いて簡便に、分子量の大きな蛋白質に対する反応速度や基質特異性を解析する方法を開発した。その結果、CBZ-Gln-Gly に比べ蛋白質では、トランスグルタミナーゼのより広範囲の領域が活性に影響を及ぼすことが示された (Fig.3)。

植物バイオマスへの  $^{13}\text{C}$  代謝動態・分解過程追跡の試み(  $^1$  理研 PSC、 $^2$  名大院生命農、 $^3$  横浜市院国際総合、 $^4$  理研環境分子、)○菊地淳 $^{1,2}$ 、森哲哉 $^3$ 、雪真弘 $^3$ 、守屋繁春 $^{3,4}$ 、平山隆志 $^{3,4}$ NMR studies of  $^{13}\text{C}$ -metabolic dynamics/degradation process into plant biomass(  $^1$ RIKEN Plant Science Center, JAPAN;  $^2$ Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., JAPAN;  $^3$ Int.Grad. Sch. Arts. Sci., Yokohama City Univ., JAPAN;  $^4$ Environ. Mol. Biol. Lab. RIKEN, JAPAN)○Jun Kikuchi $^{1,2}$ , Tetsuya Mori $^3$ , Masahiro, Yuki $^3$ , Shigeharu Moriya $^{3,4}$  & Takashi Hirayama $^{3,4}$ 

## 【緒言】

植物は  $\text{CO}_2$  を固定化し、食糧との競合がない木質系バイオマスを大量に生産する能力があるため、その代謝解析技術の構築は重要である。既に米国では  $\text{CO}_2$  固定化が高く、施肥量が少なく済むポプラやエレファントグラス等を土壤・気候に合わせて植生し、2025年までに輸送燃料の1/3をこれらの木質系バイオマスから得るための研究が本格化している $^1$ 。特にポプラに関しては昨年ゲノム解析が終了し $^2$ 、比較ゲノム解析による新機能探索、細胞壁構造の改変等、木質系バイオマス利用への基盤技術構築が進むと期待されている。

我々はこれまで開発してきた  $^{13}\text{C}$  標識技術をポプラへ応用し $^{3-5}$ 、種々の NMR 法を駆使する事にて、吸収した  $^{13}\text{C}$  源の低分子から高分子複合体まで、多様な化学資源を追跡する事を試みた(図1左)。加えて、その木質系バイオマスの構造に合わせて、微生物(あるいはその酵素)による

分解系を最適化する事もバイオ燃料・材料開発には重要である $^{6,7}$ 。特に、ここではセルロース分解能に長けたシロアリ共生系に着目し、

$^{13}\text{C}$ -セルロースの分解過程を追跡した試みについても紹介する(図1右)。

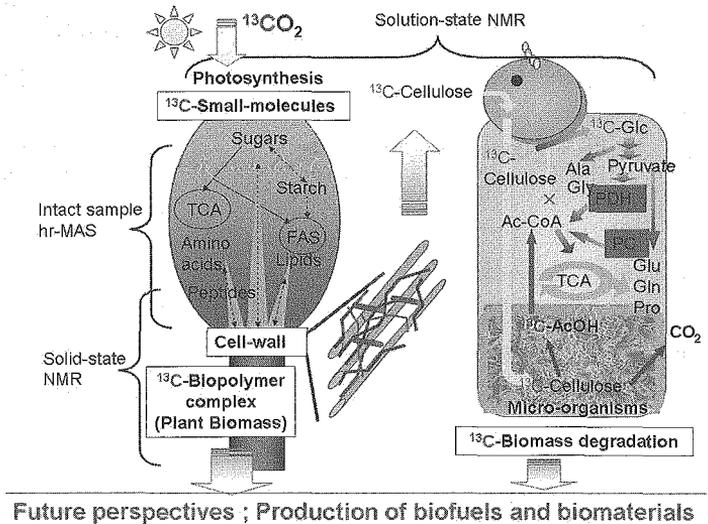


Fig.1 Concept of this study.  $^{13}\text{C}$ -metabolic dynamics into plant biomass (Left),  $^{13}\text{C}$ -cellulose degradation process (Right).

安定同位体標識、MAS、代謝動態、木質系バイオマス、腸内微生物、セルロース分解

きくちじゅん、もりてつや、ゆきまさひろ、もりやしげはる、ひらやまたかし

## 【実験方法】

ポプラの  $^{13}\text{C}_2$ 、 $^{13}\text{C}_6$ -Glc 標識化は既報の方法を改変して用いた<sup>8,9</sup>。①溶液 NMR スペクトルは 0.1 M-KPi での抽出溶液を、②HR-MAS スペクトルはインタクトな葉・茎を、③固体 NMR スペクトルは凍結乾燥した葉・茎を計測して得た。①、②は 500 MHz 溶液 NMR 装置により 1D-watergate, CPMG, 2D- $^{13}\text{C}$ -HSQC,  $\text{H}_2\text{BC}$ , 3D-HCCH-COSY を、③は 400 MHz 固体 NMR 装置により 1D-CP/MAS, NQS, 2D-MAS-J-HMQC, HETCOR, Refocused INADEQUATE, RFDR, DARR を計測した。①、②で観測される低分子代謝産物は当研究室開発のオリジナルソフトウェア、SpinAssign でシグナル帰属した。さらに、シロアリ共生系に対しては  $^{13}\text{C}_2$  標識化植物より調整した  $^{13}\text{C}$  セルロースを摂食させ、経時的にサンプリングしたシロアリ虫体、後腸を上記①と同様の方法で計測・解析した。

## 【結果と考察】

<1. ポプラの  $^{13}\text{C}$  均一安定同位体標識>  $^{13}\text{C}_6$ -Glc の根圏吸収、 $^{13}\text{C}_2$  の光合成による  $^{13}\text{C}$  取り込みの経時変化を追跡すると、炭素代謝速度は遅く、定常状態に達するまでに1ヶ月近くを要する事がわかった。各試料の代謝産物を追跡すると、茎には窒素代謝で鍵を握るアミノ酸群が大量に蓄積しており、経時的な変動も特徴的であった。これらのアミノ酸は、有機元素として重要な炭素/窒素(C/N)バランスを保つためにプールされており、特に根圏吸収への栄養依存度が低く、窒素源をリサイクルして活用する樹木ならではの現象が観測されたと考えた。

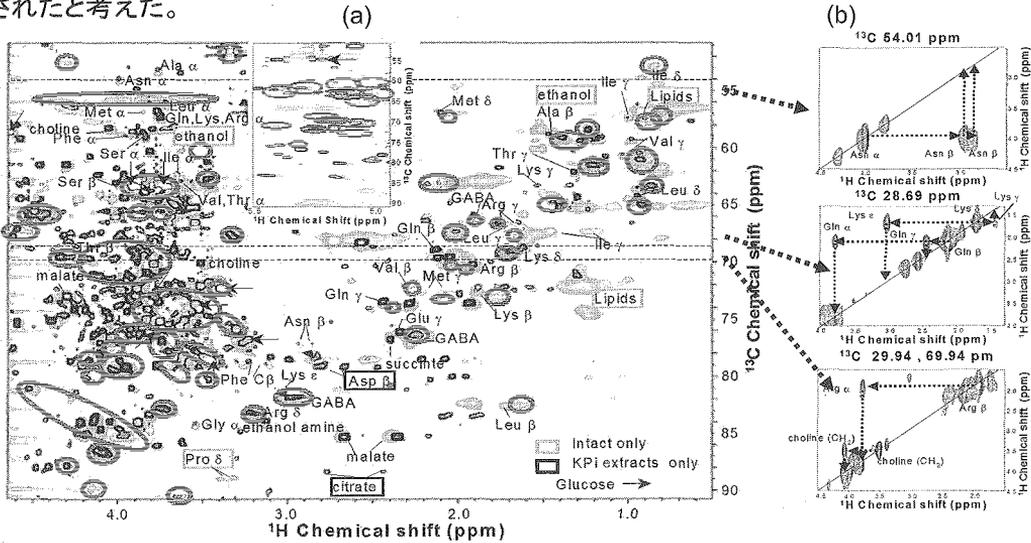


Fig. 2 Overlay of  $^{13}\text{C}$ -HSQC spectra of intact *Populus* (grey), KPi-extract (black), and cell-wall fraction (circled). (a) Slices of HR-MAS 3D-HCCH-COSY spectra of intact *Populus* (b).

<2. HR-MAS 法による不溶物質の計測> 上述のように疎抽出物の溶液 NMR 解析により、エネルギー代謝に関わる鍵物質群を追跡できた。しかし木質系バイオマスまでの炭素代謝を追跡するためには、高分子合成の原料となる多糖類の計測も必要である。しかし、これらの多くは不溶物質であるため、固体試料を扱う事ができ、かつ高分解能なスペクトル

計測が可能な HR-MAS 法を試みた。

インタクテナポプラ試料の HR-MAS  $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルを図 2a に示す。これらのシグナルの物質同定は 3D-HCCH-COSY 計測(図 2b)によって行った。また、抽出物の溶液 NMR 計測と比較した結果(図 2a)、抽出物の計測で課題となっている溶解度の問題が解消され、可溶、不溶性の代謝産物群を一斉に観測できた。さらに不溶性細胞壁画分を調製し、HR-MAS 計測した結果(図 2a)、HR-MAS 非侵襲計測と同じシグナルを観測したことから、HR-MAS 非侵襲計測では不溶性多糖類(標品との比較から、ヘミセルロース、ペクチン構成成分)の計測も可能であることがわかった。

<3. 固体 NMR 計測による木質系バイオマス解析> これまでの解析で、溶液・HR-MAS 法を使い分ける事により、ポプラが吸収した  $^{13}\text{C}$  から木質系バイオマスの構成要素群までを追跡できる事がわかった。しかし、木質系バイオマスの材料としての優れた特性は、高分子成分の構造と物性に強く依存しているため、これを解析し得る固体 NMR 計測を試みた。まず、主要成分のシグナル帰属を上述の固体 2D 計測を駆使して行った。ポプラ茎のような多成分系のサンプルでも、化学構造の違いによる原子選択的な相関シグナルを観測できた。

木質系バイオマスを石油代替資源として活用していくためには、その材料物性の解析法構築が望まれる。そこで、1D-CP 可変法、2D-PDSD の解析を試みた。

例えば、前者では Z-matrix( $Z = (I_i - I_{ave.})/\sigma$ )法で等高線表示すると、refocused INAEQUATE で明確に分離して観測されるセルロースの結晶・非晶領域を異なる極大値で示せる事がわかった(図 3)。

<4. シロアリ共生系による  $^{13}\text{C}$  セルロース分解> 上述のように米国では既に、植物・微生物の分野横断的な研究による、木質系バイオマスの有効利用化研究が過熱化しており<sup>6,7</sup>、シロアリ共生系も重要なそのターゲットとされている。その研究過程では3項で示したような固体高分子複合体の解析が重要な鍵を握る。ここではその第一歩として、 $^{13}\text{CO}_2$  標識化植物より調整した  $^{13}\text{C}$  セルロースをシロアリ共生系に摂食させた場合の、バイオマス分解過程を追跡する事とした。図 4 は虫体と後腸における各代謝産物の、 $^{13}\text{C}$ -HSQC 強度変化を経時的に示している。従来、シロアリ共生系の場合は後腸の原生生物がセルロースを酢酸

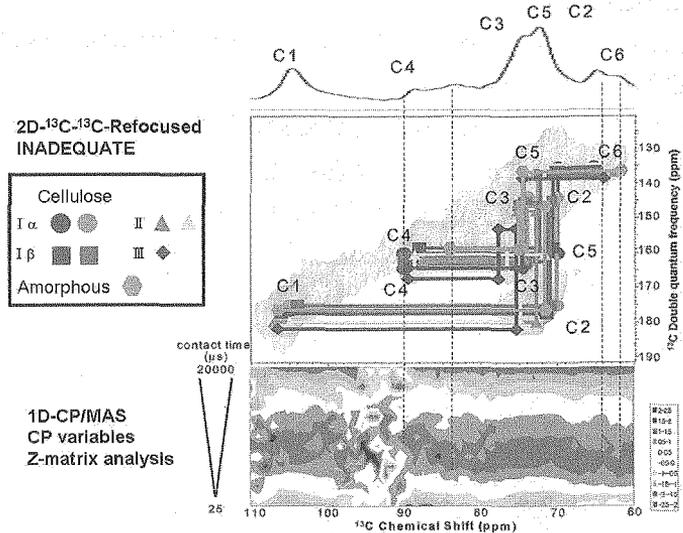


Fig.3 Expansion of refocused INAEQUATE spectrum of  $^{13}\text{C}$ -*Populus* stem (Upper). Z-matrix analysis of 1D-CP variables experiments (Bottom).

にまで分解してから、宿主に取り込まれると報告されていたが、その通り Ac-CoA より上流側、解糖系の代謝産物が宿主では  $^{13}\text{C}$  強度上昇しない事がわかった(図4左)。このようにシロアリ共生系の主要炭素源とされるセルロースを  $^{13}\text{C}$  標識化する事で、元から存在する  $^{12}\text{C}$  と新たに分解された  $^{13}\text{C}$  とを区別し、生物間に渡る相互作用を観測する事ができた。

<5. 今後の展望> 演者は木質系バイオマス利用の研究を、10年前のゲノム研究草創時と類似して捉えている。当時

我国ではゲノム解析の有効性に気付く研究者は少なかったものの、現在では SNP

解析、プロテオーム解析、難培養性の微生物叢を一斉解析する、メタゲノム解析が可能になる等、ゲノムの計測・解析技術の進展が多くの新分野を創出してきた。更に、そのメタゲノム解析を可能とする高速シーケンサーとバイオインフォマティクスの解析技術を擁して、米国 DOE では木質系バイオマスの分解微生物解析に研究者の労力を“一斉”投与している。10年前のゲノム研究と同様、我国ではメタゲノム解析等の基盤整備が遅れている中、我々は RNAi 技術による非モデル生物での特定代謝経路解析、新規プロテオーム/メタボローム相関法による有用酵素探索法の開発等、ポスト・メタゲノム解析に向けた計測・解析技術開発を推進している。

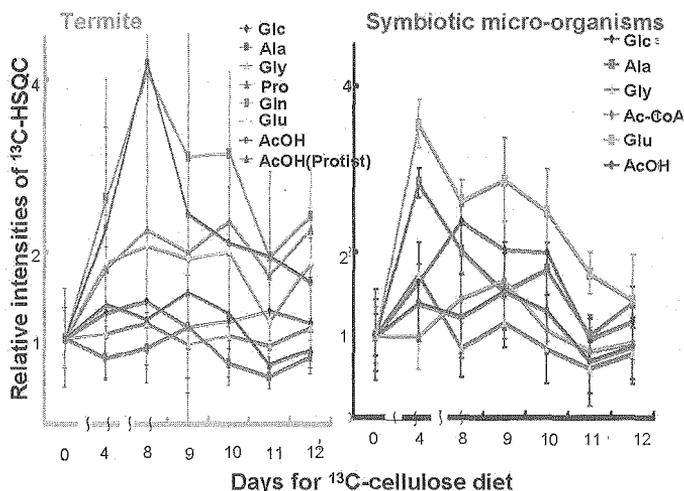


Fig.4 Changes of  $^{13}\text{C}$ -HSQC intensities by  $^{13}\text{C}$ -cellulose dieting. Host-termites (Left), Symbiotic micro-organisms (Right).

#### 【参考文献】

- 1) Tilman, D., Hill, J. & Lehman, C. *Science*, **314**, 1598-1600 (2006).
- 2) Tuskan, G. A. et al. *Science*, **313**, 1596-1604 (2006).
- 3) Kikuchi, J., Shinozaki, K. & Hirayama, T. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1099-1104 (2004).
- 4) Tian, C. J., Chikayama, E., Tsuboi, Y., Kuromori, T., Shinozaki, K., Kikuchi, J. & Hirayama, T. *J. Biol. Chem.*, **282**, 18532-18541 (2007).
- 5) Sekiyama, Y. & Kikuchi, J. *Phytochemistry*, (in press).
- 6) Stephanopoulos, G. *Science*, **315**, 801-804 (2007).
- 7) Himmel, M. F. et al. *Science*, **315**, 804-807 (2007).
- 8) Kikuchi, J. & Hirayama, T. *Biotech. Agri. Forest.*, **57**, 94-101 (2006).
- 9) Kikuchi, J. & Hirayama, T. *Methods Mol Biol*, **358**, 273-286 (2007).

旭化成 (株) 基盤技術研究所 ○橋本康博、堀池則子、山崎悟

PFG-NMR evaluation of ionic diffusion behavior in polymer electrolyte membrane

ASAHIKASEI CORPORATION, Analysis and Simulation Center

○Yasuhiro Hashimoto, Noriko Horiike, Satoru Yamazaki

Self-diffusion coefficients of the sodium ion (chloro-alkali cell) and the water (fuel cell) in the perfluoro polymer electrolyte membrane were evaluated using PFG-NMR. The influence of the morphology of the ionic cluster structure and the state of the water on the ionic mobility will be discussed.

【背景・目的】フッ素系電解質膜(旭化成ケミカルズ; Aciplex™-F、DuPont; Nafion®など)は、その高イオン伝導度・化学安定性のため、食塩電解や燃料電池へ広く使用されている。膜中で交換基は、含水したミセル(クラスター)を形成し、その中をイオンが移動すると考えられる(Figure 1)。電解質膜としての重要な性能因子であるイオンの移動を、自己拡散係数としてPFG-NMRで評価し、膜の高次構造との関係を見た。今回は食塩電解用としてNaイオン、燃料電池用として水の拡散評価の結果を報告する。

【食塩電解】電気分解により食塩水から塩素と苛性ソーダを製造するプロセスである。交換基がSO<sub>3</sub>Na(S膜)とCOONa(C膜)の膜から構成される多層膜が用いられることが多い。今回それぞれの膜中のNaイオンの拡散係数を評価した。<sup>23</sup>Naは磁気回転比が小さく、また本試料中ではT<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>値が10ms以下と小さいため、50 G/cm程度の磁場勾配ではイオンの位置変化をピーク減衰として捉えることが

キーワード PFG-NMR、燃料電池、食塩電解、固体高分子電解質膜  
はしもとやすひろ、ほりいけのりこ、やまざきさとる

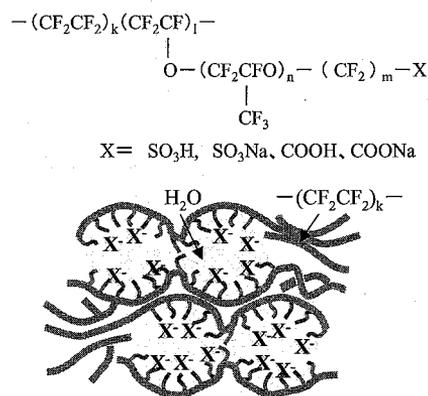


Figure 1. Chemical structure and schematic drawing of ionic cluster structure of perfluoro polymer electrolyte membrane.

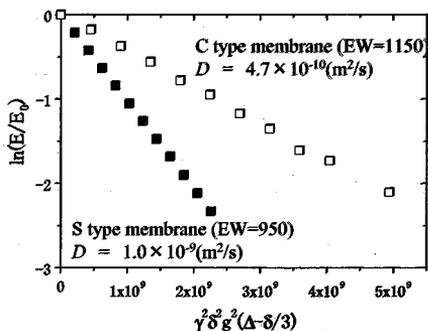


Figure 2. <sup>23</sup>Na NMR spin echo signal decay. NMR measurements (PFGSE sequence) were carried out at 90°C with JEOL ECA400 for the membrane immersed in the water.

できない。そこで 1300 G/cm の高磁場勾配を用いて評価を行った。Figure 2 に磁場勾配強度を変えたときのピーク減衰を示した。S膜、C膜ともにNaイオンの拡散係数を評価することができ、それぞれの違いを明瞭に拡散係数値として捉えることができた。この違いは、膜含水率やクラスター径に起因すると考えられる。

次に当量重量(EW)の異なるS膜について、拡散係数と、小角X線散乱(SAXS)プロファイルのフィッティングにより求めたクラスター径を比較した(Figure 3)。図中①と②は当量重量が同じで異なる膜処理法によりクラスター径を変えた試料である。その結果、イオン拡散係数は交換基の量には依存せずクラスター径に大きく影響されることがわかった。さらには、膜種によっては、得られた拡散係数値に拡散時間依存性が確認され、その拡散距離から、1 $\mu$ m 程度の不均一構造の存在が示唆された。

【燃料電池】水素と酸素の反応エネルギーを電気的に取り出す発電法である。交換基がSO<sub>3</sub>Hの膜が電解質膜として用いられている。水とともに移動するプロトンの伝導が膜性能を決定する。今回、湿度を変え

ながら膜中水の拡散係数評価を行ない、イオン伝導度との比較を行った。その結果、高湿度になるほど、拡散係数に比してイオン伝導度の増加が大きくなることがわかった(Figure 4)。高湿度下では自由水量が飛躍的に増加すること(IR解析)、およびクラスター径が急激に大きくなること(SAXS解析)がわかっている<sup>2)</sup>。高湿度下でのクラスター同士のネットワーク形成と自由水の急増により、プロトン伝導メカニズムが、低湿度下でのプロトンが水を随伴しながら伝導する機構から、高湿度下のホッピングによるプロトン伝導(Grotthus機構)に変化することが示唆される。

【参考文献】

- 1) 早水紀久；高分子論文集, 63, 1, 19, 2006
- 2) 橋本康博, 坂本直紀, 飯嶋秀樹；高分子論文集, 63, 3, 166, 2006

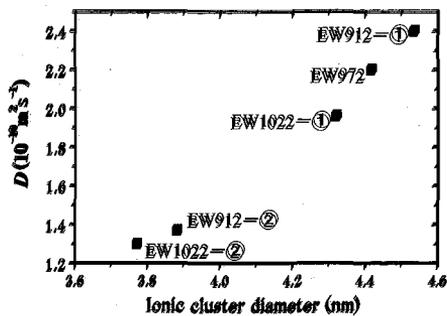


Figure 3. Self-diffusion coefficients  $D$  of sodium ion (<sup>23</sup>Na PFGSE) versus ionic cluster diameter (SAXS). Membrane was immersed in the water at room temperature.

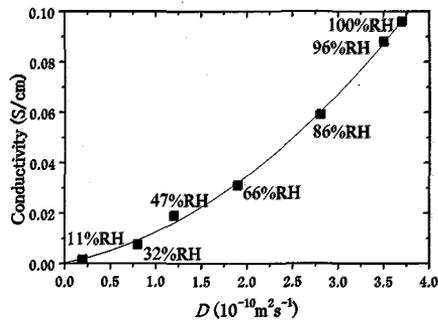


Figure 4. Ionic conductivity versus self-diffusion coefficient  $D$  of the water (<sup>1</sup>H PFGSE) measured at varied relative humidity at room temperature. Humidity was controlled by using following saturated salt aqueous solutions; LiCl·H<sub>2</sub>O(11%RH), CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O(32%RH), KNCS (47%RH), NaNO<sub>2</sub> (66%RH), KCl (86%RH), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%RH). EW of the membrane was 950 g/eq.

## Adsorption Characteristics of Electrolyte Ions Depending on Carbon Surfaces in Organic EDLC Using Solid State NMR

新日本製鐵(株)先端技術研究所 1)、九州大学先導物質化学研究所 2)  
○齋藤公児<sup>1)</sup>, 金泰坤<sup>2)</sup>, 持田勲<sup>2)</sup>

Adsorption Characteristics of Electrolyte Ions Depending on Carbon Surface in Organic EDLC Using Solid State NMR

○ Koji Saito<sup>1)</sup>, Tae-Gon Kim<sup>2)</sup>, Isao Mochida<sup>2)</sup>

1) Nippon Steel Corporation, Advanced Technology Research Lab.

2) Kyuushu University Institute for Materials Chemistry and Engineering

Surface information is very sensitive and important to material properties. But it is very difficult to detect the information about the adsorption characteristics of electrolyte ions directly, because the adsorption characteristics of electrolyte ions is weak and very complex in chemical sites. NMR has the great possibility to detect the weak adsorption, but the information is depends on the average conditions. Recently, as we can control surface condition occurring in carbon nano-fibers, we try to do the adsorption characteristics of electrolyte ions depending on carbon surfaces in organic EDLC using multi nuclear (<sup>19</sup>F and <sup>11</sup>B) Solid State NMR. We find the adsorption characteristics of electrolyte ions at various surfaces are quite different and also this approach is very useful to detect the only surface information.

### 1. はじめに

最近、多様な構造のカーボンナノファイバー (carbon nanofiber, CNF) の合成及び構造制御ができるようになった<sup>1)</sup>。その中で、黒鉛層が繊維軸に対して垂直に配列しているプレートレット型 CNF (Platelet CNF, PCNF) に一連の熱処理、酸処理等を行い、表面構造を精密に制御することに成功した。PCNF を 2800 °C で黒鉛化すると、黒鉛層の配列が向上されながらエッジの表面はドーム型ベーサル面が変わる。特に黒鉛化した PCNF (GPCNF) を硝酸処理すると、ドーム型ベーサル面が構造的応力で切り取られ、高黒鉛化度は維持されながら、表面は鮮明なエッジ面になる (GPCNF-NA)。GPCNF と GPCNF-NA は、各々ベーサル面とエッジ面が選択的に表面に現れているモデル材料として期待できる。また近来注目を浴びている超高容量キャパシターの開発では、最適な電極材料としての炭素材料の開発が中心に立っている。様々な高表面積の炭素材料が期待通りの結果を示さず、また材料の比表面積がキャパシター容量と一貫的な相関関係を示していない場合が多い。その重要な理由として、エッジ面とベーサル面の影響が挙げられている。

しかしその表面での吸着特性は不明点が多い。そこで従来はバルク平均情報でしかない NMR を利用し、電解質のイオンを様々な表面に検出させることにより、表面の状態を検出しようとするアプローチを検討した。そして、固体 NMR によるイオンの吸着状態の解析 (バルクを評価する NMR から、表面状態を予測できるか?) を試みたので報告する<sup>2)</sup>。

固体 NMR、多核 NMR、表面情報、カーボンナノファイバー、吸着状態解析

さいとうこうじ、きむてごん、もちだいさお

## 2. 実験

試料は Fig.1 に示すようないくつかの材料系で、表面状態を制御して調整・構築した。その形状は SEM 等で確認している。 $^{19}\text{F}$  や  $^{11}\text{B}$  の固体 NMR の測定は、CMX-300 で行った。4 mm の試料管に調整した試料を直接導入して実施した。

### Preparation of CNFs

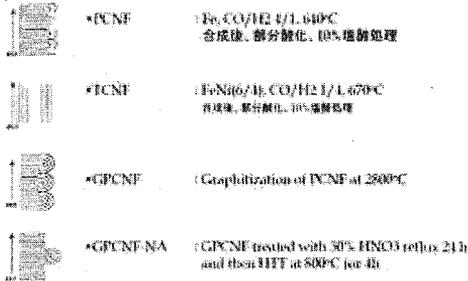


Fig.1 preparation of carbon samples

### Preparation of Samples & Plan of NMR

サンプル	特徴	$^{11}\text{B-NMR}$ & $^{19}\text{F-NMR}$				
		Impreg	Charged		Discharged	
			+	-	+	-
GPCNF	Basal surface PCNF 基底露出	GP-imp	GP-CP	GP-CM	X	X
GPCNF-NA	Edge surface GPCNF 基底露出	GPNA-imp	GPNA-CP	GPNA-CM	GPNA-DF	GPNA-DM
PCNF	Edge surface 部分酸化後、酸処理	P-imp	P-CP	X	X	X
TCNF	Basal surface 部分酸化後、酸処理	T-imp	TCM	X	X	X

Fig.2 Sample preparation for NMR measurements

試料は電解質である PC と 1M の  $\text{Et}_4\text{NBF}_4$  を使用し、電解質を浸したただの場合 (imp)、2.7 V での充電後の陰極 (CM) と陽極 (CP)、放電後の陰極 (DM) 陽極 (DP) とした。これらの試料は、ばらばらに切断して、直径 4mm のしっかりと密封された NMR サンプルチューブに詰め、12kHz で回転させている。

## 3. 結果と議論

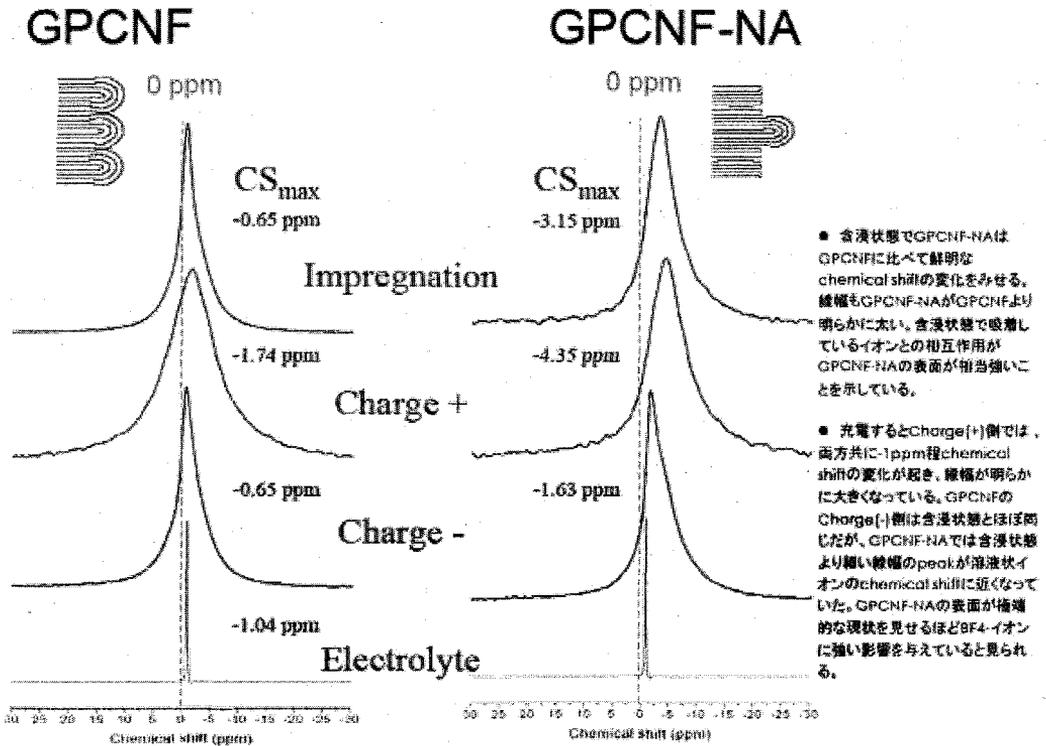


Fig.3 Results of  $^{11}\text{B}$ NMR for GPCNF and GPCNF-NA

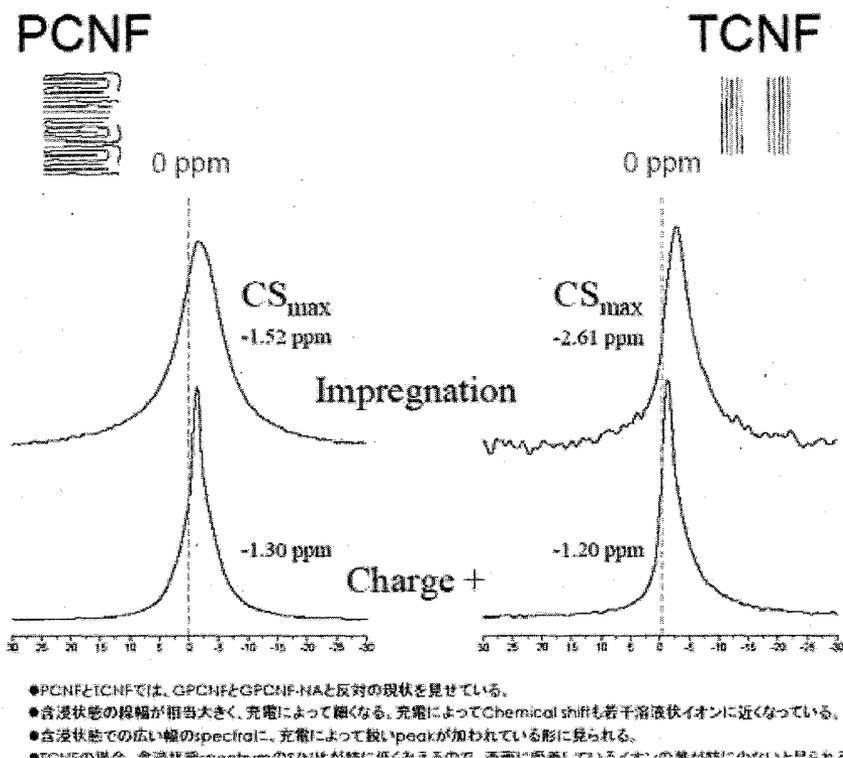


Fig.4 Results of  $^{11}\text{B}$ NMR for PCNF and TCNF

$^{11}\text{B}$ の固体NMRの結果をそれぞれ Fig.3 及び Fig.4 に示す。  
 線形からみると、二つ以上の成分が含まれていると考えられる。従って、各々の peak を二つの成分に分割した。その結果を Table 1 に示す。

Table 1 Summary of Deconvolution for  $^{11}\text{B}$  NMR spectra

Summary of Deconvolution  
 - by two species

CNF	State	CSpeak1	W1	A1	CSpeak2	W2	A2	A1+A2
Electrolyte ( $\text{BF}_4$ )	Liquid	-1.04						
	Imp	-0.64	1.66	5.96	-1.47	6.21	19.93	25.89
GPCNF	C (+)	-0.64	1.62	0.05	-1.59	10.24	19.08	19.13
	C (-)	-0.64	1.60	4.56	-1.34	6.17	22.10	26.66
GPCNF-NA	Imp	-2.99	4.71	5.54	-6.59	7.64	1.99	7.53
	C (+)	-3.96	6.03	5.24	-7.74	10.14	2.16	7.40
	C (-)	-1.63	2.04	5.58	-3.80	6.97	15.21	20.79
	D (+)	-1.64	4.39	1.42	-3.32	23.57	7.16	8.58
	D (-)	-1.78	2.37	5.86	-4.15	6.23	10.48	16.34
PCNF	Imp	-1.95	3.62	19.97	-14.83	9.33	0.25	20.22
	C (+)	-1.21	1.32	6.07	-1.66	6.14	34.61	40.68
TCNF	Imp	-2.59	4.12	1.54	-5.35	11.08	1.24	2.78
	C (+)	-1.15	2.17	4.22	-3.3	7.13	4.61	8.83

Chemical shift と線幅は上記の説明と殆ど変わらず、Peak 面積は、絶対値としては比較ができないが、同じ材料においてはある程度意味がつけられることがわかった。具体的には、① GPCNF では、Peak1 が free に近いイオンを、Peak2 は炭素表面に吸着しているイオンを示していると思われる。例えば、Peak1 は、含浸状態と Charge (-) 極の面積が似てる。一方、Charge (+) 極では殆ど現れない。Peak2 は、三つの状態で面積の違いが少ないが、Charge (+) 極での線幅のみ明らかに大きい。② GPCNF-NA では、free に近いイオンの peak が殆ど寄与していないと見られる。分けられた二つ成分がともに chemical shift と線幅が GPCNF の Peak1 に比べて相当に違うからである。吸着状態のイオンを二つ成分に分けたとも言える。面積の変化も、含浸状態と C (+) 極は二つの peak 共に変化が見られなく、Peak1 は D (+) 以外に殆ど変化がない。しかし、C (-) と D (-) で peak2 が非正常的に大きい面積を示しているのは説明しにくい。よって、2 サイトのみでの解析には多少問題が存在すると思われる。

#### 4. まとめ

今回の NMR 実験で、エッジ面 (GPCNF-NA、PCNF) がベーサル面に比べて BF<sub>4</sub>-イオンと強い相互作用をして BF<sub>4</sub><sup>-</sup> の化学状態を大きく変化させる上にイオンを強く吸着させていることは明らかにした。特に、GPCNF と GPCNF - NA の比較でより明らかに証明されている。これらの結果は、表面状態を制御した試料を用いた場合、その表面への液体の吸着状態の差異は注意深く解析すれば、固体 NMR で検出が可能であることを示している。

#### 参考文献

- 1) Tsuji M, Kubokawa M, Yano R, Miyamae N, Tsuji T, Jun MS, Hong S, Lim S, Yoon SH, Mochida I. Fast Preparation of PtRu Catalysts Supported on Carbon Nanofibers by the Microwave-Polyol Method and Their Application to Fuel Cells. *Langmuir*. 2007 Jan;23(2):387-90.
- 2) Mitani S, Lee SL, Saito K, Yoon SH, Korai Y, Mochida I. Activation of Coal Tar Derived Needle Coke with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> into an Active Carbon of Low Surface Area and Its Performance as Unique Electrode of Electric Double-Layer Capacitor. *Carbon*. 2005 Nov;43(14):2960-7.
- 3) Mitani S, Lee SI, Saito K, Korai Y, Mochida I. Contrast Structure and Edlc Performances of Activated Spherical Carbons with Medium and Large Surface Areas. *Electrochimica Acta*. 2006 Jul;51(25):5487-93.
- 4) Lee SI, Saito K, Kaneshashi K, Hatakeyama M, Mitani S, Yoon SH, Korai Y, Mochida I. B-11 Nmr Study of the BF<sub>4</sub><sup>-</sup> Anion in Activated Carbons at Various Stages of Charge of Edles in Organic Electrolyte. *Carbon*. 2006 Oct;44(12):2578-86.
- 5) Lee SI, Mitani S, Yoon SH, Choi KH, Korai Y, Saito K, Mochida I. Capacitance and H<sub>2</sub>so<sub>4</sub> Adsorption in the Pores of Activated Carbon Fibers. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*. 2006 Mar;82(4):647-52.



# 若手ポスター賞発表要旨

Young Scientists Poster Awards Abstracts

## YP01 HR-MAS を用いた生体超分子における分子認識機構を 解明する NMR 手法の開発

<sup>1</sup>東大・院薬系、<sup>2</sup>産総研 生物情報解析センター

○豊永翔<sup>1</sup>、大澤匡範<sup>1</sup>、横川真梨子<sup>1</sup>、嶋田一夫<sup>1,2</sup>

Development of the NMR method for structural analysis of the interaction in the supramolecular systems using HR-MAS

<sup>1</sup> Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup> BIRC, AIST

Shou Toyonaga<sup>1</sup>, Masanori Osawa<sup>1</sup>, Mariko Yokogawa<sup>1</sup> & Ichio Shimada<sup>1,2</sup>

Recently, it has been of great biological interest that heterogeneous supramolecular complexes are formed at the solid-liquid interface, enabling the efficient signaling. For NMR analysis of such interactions, however, the resolution and sensitivity are impaired by the line-broadening due to the local inhomogeneous magnetic susceptibility and so on. In order to overcome this problem, we have applied HR-MAS to a solid-containing interaction system consisting of a protein-immobilized beads and another protein in solution, which mimics the heterogeneous supramolecular system. Transferred cross-saturation experiments under MAS were carried out for <sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N-labeled yeast ubiquitin (Ub) and yeast Ub hydrolase (YUH)-immobilized beads, resulting in the identification of the Ub residues interacting with YUH on beads. Thus, this strategy is suggested to be generally feasible approach.

### 【背景・目的】

近年、マイクロドメインや脂質ラフトにおけるシグナル伝達のように、脂質二重膜上に複数分子が必ずしも均一でない状態で集合することによって、効率と特異性の高いシグナル伝達が可能となっていることが明らかとなり、その生物学的重要性が着目されている。このような不均一系超分子における分子間相互作用を解明するには、超分子形成の場となっている脂質二重膜を含む、より生体内に近い状態で解析する必要がある。これまでに我々は、膜タンパク質をアフィニティビーズに固定化した状態で脂質二重膜中に再構成する” bead-linked proteoliposome (BPL) ”を開発し、実際にカリウムチャネル KcsA を再構成した BPL とチャネルブロッカーである Agitoxin 2 の相互作用を転移交差飽和 (TCS) 法による解析に成功した (Yokogawa M. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005)。しかし、ビーズなどの不溶性成分が試料に共存することで、NMR スペクトルが大きく広幅化し解析が困難になることが問題となっていた。

転移交差飽和法、HR-MAS、相互作用、不均一系

とよなが しょう、おおさわ まさのり、よこがわ まりこ、しまだ いちお

そこで本研究では、マジック角高速回転(MAS)によりスペクトルの高感度化・高分解能化を図り、TCS法にて固体が共存する不均一超分子系における分子間相互作用を立体構造の観点から解明するNMR測定法を開発することを目的とする。

### 【方法】

#### (1) MAS条件下での測定を目指した不均一相互作用系の作製

相互作用系として、解離定数 ( $19\mu\text{M}$ ) および複合体の立体構造が知られている酵母ユビキチン(Ub: 8.6kDa)と酵母ユビキチン加水分解酵素(YUH: 26kDa)を選択した。YUHのN末端に10xHisタグを導入し、Znアフィニティビーズに固定化することによって、固体を共存させるだけでなく、YUHの運動性を抑制し見かけ上の高分子量化を図った試料を調製した(Fig.1)。ビーズの素材、YUHの固定化量、pHによる固定化安定性の違いなどの基礎検討を行った。

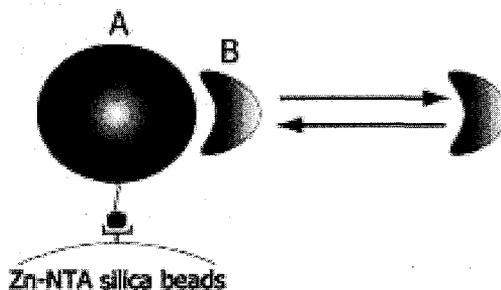


Fig.1 Schematic representation of the immobilized protein (A) and soluble protein (B) under chemical exchange between free state and bound state.

#### (2) MAS条件下でのTCS法による相互作用界面の同定

2mM 均一 $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識 Ub 溶液 (50mM NaCl, 50mM NaPi, pH6.5, 80%D<sub>2</sub>O) で上記 YUH 固定化ビーズを平衡化し、4mm HR-MAS ロータに詰めることにより NMR 試料とした。MAS 回転速度 9kHz、25°Cにおいて、TCS法の測定を行った。

### 【結果・考察】

アガロースビーズなどの膨潤性のビーズでは、MASの遠心力による固相・液相の分離が見られた。このような相分離は分子間相互作用の場である固液界面を減少させ、TCS法を適用することは不可能であった。そこで、ガラス状の多孔性シリカビーズを用いたところ、相分離を抑制することができた。YUHは、N末端に付加した10xHisタグを介してZn-NTAシリカビーズに固定化した結果、終濃度は $600\mu\text{M}$ であった。また、pH8.0で固定化したYUHは、pH5-8では解離しないことを確認し、アミド水素原子の交換を抑制できる酸性条件でのNMR測定が可能であることが判明した。固定化されたYUHは、非常に広幅化した $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを与えた。このことからYUHは運動性が強く抑制され、見かけ上巨大分子量の蛋白質として振舞うことが示唆された。

YUH固定化ビーズ共存下での $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -UbのMAS条件下での $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルは、静止状態に比べ、分解能が劇的に改善された。TCS法の測定を行ったところ、Ub上のYUH結合界面選択的に交差飽和が観測され、本手法が固液界面の相互作用系の解析に有用であることが示された。

## YP02 効率的な区分安定同位体標識タンパク質調製手法

(北海道大学大学院薬学研究院)

○小橋川 敬博、内藤 雅人、久米田 博之、原田 幸祐、稲垣 冬彦

Effective method for preparation of segmental isotope labeled protein

○Yoshihiro Kobashigawa, Masato Naito, Hiroyuki Kumeta, Kosuke Harada,  
Fuyuhiko Inagaki

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Univ.)

Intein mediated protein ligation (denoted as IPL) is a useful way to prepare segmental isotope labeled protein. There are two different IPL; native chemical ligation (denoted as NCL) and split intein. Split intein exhibits appreciable ligation efficiency, while protein is expressed as insoluble fraction and should be solubilized and be refolded. NCL allows protein to be expressed as soluble fraction, while ligation efficiency is quite low. Here we show an improved NCL method that utilizes artificially introduced cognate binding modules into fragments for ligation. This enhances the local concentration of N-terminus fragment around C-terminus fragment so that ligation reaction proceeds efficiently. This method was successfully applied for preparation of fusion protein between non-labeled GB1 domain and  $^{15}\text{N}$ -labeled Vav cSH3 domain followed by NMR analysis.

### Intein を利用した Protein Ligation の現状

intein 反応を利用することで別々に調製した2つのタンパク質断片をペプチド結合で結合させることが可能である。これを用いることで区分選択的同位体標識試料の調製が可能である。intein を利用した連結反応は2通りに分けられる。一つ目は split intein である。この方法は ligation の効率は高いが intein を分割させているために intein 自体が構造をとらず、不溶性画分として発現され、封入体を変性剤で可溶化した後に2つの断片を混ぜ合わせて

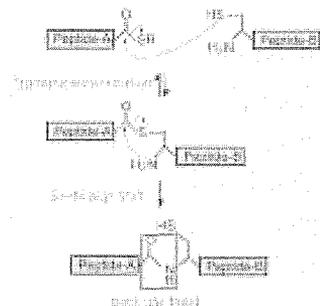


Fig.1. Schematic representation of Native Chemical Ligation (NCL).

キーワード : SH3, PB1, motif, interaction, intein

○こばしがわ よしひろ、ないとう まさと、くめた ひろゆき、はらだ こうすけ、  
いながき ふゆひこ

タンパク質を再生する必要がある。二つ目は Native Chemical Ligation (NCL) である。intein を用いることで連結反応に用いる N 末端側断片の C 末端残基にチオエステルを付加し、N 末端に Cys を有する C 末端側断片と連結する方法である (Fig. 1)。NCL はタンパク質を可溶性で発現できる反面、反応効率が低い。そのため、split intein、NCL 共に収率が低く、構造解析に十分な量の同位体標識試料を作成するためには多大なコストを必要としていた。NCL においては反応効率を高めるために高濃度 (数百  $\mu\text{M}$ ~数 mM) のタンパク質を用いて反応を行われてきた。このことが NCL の利用を溶解性が高い試料や短いペプチド断片を C 末端断片として利用できるケースに限定してきた。intein を利用した protein ligation の基本技術は 1990 年代に開発されていたものの、区分同位体標識試料を用いた初めての NMR による溶液構造決定の実例が報告されたのは 2006 年に入ってからである<sup>(1)</sup>。今回、我々は N 末端側断片および C 末端側断片に相互作用モジュールを導入することで N 末端側断片に対する C 末端側断片の局所濃度を向上し、NCL の反応効率を改善させることが可能なのではないかと考えた。はじめに、マルチドメインタンパク質である CrkII (SH2-SH3-SH3) の連結反応において相互作用モジュールの有無による ligation 効率の相違について検討した。ついで、相互作用ドメインを利用して、non-label の GB1 ドメインと  $^{15}\text{N}$ -label Vav SH3(C) の融合タンパク質の調製を行い、NMR スペクトルの測定を行った。

### Zip PB1 ドメインを利用した ligation 反応

PB1 ドメインは数 nM の解離定数で異種 PB1 ドメイン間で 2 量体を形成する 100 残基程度のユビキチンフォールドをもつドメインである。例外的に、Zip の PB1 ドメインは同種の PB1 同士で結合し、多量体化することが知られている。しかしながら、K7A 変異体および D67A 変異体は多量体化する性質は示さず、2 つの変異体間で互いに 2 量体を形成することが知られている<sup>(2)</sup>。そこで、Zip PB1 (K7E) を N 末端側断片に融合し、PB1 (D67A) を C 末端側断片に組み込んだコンストラクトを作成し (Fig2)、ligation 反応を行った。また、C 末端断片の N 末端側には Thioredoxin (Trx) とその下流に TEV protease 切断サイト (ENLFYFQ/C) を導入しておき、TEV 消



Fig. 2. Schematic representation of the constructs used for assessment of effect on ligation efficiency of introducing Zip PB1/PB1 interaction into CrkII.

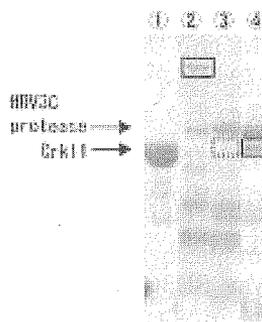


Fig. 3. SDA-PAGE analysis of ligation product. Lane 1; CrkII marker, lane 2; ligation product using PB1/PB1 interaction, lane 3; ligation product without PB1/PB1 interaction, lane 4; HRV3C digested product of lane; 2.

化により N 末端 Cys を露出させた。また、それぞれのコンストラクトには HRV3C プロテアーゼ切断サイトを導入しておき、PB1 の部分を切り離せるようにしておいた。HRV3C で予め PB1 を切り離すことで相互作用モジュール無しのコントロールとして利用できる。N 末端断片の濃度が  $7.5\mu\text{M}$ 、C 末端断片の濃度が  $22.5\mu\text{M}$  において 48 時間 ligation 反応を行った(Fig3)。レーン 1 は CrkII マーカー、レーン 2 は相互作用あり、レーン 3 は相互作用なし、レーン 4 はレーン 2 の産物を HRV3C プロテアーゼで消化した産物である。その結果、相互作用有りでは CrkII のバンドが確認されたが相互作用無しでは確認できず、相互作用モジュールの付加により ligation 反応効率が向上することが示された。また、プレリミナリーな実験において、Grb2 SH3(C)と Vav SH3(N)の相互作用を用いた系においても相互作用モジュールの付加により ligation 反応効率の向上を確認している。そのため、相互作用モジュールを N 末端断片と C 末端断片に導入することが NCL の効率を上げるための一般的な手法として利用できる可能性があることが示唆される。

#### 区分選択的同位体標識試料のタンパク質可溶化への応用

GB1、Thioredoxin (Trx)、MBP は融合タンパク質として発現させることでタンパク質の可溶性を改善することが知られている。GB1 ドメインはこれらの中で最も小さく、55 残基よりなる。可溶性が悪いタンパク質に付加することで溶解性を改善し、構造決定に成功した例が報告されている<sup>(3)</sup>。比較的分子量が小さい(~7kDa 程度)タンパク質であれば GB1 由来の信号との重なりは問題にはならないがより大きな系では信号の重なりが問題になることが考えられる。しかしながら、区分選択的安定同位体標識のテクニックを利用することで GB1 のみならず Trx 等も目的タンパク質との信号の重なりを気にすることなく利用できることになる。そこで、本研究では Vav SH3(C)に対して今回開発した ligation 手法を適用し、non-label の GB1 と  $^{15}\text{N}$ -label Vav SH3(C)の融合タンパク質の調製を試みた。Vav SH3(C)は可溶性が悪い試料の一つであり、pH 6.8 において  $50\mu\text{M}$  以下の溶解度しか示さず、溶液構造決定には至っていなかった。しか

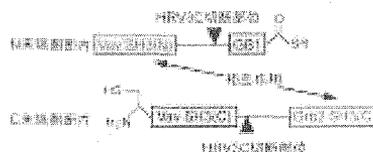


Fig. 4. Schematic representation of the constructs used for preparing the fusion protein between non-labeled GB1 and  $^{15}\text{N}$ -labeled Vav SH3(C).

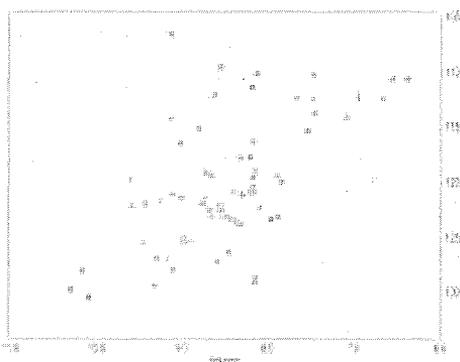


Fig. 5. HSQC spectrum of the fusion protein between non-labeled GB1 and  $^{15}\text{N}$ -labeled Vav SH3(C).

しながら、GB1 と融合タンパク質にすることで著しく溶解度が改善する。そこで、Grb2 SH3(C)と Vav SH3(N)の相互作用を利用して non-label の GB1 ドメインと  $^{15}\text{N}$ -label Vav SH3(C)の融合タンパク質の調製を行った。GB1 の N 末端側に Vav SH3(N)を融合したタンパク質を N 末端側断片とし、Vav SH3(C)の C 末端側に Grb2 SH3(C)を融合したものを C 末端側断片として用いた(Fig. 4)。C 末端断片の N 末端側には Trx とその下流に TEV protease 切断サイト(ENLFYFQ/C)を導入しておき、TEV 消化により N 末端 Cys を露出させた。Grb2 SH3(C)および Vav SH3(N)は ligation 反応後に目的断片から切り離せるように HRV3S 切断サイトを導入したものを用いた。N 末端断片が 21 (2xYT 培地)分、C 末端断片が 11 (M9 培地)分の試料を用いて区分選択的安定同位体試料を作成し、収量は約 2~3mg であった。構造解析に用いるには十分な収量である。これを用いて HSQC スペクトルを測定し、良好なスペクトルを得た(Fig. 5)。現在、non label GB1 と  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  label Vav SH3(C)の融合タンパク質の調製を試みている。本討論会ではこの試料を用いた立体構造決定についても紹介する予定である。

### 考察

昨年度の NMR 討論会において我々は SH3 ドメインとその結合配列を kinase と基質タンパク質に導入することでリン酸化タンパク質を効率的に調製することが可能であることを報告した。今回、我々は相互作用モジュール導入を NCL に応用した。リン酸化反応は基質-酵素の反応であるために、酵素の turnover を考慮する必要がある。そのため、数  $\mu\text{M}$  程度の解離定数を持つ弱い相互作用モジュールを利用した。NCL においては turnover を考慮する必要がない。むしろ、N 末端断片と C 末端断片が常に近くにいることが反応効率を向上させる上で重要であると考えられる。相互作用モジュールと ligation 効率の相関を調べることは今後の課題の一つであろう。

### REFERENCES

- (1) Vitali F, Henning A, Oberstrass FC, Hargous Y, Auweter SD, Erat M, Allain FH. Structure of the two most C-terminal RNA recognition motifs of PTB using segmental isotope labeling. *EMBO J.* 2006. **25**:150-162.
- (2) Wilson MI, Gill DJ, Perisic O, Quinn MT, Williams RL. PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol Cell.* 2003. **12**:39-50.
- (3) Chang YG, Song AX, Gao YG, Shi YH, Lin XJ, Cao XT, Lin DH, Hu HY. Solution structure of the ubiquitin-associated domain of human BMSC-UbP and its complex with ubiquitin. *Protein Sci.* 2006. **15**:1248-1259.

Novel *E. coli* Protein Expression System and its Application for NMR

*Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology*

○Kokoro Hayashi and Chojiro Kojima

The *E. coli* protein expression system is one of the most popular systems to prepare NMR sample. There are many techniques to improve the protein expression, for example, the use of expression tags, such as GST and MBP. Recently, an efficient protein expression system at low temperature (pCold expression system) was developed by Qing *et al.* (*Nature Biotech*, 2004). Here, we improved the pCold expression system combined with the expression tag technique and applied it to 10 proteins that did not express in conventional *E. coli* expression system. In our new system, 9 proteins out of 10 were successfully expressed and all of them were found in soluble fraction. 2 small proteins that are tend to be degraded were successfully purified and gave well-separated  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra. Thus, our new protein expression system is a powerful tool to prepare NMR samples.

### 序論

NMRを用いたタンパク質の解析には安定同位体標識された大量のサンプルが必要である。中でも大腸菌による大量発現系は最も広く用いられているサンプル調製法の一つであるが、大腸菌による発現精製が困難なタンパク質も数多く存在する。これまでに組換えタンパク質の溶解度や安定性を上げるための戦略として、glutathione-S-transferase (GST)や maltose-binding protein (MBP)などの発現タグを用いる方法や、発現誘導を低温で行うコールドショックベクター(pColdI~IV)を用いる方法(G. Qintg *et al.*, *Nature Biotech*, 2004)などが開発されてきた。しかしながら、これらの方法を用いても発現精製の困難なタンパク質が依然として多く存在する。今回、我々はpColdI ベクターと可溶性タグを組み合わせることで新規発現系の構築を行い、当研究室において発現困難であった 10 種類のタンパク質に適用することでその有効性を確認することができた。

---

キーワード：大量発現、大腸菌、コールドショックベクター、可溶性タグ

はやし こころ、こじま ちょうじろう

## 発現系

pCold I ベクターは、組換えタンパク質の N 末端に His タグを融合発現するように設計されたコールドショックベクターである。本研究では可溶性画分に回収できる目的タンパク質の増加を図って、この pCold I ベクターのマルチクローニングサイトと His タグ配列の間に GST タグ配列を挿入したベクター、pCold I GST を作成した (Fig. 1)。また pCold I GST には、精製過程でのタグ切断を容易にするため、極めて特異性の高いプロテアーゼ HRV3C の切断配列を挿入した。

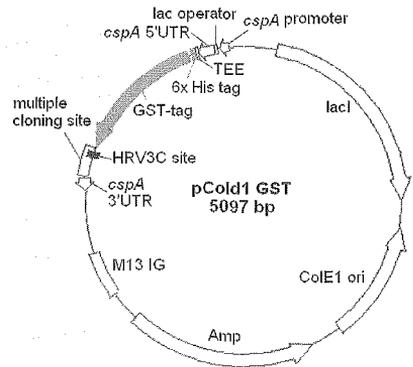


Fig. 1 Structure of pCold I GST vector.

## 組換えタンパク質の発現および NMR 実験

本研究では、当研究室においてこれまで発現に成功していなかった 10 種類の組換えタンパク質について上記の発現系を適用した。そのうち 2 種類は発現困難であったものであり、4 種類は分解をうけるために発現困難なものであった。分解を受ける 4 種類については分解産物との分離を容易にするため、C 末端にも His タグ配列を付加した。その結果、10 種類中 9 種類のタンパク質について、可溶性画分に回収することに成功した。そのうち Tsr(214-269) および NHE1(503-545) については安定同位体標識に成功し、良好な NMR スペクトルを得ることができた。Fig. 2 に Tsr(214-269) についての発現精製結果とその NMR スペクトルを示す。

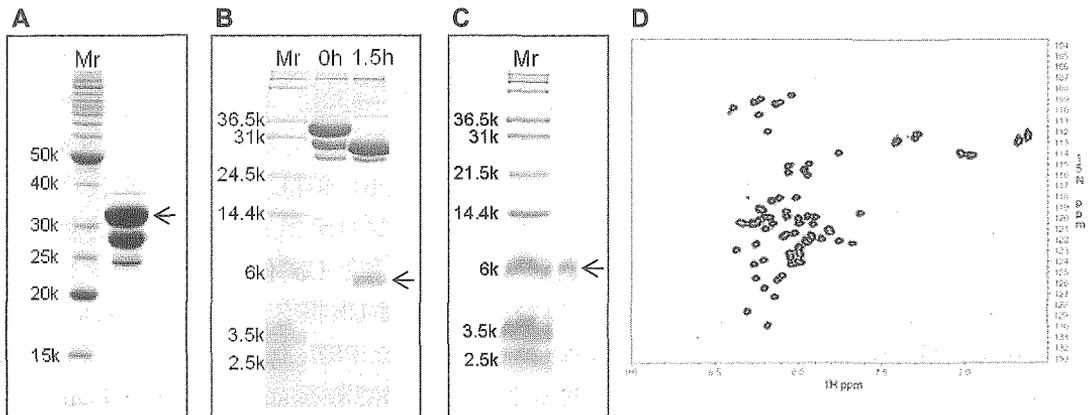


Fig. 2 NMR sample preparation of Tsr(214-269). (A) Purification by glutathione sepharose resin. (B) GST-tag digestion by HRV3C. (C) Final sample. (D)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of Tsr(214-269).

## まとめ

本研究で構築した発現ベクター、pCold I GST は当研究室で発現困難であった 10 種類中 9 種類のタンパク質の発現を可能にし、これら全ての発現タンパク質が可溶性画分に回収できた。本発現システムでは、発現段階で分解を受けやすい組換えタンパク質にも有効であるため、NMR サンプル調製において幅広い応用が期待される。

YP04

## タンパク質分解系におけるユビキチン鎖の相互作用解析

○住吉 晃<sup>1,2</sup>、坂田 絵理<sup>1</sup>、笹川 拓明<sup>2</sup>、武本 映美<sup>1</sup>、平尾 武士<sup>1</sup>、  
山口 芳樹<sup>1</sup>、Wei Li<sup>3</sup>、Claudio A.P. Joazeiro<sup>3</sup>、鈴木 匡<sup>4</sup>、加藤 晃一<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院・薬学研究科、<sup>2</sup>自然科学研究機構・分子科学研究所、

<sup>3</sup>The Scripps Research Institute、<sup>4</sup>大阪大学大学院・医学系研究科)

### NMR analyses of the interactions of ubiquitin chains in the protein degradation system

○Akira Sumiyoshi<sup>1,2</sup>, Eri Sakata<sup>1</sup>, Hiroaki Sasakawa<sup>2</sup>, Emi Takemoto<sup>1</sup>, Takeshi Hirao<sup>1</sup>,  
Yoshiki Yamaguchi<sup>1</sup>, Wei Li<sup>3</sup>, Claudio A.P. Joazeiro<sup>3</sup>, Tadashi Suzuki<sup>4</sup> and Koichi Kato<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, <sup>2</sup>Institute for  
Molecular Science, National Research Institutes, <sup>3</sup>The Scripps Research Institute, <sup>4</sup>Graduate  
School of Medicine, Osaka University

Ubiquitin (Ub) chain acts as a principal signal for proteasomal protein degradation mediated by weak interactions with the Ub-binding proteins (UBPs). Intriguingly, the fate of ubiquitinated proteins depends on the length and linkage type of Ub chains. To provide the structural basis for the recognition of Ub chains, we performed NMR analyses of the protein-protein interactions between UBPs and Ub chains. In this report, we describe the binding studies of the two key enzymes involved in the protein degradation system:

- (1) Detection of a putative weak interaction between the donor Ub and the acceptor Ub on Ub-conjugating enzyme E2 in the process of ubiquitination.
- (2) Quantitative analyses of the interaction between Lys48-linked Ub chain and the PUB domain of peptide:N-glycosylase (PNGase).

細胞内のタンパク質分解系におけるユビキチン (Ub) 鎖は、Ub 結合タンパク質 (UBPs) との比較的弱い相互作用を介しながら、26S プロテアソームに認識される分解マーカーとしての役割を演じている。興味深いことに、Ub 化された基質タンパク質の運命は、Ub 鎖の鎖長や連結様式の違い、あるいは Ub 様タンパク質群 (Ubls) により時空間的に制御されている。我々はこれまでに PRE (paramagnetic relaxation enhancement) を利用することで、脱 Ub 化酵素の一つである ataxin-3 による Ub 鎖認識メカニズムを明らかにした。本研究では、さらに体系的にタンパク質分解系における Ub 鎖の分子認識様式を理解するために、Ub 鎖の伸長と糖鎖の除去に関わる酵素をターゲットにして NMR 法によるタンパク質-タンパク質間の相互作用解析を行った。

キーワード：PRE、タンパク質間相互作用、ユビキチン鎖

著者ふりがな：○すみよし あきら、さかた えり、ささかわひろあき、たけもと えみ、ひらおたけし、やまぐち よしき、Wei Li, Claudio A.P. Joazeiro, すずき ただし、かとう こういち

基質に Ub を転移する Ub 化酵素 (E2) の 1 つである Ubc4 は、活性部位を構成する Cys85 を用いて、Ub の C 末端カルボキシル基とチオエステル結合中間体を形成する。我々は Ub 転移反応の構造的基盤を明らかにするために、Ubc4 の変異体 Ubc4 (C85S) を用いて酵素反動的に Ubc4-Ub 複合体を調製した。Ubc4 もしくは Ub をサブユニット選択的に安定同位体標識した Ubc4-Ub 複合体を調製し、Ub 転移反応におけるドナー-Ub とアクセプター-Ub 間の相互作用解析を行った。アクセプター-Ub の添加に伴い、Ubc4 に共有結合した Ub (ドナー-Ub) の Ile44 を中心とする疎水性表面の HSQC ピークに有意な化学シフト変化が誘起された。このことから、Ubc4-Ub 複合体はドナー-Ub によりアクセプター-Ub を認識していることが判明した (Fig. 1)。それにより、効率的に Ubc4-Ub 複合体からアクセプター-Ub への Ub の転移が起こるものと考えられる。

Peptide:N-glycosylase (PNGase) は、26S プロテアソームに分解される前にユビキチン化された糖タンパク質の N 結合型糖鎖を切除する酵素である。我々は NMR 法による立体構造解析により、PNGase の N 末端側の Ub 結合ドメインである PUB ドメインの立体構造を決定した (Fig. 2)。PUB ドメインは、5 つの  $\alpha$ -helix と 3 つの  $\beta$ -strand から構成されていた。PUB ドメインによる Ub 鎖の認識様式を明らかにするため、Ub サブユニットが選択的に安定同位体標識された Ub の 2 量体 (di-Ub) を用いて、相互作用に伴う HSQC ピークの化学シフト変化を観測した。その結果、PUB ドメインの添加に伴い、やはり Ub の Ile44 を中心とする疎水性表面の HSQC ピークに有意な化学シフト変化が誘起された。化学シフト変化を指標にした滴定実験の結果、PUB ドメインと diUb の結合定数は  $K_a = 8.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  であることが示された。NMR 解析および Frontal Affinity Chromatography 解析から、興味深いことに、Ub 鎖に対する PUB ドメインの親和性は鎖長依存的に増大することが明らかとなった。

本研究において、NMR 解析を通じて明らかにした Ub と UBPs の相互作用は、いずれも単独では結合定数が  $10^3 \sim 10^4 \text{ M}^{-1}$  程度と極めて弱いものであった。タンパク質分解系は、Ub 鎖の形成から分解に至る反応を進行する過程で、こうした Ub を介した弱い相互作用を重ねさせることや他のタンパク質間相互作用を組み合わせることにより、親和性の制御を行っている可能性を示すことができた。本研究は、Ub 修飾を介して細胞内におけるタンパク質分解の時空間的な制御を行うメカニズムの一端を明らかにしたものとする。

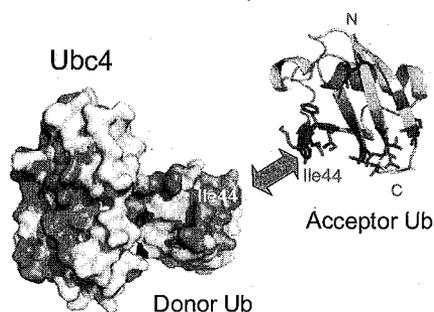


Fig. 1 Representation of the binding interface between Ubc4-Ub complex and the acceptor Ub. Chemical shift perturbation data indicated that the donor Ub directly interacts with the acceptor Ub.

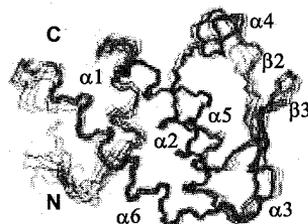


Fig. 2 Superposition of the backbone atoms of the 10 lowest energy structures of the PUB domain (PDB code: 2D5U).

YP05

呼吸鎖末端酸化酵素に対するシトクロム *c* の  
電子輸送メカニズム

○坂本光一<sup>1</sup>, 神谷昌克<sup>2</sup>, 伊藤(新澤)恭子<sup>3</sup>, 内田毅<sup>1</sup>,  
相沢智康<sup>2</sup>, 出村誠<sup>2</sup>, 河野敬一<sup>4</sup>, 吉川信也<sup>3</sup>, 石森浩一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北大院・理・化学, <sup>2</sup>北大院・生命科学・生命科学,

<sup>3</sup>兵県大院・生命理・生命科学, <sup>4</sup>北大院・理・生命理

Electron Transfer Mechanism between Cytochrome *c* and  
Cytochrome *c* Oxidase in the respiratory chain

Koichi Sakamoto<sup>1</sup>, Masakatsu Kamiya<sup>2</sup>, Shinzawa-Itoh Kyoko<sup>3</sup>, Takeshi Uchida<sup>1</sup>, Tomoyasu  
Aizawa<sup>4</sup>, Makoto Demura<sup>2</sup>, Keiichi Kawano<sup>4</sup>, Shinya Yoshikawa<sup>3</sup>, Koichiro Ishimori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University,

<sup>2</sup>Division of Molecular Life Science, Graduate School of Life Science, Hokkaido University,

<sup>3</sup>Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo,

<sup>4</sup>Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University

To properly transfer electrons from Cytochrome *c* (Cyt *c*) to Cytochrome *c* Oxidase (CcO), the site specific electron transfer complex is required. Although recent theoretical studies suggest the importance of the hydrophobic interactions to form the complex, there are no experimental evidences that hydrophobic residues are involved in the formation of the complex. To examine the contribution of hydrophobic interactions to the formation of the Cyt *c*-CcO complex, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra of ferrous and ferric <sup>15</sup>N-labeled Cyt *c* were measured in the absence and presence of CcO. Our NMR data revealed that several hydrophobic residues of Cyt *c* are located in the CcO binding site and the hydrophobic interactions depend on the oxidation state of Cyt *c*. Based on these NMR data, we propose a regulation mechanism for the electron transfer associated with oxygen reduction in CcO.

**【緒言】**呼吸鎖では、シトクロム *c* (Cyt *c*) からシトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) に電子が伝達されることにより、酸素分子がプロトンと反応し、水分子へと還元される。この酸素還元反応には 4 電子が必要であるが、Cyt *c* は 1 度に 1 電子しか CcO に伝達することができないため、Cyt *c* は CcO と複合体の形成および解離を繰り返すと考えられる。この Cyt *c*-CcO 複合体の形成には、過去の研究より Cyt *c* の Lys を介した静電相互作用が重要であると考えられてきたが、溶媒和まで考慮に入れたタンパク質複合体の構造安定性に関する最近の理論研究によると、極性残基間の静電相互作用は、その複合

電子伝達, タンパク質間相互作用, chemical shift perturbation

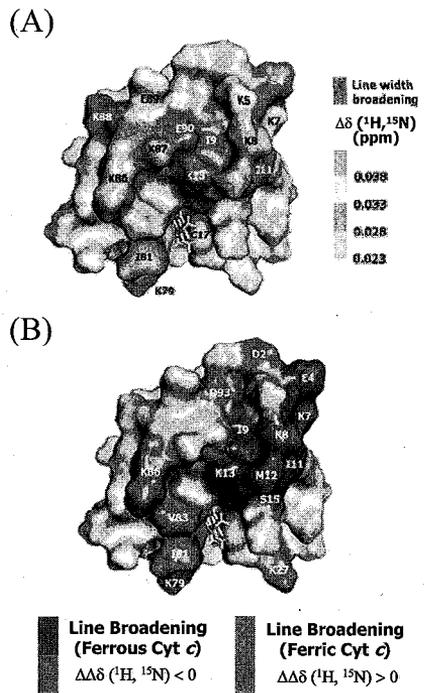
さかもと こういち

体の形成においてはエネルギー的に有利に働くものの、脱溶媒和によるエネルギーの損失を埋め合わせることができないと指摘されており、このエネルギーの損失を埋める役割を担うのが疎水性相互作用であると提案されている。Cyt *c*-CcO 複合体においては、その結合部位などの構造解析がほとんど検討されていないため、複合体の形成機構における疎水性相互作用の寄与は未だ明らかにはなっていない。そこで本研究では、タンパク質間の結合部位を同定することが可能な NMR を用い、Cyt *c* の CcO との結合部位を同定することで、非極性残基による複合体形成の制御機構に関する知見を得ることを試みた。

**【実験】** 酸化体および還元体 Cyt *c* の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定し、これらのシグナルの帰属は CBCANH, CBCA(CO)NH 等の 3 次元 NMR 測定を用いて行った。CcO 結合部位の同定は、CcO 添加前後の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの比較から行った。

**【結果および考察】** CcO 存在下において還元体 Cyt *c* の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定したところ、Fig.1(A) に示すように、CcO 結合部位には過去に報告されている極性残基だけでなく、Ile9 などの非極性残基もいくつか存在し、疎水的なヘムを CcO 側に向けて結合することが明らかとなった。CcO の電子受容部位である Cu<sub>A</sub> 近傍にも非極性残基が多く存在することを考慮すると、Cyt *c*-CcO 間の疎水性相互作用により、電子伝達を行う Cyt *c* のヘムと CcO の Cu<sub>A</sub> が向き合うような形で複合体の構造を安定化させていることが示唆された。

このような疎水性相互作用は、Cyt *c* からの電子が CcO に移動した状態に対応する酸化型 Cyt *c* においても同様に観測された。しかし、Fig.1(B) の青色で示した Ile9 や Ile11 のように、還元体では N 末端領域の疎水性相互作用が強くなっているのに対し、酸化体では、Fig.1(B) の赤色で示した Ile81 や Val83 のようにヘム近傍の残基において疎水性相互作用が強くなっていることが明らかとなった。このように還元体と酸化体で疎水性相互作用が異なることは、電子伝達に伴って Cyt *c*-CcO 間の親和性が変化することを意味している。つまり、Cyt *c* は電子移動に伴い CcO との疎水的な相互作用部位を変化させることで、その複合体形成能を制御し、効率の良い酸素還元反応を実現していることが考えられた。



**Fig.1 (A) CcO binding site on Cyt *c*.** Not only electrostatic interactions but also hydrophobic interactions would play important roles in the formation of the Cyt *c*-CcO complex. **(B) Comparison of the CcO binding site between ferrous and ferric Cyt *c*.** On oxidation of ferrous Cyt *c*, interactions derived from N-terminal region (blue) were weakened, but heme vicinity (red) were strengthened.

## 小胞体ーゴルジ体間選択的セラミド輸送分子 CERT の ゴルジ体移行メカニズムの構造生物学的解析

○杉木俊彦<sup>1,2</sup>、寺沢宏明<sup>1</sup>、熊谷圭悟<sup>3</sup>、花田賢太郎<sup>3</sup>、西島正弘<sup>3</sup>、小野克輝<sup>2</sup>、  
高橋栄夫<sup>4</sup>、嶋田一夫<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>東大・院薬系、<sup>2</sup>JBIC・JBIRC、<sup>3</sup>感染研・細胞化学部、<sup>4</sup>産総研・BIRC

### Structural biological analyses of the Golgi apparatus-targeting mechanisms of CERT, intracellular ER-to-Golgi specific ceramide trafficking protein

°Toshihiko Sugiki<sup>1</sup>, Hiroaki Terasawa<sup>4</sup>, Keigo Kumagai<sup>3</sup>, Kentaro Hanada<sup>3</sup>, Masahiro Nishijima<sup>3</sup>, Katsuki Ono<sup>1</sup>, Hideo Takahashi<sup>2</sup> and Ichio Shimada<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Japan Biological Information Research Center (JBIRC), Japan Biological Infomatics Consortium (JBIC)

<sup>2</sup>Biological Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Cell Biology, National Institute of Infectious Diseases

<sup>4</sup>Graduate school of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo

Ceramide trafficking protein (CERT) plays a central role in intracellular ceramide trafficking from endoplasmic reticulum (ER) to Golgi in mammalian cells. CERT has a pleckstrin homology (CERT-PH) domain, which specifically recognizes phosphatidylinositol 4-monophosphate (PtdIns(4)P) abundant on Golgi membrane, its interaction is essential for translocation of CERT to Golgi. In this study, we determined Golgi-binding surface on CERT-PH by transferred-cross saturation (TCS) experiments using NMR spectroscopy. As a result, we found that a amino acid sequence of lipid membrane-binding site in the surface on CERT-PH is conserved only in PH domains which recognizes PtdIns(4)P and translocate to Golgi. From these results, we proposed that the sequence of the lipid membrane-binding site is a unique and novel functional motif exists in the PH domains which target to Golgi.

Ceramide trafficking protein (CERT) は、小胞体 (ER) の膜上で生合成されたセラミドを Golgi 体へと輸送する細胞質タンパク質である。輸送されたセラミドは、形質膜の主要な構成脂質である Sphingomyelin (SM) の前駆体として必要であるため、CERT は SM の生合成および形質膜の正常な形成に不可欠な役割を担っている。

CERT の N 末端に存在する pleckstrin homology (PH) ドメイン (CERT-PH) は、Golgi 体膜上に豊富に発現している phosphatidylinositol 4-monophosphate (PtdIns(4)P) を特異的に認識することにより、CERT を Golgi 体へと移行させる役割を担っている。実際、CERT-PH の欠失もしくは変異によって PtdIns(4)P 結合能を失った CERT は、ER から Golgi 体へとセラミドを輸送する活性をほぼ完全に失うことが報告されており、CERT がセラミド輸送活性を発現するうえで CERT-PH と Golgi 体の相互作用は必須である。本研究では、CERT-PH による Golgi 体の認識様式を明らかにすることにより CERT のセラミド輸送活性のメカニズムを解明することを目的とし、NMR 分光法による構造生物学的手法を駆使して CERT-PH と Golgi 体の相互作用解析を行った。

---

Ceramide trafficking protein (CERT)、Pleckstrin homology (PH) domain、セラミド、転移交差飽和法

すぎき としひこ、てらさわ ひろあき、くまがい けいご、はなだ けんたろう、にしじま まさひろ、おの かつき、  
たかはし ひでお、しまだ いちお

## 【方法および結果】

### CERT-PH の NMR 解析を可能にする溶液条件の探索

安定同位体標識 CERT-PH を大腸菌発現系にて調製した。しかし精製した CERT-PH は凝集しやすく、シグナルのブロードニングのために NMR 解析が困難であった。そこで、一分子蛍光分析法を用いて high-through put に NMR サンプルの凝集状態をスクリーニングすることのできる系を独自に構築し、これで CERT-PH の分散状態を改善する溶液条件を網羅的に探索した。その結果、線幅がシャープで分散の良い  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを与える溶液条件を迅速に見出すことに成功し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC シグナルのほぼ全て(99%)を帰属することができた。発表では、本溶液条件スクリーニング手法の詳細についても報告する。

### 転移交差飽和法による CERT-PH - Golgi 体相互作用界面の決定

PtdIns(4)P を含む脂質二重膜に対する CERT-PH 上の相互作用界面を調べるため、哺乳動物細胞の Golgi 体の脂質組成を模して作製したリポソームをリガンドとして用いた。しかし、リポソームは数千~数万 kDa の巨大かつ不均一な分子集合体であり、X 線結晶構造解析を含めた従来の構造生物学的手法では CERT-PH とリポソームの結合界面を決定することは不可能である。そこで、当研究室で開発された NMR 測定手法である転移交差飽和 (Transferred cross-saturation; TCS) 法で相互作用界面を調べることを試みた。

TCS 実験の結果を CERT-PH の立体構造モデル上にマッピングしたところ、CERT-PH 上でリポソームからの交差飽和の影響を顕著に受けたアミノ酸残基は、CERT-PH 分子表面にて連続した面を形成していた (Fig.)。この界面は、 $\beta 1$ - $\beta 2$  間のループ部分の表面とその内側の窪みで形成されていた。

また、CERT-PH が認識しない PtdIns(3)P もしくは PtdIns(5)P を含むリポソームに対する相互作用界面を TCS 法により調べた結果、 $\beta 1$ - $\beta 2$  間のループ部分の外側表面のみに顕著な影響が検出された (Fig.)。以上の結果から、 $\beta 1$ - $\beta 2$  間のループ部分の外側表面は脂質二重膜との相互作用界面であり、もう一方の内側の窪みは PtdIns(4)P 結合部位であると結論した。

## 【まとめと考察】

NMR 分光法である TCS 法により、CERT-PH 上の PtdIns(4)P 結合部位と脂質二重膜結合部位を同定した。CERT-PH が Golgi 体へと CERT を移行させるには、リン酸基の数が少ない PtdIns(4)P との結合だけでは affinity が不十分であり、脂質二重膜との相互作用が重要な寄与をしていると考えられる。

さらに、他の PH ドメイン類と比較した結果、CERT-PH 上の脂質二重膜結合部位のアミノ酸配列は、CERT-PH をはじめとして PtdIns(4)P をリガンドとする PH ドメイン群のみに高度に保存されていることが明らかとなった。以上の結果から、我々は、CERT-PH 上に見出した脂質二重膜結合部位を形成するアミノ酸配列は、PtdIns(4)P を認識して Golgi 体に局在する PH ドメイン群のみがもつ機能モチーフであると考えている。

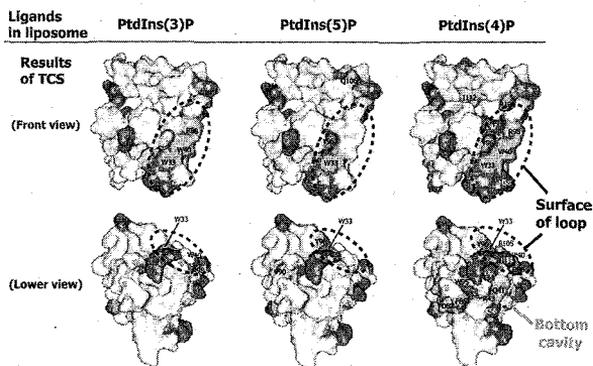


Fig. TCS experiments using several different ligand-embedded liposomes revealed that CERT-PH has two binding sites, PtdIns(4)P- and lipid membrane-binding sites, to interact with Golgi.

## 茶カテキン類の動的挙動の NMR を用いた解析

(静岡県大院生活健<sup>1</sup>, 信州大農<sup>2</sup>)○植草義徳<sup>1</sup>, 上平美弥<sup>1</sup>, 中村浩蔵<sup>2</sup>, 中山勉<sup>1</sup>Dynamic behavior of tea catechins interacting with lipid membranes  
as determined by NMR spectroscopy<sup>1</sup>Department of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka<sup>2</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu UniversityYoshinori Uekusa<sup>1</sup>, Miya Kamihira<sup>1</sup>, Kozo Nakamura<sup>2</sup>, and Tsutomu Nakayama<sup>1</sup>

Tea catechins, such as epicatechin gallate (ECg) and epigallocatechin gallate (EGCg), have various physiological activities. These tea catechins are believed to contact and then interact with lipid membranes. The dynamics of their interactions with the lipid membrane, however, have not been clarified. We investigate the interaction between tea catechins and isotropic bicelles as a lipid membrane model by solution NMR. Signals from the B-ring and the galloyl moiety in ECg and EGCg were obviously shifted, and whose proton  $T_1$  relaxation times were shortened upon the interaction. Furthermore NOESY experiments demonstrated that the B-ring and the galloyl moiety are located near the  $\gamma$ -H in the phospholipid trimethylammonium group. We propose that ECg and EGCg interact with the surface of lipid membranes via their choline moiety.

【序論】 緑茶中に含まれるカテキン類、epicatechin (EC:1), epigallocatechin (EGC:2), epicatechin gallate (ECg:3), epigallocatechin gallate (EGCg:4) (Fig. 1) は、抗菌作用, 抗酸化作用, 抗ガン作用など様々な生理機能を有していることが *in vitro* 実験から報告されている。しかし物質によりその生理活性の強弱に差がみられ、ECg や EGCg は高い活性を示す。最近、EGCg が 67 kDa ラミニンレセプターに結合するという報告がなされたが、カテキン類に対する特異的なトランスポーターやレセプターの存在は未だ発見されておらず、カテキン類が生理活性を示すメカニズムは詳細には解明されていない。しかし、それらの存在の有無に関わらず、カテキン類が生理活性を示す作用機構の第一段階として細胞膜である脂質二重層への接触が考えられる。我々は「カテキン類の生理活性強度の違いは、それらの脂質膜への異なる親和性により、細胞膜の脂質二重層への相互作用や取り込みに差が生じるためである」という仮説のもとに、カテキン類のリポソームへの取込み量 (ECg > EGCg >> EC > EGC) や分配係数を測定し、これらの結果が生理活性強度と正の相関を示すことを明らかにしてきた<sup>1</sup>。また蛍光プローブや固体 NMR の測定から、カテキン類は脂質膜中において膜の表層付近に存在することが示唆された<sup>1,2</sup>。

Keywords: tea catechins, isotropic bicelle, interaction, polyphenol

うえくさ よしのり、かみひら みや、なかむら こうぞう、なかやま つとむ

しかし、カテキン類の脂質二重層中における立体構造や運動性、相互作用に参与する部位の特定には至っていない。これらの情報が得られれば、カテキン類だけでなく、脂質と相互作用する他のポリフェノール類の生理活性を予測あるいは解釈するときの重要な判断材料になると考えられる。そこで、本研究ではカテキン類の脂質膜中における相互作用を溶液 NMR により解析した。

【実験方法】 DMPC と DHPC で構成される等方的な小型バイセルに ECg あるいは EGCg を作用させた試料溶液を調製し、 $^1\text{H}$  化学シフト値変化、 $T_1$ 、NOESY の測定をおこなった。また、カルボニル炭素を  $^{13}\text{C}$  でラベルした  $^{13}\text{C}$ -ECg を化学合成した。これをバイセルに作用させ異種核 NOE 関連の測定をおこなった。

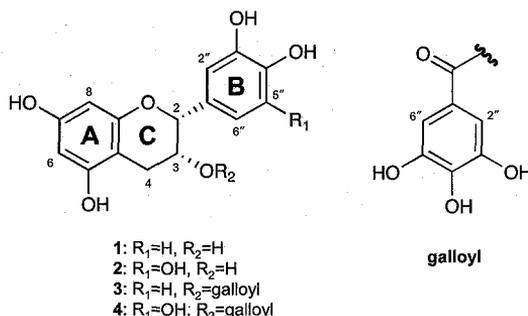


Fig. 1. Structures of tea catechins, EC (1), EGC (2), ECg (3) and EGCg (4).

【結果と考察】 ECg あるいは EGCg を小型バイセルに作用させると、B 環と galloyl 基の化学シフト値がバイセル非存在下と比較して大きく変化することが明らかとなった (Fig. 2)。この結果は、B 環と galloyl 基が脂質膜との相互作用に参与していることを示唆している。また、バイセルに作用することでこれらの部位の  $^1\text{H}$  の  $T_1$  が顕著に減少したことは、相互作用の結果、分子の局所的な運動が制限されていることを示している。次に、空間的な距離情報から作用部位を特定するために NOESY の測定をおこなった。その結果、ECg と EGCg の B 環と galloyl 基の間で分子内 NOE 相関が観測された。さらに、これらの部位とバイセルを構成しているリン脂質の極性基末端に存在する trimethylammonium 基の  $^1\text{H}$  との間で分子間 NOE が観測された。また、化学合成によってラベル導入した  $^{13}\text{C}$ -ECg のカルボニル炭素と trimethylammonium 基の  $^1\text{H}$  との間で異種核 NOE 相関が観測された。以上の結果から、ECg 及び EGCg は脂質膜中で B 環と galloyl 基が近接する構造を取り、さらにリン脂質の極性基近傍と相互作用することが明らかとなった。

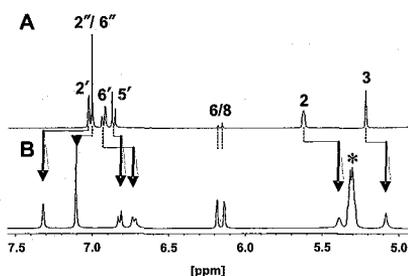


Fig. 2.  $^1\text{H}$  NMR spectra of ECg in the absence (A) and the presence (B) of bicelles in  $\text{D}_2\text{O}$  at 310 K. The asterisk indicates the signal from bicelles.

#### 【参考文献】

1. Kajiya, K. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2638–2643 (2001).
2. Kajiya, K. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1743–1747 (2004).

NMR 緩和測定による拡張ナノ空間内の液体ダイナミクスと  
空間制限効果解析

(<sup>1</sup> 東京大学工学系研究科, <sup>2</sup> JST-CREST)  
○<sup>1,2</sup> 塚原剛彦, <sup>1</sup> 火原彰秀, <sup>1,2</sup> 北森武彦

Studies on Liquid Dynamics in Extended-Nano Spaces on a Chip  
by NMR Relaxation Measurements

(<sup>1</sup> Department of Applied Chemistry, School of Engineering, the University of Tokyo  
<sup>2</sup> CREST, Japan Science and Technology Agency)

<sup>1,2</sup>Takehiko Tsukahara, <sup>1</sup>Akihide Hibara, and <sup>1,2</sup>Takehiko Kitamori

Our focus has been centered on the well-defined 10<sup>1</sup> – 10<sup>2</sup> nm-scale channels on a glass microchip (called Extended-Nano Spaces), since they promise to become an experimental tool for characterizing the complicated collective properties of liquid phase molecules. This report describes characterization of molecular motions of water confined in well-defined 10 nm – 100 nm scale extended-nano spaces based on NMR relaxation results. The results showed that proton transfer rate of water in 100 nm-sized extended-nano spaces was about 20 times faster than that in bulk space. From these results, we concluded that water motions in confining geometries are controlled by the weighted average of three phases such as bulk phase, adsorbed one, and proton transfer one.

[緒言]

1nm サイズの分子細孔ナノ空間に閉じ込めた水の物性は、化学・生物学・地質学において重要な研究課題となっている。多くの分光学的・理論的研究によって、このナノ空間の水は固体様の構造、低い運動性といった様々な特異物性を有することが明らかにされている[1]。しかし、分子細孔ナノ空間は単分子スケールであるため、分子の集団挙動を特徴とする液体構造には迫れない。我々は半導体加工技術によってガラス基板上に作製した数百 nm スケールのナノ空間（拡張ナノ空間）が、液相分子の複雑な挙動を顕在化する新しい実験ツールになりうることを着想し、拡張ナノ空間内における溶液物性について研究を進めている。これまで、流速測定および時間分解蛍光測定から、800nm 以下の拡張ナノ空間内の水はバルク水に比べ高粘度・低誘電率であること[2]、また、<sup>1</sup>H-NMR 緩和時間測定から、300 – 800nm の拡張ナノ空間内では、水の運動状態は低下しプロトン移動度が増加することを明らかにしてきた[3,4]。その結果、バルク相や壁面吸着相とは異なるプロトン移動相（壁面と長距離相互作用した水分子の水素結合ネットワーク構造）が壁面から 50nm 程度の領域において存在しているという

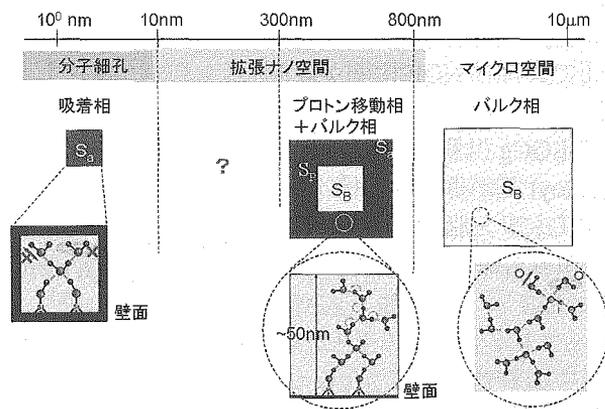


Fig. 1 Concept of three-phase model.

キーワード：拡張ナノ空間，緩和時間，プロトン移動，水分子，  
つかはらたけひこ，ひばらあきひで，きたもりたけひこ

モデルを提案するに至っている。しかし、拡張ナノ空間から分子細孔へ至る 10 – 100nm の過渡的空間での水分子挙動に関する知見が無いため、空間制限効果が起こるメカニズムを分子論的に説明できない。そこで本研究では、スピン-格子緩和速度 ( $1/T_1$ )、スピン-スピン緩和速度 ( $1/T_2$ )、回転系スピン-格子緩和速度 ( $1/T_{1\rho}$ ) 測定によって、10 – 100 nm サイズの拡張ナノ空間内における水の分子運動およびプロトン交換速度を明らかにすることを目的とした (Fig.1)。

[実験]

電子線リソグラフィーとプラズマエッチングによって、合成石英基板上 (3 cm × 7 cm) に、相当直径 40 – 5,000 nm の拡張ナノ空間を作製した。この加工基板と上板を洗浄後、真空炉内において 1080°C で熱融着し、ダイヤモンドカッターによって幅 4 mm、長さ 42 mm に切削することで NMR 用ナノチャンネル試料管とした (Fig.2)。超純水 (18.0 MΩ·cm) を freeze-pump-thaw サイクルで数回脱気した後、Ar 雰囲気下でシリンジポンプによって導入し、測定を行った。全ての  $^1\text{H}$ -NMR 測定は 500MHz の NMR 装置 (JEOL ECA500) を使い、スピン-格子緩和速度 ( $1/T_1$ )、スピン-スピン緩和速度 ( $1/T_2$ )、回転系スピン-格子緩和速度 ( $1/T_{1\rho}$ ) を行った。 $1/T_1$ 、 $1/T_2$ 、 $1/T_{1\rho}$  測定はそれぞれ、Inversion recovery 法、 $(\pi)_x - \tau - (\pi/2)_x$ 、Carr-Purcell Meiboom-Gill (CPMG) 法、 $(\pi/2)_x - \tau - ((\pi)_x - 2\tau - (\pi)_x)_n$ 、Spin-locking 法、 $(\pi/2)_x - B(\tau)_y$  を用いた。

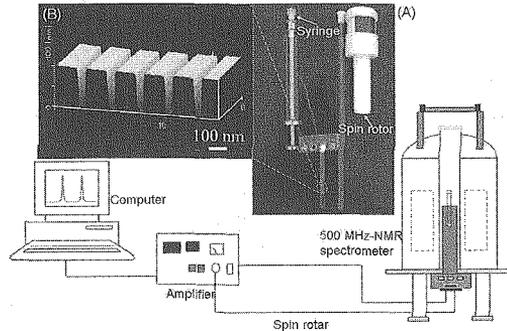


Fig. 2 (A) Schematic diagram of NMR setup for the measurements of liquids in 40 – 5,000 nm Extended-Nano Spaces. (B) AFM image of Extended-Nano Spaces on a NMR cell.

[結果と考察]

40 – 5,000nm 中における水の  $^1\text{H}$ - $1/T_1$  サイズ依存性を Fig.3 に示す。得られた  $1/T_1$  値は 800nm 近傍から 200 nm までサイズ減少に伴い急激に増加するが、40 – 200 nm の領域で一定の値に収束する傾向を示した。また、そのサイズがさらに 4 nm シリカポアまで減じられると、 $1/T_1$  値は再び増加に転じることが分かった。この結果は、拡張ナノ空間内の水分子挙動が Fig.1 に示したような三相の割合に依存していることを示唆している。つまり、800 – 5,000 nm のバルク相 (S<sub>B</sub>) では  $1/T_1$  値は一定になるが、

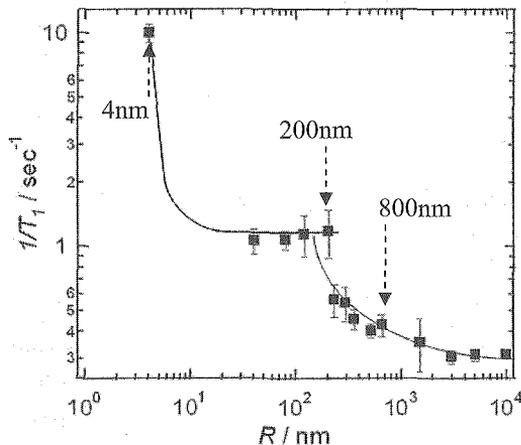


Fig.3 Log-Log plot of the  $1/T_1$  values for water confined in  $R = 40 - 5,000$  nm spaces at 500MHz and 20 °C. The solid lines are the fitted curve to Eq. (1).

800 nm 近傍から壁面の影響によるプロトン移動相 ( $S_p$ ) が出現するため、 $1/T_1$  値は  $S_B$  と  $S_p$  の割合に応じて変化します。しかし、40–200 nm の領域においては、 $S_p$  が支配的になるため  $1/T_1$  値のサイズ依存性は消失します。さらに空間制限を進めると、壁面吸着相 ( $S_a$ ) が出現し始めるため、結果として  $1/T_1$  値は再び増加すると考えられる。実際、Fig.3 に示すように、三相の重み平均で近似した式(1)のフィッティング曲線を実験値( $1/T_{1EXP}$ )と比較したところ、互いに良く一致することを確認した。

$$\frac{1}{T_{1EXP}} = \frac{1}{T_{1B}} + \frac{\lambda A_1}{V_1} \frac{1}{T_{1P}} + \frac{\varepsilon A_2}{V_2} \frac{1}{T_{1a}} \quad (1) \quad (1 = S_p, 2 = S_a)$$

ここで、 $1/T_{1B}$ 、 $1/T_{1P}$ 、 $1/T_{1a}$ 、 $\lambda$ 、 $\varepsilon$ 、 $A/V$  はそれぞれバルク相の  $1/T_1$  値、プロトン移動相の  $1/T_1$  値、吸着相の  $1/T_1$  値、吸着相の厚さ、プロトン移動相の厚さ、比界面積を示している。

$1/T_1$  値は分子運動の高周波成分に関する情報を与えるが、低周波成分、つまり遅い運動には影響されない [5]。上述した  $1/T_1$  値の変化が壁面の影響によって生じているならば、壁面吸着水のような遅い運動に敏感な  $1/T_2$  や  $1/T_{1\rho}$  値に顕著な空間制限効果が現れると期待できる。そこで  $1/T_2$  値の空間サイズ依存性を調べたところ、Fig.4 に示す結果を得た。 $1/T_2$  は  $1/T_1$  と同様にサイズ減少に伴って 800nm 近傍から急激に増加しているが、その変化量は  $1/T_1$  値よりも 10 倍以上大きくなることが分かった。 $1/T_1 \ll 1/T_2$  という結果は、分子運動の低周波成分、主にプロトン化学交換が空間制限によって影響されていることを示唆している。

そこで、プロトン交換相関時間 ( $\tau_e$ ) を定義するために、回転系の周波数 ( $\omega_l = \gamma B_l$ ) に依存する  $1/T_{1\rho}$  値の  $rf$  磁場 ( $B_l$ ) 依存の空間制限効果を調べた。 $\tau_e$  値は式(2)に基づいて求めることができる。

$$\frac{1}{T_{1\rho}} \propto \frac{1}{T_1} + \frac{A\tau_e}{1 + 4\omega_l^2 \tau_e^2} \quad (2)$$

Fig.5 に示すように、 $1/T_{1\rho}$  値は  $B_l$  の減少と共に増加し、その  $B_l$  依存性は空間制限によって増強される傾向が観測され、Table 1 に示す  $\tau_e$  値を得た。 $\tau_e$  値は 120 nm において  $1.4 \times 10^{-5}$  sec であり、5,000 nm に比べ約 1/20 程度小さい値を取ることが分かった。すなわち、120 nm 中の水分子プロトン交換速度はバルク水の 20 倍であることを意味する。120 nm における値はナノポア表面吸着水の値 ( $0.8 \times 10^{-5}$  sec) [6] に極めて近づいていることから、壁面-水分子間

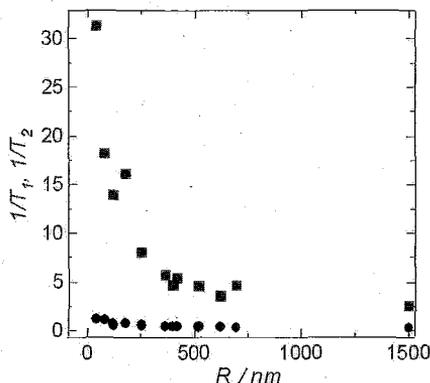


Fig.4 The size-dependences of  $^1H$ - $1/T_1$  (●),  $-1/T_2$  (■) values for water in the range of 120 to 1500 nm at 500MHz and 20 °C.

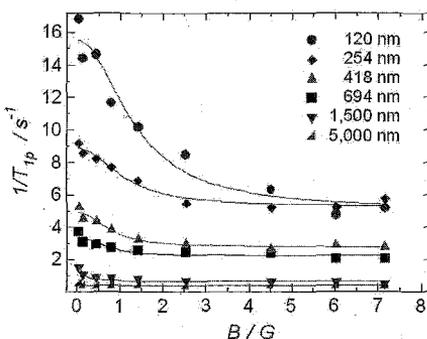


Fig.5  $^1H$ - $1/T_{1\rho}$  values as functions of the  $B_l$  at water confined in various extended-nano spaces. The solid lines are the fitted curve to Eq. (2).

のプロトン交換が水分子間のプロトン交換を誘起し、結果、交換速度が増加したと考えられる。さらに、プロトン-プロトン間の双極子相互作用の強さの尺度となる  $A$  値が、空間制限と共に極めて増加していることも、我々の推察の妥当性を示す結果であると言える。

発表では、補足結果として、非水溶媒の空間制限効果の結果を示すと共に、ガラス壁面の疎水性修飾が水分子に及ぼす影響について考察を行う。

Table 1. Results of the analysis of  $1/T_{1\rho}$  data using Eq. (1).

$R / \text{nm}$	$A / 10^4 \text{s}^{-2}$	$\tau_e / 10^{-5} \text{s}$
120	$75.7 \pm 16.7$	$1.4 \pm 0.3$
256	$21.8 \pm 4.2$	$1.7 \pm 0.4$
418	$8.7 \pm 1.5$	$2.5 \pm 0.3$
694	$4.3 \pm 1.6$	$2.8 \pm 0.1$
1,500	$0.7 \pm 0.2$	$11.4 \pm 4.4$
5,000	$0.1 \pm 0.1$	$21.9 \pm 7.2$

[結言]

本研究では、40–5,000 nm の拡張ナノ空間に閉じ込めた水分子の  $^1\text{H}$ - $1/T_1$ ,  $1/T_2$ ,  $1/T_{1\rho}$  測定を行い、これらの緩和速度が空間制限に伴って 800 nm から 200 nm 付近まで急激に増加すること、また、40–200 nm では  $1/T_1$  値は一定の値を取るが、 $1/T_2$  や  $1/T_{1\rho}$  値は連続的に変化していくことが分かった。 $1/T_1 \ll 1/T_{1\rho} \leq 1/T_2$  という結果から、空間の制限はプロトン交換速度に極めて強く影響することを見出した。 $1/T_{1\rho}$  値の  $B_1$  依存性の結果に基づくと、100 nm 程の拡張ナノ空間においては、その水のプロトン交換速度はバルクの約 20 倍速いことが明らかとなった。

これらの事実から我々は、拡張ナノ空間内における水分子運動は、バルク相、吸着相に加え、プロトン移動相の三相の重み平均で説明できると結論付けた。

[参考文献]

- [1] V. Buch, J. P. Devlin, *Water in Confining Geometries* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2003).
- [2] A. Hibara, T. Saito, H.B. Kim, M. Tokeshi, T. Ooi, M. Nakao, and T. Kitamori, Nanochannels on a fused-silica microchip and liquid properties investigation by time-resolved fluorescent measurements, *Anal. Chem.*, **74**, 6170 (2002).
- [3] T. Tsukahara, A. Hibara, Y. Ikeda, and T. Kitamori, NMR Study of Water Molecules Confined in Extended-Nano Spaces, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1180 (2007).
- [4] 塚原剛彦, 火原彰秀, 北森武彦, 第43回NMR討論会講演要旨集, 274 (2004).
- [5] T. C. Farrar, E. D. Becker, *Pulse and Fourier Transform NMR* (Academic Press, New York, 1971).
- [6] R. Holly, H. Peemoller, C. Choi, and M.M. Pintar, Proton rotating frame spin-lattice relaxation study of slow motion of pore water, *J. Chem. Phys.*, **108**, 4183 (1998).

# YP09 固体 NMR によるコレステロールを含む酸性混合脂質二重膜と ACTH の相互作用解析

○野口貴弘<sup>1</sup>、明賀博樹<sup>1</sup>、川村出<sup>1</sup>、西村勝之<sup>2</sup>、内藤晶<sup>1</sup>  
1:横浜国大院工、2:分子科学研究所

## Interaction of ACTH with cholesterol containing acidic mixed lipid bilayer as studied by Solid state NMR

Takahiro Noguchi<sup>1</sup>, Hiroki Myoga<sup>1</sup>, Izuru Kawamura<sup>1</sup>,  
Katsuyuki Nishimura<sup>2</sup> and Akira Naito<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Yokohama National University,

<sup>2</sup>Institute for Molecular Science.

Adrenocorticotropin hormone (ACTH) consisting of 39 amino acid, mainly causes the promote of glucocorticoid secretion. Cholesterol is a construction material of bilayer and known to cause the change of the membrane dynamics. In this work, solid state <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P and <sup>13</sup>C NMR spectra were observed for ACTH(1-24) reconstituted in acidic membrane-containing cholesterol. The use of liposome sample is larger than micelle and thus have restricted dynamics. Hence, solid state NMR is suitable means for these samples. The aim of this study is to clarify bioactive mechanism of ACTH by analyzing the interaction of ACTH with the membrane.

### 【序論】

副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)は、39 残基からなるペプチドホルモンである。主に副腎からの糖質コルチコイドの分泌を促進させる。これまでの当研究室の研究結果より、DMPG:DMPC=1:3 の混合膜において ACTH(1-24)は中央部が長い $\alpha$ ヘリックスを形成し安定な構造をとり、脂質二重膜と強固に結合することが明らかになっている。生体膜に含まれるコレステロールは、膜の物性を変化させることが知られている。本研究では生理活性動物種間で相同性が高く生理活性に不可欠な ACTH(1-24)を合成し、コレステロールの有無による膜への相互作用変化について検討した。多重膜リポソーム試料はサイズがミセルに比べて大きく運動性が制限されるので、固体 NMR を用いた解析が有利になる。そこで ACTH(1-24)と脂質二重膜との相互作用の変化を <sup>1</sup>H および <sup>31</sup>P 固体 NMR 測定により比較検討した。さらに膜結合 ACTH の構造を <sup>13</sup>C NMR により解析した。それらの結果から ACTH の生理活性機能を解明することを目的とした。

キーワード

固体 NMR 化学シフト値 ACTH 酸性混合脂質膜 コレステロール

のぐちたかひろ みょうがひろき かわむらいずる にしむらかつゆき ないとうあきら

### 【試料調製】

[1-<sup>13</sup>C]Gly<sup>10</sup>-ACTH(1-24)と[1-<sup>13</sup>C]Val<sup>13</sup>-ACTH(1-24)をFmocアミノ酸を用いて化学合成した。アミノ酸残基の脱保護を行い、得られた粗試料を逆相HPLCにより精製した。得られたペプチドをDMPG:DMPC=1:3(モル比)とDMPG:DMPC:コレステロール=1:3:1(モル比)からなる混合膜に再構成した。参照用試料として膜のみの試料も調製した。pH 7.5, 100 mM NaCl, 20 mM Tris緩衝液を用いて80%以上の水和率をもつ多重膜リポソームを調製しNMR測定用試料とした。

### 【固体NMR測定】

<sup>13</sup>C DD-MAS NMRからは、<sup>13</sup>C安定同位体標識したアミノ酸残基の等方化学シフト値より、ペプチドの局所二次構造を解析することができる。<sup>13</sup>C Static NMRからは、ペプチドの運動性を評価することができる。すなわちペプチドの<sup>13</sup>C安定同位体標識部位が膜に結合した場合、運動性が低下するので化学シフト異方性により広幅な信号が観測される。逆に膜から離れた場合は、等方的な運動をするので先鋭な信号が観測される。<sup>31</sup>P Static NMRではリン脂質のリン酸基の運動性を評価することができる。<sup>1</sup>H MAS NMRの測定では、膜のリン脂質アシル鎖の信号を観測した。液晶相においてはアシル鎖の運動が活発になるため、ゲル相に比べ信号強度が上がる。これより膜の相転移挙動を評価することができる。ペプチドと酸性膜が相互作用をした場合、酸性膜の電荷が中和されリン脂質間の相互作用が強まり、相転移を起こすのにエネルギーが必要となるので相転移点が増加する。ペプチド全ての固体NMR測定は、Chemagnetics CMX infinity-400 NMR分光器を用いて行った。

### 【結果と考察】

#### ① <sup>13</sup>C NMR

40 °Cにおける<sup>13</sup>C DD-MAS NMRスペクトルの等方化学シフト値(Table.1, Fig.1)より、Gly<sup>10</sup>とVal<sup>13</sup>はコレステロールの有無に関わらず、αヘリックス構造を形成することが示唆された。40 °Cにおける<sup>13</sup>C DD-static NMRスペクトル(Fig.2)よりDMPG:DMPC=1:3においてGly<sup>10</sup>とVal<sup>13</sup>のカルボニル炭素の広幅なNMR信号が観測された。Gly<sup>10</sup>とVal<sup>13</sup>は脂質二重膜と強く結合していると考えられる。コレステロール添加膜ではGly<sup>10</sup>とVal<sup>13</sup>は、先鋭なNMR信号に変化した。この結果はGly<sup>10</sup>とVal<sup>13</sup>部位の運動性が上昇したことを示しており、局所的に脂質二重膜から遊離したことが考えられる

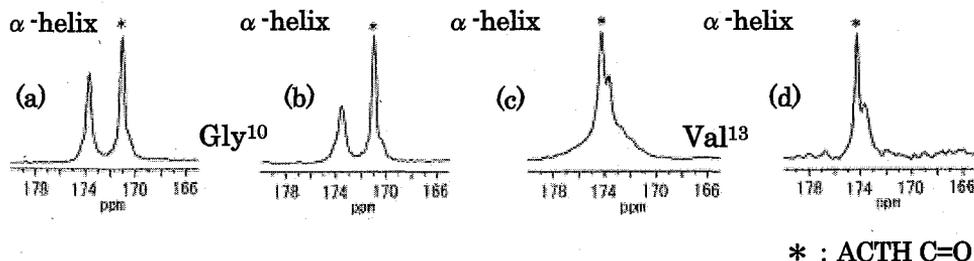


Fig.1 <sup>13</sup>C DD-MAS NMR spectra of Gly<sup>10</sup> (a,b) and Val<sup>13</sup> (c,d) C=O at 40 °C.  
peptide :DMPG : DMPC : chol = (a) 1:5:15:0 , (b) 1:5:15:5 , (c) 2:5:15:0 ,  
(d) 1:5:15:5

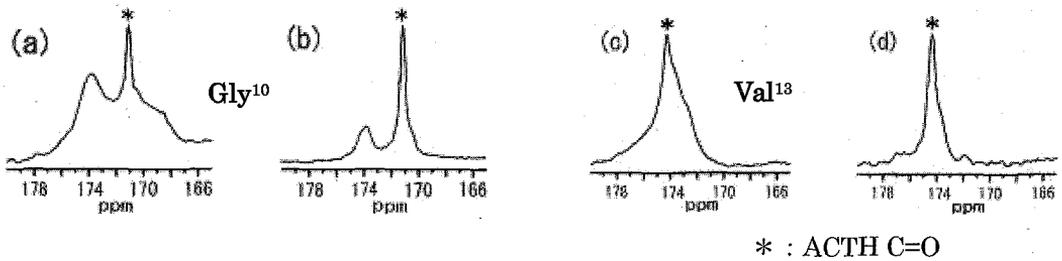


Fig.2  $^{13}\text{C}$  DD-Static NMR spectra of Gly $^{10}$  (a,b) and Val $^{13}$  (c,d) C=O at 40 °C.  
 peptide: DMPG : DMPC : chol = (a) 1:5:15:0 , (b) 1:5:15:5 , (c) 2:5:15:0 ,  
 (d) 1:5:15:5

Table.1  $^{13}\text{C}$  chemical shifts value of carbonyl carbon of ACTH at 40 °C

	peptide:lipids (molar ratio)	lipids composition (molar ratio)	Chemical shift value (ppm)
Gly $^{10}$	1:20	DMPG:DMPC=1:3	171.04
Gly $^{10}$	1:20	DMPG:DMPC:cholesterol=1:3:1	171.04
Val $^{13}$	1:10	DMPG:DMPC=1:3	174.21
Val $^{13}$	1:20	DMPG:DMPC:cholesterol=1:3:1	174.17

②  $^{31}\text{P}$  static NMR

コレステロールの有無に関わらず、典型的な軸対称粉末線形が観測されたことから、均一なリポソームが形成されていることが示唆された(Fig.3)。

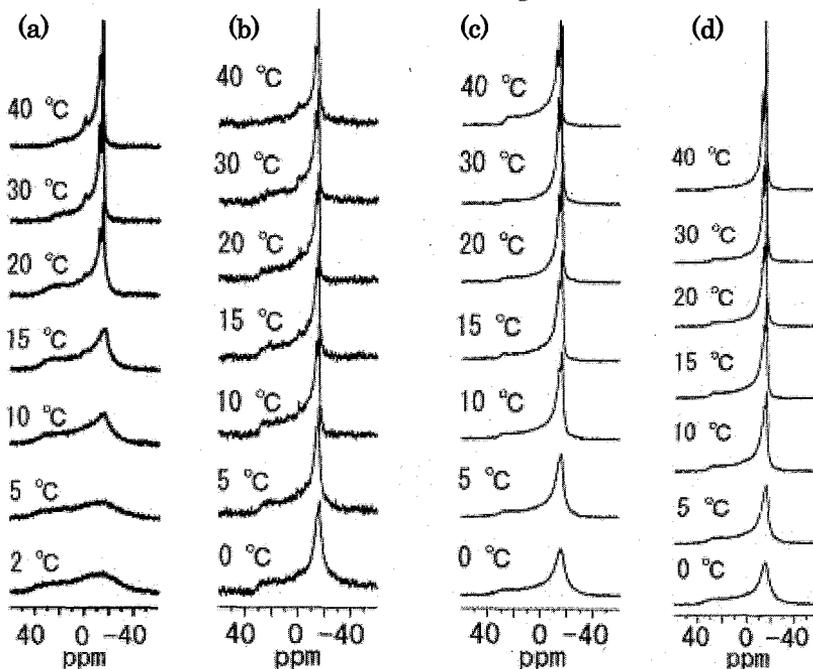


Fig.3 Temperature variation of  $^{31}\text{P}$ -Static NMR Spectra.(peptide:DMPG :DMPC:Chol  
 =(a) 0:5:15:0 , (b) 0:5:15:5 ,(c) 1:5:15:0 , (d) 1:5:15:5)

### ③ $^1\text{H}$ MAS NMR

脂質二重膜アシル鎖のプロトン信号強度の温度変化を測定した(Fig.4)。アシル鎖のプロトンの信号は膜の相転移現象に敏感である。それぞれの信号強度プロットの結果(Fig.5)、コレステロール添加膜においてペプチドが存在する場合、膜のみの場合と比較して液晶-ゲル相転移点が上昇した。これは6個の正電荷をもつACTH(1-24)が酸性脂質二重膜の電荷を中和し、リン脂質間の相互作用を強めたため、相転移点を上昇させたと考えられる。一方コレステロールなしの膜においては、ペプチドの有無に関わらず相転移点の変化はほとんど観測されなかった。

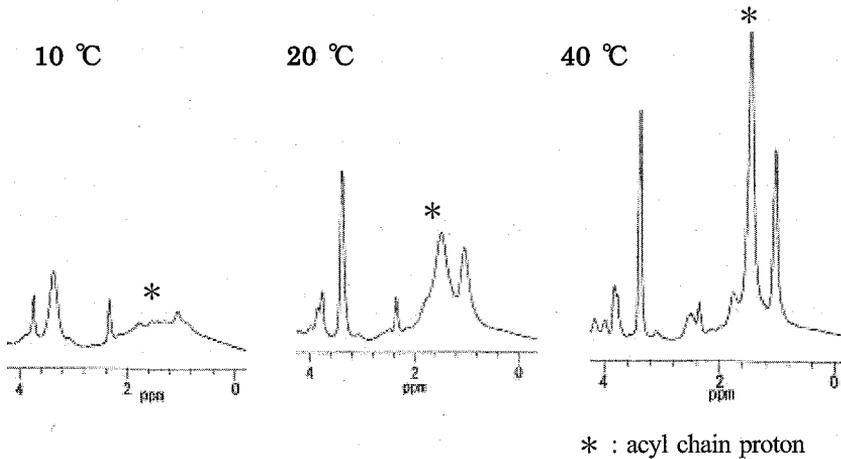


Fig.4 Temperature variation of  $^1\text{H}$  MAS NMR Spectra. peptide:DMPG:DMPC:Chol=1:5:15:5

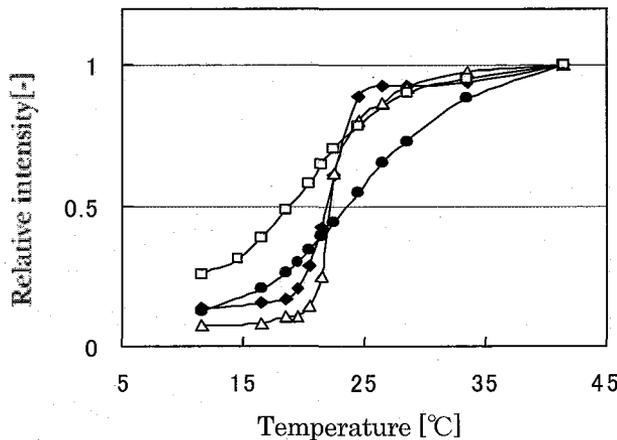


Fig.5 Plots of  $^1\text{H}$  MAS NMR spectra against temperature.

(peptide:DMPG:DMPC:Chol=● 1:5:15:5 ( $T_c=23.5$  °C), ◆ 1:5:15:0 ( $T_c=22.0$  °C),

□ 0:5:15:5 ( $T_c=19.0$  °C), △ 0:5:15:0 ( $T_c=22.0$  °C))

#### 【結論】

コレステロールが膜に添加された場合、ACTH(1-24)は、コレステロールなしの膜と比較して膜の中に深く入り込み強く相互作用を起こす部位があるのに対しGly<sup>10</sup>, Val<sup>19</sup>近傍は膜から離れて運動性が上がったと考えられる。今後はペプチドのC末端側も測定し膜と結合している部位の特定を進めていく予定である。

<sup>1</sup>分子科学研究所,<sup>2</sup>兵庫県立大学 ○上釜 奈緒子<sup>1</sup>、八木澤 仁<sup>2</sup>、辻 暁<sup>2</sup>、西村 勝之<sup>1</sup>

Study of Local Mobility of Lipids and Membrane Bound Protein PLC- $\delta$ 1 by Solid State NMR

<sup>1</sup>Institute for Molecular Science, <sup>2</sup>University of Hyogo,

○Naoko Uekama<sup>1</sup>, Hitoshi Yagisawa<sup>2</sup>, Satoru Tuzi<sup>2</sup>, and Katsuyuki Nishimura<sup>1</sup>

We examined local mobility of phospholipase C- $\delta$ 1 (PLC- $\delta$ 1) pleckstrin homology (PH) domain bound to phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) embedded in POPC fully hydrated multi-lamella vesicle. Motionally averaged <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H dipolar interactions of [3-<sup>13</sup>C]Ala-labeled PLC- $\delta$ 1 PH domain were studied by an amplified separated local dipolar field spectroscopy under magic angle spinning. Dynamic order parameters thus obtained for PLC- $\delta$ 1 PH domain as viewed from Ala residues were determined by a normalized dipolar coupling constants with respect to those of static ones. Local mobility of PLC- $\delta$ 1 PH domain was further analyzed on the basis of dynamic order parameters for individual sites. The relationship of local mobility of PH domain and its function will be discussed.

## 緒言

phospholipase C- $\delta$ 1 (PLC- $\delta$ 1)は細胞内情報伝達に関わる酵素で、生体膜中に含まれる phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>)を加水分解し、セカンドメッセンジャーとして機能する inositol 1,4,5-trisphosphate(IP<sub>3</sub>)およびジアシルグリセロールを産生する。このとき PLC- $\delta$ 1 は N 末端に位置する PH ドメインを介して、PI(4,5)P<sub>2</sub>を含む生体膜上に局在化し、機能を発現している。このような膜表在性タンパク質の生体膜表面における機能の分子メカニズムを正しく理解するためには、生理学的条件を考慮して、完全に水和し、水相に接した状態の脂質二重膜に結合したタンパク質を対象として立体構造情報を解析する必要がある。

本研究では、分子運動により平均化されている Ala 側鎖 CH<sub>3</sub>の弱い <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 磁気双極子相互作用を、MAS 条件下で増幅して観測する固体 NMR の新規測定法を用い、精密に決定した。この知見をもとに、Ala 各残基各々のダイナミックオーダーパラメーター(DOP)を決定し、完全水和マルチラメラベシクルに結合した PLC- $\delta$ 1 PH ドメインの局所運動性の解析を行った。

---

固体 NMR マルチラメラベシクル 膜タンパク質 運動性 PLC- $\delta$ 1

うえかま なおこ、やぎさわ ひとし、つじ さとる、にしむら かつゆき

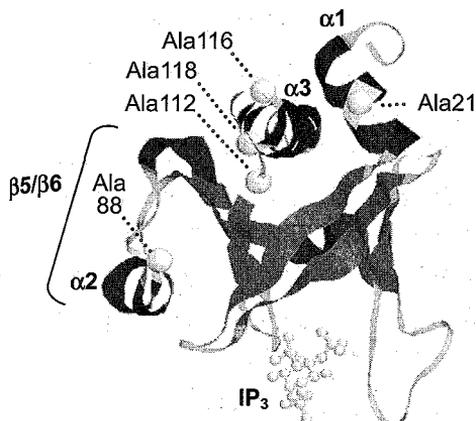


Fig. 1 Three-dimensional model structure of PLC- $\delta$ 1 PH domain - IP<sub>3</sub> complex<sup>1)</sup>. Sidechains of Ala residues are indicated as white spheres with residue numbers. Position of  $\alpha$  helices ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3) and  $\beta$ 5/ $\beta$ 6 loop are indicated.

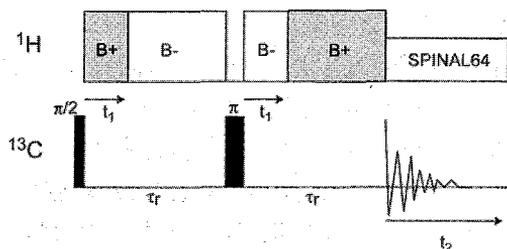


Fig. 2 A schematic representation of the pulse sequence of constant time 4-fold amplified separated local field spectroscopy under MAS<sup>3)</sup> used in this study. B+/- indicates BLEW12+/- <sup>1</sup>H homonuclear dipolar decoupling<sup>4,5)</sup>.

## 試料調製および測定法

試料 : アラニン残基側鎖メチル基の炭素核を <sup>13</sup>C 安定同位体標識した PLC- $\delta$ 1 PH ドメイン([3-<sup>13</sup>C]Ala PLC- $\delta$ 1 PH ドメイン)は大腸菌中で発現、精製した。得られたタンパク質は 2-oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)と、PLC- $\delta$ 1 PH ドメインのリガンドである PI(4,5)P<sub>2</sub> からなるマルチラメラベシクルと混合し、ベシクル表面に結合させた。蛋白質、脂質のモル比は PH ドメイン: PI(4,5)P<sub>2</sub>: POPC = 1 : 2 : 40 とした。Fig. 1 に X 線結晶解析より報告された PH ドメインの構造モデルおよび本研究で用いた [3-<sup>13</sup>C]Ala 標識部位を示す。

測定法 : 本実験では分子運動により平均化されている Ala 側鎖 CH<sub>3</sub> の弱い <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 磁気双極子相互作用を、MAS 下で 4 倍増幅して観測する固定時間型双極子磁場分離法を用いた。そのパルスシーケンスを Fig. 2 に示す。観測には <sup>13</sup>C の磁化を直接励起した。MAS 回転速度は 2577 Hz、測定温度は 20°C とした。繰り返し時間 4 s、各 FID は 30000 回ずつ積算し、全測定時間は約 11 日であった。<sup>1</sup>H デカップリングには SPINAL64、ラジオ波強度 28 kHz を用いた。測定は 8 点の FID の取り込みを 2 次元モードで行い、F2 側のみフーリエ変換する方法で信号強度の変化を反映するスライススペクトルを得た。

## 結果と考察

Fig. 3 に <sup>13</sup>C-DPMAS NMR スペクトルを示す。今回、測定条件の最適化、および SPINAL64 デカップリングの適用により、従来の既報の天然 PC (bovine 由来) を用いたスペクトル<sup>2)</sup> より高分解能なスペクトルを得たが、主なピークはこれまでの帰属と一致した。Ala116、および Ala88 の信号は、既報<sup>2)</sup> と同じ化学シフト値に主ピークが観測されると同時に、今回の高分解能化で 16.16 ppm および 16.64 ppm に各々新たに副ピークが分離観測された。このことから、PLC- $\delta$ 1 PH ドメインは脂質二重膜上で少なくとも主-副の 2 つの異なる状態で存在することが示唆された。また Ala112 は bovine 由来混合 PC-MLV 上では DPMAS 信号は

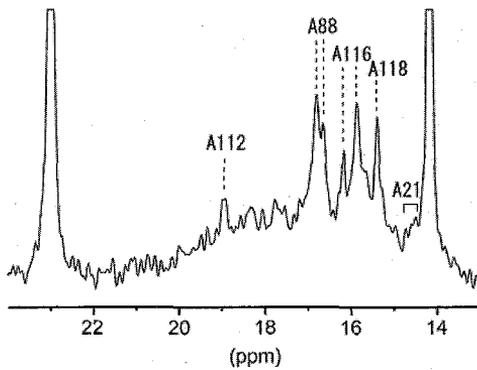


Fig. 3 The DP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of  $[\text{3-}^{13}\text{C}]$  Ala labeled PH domain of PLC- $\delta$ 1 bound to POPC/PIP $_2$  MLVs.

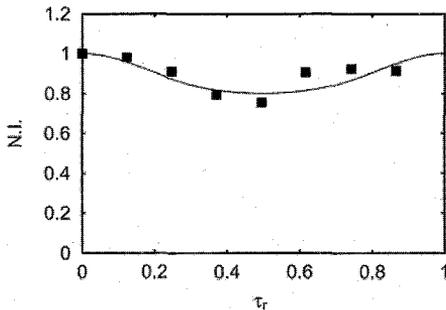


Fig. 4 The plot of normalized signal intensities of  $\text{CH}_3$  carbon in Ala118 of PLC- $\delta$ 1 PH domain as a function of dipolar evolution time (single rotor period) with optimized theoretical curve.

弱く、CPMAS による信号が強く観測されており、今回のスペクトルとはこの点が大きく異なっている。脂質が POPC に変わることにより、大きく運動性が変化したと考えられる。

同位体標識した Ala 残基側鎖メチル炭素核を観測し、上述の測定法を適用することにより残留  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  磁気双極子相互作用の時間発展による信号減衰を観測した。信号強度の変化を発展時間に対してプロットし、最適な理論曲線をフィッティングして残留磁気双極子相互作用を求めた。さらに双極子結合定数で規格化し、PLC- $\delta$ 1 PH ドメイン中の Ala 残基のメチル基のダイナミックオーダーパラメーター(DOP) ( $0 < \text{DOP} < 1$ , 完全静止時:1, 等方運動時:0)を求め、運動性の評価を行った。Ala118 に対して得られた規格化信号強度のプロットと最適理論曲線を Fig. 4 に示す。他の分離した信号についても同様の解析を行い、一連の DOP を Table 1 のように求めた。

結晶中の Ala 残基は C3 軸周りの回転のため  $\text{DOP}=0.333$  を示す。膜貫通型タンパク質である bR のヘリックス部位、ループ部位は各々  $\text{DOP}=0.3$ 、および 0.25 程度であることが報告されている<sup>9)</sup>。一方、本研究で得られた DOP はどれも一桁小さい値を示しており、著しく高い運動性を有していることが分かる。この DOP 値は通常の変位法を用いた同様の解析での検出限界以下であり、本研究で用いた増幅

型双極子磁場分離法が極めて有効であることが分かる。しかし、4倍増幅型測定法を用いても、Ala21、Ala88、および Ala112 の 3 残基は残留磁気双極子相互作用が検出限界以下であり、DOP 検出に至らなかった。また Ala112 は今回の POPC-MLV では上述の DPMAS スペクトルの考察からの予測を支持し、実験的にも DOP が検出限界以下であったため高い運動性を有していることが判明した。また同一  $\alpha$  ヘリックス内に存在する Ala116 の主ピーク、および Ala118 は、ほぼ同様な値が得られた。しかし Ala116 の副ピークはこれらより大きい DOP 値を示し、副状態は主状態に対してわずかに運動性が低いことが判明した。Ala118 に関しても DPMAS では副ピークが存在するが、DOP 解析を定量的に行うには至らなかった。

PH ドメインは非常に多くのタンパク質中に見出される構造ドメインであり、共通構造として

7本の $\beta$  スtrandからなる $\beta$  サンドイッチ構造とC末端の $\alpha$ ヘリックス構造を持つ。PLC- $\delta$ 1 PH ドメインのC末端 $\alpha$ ヘリックス( $\alpha$ 3ヘリックス)は本実験で解析を行ったAla116、およびAla118とともにTrp121を有している。Trp121は $\beta$  サンドイッチ構造の疎水性コア領域と相互作用することでPHドメインの立体構造維持に深く関与すると考えられており、 $\alpha$ 3ヘリックスはPHドメインの中で運動性が相対的に低いことが予測される。DOPの相対比較ではこの結果を支持している。一方、 $\alpha$ 1ヘリックスおよび $\alpha$ 2ヘリックスは他のPHドメインには存在しないPLC- $\delta$ 1に特有のヘリックスであり、PHドメインの疎水性コア領域とは独立した二次構造である可能性が高い。 $\alpha$ 1ヘリックスはDOPが検出限界以下であったAla21が含まれており、 $\alpha$ 1ヘリックスの運動性が高いことが予測される。またC末端にAla88が存在する $\alpha$ 2ヘリックスは脂質二重膜結合時に脂質膜の界面と相互作用し、Ala88および $\alpha$ 2ヘリックスを挟む $\beta$ 5/ $\beta$ 6ループに空間上近接する $\beta$ 7のAla112の立体構造が変化することが示されている<sup>2)</sup>。これら2残基の運動性も極めて高いことが本研究で示され、Ala88のDOPもこの予測を支持する結果となった。

今回の研究結果は固体NMRで多くの研究報告が存在する膜貫通型タンパク質に比べて脂質二重膜上に局在化したPLC- $\delta$ 1 PHドメインは極めて運動性が高いことを示している。生理条件下に近い試料状態の膜表在性タンパク質では、このような極めて高い運動性が脂質膜上における機能とも深く関わっている可能性が考えられ、完全に水和した膜表面において蛋白質中の部位ごとの運動性を詳細に解析しうる、本研究のアプローチは膜表在性蛋白質の構造と機能を解析してゆく上で有効な手法となると考えられる。

Table 1 Summary of dynamic order parameters (DOP) for individual Ala residues in PH domain of PLC $\delta$ -1.

	sites					
	Ala21	Ala118	Ala116	Ala88	Ala112	
Chemical shifts (ppm)	14.55	15.38	15.87	16.19	16.84	18.93
Secondary structure	$\alpha$ -helix	$\beta$ -strand				
DOP	UDL	0.0533	0.0556	0.0699	UDL	UDL

\*UDL: under detection limit

### 参考文献

- 1) K. M. Ferguson, M. A. Lemmon, J. Schlessinger, and P.B. Sigler, *Cell* **83**, 1037-104 (1995)
- 2) S. Tuzi, N. Uekama, M. Okada, S. Yamaguchi, H. Saito, and H. Yagisawa, *J. Biol. Chem.* **278**, 28019-28025 (2003)
- 3) K. Nishimura, manuscript has been submitted. 西村勝之 NMR 討論会 2007 札幌.
- 4) D. P. Barum and A. Bielecki, *J. Magn. Reson.* **95** 184-190 (1989).
- 5) T. Fujiwara, T. Shimomura, and H. Akutsu, *J. Magn. Reson.* **124**, 147-153 (1997)
- 6) J.P. Barre, S. Yamaguchi, H. Saito, and D. Huster, *Eur. Biophys. J.* **32**, 578-584 (2003)

# YP11 固体 NMR による抗菌ペプチド Alamethicin の脂質膜中での 配向と動的構造解析

横浜国大・院工

○三島 大輔、永尾 隆、川村 出、内藤 晶

## Dynamic structure and orientation of antibiotic peptide alamethicin in lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy

Graduate School of Engineering, Yokohama National University

Daisuke Misima, Takasi Nagao, Izuru Kawamura, and Akira Naito

Dynamic structure of alamethicin in the fully hydrated lipid bilayers was investigated by analyzing the anisotropic and isotropic  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of carbonyl carbons under the static and magic-angle spinning conditions. Isotropic  $^{13}\text{C}$  chemical shift interaction obtained from DD-MAS experiments showed that labeled positions of alamethicin are involved in helical forms. We analyzed the  $^{13}\text{C}$  chemical shift tensors of carbonyl carbons by considering the rotational motion of helix about the bilayer normal with the tilt angle  $\zeta$  and the phase angle  $\gamma$  of the peptide plane. These results indicate that the N-terminal region of alamethicin adopts an  $\alpha$ -helical structure with the tilt angles of  $21^\circ$  and the C-terminal region of alamethicin adopts a  $3_{10}$ -helical structure with the tilt angles of  $32^\circ$  from the bilayer normal.

### 【序論】

アラメチシンは 20 アミノ酸残基 (Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phol) からなる直鎖状ペプチドで、細菌 *trichoderma viride* から得られる抗生物質である。その特徴は、アラニンの  $\alpha$ -プロトンがメチルに置き換わった  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (以下 Aib と略す) を 8 個含み、中央付近 Pro14 付近で折れ曲がったヘリックス構造をとることである。アラメチシンは、脂質膜中にて電位駆動型イオンチャンネル活性を示すことが知られている。このアラメチシンの電位駆動型イオンチャンネル機構を理解するには、アラメチシンの脂質膜中での配向と動的構造を明らかにすることが重要である。一般に固体 NMR において、膜結合ペプチドの立体構造および膜に対する配向情報を得るための方法として、ガラスプレート上に機械的に配向させたペプチド-リン脂質二分子膜系を用いるなど、膜を磁場に対して配向させて  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  双極子相互作用を利用する方法があるが、本研究ではカルボニル炭素の化学シフト異方性を利用する事により、膜を磁場に対して配向させることなく、配向と動的構造解析を可能にしたので報告する。

---

固体 NMR、ペプチド、Alamethicin、化学シフト異方性、脂質二重膜

みしま だいすけ、ながお たかし、かわむら いづる、ないとう あきら

【実験】

Fmoc 固相法を用いて Ala<sup>6</sup>, Val<sup>9</sup>, Gly<sup>11</sup>, Val<sup>15</sup>, Aib<sup>16</sup>, Aib<sup>17</sup>, Gln<sup>18</sup> のカルボニル部位をそれぞれ特異的に <sup>13</sup>C 標識したアラメチン類似体を合成した。合成した試料と DMPC をペプチド対脂質モル比が 1:10 の割合になるように全量 50mg を量り取り、トリスバッファー(pH7.5)を加えて水和した。凍結・融解を繰り返し脂質 2 分子膜試料を調製した。固体 NMR 測定は <sup>1</sup>H 高出力デカップリング(DD)とマジック角回転(MAS)を組み合わせた DD-MAS 法と試料を静止させた DD-static 法を用いて行った。静止したカルボニル炭素の化学シフトテンソルの主値を決定するため、急速凍結した試料を凍結乾燥し、交差分極マジック角回転(CP-MAS)法による低速 MAS(2kHz)NMR 測定を行い、サイドバンドパターンから  $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$ ,  $\delta_{33}$  を求めた。すべての固体 NMR 測定は、Chemagnetics CMX infinity-400 NMR 分光器を用いて行った。

【結果と考察】

ヘリックスが 1 軸まわりで回転運動を行っており、その回転軸は膜面に対して垂直であるとき、ヘリックス中のペプチド平面は Fig.1 のように回転軸 Z' に対するヘリックス軸 Z の傾き角  $\zeta$  と、ヘリックス軸(Z)回りのペプチド平面の位置を示す位相角  $\gamma$  で表される。このとき観測される軸対称粉末パターンの化学シフト異方性  $\Delta\delta = \Delta\delta_{\parallel} - \Delta\delta_{\perp}$  は(1)式で表される<sup>1)</sup> この(1)式を用いて  $\zeta$  と  $\gamma$  を

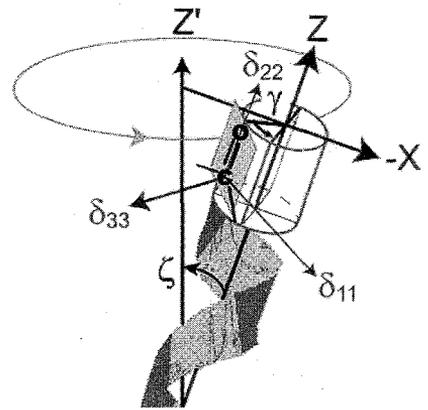


Fig.1 The coordinate systems when the helical rod rotates about the bilayer normal(Z').

$$\Delta\bar{\delta} = \frac{3}{2} \text{Sin}^2 \zeta (\delta_{11} \text{cos}^2 \gamma + \delta_{33} \text{sin}^2 \gamma - \delta_{22}) + (\Delta\bar{\delta})_{\zeta=0}$$

$$(\Delta\bar{\delta})_{\zeta=0} = \delta_{22} - \frac{\delta_{11} + \delta_{33}}{2} \quad \text{--- (1)}$$

決定した。まず、DD-MAS 測定を行った結果を Fig.2 と Fig.3 に示した。得られた <sup>13</sup>C 化学シフト等方値はすべてヘリックスの値を示しており、アラメチシンの N 末端と C 末端側は、脂質二分子膜中でヘリックス構造をとっていることがわかった。DD-static 測定の結果を Fig.4 と Fig.5 に示した。各スペクトルは  $\delta_{\parallel}$  と  $\delta_{\perp}$  の 2 軸であらわされる軸対称粉末パターンを示しており、アラメチシンの軸対称回転運動を行っていることが判明した。すでにバイセルを用いた磁場配向膜での実験より、アラメチシンの回転軸が脂質膜面に対して垂直であることがわかっている<sup>2)</sup>。したがって、ヘリックスが 1 軸まわりで回転運動を行っており、その回転軸は膜面に対して垂直であるので、化学シフト異方性  $\Delta\delta$  の解析に対しては(1)式が適用できる。つぎに、凍結乾燥試料を用いて低速(2kHz)MAS 測定により得られた各標識位置の <sup>13</sup>C CP-MAS NMR スペクトルを Fig.6, Fig.7 に示す。各カルボニル炭素の化学シフトテンソルの主値 ( $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$ ,  $\delta_{33}$ ) をそれぞれのスペクトルをシミュレーションスペクトルと比較して決定した (table1.)。先に示した化学シフト異方性の式と  $\alpha$ -ヘリックス構造において隣り合う

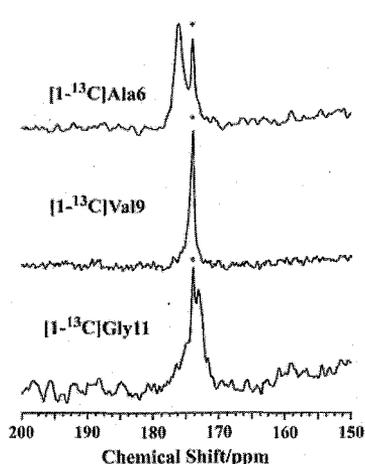


Fig.2  $^{13}\text{C}$  DD-MAS of N-terminal, helix in alamethicin-DMPC bilayer system.

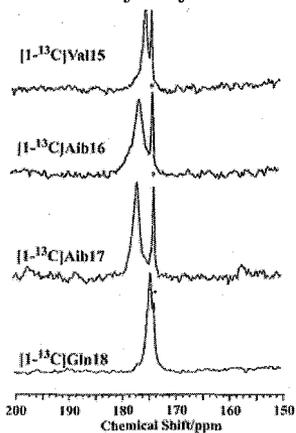


Fig.3  $^{13}\text{C}$  DD-MAS of C-terminal, helix in alamethicin-DMPC bilayer system.

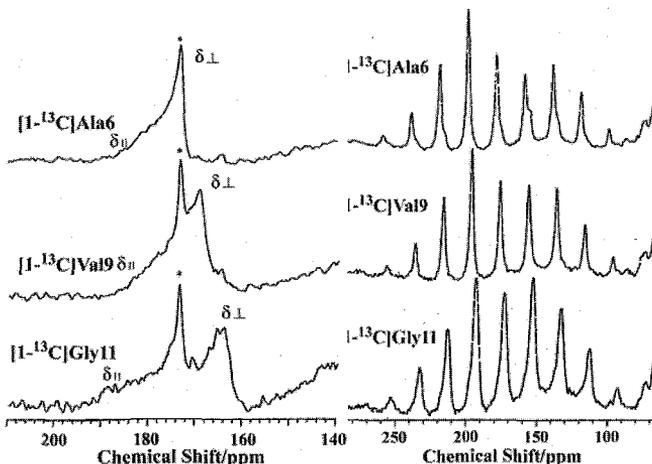


Fig.4  $^{13}\text{C}$  DD-static of N-terminal, helix in alamethicin-DMPC bilayer system.

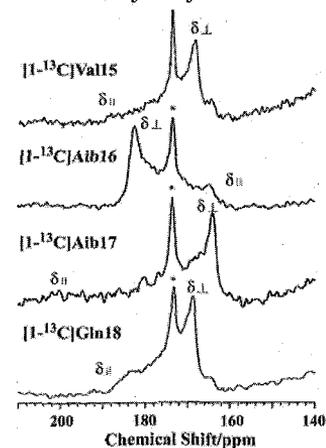


Fig.5  $^{13}\text{C}$  DD-static of C-terminal, helix in alamethicin-DMPC bilayer system.

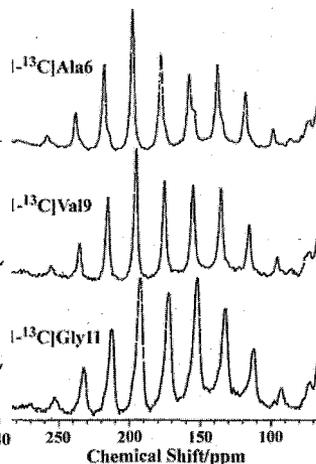


Fig.6  $^{13}\text{C}$  CP-MAS of N-terminal, helix in lyophilized alamethicin-DMPC bilayer system.

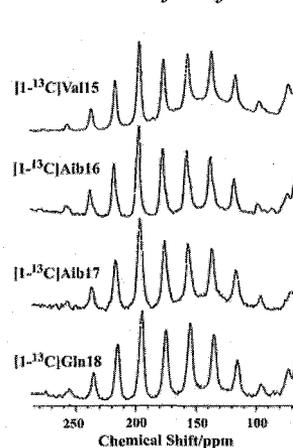


Fig.7  $^{13}\text{C}$  CP-MAS of C-terminal, helix in lyophilized alamethicin-DMPC bilayer system.

Table 1.  $^{13}\text{C}$  chemical shift values of alamethicin bound to DMPC bilayer at  $40^\circ\text{C}$ .

	$\delta_{\text{iso}}$ / ppm	STRUCTURE	$\delta_{\parallel}$ / ppm	$\delta_{\perp}$ / ppm	$\Delta\delta$ / ppm	$\delta_{11}$ / ppm	$\delta_{22}$ / ppm	$\delta_{33}$ / ppm
[1- $^{13}\text{C}$ ] Ala <sup>6</sup>	176.7	Helix	183.5	172.4	11.1	247	190	93
[1- $^{13}\text{C}$ ] Val <sup>9</sup>	174.1	Helix	183.4	169.3	14.1	241	186	95
[1- $^{13}\text{C}$ ] Gly <sup>11</sup>	172.5	Helix	189.2	164.6	24.6	252	174	92
[1- $^{13}\text{C}$ ] Val <sup>15</sup>	175.2	Helix	189.4	168.1	21.3	245	185	96
[1- $^{13}\text{C}$ ] Aib <sup>16</sup>	176.2	Helix	163.3	182.6	-19.3	246	185	98
[1- $^{13}\text{C}$ ] Aib <sup>17</sup>	176.8	Helix	202.2	164.2	38.0	242	188	101
[1- $^{13}\text{C}$ ] Gln <sup>18</sup>	176.4	Helix	186.3	168.9	17.4	248	181	96

ペプチド平面の $\gamma$ の差が $100^\circ$ 、 $3_{10}$ -ヘリックスなら $\gamma$ の差が $120^\circ$ であることに着目し、N末端側の解析にはAla<sup>6</sup>,Val<sup>9</sup>,Gly<sup>11</sup>、C末端側の解析にはAib<sup>16</sup>,Aib<sup>17</sup>,Gln<sup>18</sup>の3種類の標識部位を用いた。<sup>13</sup>C化学シフト異方性の実験値と理論値の最小自乗誤差RMSD(root mean square deviation)の等高線プロットを $\gamma$ を変化させて求めた。この結果、RMSD値を最小にすると $\gamma$ の組み合わせをユニークに決定することができた。しかし、(1)式から±と、 $\gamma$ と $\gamma-180^\circ$ は区別できないので、とりうる構造の組み合わせは16通りになる。この中で立体構造上無理のある構造を除いたところ、Fig.8に示した4種類に絞ることができた。

【まとめ】

アラメチシンのN末端側のヘリックスは $\alpha$ -ヘリックスを形成し、その軸は脂質膜法線に対して約 $20^\circ$ 傾いており、C末端側のヘリックスは $3_{10}$ -ヘリックスを形成し、その軸は脂質膜法線に対して約 $30^\circ$ 傾いていることが判明した。さらに、親水性アミノ酸残基であるGln<sup>7</sup>の側鎖と、Gln<sup>18</sup>の側鎖が同じ側に位置することが明らかになった。今後、kink近傍の残基であるN末端側ヘリックスのAib<sup>10</sup>のカルボニル炭素とC末端側ヘリックスのVal<sup>15</sup>のアミド窒素の原子間距離を測定することによってFig.8の4種類から1つに絞込みを行い、さらにアラメチシン分子の膜の深度についても決定する予定である。

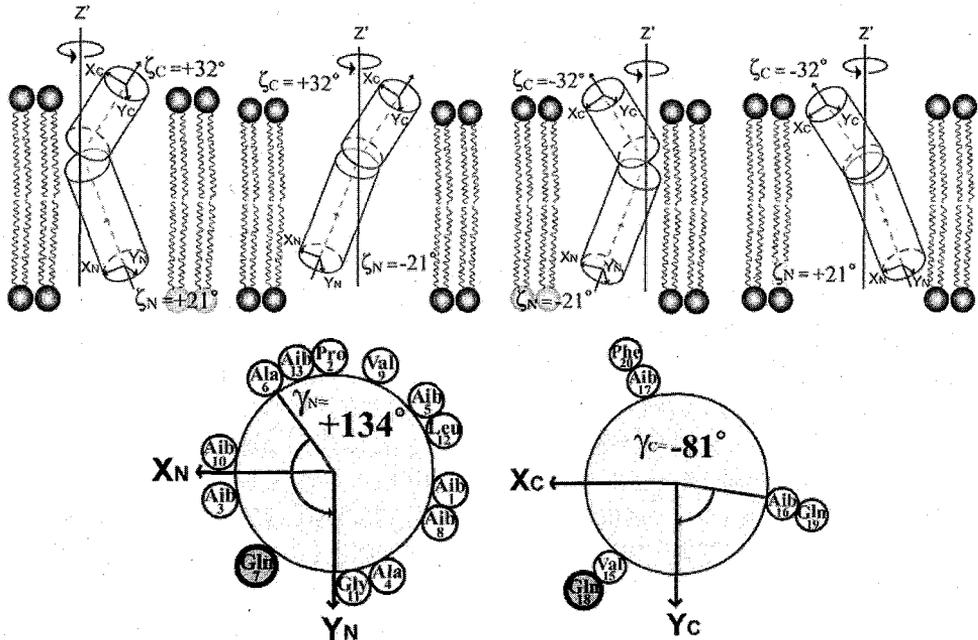


Fig.8 Schematic representation of the dynamic interaction of alamethicin bound to DMPC bilayers at 40°C.

【文献】

- 1) S. Toraya et al. 2004 Biophys. J. 87, 3323-3335.
- 2) T. Nagao et al. 1998 Peptide Science 1998, 341-344.

超高分子量ポリエチレンの熔融延伸過程における  
*in-situ* パルス NMR 計測を用いた分子鎖絡み合い解析  
 群馬大学大学院工学研究科 ○攪上 将規・上原 宏樹・山延 健

**Analysis of Molecular Entanglement Characteristics during Drawing from Ultra-High Molecular Weight Polyethylene Melts Based on *In-Situ* Pulse-NMR Measurement**

Masaki Kakiage, Hiroki Uehara, and Takeshi Yamanobe

(Graduate School of Engineering, Gunma University)

Novel *in-situ* measurement system for evaluation of molecular motility during drawing of polymeric materials was set up by introducing the drawing and stress detecting devices into a  $^1\text{H}$  pulse-NMR spectrometer. In this study, we analyze the molecular motion of amorphous chains during melt-drawing of ultra-high molecular weight polyethylenes (UHMW-PEs) having different MW distribution (MWD), based on above *in-situ* NMR measurement system. At the initial stage of draw, with orientation of only amorphous chains, three-component resolution was enabled for free induction decay curve, which include “rigid”, “intermediate” and “mobile” components. Among then, the “intermediate” one reflected the MWDs of each UHMW-PE. These results demonstrated that this “intermediate” amorphous phase could be regarded as the index of molecular entanglement characteristics of polymeric materials.

[目的] 我々はこれまでに「シンクロトロン放射光を用いた X 線回折・散乱測定」を通して、超高分子量ポリエチレン (UHMW-PE) の熔融延伸過程における六方晶への一時通過的な結晶化挙動から「分子鎖絡み合い特性」を定量的に見積ってきた。その中で、この現象が熔融延伸過程における「分子鎖絡み合い密度の異なる成分の相分離」あるいは「分子鎖絡み合いの解きほぐし」といった非晶鎖の構造変化に誘起されて進行することがわかってきた。特に、六方晶結晶化以前の延伸初期段階における熔融非晶鎖の変形挙動が大きく関与していることが予想される。したがって、この特異な相構造形成メカニズムの解明を進めていくためには、非晶鎖の構造変化を *in-situ* (その場) 計測することが不可欠である。そこで本研究では、高分子非晶鎖の構造変化をダイレクトに計測できる NMR 分光を用いることで、熔融延伸過程における非晶構造変化を追跡する技術を確認することを目的とした。対象試料としては、異なる分子量分布を有するメタロセン系及びチーグラール系 UHMW-PE を用いることで、その分子鎖絡み合い特性が非晶構造変化に及ぼす影響を考察した。

[実験] 用いた試料は、旭化成ケミカルズ(株)提供の、同程度の粘度平均分子量約  $1.0 \times 10^7$  を有するメタロセン系及びチーグラール系触媒で重合された 2 種類の UHMW-PE である。これらパウダー試料を  $180^\circ\text{C}$  にて熔融プレス成形し、厚さ約  $3.5\text{mm}$  のフィルムを作製した。これを幅  $3.5\text{mm}$  の角柱状に切り出し、試料とした。

これらの試料を、パルス NMR 装置 (日本電子(株)製 MU-25) 内に敷設可能なように我々の研究グループで設計・試作した一軸上下方向引張り装置を用いて、融点 ( $135^\circ\text{C}$ ) 以上の延伸温度  $150^\circ\text{C}$ 、延伸速度  $2\text{mm}/\text{min}$  にて熔融延伸を行った際の  $^1\text{H}$ -NMR 緩和曲線と延伸応力を *in-situ* で測定した。パルス NMR 測定は、熔融樹脂やゴム状物質の解析に用いられる Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 法を採用した。このようにして

キーワード: 超高分子量ポリエチレン / 熔融延伸 / 分子鎖絡み合い / *in-situ* (その場) パルス NMR 計測

かきあげ まさき・うへはら ひろき・やまのべ たけし

得られた自由誘導減衰 (FID) 曲線に対して、緩和時間の短い方から Rigid、Intermediate、Mobile の 3 成分を仮定してフィッティングを行い、そのスピンスピン緩和時間 ( $T_2$ ) 及び成分比を見積った。

[結果と考察] 図 1 は、メタロセン系及びチーグラ系試料の熔融延伸に伴う各成分の  $T_2$  と成分比を延伸時間に対してプロットしたものである。まず  $T_2$  を見ると、両試料ともに延伸に伴う変化はほとんど認められない。ただし、すべての延伸時間においてチーグラ系試料の方が高い値を示している。このことは、チーグラ系試料の方が同じ非晶成分であっても分子運動性が若干高いことを示唆している。一方、成分比変化からは、メタロセン系試料とチーグラ系試料の非晶鎖特性の違いが明瞭に見て取れる。まず、始めの状態を比較すると、メタロセン系試料の優勢相が Mobile 成分であるのに対して、チーグラ系では Intermediate 成分が最も多い。Rigid 成分に関しては、両試料ともほぼ同じ 10% 程度の値を示しており、延伸してもほとんど変化しない。これに対して、Mobile 成分は延伸に伴って増加し、逆に、Intermediate 成分は低下している。特に、チーグラ系試料では、延伸後半では 80% 程度が Mobile 相になっている。しかしながら、メタロセン系試料では 60% 程度までしか達していない。低分子量成分を含むチーグラ系試料において Mobile 成分が顕著に増加していることを考えると、この Mobile 成分は分子鎖絡み合いが解きほぐされた非晶鎖に由来すると言える。非晶状態でありながらも分子配向が導入されているために分子鎖間での滑りが起こり易いことが、高い分子運動性をもたらしていると考えられる。これに対して、Intermediate 成分は、分子鎖絡み合いを多く含むランダムコイル状態の非晶鎖に起因すると解釈される。この分子鎖絡み合いはネットワーク状に分布していると予想され、そのために分子運動性が Mobile 成分よりも制限されていると考えられる。これらの結果から、本研究の *in-situ* NMR 計測法を用いて Intermediate 成分の量 (成分比) と質 (分子運動性) を的確に捉えることによって、試料間の分子鎖絡み合い特性の違いを定量的に説明できたと言える。

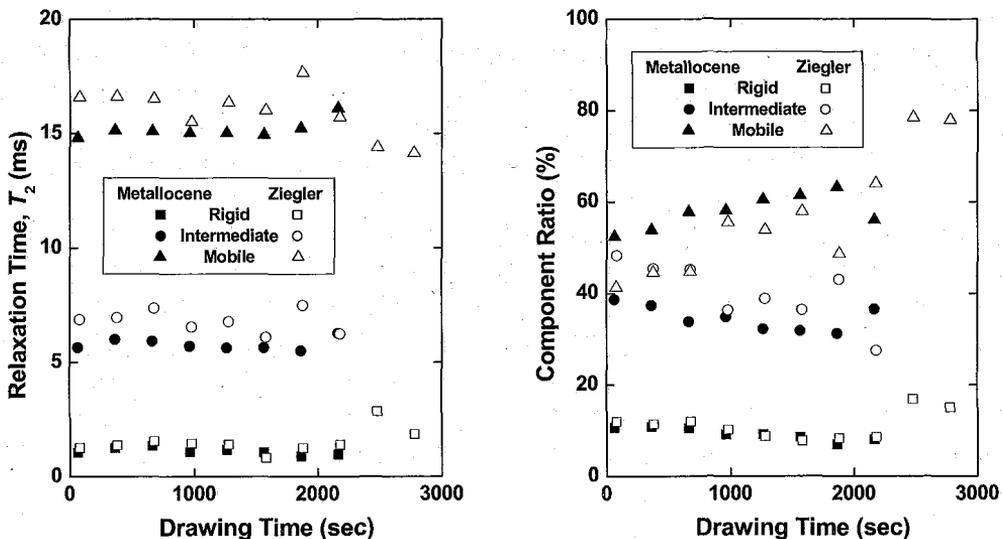


Figure 1. Changes in  $T_2$  (left) and component ratio (right) of “rigid” (square), “intermediate” (circle) and “mobile” (triangle) components evaluated from the FID curves. The filled and open symbols indicate the fitting results for metallocene- (filled) and Ziegler-catalyzed (open) UHMW-PEs.

NMR 計測を用いた栄養源変化に対する腸内細菌の  
代謝動態解析(<sup>1</sup>横浜市総科、<sup>2</sup>理研RCAI、<sup>3</sup>理研PSC、<sup>4</sup>名大院生命農)○中西裕美子<sup>1</sup>、福田真嗣<sup>1,2</sup>、近山英輔<sup>3</sup>、木村悠一<sup>1</sup>、大野博司<sup>1,2</sup>、菊地淳<sup>3,4</sup>

NMR studies of nutrition effect on metabolic dynamics of gut microorganisms

(<sup>1</sup>Int. Grad. Sch. Arts. Sci., Yokohama City Univ, JAPAN, <sup>2</sup>RIKEN RCAI, JAPAN, <sup>3</sup>RIKEN PSC, JAPAN, <sup>4</sup>Grad. Sch. of Bioagri. Sci., Nagoya Univ. JAPAN)  
○Yumiko Nakanishi<sup>1</sup>, Shinji Fukuda<sup>1,2</sup>, Eisuke Chikayama<sup>3</sup>, Yuuichi Kimura<sup>1</sup>, Hiroshi Ohno<sup>1,2</sup> and Jun Kikuchi<sup>3,4</sup>

**Abstract**

Gut microorganisms interact with host metabolism, it is essential for human health. Although, nutrition effect on metabolic dynamics of gut microorganisms play essential rule for human health its analysis is quit difficult due to their complexity. Therefore, we developed new method for real-time monitoring of nutrition effect on metabolic dynamics of gut microorganisms by *in vivo* <sup>13</sup>C-HSQC. Using this method, we showed the incorporation of <sup>13</sup>C-nutrients and their metabolism with two kind of bacteria growing in mono-culture or co-culture states. Further, we developed a novel metabolic profiling method for 2D-HSQC spectra. Tanscriptomic and proteomic analysis were co-performed to analyze correlation between metabolites and gene expression levels. Additionally, we showed a pilot experiment to identify the biomarkers that represents specific metabolic profiles of gut microorganisms using mice feces.

**Introduction**

腸内は約 500 種の細菌が混在する複雑系であり、腸内環境の改善はヒトの健康維持と増進に貢献すると言われている。特に腸内細菌叢の栄養代謝は大きな鍵を握っているものの、その複雑性故に画期的な解析法はまだ存在せず、その方法論の構築が期待されている。そこで我々は、ヒトの腸内に生息する微生物叢の栄養代謝に着目し、単純な 2 種の微生物共生モデル系に対する NMR の解析方法論を構築した。これは NMR 試料管中に直接菌体を培養し、増殖に伴う代謝変動を <sup>13</sup>C-HSQC を用いてリアルタイムで計測することで、多数の代謝物を一斉に追跡する方法である。一方、個々の代謝物を追跡するだけでなく、得られた NMR スペクトルの中の特徴的な代謝変動を抽出するプロファイリング法も重要であり、既存の 1D スペクトルによるプロファイリング法は 2D 計測を用いる我々の方法には適用できないことから、2D スペクトルを直接 bin 化する新たなプロファイリング法を開発した。さらに、これらモデル系で構築した方法論を用いて、次に多数の細菌が混在する複雑系である糞についても同様の代謝解析を行った。微生物共生モデル系に対してはトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を上記のメタボローム解析に加えることで-Omics 的な解析を試みた。

Keywords: リアルタイム計測、腸内細菌、プロファイリング、栄養代謝

なかにしゆみこ、ふくだしんじ、ちかやまえいすけ、きむらゆういち、おおのひろし、きくちじゅん

## Results

### 微生物の *in vivo* NMR 計測によるメタボローム解析

我々は安定同位体標識した微生物群の新しい代謝動態解析法として、*in vivo* NMR計測による連続モニタリング法を構築した (Fig.1)。この方法で *Escherichia coli* O157:H7 (EC) と *Bifidobacterium longum* (BL) の共培養系の NMR サンプル管中での増殖過程における代謝物の変動を、 $^{13}\text{C}$ -HSQC スペクトルを 30 分毎に 8 時間に渡り計 16 回測定することにより追跡した。その結果、 $^{13}\text{C}_6$ -Glucose 標識実験からは、BL が Asp を多量に生産するものの、逆に EC は消費することがわかった。共培養時には BL が生産した Asp を EC が消費していた。一方  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  アミノ酸標識実験では Ser, Glu, Lactate の代謝変動が EC, BL 単独培養時と共培養時とで異なっていた。均一標識培地ではこれら Asp, Ser, Glu, Lactate の代謝変動が総和となり、EC, BL 単独培養時と共培養時とで異なっていた。また、BL と同じ種である *Bifidobacterium adolescentis* (BA) についても *in vivo* NMR 計測を行った。単培養において、同定された代謝物についてはこの 2 種間では異なる代謝変動は検出されなかった。一方でこのような、栄養源や微生物種の変動に伴う、代謝変動情報を 2D-NMR スペクトルから効率良く抽出する方法論が必要となった。

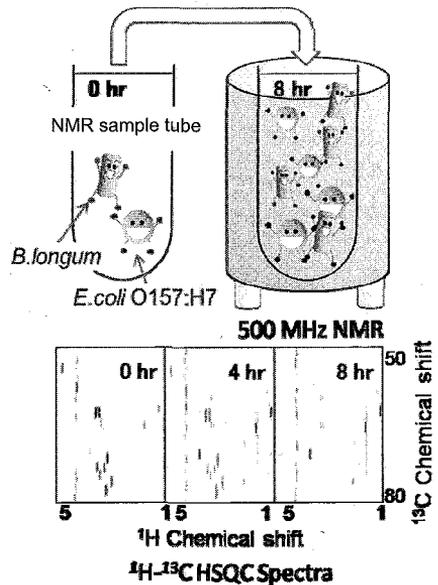


Fig.1 Scheme of real time *in vivo* NMR for monitoring dynamic metabolic changes

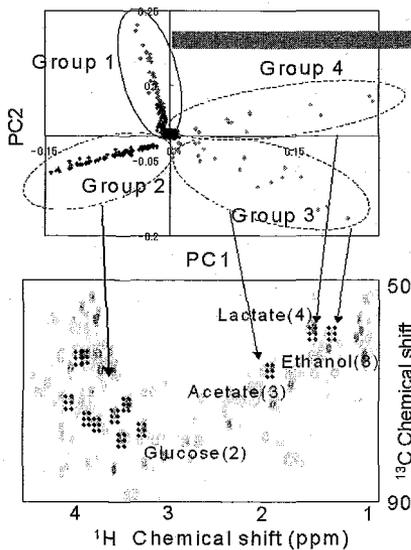
### 2D-HSQC スペクトルデータのプロファイリング法によるメタボローム解析

前述の方法では BL と BA の違いが明確でなかったことから、我々は代謝物を直接同定せずにスペクトル自体をプロファイリングする方法を新たに開発した。主成分分析 (PCA) を応用したプロファイリングの結果、2 種の PC1 方向に増殖前から増殖後へと時系列に分かれ、PC2 方向は種ごとに分かれた。この PCA の結果の loading plot を求めると大きく 4 つに分類された (Fig.2A)。loading 値  $\pm 0.01$  以上のものを寄与が高いケミカルシフトとして HSQC スペクトル上にプロットした (Fig.2B and C)。ローディングの結果、Glucose、Lactate、Acetate、Ethanol、各種アミノ酸、Raffinose、Galactose の変動を検出した。

### マーカー分子の探索: 混合系における *in vivo* NMR 法とプロファイリング法によるメタボローム解析

今後ヒトの疾患前診断等への応用を考える際、非侵襲計測/サンプリングは重要検討事項である。従って体外で腸内細菌の動態を解析する方法論の構築が望まれる。我々は、マウスの糞を直接 NMR サンプル管で培養するパイロット実験を行った。嫌気性に調製した PBS バッファーと  $^{13}\text{C}$  標識した栄養源を与え NMR 中で  $37^\circ\text{C}$ 、8 時間培養し、同時に  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC を 30 分毎に計測した。菌体を培養したときと同様にスペクトルに変動がみられ、腸内細菌の主要な代謝産物である Acetate、Lactate、Formate などの有機酸が検出された。

A. Plots of loading factors against PC1 vs. PC2



B. Plots of loading factors(Group 1) on HSQC spectrum

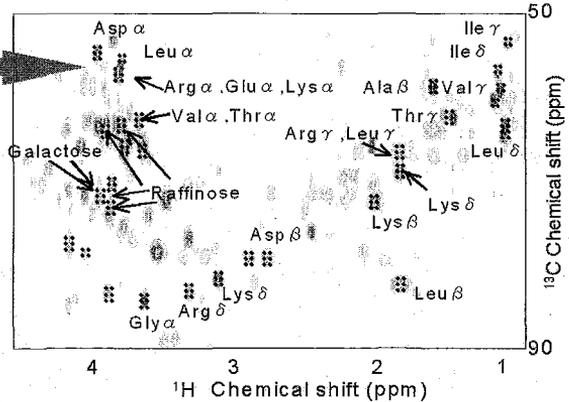


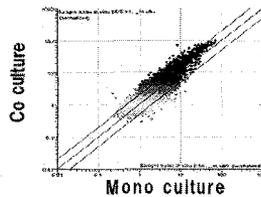
Fig.2 Newly developed profiling method for time-dependent metabolic changes of *in vivo* 2D-HSQC spectra. (A) Loading plots of PC1 and PC2. (B) Group1 on the HSQC spectrum (C) Group 2, 3, and 4 on the HSQC spectrum

C. Plots of loading factors(Group 2,3,4) on HSQC spectrum

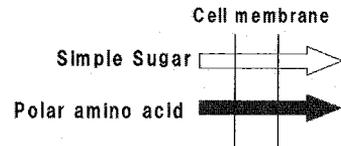
### トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析

上述のメタボローム解析により、ECとBLの混在系においてアミノ酸の大きな変動を見出したため、遺伝子レベルとタンパク質レベルとの相関を調べるためにトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を行った。その結果、ECでは共培養時に単培養に比べ、mRNAの発現量が変動する遺伝子が多いことがわかった(Fig.3A)。また、ECでは共培養時に単糖のトランスポーターのmRNAの発現量が低下し、アミノ酸のトランスポーターのmRNAの発現量が上昇していた(Fig.3B)。代謝物で変動の見られたAspに着目するとAspを分解・合成する酵素のmRNAの発現量が共培養時に増加していた(Fig.3C)。また、プロテオーム解析からも、ECではAspを分解する酵素の発現量が増加していた。

A. Gene expression profile



B. ABC Transporter



C. Asp metabolism

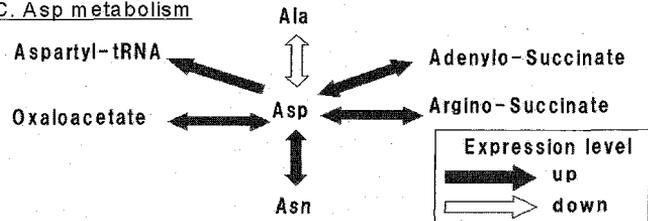


Fig.3 (A) Gene expression profile (B) Expression level of mRNA related ABC transporter proteins. (C) That related Asp metabolism. Arrows indicate the increase of the level (gray) and the decrease (white), respectively.

## Discussion

我々は微生物群の新しい栄養代謝動態解析法として、安定同位体標識に基づく *in vivo* NMR 計測による連続モニタリング法を構築した。EC と BL の 2 種の菌体の共培養系にこれを適用した結果、BL が Asp を多量に生産するものの、逆に EC は消費することがわかった。また、共培養時には BL が生産した Asp を EC が消費していた。このことは、この 2 種の菌体が代謝的に相互に接続していることの反映であると考えられる。また、EC と BL のトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析の結果、Asp を分解する酵素の発現量と遺伝子発現量が EC で増加していた。これらの解析を統合すると、EC は BL との共培養時には Glc の消費を抑えアミノ酸の消費を増進していることから、共培養時では EC は基質の利用性を変え単培養時と異なるエネルギー代謝を行い共培養という環境の変化に適応していると考えられる。

我々は新たに 2D-HSQC をプロファイリングする方法を開発した。非安定同位体試料の計測は  $^1\text{H}$  を観測する一次元  $^1\text{H}$ -NMR 計測が主であるが、シグナルのオーバーラップにより多くのマーカー分子の同定は難しい。しかし、この二次元 NMR スペクトルのプロファイリングではシグナルが  $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  の 2 次元で分離され、より多くのマーカー分子群を同定することができる。我々はこの方法を BL と BA の系に適用した結果、経時に減少する物質は Glucose であり、経時に増加する物質は Lactate、Acetate、Ethanol であることがわかった。また種間では差が少ない物質は Glucose であり、種間で異なる変動をする物質はアミノ酸と Raffinose、Galactose であることがわかった。このように、この方法論によって種間で異なる変動を示す代謝物質をより高分解能で検出できることを示した。

我々は今回開発した方法により、第 1 に系全体の変動点を決定することができ、第 2 に菌体が摂取する  $^{13}\text{C}$  栄養源を変えることで、共培養時に特徴的な栄養代謝を追跡することを可能にした。今後はより複雑な菌叢を有する糞の栄養代謝解析法へと展開させる事で、ヒトへの疾患前診断法として発展させ、医薬を用いる前に恒常性異常を止め、健康維持を可能とする方法として確立したいと考えている。

## Materials and Methods

*In vivo* NMR 計測で用いた培地は安定同位体ラベル源として  $^{13}\text{C}_6$ -D-Glucose ( $^{13}\text{C} > 98\%$ , Spectra)、Algal Amino Acid Mixture ( $^{13}\text{C}: 97.1\%$ ,  $^{15}\text{N}: 98.3\%$ , Chlorella Industry)、または  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識リッチ培地 (E. coli OD2, Silantes) に 0.5%  $^{13}\text{C}_6$ -D-Glucose、0.5%  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  amino acid を添加した均一標識培地を用いた。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC の測定条件はデータポイント 1024 ( $^1\text{H}$ )  $\times$  32 ( $^{13}\text{C}$ )、測定範囲は  $^1\text{H}$  12 ppm (F1)、 $^{13}\text{C}$  40 ppm (F2)、積算は 32 回、310 K で 8 時間測定を行った。トランスクリプトーム解析はマイクロアレイ (Affymetrix) を用いて、プロテオーム解析はタンパク質を抽出後、2 次元電気泳動により分離を行い、MLDI-TOF-MS により同定を行った。2D プロファイリングは計測した 2 次元の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルを  $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  方向に格子状に区切り 1 次元に並べることで bin 化を行った。この bin 化した数値データからノイズを削除した後、1 実験につき 16 スペクトルの数値データを PCA で一斉に解析を行った。

# 高温超伝導を用いた超 1GHz NMR における磁場ロック機構

YP14 ○柳澤 吉紀<sup>B,A</sup>、中込 秀樹<sup>B</sup>；保母 史郎<sup>C</sup>；細野 政美<sup>D</sup>；濱田 衛<sup>E</sup>；木吉 司<sup>F</sup>  
大塚昭弘<sup>F</sup>；福崎 智数<sup>A,G</sup>；高橋 雅人<sup>A</sup>、山崎 俊夫<sup>A</sup>、前田 秀明<sup>A,C</sup>

<sup>A</sup>理研 GSC、<sup>B</sup>千葉大・工、<sup>C</sup>横浜市大大学院、<sup>D</sup>日本電子、<sup>E</sup>神戸製鋼、<sup>F</sup>物材機構、<sup>G</sup>東京理科大

## Application of field-frequency lock to beyond 1GHz NMR using HTS coil

○ Yanagisawa Yoshinori<sup>B,A</sup>, Nakagome Hideki<sup>B</sup>, Hobo Fumio<sup>C</sup>, Hosono Masami<sup>D</sup>, Hamada Mamoru<sup>E</sup>,  
Kiyoshi Tsukasa<sup>F</sup> ; Otsuka Akihiro<sup>F</sup>, Fukuzaki Tomokazu<sup>G</sup>, Takahashi Masato<sup>A</sup>, Yamazaki Toshio<sup>A</sup>,  
Maeda Hideaki<sup>A,C</sup>

<sup>A</sup>RIKEN, <sup>B</sup>Chiba Univ., <sup>C</sup>Yokohama City Univ., <sup>D</sup>JEOL Ltd., <sup>E</sup>Kobe Steel, Ltd.,  
<sup>F</sup>NIMS, <sup>G</sup>Tokyo Univ. of Science

We have started a project to develop a beyond 1GHz NMR by using a Bi2223 high temperature superconducting innermost coil. Due to small residual resistance on the HTS conductor, stable persistent current, such as 10Hz/h, is improbable for the NMR magnet and therefore a current is supplied by the outer power supply. However, current ripples caused by the power supply lead to magnetic field ripples, resulting in marked side bands in the NMR signals. We have experimentally studied the maximum permissible field ripples being controlled by the conventional internal field-frequency lock system. The results were compared with the field ripples actually caused by a highly stabilized outer power supply on an NMR magnet. As the latter is 1/100 of the former, it is suggested that the field ripples on the NMR magnet is controlled by the conventional field-frequency lock, if the highly stabilized power supply is utilized.

### 〈はじめに〉

我々は、高温超伝導内層コイルを用いて、超1GHz NMR スペクトロメータを開発するプロジェクトを開始した<sup>1)</sup>。高温超伝導コイルには微弱な残留抵抗があり、永久電流モードでは NMR に要求されるレベルの磁場安定度(10Hz/h)を実現できないので、安定化外部電源による通電モードでの運転が必要になる。通電モードでは、電流リップルが生じるので、これを安定化しなければ、良質な NMR スペクトルを取得できない。本報では、通電モードにおける磁場安定化の可否について、2 種類の実験で検証した。第 1 の実験では、RF コイル外周に巻いたコイルに交流を通して模擬的な磁場リップルを発生させ、既存の<sup>2</sup>H 磁場-周波数ロックの磁場安定化機能の限界を調べた。第 2 の実験では、外部電源で NMR 磁石を通電し、実際に生じる磁場リップルのスペクトルを計測した。両者を比較することで、<sup>2</sup>H 磁場-周波数ロックによる通電モードでの磁場安定化への適用性を検討した。

### 〈実験方法〉

第 1 の実験では、模擬的な磁場リップル発生用のソレノイド・コイル(内径 32mm、長さ 68mm、巻き数 386)を 500MHz NMR の NMR プローブ内部に設置した(Fig.1)。コイルの正弦波電流の周波数と振幅を変化させ、磁場-周波数ロック機構の制御回路のエラー信号<sup>2)</sup>を計測すると共に、標準試薬(Chloroform / Acetone-d6)について NMR 信号の変化を調べた。

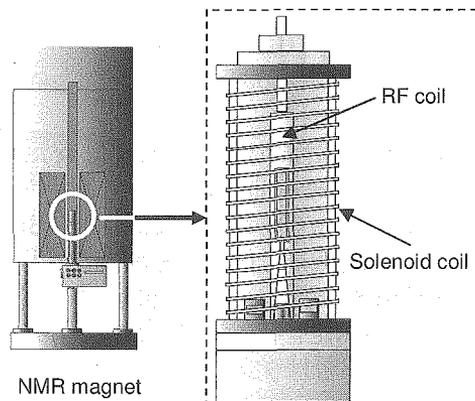


Fig.1. Solenoid coil for generating field ripples

キーワード：高磁場 NMR、磁場安定化、磁場ロック

やなぎさわよしりのり、なかごめひでき、ほぼふみお、ほそのまさみ、はまだまもる、きよしつかさ、おおつかあきひろ、ふくざきともかず、たかはしまさと、やまざきとしお、まえだひであき

第 2 の実験では、高安定化電源をもちいて、NMR 磁石を通电しているときに生じる磁石の電圧信号を、サンプリング時間 2 ミリ秒でデジタルレコーダにより約 10 分間測定し、これをフーリエ変換してからフーリエ空間で電流に変換し、磁石電流リップル(即ち磁場リップル)のスペクトルを求めた。

＜実験結果＞

(1) 磁場制御の周波数特性

小コイルで正弦波磁場リップルを発生させた時の制御系エラー信号の振幅と NMR スペクトルを Fig.2 に示す。エラー信号は、サンプル磁場が基準周波数に固定されていなければゼロになるが、磁場変動が大きいくほど大きな値になる。制御パラメータである Loop Gain、Loop Time、Loop Filter を変更しながらエラー信号の周波数特性を比較した。NMR 装置の標準的なパラメータである①(○で表示)では、1Hz 以下の低周波リップルでも有限のエラーが生じ、スペクトルにもサイドバンドが生じるが、高周波向けに独自に設定したパラメータ②(●で表示)では 20Hz までエラー信号はほぼゼロで NMR のサイドバンドも少ない。但し、80Hz に共振があり、磁場リップルは逆に増強されるので、この付近では NMR 信号のサイドバンドも急増する。

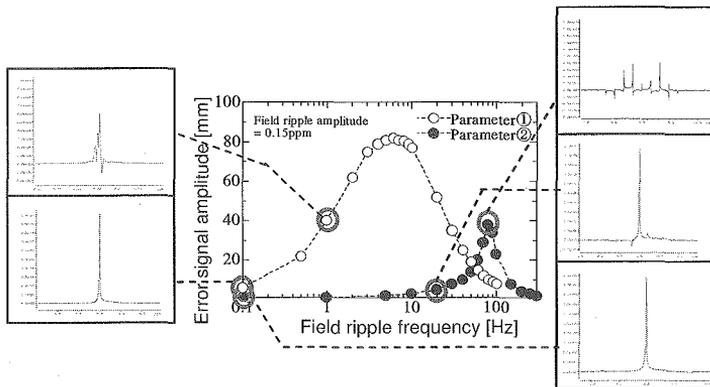


Fig.2. NMR spectra and error signal under field ripples

(2) 磁石に生じる磁場リップルとの比較

パラメータ設定②における許容磁場リップルと、実際にマグネットを外部通电したときに生じる磁場リップルを比較して Fig.3 に示す。許容磁場リップルは、サイドバンドが主ピークの 5%になる値である。磁場ロック機構が許容できる磁場リップルは電源通电時に生じる磁場リップルより数桁大きいので、このレベルの安定化電源を用いるならば、外部通电下でも磁場リップルを抑え、良質な溶液 NMR 計測が可能であると推測できる。

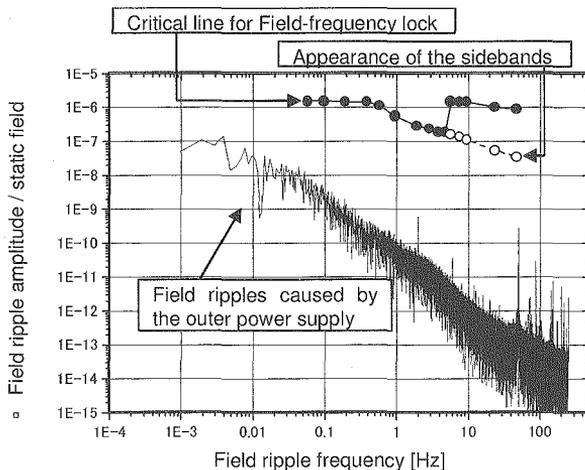


Fig.3. Permissible field ripples compared to the power supply ripples

＜まとめ＞

NMR 磁石の外部通电下での磁場リップル抑制に、既存の <sup>2</sup>H 内部ロック機構が適用できる見通しを得た。今後、NMR 磁石を外部通电した状態で溶液 NMR 計測の実証試験を行う。

- 1) T. Kiyoshi, M. Hamada, M. Hosono, T. Yamazaki, H. Maeda; Upgrading Project towards 1.05 GHz, presented at the 20th international conference on Magnet technology, 2007.
- 2) Andrew E. Derome, Modern NMR techniques for Chemical Research, p120, Pergamon Press.

本開発は、(独)科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業による成果である。

DDS のイメージ周波数とスーパーナイキストサンプリングを用いたデジタル NMR 分光計の駆動周波数向上方法

(阪大院基) ○ 根来誠、武田和行

Boost-up of operational frequency in a homebuilt NMR spectrometer with DDS-image extraction and super-Nyquist sampling

○ Makoto Negoro and Kazuyuki Takeda

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

**Abstract:** Operational frequency in a digital NMR spectrometer can be boosted up with a combination of DDS-image extraction and super-Nyquist sampling, which is realized by only modifying the pass bands in the filter circuits.

Fig. 1 に示すような、送信系で DDS(Direct Digital Synthesis) を用いて中間周波数 (IF) を生成し、かつ受信系でデジタル直交復調 (Digital Quadrature Demodulation: DQD) を行っているデジタル NMR 分光計 [1] において、簡便に IF を高める新しい方策を提案する。

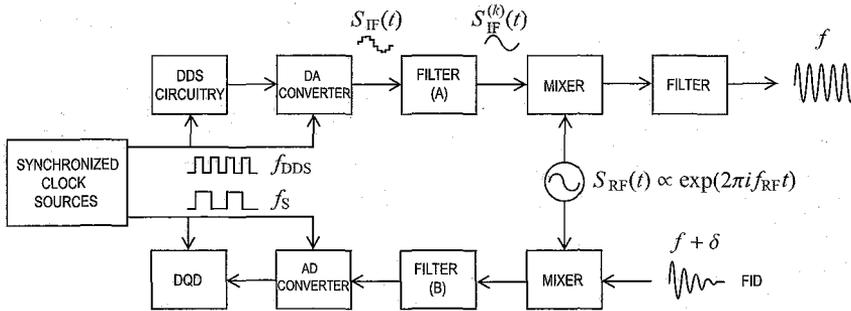


Fig. 1: A block diagram for the conventional digital NMR spectrometer [1].

周波数  $f_{\text{DDS}}$  のクロックで駆動されて基本周波数  $f_{\text{IF}}^{(0)}$  を生成する DDS の出力は、Fig. 2 のようにクロックの立ち上がりとともに信号が不連続に変化することによって高調波を含んでおり、その出力信号  $S_{\text{IF}}(t)$  は

$$S_{\text{IF}}(t) = S_{\text{IF}}^{(0)}(t) + S_{\text{IF}}^{(1)}(t) + S_{\text{IF}}^{(2)}(t) + \dots, \tag{1}$$

$$S_{\text{IF}}^{(k)}(t) = (\text{const}) \cdot \text{sinc} \left( \frac{\pi f_{\text{IF}}^{(k)}}{f_{\text{DDS}}} \right) \exp \left( 2\pi i f_{\text{IF}}^{(k)} t \right), \tag{2}$$

$$f_{\text{IF}}^{(k)} = \begin{cases} \frac{k+1}{2} f_{\text{DDS}} - f_{\text{IF}}^{(0)}, & k = 1, 3, 5, \dots \\ \frac{k}{2} f_{\text{DDS}} + f_{\text{IF}}^{(0)}, & k = 2, 4, 6, \dots \end{cases} \tag{3}$$

Key Word: デジタル NMR 分光計, アンダーサンプリング, イメージ周波数

著者ふりがな: ねごろまこと、たけだかずゆき

$$S_{\text{IF}}(t) = S_{\text{IF}}^{(0)}(t) + S_{\text{IF}}^{(1)}(t) + S_{\text{IF}}^{(2)}(t) + \dots$$

Fig. 2: A schematic figure illustrating that the DDS output signal is a superposition of the fundamental signal and the signals with image frequencies.

と記述できる。そこでフィルタ回路 (Fig. 1 の A) により、イメージ周波数  $f_{\text{IF}}^{(k)} (k \geq 1)$  を遮断し基本周波数  $f_{\text{IF}}^{(0)}$  のみを抽出した後、ミキサで周波数  $f_{\text{RF}}$  と混合し、さらにフィルタ回路を経て所望の出力周波数  $f = f_{\text{RF}} + f_{\text{IF}}^{(0)}$  (もしくは  $f = f_{\text{RF}} - f_{\text{IF}}^{(0)}$ ) が生成される。

一方受信系では、周波数  $f + \delta$  の FID 信号がミキサで周波数  $f_{\text{RF}}$  の参照信号と混合されて生成した二つの周波数  $2f_{\text{RF}} + f_{\text{IF}}^{(0)} + \delta$  と  $f_{\text{IF}}^{(0)} + \delta$  がフィルタ (Fig. 1 の B) で選別されて、後者の信号のみが AD コンバータへと送られる。送信系と受信系の位相の一貫性を保つために、AD 変換のサンプリングクロック周波数  $f_s$  は、 $f_{\text{DDS}}$  と同期している必要がある。また、信号の周波数  $f_{\text{IF}} + \delta$  が、サンプリング周波数  $f_s$  で決定される第一ナイキスト領域  $[0, f_s/2]$  の範囲内に収まっていればエイリアシングの無い AD 変換が可能となる。

以上が従来のデジタル NMR 分光計における送受信のしくみである。最近はこの方式を採用して、かつ必要な全てのデジタル回路を一つのチップに実装したコンパクトな分光計も開発されている [1]。ただしこの方式には、 $f_{\text{IF}}^{(0)}$  を十分に高くすることができないという欠点がある。その理由は、中間周波数  $f_{\text{IF}}$  がナイキスト条件  $0 < f_{\text{IF}}^{(0)} < f_s/2$  で制限されることと、また現時点で利用可能な AD コンバータのサンプリング周波数  $f_s$  は高々 100MHz 程度であることによる。たとえば [1] では  $f_{\text{IF}}^{(0)} = 20\text{MHz}$ 、 $f_s = 80\text{MHz}$  を用いており、フィルタ回路 (図 1 の A、B) に急峻な特性が要求されている。

ここで我々が提案する方策のポイントは、(i) DDS のイメージ周波数を積極的に利用することと、(ii) AD 変換においてスーパーナイキストサンプリング (アンダーサンプリング) を行うことにある。この方策では、Fig. 1 の A、B のフィルタ回路を変更するだけで、他のハードウェアに何ら変更を加えることなく高い中間周波数  $f_{\text{IF}}^{(k)}$  を利用することが可能となる。この手法により、 $f_{\text{DDS}} = 160\text{MHz}$ 、 $k = 2$ 、 $f_{\text{IF}}^{(2)} = 180\text{MHz}$ 、 $f_{\text{RF}} = 320\text{MHz}$ 、 $f = 500\text{MHz}$ 、 $f_s = 80\text{MHz}$  を用いて測定したシリコンゴムの  $^1\text{H}$  NMR 信号を Fig. 3 に示す。

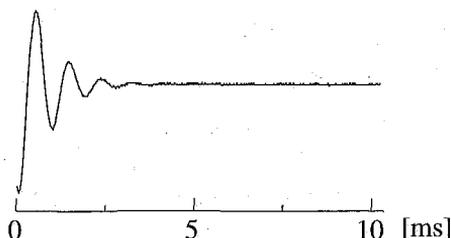


Fig. 3:  $^1\text{H}$  NMR signal in silicone rubber in 11.7 T measured with the proposed in a home-built digital NMR spectrometer.

## References

- [1] K. Takeda, Rev. Sci. Instrum. **78**, 033103 (2007).

## 電源励磁による超伝導磁石の磁場安定化手法の開発

<sup>1</sup>理化学研究所 GSC, <sup>2</sup>千葉大学工学部, <sup>3</sup>横浜市立大学, <sup>4</sup>日本電子,  
<sup>5</sup>神戸製鋼, <sup>6</sup>物質材料研究機構

○ 高橋 雅人<sup>1</sup>, 柳澤 吉紀<sup>2</sup>, 保母 史郎<sup>3</sup>, 中込 秀樹<sup>2</sup>,  
細野 政美<sup>4</sup>, 濱田 衛<sup>5</sup>, 木吉 司<sup>6</sup>, 山崎 俊夫<sup>1</sup>, 前田 秀明<sup>1,3</sup>

### Development of magnetic field stabilization method for a current supplied superconducting magnet

<sup>1</sup>RIKEN, <sup>2</sup>Chiba Univ., <sup>3</sup>Yokohama City Univ., <sup>4</sup>JEOL Ltd., <sup>5</sup>Kobe Steel, Ltd., <sup>6</sup>NIMS  
○Masato Takahashi<sup>1</sup>, Yoshinori Yanagisawa<sup>2</sup>, Fumio Hobo<sup>3</sup>, Hideki Nakagome<sup>2</sup>, Masami Hosono<sup>4</sup>, Mamoru Hamada<sup>5</sup>, Tsukasa Kiyoshi<sup>6</sup>, Toshio Yamazaki<sup>1</sup> and Hideaki Maeda<sup>1,3</sup>

A novel method to stabilize magnetic field is demonstrated. Achieving higher magnetic field is important for higher sensitivity, resolution and solid state NMR. But commonly used Low Temperature Superconductor (LTS) can not generate beyond 23.5 T. We started a project which the innermost insert coil of the 920MHz NMR is replaced from Nb<sub>3</sub>Sn to Bi-high temperature superconductor (HTS) for beyond 1GHz operation (supported by Sentan, JST). Unfortunately HTS has small residual resistance, which prevents operation in persistent mode. Thus an outer power supply for the HTS is needed, causing current ripples.

The stabilizing method in this study uses NMR signals and a frequency counter. The frequency counter measures the frequency of NMR FID signal and compensation coil current is controlled by this frequency change. It is less accurate than the normal <sup>2</sup>H internal lock system of NMR, but robust and faster. The method is effective as an external lock system for current-supplied type of solid state NMR magnets.

#### 緒言

NMR では高磁場化によって、高感度、高分解能なスペクトルを得ることができる。さらに、固体 NMR の四極子核計測では、より細い線幅のスペクトルになるため高磁場化が有効である。しかし 1GHz 超の NMR を実現するには、これまで使われてきた金属超伝導線ではなく高温超伝導線を用いる必要がある。これは、20T を超えるような高磁場中で低温超伝導線の臨界電流密度が小さくなるためである。一方、高温超伝導線を超流動ヘリウム温度で使用すると高磁場中でも高い臨界電流が得られるため、1GHz 以上を実現するには超伝導磁石の最内層コイルに高温超伝導線を利用する方法が最善である。我々は、高温超伝導を用いた超 1GHz NMR システムの開発を開始した。

高温超伝導線は、大きな電流を流すとわずかではあるものの抵抗が発生する。このため、通常の NMR 磁石のように永久電流モードで使用すると、この抵抗により 10<sup>-4</sup>/h の速度で電流が減衰してしまうため、NMR で必要とされる十分な磁場安定度を実現できない。

そこで、永久電流モードで使用するのではなく、外部電源から電流を常に供給する方法を採用した。これにより、磁場減衰を抑えることができるものの、外部電源の電流変動の影響を受けてしまう<sup>(1)</sup>。この電流変動量は電源の性能に依存するが永久電流に比べれば大きく、これにより NMR スペクトルは変調される。そこで、この磁場変動を抑える仕組みを考案し

キーワード：高磁場 NMR、磁場安定化、変動磁場測定

たかはしまさと、やなぎさわよしのり、ほぼふみお、なかごめひでき、ほそのまさみ、はまだまもる、きよしつかさ、やまざきとしお、まえだひであき

実験を行った。固体 NMR 装置を想定して、外部ロックに適用できる方式とした。本研究では最終的に物質・材料研究機構に設置してある 920MHzNMR の最内層コイルを、外部電源通電の高温超伝導コイルに置き換えることで 1.05GHz で運転することを目標としている。

**磁場変動抑制手法**

Fig. 1 に本研究で考案した手法を示す。変動磁場を NMR によって測定し、この値を用いて室温ボア内に設置したコイルに変動磁場を補正するような電流をフィードバックする。従来からの手法とは異なり、水など単一ピークの NMR 信号を周波数カウンタで測定することにより磁場測定を行う。このシステムを通常の NMR の測定サンプルと測定系とは別に用意し、外部ロックとして使用する。

NMR そのものは磁場に非常に敏感な測定方法であり、磁場の測定方法として最適であると考えている。また、従来から用いられている（たとえば重水素などによる）内部ロックシステムは NMR 信号の分散を用いることによって、磁場変動に対して非常に高精度に補正できるものの、許容磁場変動幅に限界がある可能性がある。それに対し本研究で提案する周波数カウンタを用いる手法では、測定精度は従来からの内部ロックシステムに及ばない<sup>(2)</sup>ものの、許容磁場変動幅が大きい。

**実験**

第一段階として 500MHzNMR を用い<sup>1</sup>H 計測で実験を行った。一定間隔で励起パルスを発生させ、生じた NMR 信号をミキサで周波数を落とすとして周波数カウンタに取り込んだ。この値を PC に転送し、フィードバック用の電流値を計算し D/A 変換ボードから出力した。プローブ内部に取り付けた変動磁場補正コイルにこの電流を流して磁場補正を行った。変動磁場の発生には装置に備えられている室温シムのスイープモードを使った。そのため今回は磁場の変動は三角波状である。

Fig. 2 にその結果を示す。磁場振幅 (ppm, 1Hz の三角波状の磁場変動 (左軸、実線) が測定できている。さらに 0 秒から周波数カウンタによって測定された磁場強度を用いて補正コイル用の電流 (右軸、点線) を制御して磁場の変動抑制を行ったが、磁場は良く安定化されゼロを保持している。この結果により周波数カウンタを用いた磁場変動抑制手法が有効であることが確かめられた。今後、さらなる磁場計測速度の高速化と、磁場測定プローブの小型化を進め、本技術を固体 NMR 用の外部ロックシステムに発展させていく予定である。

**参考文献**

- (1) A. Otsuka et al., "Field Stability of 600MHz NMR Magnet in the Driven-Mode Operation", Applied Superconductivity Conference 2007, to be published.
  - (2) 柳澤 吉紀ら 第 46 回 NMR 討論会講演要旨集(2007)
- 本研究は、(独) 科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業による成果である。

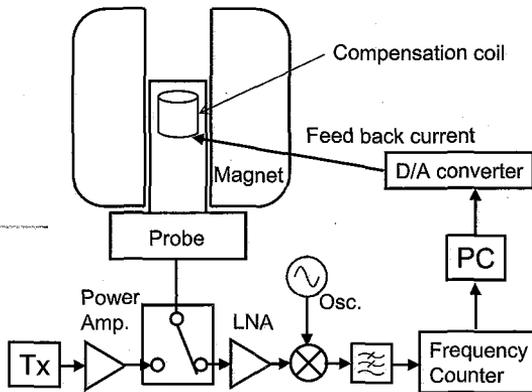


Fig.1. Magnetic field stabilization system using frequency counter

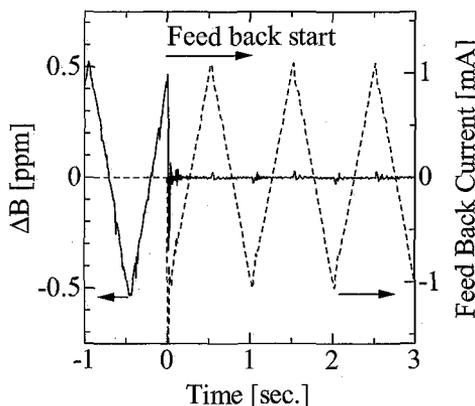


Fig. 2. Measured magnetic field modulation and stabilized magnetic field by feedback current

高橋 7



ポスター発表要旨

Poster Abstracts

## P001 SAIL 法を用いたタンパク質構造解析の新しい展開

(名大院・理<sup>1</sup>、Academia Sinica<sup>2</sup>、阪大院・理<sup>3</sup>、SAIL(株)<sup>4</sup>、首都大院<sup>5</sup>)

武田光広<sup>1</sup>、Chung-ke Chang<sup>2</sup>、Ing-jye Jiang<sup>2</sup>、中村健一郎<sup>3</sup>、寺内勉<sup>4</sup>、相本三郎<sup>3</sup>、  
Tai-huang Huang<sup>2</sup>、甲斐荘正恒<sup>1,5</sup>

### Some new aspects of the SAIL method for protein structural studies

*Mitsuhiro Takeda*<sup>1</sup>, *Chung-ke Chang*<sup>2</sup>, *Ing-jye Jiang*<sup>2</sup>, *Kenichiro Nakamura*<sup>3</sup>, *Tsutomu Terauchi*<sup>4</sup>, *Saburo Aimoto*<sup>3</sup>, *Tai-huang Huang*<sup>2</sup>, *Masatsune Kainosho*<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science, Nagoya University, Furo, Chikusa, Nagoya 464-8622, Japan

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei 115, Taiwan,

<sup>3</sup>Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

<sup>4</sup>SAIL Technologies, 1-40 Suehiro, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan

<sup>5</sup>Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, 1-1, Minami-ohsawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan

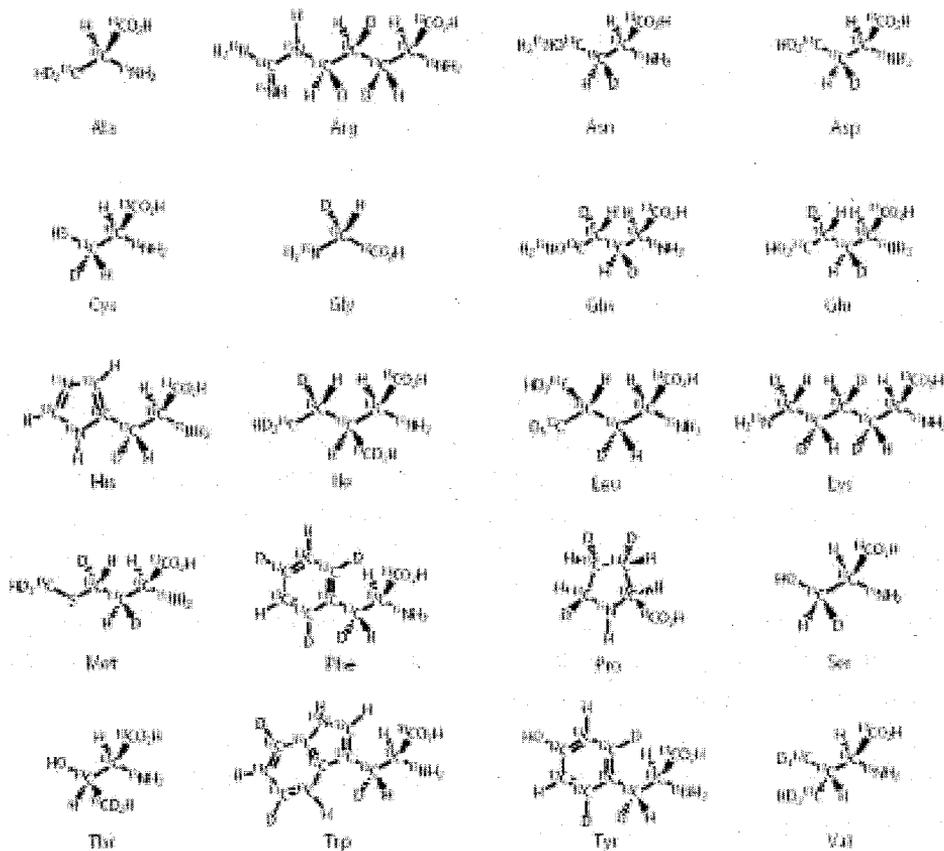
**[Summary]** NMR spectroscopy provides information about the three-dimensional structures and the dynamic properties of proteins in solution, which cannot be readily obtained by any other technique. Thus, NMR spectroscopy has great potential to yield critical insights into the structure-function relationships of proteins. However, its usefulness had been severely hampered, especially for large proteins, by various problems associated with line-broadening and extensive overlapping of NMR signals. To overcome these problems, we have developed a new concept to optimize protein samples for NMR spectroscopy. We will present some of our latest NMR data, showing that SAIL and related approaches will reveal new aspects of protein structures and dynamics.

NMR spectroscopy can be used to determine the three-dimensional structures and to clarify the dynamics of proteins in solution. NMR is widely accepted as an indispensable tool for gaining insight into the structure-function relationships of proteins. In spite of its great potential, however, the application of NMR spectroscopy to studies of large proteins, such as membrane proteins and supra-molecular complexes, had been critically hampered by problems associated with line-broadening and severe overlapping of NMR signals. To accommodate the increasing demands for investigating such large proteins, improvements in NMR technology have been continuously pursued, including the preparation of samples enriched with deuterium and the implementation of transverse relaxation optimized spectroscopy. However, these techniques cannot be readily applied to the overall structural determination of large proteins.

We have recently developed a new concept to optimize protein samples for NMR spectroscopy. The stereo-array isotope labeling (SAIL) method utilizes a protein exclusively composed of *stereo*- and *regio*-specifically isotope-labeled amino acids. The labeling pattern of the SAIL protein is optimized for the observation of NMR signals, without compromising the structural information (1). So far, we have demonstrated for some large proteins (over 25 kDa) that the employment of the SAIL methods leads to dramatic improvements in both the spectral quality and sensitivity of NMR spectra, confirming the feasibility of employing the SAIL method for studying large proteins.

キーワード SAIL 法, セルフリータンパク質合成, 高分子量タンパク質

たけだ みつひろ、Chung-ke Chang、Ing-jye Jiang、なかむら けんいちろう、てらうち つとむ、あいもと さぶろう、Tai-huang Huang、かいのしょう まさつね



**Figure 1. Chemical structures of 20 SAIL amino acids**

To facilitate the SAIL method as a practical approach in biological NMR spectroscopy, we have been developing various key technologies (2, 3, 4). We will present some of our latest NMR data, showing that SAIL and related approaches will reveal new aspects of protein structures and dynamics.

### References

1. Kainosho M., Torizawa T., Iwashita Y., Terauchi T., Ono M.A., and Guentert P. *Nature*, **440**, 52-57 (2006)
2. Torizawa T., Ono A.M., Terauchi T., and Kainosho M. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12620-12626 (2005)
3. Torizawa T., Shimizu M., Taoka M., Miyano H., and Kainosho M., *J. Biomol. NMR*, **30** (2004) 311-325
4. Ikeya T., Terauchi T., Guentert P., and Kainosho M. *Magn. Reson. Chem.*, **44** (2006) S152-S157

## マルチサイトデカップリング

日本電子株式会社 ○朝倉克夫、内海博明

## Multiple Sites Decoupling

JEOL Ltd., K. Asakura, H. Utsumi

The  $^{19}\text{F}$  decoupling is usually not achieved sufficiently because of the  $^{19}\text{F}$  nuclei's high resonance frequency and very wide chemical shift range. In general, in many fluorine compounds, the  $^{19}\text{F}$  signals are observed separately in several discrete areas of the spectrum. Adiabatic broadband decoupling can decouple all  $^{19}\text{F}$  groups but also affects some areas with no signals that are out of concern. Furthermore, it causes decoupling sidebands. We applied plural narrow range decoupling offsets, with each offset aimed to independent chemical shift areas to decouple all signals. Finally, the new method to obtain the quantitative sideband-less  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}, ^{19}\text{F}\}$  spectrum of the fluorine compound will be presented and discussed.

$^{19}\text{F}$  デカップリングの実験では、 $^{19}\text{F}$  の広範な化学シフト (Fig.1) により、大抵の場合完全デカップリングが達成できない (Fig.2)。

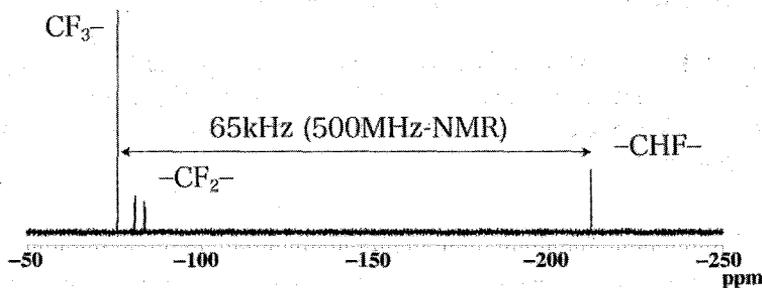


Fig.1.  $^{19}\text{F}$ -NMR spectrum of the  $\text{CF}_3\text{CHF}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$

キーワード (含フッ素化合物、デカップリング、複数帯域)

あさくらかつお、うつみひろあき

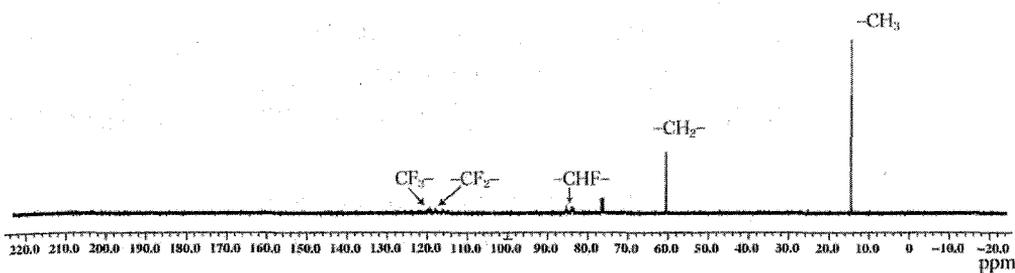


Fig.2.  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}, ^{19}\text{F}(-150\text{ppm})\}$ -NMR spectrum of the  $\text{CF}_3\text{CHF}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$

これに対し、一つのチャンネルに対して複数の RF 源をアサインし、異なった照射オフセットの RF 源から同時にデカップリング照射をおこなうことにより、効率よく全領域のデカップリングを実現することができる。また、複数帯域を個別にデカップルするため、必要なデカップリング出力は小さくなり、RF コイルやサンプルの発熱を抑えることができる。 $\text{CF}_3\text{CHF}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ では、 $^{19}\text{F}$ の信号が $-80\text{ppm}$ 付近と $-212\text{ppm}$ 付近の2カ所にそれぞれ集まっており (Fig.1)、それらの領域をそれぞれ独立してデカップルすることにより、 $^{19}\text{F}$ とのカップリングが完全に消去された $^{13}\text{C}\{^1\text{H}, ^{19}\text{F}\}$ スペクトルを得ることができた (Fig.5)。本手法は、多くの含フッ素化合物に見られるような、それぞれがある程度離れたいくつかの領域に信号が集中するサンプルに対して有効性が期待される。

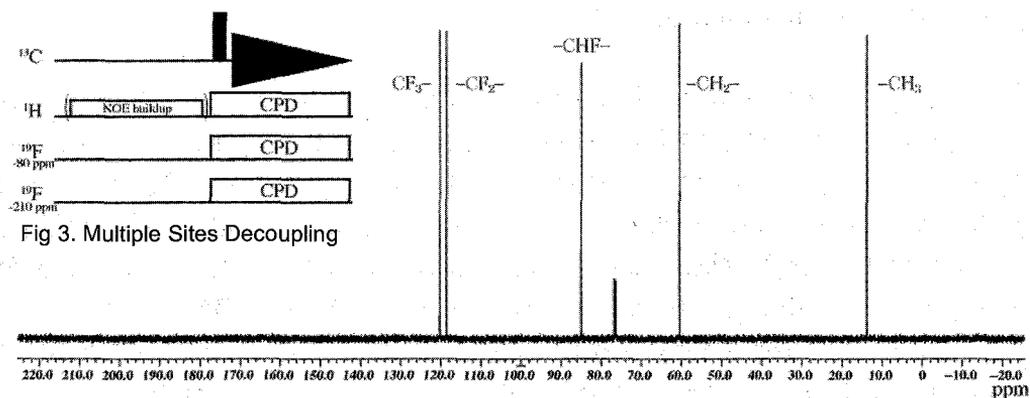


Fig 3. Multiple Sites Decoupling

Fig.4.  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}, ^{19}\text{F}(-80\text{ppm}, -212\text{ppm})\}$ -NMR spectrum of the  $\text{CF}_3\text{CHF}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$

DOSY 法における  $T_2$  フィルターの有効性

(日本電子 (株)・応用研究グループ<sup>1</sup>、  
大日本インキ化学工業 (株)・分析センター<sup>2</sup>)  
○櫻井智司<sup>1</sup>、末松孝子<sup>1</sup>、戸田政明<sup>2</sup>、雨宮晶子<sup>2</sup>、内海博明<sup>1</sup>

Effectivity of  $T_2$  Filter for DOSY method  
(Application & Research Group, JEOL Ltd.<sup>1</sup>,  
Analysis Center, Dainippon Ink and Chemicals, Incorporated<sup>2</sup>)  
Satoshi Sakurai<sup>1</sup>, Takako Suematsu<sup>1</sup>, Masaaki Toda<sup>2</sup>  
Akiko Amemiya<sup>2</sup>, Hiroaki Utsumi<sup>1</sup>

Due to progress of field gradient amplifier and improvement of processing software in recent years, the DOSY method came to be applied for various fields. The analysis of additives etc. in the Polymer materials is the one of them. However, because the Polymer has multi peaks, which are broad, they are overlapped with the peaks of the additives in many cases. The signal decays of small molecules are larger than of Polymers in the diffusion measurement by NMR. For this reason, the signal decays of additives, which are overlapped with the Polymer peaks, are influenced seriously. Therefore, it is easy to cause the mistake of the analysis by DOSY. Then, it was confirmed to be able to do a more accurate DOSY measurement by applying the  $T_2$  filter to the DOSY measurement, and decreasing the peak of the polymer origin.

【緒言】DOSY 法は近年の装置の精度向上および処理ソフトの改良により、広い分野で利用されるようになった。ポリマー材料中における添加剤などの解析もそのうちの一例である。ところが、ポリマー由来のピークはブロードでありかつ複数ピークとなるため、多くの場合が添加剤由来のピークと重なってしまう。NMR による拡散測定では、信号強度の減衰は（拡散係数の大きい）低分子由来のピークが先であり、高分子であるポリマー由来のピークと重なっているピークでは大きな影響を受ける。このため、DOSY による解析の間違いを起こし易い。そこで、 $T_2$  フィルターを DOSY 測定に適用し、高分子由来のピークを低減することで、より正確な DOSY 測定が行えることを確認した。

キーワード：DOSY、 $T_2$  フィルター、添加剤、ポリマー

さくらいさとし、すえまつたかこ、とだまさあき、あめみやあきこ、うつみひろあき

【実験】 $T_2$  フィルターにはスピロックを使用し、BPP-STE-LED シーケンスと組み合わせた (Fig. 1)。

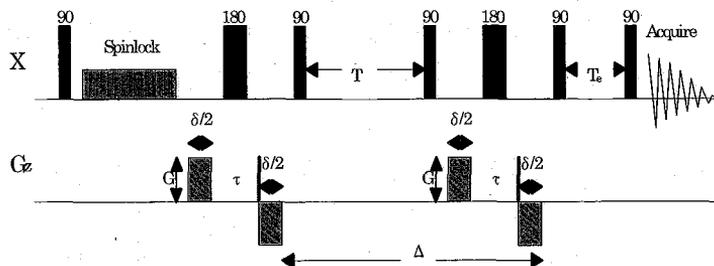


Fig. 1 Pulse Sequence of BPP-STE-LED with  $T_2$  filter

測定は JNM-ECX400P で行った。モデルケースとして、分子量 50000 のポリスチレン 10 mg とカンファー 5 mg を Chloroform-*d* に溶解し混合試料とした。試料管には外径 3 mm の試料管を用い、測定の主なパラメータは以下の条件で行った。拡散時間  $\Delta=100$  ms、磁場勾配パルス幅  $\delta=1.2$  ms、磁場勾配強度  $G=0.1\sim 32$  G/cm (16 ステップ)。 $T_2$  フィルター付きの測定に関しては、スピロックタイムは 300 ms。

【結果】 $T_2$  フィルターを使用していない測定では、ポリスチレン由来のピークと重なっているカンファー由来のピークが他のピークと異なる拡散係数値として得られてしまった。これに対し、 $T_2$  フィルターを使用することで、カンファー由来のピークは全て同じ拡散係数値として得られた。

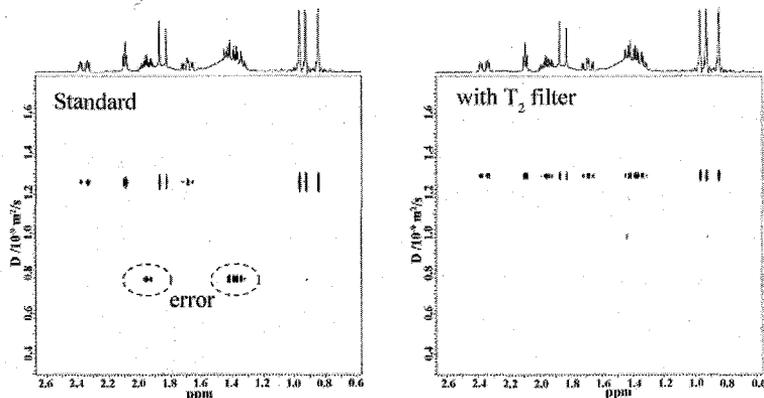


Fig. 2  $^1\text{H}$ -DOSY spectra of mixture

【考察】 $T_2$  フィルターを用いることにより、高分子由来のピークと重なっている低分子由来のピークでも正しい拡散係数値として求められることが分かった。これにより、ポリマー試料における添加剤などの解析に対しても、DOSY 法が有効に適用できると思われる。

P004

DIORITE 法による高分子量蛋白質の分子形態変化解析  
- 試料調製技術の最適化

(<sup>1</sup>広島大院・理・数理分子、<sup>2</sup>三菱化学生命研、<sup>3</sup>PRESTO/JST)

○今田愛子<sup>1</sup>、古川貴章<sup>1</sup>、田中利好<sup>2</sup>、河野俊之<sup>2</sup>、楯 真一<sup>1,3</sup>

DIORITE analysis of the molecular shape of proteins - optimization  
of the aligning media for large proteins

○Aiko Imada<sup>1</sup>, Takaaki Furukawa<sup>1</sup>, Rikou Tanaka<sup>2</sup>, Toshiyuki Kohno<sup>2</sup>, and Shin-ichi Tate<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima Univ.,

<sup>2</sup>Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, <sup>3</sup>PRESTO/JST

**Abstract**

DIORITE (Determination of Induced ORientation by Trosy Experiments) is our newly devised approach for determining the protein molecular shape. In this approach, the orientation dependent TROSY shift changes are used for determining the molecular alignment tensor of the protein in a weakly aligned state, thus the approach can be applied to the proteins with large molecular weights. As a prerequisite for the application of the DIORITE, the protein has to be aligned against the static field in an appropriate extent. In this presentation, we are going to report the optimization of protein aligning media made of acrylamide and bis-acrylamide, which is useful for analysis of the protein around 40kDa.

**【緒言】**

我々は、弱い磁場配向状態におかれた蛋白質で観測される TROSY シグナル変化のみから分子配向テンソルを決定し、溶液中の蛋白質の分子形態を決定することが可能な新しい解析技術 (DIORITE 法) を開発した。我々の研究室では、この方法を高分子量蛋白質に対して利用可能な一般的方法とするために、試料の性質に依存せずに安定に磁場配向を実現できるアクリルアミドゲルを用いた配向試料調製技術の検討を進めている。本研究では、分子量約 40kDa の蛋白質である Maltose Binding Protein (MBP) を対象とし、アクリルアミドゲルによる配向を用いて、DIORITE 法による立体構造解析を行う。

**Keywords :** 異方性スピン相互作用、分子配向、重水素標識、TROSY

いまだあいこ、ふるかわたかあき、たなかりこう、こうのとしゆき、たてしんいち

### 【実験】

適切な比率で調製した 30% (w/v) アクリルアミド (+アクリル酸) /ビスアクリルアミド溶液に対し、TEMED、APS を加え、磁場配向を誘導しない非圧縮状態の化学シフト基準用ゲル、円形、楕円形アクリルアミドゲルから作製した圧縮ゲルを作製した。アクリルアミドゲルに対しサンプル溶液を浸潤させ、圧縮ゲル中で観測された TROSY シフト変化量を計測した。アクリルアミドとビスアクリルアミドの比率によるゲルの網目密度の調節、アクリル酸添加によるゲル中への負電荷のドーピング効果、およびゲルの膨張効果に着目しアクリルアミドゲルの成分を変化させ MBP に最適な配向条件を探索した。

### 【結果】

アクリルアミドとビスアクリルアミドの比率が 75:1、100:1、125:1、150:1 さらに 2.5% (w/v) アクリル酸を加えた 150:1 のゲルを用いて測定を行った。このうち最もビスアクリルアミドの割合の高い 75:1 のゲルでは、蛋白質分子の回転運動に対する制約が強すぎてシグナルの観測ができなかった (Fig.1)。分子量 20kDa 程度の蛋白質では同様の条件で、異方性スピン相互作用によるシグナル変化を観測できたことを考えると、網目の大きさは高分子量蛋白質の配向の最適化に重要なファクターであると分かった。そこで、ビスアクリルアミドの割合を変化させることで磁場配向の強さを調整し、最適な条件を検討した。Fig.2 にその結果の 1 例を示す。ビスアクリルアミドの割合が低くなるにつれ、S/N が良くなっており、分子配向により誘導される TROSY シグナルの変化がはっきり確認できる。分子量 40kDa の MBP には 150:1 という条件が最適であることが分かった。現在はこの条件で観測された TROSY シフト変化を用いて DIORITE 解析を進めている。

75:1(aa/bis)

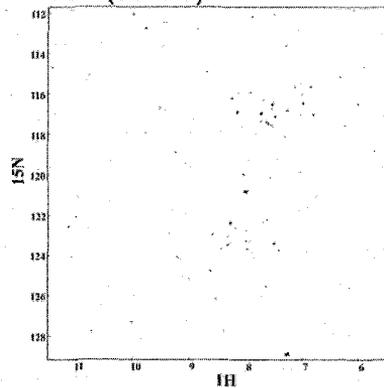


Fig.1 TROSY spectrum for 75:1 (aa/bis) gel

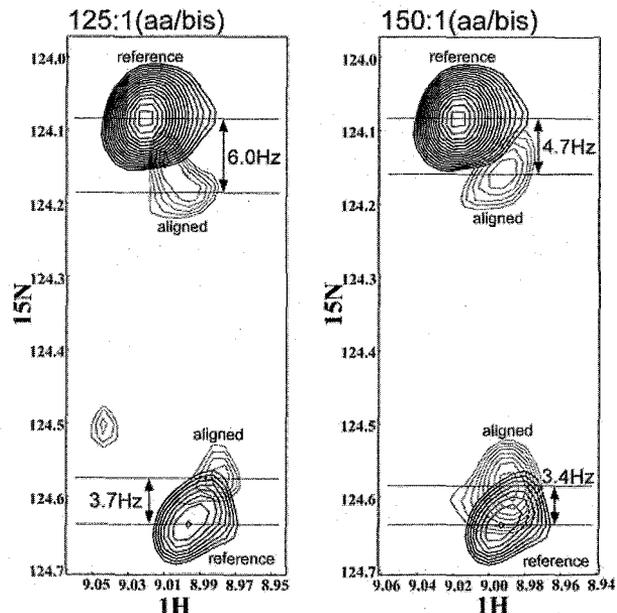


Fig.2 TROSY spectra for 125:1 (aa/bis) gel and 150:1(aa/bis) gel

### 3重共鳴 4次元 NMR 測定への非線形サンプリングの応用

(<sup>1</sup>首都大学東京(東京都立大), <sup>2</sup>CREST/JST, <sup>3</sup>University of Cambridge, <sup>4</sup>ブルカーバイオスピン, )

○重光 佳基<sup>1,2</sup>, 土江 祐介<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>3</sup>, Markus Wälchli<sup>4</sup>,  
伊藤 隆<sup>1,2</sup>

#### Applications of nonlinear sampling scheme for four dimensional triple resonance NMR spectroscopy.

Yoshiki Shigemitsu<sup>1,2</sup>, Yuusuke Tsuchie<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>3</sup>, Markus Wälchli<sup>4</sup>  
and Yutaka Ito<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; <sup>2</sup>CREST, JST; <sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK; <sup>4</sup>Bruker Biospin)

Despite its potential advantages in analysis, long duration of measurement and limited digital resolution in indirectly observed dimensions prevent 4D NMR experiments from being used in protein NMR projects routinely. In this presentation, we demonstrate the benefits of the nonlinear sampling scheme and 3D maximum entropy processing in 4D triple-resonance experiments. In the case of 4D HCC(CO)NH experiments on smaller proteins, we succeeded in measuring spectra of equivalent quality with approximately 1/5 duration, when compared with employing a conventional sampling scheme. In the case of 4D HNCOCA experiments on larger proteins, 4D spectra with much higher resolution were obtained by extending the acquisition time for indirectly observed dimension in combination with nonlinear sampling scheme.

#### 【序】

3重共鳴 4次元 NMR 法は、曖昧さの少ない解析が可能であるなどの長所が知られていたにも関わらず、測定時間が長時間に及ぶこと、さらに新しい関節観測軸を導入することによる感度低下、間接観測軸のデータポイントの不足によるスペクトルの分解能の問題などから、通常の蛋白質の解析にはこれまで多用されてこなかった。今回われわれは、最近注目されてきている迅速に異種核多次元 NMR スペクトルを測定できる手法の一つである非線形サンプリング法 (nonlinear sampling) と 3次元最大エントロピー法 (3D MaxEnt) によるデータ処理法を、HNCOCA や HCC(CO)NH などの 3重共鳴 4次元 NMR 測定に適用することを試み、良好な結果を得たので報告する。

#### 4D NMR, 3重共鳴 NMR, 非線形サンプリング, 最大エントロピー法

しげみつ よしき, つちえ ゆうすけ, だにえる にーとりすぱっは, まるくす うえるひり,  
いとう ゆたか

## 【測定・結果】

測定には、数種類の均一に  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識された 100 残基の蛋白質と、均一に  $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識された大腸菌 Ni 結合蛋白質 Nika (502 アミノ酸残基, 56kDa) とサルモネラ Oppa (517 アミノ酸残基, 59kDa) を試料用いた。

4D HCC(CO)NH 測定は、低分子量試料を用い、①従来法 [ $512^* (^{1}\text{H}^{\text{N}}) \times 32^* (^{1}\text{H}) \times 16^* (^{13}\text{C}) \times 12^* (^{15}\text{N})$ ] と、②nonlinear sampling [ $512^* (^{1}\text{H}^{\text{N}}) \times 16^* (^{1}\text{H}) \times 10^* (^{13}\text{C}) \times 8^* (^{15}\text{N})$ ] でそれぞれ行った。

4D TROSY-HNCOCA の測定は、高分子量試料を用い、①従来法 [ $512^* (^{1}\text{H}^{\text{N}}) \times 16^* (^{15}\text{N}) \times 16^* (^{13}\text{C}) \times 8^* (^{13}\text{CO})$ ]、②nonlinear sampling で測定時間を短縮したもの [ $512^* (^{1}\text{H}^{\text{N}}) \times 2048 \text{ random sampling points}$ ]、③nonlinear sampling で測定時間を短縮したもの [ $512^* (^{1}\text{H}^{\text{N}}) \times 12288 \text{ random sampling points}$ ] の 3 種を行った。

Figure 1 には 4D HNCOCA の例を示した。Figure 1b, 1c, 1d は、それぞれ上記 HNCOCA 測定のうち、①、②、③のデータについて 3D MaxEnt 法で処理したものである。Figure 1a に示した TROSY-HSQC 上のクロスピークに注目し、この  $^1\text{H}^{\text{N}}$ ,  $^{15}\text{N}$  の化学シフトに相当する 2D  $^{13}\text{C}^{\alpha}-^{13}\text{CO}$  平面を切り出している。

Figure 1c では、データポイントが Figure 1b の 1/8 にまで削減されているにもかかわらず、同様のスペクトルが得られている。また Figure 1d では Figure 1b とほぼ同様のデータサイズであるにもかかわらず、分解能が飛躍的に向上していた。この結果から、nonlinear sampling を用いることで、従来法より短時間で従来法と同等あるいはそれ以上の高分解能 4D スペクトルを得ることが可能になることが示された。

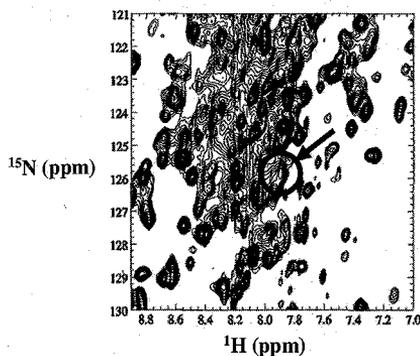


Figure 1a :  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  TROSY-HSQC spectrum of  $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled Nika.

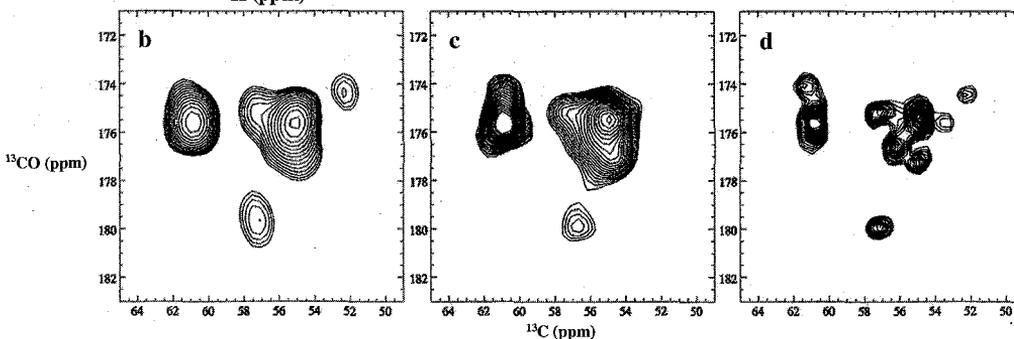


Figure 1b, 1c, 1d : Contour plots of the  $^{13}\text{C}_{\alpha}/^{13}\text{CO}$  planes ( $^1\text{H}$  chemical shift ; 7.899 ppm,  $^{15}\text{N}$  chemical shift ; 125.84 ppm ) from 4D HNCOCA spectra measured on 59kDa u- $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Nika.

外部変動磁場  $B_1$  の不均一性を利用した、水溶液の  $^1\text{H}$ -1次元 NMR 測定における簡便かつ有効な溶媒信号消去

日本電子(株)、根本暢明○

Easy and Effective Water Suppression in  $^1\text{H}$  - One Dimensional Solution NMR Measurements of by Means of  $B_1$  Inhomogeneity.

Nobuaki NEMOTO, JEOL Ltd.

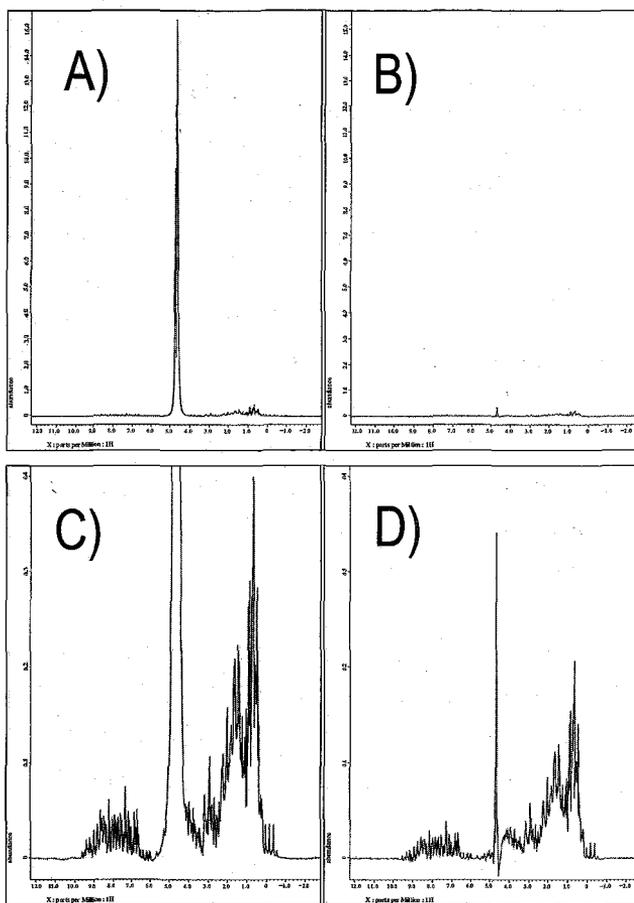
In general, the huge water signal must be eliminated upon the  $^1\text{H}$ -one dimensional solution NMR measurements of aqueous solution. In a solution NMR system including a cryogenically coldprobe, water suppression is very difficult, due to the difficulty of shimming, the radiation dumping of the water signal, to the temperature gradient and so on. I show an easy and effective water suppression by means of  $B_1$  inhomogeneity. The 90 and 180 degree pulse widths used for FLIPSY (FLIP angle adjustable one-dimensional noeSY) was derived from not a nutation experiment, but from an experiment combined with nutation and  $B_1$ -map measurement. Here, even though the shimming is much far from the perfect setting, a reasonably good water-suppressed spectrum is easily obtained with a short setting time.

一般に、水溶液の  $^1\text{H}$ -1次元 NMR 測定を行う際、溶媒である水の巨大な  $^1\text{H}$  信号を消去する必要がある。ところが、極低温プローブを含む溶液 NMR のシステムにおいては、分解能調整の難しさや、ラディエーション・ダンピング、試料管内部の温度勾配等の原因により、水の溶媒信号を綺麗に消去することが必ずしも容易ではない。今回、プローブの持つ外部変動磁場  $B_1$  の不均一性を利用した溶媒信号消去において比較的良好的結果を得ることができたので報告する。

FLIPSY (FLIP angle adjustable one-dimensional noeSY) 実験において使用する  $90^\circ$  パルス長を、通常の nutation 実験からではなく、nutation 実験と  $B_1$ -map 測定用の実験を組み合わせた実験から得た。この方法により、最も  $B_1$  強度の強い、コイル中央部分における  $90^\circ$  パルス長を得て、それを測定に使用した。ある程度多くの積算回数(試した範囲では、8回以上の積算が望ましい)が必要で、感度とのトレードオフが存在する、といった欠点はあるものの、分解能調整が必ずしも完璧でない状況下であっても、比較的短い設定時間で、平易に、かつ綺麗に溶媒信号を消去することができた。討論会では、詳細について述べる。

キーワード: 溶媒消去、FLIPSY、 $B_1$ -inhomogeneity

ねもとのぶあき○



**Figure 1.** Water suppressed one dimensional  $^1\text{H}$ -NMR spectra of 0.9 mM  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  chlorella ubiquitin dissolved in 90%  $\text{H}_2\text{O}$  / 10%  $\text{D}_2\text{O}$ .  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  are not decoupled. All these spectra are measured on a JEOL's ECA-600 spectrometer equipped with a 5 mm  $\phi$   $^1\text{H} - \{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$  triple resonance coldprobe with a Z - single axis field gradient coil. Total number of scans for each spectrum is 32. In A) and C), spectra water-suppressed by a conventional long - weak pulse ( $\text{pw}_{90} = 5.8 \mu\text{s}$ ) are shown, whereas in B) and D), spectra measured with FLIPSY pulse-sequence with the 90 degree pulse width ( $\text{pw}_{90} = 4.1 \mu\text{s}$ ) derived from an experiment combined with nutation and  $B_1$ -map measurement are shown. C) and D) are close-up of A) and B), respectively.

【文献】

Neuhaus, D., et al., *J. Magn. Reson.*, **118**, 256-263 (1996); Tate, S. and Inagaki, F., *J. Magn. Reson.*, **96**, 635-643 (1992); Cory, D.G. and Ritchey, W. M., *J. Magn. Reson.*, **80**, 128-132 (1988);

(日本電子<sup>1</sup>、わかもと製薬<sup>2</sup>) ○高橋豊<sup>1</sup>、櫻井智司<sup>1</sup>、森園大輔<sup>2</sup>、内海博明<sup>1</sup>

### Development of a Simplified Sample Injection System by DI-MICCS-NMR

(JEOL<sup>1</sup>, Wakamoto Pharm<sup>2</sup>) Y. Takahashi<sup>1</sup>, S. Sakurai<sup>1</sup>, D. Morizono<sup>2</sup>, H. Utsumi<sup>1</sup>

**Abstract:** We have reported the development of a micro device “MICCS (Micro Channeled Cell for Synthesis monitoring)” for NMR, and its application for synthesis monitoring “MICCS-NMR”. Herein we report the new method “DI-MICCS-NMR (Direct Injection-MICCS-NMR)”, which is simple flow-measurements using MICCS technology. The system of DI-MICCS-NMR was constructed with MICCS, a manual injector, a LC pump and an NMR instrument. MICCS, a manual injector and a LC pump were coupled with fused-silica capillary tubings. The sample is introduced as a segment by the manual injection with the carrier solvent (e.g. Water) by the LC pump. And then, the sample is measured while it through the detection part of MICCS.

【はじめに】通常、NMRを用いた測定においては、NMR-Lockのために試料を重水素化溶媒に溶解する。重水素化溶媒は、通常の溶媒よりも遥かに高価で、種類にも依るが1検体当たり数万円以上のコストがかかることがある。NMR分析における重水素化溶媒のランニングコストの高さは、NMRが抱える重要問題の一つであると考えられる。

最近我々は、NMRマグネット内のin-situ化学反応の様子をリアルタイムで観測するためのマイクロデバイス“MICCS”を開発したり、MICCSを用いたNMR分析法“MICCS-NMR”の利点を以下に挙げる。

1. 外部Lock溶媒の方式を用いるため、試料を重水素化溶媒に溶解する必要がない
  2. ガラスや外部重水素化溶媒の磁化率に対して溶媒の磁化率の影響が小さいため、溶媒を変えた時分解能の変化が殆ど起こらない
  3. MICCSをマグネットに導入した状態で、外部から容易に試料を導入できる
- これらの利点を生かし、MICCS-NMRを簡易測定に応用できると考えた。Direct Injection (DI)-MICCS-NMRと名付けた本手法について、若干の測定データと共に報告する。

【実験】核磁気共鳴装置には、日本電子製JNM-ECA600を用いた。MICCSは、パイレックスガラスを基板材料として、マイクロ化学技研に作製を依頼した。MICCS

キーワード：MICCS、MICCS-NMR、簡易測定、フローNMR

たかはしゆたか、さくらいさとし、もりぞのだいすけ、うつみひろあき

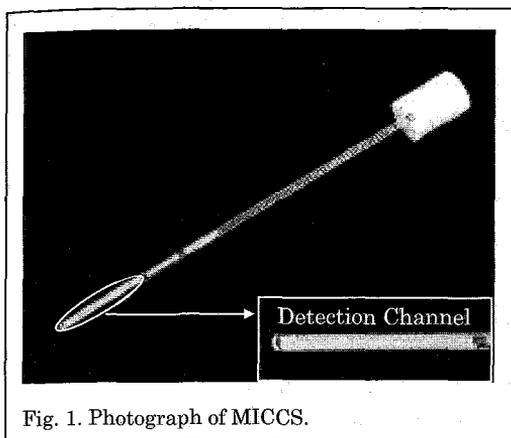


Fig. 1. Photograph of MICCS.

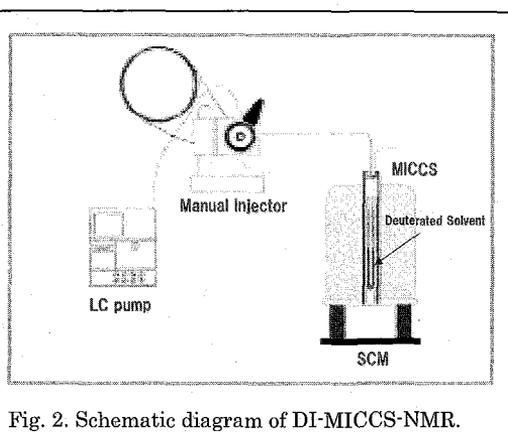


Fig. 2. Schematic diagram of DI-MICCS-NMR.

の写真を Fig. 1 に、DI-MICCS-NMR 装置の概略を Fig. 2 に示す。MICCS 内のチャンネル寸法は、幅 300  $\mu\text{m}$ 、深さ 100  $\mu\text{m}$  とした。MICCS の検出部領域は、約 40 mm の長さで折り返し構造を有しており、その容量は約 7.2  $\mu\text{L}$  である。MICCS は、重水素化溶媒を注入した標準的な 5 mm $\phi$  の NMR 試料管に挿入・ホルダに固定した後、キャピラリチューブを用いて LC 用高圧ポンプ、LC 用マニュアルインジェクタと接続した状態で、標準の 5 mm  $\phi$  プローブに導入した。クロロホルムを LC ポンプから 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  流量で送液しながら、様々な溶媒（ベンゼン、クロロホルム、DMF、DMSO、ヘキサン、メタノール、THF、トルエンなど）に溶解した試料 100  $\mu\text{L}$  を、マニュアルインジェクタから連続的に注入し、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定した。

【結果と考察】結果として、溶媒の種類によって試料のシグナルが安定して観測される時間が異なり、スペクトルのシフトが起こることが確認された。そこで、各溶媒の磁化率を確認したところ、ポンプから送液している溶媒と試料溶媒との磁化率の差が影響していることが分かった。また、送液溶媒と磁化率の差の小さい溶媒を用いた場合には、それぞれのスペクトルの分解能は、試料注入毎のシム調整を行っていないにも関わらず、何れも高い水準を保っていることが確認できた。本法は、簡便且つ経済的な NMR 測定手法として応用できる可能性が示唆された。

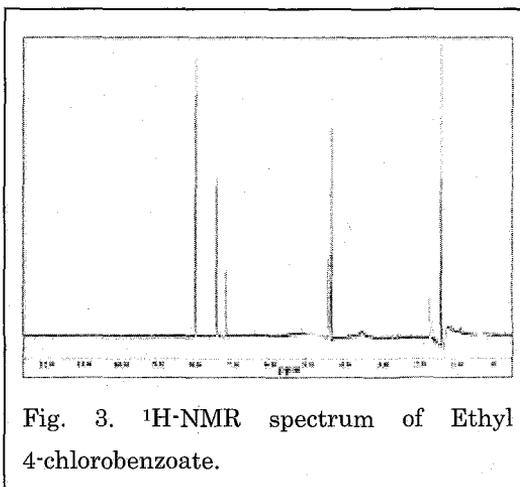


Fig. 3.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of Ethyl 4-chlorobenzoate.

【文献】

- 1) Y. Takahashi, M. Nakakoshi, S. Sakurai, Y. Akiyama, H. Suematsu, H. Utsumi and T. Kitamori., *Anal. Sci.*, 23, 395-400 (2007).

【謝辞】試料ご提供、測定ご協力頂きました、東京化成工業株式会社の加藤康彦博士、兎澤透博士に深謝いたします。

## GB1タグと無細胞タンパク質合成系を利用した立体構造解析 の迅速化

(北大院薬) ○小椋賢治, 斉尾智英, 安達聡一郎, 小橋川敬博,  
久米田博之, 稲垣冬彦

*Highly efficient structural analysis using GB1-tag and cell-free protein expression*  
*Kenji Ogura, Tomohide Saio, Soichiro Adachi, Yoshihiro Kobashigawa, Hiroyuki*  
*Kumeta, and Fuyuhiko Inagaki*  
*School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan*

We constructed new DNA fragment system for preparation of linear expression templates for cell-free protein expression. The DNA fragments was designed to express a target protein fused with highly soluble small GB1 protein. As a test, the linear expression template of p40<sup>phox</sup>SH3 domain was prepared with the system by overlap extension PCR. Isotope labeled GB1-fused p40<sup>phox</sup>SH3 synthesized by the template and cell-free system showed well dispersed HSQC spectrum and isolation of two structural domains. This expression system is suggested to be efficient in high throughput sample preparation for structural determination.

### 【序論】

セルフリータンパク質合成系は、PCRにより作成された直鎖DNAを転写テンプレートとして使用できることから、大腸菌等の生細胞によるタンパク質発現系に対して、発現タンパク質を高速にスクリーニングできる利点がある。そのため、立体構造研究において効率的な試料調製法として広く利用されている。今回、われわれは、低分子量かつ高可溶性ドメインとして知られているGB1ドメインを目的タンパク質と融合発現させるための直鎖DNAテンプレート作成システムを構築し、本システムにより実際にタンパク質合成をおこない、フォーリング評価および立体構造解析を迅速化する手法を確立することを目的とした。

### 【実験】

#### 1. GB1融合タンパク質発現のための直鎖DNAテンプレート作成システムの構築

はじめに、GB1遺伝子(56アミノ酸)をpIVEX 2.3d vector(ロシュ)に組み込み、C末端にHistagを付加したGB1発現ベクター(pIVEX-GB1)を作成した。このpIVEX-GB1ベクターを用いてセルフリータンパク質合成をおこない、実際にGB1タンパク質が合成されることを確認した。つぎに、pIVEX-GB1ベクターから、Overlap extension PCR反応のためのDNA断片を得るため、pIVEX-GB1ベクターのT7-promotor+GB1領域(以下T7P-GB1と表記)とHistag+T7-terminator領域(以下HT-T7Tと表記)をPCRにより増幅した。これらのPCR断片を精製し、GB1融合タンパク質発現のための直鎖DNAテンプレート作成のためのT7P-GB1およびHT-T7T DNA断片を作成した。

#### 2. タンパク質発現用直鎖DNAテンプレートの作成

おぐらけんじ さいおともひで あだちそういちろう こばしがわよしひろ

くめたひろゆき いながきふゆひこ

試料調製 無細胞タンパク質合成 立体構造解析

今回構築したDNA断片によりタンパク質が合成できるか確認するため、モデルタンパク質として、立体構造既知のp40<sup>phox</sup>SH3ドメイン（66アミノ酸）遺伝子の5'側および3'側に、それぞれT7P-GB1断片およびHT-T7T断片をOverlap extension PCR法により付加し、GB1-p40<sup>phox</sup>SH3融合タンパク質合成用直鎖DNAテンプレートを作成した。

### 3. Small scaleセルフリータンパク質合成

作成したGB1-p40<sup>phox</sup>SH3融合タンパク質発現用直鎖DNA断片を内液50 $\mu$ Lの透析法セルフリー合成容器にて37 $^{\circ}$ C、12時間震盪し、タンパク質合成反応をおこなった。SDS-PAGEにより、目的タンパク質が可溶性画分に発現することを確認した。

### 4. Semi-large およびlarge scaleセルフリータンパク質合成

GB1-p40<sup>phox</sup>SH3融合タンパク質発現用直鎖DNA断片を用いて、カセット型透析容器（ピアス）にて、<sup>15</sup>Nまたは<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>Nラベルアミノ酸を使用して、内液2mL（semi-large scale）または内液5mL（large scale）のセルフリー合成反応をおこなった。Semi-large scale反応では、合成完了後の反応液をNMR測定バッファーに対して透析し、粗精製NMR測定試料とした。また、large scale反応では、反応液をHisTrapカラムによるアフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製NMR測定試料とした。

### 5. 粗精製試料のNMR測定によるフォールディングの評価

Semi-large scale反応にて得られた粗精製GB1-p40<sup>phox</sup>SH3 NMR試料を用いて測定した<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルから、(1) 最終精製を経ずとも粗精製の段階で、フォールディング評価に十分な高分解能NMRスペクトルを測定できること、(2) GB1タグが小分子のため、目的タンパク質由来シグナルとオーバーラップが少なく、スペクトル評価の障害とならないこと、が確認できた。したがって、PCR反応からNMR測定まで24時間以内で目的タンパク質のフォールディング評価が可能であることが示された。また、目的タンパク質由来シグナルとGB1由来シグナルの線幅を比較することにより、目的タンパク質の会合状態の評価が容易であることが本発現システムの利点である。

### 6. 最終精製試料による立体構造解析

Large scale反応にて得られた最終精製GB1-p40<sup>phox</sup>SH3 NMR試料にて、各種三次元NMR測定をおこない、<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N原子帰属のち、NOESY由来距離制限に基づいてCyanalにより立体構造決定をおこなった。GB1とp40<sup>phox</sup>SH3が独立した立体構造が得られ、GB1が目的タンパク質の立体構造に影響を与えないことが確認された。

【結論】GB1融合タンパク質セルフリー合成のための直鎖DNAテンプレート作成システムを構築した。このシステムを用いて、実際にGB1融合タンパク質がセルフリー合成できることを確認した。セルフリー系により調製された同位体ラベルGB1融合タンパク質のNMRスペクトルを測定し、GB1タグが付加した状態で立体構造形成を評価できること、およびGB1タグが目的タンパク質の立体構造に影響を与えないこと、を確認した。本発現システムにより、従来大腸菌発現系では1週間程度を要していたNMR立体構造評価が、1-2日程度で可能であることが示された。さらに、目的タンパク質がGB1融合タンパク質として調製されることから、会合状態の評価が容易であること、さらに、可溶性の向上効果が期待できるために難溶性タンパク質の立体構造解析に有用であると考えられる。

タグ分子を利用した  
ペプチド発現系における融合タンパク質の解析  
(<sup>1</sup>北大院・理、<sup>2</sup>北大院・生命)

○梅津喜崇<sup>1</sup>、相沢智康<sup>1</sup>、島本怜史<sup>1</sup>、上島達朗<sup>2</sup>、  
多々見文恵<sup>1</sup>、神谷昌克<sup>2</sup>、出村誠<sup>2</sup>、河野敬一<sup>1</sup>

**Structural analysis of fusion protein in *E. coli* expression systems**

Yoshitaka Umetsu<sup>1</sup>, Tomoyasu Aizawa<sup>1</sup>, Satoshi Shimamoto<sup>1</sup>, Tatsuro Kamijima<sup>2</sup>,

Fumie Tatami<sup>1</sup>, Masakatsu Kamiya<sup>2</sup>, Makoto Demura<sup>2</sup>, Keiichi Kawano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. of Sci., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. of Life Sci., Hokkaido Univ.

Expression of a useful peptide, like an antimicrobial peptide, in bacteria may be cytotoxic to the host or subjected to degradation by host-derived peptidases. To overcome these potential problems, expression strategies have been developed by the fusion of useful peptides with partner proteins. Fusion proteins often invalidate the toxicity to the host bacteria. To reveal the influence of the partner protein on useful peptide in *E. coli* expression system, we performed structural experiments and interactive analysis of the fusion proteins by NMR spectroscopy.

【諸言】大腸菌・酵母などを用いたペプチド・タンパク質の大量生産技術は、バイオ分野において欠かすことが出来ない技術となっている。しかしながら、生産を目的とするペプチド・タンパク質自身の安定性や毒性が生産の成否に大きく関係するため、様々な研究・開発におけるハードルとなっている。例えば、有用な抗菌ペプチドの生産は、微生物自身に悪影響を及ぼすため困難を伴う。そのため、このようなペプチド生産においては、「タグ分子(キャリアタンパク質)」を末端に付加した融合タンパク質として発現することでターゲットペプチドを分解から保護し、生産したペプチドが微生物に悪影響を及ぼさないように不活性化することが一般的である。しかし、現在用いられているタグ分子の多くが天然由来の配列であることから、必ずしも十分な不活性化や保護が期待できるわけではない。このような欠点を可能な限り回避し、目的とするペプチドを大量に生産することのできる新規タグ分子のデザイン・開発が様々な分野での応用利用に必要不可欠である。

そこで本研究では、人工的なタグ分子のデザイン・開発に向けた基礎研究として、タグ分子として広く用いられている *E. coli* 由来の Thioredoxin (Trx) と有用ペプチドとの融合タンパク質を作成し、立体構造や相互作用が生産の成否にどのように関わっているのかを NMR を用いて検討した。

【キーワード】 融合タンパク質、タグ分子、大腸菌、ペプチド

うめつよしたか、あいざわともやす、しまもとさとし、かみじまたつろう、たたみふみえ、かみやまさかつ、でむらまこと、かわのけいいち

【実験】 本実験では、有用ペプチドのモデルとして昆虫由来成長阻害因子 (Growth blocking peptide, GBP)、カプトガニ由来抗菌ペプチド (Tachyplesin, TP) を用いた。N 末端側に Trx、C 末端側にペプチド、両者をつなぐリンカー部分に His-Tag およびプロテアーゼ切断部位 (DDDDK) をもった融合タンパク質として大腸菌で発現させた (Fig.1)。それぞれの融合タンパク質は逆相 HPLC などを用いて精製を行った。また、それぞれのペプチドは、融合タンパク質をプロテアーゼで処理し、逆相 HPLC を用いて精製した。NMR 測定は、Bruker 社の DRX500 を用いて多核多次元測定を行ない、融合タンパク質の立体構造に関する情報を得た。

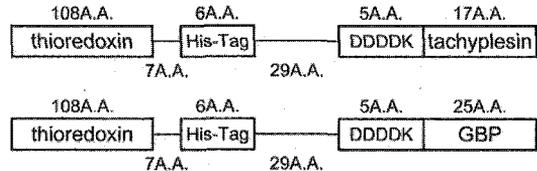


Fig. 1. Constructions of fusion proteins

【結果・考察】 大腸菌内で発現している融合タンパク質の量は、Trx-GBP、Trx-TPで顕著な差がみられなかったにもかかわらず、最終的に得られたTPの収量はGBPの収量と比較して約1/6程度であった。そこで得られた<sup>15</sup>Nラベル化サンプルを用いて融合タンパク質の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCを測定した。融合タンパク質における大部分のTrx由来のピークは、Trx単独での化学シフトとほぼ一致したため、Trx-GBP、Trx-TPのTrx部分はTrx単独の時とほぼ同一の立体構造を保持していることが明らかになった。また、Trx-GBPではGBP単独時と同様のピークも観測された。このことからTrx-GBPでは両者の間に相互作用はなく、間をつなぐリンカー部分が比較的高い運動性をもっていることが推測できる。一方、Trx-TPではTP単独時と同様のピークは観測されず、Trx由来の一部の残基ではピーク強度の減少や、わずかな化学シフト変化が観測された (Fig.2)。未融合状態のTrxにTPをtitrationした場合にも同様の化学シフト変化がみられることから、TPはTrxと直接相互作用しているものと考えられる。融合タンパク質の状態ではTPが抗菌活性をほとんど示さないことから、両者の間の相互作用はTPの抗菌活性を不活性化させるために非常に有効であると考えられる。しかしながら、プロテアーゼ処理過程において、Trx-TPはTrx-GBPに比べてタグ分子の切断効率が悪いことから、両者の相互作用が不活性化だけではなくプロテアーゼによる切断にも影響を与えている可能性が示唆された。このことから、タグ分子を高効率で切断するためには、TPとの相互作用を保持したまま、プロテアーゼによる切断が可能なTrx、リンカー部分のデザインが必要であると考えられる。

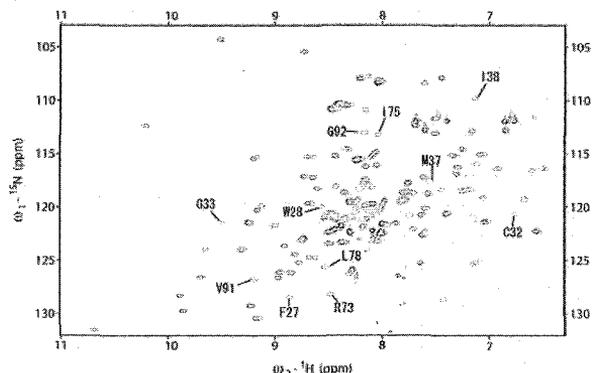


Fig. 2. Overlay of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra of Trx-TP and Trx. Labeled peaks represents the remarkably weakened peaks of Trx-TP compared to those of Trx.

【謝辞】 本研究の一部は、新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業の補助を受けて行われた。

## 構造基盤解析に向けたミトコンドリアTom20-プレ配列ペプチド複合体の安定化

○ 齊藤貴士<sup>1,2</sup>, 井倉真由美<sup>1</sup>, 尾瀬農之<sup>1</sup>, 帯田孝之<sup>1</sup>, 小島理恵子<sup>1</sup>, 前仲勝実<sup>1</sup>, 神田大輔<sup>1</sup>

<sup>1</sup>九大・生医研

<sup>2</sup>九大・デジタルメディスン・イニシアティブ

### Stabilization of Mitochondrial Tom20-Presequence Peptide Complex for the Structural Basis of Presequence Recognition

○ Takashi Saitoh<sup>1,2</sup>, Mayumi Igura<sup>1</sup>, Toyoyuki Ose<sup>1</sup>, Takayuki Obita<sup>1</sup>, Rieko Kojima<sup>1</sup>, Katsumi Maenaka<sup>1</sup>, and Daisuke Kohda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

<sup>2</sup> Digital Medicine Initiative, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol as precursor proteins with a cleavable N-terminal presequences, and are imported into mitochondria. One of the subunits, Tom20, functions as a general protein import receptor by recognizing the presequences of proteins. It is difficult to obtain the structural information using NMR spectroscopy and X-ray crystallography due to the weak affinity of Tom20 to presequence peptides. In this presentation, we introduce two techniques for the stabilization of the Tom20-presequence peptide complex by (1) an intermolecular disulfide bond between Tom20 and presequence peptide, and (2) an intramolecular disulfide bond to configure a helical conformation by inserting a D-type cysteine in the peptide.

ミトコンドリアには独自のゲノムDNAが含まれているが、このミトコンドリアゲノムにコードされているタンパク質はごく少数であり、ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は核のゲノムDNAにコードされている。これらのミトコンドリアタンパク質は細胞質にあるリボソームでプレ配列が付加された前駆体蛋白質として合成された後、ミトコンドリアの外膜及び内膜に存在する膜透過装置（タンパク質からなる超分子複合体でそれぞれTom及びTim複合体と呼ばれる）によってミトコンドリア・マトリクスへと輸送される（Fig. 1）。このうちプレ配列を最初に認識する受容体がTom20である。プレ配列

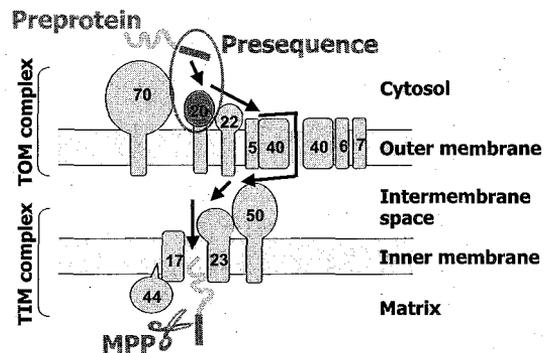


Fig. 1 Diagram of mitochondrial protein transport

Relaxation analysis, Disulfide bond, D-type cysteine, Tom20, Presequence

さいとうたかし、いぐらまゆみ、おせとよゆき、おびたたかゆき、こじまりえこ、まえなかつみ、こうだだいすけ



共発現を利用した  
不溶性顆粒の新規大量発現量法  
(北大院・理<sup>1</sup>、北大院・生命<sup>2</sup>、農業生物資源研<sup>3</sup>)  
○北條江里<sup>1</sup>、相沢智康<sup>1,2</sup>、神谷昌克<sup>1,2</sup>、  
宮沢光博<sup>3</sup>、加藤祐輔<sup>3</sup>、出村誠<sup>1,2</sup>、河野敬一<sup>1,2</sup>

**A novel expression system for high-level recombinant protein production in *E. coli***

<sup>1</sup>Grad. Sch. of Sci., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. of Life Sci., Hokkaido Univ.

<sup>3</sup>Dept. of Dev. Biol., Natl. Inst. of Agrobiol. Sci.

Eri Hojo<sup>1</sup>, Tomoyasu Aizawa<sup>1,2</sup>, Masakatsu Kamiya<sup>1,2</sup>, Mitsuhiro Miyazawa<sup>3</sup>,

Yusuke Kato<sup>3</sup>, Makoto Demura<sup>1,2</sup>, Keiichi Kawano<sup>1</sup>

We present a novel method to facilitate the expression level in *E. coli* of recombinant protein that is difficult to express in conventional production system. We demonstrated that coexpression of the aggregation-prone protein remarkably enhanced the expression of target protein as insoluble form. It seems that over-expression of the partner protein protects target protein from proteolytic degradation by forming insoluble inclusion bodies and accounts for the higher observed yields. Importantly, it is possible to isolate target protein from partner protein by simple affinity chromatography, and never requires chemical or enzymatic cleavage of fusion protein. This advantage makes our new method more effective and cost-efficient, expandable to large-scale production.

【序論】

蛋白質の機能や構造を NMR を用いて解析するには、目的蛋白質を大量に調製する必要がある。解析に必要な安定同位体ラベル化試料の安価な大量調製法として大腸菌による発現系は未だ魅力的な発現系である。しかし、発現の有無及び発現量の多少はターゲットにより大きく左右され、予想や制御をすることは難しい。例えば、抗菌ペプチドの発現では、毒性や分解の回避のために不溶性顆粒での発現がよく選択されるが、その際、不溶性顆粒の形成を制御することは容易ではない。この問題を解決するために、我々は目的蛋白質を封入体として安定かつ大量に発現させる新規の大腸菌発現法を開発した。この手法によって効率良い安定同位体ラベル試料の調整に成功し、現在 NMR による解析を進めている例について報告する。

<キーワード> 大腸菌、共発現、封入体

ほうじょう えり、あいざわ ともやす、かみや まさかつ、みやざわ みつひろ、  
かとう ゆうすけ、でむら まこと、かわの けいいち

### 【実験】

線虫 *C.elegans* 由来抗菌ペプチド ABF-2 (antibacterial factor-2, Mw. = 6999)を、HLA (Human  $\alpha$ -lactalbumin, Mw. = 14031)との共発現により封入体として大腸菌 (BL21) 内で発現させた。回収した封入体は尿素を用いた可溶化の後、イオン交換クロマトグラフィによって共発現蛋白質および夾雑物を分離し、透析による巻き戻しを行った。ABF-2は4本のジスルフィド結合を有するため、巻き戻しが完了したサンプルを逆相HPLCにより精製し、正しいジスルフィド結合を持った天然状態のABF-2を得た。

### 【結果・考察】

目的蛋白質 ABF-2 は、従来の単独発現系ではほとんど発現が認められなかったが、HLAとの共発現を行うことで、封入体としての発現が確認された。HLAは単独で発現させた際、強力で封入体を形成することが知られている分子であり、その効果でABF-2もまた封入体となり、毒性や分解といった従来の単独発現系での問題を回避したと考えられる。さらにABF-2とHLAは互いに逆の等電点を有した蛋白質であり、それが封入体形成をさらに促進する要因となることも明らかになった。また、目的蛋白質と共発現蛋白質の等電点が大きく異なることは、精製段階においても有利な効果をもたらした。通常、融合タンパク質として目的蛋白質を発現させた場合、酵素を用いた切断処理を行う必要があるが、この操作は誤切断を伴うことがあり収率低下の原因となる。本法ではイオン交換クロマトグラフィによって目的蛋白質を単離するため非常に収率が高く、酵素使用の場合と比較してコスト低減も実現できる。また、分子内に4本のジスルフィド結合を有するABF-2の活性再生は困難が予想されたが、酸化還元剤を用いた透析法により効率良く天然状態のABF-2を得ることができた。本法を用いた大量発現系により、 $^{15}\text{N}$ および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識ABF-2の調製に成功し、現在はNMRスペクトルの解析中である。

【謝辞】本研究の一部は、新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業の補助を受けて行われた。

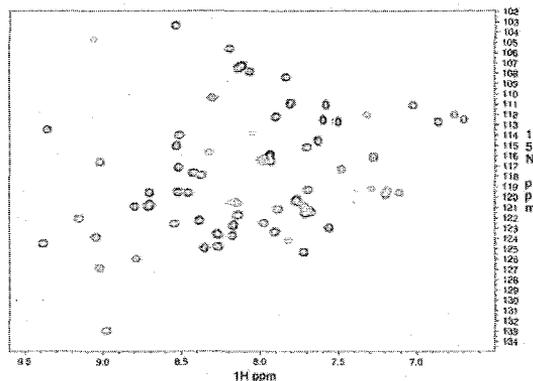


Figure: The  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  HSQC spectrum of  $^{15}\text{N}$ -labelled ABF-2.

## ウイルスベクターと植物細胞を利用した試料調製法

○ 大木進野<sup>1</sup>, 土肥浩二<sup>2,3</sup>, 森正之<sup>2,3</sup>(北陸先端大学院大<sup>1</sup>, JST-CREST<sup>2</sup>, 石川県立大<sup>3</sup>)

## A sample preparation method using virus vectors and plant cells

S. Ohki<sup>1</sup>, K. Dohi<sup>2,3</sup>, and M.Mori<sup>2,3</sup>(JAIST<sup>1</sup>, JST-CREST<sup>2</sup>, and Ishikawa Pref. Univ.<sup>3</sup>)

We applied a new method to preparation of stable-isotope labeled NMR samples. Our approach employs virus vectors and plant cells to express protein samples. This method needs only ~50 mL culture for the synthesis of several mg protein sample, because infection of virus vector strongly promotes production of target proteins in the plant cells. The <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra clearly suggest that this strategy enables one of the alternative methods for sample preparation in the protein NMR field.

## &lt;イントロダクション&gt;

タンパク質の NMR 研究においては、今日では <sup>13</sup>C や <sup>15</sup>N による安定同位体標識試料の利用が必須となっている。一般的に必要とされるのは、タンパク質分子全体を均一に標識した試料である。このような標識試料を調製するためには、大腸菌などの生きた細胞に目的タンパク質を産生させる遺伝子工学的方法が広く採用されている。目的タンパク質の発現効率によるが、通常、研究室レベルでは 1~数リットルの液体培地が菌体培養に用いられる。これを効率化すべくタンパク質発現量の改善や発現困難なタンパク質の発現方法に関して多くの報告がなされており、我々の今回の報告もその一例に位置づけられる。

我々は、ウイルスベクターと植物細胞を利用して安定同位体標識タンパク質試料を調製した。ウイルスベクターは高いタンパク質生産能力を持っているので、これに目的タンパク質をコードさせることにより高効率で研究対象試料を発現することが可能になる。

キーワード：植物細胞，ウイルスベクター，安定同位体標識，タンパク質

発表者氏名：おおきしんや，どひこうじ，もりまさし

### <実験>

トマトモザイクウイルス由来のウイルスベクターに目的タンパク質の遺伝子を組み込み、植物細胞（タバコ培養細胞 BY-2）に導入して形質転換細胞を作製した（参考文献 1）。

この形質転換細胞を窒素源が  $^{15}\text{N}$  で標識された BY-2 用改変 MS 培地に継代し、2 日間前培養した後、誘導物質（エストラジオール）を添加してウイルスベクターの発現を誘導して感染させた。3 日後に細胞を回収し、試料タンパク質の発現を電気泳動などで確認した。

回収した細胞を破砕し、通常の生化学的なカラム操作と透析・濃縮によって NMR 試料を調製した。それぞれのタンパク質試料に関して  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定した。NMR 測定は Varian INOVA750 (750MHz) を用いて行い、フーリエ変換は NMRPipe で行った。

### <結果と考察>

本方法を用いて複数の種類のタンパク質試料を調製できた。電気泳動のバンドの濃さから推定して、発現量が多い場合には数 mg の試料タンパク質を 50 mL の培養によって調製できた。この発現効率、本手法が NMR 試料調製の方法としても十分な能力を有していることを示している。

調製した  $^{15}\text{N}$  標識タンパク質の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定した結果、目的タンパク質が天然状態と同一の立体構造を形成していることが確認できた。よって、この手法は NMR 用試料調製方法のひとつとして広く利用することが出来ると考えられる。

### <参考文献>

- 1) Dohi, K., Nishikiori, M., Tamai, A., Ishikawa, M., Meshi, T., and Mori, M. (2006) *Archives of Virology* **151**, 1075-1084.

P013 ミミズ由来 R 型レクチンの C 末端糖結合ドメインの糖との相互作用に関する研究

<sup>1</sup> 農研機構・食品総合研究所、<sup>2</sup> 産総研・糖鎖医工学研究センター、<sup>3</sup> 山形大・理学部

- 逸見 光<sup>1</sup>、久野 敦<sup>2</sup>、伊藤茂泰<sup>2,3</sup>、鈴木龍一郎<sup>2,3</sup>、長谷川典巳<sup>3</sup>、平林 淳<sup>2</sup>

Interaction of C-terminal domain of a R-type lectin from earthworm with some sugars  
<sup>1</sup>National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), <sup>2</sup>Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), <sup>3</sup>Department of Material and Biological Chemistry, Yamagata University

○ Hikaru Hemmi<sup>1</sup>, Atsushi Kuno<sup>2,3</sup>, Shigeyasu Ito<sup>2,3</sup>, Ryuichiro Suzuki<sup>3</sup>, Tsunemi Hasegawa<sup>3</sup>, Jun Hirabayashi<sup>2</sup>

A novel 29-kDa lectin (EW29) isolated from the earthworm *Lumbricus terrestris* consists of two homologous domains (14,500 Da) showing 27% identity with each other. Recently, the crystal structure of the complex between the C-terminal domain of EW29 (EW29Ch) and sugar was reported, indicating that the protein has two sugar-binding sites ( $\alpha$  and  $\gamma$ ). The physiological function of EW29, however, remains unknown. The titration experiments of EW29Ch with some sugars by <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectroscopy showed that the chemical exchange of the residues in the  $\alpha$  sugar-binding site is in the slow or intermediate exchange regime, whereas that in the  $\gamma$  sugar-binding site is in the fast exchange regime. Thus, we suggest that the  $\alpha$  sugar-binding site of EW29Ch has tight sugar-binding mode.

1. はじめに

分子量が 2 万 9 千のミミズ由来レクチン (EW29) は、27% アミノ酸配列が同一の 2 つのドメインからなり、さらに、そのアミノ酸配列中に“Gly-X-X-X-Gln-X-Trp”と言うモチーフ構造を持つ<sup>1</sup>。このモチーフ構造は、これまで多くの糖認識タンパク質で発見されており、R-type レクチンファミリーを形成している。さらに、このレクチンの特徴として、R-type レクチンファミリーに属する他のタンデムリピートタンパク質がドメイン毎に一つの糖結合部位しか持たないことから単独のドメインでは赤血球凝集活性を持たないと考えられているが、EW29 において C 末端ドメイン単独 (EW29Ch) でも EW29 に比べ 10 倍程度低い活性ではあるが赤血球凝集活性を持つことが知られている。最近、EW29 Ch と糖との結

---

キーワード：レクチン、糖結合タンパク質、糖、相互作用

著者ふりがな：へんみひかる、くのあつし、いとうしげやす、すずきりゅういちろう、はせがわつねみ、ひらばやしじゅん

晶構造が解析され、分子内に2つの糖結合部位が存在することがわかった。しかしながら、未だその生理的機能は不明である。今回、EW29Chと各種糖との相互作用について、NMR滴定実験法を用いて解析を行ったので、その結果について報告する。

## 2. 方法

NMR測定サンプルは、約0.3mM~0.5mM  $^{15}\text{N}$ ラベル体を用いた。NMR滴定実験は、高濃度の糖ストック溶液を一定量ずつタンパク質溶液に添加し、約1時間室温で静置後、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの測定を行った。

## 3. 結果と考察

1) EW29Chと各種糖(ラクトース、メリビオース、ガラクトース)との相互作用を調べるため、NMRを用いた titration 実験を行った。その結果、複合体結晶構造の結果と同様に、3つのサブドメインの内、 $\alpha$ と $\gamma$ の2つのサブドメインでのみ糖結合部位が確認された。さらに、 $\gamma$ の糖結合部位においては、NMRタイムスケールにおいて fast exchange を示したが、 $\alpha$ の糖結合部位においては slow exchange、または、intermediate exchange を示した。これらの結果より、EW29Chでは2つの糖結合部位における結合様式が異なることが明らかになった。

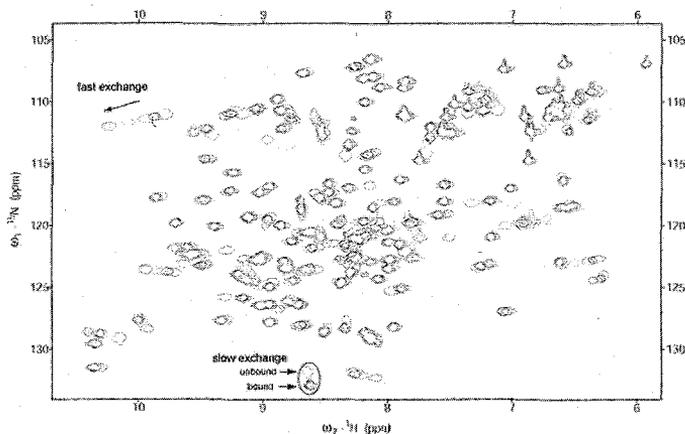


Figure 1.  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC spectrum illustrating the significant chemical shift changes of some residues of the protein on titration with lactose.

## References

1. Hirabayashi, J., Dutta, S. K. and Kasai, K. (1998) J. Biol. Chem. 273, 14450-14460.

P014

Jumonji AT-rich interaction domain (ARID)の NMR 構造解析  
(三菱化学生命科学研究所)

○楠英樹、竹内隆、河野俊之

NMR structural analysis of the AT-rich interaction domain (ARID) of Jumonji

Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)

○Hideki Kusunoki, Takashi Takeuchi and Toshiyuki Kohno

Jumonji (Jmj) is a ubiquitous, transcriptional repressor protein which plays important roles in development, cell growth and gene expression. The Jmj protein is a member of the Jmj transcription factor family, which contains an AT-rich interaction domain (ARID) and jumonji-like domains (jmn/jmjC). The ARID domain is a distinct DNA-binding module containing an atypical helix-turn-helix (HTH) motif, and the ARID family members are known to be involved in both the specific and nonspecific DNA sequence recognition. The typical 3D structure of the ARID domain consists of six  $\alpha$ -helices, while the extended ARID domain consists of the typical six  $\alpha$ -helices and additional  $\alpha$ -helices at the N- and/or C-terminus. The Jmj ARID domain may function as a nonspecific DNA-binding domain, however its detailed DNA-binding mode has not been elucidated. In this study, we determined the solution structure of the Jmj ARID domain by NMR spectroscopy, as a first step to better understand its structure-function relationship.

「序論」

Jumonji (Jmj) 蛋白質は、転写抑制ドメイン、DNA 結合に関与すると考えられている AT-rich interaction domain (ARID ドメイン)、このファミリーに高く保存された JmjN と JmjC ドメイン、Zn フィンガー (C5HC2) ドメインを持ち、転写抑制因子として細胞増殖の制御や遺伝子発現の調節で重要な役割を果たしている。例えば、Jmj 蛋白質は、サイクリン D1 の発現を抑制することによって、心筋細胞の増殖を調節していることが知られている。ARID ドメインは、不定型のヘリックス・ターン・ヘリックス (HTH) モチーフを持つ DNA 結合モジュールであり、このモチーフを介して、AT 配列に富む特異的な DNA 配列を認識し結合するものと、非特異的な DNA 配列を

キーワード : ARID; DNA 結合ドメイン ; Jumonji; NMR

○くすのき ひでき、たけうち たかし、こうの としゆき

認識し結合するものが報告されている。ARID ドメインの基本構造は 6 本の  $\alpha$  ヘリックスから構成されているが、その基本構造の N 末側、N 末側と C 末側にさらに  $\alpha$  ヘリックスを持つ ARID ドメインも存在することから、このドメインは、多様な構造モチーフを形成できると考えられている。Jmj 蛋白質の ARID ドメインは、このファミリーに高く保存された JmjN と JmjC ドメインの間に存在し、非特異的な DNA 配列に結合すると予想されている。しかしながら、Jmj 蛋白質の ARID ドメインの立体構造や、その詳細な DNA 結合様式の知見は未だ得られていない。そこで、Jmj 蛋白質の ARID ドメインの構造機能相関を解明するため、まず、Jmj 蛋白質の ARID ドメインの立体構造を決定した。

#### 「実験」

$^{15}\text{N}$  および  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  で安定同位体標識した Jmj 蛋白質の ARID (残基番号 615-730) ドメインを GST 融合蛋白質として大腸菌で発現し、グルタチオンアフィニティー、陽イオン交換、ゲルろ過カラムを用いて精製した。ブルカー社製 AVANCE 500 と AVANCE II 700 を用いて、温度  $15^\circ\text{C}$  で NMR 測定を行い、常法に従って、主鎖及び側鎖の帰属を行った。そして、二次元及び三次元 NOESY スペクトルから得られた 1502 個の距離情報、TALOS より得られた 172 個の二面角情報、49 X 2 個の水素結合を用いて、CNS で構造計算を行った。

#### 「結果及び考察」

NMR 構造解析の結果、Jmj 蛋白質の ARID (615-730) ドメインは、7 本の  $\alpha$  ヘリックスと 1 つの短い  $\beta$  ヘアピンループから構成されていることが明らかになった。ARID ドメインは、6 本の  $\alpha$  ヘリックスを基本構造として持つが、Jmj 蛋白質の ARID (615-730) ドメインは、他の ARID ドメインと良く類似した基本構造に加えて、C 末側に一本の  $\alpha$  ヘリックスを持つことが分かった。一方、Jmj 蛋白質の ARID (615-730) ドメインでは、N 末側に他の ARID ドメインで見られた  $\alpha$  ヘリックスに相当する領域を含んでいないため、この ARID ドメインの N 末側が  $\alpha$  ヘリックスを形成するかどうか分からなかった。そこで、N 末側を更に伸ばした Jmj 蛋白質の ARID (599-730) ドメイン (N 末側のアミノ酸残基が 599 番目から開始したもの) を調製し、NMR 解析を試みている。

P015

## MAP3K12 binding inhibitory protein 1 (MBIP)の

### 構造生物学的研究

(横浜市立大学 大学院国際総合科学研究科)

○佐藤 昌彦、長土居 有隆、西村 善文

### **Structural biology of MAP3K12 binding inhibitory protein 1 (MBIP)**

Yokohama City University, Graduate School of Supramolecular Biology

Masahiko Satoh, Aritaka Nagadoi, Yoshifumi Nishimura

MAP3K12 binding inhibitory protein 1 (MBIP) is a unique, evolutionarily conserved protein however its function has not yet been solved. We identified three novel domains in MBIP by using a secondary structural prediction. Each of three domains was expressed and purified in the homogeneity and we have observed  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of each domain. HSQC spectrum of the N-terminal domain of MBIP showed that this domain adopts a globular fold and possibly contains a novel function.

#### [研究の背景と目的]

当研究室では、ヒト核内タンパク質を標的とした NMR による立体構造の解析及び新規機能性ドメインの探索を行っており、東大医科研菅野研由来の約 400 個のヒト核内タンパク質の cDNA クローンを貯蔵している。それらの cDNA クローンに対して、DNA シークエンスを順次行い、変異や欠損の無い全長の cDNA が確認出来たものから優先的に発現系を構築し、発現確認、精製、NMR 測定を行ってきた。MBIP (NCBI ID: NM\_016586/NP\_057670) は、完全長の cDNA が確認できたタンパク質の一つであるが、各種データベースを利用してこのタンパク質について調査したところ、構造的に全く未知であり、既知の機能性ドメインが含まれていないことが判明した。また、二次構造予測の結果から、立体構造を形成していると予想した複数の領域について発現系を作製したところ、いずれも発現量は多く、ほぼ可溶性発現か半分程度が可溶性発現であった。したがって、この MBIP は高濃度のタンパク質試料を要する NMR による構造解析を行うのに適していると判断し、このタンパク質について立体構造の解析と新規ドメインの探索を試みようと考えた。

キーワード: MBIP 立体構造解析 溶液 NMR

○さとう まさひこ、ながどい ありたか、にしむら よしふみ

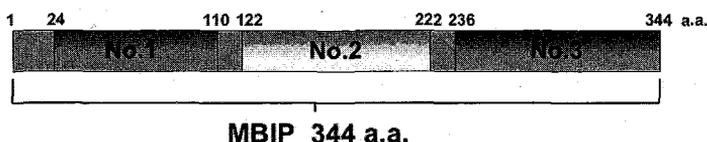


Fig.1 Three structural domains deduced by a secondary structure prediction. No.1(24-110), No.2(122-222), No.3(236-344) are structural domains, which may have a novel function predicted by Jpred.

### [実験方法]

#### 1. ドメイン検索及び二次構造予測に基づく標的領域の決定

Pfam、Smart などのドメイン検索データベースを利用して調べたところ、MBIP に既知の機能性ドメインは全く含まれていなかった。MBIP の全長を NMR で構造解析することは、分子量の制限の問題から困難であったため、タンパク質の二次構造予測ツールである Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>)を用いて、新規ドメインを含んでいる可能性が高いと思われる領域を予測した。その予測結果に基づいて、まず Fig.1 に示す No.1(24-110)、No.2(122-222)、No.3(236-344) を構造解析の標的領域とすることに決定した。

#### 2. 目的 DNA の発現ベクターへの組込み

標的領域とした No.1(24-110)、No.2(122-222)、No.3(236-344)の DNA 断片を、完全長 cDNA を鋳型として PCR 法により増幅した。得られた各 DNA 断片を、pET-23b(Novagen)に新たにタグを付加するなどの変更を加えて作製したタンパク質発現用プラスミド Vector2352 へと組み込み、大腸菌 BL21(DE3)pLysS(Novagen)へ導入した。

#### 3. タンパク質試料の調製

No.1(24-110)、No.2(122-222)、No.3(236-344)について、それぞれ  $^{15}\text{N}$  安定同位体を含む M9 培地で大腸菌の培養を行い、タンパク質を誘導発現させた。回収した菌体を超音波破碎し、遠心して得られた上清を、ニッケルカラムを使用して精製した。次に、タグを切断し、さらにゲル濾過クロマトグラフィーによって精製を行った後、それぞれ NMR 測定用のバッファーへとバッファー交換した。また、No.1(24-110) については、三次元 NMR 測定を行うために、 $^{15}\text{N}$  安定同位体と  $^{13}\text{C}$  安定同位体を含む M9 培地でも培養を行い、ほぼ同様の方法で精製を行った。

#### 4. NMR 測定

NMR 測定の装置には、BRUKER AVANCE 500,700,800 を用いた。No.2(122-222) と No.3(236-344)は二次元 NMR( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC)測定のみを行った。No.1(24-110)については、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC 測定の外に、主鎖の帰属を行うために、三次元 NMR 測定 (HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB)も行った。

#### 5. NMR スペクトルのデータ処理と解析

NMR スペクトルのデータ処理と解析には NMRPipe と Kujira を使用した。

##### [結果と考察]

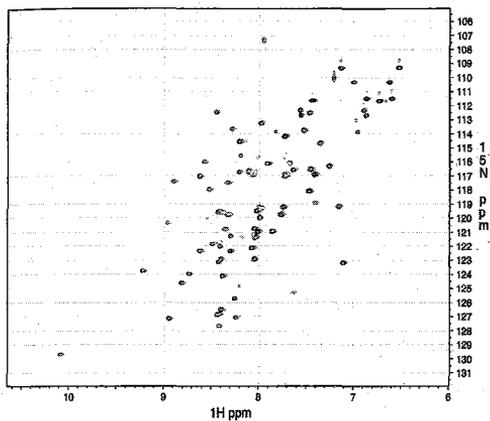
No.1(24-110), No.2(122-222)と No.3(236-344)の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC の測定の結果、No.1(24-110)は、Fig.2A に示すように全体的にシグナルがよく分散したスペクトルが得られたことから、安定な立体構造を形成していることが考えられた。No.2(122-222)は、シグナルが分散せずに集合した状態で観測されたことから、完全なランダム構造であると判断した(Fig.2B)。また、進化的に保存されている領域であることから、新規ドメインを含んでいる可能性が高いと予想していた No.3(236-344)は、立体構造を形成しているようなシグナルの分散は見られず、溶液中で会合してしまっている可能性が考えられた (Fig.2C)。以上の結果から、現在は立体構造を保持していると判断した No.1(24-110)を引き続き  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  で二重標識して、三次元 NMR の測定を行い、主鎖の帰属は Kujira (小林、理化学研究所) を使用して行っている。

No.1(24-110)と有意な相同性が認められるアミノ酸配列は、既知の他のタンパク質には見つかっていない。また、脊椎動物の MBIP の間でも No.1(24-110)の領域の保存性は低いにも関わらず、NMR 測定の結果は、この領域が安定な立体構造を形成していることを示唆したことは、興味深いことである。現時点では、この No.1(24-110)がどのような機能や役割を果たすのか、その予測を行うことは困難である。しかし、立体構造を解析し、他の構造既知のタンパク質と立体構造を比較することで、新たな知見が得られる可能性があると思われる。

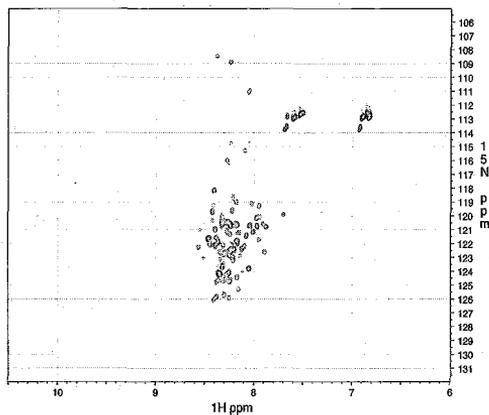
No.3(236-344)の領域は MAP3K12 と結合するロイシンジッパー様モチーフを含む可能性が示唆されており、また進化的にアミノ酸配列が保存されていることから、この領域の立体構造を解析することには、構造生物学的に重要な意味があると考えられるが、今回の NMR 測定では構造形成を確認することができなかった。精製段階で No.3(236-344)はかなり不安定で凝集しやすい傾向があったため、NMR 測定時も溶液中で非特異的な自己会合を起こしてしまっていた可能性が考えられた。一般的に、

タンパク質相互作用に関わるドメインは、単独では非特異的な自己会合を起こしやすい傾向があると考えられていることから、MAP3K12 と相互作用させることで、No.3(236-344)の構造及び性質が安定化される可能性はあると思われる。

(A) No.1(24-110)



(B) No.2(122-222)



(C) No.3(236-344)

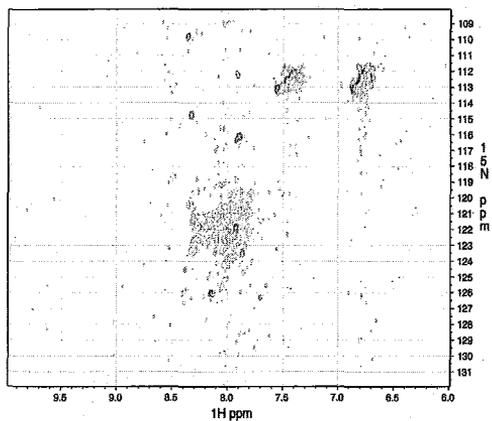


Fig2.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of three domains in MBIP.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled samples of three domains: No.1(24-110), No.2(122-222), No.3(236-344)

## NMR Structures and Self-Sumoylation of the N-terminal SAP domains of SUMO ligase PIAS/Siz Family

Protein Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences

Rintaro Suzuki, Heisaburo Shindo, Akira Tase and Toshimasa Yamazaki

### Introduction

Small ubiquitin-like modifier (SUMO) is a member of the ubiquitin-like protein family. Post-translational modification by SUMO is an important mechanism that regulates a wide variety of cellular functions except for the protein degradation, which is a major role of ubiquitin. The sumoylation pathway is very similar to that of ubiquitination, in which SUMO/ubiquitin are activated by E1 and transferred to E2 to form thioester-linked complexes. E3 ligases are required to recognize various specific substrate proteins and to ligate SUMO/ubiquitin to the  $\epsilon$ -amino group of a lysine residue in the target motifs of substrates.

PIAS/Siz protein family is one of the E3 ligases. N-terminal SAP domain of Siz1 from yeast is suggested to assume the binding to DNA and contribute to the localization of the protein in nucleus. In addition, Siz1 itself is often sumoylated, but the biological significance of the self-sumoylation of Siz1 is unknown. We investigated the structures and functions of the N-terminal SAP domains of PIAS/Siz from mammal, plant, and yeast. The structures of SAP domain and their binding modes to DNA were different by species. The self-sumoylation site of Siz1 was also examined and its possible roles are discussed.

### Materials and Methods

His-tagged N-terminal SAP domains of Siz1 from yeast and rice were overexpressed in *E. coli* BL21 in  $^{15}\text{N}$ - and/or  $^{13}\text{C}$ -enriched medium. The recombinant proteins were purified and cleaved by thrombin to remove the His-tag. The NMR samples were prepared in 8%  $\text{D}_2\text{O}$  containing 300 mM NaCl, 20 mM potassium phosphate (pH 6.1). Multi-dimensional NMR spectra were acquired on a Bruker DMX750 spectrometer. A self-complementary DNA 16-mer,  $\text{d}(\text{CAAAAATATATTTTGG})_2$ , was used for DNA binding experiments by chemical shift perturbation. The binding is also inspected by gel-shift assay.

A plasmid which contains a linear fusion of human Aos1-Uba2 (E1), Ubc9 (E2), and SUMO-1 (S1) was kindly provided by Dr. H. Saito [1]. A plasmid which contains the His-tagged yeast Siz1 (also called as Ull1) with truncation of C-terminal 440 residues (Ull1 $^{\Delta\text{C}440}$ -His) was kindly provided by Dr. Y. Kikuchi [2]. E1, E2, S1, and Ull1 $^{\Delta\text{C}440}$ -His or His-tagged yeast SAP were co-overexpressed in *E. coli*. His-tagged proteins were purified, concentrated, and subjected to immunoblotting against both His-tag and SUMO-1.

-----  
**Keywords:** sumoylation / SUMO ligase / self-sumoylation / DNA binding

## Results and Discussion

### *Solution Structure of Yeast SAP Domain*

Globular domain of yeast SAP domain consisted of five  $\alpha$ -helices (Fig. 1). While N-terminal 21 residues did not converge, there was a short helix at residues 4-6. A comparison with the previously determined structure of N-terminal SAP domain of human PIAS1 [3] demonstrated that the features of yeast SAP were (1) an N-terminal flexible region, (2) a longer  $\alpha 1$ -helix, (3) an extended loop between  $\alpha 3$ - and  $\alpha 4$ -helices, and (4) an additional helix  $\alpha 5$ . In yeast SAP, the  $\alpha 5$ -helix contacted with the  $\alpha 2$ - and  $\alpha 4$ -helices and the angle between  $\alpha 2$ - and  $\alpha 4$ -helices was  $125^\circ$ . In contrast,  $\alpha 2$ - and  $\alpha 4$ -helices are nearly parallel ( $161^\circ$ ) in human SAP which lacks  $\alpha 5$ -helix. This difference in the arrangement of helices resulted in a different conformation of the SAP-motif in yeast SAP (residues 34-68) from human SAP.

### *Interactions between SAP Domains and DNA*

The SAP-motif has been presumed to be a DNA-binding motif. We examined the DNA-binding of the SAP domain by gel-shift assay and chemical shift perturbation. When the DNA bound to yeast SAP, the band of DNA was retarded in electrophoresis, suggesting a concerted manner of the binding to the SAP domain. On the other hand, upon binding to the SAP domain of rice, the band of DNA disappeared, suggesting non-specific binding. In the titration experiments of  $^{15}\text{N}$ -labeled SAP domains with DNA, residues of the rice SAP with strongly perturbed chemical shifts were similar to those of human SAP, but differed from those of yeast SAP. Moreover, the good fittings to the titration curves were attained with the model of 1/2 stoichiometry for the DNA/yeast SAP, and 1/1 for the rice SAP. The binding mode of mammal and plant SAP could be different from that of the yeast SAP.

### *Self-sumoylation of Yeast Siz1*

Yeast SAP has been reported to be required for the self-sumoylation of Siz1 *in vitro*. We used sumoylation assay system in *E. coli* with recombinant human E1, E2, and S1 proteins, to determine the sumoylation site in yeast Siz1. Immunoblotting showed that both of the Ull1 $^{\Delta\text{C440}}$ -His and the SAP domain were sumoylated by this system, indicating that the SAP domain was able to be solely sumoylated. This suggests the possible involvement of the sumoylation of the SAP domain in the modulation of the function of the SAP domain, such as DNA-binding.

**References:** 1) Uchimura, Y. et al. (2004). *Anal. Biochem.*, **331**: 204-206. 2) Takahashi, Y. et al. (2003). *J. Biochem.*, **133**: 415-422. 3) Okubo, S. et al. (2004). *J. Biol. Chem.*, **279**: 31455-31461.

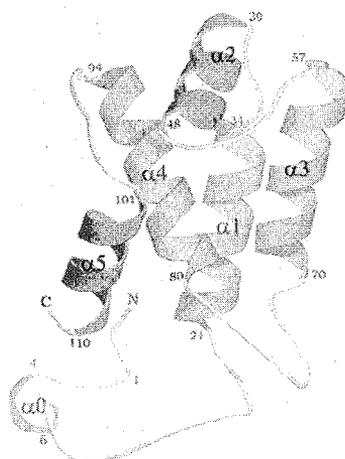


Fig. 1. Structure of N-terminal SAP domain of yeast Siz1.

# シトクロム *c* の塩酸グアニジンによる変性過程で生じる非天然ヘム配位構造の常磁性 NMR 研究

(筑波大院数物)

○太 虎林、高山真一、河野 慎、長友重紀、山本泰彦

## Characterization of Non-native Heme Coordination Structures Emerging upon GdnHCl-Induced Unfolding of Cytochrome *c*

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

○Hulin Tai, Shin-ichi J. Takayama, Shin Kawano, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto

The folding and unfolding of the oxidized cytochrome *c* (cyt *c*) is strongly influenced by the binding of protein-donated ligands to its covalently attached heme. Denaturation of cyt *c* at neutral pH leads to replacement of the native Met heme axial ligand with one or more protein-donated His side chains (*bis*-His form), and such *bis*-His forms have been shown to act as kinetic traps of the cyt *c* folding. *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> (HT) and *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*<sub>551</sub> (PA) are highly homologous and possesses a single His residue as an axial ligand to heme Fe. Consequently, both unfolding and refolding of HT and PA proceed in the absence of the non-native *bis*-His form. We investigated the non-native heme coordination structures emerging upon GdnHCl-induced unfolding of the oxidized HT and PA, and detected a low-spin intermediate whose axial Met is replaced by *N*-terminal amino group (His-*N*<sub>term</sub> form).

### 序 論

シトクロム *c* (cyt *c*) の変性過程では、ヘム鉄の軸配位子が置換された種々の中間体が検出されており、これら中間体の熱力学的安定性は変性反応の反応機構や動力学に大きな影響を及ぼす。通常、cyt *c* は、天然状態における軸配位子の一つとして存在する His 以外にも複数の His をもつが、cyt *c* の変性過程ではこれらの His も軸配位子としてヘム鉄に配位し (*bis*-His form)、フォールディング中間体の形成に重要な役割を果たす。また、これらの非天然な His 軸配位子が存在しない場合、非天然軸配位子としては *N* 末端の  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> と Lys の  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> が考えられるが、それらの性質の詳細はまだ明らかになっていない。本研究で用いた好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*) シトクロム *c*<sub>552</sub> (HT) とその相同タンパク質である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) シトクロム *c*<sub>551</sub> (PA) は、天然の軸配位子として存在する His 以外には His をもたないため、*bis*-His form を形成することはできない。本研究では、酸化型 HT と PA の塩酸グアニジン (GdnHCl) による変性過程で生じる非天然ヘム配位構造を常磁性 NMR により解析した。

### 結果と考察

酸化型 HT の GdnHCl 添加による変性実験から得られた一連の 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 ( $S = 1/2$ ) であるので不対電子を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、GdnHCl 添加により、酸化型 HT の常磁性シフトしたシグナルの強度減少に伴い、非天然ヘム配位構造に由来するシャープなシグナルが 15 - 40 ppm に現れ、それらの強度が増大する。新たに観測されるシグナルのシフト値から、非天然ヘム配位構造は  $S = 1/2$  であることが明らかとなった。

Fig. 2 に、[GdnHCl] = 6 M での酸化型 HT、*N* 末端の  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> をカルボキシル基に修飾した *N*<sub>keto</sub>-HT および全ての Lys をホモアルギニンに

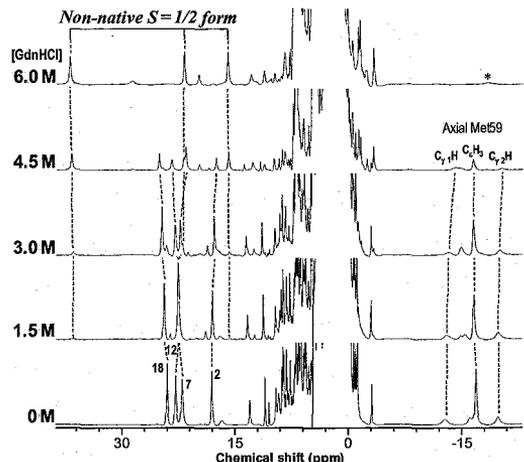


Fig. 1. <sup>1</sup>H NMR spectra of HT, p<sup>H</sup> 7.0, in the presence of various [GdnHCl] (0 - 6 M), at 25 °C.

Keyword : 常磁性 NMR、シトクロム *c*、アンフォールディング、ヘム配位構造

たい ころん、たかやま しんいち、かわの しん、ながとも しげのり、やまもと やすひこ

修飾した *Har*-HT の NMR スペクトルを比較して示す。HT と *Har*-HT では共に、15–40 ppm に低スピン非天然ヘム配位構造に由来するシグナルが観測されたのに対して、*N<sub>keto</sub>*-HT では、40–80 ppm に、典型的な高スピン構造に由来するシグナルが観測された。従って、HT の低スピン非天然ヘム配位構造では、*N* 末端の  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> がヘム鉄に配位する (*His-N<sub>term</sub>* form) ことが明らかになった。

Fig. 3 に、HT の *His-N<sub>term</sub>* form の NOESY スペクトルを示す。*His-N<sub>term</sub>* form のヘムメチルプロトンシグナルは、NOE により低磁場側から 7、18、2-Me であると帰属されている。Fig. 3 に示すように、HT の *His-N<sub>term</sub>* form では、ペプチド鎖の Leu4 あるいは Ala5 の側鎖のメチル基に由来すると考えられるシグナルが -3.28 ppm に観測されており、ヘムの 7 および 12-Me との間で NOE 相関が観測される。従って、ヘムと *N* 末端のペプチド鎖は、Fig. 3 で示したような構造であると考えられる。

Fig. 4 の最上段と最下段に、[GdnHCl] = 6 M での酸化型 HT と PA の NMR スペクトルを比較して示す。PA の低スピン非天然ヘム配位構造も HT と同じく *His-N<sub>term</sub>* form であることが明らかになっており、また、飽和移動法により、ヘムメチルプロトンシグナルは低磁場側から 18、12、2 および 7-Me であると帰属され、HT と大きく異なることが明らかとなっている。HT と PA の *His-N<sub>term</sub>* form の違いはヘムから *N* 末端までのペプチド鎖の違いに起因すると考えられる (PA では EDPEVLFKNKG、HT では NEQLAKQKG)。また、HT と PA の *N* 末端のアミノ酸残基を相互に置換した変異体 HT-N1E と PA-E1N および HT の *N* 末端ペプチド鎖の長さを PA と同じく 11 残基に伸ばした変異体 HT-n11 の *His-N<sub>term</sub>* form の NMR スペクトルも Fig. 4 に示す。HT と HT-N1E および PA と PA-E1N の間では明確なシフト差が観測された。この結果は、HT と PA の低スピン非天然ヘム配位構造は、*His-N<sub>term</sub>* form であることを示している。一方、HT-n11 の *His-N<sub>term</sub>* form のヘムメチルシグナルでは、顕著なブロードニングが観測され、シフトパターンも PA のものと類似している。従って、ヘムから *N* 末端までのアミノ酸が 9 残基数と少ない HT では、*N* 末端のペプチド鎖はヘムに対してある特定のコンフォメーションで固定されていると考えられる。

## 結論

酸化型 HT と PA の変性過程では、軸配位子 Met が *N* 末端の  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> によって置換されることが天然 *cyt c* で初めて明らかとなり、中性 pH 条件では、Lys の  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> よりも *N* 末端の  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> が選択的にヘム鉄に配位することが示された。また、ヘムから *N* 末端までのペプチド鎖は、*His-N<sub>term</sub>* form の安定性に影響を及ぼすことも明らかとなった。

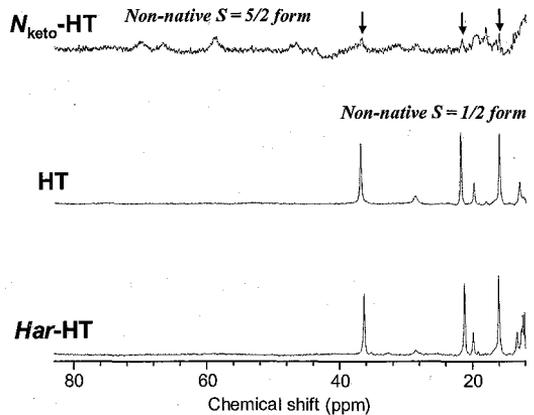


Fig. 2. The downfield shifted <sup>1</sup>H NMR spectra of *Har*-HT, HT, and *N<sub>keto</sub>*-HT, p<sup>2</sup>H 7.0, [GdnHCl] = 6.0 M, at 25 °C.

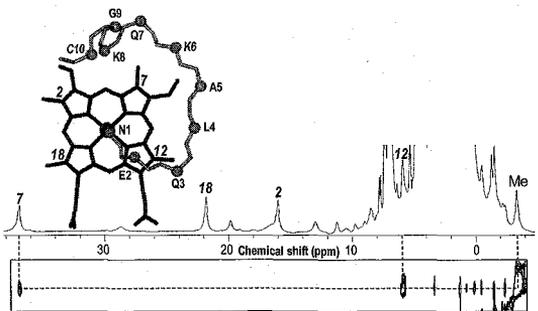


Fig. 3. A portion of NOESY spectrum of HT, p<sup>2</sup>H 8.0, [GdnHCl] = 6.0 M, at 25 °C.

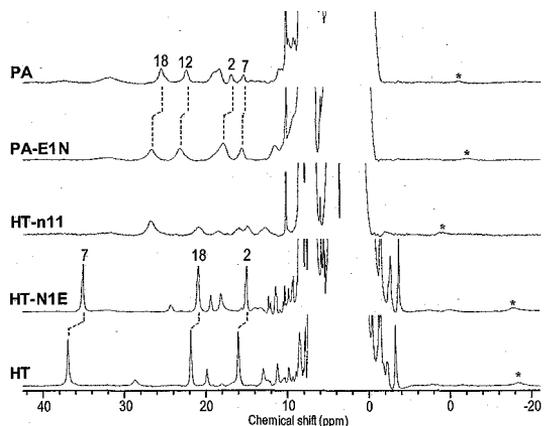


Fig. 4. <sup>1</sup>H NMR spectra of HT, PA, and mutant, p<sup>2</sup>H 7.0, [GdnHCl] = 6.0 M, at 25 °C.

P018

基本転写因子 TFIIE 全長の NMR による構造解析  
○片岡雅之、長土居有隆、奥田昌彦、明石知子、西村善文  
横浜市大・院・国際総合科学

NMR analysis of human general transcription factor TFIIE

○Masayuki Kataoka, Aritaka Nagadoi, Masahiko Okuda, Satoko Akashi,  
Yoshifumi Nishimura

Graduate School of Supramolecular Biology, Yokohama City University

Human general transcription factor IIE (TFIIE) is a component of a transcription preinitiation complex that associated with RNA polymerase II. TFIIE consists of  $\alpha$  (50 kDa) and  $\beta$  (35 kDa) subunits. Although TFIIE plays an important role in transcription initiation, its tertiary structure has not yet been solved at an atomic resolution. Extremely elongated structure deduced from Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) experiment suggests its high flexibility, so the X-ray crystallographic analysis of intact human TFIIE seems to be difficult. Here, we tried to investigate the structure of human general transcription factor TFIIE by using NMR.

ヒト TFIIE は、転写前開始複合体の構成要素の一つとして RNA polymerase II と結合する。TFIIE は  $\alpha$  (50kDa) と  $\beta$  (30kDa) の 2 つのサブユニットで構成されている。TFIIE は転写開始において重要な役割を担っているが、原子レベルでの 3 次元構造は決定されていない。X 線小角散乱の結果からその分子形状が非常に細長い棒状であることを示しており、極端に細長い分子であるため運動性に富み、結晶化は困難であると思われる。本研究では、NMR によりヒト TFIIE の構造解析を行うことを目的としている。

基本転写因子, TFIIE, NMR

かたおかまさゆき、ながどいありたか、おくだまさひこ、あかしさとこ、  
にしむらよしふみ

## 実験

大腸菌を用いた発現系により非標識の N 末に Hattag を持つ TFIIIE $\alpha$ 、安定同位体標識の tag を持たない TFIIIE $\beta$  を別々に発現させ、それぞれ等量の菌体を混合し、菌体破碎後、Ni カラム、ゲル濾過クロマトグラフィーにより TFIIIE $\alpha\beta$  複合体を精製した。NMR スペクトル測定は TFIIIE $\alpha\beta$  複合体濃度 0.1mM, 20mM リン酸バッファー (pH6.8), 1mM DTT, 1mM ZnCl<sub>2</sub>, 10% D<sub>2</sub>O, 293K で行った。測定は分光器 Varian 900、Bruker 700 で行った。

## 結果と考察

Ni カラム、ゲル濾過クロマトグラフィーにより TFIIIE $\alpha\beta$  複合体を単離精製し、試料濃度 0.1 mM /mL 得ることができた。HSQC 測定で観測された TFIIIE $\beta$  由来の TFIIIE $\alpha\beta$  複合体の 150 個程度のシグナルは TFIIIE $\beta$  が 291 残基であることから約 50% シグナルが消失した。この 50% のシグナルの消失は分子量増大による影響、または、TFIIIE $\alpha$  由来の未切断の tag によるものであると考えられる。TFIIIE $\alpha$  の N 末に配置した HATtag をプロテアーゼで切断することができなかつたのは、TFIIIE $\alpha$  の N 末と  $\beta$  の相互作用により TFIIIE $\alpha$  の N 末に配置してあるプロテアーゼ部位が、complex の中に埋もれてしまった為であると考えている。

現在、tag を除去した TFIIIE $\alpha\beta$  複合体の精製するために、TFIIIE $\alpha$ 、TFIIIE $\beta$  の大量発現系の検討、TFIIIE $\alpha$ 、TFIIIE $\beta$  それぞれを単独で精製し tag 切断後 TFIIIE $\alpha\beta$  複合体を形成させ NMR による構造解析を行っている。

## [参考文献]

- [1] Masahiko Okuda, Aki Tanaka, Yoko Arai, Manami Satoh, Hideyasu Okamura, Aritaka Nagadoi, Fumio Hanaoka, Yoshiaki Ohkuma, and Yoshifumi Nishimura (2004) J. Biol. Chem. 279, 51395–51403
- [2] Masahiko Okuda, Yoshinori Watanabe, Hideyasu Okamura, Yoshiaki Ohkuma, and Yoshifumi Nishimura (2000) EMBO J. 19, 1346–1356
- [3] Yoshiyuki Itoh, Satoru Unzai, Mamoru Sato, Aritaka Nagadoi, Masahiko Okuda, Yoshifumi Nishimura, and Satoko Akashi (2005) PROTEINS, Structure, Function, and Bioinformatics 61, 633–641

P019

*Saccharomyces cerevisiae* Atg8 の立体構造解析

○ 渡部 正博<sup>1</sup>、野田 展生<sup>1</sup>、横地 政志<sup>1</sup>、久米田 博之<sup>1</sup>、  
小橋川 敬博<sup>1</sup>、藤岡 優子<sup>1</sup>、中戸川 仁<sup>2</sup>、大隅 良典<sup>2</sup>、稲垣 冬彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大院薬、<sup>2</sup>基生研)

Solution Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8

○ Masahiro Watanabe<sup>1</sup>, Nobuo Noda<sup>1</sup>, Masashi Yokochi<sup>1</sup>, Hiroyuki Kumeta<sup>1</sup>, Yoshihiro Kobashigawa<sup>1</sup>, Yuko Fujioka<sup>1</sup>, Hitoshi Nakatogawa<sup>2</sup>, Yoshinori Ohsumi<sup>2</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, <sup>2</sup>National Institute for Basic Biology)

Atg8, a member of a novel ubiquitin-like protein family, is an essential component of the autophagy machinery in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This protein consists of 117 amino acid residues. We determined the solution structure of Atg8 by NMR methods. The 22 peaks corresponding to the mainly N-terminal region were not observed in <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra of wild-type Atg8 due to exchange broadening. We could obtain these peaks by using K26P variant, and this mutation reduced the motility of the N-terminal region in Atg8 without lacking the autophagic activity. NMR measurements demonstrated that the structure comprised the N-terminal helical domain and the ubiquitin-like C-terminal domain, which is similar to that of mammalian Atg8 homologues. In addition, the N-terminal domain of Atg8 had higher motility in contrast to that of mammalian homologues.

【背景】

オートファジー（自食作用）とは、飢餓状態に陥った細胞が生き延びるために、自己のオルガネラ等を分解してリサイクルするためのシステムである。酵母から哺乳動物に至るまで見出され、基本的な生命維持のシステムと考えられている。1960年代にその現象が発見され、遺伝学的な研究では、酵母において少なくとも16個のATG遺伝子が関与することが明らかにされているが、分子レベルにおける解析は未知な点が多い。オートファジーでは、初期の過程で隔離膜が湾曲しながら伸張して、細胞質の一部が隔離膜によって取り込まれるオートファゴソームと呼ばれる2重膜構造体が形成されるが、そのメカニズムは不明な点が多い。オートファゴソームの形成に必須な

キーワード: Atg8, autophagy, high-pressure NMR, residual dipolar coupling, ubiquitin-like

○わたなべ まさひろ、のだ のぶお、よこち まさし、くめた ひろゆき、こばしがわ よしひろ、ふじおか ゆうこ、なかとがわ ひとし、おおすみ よしのり、いながき ふゆひこ

Atg タンパク質群には、Atg5 と Atg12 を結合させる Atg12 結合系と、脂質のホスファチジルエタノールアミン(PE)と Atg8 を結合させる Atg8 結合系の 2 種類のユビキチン様反応系がある。本研究の対象となる Atg8 系結合システムにおいて、Atg8 は 117 アミノ酸残基からなる分子量約 13.6 kDa の親水性のタンパク質で、N 末端ドメインとユビキチン様ドメインの 2 つからなり、一部がオートファゴソーム膜上に局在化することが報告されている。

本研究の目的は、Atg8 の立体構造解析より N 末端ドメインにおける運動性や他のホモログとの比較を構造生物学の見地から議論し、Atg8 系結合システムにお Atg8 が PE 化して隔離膜に向かってどのようにしてオートファゴソームが形成されるのかを、いての知見を得ることである。

### 【結果・考察】

Atg8 の溶液中における立体構造を NMR 法によって解析した。野生型の Atg8 では、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトルで N 末端 21 残基に相当するピークを観測出来なかった。このため、N 末端ドメインの運動性を抑制させる Atg8 の遺伝子変異体として K26P を作成した。アミノ酸残基 26 番目は、Atg8 のホモログにおいて 2 つのドメインをつなぐリンカー領域に存在し、Atg8 のホモログで保存されているプロリン残基に置換した。K26P 変異体を調製したところ、野生型よりも収量や安定性が増加して、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトルにおいても殆どのピークが観測されたので、構造解析に適したサンプルとなった。

Atg8 K26P 変異体の立体構造を図 1 に示す。Atg8 のホモログと同様に N 末端ドメインとユビキチン様ドメインの 2 つからなる構造をとることが明らかになった。Atg8 は、ユビキチン様ドメインにおいてはホモログとよく重なり合った。対照的に N 末端ドメインにおいては、ホモログは 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスを取るが、Atg8 は 1 本のみであり、 $\alpha$ -ヘリックスの先端は運動性が高いことが示唆された。また、重水素交換実験や緩和実験からもこの領域の運動性の高さが観測された。

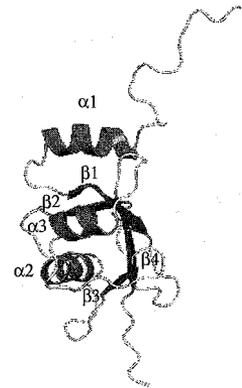


Fig.1 Solution structure of Atg8

PE による修飾を受けた Atg8 は N 末端領域の構造変化が以前に報告されている。今回の結果より、この領域の運動性の高さとは何かの相関があるのかもしれない。

## AML1 Runt domain に結合する RNA アプタマーの構造解析

(<sup>1</sup>千葉工大・工・生命環境科学, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研,  
<sup>4</sup>東大・医科研・遺伝子動態)

○野村祐介<sup>1,2</sup>, 富士原和也<sup>1,2</sup>, 千葉学<sup>1</sup>, 飯淵宏昭<sup>1</sup>, 田中卓<sup>1,2</sup>,  
 田中陽一郎<sup>2,3</sup>, 福永淳一<sup>2,3</sup>, 神津知子<sup>2,3</sup>, 中村義一<sup>2,4</sup>, 河合剛太<sup>1</sup>, 坂本泰一<sup>1,2</sup>

## Structural analysis of RNA aptamer against AML1 Runt domain

(<sup>1</sup>Dept. Life Env. Sci., Fac. Eng., Chiba Inst. Tech., <sup>2</sup>CREST, JST, <sup>3</sup>Saitama Cancer Center  
 Res. Inst. for Clin. Oncol., <sup>4</sup>Dept. Basic Med. Sci., Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo,)

○Yusuke Nomura<sup>1,2</sup>, Kazuya Fujiwara<sup>1,2</sup>, Manabu Chiba<sup>1</sup>, Hiroaki Iibuchi<sup>1</sup>, Taku Tanaka<sup>1,2</sup>,  
 Yoichiro Tanaka<sup>2,3</sup>, Jun-ichi Fukunaga<sup>2,3</sup>, Tomoko Kozu<sup>2,3</sup>, Yoshikazu Nakamura<sup>2,4</sup>,  
 Gota Kawai<sup>1</sup>, Taiichi Sakamoto<sup>1,2</sup>

A high affinity RNA aptamer (AML38) against AML1 Runt domain has been selected from combinatorial libraries by *in vitro* selection (SELEX). To understand the structural basis of the recognition of AML1 Runt domain by AML38, we determined the solution structure of essential stem-loop (AML22) of the aptamer using NMR. The stem-loop is stabilized by a CACG tetraloop and contains the A15-C22 mismatch and the C14-G23-A24 base triple. The phosphate backbone adjacent to the C14-G23-A24 base triple adopts unusual structure, which results in a widened and shallow major groove. Considering the mutation analysis of the aptamer and the structural and sequence similarity between AML22 and the Runt domain binding DNA, the high affinity aptamer is suggested to mimic the target DNA of the Runt domain.

## [序]

ヒト急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia, AML) の主な原因の一つとして、t(8;21)染色体転座によってつくられる AML1-MTG8 融合タンパク質の発現がある。転写調節因子である AML1 タンパク質中の Runt domain は DNA 結合に重要であり、我々はすでに、AML1 Runt domain に特異的に結合する RNA アプタマーの取得に成功している。本研究では、アプタマーの立体構造を明らかにすることによって、より高い結合能をもつアプタマーを設計することをめざしている。

SELEX 法によって得られた全長 38 残基の RNA アプタマー (AML38) は、MFOLD による二次構造予測の結果、ヘアピンループと内部ループをもつことが予測された。NMR スペクトルの解析を容易にし、かつ確実に構造を決定するために、AML38 をヘアピンループ部分と内部ループ部分の 2 つの部分に分割し、各々を解析した。今回は、主にヘアピンループ部分に相当する AML22 の構造解析結果について報告する。

[方法]

AmpliScribe™ T7-Flash High Transcription kits を用いて, AML22 の転写合成を行なった. この際に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  NTP (大陽日酸)を用いることで安定同位体標識した AML22 を合成した. DRX-500 分光計および DRX-600 分光計 (Bruker 社) を用いて NMR スペクトルを測定した. 軽水溶媒中で NOESY,  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HMQC および HNN-COSY を測定した. 重水溶媒中では NOESY, HOHAHA,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY を測定した. 構造計算には CNS 1.1 を用いた.

[結果および考察]

軽水中における NMR スペクトルの解析の結果より, C16-G21 で塩基対の形成が観測され, CACG テトラループをもつ構造であることがわかった (Fig. 1, Fig. 2A). また重水中の NOESY スペクトルにおいて, H8/H6-H1' の領域で g1-C19, G20-a1 を連鎖帰属することができた. 得られた情報から立体構造計算をおこなったところ, アプタマーは, C14-G23-A24 の base triple, A15-C22 ミスマッチを形成し, DNA と同様な広い major groove を形成することがわかった (Fig. 2C). AML1 Runt domain は標的 DNA の major groove に結合することがわかっている<sup>1)</sup>. この標的 DNA において結合に関わる残基が, アプタマーの立体構造のほぼ同じ位置に存在していることがわかった (Fig. 2). さらに, 変異体を用いた解析から, これらの残基が結合に重要であることがわかった. これらのことから, アプタマーは Runt domain の標的 DNA の構造を擬態して結合していることが示唆された (Fig. 2C, D).

(1) Tahir H. Tahirov *et al.*, *Cell*, **104**, 755–767 (2001).

Keywords: RNA, Aptamer, AML1, Molecular mimicry, base triple

のむら ゆうすけ, ふじわら かずや, ちば まなぶ, いいぶち ひろあき, たなか たく, たなか よういちろう, ふくなが じゅんいち, こうづ ともこ, なかむら よしかず, かわい ごうた, さかもと たいいち

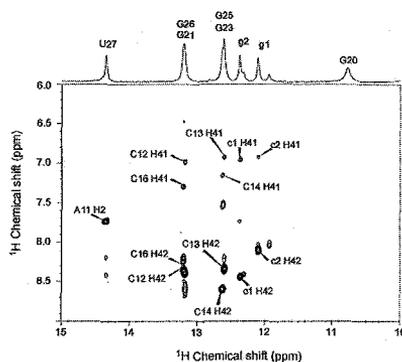


Fig. 1. 2D NOESY spectrum of AML22 in H<sub>2</sub>O.

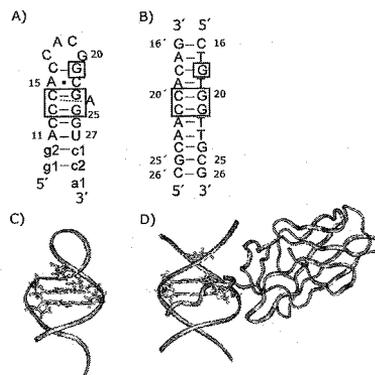


Fig. 2. Comparison of AML22 and the AML1 Runt domain binding DNA. Secondary structures of AML22 (A) and the DNA (B). Squares indicate the important residues for the AML1 Runt domain binding. Three dimensional structures of AML22 (C) and DNA-AML1 Runt domain complex (PDB ID:1HJC) (D)<sup>1)</sup>. The important residues for the AML1 Runt domain binding are indicated by stick model.

## P021 出芽酵母 Bem1p SH3-CI ドメインの立体構造解析

(<sup>1</sup>北大・生命科学院・構造生物、<sup>2</sup>北大・院薬・構造生物、  
<sup>3</sup>東大・新領域・ゲノムデバイス)

○高久朋之<sup>1</sup>、小椋賢治<sup>1,2</sup>、久米田博之<sup>2</sup>、山口佳洋<sup>3</sup>、  
伊藤隆司<sup>3</sup>、稲垣冬彦<sup>1,2</sup>

### Solution structure of Bem1p SH3-CI domain

(<sup>1</sup>Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Life Science, Hokkaido University, <sup>2</sup>Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, <sup>3</sup>Department of Computational Biology, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo)

○ Tomoyuki Takaku<sup>1</sup>, Kenji Ogura<sup>1,2</sup>, Hiroyuki Kumeta<sup>2</sup>, Yoshihiro Yamaguchi<sup>3</sup>,  
Takashi Ito<sup>3</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>1,2</sup>

Bem1p is a scaffold protein for cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. Bem1p SH3-CI domain interacts with Cdc42p as well as Ste20p. Interestingly, Cdc42p and Ste20p bind Bem1p SH3-CI domain exclusively. Here, we report the solution structure of Bem1p SH3-CI domain and show that Bem1p SH3 and CI are structurally and functionally related to each other.

#### 【序論】

Bem1p は、出芽酵母の細胞極性形成のシグナル伝達系において足場タンパク質として機能する。近年の報告により、Bem1p SH3-CI ドメインは Cdc42p 結合ドメインとして同定された。SH3-CI ドメインは、既知の SH3 ドメイン及び約 40 残基からなる CI 領域(Cdc42-interacting)から構成されており、SH3 ドメインのみでは不溶性になり、CI 領域のみでは Cdc42p と相互作用しないことも報告されている。また、SH3-CI ドメインは Cdc42p 以外にも、エフェクターの Ste20p 等とも相互作用することが知られており、細胞極性形成のシグナル伝達系において重要なドメインであると考えられている。そこで本研究では、Bem1p SH3-CI ドメインの溶液構造を NMR 法により解析した。

#### 【方法】

Bem1p SH3-CI ドメインを GST 融合タンパク質として大腸菌により発現させ、GS4B によるアフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによ

---

【キーワード】 Bem1p SH3-CI cell polarity

【著者ふりがな】 ○たかくともゆき、おぐらけんじ、くめたひろゆき、やまぐちよしひろ、いとうたかし、いながきふゆひこ

り精製した。NMR測定には 0.3 mM  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体を用い、Varian UNITY INOVA 600 MHzおよび 800 MHz分光計によってNMR測定を行った。スペクトル処理用ソフトウェアとしてNMRPipe、スペクトル帰属用ソフトウェアとしてSparkyを用いて主鎖、側鎖の帰属を行った。 $^{13}\text{C}$ -edited 3D NOESY、 $^{15}\text{N}$ -edited 3D NOESYによりNOE信号を取得し、CYANA2.1を用いて立体構造計算を行った。

#### 【結果と考察】

立体構造計算の結果、図1のような立体構造が得られた。Bem1p SH3-CI ドメインは、SH3 ドメインと CI 領域から構成されており、SH3 ドメインは既知の SH3 ドメインと同様の立体構造をとり、CI 領域は2本の $\alpha$ ヘリックスから形成されていた。SH3 と CI 領域の間に、多数の NOE が観測され、SH3-CI は一つの構造ドメインであることが示された。これは、Bem1p SH3 を単独で大腸菌により発現させると、不溶性になるという結果とも対応する。また、Bem1p CI 単独では、Cdc42p と結合しないということも知られていることから、SH3-CI ドメインは構造のみならず機能的にも関連している可能性が示された。

Cdc42p との結合に必須な残基である N253 は、CI 領域の2つの $\alpha$ ヘリックスより C 末端のフレキシブルな領域に位置する。標的である Cdc42p と相互作用することによって、この領域は何らかの構造を形成する可能性が高い。

今後、Bem1p SH3-CI と Cdc42p の複合体の立体構造解析を行うことにより、これらの問題を解決する。

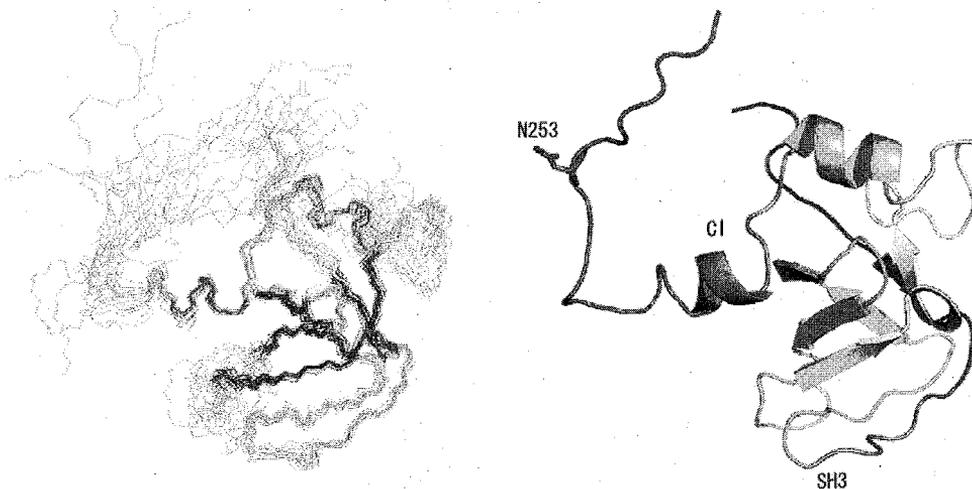


Figure1. Solution structure of Bem1p SH3-CI domain (left, overlay of 20 structures. right, ribbon diagram with Asn253 in a stick model)

P022

相互作用に基づく光合成循環的電子伝達の機構解明

○ 野本 直子<sup>1</sup>、上田 卓見<sup>1</sup>、嶋田 一夫<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院薬学系研究科、<sup>2</sup>BIRC,AIST

Clarification of the photosynthetic cyclic electron transport mechanism

Naoko Nomoto<sup>1</sup>, Takumi Ueda<sup>1</sup>, Ichio Shimada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo

<sup>2</sup>Biological Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Photosynthetic ferredoxin(Fd) transfers electrons from photosystem I(PSI) to ferredoxin-quinone reductase(FQR) in the cyclic electron transport. We aim to elucidate the mechanism of the cyclic electron transport around PSI by identification of the interface residues of Fd for PSI and FQR. Because PSI and FQR are huge and heterogeneous, we exploited transferred cross saturation (TCS) experiment to identify interface residues. [ $ul$ -<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N] Fd, PSI micelles and thylakoid membrane vesicles were prepared, and TCS experiments were performed. Residues including E30-I33 and those around T53 were affected by the irradiation in both TCS experiment with PSI micelles and that with the vesicles, while K4 and D84 were affected only in the TCS experiment with vesicles. These results suggest that the former and latter residues are on the interface of the Fd-PSI and Fd-FQR complexes, respectively.

[序] 光合成型フェレドキシン (Fd) は、循環的電子伝達において、光化学系 I (PS I) から電子を受け取り、フェレドキシン-キノン還元酵素 (FQR) へ渡す (Fig. 1)。これらの電子輸送反応は、過剰光条件下において、チラコイド膜内外のプロトン濃度勾配を形成させることにより、光エネルギーの熱散逸を誘導し、その結果光障害を抑制する。

Fd-PSI 複合体を含む多くの電子輸送複合体では、最終的な複合体を形成する際に、Initial complex とよばれる、両者が弱い静電相互作用で緩く接近したような、不均一な状態を過渡的に形成することが、素早い複合体形成および電子輸送に重要であると考えられている。しかし、Fd と PSI および FQR の複合体の立体構造は未だ解かれていない。Fd と PSI の相互作用様式を構造生物学的に解明することにより、Fd と PSI との複合体形成メカニズムを明らかにできると考えた。

キーワード： 転移交差飽和法、膜タンパク質、光合成、循環的電子伝達、フェレドキシン

著者ふりがな： のもと なおこ、うえだ たくみ、しまだ いちお

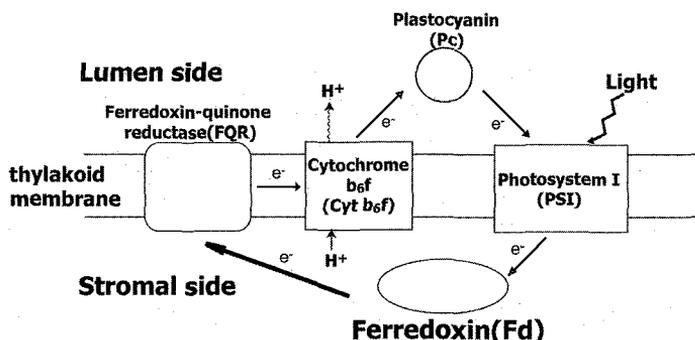


Fig. 1 Schematic diagram of the cyclic electron transport around photosystem I. Ferredoxin(Fd) transfers electrons from photosystem I(PSI) to ferredoxin-quinone reductase(FQR). The electrons are transferred to PSI via cytochrome b<sub>6</sub>f and plastocyanin.

また、FQR の活性は、低分子チラコイド膜タンパク質である Proton Gradient Regulation 5 (PGR5) をはじめとするサブユニット群が協同的に働くことにより担われていると考えられている。しかし、FQR の解析はチラコイド膜に埋め込まれた状態で行う必要があるため、FQR のサブユニット全体に関する知見はとぼしく、PGR5 の FQR 活性における具体的な役割も不明である。Fd と FQR の相互作用様式が解析できるならば、FQR の作用機構に関して重要な知見が得られると考えた。

PS I および cyt. b<sub>6</sub>f は、活性を保持した状態で界面活性剤により可溶化する方法が確立されており、単独状態での立体構造が解かれている。しかし、1. Fd と FQR および PSI との複合体は、電子輸送を素早く行うため寿命が短いこと、2. FQR が脂質二重膜に埋もれた膜タンパク質であることから、Fd と PSI および FQR との複合体に、従来の構造生物学的手法を適用するのは困難である。

当研究室にて開発された、巨大分子量を有する受容体に対するリガンドタンパク質中の結合界面を同定する、転移交差飽和 (TCS) 法を用いれば、Fd 上の PSI および FQR 結合界面を同定できることが期待される。そこで本研究では、Fd 上の PSI および FQR との相互作用界面残基を同定することにより、PSI-Fd-FQR 間の電子輸送機構を解明することを目的とした。

[材料および方法] 安定同位体標識を施したホウレンソウ由来 Fd I は、大腸菌 BL21(DE3)-CodonPlus-RP を用いて大量発現させ、超音波破碎後可溶性画分より Sepharose 6B、Resource PHE、Hiload Superdex 75 カラムを用いて SDS-PAGE にて単一バンドとなるまで精製した。また、ホウレンソウの葉から調製したチラコイド膜を超音波処理することによりベシクルを形成させ、生じた Inside-out ベシクルと Right side-out ベシクルを、デキストラン/ポリエチレングリコールの水性二層分配により分離した。加えて、n-dodecyl-β-D-thiomaltoside で可溶化した PS I ミセルおよび n-undecyl-β-D-maltoside で可溶化した cyt.b<sub>6</sub>f ミセルを、先行論文の方法に従ってホウ

レンソウの葉より調製した。得られた Fd、PS I ミセル、cyt.b<sub>6</sub>f ミセルおよびチラコイド膜ベシクルが、電子輸送活性を保持していることを確認した。20 mM KPi, 100 mM NaCl, pH 6.5, 80% D<sub>2</sub>O に溶解した、50 または 100 μM の均一 [<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N] 標識 Fd に対し、PS I ミセル、cyt.b<sub>6</sub>f ミセルおよびチラコイド膜ベシクルをそれぞれ 1/5、1/10、1/5 倍量混合し、NMR サンプルとした。NMR 測定は、クライオプローブを装着した Avance 800 を用いて、測定温度 20 °C にて行った。

[結果] 最初に、Fd 上の PSI との結合界面を同定するために、酸化型 Fd と PSI ミセルを混合し、TCS 実験を行った。その結果、Y3, L7, V14, C18, D21, V22, E30-I33, K52, T53, S55, D66, D67, I69, D70, V82, S83, V85, T86, I87, A97 において、ラジオ波照射に伴う 25 % 以上のシグナル強度減少が観測された。これらの残基を Fd 立体構造上にマッピングした結果、T53 近傍および E30-I33 が連続面を形成していた (Fig. 2A)。一方、酸化型 Fd に対して界面活性剤のみを添加した対照実験においては 20% 以上の強度減少は観測されなかった。したがって、T53 近傍および E30-I33 は、PSI との結合界面上に存在すると考えた。

次に、FQR との相互作用を検出するために、PSI および FQR の Fd 結合界面が外側を向いた right side-out ベシクルを用いた TCS 実験を行った。その結果、PSI ミセルとの TCS 実験で強度減少が観測された E30, E31, I33 に加えて、K4, D84 にラジオ波照射にともなう強度減少が観測された (Fig. 2B)。一方、PSI および FQR の Fd 結合界面が内側を向いた inside-out ベシクルを用いた TCS 実験では、ラジオ波照射に伴う 20% 以上のシグナル強度減少は観測されなかった。以上の結果から、K4 および D84 が FQR との結合界面に存在する可能性があると考えた。

また、いずれの TCS 実験においても、常磁性緩和効果 (PRE) のため、[2Fe-2S] クラスタ近傍の残基のアミドプロトンのシグナルは観測されなかった (Fig. 2C)。

[考察] プラストシアニン-PSI 間相互作用の TCS 解析においては、酸性クラスターに強度減少は観測されなかったのに対し、本研究の Fd-PSI 相互作用の TCS 解析では酸性クラスターにシグナル強度減少が観測された。したがって Fd-PSI 相互作用では酸性クラスターが最終的な複合体の安定化にも寄与していることを示唆する。

酸化型 Fd を用いた TCS 実験では、Fd の [2Fe-2S] クラスタの常磁性緩和増大効果の影響を受けている。そこで、この影響を排除するために現在、Fd の [2Fe-2S] クラスタの鉄イオンを、反磁性のガリウムに置換した Fd を調製し、TCS 実験を行うことを試みている。

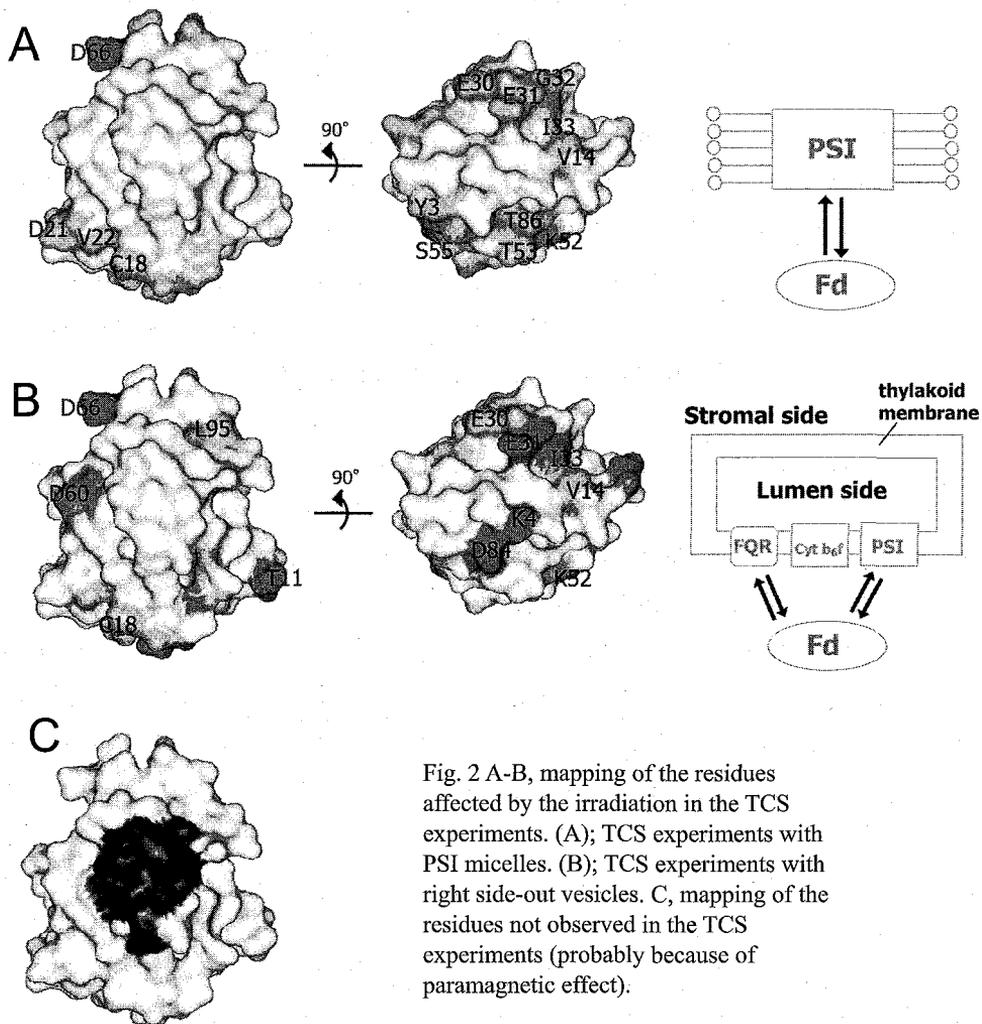


Fig. 2 A-B, mapping of the residues affected by the irradiation in the TCS experiments. (A); TCS experiments with PSI micelles. (B); TCS experiments with right side-out vesicles. C, mapping of the residues not observed in the TCS experiments (probably because of paramagnetic effect).

P023

Cvt経路関連タンパク質Atg8とAtg19 C末の複合体構造解析

(<sup>1</sup>北大・院薬・構造生物, <sup>2</sup>北大・生命科学院・構造生物,  
<sup>3</sup>基生研・分子細胞生物)

○久米田 博之<sup>1</sup>, 足立 わかな<sup>2</sup>, 小椋 賢治<sup>1,2</sup>, 野田 展生<sup>1,2</sup>,  
藤岡 優子<sup>1</sup>, 中戸川 仁<sup>3</sup>, 大隅 良典<sup>3</sup>, 稲垣 冬彦<sup>1,2</sup>

NMR structure analysis of the Cvt pathway related proteins, Atg8 and Atg19.

(<sup>1</sup>Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, <sup>2</sup>Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Life Science, Hokkaido University, <sup>3</sup>Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology)

○Hiroyuki Kumeta<sup>1</sup>, Wakana Adachi<sup>2</sup>, Kenji Ogura<sup>1,2</sup>, Nobuo Noda<sup>1</sup>, Yuko Fujioka<sup>1</sup>,  
Hitoshi Nakatogawa<sup>3</sup>, Yoshinori Ohsumi<sup>3</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>1,2</sup>

The cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway is a selective autophagy pathway in yeast, whereby the resident vacuolar hydrolases, mainly aminopeptidase 1 (Ape1) are directly targeted from the cytoplasm to the vacuole. The precursor Ape1 (prApe1) comprised of homo-dodecamer assembles into a Cvt complex. Atg19 binds to the propeptide of prApe1 and mediates targeting of the Cvt complex to the preautophagosomal structure (PAS) through binding to lipidated Atg8. It has been recently described that the C-terminal 10 residues of Atg19 is essential for Atg8 binding. Here, we report the complex structure of Atg8 and Atg19 C-terminal peptide and discuss their interaction mode.

[はじめに] オートファジーは全ての真核生物において保存されている飢餓条件に対する細胞の防御機構である。オートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜構造体に囲まれた細胞質成分がリソソームまたは液胞へと輸送される。輸送された細胞質成分は液胞内酵素により分解され新たな細胞成分の原料として再利用される。*Saccharomyces cerevisiae*において発見されたCytoplasm to vacuole targeting (Cvt) 経路は富栄養条件においても発現する選択的オートファジーの一種であり、主に液胞内分解酵素であるAminopeptidase I (Ape1) が輸送される。細胞質中で翻訳され、12量

Cvt pathway, Atg8, Atg19, complex structure

くめた ひろゆき、あだち わかな、おぐら けんじ、のだ のぶお、ふじおか ゆうこ、なかとがわ ひとし、おおすみ よしのり、いながき ふゆひこ

体化したApe1はN末にあるプロペプチド領域によってAtg19と結合する。Atg19はAtg8またはAtg11を介して隔離膜前駆体であるpre-autophagosomal structure (PAS) に局在する。近年、Atg8との相互作用にはAtg19のC末10残基が重要であることが報告された。

本発表では Atg8 および Atg19 C 末 21 残基 (以下、Atg19 C21) の複合体立体構造および Atg8 の標的認識に関する考察について報告する。

[方法・結果] Atg8 の Atg19 C21 認識部位を特定するため、滴定実験を行った。0.28 mM  $^{15}\text{N}$  ラベル Atg8 に対して、0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2 モル等量となるよう Atg19 C21 を加え、それぞれ  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定した。結果、slow exchange でのピーク摂動が確認され、1.5 モル等量において飽和した。ほぼ全ての残基由来の信号において摂動が確認されたが特に  $\beta 2$  ストランド近傍が顕著であった。

より詳細な相互作用様式を明らかにするために NMR 法による複合体立体構造解析を行った。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ラベル Atg8 + ノンラベル Atg19 C21 ならびに ノンラベル Atg8 +  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ラベル Atg19 C21 複合体をそれぞれ調製し、各種 NMR 測定を行った。NMR 測定は、Varian 社製 UNITY INOVA 800 MHz および 600 MHz 分光計によって行い、立体構造計算には CYANA 2.1 を用いた。得られた立体構造を Fig に示す。Atg19 C21 は Atg8 の  $\beta 2$  ストランド近傍に結合していた。Atg19 C21 は C 末側 10 残基においてのみ Atg8 との分子間 NOE が観測された。

[考察] Atg8 の Atg19 C21 結合面は塩基性を呈しており、これは Atg8 ホモログ間で保存されている。Atg19 C21 の C 末領域は酸性残基が続いており静電相互作用により結合すると考えられる。

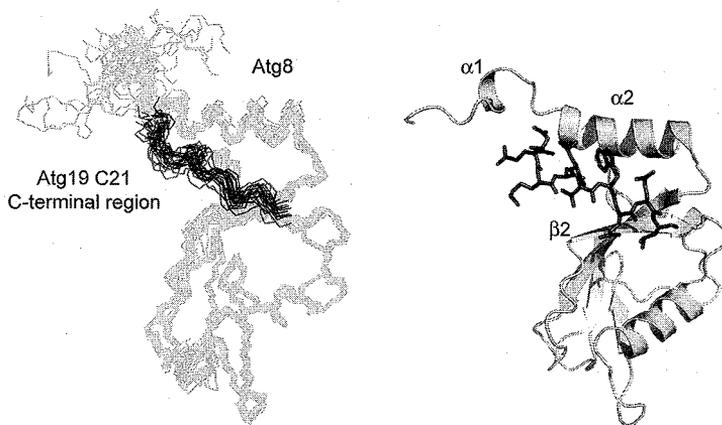


Fig. Complex structure of Atg8 and Atg19 C21.

(left, ensemble 20 structures. right, ribbon diagram of Atg8 and stick model of Atg19 C21)

## タキプレシン I の DPC および LPS との相互作用解析

(北大院・理<sup>1</sup>、北大院・生命<sup>2</sup>、富山大・薬<sup>3</sup>、九大院・理<sup>4</sup>)

杉田圭太郎<sup>1</sup>、○神谷昌克<sup>2</sup>、大久保知行<sup>1</sup>、上島達郎<sup>2</sup>、島本怜史<sup>1</sup>、多々見文恵<sup>2</sup>、相沢智康<sup>1</sup>、水口峰之<sup>3</sup>、川畑俊一郎<sup>4</sup>、出村誠<sup>2</sup>、河野敬一<sup>1</sup>

### Structural analysis of Tachyplesin I with DPC and LPS

<sup>1</sup>Grad. Sch. of Sci., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. of Life Sci., Hokkaido Univ., <sup>3</sup>Fac. of Pharmaceut. Sci., Toyama Univ., <sup>4</sup>Dept. of Biol. Grad. Sch. of Sci., Kyushu Univ.

Keitaro Sugita<sup>1</sup>, Masakatsu Kamiya<sup>1,2</sup>, Tomoyuki Ohkubo<sup>1</sup>, Tatsuro Kamijima<sup>2</sup>, Satoshi Shimamoto<sup>1</sup>, Fumie Tatami<sup>2</sup>, Tomoyasu Aizawa<sup>1,2</sup>, Mineyuki Mizuguchi<sup>3</sup>, Shun-ichiro Kawabata<sup>4</sup>, Makoto Demura<sup>2</sup>, Keiichi Kawano<sup>1</sup>

Antimicrobial peptides are an important component of the innate defenses of all species of life. Tachyplesin I was an antimicrobial peptide found in hemocytes of the Japanese horseshoe crab. The activity of tachyplesin I is derived from its ability to permeabilize the bacterial cell membranes. However, the detailed mechanism has yet to be elucidated. To better understand the action mechanism of tachyplesin I, we performed a structural analysis of tachyplesin I in the presence of DPC and LPS reasonably mimicking the membrane environment. In this presentation, we will discuss the action mechanism of antimicrobial activity based on the structures of tachyplesin I with lipid micelles.

#### 【要旨】

抗菌ペプチドは自然免疫において重要である。タキプレシン I はカブトガニの血球から発見された抗菌ペプチドである。抗菌ペプチドは一般に細菌の細胞膜を破壊することで抗菌活性を示すと考えられているが、詳細な分子機構については未だ議論の的である。タキプレシン I やそのアナログは様々な感染症に対する治療に有効であると考えられており、抗菌活性の分子機構の解明が期待される。

我々は、タキプレシン I の活性メカニズムを理解するため、細胞膜のモデル膜として用いられる DPC ミセルやリポ多糖存在下での NMR 測定を行った。本発表では、DPC およびリポ多糖存在下でのタキプレシン I の構造を基にその活性機構について議論したい。

<キーワード> 抗菌ペプチド、自然免疫、膜、リポ多糖

すぎた けいたろう、かみや まさかつ、おおくぼ ともゆき、かみじま たつろう、たみ ふみえ、あいざわ ともやす、みずぐち みねゆき、かわばた しゅんいちろう、でむら まこと、かわの けいいち



## RIG-I C 末端側ドメインの機能解析

<sup>1</sup>北大・院・薬, <sup>2</sup>京大・ウイルス研○高橋 清大<sup>1</sup>, 米山 光俊<sup>2</sup>, 西堀 達哉<sup>1</sup>, 久米田 博之<sup>1</sup>, 成田 亮<sup>2</sup>,  
平井 玲子<sup>2</sup>, 藤田 尚志<sup>2</sup>, 稲垣 冬彦<sup>1</sup>

## Solution structure of RIG-I CTD and its functional implications

○Kiyohiro Takahashi<sup>1</sup>, Mitsutoshi Yoneyama<sup>2</sup>, Tatsuya Nishihori<sup>1</sup>, Hiroyuki Kumeta<sup>1</sup>, Ryo Narita<sup>2</sup>, Reiko Hirai<sup>2</sup>, Takashi Fujita<sup>2</sup> and Fuyuhiko Inagaki<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Genetics, Institute for Virus Research, and Laboratory of Molecular Cell Biology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University

RIG-I (Retinoic acid inducible gene-I) is an essential factor that recognizes viral RNAs and transduces type-I interferon signal that induces cellular immunoresponses. RIG-I is known to have tandem CARDs and a DEAD box like helicase domain from N-terminus to C-terminus and is suggested to form a compact closed structure. Upon viral infection, the helicase domain recognizes viral RNAs, and then releases tandem CARDs for downstream signal transduction. Our recent studies showed that RIG-I has extra domain that is located at the C-terminus to the helicase domain (called C-terminal domain; CTD). We found RIG-I CTD recognizes viral RNAs specifically and has important roles to form a closed structure. We solved the solution structure of CTD and specified the surface that interacts with viral RNAs.

## 背景

ウイルスは宿主に感染する際、二重鎖 RNA (dsRNA) のような特徴的な RNA を作り出すことが知られている。これに対し我々の体は RIG-I (Retinoic acid inducible gene-I) と呼ばれるヘリカーゼ様タンパク質を用い、ウイルス RNA を認識することにより免疫の誘導を行う。

RIG-I はマルチドメインタンパク質であり、N 末端側から、CARD を二つ、C 末端側に helicase ドメイン及び、200 残基程度の未知の領域を持ち、通常はドメイン間相互作用により閉じた構造を持つと考えられている。ウイルス感染の際には、helicase ドメインがウイルス RNA を認識し、構造変化を起こし、CARD を開放することにより、下流のやはり CARD を持

---

キーワード : 自然免疫

著者ふりがな : たかはしきよひろ, よねやまみつとし, にしほりたつや, くめたひろゆき, なりたりよう, ひらいれいこ, ふじたたかし, いながきふゆひこ

つシグナル伝達因子 IPS-1 (MAVS, Cardif, VISA)との相互作用によりシグナルを伝達する。また、RIG-I には RNA に対して、特異認識を示すことが知られており、ウイルス由来の dsRNA、5'に三リン酸を持つ一重鎖 RNA(5'ppp-ssRNA)に対して、結合、活性化するものの、普遍的な一重鎖 RNA(ss-RNA)には応答しないことが知られている。

## 実験

我々はバイオフィオマティクス、プロテアーゼを用いた限定分解により、helicase の更に C 末端側にドメインがあることを発見した(以後、C-terminal domain; CTD と呼ぶ)。また、このドメインが全長の RIG-I と同様に dsRNA、5'ppp-ssRNA、とは結合するものの、ssRNA とは結合しないことを確かめ、この領域が RIG-I において RNA の特異的認識を行うドメインであることを同定した。

RIG-I CTD の大腸菌による、大量発現系、精製系を構築し、NMR による溶液構造解析を行った。RIG-I は 6 対と 3 対のβシートを二つのαヘリックスが繋ぎとめる形でコアを形成していた。また、データベース Dali を用いた結果、その構造が Rab8 GTPase の GEF である Mss4 とよく似た構造をもつことがわかった。しかし、Mss4 において、Rab8 との結合に必要な、ターン構造は保存されて居らず、逆に Mss4 には見られない、C 末端に至る、長いリンカー領域(Fig.1 C-terminal linker region)と、フレキシブルなリンカー領域が存在した。(Fig.1 flexible linker)

RIG-I CTD は C-terminal linker region と flexible linker に囲まれる形で、広い塩基性の表面(Fig. 1 basic surface)を持ち、各種 RNA を用いた滴定実験の結果、この塩基性面が RNA の認識に関わることが判明した。また、結合に関与する塩基性アミノ酸に対する変異実験も、この結果を後押しするものであった。

## 結論

昨今の研究では、RIG-I におけるウイルス RNA の特異的認識は helicase ドメインによって担われていると考えられていた。これに対して、我々は RIG-I が 150 残基程度の短い CTD を用い、この RNA の特異的認識を行っていることを明らかにした。また、Mss4

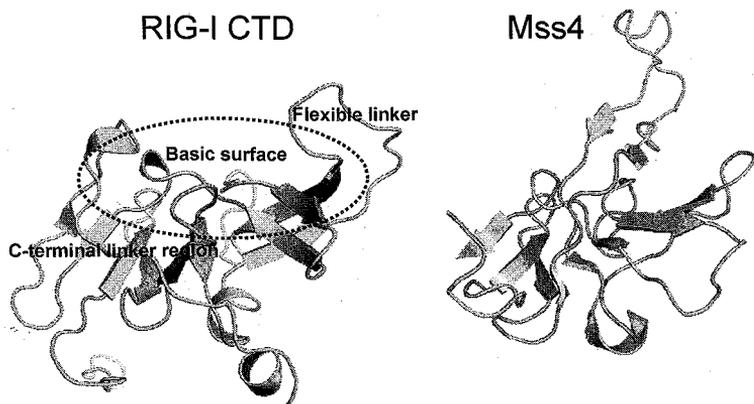


Figure 1 Comparison of the structure of RIG-I CTD and Mss4

との構造を比較することによりその特徴的な領域がこの認識機構に関わっていることを明らかにした。

出芽酵母カルモジュリンのCa<sup>2+</sup>結合体の構造解析

(<sup>1</sup>北大・生命科学院・構造生物、<sup>2</sup>北大・院薬・構造生物、  
<sup>3</sup>北大・院理・生物有機化学)

○吉田良輔<sup>1</sup>、伊藤浩之<sup>2</sup>、久米田博之<sup>2</sup>、小椋賢治<sup>1,2</sup>、  
 高橋清大<sup>2</sup>、矢澤道生<sup>3</sup>、稲垣冬彦<sup>1,2</sup>

Solution structure of Ca<sup>2+</sup>-bound calmodulin from *Saccharomyces cerevisiae*

(<sup>1</sup>Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Life Science, Hokkaido University, <sup>2</sup>Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, <sup>3</sup>Bioorganic Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University)

○Ryosuke Yoshida<sup>1</sup>, Hiroyuki Ito<sup>2</sup>, Hiroyuki Kumeta<sup>2</sup>, Kenji Ogura<sup>1,2</sup>,  
 Kiyohiro Takahashi<sup>2</sup>, Mitio Yazawa<sup>3</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>1,2</sup>

Calmodulin (CaM) is an essential eukaryotic Ca<sup>2+</sup>-binding protein involved in a multitude of cellular functions. It generally contains four Ca<sup>2+</sup>-binding motifs called EF-hands (EF1~4 from the N-terminus), while calmodulin from *Saccharomyces cerevisiae* (yCaM) contains three motifs. The yCaM EF4 is incapable of binding Ca<sup>2+</sup> because of displacement of fetal residues to bind Ca<sup>2+</sup>. We have focused on the structure of Ca<sup>2+</sup>-bound yCaM, so the mechanism that yCaM binds target peptide is elusive. Here, We report the solution structure of Ca<sup>2+</sup>-bound yCaM.

## 【序論】

カルモジュリン (CaM) は真核細胞中に普遍的に存在しているCa<sup>2+</sup>結合タンパク質であり、ヘリックス-ループ-ヘリックスにより構成される4つのEF-hand構造 (EF1~4) を有することが知られている。通常、ひとつのEF-handにつき、1つのCa<sup>2+</sup>が結合する。脊椎動物においてはその一次構造はほぼ完全に保存されている。しかし、出芽酵母由来カルモジュリン (yCaM) では、脊椎動物と比較して一次構造の相同性が60%程度と低いことや、Ca<sup>2+</sup>が3分子しか結合しないなどの相違点がある。特に大きな相違点としてEF4にCa<sup>2+</sup>が結合し

キーワード：カルモジュリン

○よしだ りょうすけ、いとう ひろゆき、くめた ひろゆき、おぐら けんじ、たかはし きよひろ、やざわ みちお、いながき ふゆひこ

ない点が挙げられる。これはyCaMのEF4にはCa<sup>2+</sup>と結合するのに必要な残基が他の残基に置換されているためである。これまで、Ca<sup>2+</sup>結合型yCaMの立体構造は明らかになっておらず、その標的ペプチドの認識に関する知見も十分ではない。本発表では、Ca<sup>2+</sup>結合型yCaMについてNMRを用いて3次元立体構造解析を行い、構造に関して得られた新たな知見について報告する。

### 【実験】

yCaMおよびyCaM121（後述）の立体構造決定には、0.9 mM <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>Nラベル体を用いた。Varian社製UNITY INOVA 600/800 MHz分光計を用いてNMR測定を行い、立体構造計算にはCYANA2.1を用いた。

### 【結果】

yCaMの<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>Nラベル体を用いてNMR法により解析を試みたが、EF4は運動性が高い領域であることがわかり、完全な帰属は困難であった。そこで、EF4を部分的に欠損させたコンストラクト（yCaM121）を作製し、[<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N]-HSQCを測定することでyCaMと比較を行った。その結果、EF1～3由来のピークについて、両者のスペクトル間での一致が確認された。これは、EF4がランダムな構造をとりEF4を欠損させてもCa<sup>2+</sup>結合型yCaMの全体構造が保持されていることを意味する。yCaM121について得られた立体構造を図1に示した。構造解析の結果、EF1-EF2間およびEF1-EF3間に多数のNOEが観測された（図1）。従来の脊椎動物のCaMはEF1-EF2、EF3-EF4でそれぞれ独立したドメインを形成する。しかし、Ca<sup>2+</sup>結合型yCaMではEF1～3で単一のドメインを形成することが示唆された。

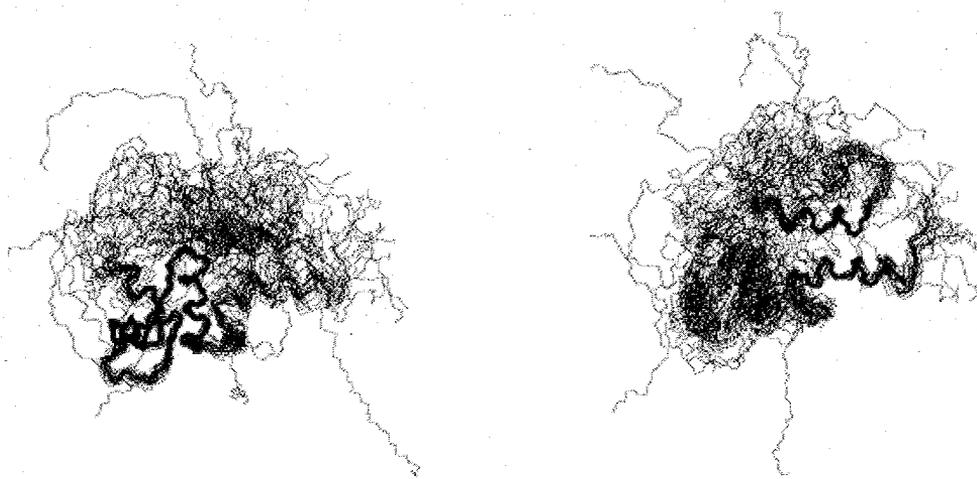


Fig.1. Superposition of 20 calculated structures of the yCaM121 converge conditionally in the range of EF1-EF 2 (left) and EF1-EF 3 (right).

P027 新規亜鉛フィンガーモチーフ CYR ドメインの構造機能解析

(京大院工<sup>1</sup>, 阪大蛋白研<sup>2</sup>, 首都大東京大院理工<sup>3</sup>, 東北大加齢研<sup>4</sup>)

○磯貝信<sup>1</sup>, 有吉眞理子<sup>1</sup>, 朽尾豪人<sup>1</sup>, 池上貴久<sup>2</sup>, 伊藤隆<sup>3</sup>, 菅野新一郎<sup>4</sup>,  
安井明<sup>4</sup>, 白川昌宏<sup>1</sup>

Structure and Functional Analysis of Novel Zinc-finger motif, CYR domain  
○Shin Isogai<sup>1</sup>, Mariko Ariyoshi<sup>1</sup>, Hidehito Tochio<sup>1</sup>, Takahisa Ikegami<sup>2</sup>, Yutaka Ito<sup>3</sup>, Shin-ichiro Kanno<sup>4</sup>, Akira Yasui<sup>4</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Engineering, Kyoto University

<sup>2</sup> Institute for Protein Research, Osaka University

<sup>3</sup> Graduate School of Sciences and Engineering, Tokyo Metropolitan University

<sup>4</sup> Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

CYR (Cystein-tYrosine-aRginine) motif is a novel zinc-finger motif consists of ~30 a.a. which has been shown to implicated in the damaged DNA repair functionality of the DNA repair enzymes. To clarify function and conservation of the CYR motif, we choose two homologs of CYR motif for the analysis. <sup>15</sup>N-HSQC spectra show both peptides are unfolded under the condition when metal ions are depleted, and folded when Zn(II) ions are added to the M9(<sup>15</sup>N) medium. The Zn(II) ion dependency are reconfirmed <sup>15</sup>N-HSQC spectra chemical shift perturbation experiments of <sup>15</sup>N labeled CG1218-PA CYR domain titrated with Zn(II) ions. Structure determination and further characterization of these CYR domains are in progress.

【序論】CYR(Cystein-tYrosine-aRginine)モチーフは新規に発見された DNA 修復酵素に多く見られる 30 残基ほどの C2H2 型の新規亜鉛フィンガー様モチーフであり、Cys-X<sub>5</sub>-Cys-X<sub>6</sub>-His-X<sub>5</sub>-His という特異なスペーシングを持つ。この CYR モチーフは DNA 修復酵素の C 末端もしくは N 末端に保存されているが、その構造的、機能的特徴はまだ明らかになっていない。共同研究者である東北大学の安井教授のグループらにより、PALF (PNK and APTX-like FHA) DNA 修復酵素におけるタンデム CYR モチーフの役割は、塩基喪失部位 (AP サイト) や損傷塩基 DNA の認識とそれらの 5' 側へのニックの導入、二本鎖 DNA の末端の切断、その他 DNA 修復酵素との相互作用などのいくつかの機能があることが明らかになった。しかし、これらの機能がタンデム CYR モチーフのみかあるいはモチーフに含まれる他の未知ドメインによる機能なのかは明らかになっていない。また、シングルの CYR モチーフは高等動物の多くの DNA 代謝関連蛋白質で見つかった。そこで、CYR モチーフ単体の機能を明らかにするため、シングル CYR モチーフをもつ、ショウジョウバエ機能未知

キーワード : DNA 修復, 亜鉛フィンガー, CYR モチーフ

いそがいしん, ありよしまりこ, とちおひでひと, いけがみたかひさ, いたうゆたか, かのしんいちろう, やすいあきら, しらかわまさひろ

CG1218-PA タンパク質を対象として立体構造の決定および機能解析を行うことを目指した。

【実験】CG1218-PA の CYR モチーフの  $^{15}\text{N}$  および  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識ペプチドはユビキチン様タンパク質 SUMO1 の高い可溶性とその C 末端切断酵素 SENP2 の高い特異性を利用するため、GST-SUMO1 融合タンパク質として大腸菌にて発現した。GST-SUMO1 融合 CYR ペプチドはアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。NMR 測定は Bruker Biospin 社製の 500MHz、600MHz、700MHz の各 NMR 装置を用いて行った。また、 $^{15}\text{N}$ -HSQC の解析、CG1218-PA の CYR モチーフの立体構造の決定には NMRPipe、Sparky、CARA、ATNOS/CANDID、CYANA 等の解析ソフトウェアを用いた。

【結果と考察】M9 最少培地に亜鉛(II)を添加せずに得られた  $^{15}\text{N}$  標識 CG1218-PA の CYR ペプチドは共に  $^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトルにおいて Unfold の  $^1\text{H}$  化学シフトを示していた。 $^{15}\text{N}$  標識 CG1218-PA-CYR に対して亜鉛(II) イオンを添加し、 $^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトルにおいて観察したところ、Fold 状態と思われる拡散したピークの強度が上昇した。M9 最少培地に亜鉛(II)を添加した場合に得られたスペクトルは CG1218-PA-CYR に亜鉛を添加した際に得られたスペクトルと同様のものであった。この CYR モチーフが構造形成するために亜鉛(II)が必須であることが分かった (Fig.1)。

$^{13}\text{C}$ -NOESY、 $^{15}\text{N}$ -NOESY スペクトルおよび ATNOS/CANDID/CYANA により約 500 の距離情報を修得することができた。得られた CG1218-PA-CYR の 20 個の初期構造は 1 本の短い  $\alpha$ -helix ともう一つの  $\alpha$ -helix 状の二次構造からなっており、その間に亜鉛(II)の配位する空隙が存在すると予測される。今後は構造の細密化・機能解析等を行っていく。

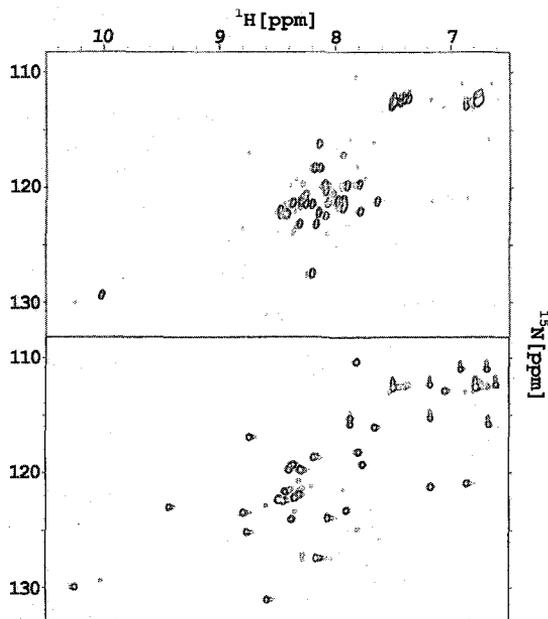


Fig.1  $^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of CG1218-PA-CYR without Zn(II) (upper), and with Zn(II) (lower).

NMRによって解明されたOsCnfU-1AドメインI, IIの  
鉄-硫黄クラスター受け渡しにおける協調した機能  
(北大・生命科学<sup>1</sup>, 茨城大・農<sup>2</sup>、農業生物資源研<sup>3</sup>、広島大・生物圏<sup>4</sup>)  
○斉尾智英<sup>1</sup>, 久米田博之<sup>1</sup>, 小椋賢治<sup>1</sup>, 横地政志<sup>1</sup>, 朝山宗彦<sup>2</sup>,  
加藤静恵<sup>3</sup>, 加藤悦子<sup>3</sup>, 手島圭三<sup>4</sup>、稲垣冬彦<sup>1</sup>

The Cooperative Role of OsCnfU-1A Domain I and Domain II  
in the Iron-Sulfur Cluster Transfer Process as Revealed by NMR

<sup>1</sup>Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan.

<sup>2</sup>College of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Ibaraki, Japan. <sup>3</sup>Biochemistry Department, National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

<sup>4</sup>Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, Japan.

○ Tomohide Saio<sup>1</sup>, Hiroyuki Kumeta<sup>1</sup>, Kenji Ogura<sup>1</sup>, Masashi Yokochi<sup>1</sup>, Munehiko Asayama<sup>2</sup>, Shizue Katoh<sup>3</sup>, Etsuko Katoh<sup>3</sup>, Keizo Teshima<sup>4</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>1</sup>

OsCnfU-1A is a chloroplast-type Nfu-like protein that consists of tandem repeats sharing high sequence homology with each other. Domain I (73-153) has a CXXC motif suggested to assemble an iron-sulfur cluster whereas domain II (154-226) lacks this motif. We solved the solution structure of domain I. Although domain I was structurally similar to domain II, the electrostatic surface potential was different. Chemical shift perturbation experiment of domain I and II with ferredoxin suggested the following hypothesis: First, an iron-sulfur cluster is assembled on domain I. Second, domain II interacts with ferredoxin that tethers domain I close to ferredoxin. Finally, domain I transfers the cluster to ferredoxin. Thus, domain II facilitates the efficient transfer of the iron-sulfur cluster from domain I to ferredoxin.

【序論】

NifU/Nfu-like タンパク質は、鉄-硫黄(Fe-S)クラスター形成の足場として機能し、電子伝達や代謝反応ばかりでなく、遺伝子の発現調節にも関わっていることが明らかになっている。NifU/Nfu-like タンパク質は高度に保存された CXXC モチーフ中のシステイン残基を使って Fe-S クラスター形成の足場となり、形成したクラスターを Fe-S タンパク質に受け渡す。植物の葉緑体に局在する Nfu-like タンパク質(CnfU)は、形成した Fe-S クラスターを、光合成における電子伝達を担う Ferredoxin に受け渡す機能を持つ。CnfU は 2 回の繰り返しドメインを持ち、N 末端側の domain I は活性中心である CXXC モチーフを持つが、C 末端側の domain II では CXXC モチーフを欠いている。このような配列構成は他の生物の NifU/Nfu-like タンパク質では見られず、植物特有のものである。CXXC モチーフを持つ domain I はクラスター形成の足場として機能すると考えられているが、そのモチーフを持たない domain II の機能・存在意義は未知であった。本研究では、イネの蛋白質 OsCnfU1A domain I を大腸菌系無細胞タンパク質合成により調製し、NMR を用いた立体構造解析を行なった。OsCnfU1A domain

Key words : cell-free protein synthesis, *Oryza sativa*, photosystem,  
Fe-S cluster protein

著者ふりがな : さいおともひで、くめたひろゆき、おぐらけんじ、よこちまさし、あさやまむねひこ、  
かとうしづえ、かとうえつこ、てしまけいぞう、いながきふゆひこ

IIを始めとする他の NifU/Nfu-like タンパク質との比較や、Ferredoxin との NMR 滴定実験により、Fe-S クラスター受け渡しにおける CnfU の domain I, domain II のそれぞれの役割について検証した。

#### 【実験】

自作の改良型透析器を用いた大腸菌系無細胞タンパク質合成により、 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  ラベル OsCnfU1A domain I を His-tag 融合タンパク質として発現させ、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。NMR 測定は Varian 社製 Unity Inova 600 MHz, 800 MHz 分光計を用いて 25°C にて行った。スペクトル解析には Olivia を使用し、 $^{13}\text{C}$ -および  $^{15}\text{N}$ -NOESY からの距離制限と TALOS 由来の二面角制限を用いて、CYANA によって立体構造計算を行った。さらに、Ferredoxin を OsCnfU1A domain I, domain II に対して滴定し、domain I, domain II の HN-HSQC スペクトルの化学シフト変化を観測した。

#### 【結果・考察】

改良型透析器を用いて OsCnfU1A domain I を発現させたところ、1mL 反応内液あたり 2.7mg の収量を得ることができた。

OsCnfU1A domain I の立体構造は、domain II と同様の骨格構造を有してはいたものの、その静電ポテンシャルは大きく異なっていた。Domain II は保存された塩基性残基によって形成された広い塩基性面を呈しているのに対し、domain I ではその塩基性領域の広がりが抑えられていた。NMR 滴定実験の結果、domain I と ferredoxin の間には特異的な相互作用は見られなかったのに対して、domain II と ferredoxin の間には特異的な相互作用が観測された。Domain II の Ferredoxin との相互作用面は、domain II に特徴的な塩基性領域と、それと隣接した疎水性領域から構成されていることが明らかとなった。本研究により、Ferredoxin への Fe-S クラスター受け渡し機構について、次のような仮説が提唱された。1. Fe-S クラスターが domain I の CXXC モチーフ上に形成される。2. Domain II が Ferredoxin と相互作用することによって Ferredoxin を domain I に対して引き寄せる。3. Domain I の持つ Fe-S クラスターが Ferredoxin へと受け渡される。

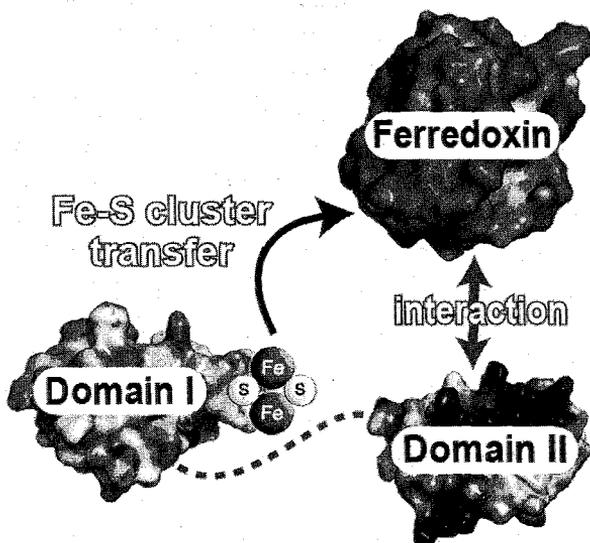


Figure1: Schematic view of the interaction between CnfU and Ferredoxin. Fe-S cluster is assembled on domain I. Domain II interacts with ferredoxin thus tethering domain I close to the ferredoxin. Subsequently domain I transfers the Fe-S cluster to ferredoxin.

【参考文献】 T. Saio et al., *J. Biochem. (Tokyo)* Epub 2007 Jun 1. (PMID:17545250)

## P029 オキシステロール結合タンパク質 OSBP の小胞体局在モチーフと小胞体膜貫通タンパク質 VAP-A からなる複合体の立体構造解析

○古板恭子<sup>1</sup> Jee, JunGoo<sup>1</sup> 深田はるみ<sup>2</sup> 三島正規<sup>1,3</sup> 児嶋長次郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科、<sup>2</sup>大阪府立大学 生命環境科学研究科、<sup>3</sup>首都大学東京大学院 理工学研究科

### Structural analysis of the complex between FFAT motif of OSBP and VAP-A MSP domain

○Kyoko Furuita<sup>1</sup>, Jee, Jun Goo<sup>1</sup>, Harumi Fukada<sup>2</sup>, Masaki Mishima<sup>1,3</sup> and Chojiro Kojima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology,

<sup>2</sup>Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, <sup>3</sup>Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

University

Oxysterol binding protein (OSBP) is a cytosolic receptor of cholesterol and oxysterols such as 25-hydroxycholesterol (25-HC). OSBP is implicated in sterol homeostasis and signal transduction. OSBP is localized to the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum (ER) and translocates to Golgi apparatus membranes after addition of 25-HC or cholesterol depletion. ER localization of OSBP is mediated by complex formation of OSBP with VAMP-associated protein-A (VAP-A). Here, to clarify the structural basis of the interaction between VAP-A and OSBP, we determined solution structure of the complex composed of a human VAP-A major sperm protein (MSP) domain and a human OSBP peptide containing the FFAT motif.

Oxysterol binding protein (OSBP)は、25-hydroxycholesterol (25-HC) を初めとするオキシステロール及びコレステロールの細胞内受容体であり、脂質の恒常性に関わることが知られている。OSBP は通常の細胞では、小胞体膜表面、あるいは Extracellular signal Regulated Kinase (ERK)ホスファターゼ複合体の一部としてコレステロール結合型で細胞質に存在する。しかし、細胞のコレステロールの減少、あるいは 25-HC の増加により、OSBP は小胞体膜表面あるいは細胞質からゴルジ体膜へと移行する。OSBP の小胞体膜表面への局在には、OSBP の中ほどにある FFAT モチーフが、小胞体膜貫通タンパク質 VAMP-associated protein-A (VAP-A)の細胞質側にある Major Sperm Protein (MSP)ドメインと相互作用することが必須である。本研究では、OSBP と VAP-A の相互作用の構造的基盤を確立するために、VAP-A MSP ドメインと FFAT モチーフを含む OSBP フラグメントからなる複合体の立体構造を溶液 NMR により決定したので報告する。

キーワード： タンパク質、ペプチド、複合体、立体構造、等温滴定型熱量計

著者ふりがな： ふるいた きょうこ、じー じゅんぐー、ふかだ はるみ、みしま まさき、こじま ちょうじろう

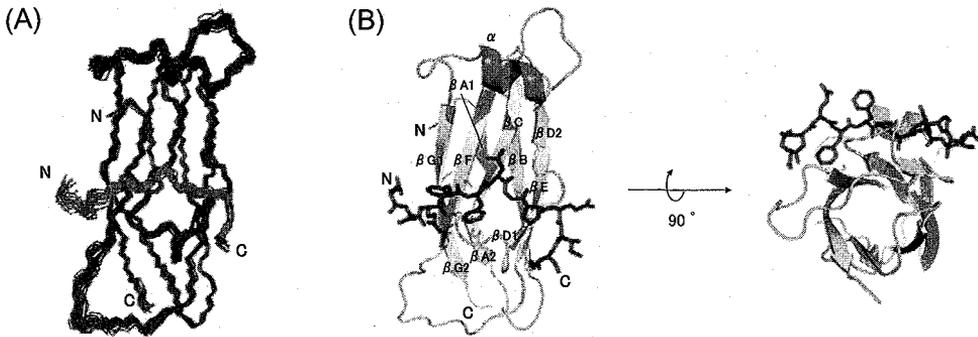


Figure 1. Solution structure of the complex between VAP-A (6-125) and OSBP(356-366). (A) Superimposed picture of 20 lowest energy structures. (B) Ribbon representation of the lowest energy structure of VAP-A. OSBP is shown in stick model.

大腸菌による大量発現系を用い、非標識、 $^{15}\text{N}$  標識および  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識の VAP-A MSP ドメインおよび FFAT モチーフを含む OSBP フラグメントのサンプルを調製した。調製したサンプルを用いた等温滴定カロリーメトリー(ITC)実験の結果、OSBP フラグメントと VAP-A MSP ドメインは解離定数  $1.84 \mu\text{M}$  で 1:1 結合をすることが示された。

複合体の化学シフトの帰属は、主に  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識と非標識からなる複合体の各種多次元 NMR スペクトルを用いて行った。複合体の立体構造は、まず CYANA を用いて構造計算を行い、得られた構造を CNS/ARIA により精密化することで決定した。距離制限情報は、 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識複合体の  $^{13}\text{C}$ -edited NOESY スペクトル、 $^{15}\text{N}$  標識複合体の  $^{15}\text{N}$ -edited NOESY および  $^{15}\text{N}$ -filtered  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY スペクトル、また  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識 VAP-A/非標識 OSBP 複合体の  $^{13}\text{C}$ -filtered  $^{13}\text{C}$ -edited NOESY スペクトルより得た。また、TALOS プログラムにより決定した主鎖二面角情報、HNHB および HN(CO)HB スペクトル、 $^3\text{J}_{\text{CC}}$ , および  $^3\text{J}_{\text{NC}}$ , の測定から得た側鎖  $\alpha_1$  角の情報を構造計算に用いた。得られた立体構造を Figure 1 に示す。VAP-A MSP ドメインは 7 本の  $\beta$  ストランドおよび 1 つの  $\alpha$  ヘリックスを含み、逆平行  $\beta$  シートからなる免疫グロブリン様  $\beta$  サンドイッチ構造を有していた。OSBP フラグメントは FFAT モチーフ部分がストランド状、その両端では屈曲し、VAP-A MSP ドメインの  $\beta$  ストランド C~F にまたがって結合していた。OSBP フラグメントの Phe 359 および Ala 362 の側鎖は VAP-A MSP ドメイン側鎖の疎水性部分からなるポケットにはまりこんでいた。また、いくつかの残基で、側鎖間の静電的相互作用や主鎖間の水素結合がみられた (Figure 2)。

発表では、立体構造に基づいて作成した OSBP フラグメント変異体を用いた ITC 実験の結果も合わせて、VAP-A MSP ドメインと OSBP フラグメントの相互作用について議論する予定である。

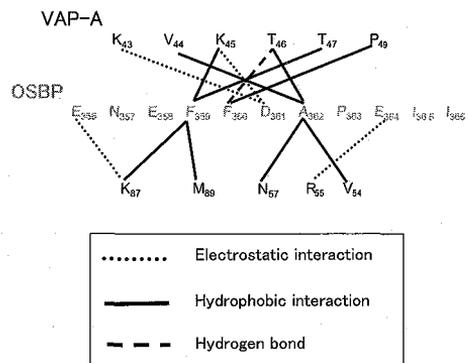


Figure 2. Interactions between VAP-A MSP domain and OSBP fragment.

P030  $T_2$ 緩和分散法を用いたアミノ酸変異の酵素反応に対する  
遠隔作用の解析

(<sup>1</sup>広島大院・理・数理分子、<sup>2</sup>九大・生医研、<sup>3</sup>九大・デジタルメディシン、  
<sup>4</sup>JST/PRESTO)

○古川貴章<sup>1</sup>、大前英司<sup>1</sup>、齋藤貴士<sup>2,3</sup>、神田大輔<sup>2</sup>、月向邦彦<sup>1</sup>、楯 真一<sup>1,4</sup>

**$T_2$  relaxation dispersion analysis to elucidate the long-range mutation effect  
on enzyme reaction**

**Takaaki Furukawa<sup>1</sup>, Eiji Ohmae<sup>1</sup>, Takashi Saitoh<sup>2</sup>, Daisuke Kohda<sup>2</sup>, Kunihiko Gekko<sup>1</sup>,  
and Shin-ichi Tate<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima Univ.,

<sup>2</sup>Medical Inst. Bioregulation, Kyushu Univ., <sup>3</sup>JST/PRESTO

**Abstract:** The enzymatic reaction of dihydrofolate reductase (DHFR) from *Escherichia coli* is shown to be influenced by amino acid replacement to G67 in the flexible loop region (Ohmae et al. 1998). The G67V mutant of DHFR shows reduced  $k_{cat}$  and slight increase in  $K_m$  values. Because G67 resides in the loop region located far from the active site of the enzyme, the observed reduction in activity is quite remarkable. To structurally explore the observed long-range mutation effect on the DHFR reaction, we applied the  $T_2$  relaxation dispersion experiments that are sensitive to detect slow conformational fluctuation in msec time regime. The present experiments using two magnetic fields have shown the presence of the long-range motional coupling between two loops in the enzyme, which modulates the active conformation of the reactive loop. This may explain the observed long-range mutation effect.

The structure and dynamics of protein is becoming focused because of the availability of a various types of elaborate NMR experiments based on the nuclear spin relaxation phenomena. The protein motion in the time regime ranging from  $\mu$ sec to msec is directly linked to the enzymatic reaction. The protein motion in this time regime is still hard

**Keywords:** 蛋白質内部運動、酵素活性、変異体、安定同位体利用NMR

ふるかわたかあき、おおまえいじ、さいとうたかし、こうだだいすけ、  
げっこうくにひこ、たてしんいち

to be tackled with by computer simulations. The NMR experiments, thus, are to be expected to provide fruitful insight into the protein slow conformational dynamics with large amplitudes.

In the present work, we analyzed the long-range mutation effect on the enzymatic reaction of DHFR; the G67V mutation shows the significant reduction in the enzymatic activity. Because G67 resides in the flexible loop located far away from the active site of DHFR (Fig.1), the observed reduction of the enzyme activity is not readily understood. To structurally explore the mutation effect of G67 to the active site, we achieved  $T_2$  relaxation dispersion experiments under two different magnetic fields, 600MHz and 700MHz for  $^1\text{H}$  resonance frequencies. Present analyses have shown the G67V mutation has significant modulation to the conformational dynamics of the

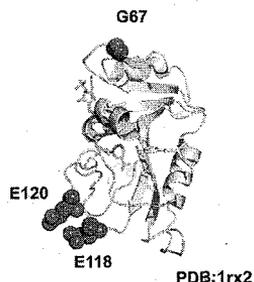


Fig.1: DHFR structure in the complex with ligands.

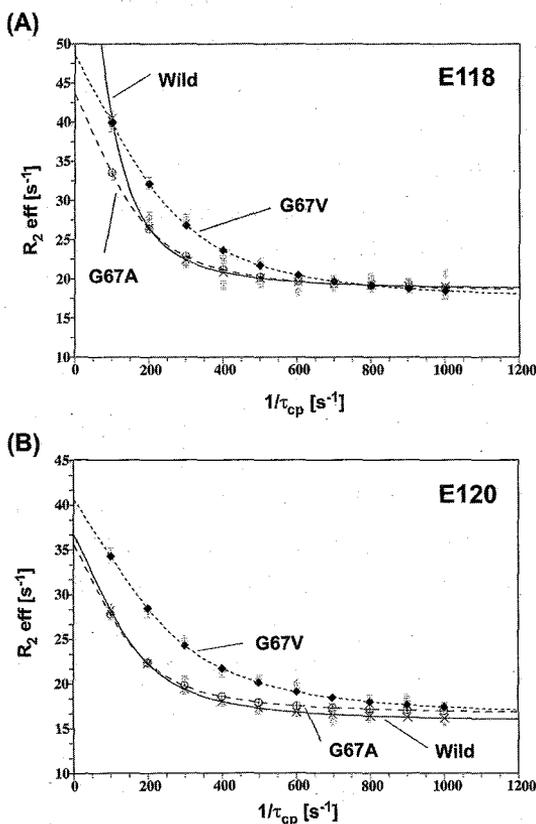


Fig.2: Observed changes in the  $R_2$  dispersion profiles

active loop (residues 117-131, particularly important around E120) (Fig.2). The  $R_2$  dispersion profiles under two different magnetic fields provide the chemical shift difference between two conformations ( $\Delta\omega$ ) and the exchange rate ( $k_{ex}$ ). For E118 in the wild type, we obtained the values  $\Delta\omega = 4.3 \pm 0.1$  ppm with  $k_{ex} = 277.8 \pm 5.0$  Hz. In the case of G67V mutant, the corresponding values were  $\Delta\omega = 5.3 \pm 0.2$  ppm and  $k_{ex} = 720.8 \pm 6.4$  Hz. G67A mutant, which does not show significant change in its activity, showed the similar dynamic parameters to those for the wild type, suggesting the induced change in the dynamics of the active loop can be related to the reduced activity of G67V mutant.

The details in the analyses and the observed dynamics and function relationship for DHFR will be presented.

P031 溶液 NMR を用いた出芽酵母 Ire1p RNase ドメインの解析  
奈良先端大・バイオ<sup>1</sup>、三菱化学生命科学研<sup>2</sup>、奈良先端大・情報<sup>3</sup>  
○河原郁美<sup>1</sup>、Jee JunGoo<sup>1</sup>、河野俊之<sup>2</sup>、箱嶋敏雄<sup>3</sup>、今川佑介<sup>1</sup>、  
河野憲二<sup>1</sup>、児嶋長次郎<sup>1</sup>

#### NMR study of RNase domain of yeast Ire1p

<sup>1</sup>Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology,  
<sup>2</sup>Mitubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS) and <sup>3</sup>Graduate School of Information  
Science, Nara Institute of Science and Technology

○Ikumi Kawahara<sup>1</sup>, JunGoo Jee<sup>1</sup>, Toshiyuki Kohno<sup>2</sup>, Toshio Hakoshima<sup>3</sup>, Yusuke Imagawa<sup>1</sup>,  
Kenji Kohno<sup>1</sup> and Chojiro Kojima<sup>1</sup>

IRE1 is a stress sensor of endoplasmic reticulum (ER) stress, and conserved on many of eucaryotes. ER stress is caused by an accumulation of unfolded proteins in ER lumen. The response to ER stress as known as Unfolded Protein Response (UPR). Ire1p is the ER transmembrane protein and plays a key role in yeast UPR signaling. Cytosolic domain of Ire1p is composed of a kinase domain and a site-specific endoribonuclease (RNase) domain. RNase domain cleaves a *HAC1* mRNA. Hac1 is the UPR-specific transcription factor in yeast. Here we found the soluble Ire1p RNase domain which cleaves target RNA specifically without the kinase domain and gives a well-separated <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum.

#### 【序論】

IRE1 は酵母からヒトに至るまで幅広い生物で保存された小胞体ストレスセンサーである。小胞体ストレスは、何らかの原因で折りたたみが異常なタンパク質が小胞体内に蓄積することで引き起こされる。この小胞体ストレスに対する応答を Unfolded Protein Response (UPR) と呼ぶ。Ire1p は出芽酵母の UPR において、中心的な役割を果たす膜貫通タンパク質である。Ire1p は細胞質側に kinase ドメインと RNase ドメインを持ち、RNase ドメインの活性化によって下流の転写因子 Hac1 のスプライシングを引き起こす。本研究では溶液 NMR を用いて Ire1p の RNase ドメインの構造解析を行うことによって、Ire1p の活性化機構ならびに *HAC1* mRNA の認識機構の解明を目指した。

キーワード：タンパク質 立体構造 小胞体ストレス UPR

著者：○かわはら いくみ、じー じゃんぐー、こうの としゆき、  
はこしま としお、いながわ ゆうすけ、こじま ちょうじろう

### 【ドメインの同定、構造解析】

Ire1p RNase ドメインを大量に調製するために、構造的に安定なドメインの同定と、大量発現系の構築をおこなった。細胞質側のドメイン全長のプロテアーゼによる限定分解から、安定な RNase ドメインの同定に成功した。大腸菌大量発現系を用いて、Ire1p RNase ドメインの発現および精製を行い、 $^{15}\text{N}$  均一標識したサンプルを調製し実験に用いた。得られたフラグメントの円偏光二色性スペクトルを測定した結果、 $\alpha$ ヘリックス構造に富んだ新規フォールドであることが示唆された。また、このフラグメントについては *in vitro* での *HAC1* mRNA 切断活性を確認している（今川ら、未発表データ）。そこで Ire1p RNase ドメインと基質 *HAC1* RNA との相互作用を滴定実験により調べた。*HAC1* mRNA は本来 Ire1p によって2ヶ所切断を受けるが、本研究では切断部位を1つ含む RNA 配列 (5'-CGUAAUCCAGCCGUGAUUACG-3') を用いた。RNA に Ire1p RNase ドメインを滴定した結果、イミノプロトンのスペクトルパターンに変化が生じた。これは Ire1p RNase ドメインが *HAC1* RNA と直接相互作用するとことを示す。

Ire1p RNase ドメインの  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定した結果、NMR 測定に用いる濃度ではサンプルの会合を抑えることができず、良好なスペクトルを得ることができなかった (Figure 1)。そこで測定条件の最適化を行った結果、200 mM リン酸と 2 mM バナジン酸存在条件下で Figure 2 に示すような良好な NMR スペクトルを得ることができた。発表では  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  均一標識したサンプルを用いた 3D NMR 測定および主鎖帰属について報告を行うとともに、Ire1p の *HAC1* mRNA の認識機構について議論する予定である。

Figure 1

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of Ire1p RNase domain at 310K [50 mM potassium phosphate (pH7.4), 50 mM potassium chloride]

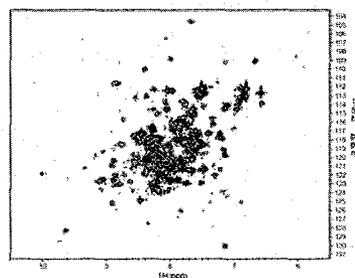
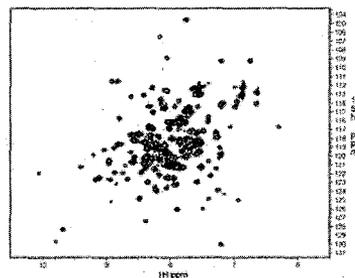


Figure 2

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of Ire1p RNase domain at 310K [200 mM potassium phosphate (pH7.4), 50 mM potassium chloride, 0.5 mM DTT, 2 mM sodium orthovanadate (V)]



## VCIP135 の構造学的研究

(<sup>1</sup>京都大学大学院工学研究科、<sup>2</sup>大阪大学蛋白質研究所、<sup>3</sup>理化学研究所、<sup>4</sup>神戸大学医学系研究科)

○岩津宇洸<sup>1</sup>、中田善三郎<sup>2</sup>、栲尾尚哉<sup>3</sup>、木川隆則<sup>3</sup>、横山茂之<sup>3</sup>、廣明秀一<sup>4</sup>、栲尾豪人<sup>1</sup>、白川昌宏<sup>1</sup>

## Structural study of VCIP135

(<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, University of Kyoto, <sup>2</sup>Institute for Protein Research, University of Osaka, <sup>3</sup>RIKEN, <sup>4</sup>Graduate School of Medicine, University of Kobe)

○Takahiro Iwazu<sup>1</sup>, Zenzaburo Nakata<sup>2</sup>, Naoya Tochio<sup>3</sup>, Takanori Kigawa<sup>3</sup>, Shigeyuki Yokoyama<sup>3</sup>, Hidekazu Hiroaki<sup>4</sup>, Hidehito Tochio<sup>1</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>1</sup>

NSF and p97 are ATPases required for the heterotypic fusion of transport vesicles with their target membranes and the homotypic fusion of organelles. NSF uses ATP hydrolysis to dissociate NSF/SNAPs/SNAREs complexes. In contrast, p97 does not dissociate the p97/p47/SNARE complex even in the presence of ATP. VCIP135 is an essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, and it binds to the p97/p47/syntaxin5 complex and dissociates it via p97 catalyzed ATP hydrolysis. Both VCIP135 and p47 have homologous ubiquitin-like domains.

In this study, we determined the solution structure of VCIP135 UBX domain of rat by solution state NMR spectroscopy.

## [序論]

NSF と p97 はゴルジ体の膜融合に必須の ATPase である。NSF は ATP 加水分解によって NSF/SNAPs/SNAREs 複合体を解離させるが、p97 は ATP 存在下においても p97/p47/SNARE 複合体を解離させることができない。VCIP135 は p97/p47 が仲介する膜融合に必須のタンパク質で、p97/p47/syntaxin5 複合体

---

キーワード：VCIP135、膜融合、UBX、p97

いわづたかひろ なかたぜんざぶろう とちおなおや きがわたかのり  
よこやましげゆき ひろあきひでかず とちおひでひと しらかわまさひろ

に結合し、p97によるATP加水分解を通じて、その複合体を解離させると言われている。さらに、VCIP135は配列解析からUBXドメインを含んでいることが示唆されていて、p97のN末ドメインと結合することが知られている。しかしながら、VCIP135の機能及び構造に関する知見は十分ではない。

本研究の目的は、NMRを用いてVCIP135のUBXドメインの溶液構造の立体構造決定を行い、p97経路の分子機構の知見を得ることである。

### [方法]

大腸菌により、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識されたVCIP135のUBXドメインを調製した。Bruker社の600MHzのNMR装置を用いて多核多次元NMR測定を行い、得られたスペクトルをKujiraで解析することにより、主鎖および側鎖の帰属を行った。さらに、立体構造既知であるp47のp97N末ドメインとの相互作用表面と比較するために、VCIP135のUBXドメインとp97N末ドメインとのNMR化学シフト摂動実験を行った。その結果をFig. 1に示した。

### [結果と考察]

得られたVCIP135のUBXドメインとp97のN末ドメインの相互作用表面はp47のp97N末ドメインとの相互作用表面と非常に良く似ていることが分かった。このことから、VCIP135のUBXドメインがp97との結合に深く関与していて、その結合様式はp47-p97複合体の結合様式と非常によく似ていることが分かった。

現在、 $^{15}\text{N}$ -edited NOESYと $^{13}\text{C}$ -edited NOESYのNOE自動帰属と立体構造計算をCYANA2.1により行っている。本発表では、VCIP135のUBXドメインの構造とp97のN末ドメインとの相互作用の特徴について述べたい。

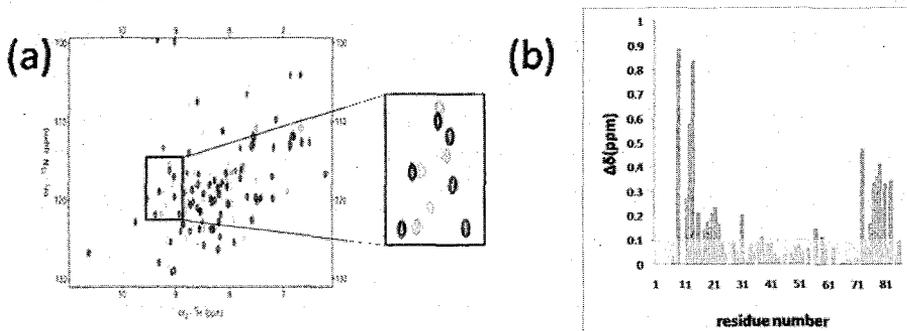


Fig. 1 (a)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of VCIP135-UBX

Black: 0 eq of p97-N

Gray: 3 eq of p97-N

(b) Chemical shift perturbation of VCIP135 UBX domain-p97 N interaction

$$\Delta\delta(^{15}\text{N}+^1\text{H}_\text{N}) = |\Delta\delta^{15}\text{N}|/4.69 + |\Delta\delta^1\text{H}_\text{N}|$$

## 複製開始制御因子 Sld2 のリン酸化による機能制御の解析

(京大院工<sup>1</sup>、阪大蛋白研<sup>2</sup>、国立遺伝学研究所<sup>3</sup>、理化学研究所<sup>4</sup>)○倉富博康<sup>1</sup>、池上貴久<sup>2</sup>、荒木弘之<sup>3</sup>、枳尾尚哉<sup>4</sup>、木川隆則<sup>4</sup>、横山茂之<sup>4</sup>  
有吉真理子<sup>1</sup>、枳尾豪人<sup>1</sup>、白川昌宏<sup>1</sup>

## Structural Analysis of Sld2 Phosphorylation Mechanism

(1Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2Institute for Protein Reserch, Osaka University, 3National institute of Genetics, 4RIKEN Genomic Sciences Center)

○Hiroyasu Kuratomi<sup>1</sup>, Takahisa Ikegami<sup>2</sup>, Hiroyuki Araki<sup>3</sup>, Naoya Tochio<sup>4</sup>, Takanori Kigawa<sup>4</sup>, Shigeyuki Yokoyama<sup>4</sup>, Mariko Ariyoshi<sup>1</sup>, Hidehito Tochio<sup>1</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>1</sup>

A Sld2-Dpb11 protein complex is required for loading DNA polymerases onto replication origins. This complex formation depends on the phosphorylation of Thr84 of Sld2. Previous studies suggest that prior phosphorylation of Ser100 would be essential for the phosphorylation of Thr84. Using NMR spectroscopy, we carried out structural analyses of 32-aa. peptide containing Thr84 and Ser100, and its S100D mutant, which is expected to mimic phosphorylated state. These two peptides showed different NMR spectra. This implies that the phosphorylation of Ser100 induces conformational change in this peptide.

【序論】真核生物は生命体の遺伝情報を担う DNA を正確に複製し遺伝的に同一な娘細胞を作る。この DNA の複製には DNA ポリメラーゼが複製開始領域に結合する事が不可欠である。出芽酵母において、Sld2 (Synthetic Lethality with Dpb11-1) は Dpb11 と複合体を形成し、DNA ポリメラーゼを複製開始領域へリクルートする。この複合体形成には Sld2 の CDK (Cyclin Dependent Kinase) によるリン酸化が必要である事が分かっている。しかし、リン酸化の複合体形成に与える影響は未だ解明されていない。

---

キーワード : Sld2、リン酸化

くらとみひろやす、いけがみたかひさ、あらかきひろゆき、とちおなおや、  
きがわたかのり、よこやましげゆき、ありよしまりこ、とちおひでひと、  
しらかわまさひろ

Sld2 は 11 箇所の CDK リン酸化部位を持ち、そのうち Thr84 のリン酸化のみが Dpb11 との相互作用に直接関与する事が分かっている。その他の CDK-リン酸化モチーフは Dpb11 との相互作用には直接は関わっておらず、Thr84 のリン酸化を調節している事が示唆されている。特に Ser100 のリン酸化は構造学的な観点から Thr84 のリン酸化に必須であると考えられている。本研究はこの Ser100 のリン酸化による立体構造変化を議論する事を目的としている。

【実験】本研究では Sld2 の Thr84 及び Ser100 を含む 32 残基のペプチド領域をモデルペプチドとして用いた。WT (Sld2-WT) 及び Ser100 (Sld2-P) リン酸化状態の Sld2-32 残基についてそれぞれ安定同位体標識されていない合成ペプチドを用い、 $^1\text{H}$ -NOESY 測定を行った。更に詳細な解析を行う為に  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  安定同位体標識されたペプチド (Sld2-32aa) を調製した。このペプチドは CBD-インテイン融合ペプチドとして大腸菌にて発現し、アフィニティークロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーを用いて精製を行った。インテインタグは Self-splicing 反応により高い切断効率を示し、Chitin binding domain (CBD) は精製用のタグである。また、Ser100 を Asp に置換したモデルペプチドも同様に作成した (Sld2-32aa-S100D)。この変異によって Ser100 のリン酸化状態を擬似すると期待される。NMR 測定は Bruker 社製の 600, 700MHz の各 NMR 装置を用い、解析は NMRPipe, Sparky, Kujira, CYANA の各解析ソフトウェアを用いた。

【結果と考察】合成ペプチドを用いた  $^1\text{H}$ -NOESY 測定の結果、リン酸化によって、新たに芳香環プロトンと脂肪族プロトンの間に交差ピークが現れた。(Fig.1) これはリン酸化の影響で構造が誘起された事を示唆している。詳細な解析の為に、安定同位体標識された Sld2-32aa、及び Sld2-32aa-S100D についてそれぞれ多次元 NMR 測定を行い、主鎖、側鎖の化学シフトを帰属した。 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC 測定の結果について比較を行ったところ、6 アミノ酸残基のピークの移動を確認した。隣接していない残基のピークも移動している事が確認でき、これはリン酸化によってなんらかの立体構造変化を起こしている事を示唆している。

リン酸化による Sld2 の立体構造変化を詳細に解析する為には、さらなる構造学的な知見が必要である。現在、得られた化学シフトの情報を基にして NOE の解析を行っている。

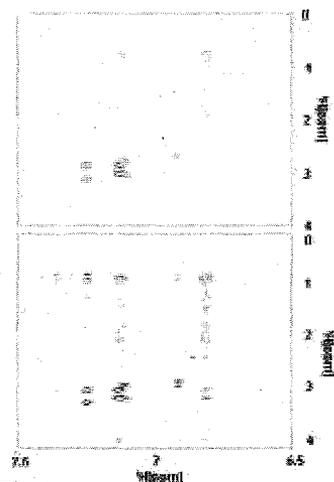


Fig.1  
Aromatic and aliphatic region of  $^1\text{H}$ -NOESY of Sld2-WT (upper) and Sld2-P (lower).

P034 可変圧力 NMR を用いた T4 リゾチームのキャビティに基づいた構造揺らぎの検出

(<sup>1,2</sup>近畿大学・生物理工学 <sup>2</sup>理化学研究所SPRING-8 <sup>3</sup>理化学研究所GSC <sup>4</sup>

東京大学・理学 <sup>5</sup>オレゴン大学化学科 <sup>6</sup>グローニンゲン大学生物物理化学)

○<sup>1,2</sup>前野覚大 <sup>2</sup>北原亮 <sup>3,4</sup>横山茂之 <sup>5</sup>Frederick W. Dahlquist <sup>6</sup>Frans A. A. Mulder <sup>1,2</sup>赤坂一之

Detection of Cavity-based Fluctuations in a T4 Lysozyme Mutant. A Variable Pressure NMR Study.

<sup>1,2</sup>Akihiro Maeno, <sup>2</sup>Ryo Kitahara, <sup>3,4</sup>Shigeyuki Yokoyama, <sup>5</sup>Frederick W. Dahlquist, <sup>6</sup>Frans A. A. Mulder and <sup>1,2</sup>Kazuyuki Akasaka

<sup>1</sup>Dep. of Biotech. Sci., Grad. Sch. of Biology-Oriented Sci. and Tec., Kinki Univ., <sup>2</sup>RIKEN SPRING-8 Center, <sup>3</sup>RIKEN Genomic Sciences Center, <sup>4</sup>Grad. Sch. I of Sci., Univ. of Tokyo, <sup>5</sup>Inst. of Mol. Biol. and Dep. of Chem., Univ. of Oregon, USA, <sup>6</sup>Dep. of Biophys. Chem., Univ. of Groningen, Netherlands

Variable-pressure two-dimensional <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H HSQC and <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H TROSY experiments were carried out on the cavity-mutant (L99A) of T4 Lysozyme in the pressure range between 3 and 300 MPa at pH 6.0 and 298 K. Distinct reduction of the cross-peak intensities with pressure were observed preferentially for the side chain methyl groups and the backbone amide groups surrounding the cavity, indicating the presence of slow conformational fluctuations preferentially around the cavity of L99A. Since lower volume of a protein is associated normally with hydration, the enhanced conformational fluctuation around the cavity detected at high pressure is very likely associated with the water penetration into the cavity of L99A.

一般的に蛋白質は溶液中において、次々と異なる三次構造に形を変え揺らいでいる。これらの構造揺らぎは蛋白質の水和による部分モル体積の変化を伴うため、部分モル体積が小さい構造がより変性の進んだ構造となる（体積原理）。従って、圧力は、水和の進んだ、部分モル体積の小さい構造の分布率を増加させ、NMRによる検出を可能にする。

これまでに主鎖アミド<sup>15</sup>NHをプローブにして可変圧力NMR法で構造揺らぎが調べ

キーワード：可変圧力NMR, キャビティ, 構造揺らぎ, 緩和分散NMR法

著者：まえの あきひろ、きたはら りょう、よこやま しげゆき、フレデリック ダルクイスト、フランス ムルダー、あかさか かずゆき

られ、加圧に伴う化学シフト変化や座標変化から、Fold 構造内の早くて小さな構造変化が分子内キャビティ周辺で優先的に起こっている事が示された(Williamson et al., *Protein Sci.* (2003), Kamatari et al., *Eur. J. Biochem.* (2001))。この結果、早い時間オーダー (>>ミリ秒)の構造揺らぎは分子内キャビティの水和に伴う構造変化である事が示唆された。

そこでキャビティ周辺の構造揺らぎをより直接的に検出するため、大きなキャビティ1個をもつ T4 リゾチーム変異体(L99A)を対象に、可変圧力 NMR を適用した。この蛋白質のキャビティの水和に伴う構造変化を直接捉えようとした。

[結果・考察]

二次元 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  HSQC(pH6.0, 298K, 30~3 kbar)の結果、幾つかの側鎖メチル基のクロスピーク体積が加圧に伴い選択的に減少した(Fig. A)。非常に興味深い事に、これらのピーク体積減少が起きた側鎖メチル基の位置を立体構造上に示すと、それらはキャビティ全体をしっかりと包み込むように配向していた。圧力は蛋白質の体積のより小さな構造を安定化し、且つ体積の小さな構造は水和と密接に結びついていることから、上で観測された蛋白質の構造揺らぎは、キャビティの水和を伴う構造揺らぎである事を示している(Fig B, C)。

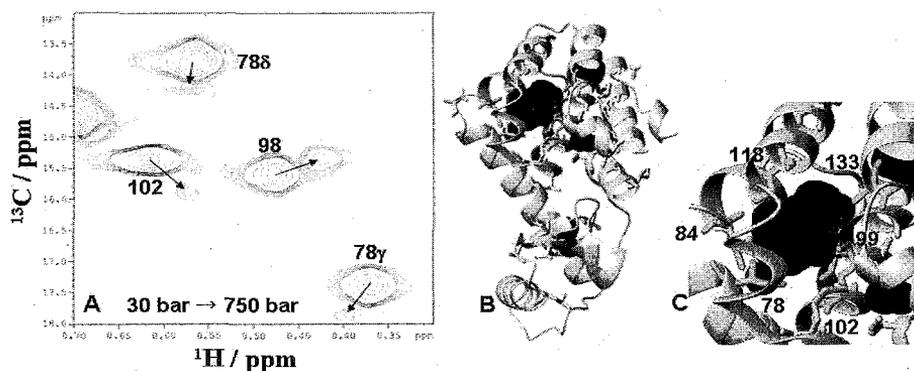


Fig. (A) Selective reduction of cross peak volumes with increasing pressure for side chain methyl group of L99A around the C terminal cavity in the  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  HSQC spectra. (B) Illustration shows the location of side chain methyl groups of L99A that preferentially lose the cross peak volume with pressure. Navy-blue spheres show the artificially created cavity. (C) Enlargement of B at the cavity surrounding residues in L99A.

(1 奈良先端大・バイオ、<sup>2</sup> 農業生物資源研)○西ヶ谷有輝<sup>1</sup>、Jee JunGoo<sup>1</sup>、小林俊達<sup>1</sup>、三島正規<sup>1</sup>、三浦純<sup>2</sup>、  
加藤悦子<sup>2</sup>、高野誠<sup>2</sup>、山崎俊正<sup>2</sup>、児嶋長次郎<sup>1</sup>

## Structural Analysis of Phytochrome B Histidine-kinase Like Domain

<sup>1</sup>Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology (NAIST) and <sup>2</sup>National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS)○Yuki Nishigaya<sup>1</sup>, JunGoo Jee<sup>1</sup>, Toshitatsu Kobayashi<sup>1</sup>, Masaki Mishima<sup>1</sup>, Jun Miura<sup>2</sup>, Etsuko Kato<sup>2</sup>, Makoto Takano<sup>2</sup>, Toshimasa Yamazaki<sup>2</sup> and Chojiro Kojima<sup>1</sup>

Phytochrome is red/far-red photoreceptor and regulates many aspects of the life cycle in plant. Phytochrome has histidine kinase like domain (HKLD) and it shows sequence homology to histidine kinase. However, in HKLD the histidine residue which is essential for histidine kinase activity is missing and thus whether it works as kinase is elusive. To know the structure as well as the function of HKLD, we have studied HKLD of the rice phytochrome B (phyB) using NMR and biochemical methods. Here we first report the optimization of domain boundary and purification protocol and the resulting <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC and HNC0 spectra. Second, we show the ATPase activity of phyB HKLD by chemical shift perturbation experiments and biochemical assays.

## [序論]

光は植物にとって発芽や花茎誘導など多様な反応を制御する環境因子として重要である。植物の主要な光受容体であるフィトクロムは赤色/遠赤色光受容体であり、安定な二量体を形成する可溶性タンパク質である。Histidine Kinase Like Domain (HKLD)はフィトクロムの C 末端ドメインに含まれ、ヒスチジンキナーゼと相同性を有するが(イネ phyB HKLD と大腸菌 EnvZ のヒスチジンキナーゼドメインとの配列一致率 19%)、活性に必要なヒスチジン残基を欠くためヒスチジンキナーゼとしては機能しない。一方、phyA 全長において Ser キナーゼ活性が観測されているが、ヒスチジンキナーゼと同じく GHKL 型 ATPase/kinase スーパーファミリーに分類される Pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) などは Ser キナーゼ活性を有することが知られていることから、高等植物のフィトクロム HKLD は Ser キナーゼ活性を有する可能性がある。そこで、本研究では溶液 NMR および生化学的実験によりイネ phyB HKLD の機能および構造の解明をめざした。

---

 キーワード タンパク質 低濃度 溶媒の最適化

 著者ふりがな にしがや ゆうき、じー じゅんぐー、こばやし としたつ、みしま まさき、  
みうら じゅん、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

## [方法]

HKLD はヒスチジンキナーゼにおける二量体化ドメインおよびキナーゼドメインと相同な 2 つのドメインからなるが、本研究ではイネ phyB HKLD のキナーゼドメインに相当する領域を使用した。pCold ベクターを用いた大腸菌大量発現系を用い、 $^{15}\text{N}$  および  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  均一標識したサンプルを発現・精製し実験に用いた。ATPase 活性測定は 200  $\mu\text{M}$  HKLD、2 mM ATP、25 mM Tris-HCl (pH 7.0)、5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、2 mM DTT、37  $^\circ\text{C}$ 、5 hours で行い、検出に遊離リン酸検出試薬 BIOMOL GREEN (BIOMOL 社)を用いた。NMR 測定は Bruker 社製 クライオプローブ付 AVANCE 500 を用いて 313 K で行った。NMR タイトレーション実験は 25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、2 mM DTT でおこなった。

## [結果・考察]

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを用いたタイトレーション実験により HKLD が ADP および AMP-PMP に結合することが示された。また、生化学実験により HKLD が ATPase 活性 ( $K_m \sim 0.6$  mM,  $K_{cat} \sim 0.016$   $\text{min}^{-1}$ ) を有することが示された。この ATPase 活性は非常に低いが、他の GHKL 型 ATPase/kinase スーパーファミリーのタンパク質である Hsp90 や MutL の ATPase 活性と同等であり、妥当だと考えられる。

PhyB HKLD の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルは、濃度依存的な多量体形成によりピークの増加およびブロードニングが生じたため、各種安定化剤・界面活性剤の添加を行ったが  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルは改善されなかった。そこで、pCold ベクターの利用、限定分解をもとにした配列の検討、精製条件の改良および溶媒の検討を行ったところ、純水中において pH 7.0、37  $^\circ\text{C}$  で 1 ヶ月以上安定なサンプルを得ることができた。高濃度域では解析可能なスペクトルが得られていないため、多量体化が生じない低濃度で  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定したところ、17  $\mu\text{M}$  という低濃度にもかかわらず非常に良好なスペクトルが観測できた (Figure 1)。また、HNCO を測定したところ、約 24 時間で良好なスペクトルが得られた。

発表では HKLD の主鎖帰属について報告するとともに、緩衝剤や塩などの溶媒条件がスペクトルの S/N に与える影響や、三重共鳴実験における感度向上を目指した溶媒の最適化について議論する。

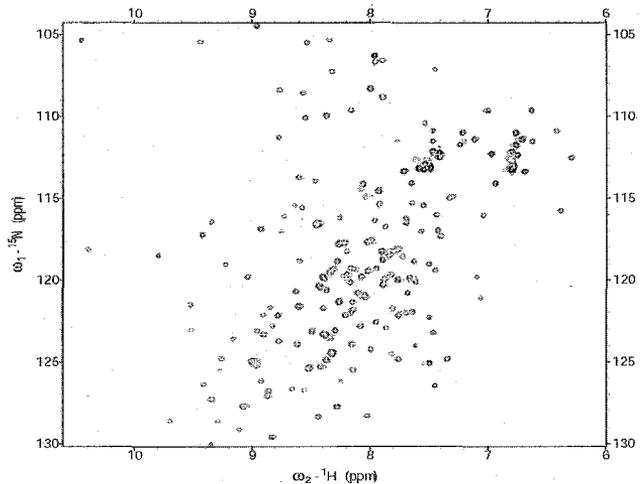


Figure 1.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum (ns=32, 1024x256 pts, 2.5 hours) of 17  $\mu\text{M}$  phyB HKLD in water on a Bruker AVANCE 500 equipped with a cryogenic probe at 313 K.

**アメロジェニンの NMR 解析**

(<sup>1</sup>北海道大学大学院理学研究院、<sup>2</sup>北海道大学大学院先端生命科  
研究院、<sup>3</sup>富山大学大学院医学薬学研究部)

○<sup>1</sup>熊木康裕、<sup>2</sup>相沢智康、<sup>2</sup>神谷昌克、<sup>2</sup>出村誠、<sup>3</sup>水口峰之、  
<sup>1,2</sup>河野敬一

**NMR analysis of amelogenin**

(<sup>1</sup>Graduate School of Science, Hokkaido University, <sup>2</sup>Graduate School of Life Science,  
Hokkaido University, <sup>3</sup>Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science for  
Research, Toyama University)

Yasuhiro Kumaki<sup>1</sup>, Tomoyasu Aizawa<sup>2</sup>, Masakatsu Kamiya<sup>2</sup>, Makoto Demura<sup>2</sup>, Mineyuki  
Mizuguchi and Keiichi Kawano<sup>1,2</sup>

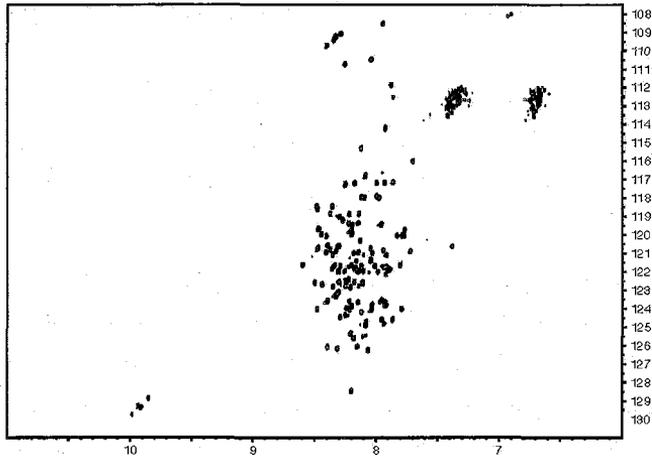
Amelogenin is a major component of enamel matrix proteins. The self-assembly of the amelogenin is believed to play an essential role in regulating the growth and organization of enamel crystals during enamel formation. Recently, it was reported that the self-assembly of the amelogenin is sensitive to the temperature and pH. The elucidation of the amelogenin assembly process is indispensable for the understanding of the mechanisms of enamel formation. The purpose of the present study is to obtain the insight into the structure of the amelogenin molecule and its self-assembly process in the atomic level. As a first step, we are going ahead with NMR assignments of the recombinant porcine amelogenin. In addition, the dynamic property such as the diffusion and the relaxation are being examined in several temperatures and pH's.

アメロジェニンはエナメルマトリクス蛋白質の主要な成分である。このアメロジェニンの自己凝集は、エナメル組織の形成において重要な役割を果たしていることが知られている。近年、このアメロジェニンの自己凝集は温度及び pH に依存することが報告されている<sup>[1],[2]</sup>。この自己凝集プロセスの解明はエナメル組織の形成メカニズムの理解に不可欠である。

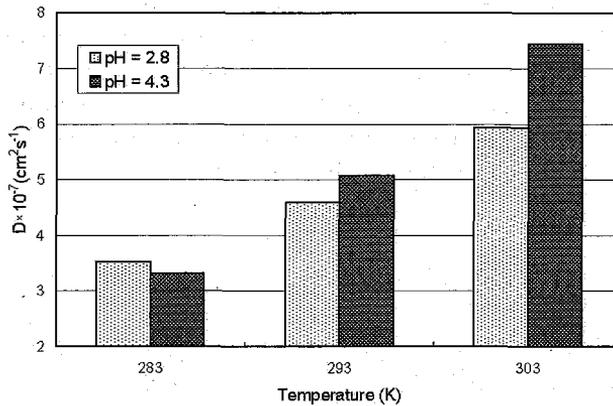
本研究の目的は、アメロジェニン分子の立体構造、及びその自己凝集プロセスをについて原子レベルでの知見を得ることである。その第一段階として、現在リコンビナントの豚のアメロジェニンについて NMR の帰属を行っている。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC の結果 (Fig.1) は、低温 (283 K)、及び低 pH (3.0) の条件で、比較的分離の良いスペクトルを得ることが可能であることを示している。よってこの条件で、現在種々の多次元測定を行っている。さらに自己拡散や緩和などの動的な性質についても、種々の温度及び pH において NMR を用いて調べている (Fig.2)。

キーワード: アメロジェニン、マトリクス蛋白質、自己凝集

くまきやすひろ、あいざわともやす、かみやまさかつ、でむらまこと、みずぐちみねゆき、  
かわのけいいち



**Fig.1**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra for  $^{15}\text{N}$ -labeled recombinant porcine amelogenin at pH 3.0 and 283 K.



**Fig.2** The diffusion coefficients of the amelogenin (0.2mM) under the three temperatures (283, 293, and 303 K) and two pH's (2.8 and 4.3) revealed by PFG BPPLD method.

<参考文献>

[1] Moradian-Oldak J, Leung W, Fincham AG. *J. Struct. Biol.* **122**:320-327, 1998.  
 [2] Petta V, Moradian-Oldak J, Yannopoulos SN, Bouropoulos N. *Eur. J. Oral Sci.* **114** (Suppl. 1): 308-314, 2006.

## 微小管プラス端集積因子 CLIP-170 と $\alpha$ -tubulin の C 末端ペプチド複合体の構造解析

○ 三島正規<sup>1\*</sup>、前崎綾子<sup>2\*</sup>、笠美由希<sup>2,3</sup>、渡辺崇<sup>4</sup>、深田正紀<sup>4</sup>、  
貝淵弘三<sup>4</sup>、箱嶋敏雄<sup>2,3</sup>

首都大学東京 理工学研究科<sup>1</sup>、奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科<sup>2</sup>、  
CREST<sup>3</sup>、名古屋大学 医学研究科<sup>4</sup>、\*共筆頭著者

**Structural study of CLIP-170 in complex with the C-terminal tail of  $\alpha$ -tubulin**  
Masaki Mishima<sup>1,5</sup>, Ryoko Maesaki<sup>2,5</sup>, Miyuki Kasa<sup>2,3</sup>, Takashi Watanabe<sup>4</sup>, Masaki Fukata<sup>4</sup>, Kozo Kaibuchi<sup>4</sup> and Toshio Hakoshima<sup>2,3</sup> <sup>1</sup>Graduate School of Science and Technology, Tokyo Metropolitan University, <sup>2</sup>Structural Biology Laboratory, Nara Institute of Science and Technology, <sup>3</sup>CREST, Japan Science and Technology, and <sup>4</sup>Department of Cell Pharmacology, Nagoya University, Graduate School of Medicine. <sup>5</sup>Contributed equally.

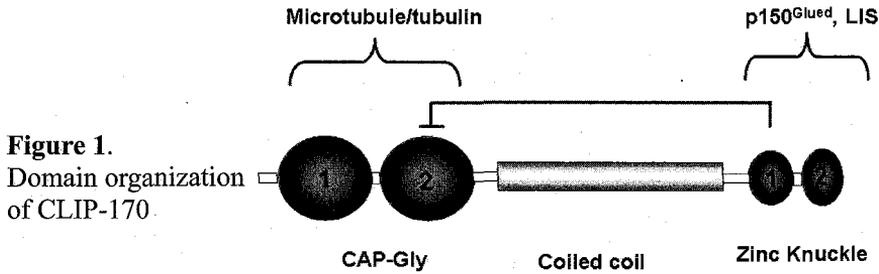
CLIP-170 is a prototype of the plus-end-tracking proteins that regulate microtubule dynamics, but it is still elusive how CLIP-170 recognizes the microtubule plus end and contributes to polymerization rescue. We present crystallographic and NMR studies of CAP-Gly domains of CLIP-170, CAP-Gly1 and CAP-Gly2. Searching conditions using NMR, we found that the C-terminal peptide bound to CAP-Gly2 in slow-exchange manner at low salt condition. We next determined the NMR structure of CAP-Gly2 in complex with  $\alpha$ -tubulin peptide, which revealed the  $\alpha$ -tubulin C-terminal EExEEY motif directly bound to the basic groove. Mutation studies showed that this acidic sextette motif is the minimum region for CAP-Gly binding. These results provide a structural basis for the proposed CLIP-170 copolymerization with tubulin dimers/oligomers on the microtubule plus end.

### 【背景】

微小管は主にそのプラス端で動的に伸長と消失を示す。近年、微小管プラス端に特異的に集積し、伸長を促進する分子(+TIPs)が同定され、+TIPs が微小管の極性や局在、微小管ネットワークの形成を制御することが明らかになっている。これは今まで不明であった微小管の細胞内での動的な振舞いを制御する分子機構として大変興味深い。Cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170)は+TIPs の中でも最もよく研究されているものの一つである(文献1)。CLIP-170 は N 末端側に微小管結合に関わるとされる 2 つの CAP-Gly ドメインと、中央にコイルドコイル領域、C 末端側に微小管結合に関して自己阻害的に働くと思われる zinc-knuckle 領域からなる(Fig. 1)。CLIP-170 による微小管動態の制御機構を解明することを目的として、まず微小管の捕捉、その伸長促進メカニズムを明らかにするため、CLIP-170 の微小管結合領域の X 線結晶構造解析、多次元 NMR による構造解析、表面プラズモン共鳴(SPR)および生化学的手法による機能解析を行った。

キーワード: 微小管、+TIPs、蛋白質複合体、細胞骨格

著者ふりがな: みしままさき、まえさきりょうこ、かさみゆき、わたなべたかし、ふかたまさき、かいぶちこうぞう、はこしまとしお



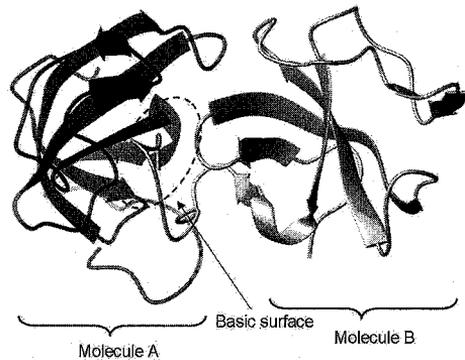
**Figure 1.**  
Domain organization  
of CLIP-170.

**【結果】**

**(結晶構造)**

CAP-Gly1、CAP-Gly2 単体の構造は X 線結晶構造解析により比較的容易に高分解能で決定できた。結晶構造から CAP-Gly1、CAP-Gly2 はともにプラス電荷の局在した特徴的な分子表面をもち、特に CAP-Gly2 ではプラス電荷の局在が顕著であることが明らかとなった。表面プラズモン共鳴を用いた実験から CAP-Gly2 は  $K_d$  が約  $3 \mu\text{M}$  で tubulin の C 末端酸性テールペプチドに結合するが、CAP-Gly1 の結合力はその約 20 倍弱かった。この結合力の差は主にプラス電荷の局在の違いに由来すると考えられる。

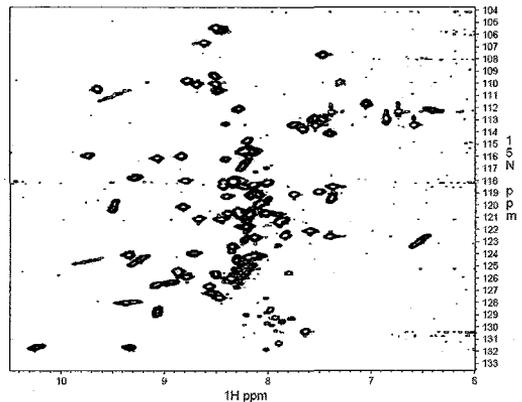
次に、CAP-Gly2 と tubulin の酸性テールペプチドとの複合体の結晶化に取り組んだものの、結晶化には至らなかった。これはおそらく酸性テールが結合するであろうプラス電荷の局在する分子表面が、結晶のパッキングによって覆われているためだと思われる(Fig. 2)。



**Figure 2.** Crystal packing of CAP-Gly2

**(HSQC による複合体形成のモニター)**

複合体の結晶化が困難であったので、NMR を用いて溶液条件下での酸性テールとの相互作用部位を調べたところ、推測通り、結晶中でパッキングによりマスクされたプラス電荷の局在する分子表面が、酸性テール結合部位であることが示された。最初、生理的条件に近い buffer 条件(Fig. 3 legend)では fast-exchange から intermediate-exchange が複合的に存在する結合を示し、NMR を用いても複合体の構造解析には相当の困難が予想された(Fig. 3)。しかし、相互作用には静電的な相互作用が支配的な役割をしていると考え、より静電的な相互作用が強くなるであろう低塩濃度条件下で測定を行ったところ、ほぼ slow-exchange 条件で結合した。また低塩濃度での複合体状態の



**Figure 3.**  
 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of 0.1 mM CAP-Gly2/tubulin peptide (1:1) in 50 mM K-phos (pH 7.0) and 100 mM KCl. Some curious peaks possibly due to intermediate exchange were observed.

スペクトルは、生理的条件に近い塩濃度において酸性テールを過剰量を加えることによって複合体型にしたスペクトルと同一であった。このことから塩濃度を下げた状態でも生理的条件下の構造が保持されていると判断し、研究を進めた。

(NMR によって決定した複合体構造)

安定に複合体を形成する測定条件が得られたので、多次元 NMR 法により CAP-Gly2/ $\alpha$ -tubulin C 末端酸性テールペプチド複合体の立体構造を決定した(Fig. 4)。その結果、酸性テールは CAP-Gly2の $\beta$ -strand ( $\beta$ 6)と短い逆平行 $\beta$ -sheet 様の構造を形成し、結合していた(Fig. 5)。この複合体形成に関わる F272(CAP-Gly2)、Y451(tubulin)の主鎖アミドプロトンの信号はいずれも複合体形成にともない大きく低磁場にシフトした。また N253(CAP-Gly2)の側鎖の NH<sub>2</sub> の信号は極めて特徴的に分離していた(Fig. 6)。9.84ppm の非常に低磁場の信号がペプチドの C 末端のカルボキシル基(COO-)との水素結合によるもの、高磁場にシフトした 5.20ppm のものは F272の芳香環が近傍に存在する結果であると思われる。F272(CAP-Gly2)の主鎖、N253(CAP-Gly2)の側鎖と酸性テールペプチドのカルボキシル基との水素結合は、ドメインによるペプチド C 末端の特異的な認識機構としても非常に興味深い。さらに F272(CAP-Gly2)と Y451(tubulin)の芳香環は CH- $\pi$ スタッキングによる相互作用をしていた。実際、複合体中での F236の芳香環の信号は高磁場にシフトしていた。また $\alpha$ -tubulinの酸性側鎖は CAP-Gly2の K224、K227、K252、K268によって提供されるプラス電荷に富んだ表面上に位置し、これらが静電的な相互作用をしていると判断できた。

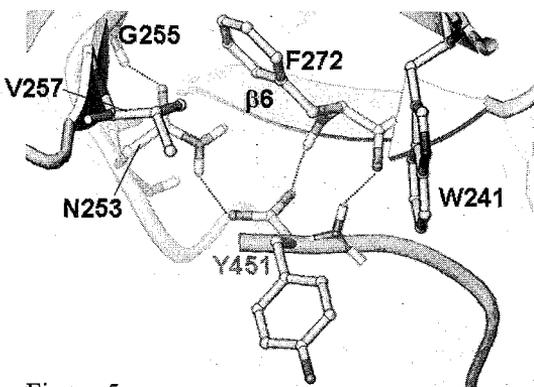


Figure 5. Close-up view of the hydrogen bonds formed in the complex. The side chain of Phe236 is omitted for clarity.

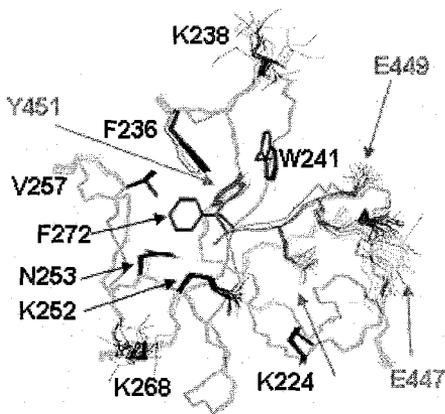


Figure 4. A best-fit superimposition of the final 20 simulated annealing structures of the CLIP-170 CAP-Gly2 domain bound to the  $\alpha$ 3-tubulin peptide with the lowest energies. (residues 212-281, 447-451) are displayed.

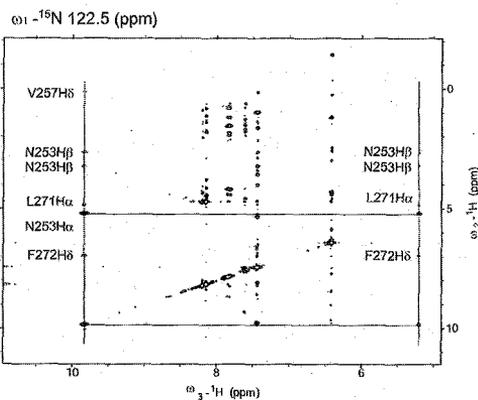


Figure 6. Selected  $\omega_3(^1\text{H})/\omega_1(^1\text{H})$  slice at 122.5 ppm of  $\omega_2(^{15}\text{N})$  of the 3D  $^{15}\text{N}$  edited NOESY-HSQC experiment. The cross-peaks for  $^1\text{H}$  ( $\omega_3$ ) resonances of side-chain NH<sub>2</sub> of Asn253 are connected by lines.

## 【考察】

### (プラス端伸長機構)

我々の構造解析、結合実験、競合実験から CLIP-170 と  $\alpha$ -tubulin との相互作用には酸性テール EExEEY(coo-)が必要かつ十分であることが示された。即ち CLIP-170 は、チューブ状に重合した微小管構造を特異的に認識するのではなく、tubulin ダイマーでも結合することを意味する。これは CLIP-170 のプラス端集積に関して、tubulin ダイマーにまず CLIP-170 が結合し、共重合するというモデルを支持する。我々は今回の解析から明らかになった CAP-Gly ドメインの持つプラス電荷が酸性テールの負電荷を中和することが重合を促進する一つのメカニズムであると考えている。

### (自己阻害)

同位体標識した CAP-Gly2 の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルをモニターしつつ、調製した非標識 Zinc-Knuckle 領域の titration を行ったところ、Zinc-Knuckle は CAP-Gly2 に対して酸性テールが相互作用するのと同じ領域で結合することが示された。これは以前より提唱されていた Zinc-Knuckle による自己阻害機構を立体構造に基づき裏付けるものである。Tubulin は abundant な蛋白質であり、細胞内で高濃度で存在することも考えられることから、このような自己阻害により不要な相互作用が抑制されることは自然なことであろう。

### (比較)

我々の報告にわずかに先立ち同様の CAP-Gly をもつ p150<sup>Glued</sup> とペプチドの複合体の立体構造が報告され、CAP-Gly ドメインの結合モチーフは EEY(coo-)であるという提案がなされた(文献2)。しかし、この構造は結晶中で  $\beta$ -strand を交換したドメインスワップ型の二量体を形成しており、ペプチドはその二量体のひとつのモノマーにのみ結合していた。基本的には我々の複合体と同様のモードで相互作用していたが、この結果のみから特異的分子認識を明らかにしたというのは困難に思われる。少なくとも我々の実験では p150<sup>Glued</sup> の CAP-Gly ドメインとペプチドとの結合は  $K_d$  が mM オーダーであり特異的に結合すると判断できないレベルである。我々は今回の解析から CAP-Gly ドメインによる  $\alpha$ -tubulin への結合は酸性テールペプチド部分の EExEEY(coo-)を認識することによって特異的に行われることを明らかにした。

## 【方法】

### (NMR)

大腸菌による大量発現系を用い、非標識、 $^{15}\text{N}$  標識および  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識の CAP-Gly2 と  $\alpha$ -tubulin の C 末端ペプチドのサンプルを調製した(Buffer: 30 mM d<sub>19</sub>-Bis-Tris pH 6.9, 1 mM d<sub>10</sub>-DTT)。信号の帰属は HNCACB、HN(CO)CACB、HN(CA)CO、HNCO、H(CCO)NH、4D HC(CO)NH、C(CO)NH、HCCH-TOCSY、2D  $^{15}\text{N}$  filtered NOESY により行った。主鎖二面角は TALOS を用いて、側鎖の  $\chi_1$  角は HNHB、HN(CO)HB、HACAHB により見積もった。 $^{13}\text{C}$  edited NOESY、 $^{15}\text{N}$  edited NOESY から距離情報を収集した。NMR 測定は Bruker Avance-500 (Cryoprobe)、DRX-800 を使用し 303 K で行った。CANDID ver. 2.1 により構造計算を行い、最終的に 65 個の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  の RDC を加え CNS ver.1.1 による構造計算を行った。低塩濃度のため配向は不安定であったが、PEG(C12E5)/hexanol を用いて配向試料を作成した。

【文献】(1)Galjart, N. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:487-498 (2)Honnappa, S. et al. (2006) *Mol. Cell* 23:663-671

## GPVI とコラーゲン及び結合リガンドとの相互作用解析

○小野克輝<sup>1</sup>、吉澤良隆<sup>1</sup>、加藤こずえ<sup>1</sup>、赤澤大輔<sup>1</sup>、  
高橋栄夫<sup>2</sup>、嶋田一夫<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>JBIC・生物情報解析研究センター、<sup>2</sup>産総研・生物情報解析研究センター

<sup>3</sup>東大・院薬系

## Interaction Analysis of GPVI with Collagen and its Binding Ligands

○Katsuki Ono<sup>1</sup>, Yoshitaka Yoshizawa<sup>1</sup>, Kozue Kato<sup>1</sup>, Daisuke Akazawa<sup>1</sup>,  
Hideo Takahashi<sup>2</sup>, and Ichio Shimada<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Japan Biological Information Research Center, JBIC

<sup>2</sup>Biological Information Research Center, AIST

<sup>3</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Glycoprotein VI (GPVI) is a key receptor for collagen-induced platelet activation. In human, GPVI deficiency causes a loss of platelet activation in response to collagen, and loss or inhibition of GPVI prevents arterial thrombus formation in animal models but causes only mildly prolonged bleeding times. Therefore, GPVI is considered as a potent target molecule for therapy of thrombotic disease. However, little is known about recognition mechanism for the interaction between GPVI and its binding ligands. In the present study, the comprehensive interaction analysis by NMR has been performed between GPVI and its various ligands; CRP (collagen-related peptides), phage-derived peptides, and screened low molecular weight compounds. A commonality and dissimilarity for binding mode between phage-derived peptide and compounds will be discussed.

## 《序論》

Glycoprotein VI (GPVI)は血小板凝集に関与する膜タンパク質であり、血管損傷部位に露出したコラーゲンと結合することで血小板の活性化を引き起こす。この活性化により血小板接着因子インテグリンへ情報が伝達され、フィブリノーゲンを介して血小板同士が架橋されることで凝集が促進される。GPVI を欠損または抑制した場合、動脈血栓の形成が抑制されることから、GPVI は血栓予防治療薬の標的タンパク質として注目されている。これまでの研究から GPVI はコラーゲンの GPO (Gly-Pro-Hyp) 配列を特異的に認識していることが報告されている(ref.1)が、その認識機構について

キーワード：GPVI、コラーゲン、血小板凝集、相互作用解析

おのかつき、よしざわよしたか、かとうこずえ、あかざわだいすけ、  
たかはしひでお、しまだいちお

は分かっていない。GPVI のコラーゲンに対する結合の特異性を示す機構を解明し、更にその結合を阻害する低分子をデザインするための情報を得ることができれば、立体構造を指標とする創薬の促進に繋がると考えられる。

そこで我々は、GPVI に対して結合するコラーゲンの結合部位を同定すると共に、GPVI 結合ペプチド及び低分子化合物の結合様式を明らかにするため NMR により相互作用解析を行った。

#### 《結果と考察》

GPVI は、コラーゲン中の GPO 配列を特異的に認識していると考えられているが、滴定実験や TSC 測定の結果から GPP 配列に対しても、GPO と比較して弱いものの、結合親和性を有していることが示唆された。

また、当研究室で開発したファージディスプレイシステム(ref.2)により 12 残基から成る GPVI 結合ペプチド (R5-7L)を得ることに成功した。このペプチドは芳香族環を持つアミノ酸に富み、D1D2<sup>GPVI</sup> (1-184aa)と CRP との結合を濃度依存的に抑制できることが SPR により示された。結合状態にある R5-7L の立体構造決定するため TrNOE 測定を行った結果、その構造はヘリックス様の部分構造を有していた。変異体実験等により疎水性残基が GPVI との結合に関与していることが明らかとなった。

更に GPVI に対し R5-7L 及び血小板凝集活性を有する数種類の低分子化合物の滴定実験を行った(Fig)。その結果、R5-7L は GPVI の疎水性クラスターが形成されている部位に特異的な結合していることが示唆され、低分子化合物の中には R5-7L と同じような位置に結合していることを示唆する結果が得られた。

R5-7L から得られる構造情報は新たな創薬における有益な情報を含んでいると考えられる。発表ではこれらの結果をもとに、GPVI のコラーゲン及び結合リガンドの認識機構について議論を行いたい。

#### 《謝辞》

本研究は NEDO の支援を受けました。

#### 《参考文献》

1. Moroi, M. and Jung, S. M. (2004) *Thromb. Res.*, **114**, 221-233
2. Mizukoshi, Y., Takahashi, H., and Shimada, I. (2006) *J. Biomol. NMR*, **34**, 23-30

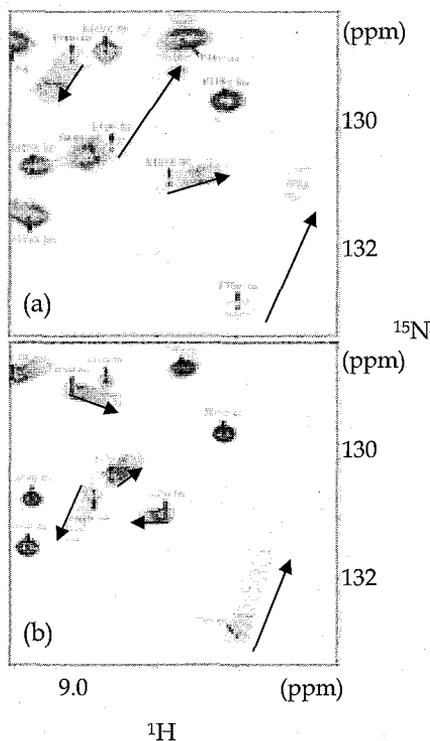


Fig. Overlay of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra expanded region of D1D2<sup>GPVI</sup> titrated by R5-7L peptide (a) and a low molecular weight compound (b).

## 転写コアクチベーターMBF1の構造解析

首都大学東京理工学研究科<sup>1</sup>、国立遺伝学研究所<sup>2</sup>、京都大学工学研究科<sup>3</sup>

○永井 義崇<sup>1</sup>、広瀬 進<sup>2</sup>、白川 昌宏<sup>3</sup>、伊藤 隆<sup>1</sup>、三島 正規<sup>1</sup>

## Structural analysis of transcriptional coactivator MBF1

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Technology, Tokyo Metropolitan University,

<sup>2</sup>National Institute of Genetics, <sup>3</sup>Graduate School of Engineering, Kyoto University

Yoshitaka Nagai<sup>1</sup>, Susumu Hirose<sup>2</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>3</sup>, Yutaka Ito<sup>1</sup>,

Masaki Mishima<sup>1</sup>

Transcriptional coactivator MBF1 is conserved among various eukaryotes, and it regulates activity of the heterodimer transcription factor, AP-1, which consists of bZIP proteins, Jun and Fos. Oxidation of cysteine 278 of Jun causes AP-1 inactivation, while MBF1 prevents the cysteine from being oxidized by binding with the basic region of Jun.

Toward the understanding the mechanism of transcriptional regulation by MBF1, our purpose is structure determination of the Jun/Fos/AP-1 site/MBF1 complex. As a first step, we have studied the structure of MBF1 and an interaction between the basic region of Jun and MBF1 using hetero nuclear NMR.

## &lt;序論&gt;

転写コアクチベーターMBF1は、あらゆる真核生物に保存されており、bZIP蛋白質JunとFosによって形成されるヘテロダイマー転写制御因子AP-1の活性を調節する。AP-1は、細胞の分化、自然免疫、酸化ストレスに対する防御といった機能を備えている。MBF1は、AP-1を形成しているJunの塩基性領域と直接結合し、Junのシステイン残基の酸化修飾が原因でおこるAP-1の失活を防ぐことで、AP-1のDNAへの結合を促進し、酸化ストレス防御に寄与していることが知られている。しかし、MBF1がAP-1を形成しているJunのシステイン残基

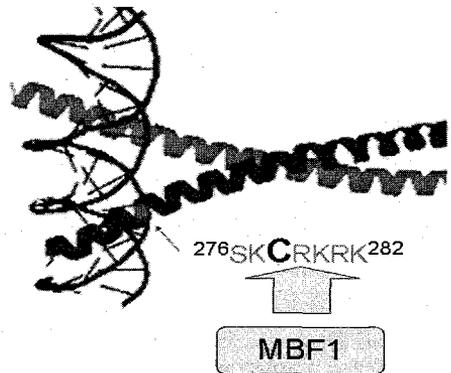


Fig.1. Jun/Fos/DNA complex  
MBF1 binds with the arrowed basic area of Jun. C278 is the critical cysteine.

キーワード: 転写、コアクチベーター、立体構造

著者ふりがな: ながいよしたか、ひろせすすむ、しらかわまさひろ、いとうゆたか、みしままさき

の酸化を直接の結合によっていかに防いでいるのかという点を明らかにするためには、MBF1 と Jun 等の複合体の立体構造に基づく考察が必要である。本研究では、ショウジョウバエ由来の Jun/Fos/AP1-site/MBF1 複合体の立体構造の解析を目的とし、まず MBF1 と Jun の塩基性領域との直接の相互作用の解析と、MBF1 の構造解析を試みた。

#### <実験>

大腸菌内で  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識、 $^{15}\text{N}$  標識のショウジョウバエ由来の MBF1 全長(145 残基)を発現させ、それらを精製し、試料を調製した。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識の試料を用いて、2 次元  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC を測定した。さらに、同じ試料を用いて主鎖の帰属のため非線形サンプリング法を用いて、CBCANH、CBCA(CO)NH、HN(CA)CO、HNCO の各種 3 次元測定を行った。また、ノンラベルの Jun の bZIP ドメイン(76 残基)を大腸菌内で発現させ、精製を行った。

$^{15}\text{N}$  標識の MBF1 を試料として 2 次元  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC を測定した後、この Jun を混合し、再び 2 次元  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC を測定することで MBF1 と Jun との結合実験を行った。

なお、NMR 測定は、CRYOPROBE を装着した Bruker AVANCE 600 を用いて、測定温度 303K で行った。非線形な測定データは AZARA v2.7 を用いて MEM 法により行った。スペクトルの解析には ANSIG-for-OpenGL v1.0.6 を用いた。

#### <結果・考察>

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識の試料を用いた 2 次元  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC において、右図のような良好なスペクトルを得ることができた。各種 3 次元測定によって得られたスペクトルから、上記のソフトウェアを用いて解析を行い、概ね主鎖の帰属を完了した。

$^{15}\text{N}$  標識の MBF1 を用いた結合実験においては、Jun を混合する前後の  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC のスペクトルデータにほとんど変化が見られなかったことから、MBF1 と Jun の塩基性領域だけでは現在のところ直接の結合が観測できていない。両者の相互作用のためには、Fos や AP-1 サイトも含めたより大きな領域が必要なのかもしれない。

今後は、まず MBF1 の立体構造の解析を進めるとともに、Jun/Fos/AP-site 複合体と MBF1 の複合体を形成させ、目的である複合体の立体構造の解析を目指す。

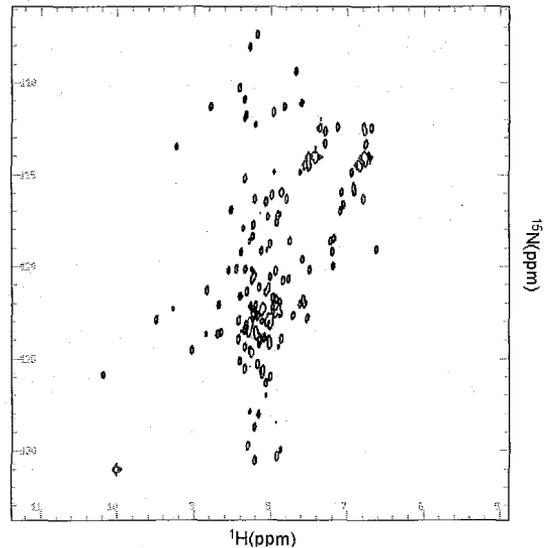


Fig.2. The  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of 1 mM  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled MBF1. 50mM K-Phos(pH6.9), 50mM KCl at 303K. AVANCE600

## NMR構造解析

(理研GSC<sup>1</sup>, 横浜市大院<sup>2</sup>, ハウス食品<sup>3</sup>)○大橋若奈<sup>1</sup>, 中村安里<sup>2</sup>, 林文晶<sup>1</sup>, 正村典也<sup>3</sup>, 柘植信昭<sup>3</sup>, 今井真介<sup>3</sup>, 廣田洋<sup>1,2</sup>**Solution structure of lachrymatory factor synthase from *Allium cepa***(RIKEN Genomic Sciences Center<sup>1</sup>; Graduate School, Yokohama City University<sup>2</sup>;  
Somatech Center, House Foods Corporation<sup>3</sup>)Wakana Ohashi<sup>1</sup>, Anri Nakamura<sup>2</sup>, Fumiaki Hayashi<sup>1</sup>, Noriya Masamura<sup>3</sup>, Nobuaki  
Tsuje<sup>3</sup>, Shinsuke Imai<sup>3</sup>, Hiroshi Hirota<sup>1,3</sup>

The irritating lachrymatory factor that is released by onions when they are chopped up is specifically synthesized by lachrymatory factor synthase (LFS) and alliinase. LFS is composed of 169 amino acid residues. The amino acid sequence analysis reveals that LFS has no functional and structural motifs. Deletion analysis indicates that the enzymatic activity of LFS (23-169) is equivalent to that of intact LFS. Here, we performed the structural analysis of the active domain of LFS by solution NMR spectroscopy.

## [序論]

タマネギの切断時に放出される催涙因子(propanethial S-oxide)は、alliinase 及び lachrymatory factor synthase (LFS) の 2 つの酵素による含硫アミノ酸 (1-propenyl-L-cysteine sulfoxide: PRENCISO) の分解・転位反応によって生成される。PRENCISO に LFS と alliinase の両方を加えると、香味物質とともに催涙因子が生成する。一方、PRENCISO に alliinase のみを加えると、催涙因子は生成せず、alliinase による PRENCISO の分解産物 1-propenylsulphenic acid (1) から二量化を経て生成すると考えられる香味物質が得られる。1は不安定なために単離されていないが、以上のことから、PRENCISO に alliinase が作用して1が生成し、催涙因子は1に LFS が作用して生じ、香味物質は1から非酵素的に生じるとされている。しかし、催涙因子生成機構の詳細は未だ明らかになっていない。LFS の 1 次配列解析の結果、既知モチーフは見出されなかった。本研究

---

キーワード:タマネギ、催涙、酵素、lachrymatory factor、synthase

著者ふりがな:おおはし わかな、なかむら あんり、はやし ふみあき、まさむら のりや、  
つげ のぶあき、いまい しんすけ、ひろた ひろし

では、LFS の立体構造解析を行い、その立体構造学的特徴を明らかとするとともに、基質認識領域、基質認識機構に関する知見を得ることを目的とする。

#### [実験]

大腸菌による大量発現系により、 $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ラベル体タマネギ由来 LFS を調製し測定試料とした。主鎖・側鎖帰属用多核多次元 NMR 測定は、Bruker 社製 AVANCE 600 MHz を用いて行った。構造解析用  $^{15}\text{N}$ -edited NOESY-HSQC,  $^{13}\text{C}$ -edited NOESY-HSQC 測定は、Varian INOVA 800MHz, 900MHz をそれぞれ用いて行った。スペクトル処理には NMRPipe、スペクトル解析には NMRview 及び Kujira を用いた。

#### [結果・考察]

LFS は全長 169 アミノ酸、分子量 19 kDa からなり、23-169 領域は全長と同等の催涙因子合成活性を有する。23-169 ドメインを His-tag 融合型タンパク質として発現し、thrombin 処理による His-tag 切断を試みた所、His-tag は切断されなかった。切断酵素(enterokinase)及び鎖長(LFS(13-169), LFS(18-169), LFS(23-169))によらず、tag は切断されないままであった。そこで、活性試験により His-tag 融合型 LFS に催涙因子合成活性が保持されていることを確認した後、His-tag 融合型 LFS(23-169)を用いて解析を行った。

Fig に示す2次元  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルが得られた。 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル中、プロリン 6 残基を除く観測可能なアミノ酸残基 162 残基中約 80% に相当する数のシグナルが得られた。これらのシグナルについて主鎖帰属を進め、得られたケミカルシフト値を用いて TALOS による二次構造予測を行った結果、 $\beta$ -strand 構造を多く含んだ構造を保持していることが予想された。本年会では、帰属領域、未帰属領域、及び帰属領域の立体構造について議論する予定である。

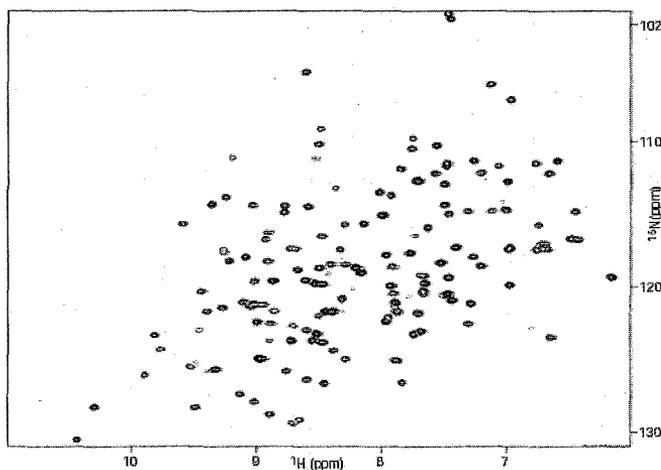


Fig.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of LFS (23-169)

Reference: Imai, S. et. al. (2002) *Nature* 419. 685

## Rho-kinase の split PH ドメインの構造解析

首都大学東京・理工学研究科<sup>1</sup>、奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科<sup>2</sup>、名古屋大学・医学研究科<sup>3</sup>、CREST<sup>4</sup>

○ 佐藤 明子<sup>1</sup>、寺脇 慎一<sup>2</sup>、伊藤 隆<sup>1</sup>、天野 睦紀<sup>3</sup>、貝淵 弘三<sup>3</sup>、箱嶋 敏雄<sup>2,4</sup>、三島 正規<sup>1</sup>

### Structural analysis of split PH domain of Rho-kinase

Akiko Sato<sup>1</sup>, Shinichi Terawaki<sup>2</sup>, Yutaka Ito<sup>1</sup>, Mutsuki Amano<sup>3</sup>,  
Kouzo Kaibuchi<sup>3</sup>, Toshio Hakoshima<sup>2,4</sup>, and Masaki Mishima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University,

<sup>2</sup> Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology,

<sup>3</sup>Graduate School of Medicine, Nagoya University, <sup>4</sup>CREST

Rho-kinase, an effector of Rho small GTPase, plays a crucial role in regulation of cytoskeleton. Based on the amino-acid sequence analysis, C-terminal of Rho-kinase is expected to have PH like domain with the Cys rich regions (C1 like domain(C1L)) insertion in the middle of its sequence. It consists of the PHn region, the C1L region, and the PHc region. The role of such split PH domain is still elusive. In this study, we aimed to determine the structure of split PH domain of Rho-kinase and to study its function. A series of triple-resonance experiments was measured, and assignment of backbone resonances is in progress.

【序論】 Rho-kinase は低分子量 G 蛋白質 Rho のエフェクターで、細胞骨格の制御において重要な役割を担っている。Rho-kinase は C 末端側に PH 様ドメインを持つが、その PH 様ドメインは途中に Cys に富む C1 類似ドメイン (C1L) が挿入されており、PHn 領域、C1L 領域、PHc 領域から構成されることがアミノ酸配列から予想されている。このような split PH ドメインは近年発見され研究が進んでいるが、その構造的・機能的意義は明らかにされていない。本研究では split PH ドメインの機能解明を目的とし、Rho-kinase の split PH ドメインの立体構造解析を試みた。

【実験】 大腸菌を用いた大量発現系を用いて、<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識 Rho-kinase PH 様ドメイン (PHn-C1L-PHc 残基 1151-1350) を発現させ、精製した。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC よるバッファーの条件検討等を行い、構造解析可能な分離のよい <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC を与える条件を確立した。

キーワード：Protein kinase、低分子量 G 蛋白質、Split PH domain、立体構造

著者ふりがな：さとう あきこ、てらわき しんいち、いとう ゆたか、あまの むつき、かいぶち こうぞう、はこしま としお、みしま まさき

主鎖の帰属のため、2次元  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC、3次元 CBCANH、CBCA(CO)NH、HN(CA)CO、HNC(O)の測定を行った。また、Rho-kinase (C1L-PHc 残基 1246-1350)のコンストラクトについても同様に発現精製系を確立し、2次元  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC を測定した。NMR測定は、CRYOPROBEを装着した Bruker AVANCE 600 分光計を用い、測定温度 298 Kで行った。データ処理およびスペクトルの解析は AZARA v2.7、ANSIG-for-OpenGL v1.0.6、Sparkyソフトウェアを用いた。

**【結果と展望】** PHn-C1L-PHc、C1L-PHc のコンストラクトについて  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC 測定を行った結果、それぞれ Figure 2 のようなスペクトルを得た。共に分離がよく、PHn-C1L-PHc と C1L-PHc でクロスピークの位置がほぼ一致していた。現在測定した三次元データから PHn-C1L-PHc の主鎖の帰属を試みている。また、C1L-PHc のコンストラクトでも主鎖の帰属を行い、比較考察を行う予定である。また、今後はタイトレーション実験により脂質等との相互作用を調べるなど、split PHドメインの機能解明を目指す。

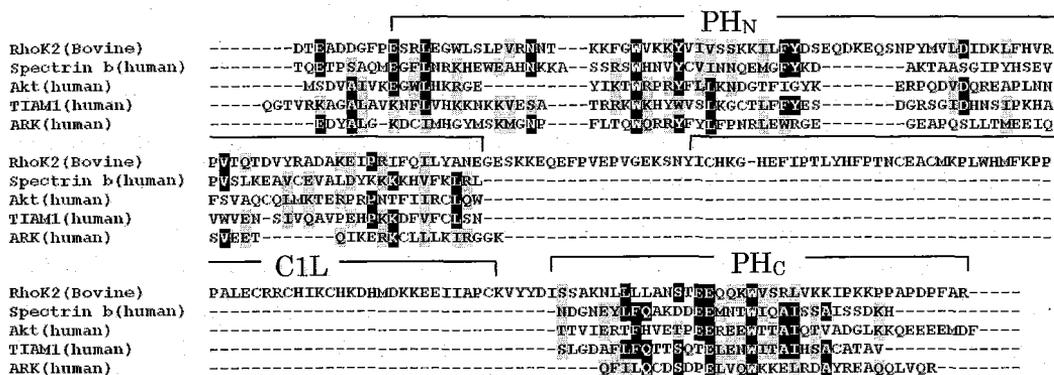


Figure 1. Multiple sequence alignment of C-terminal Rho-kinase and normal PH domains

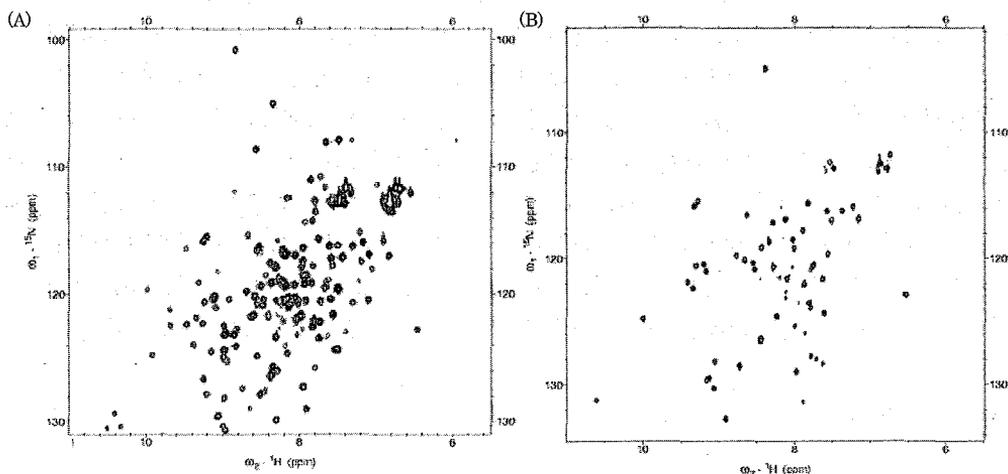


Figure 2. The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra (A)  $^{15}\text{N}$ -labeled Rho-kinase (PHn-C1L-PHc) (B)  $^{15}\text{N}$ -labeled Rho-kinase (C1L-PHc)

## NMR 法を用いた LC3 と標的分子の相互作用解析

<sup>1</sup>北大・生命科学院・構造生物, <sup>2</sup>北大・院薬・構造生物, <sup>3</sup>基生研・分子細胞生物,  
<sup>4</sup>東京医科歯科大学院・細胞生理

○佐藤健次<sup>1</sup>, 久米田博之<sup>2</sup>, 野田展生<sup>1,2</sup>, 小椋賢治<sup>1,2</sup>,  
 藤岡優子<sup>2</sup>, 水島昇<sup>4</sup>, 大隅良典<sup>3</sup>, 稲垣冬彦<sup>1,2</sup>

NMR analysis of the complex of LC3, a mammalian homolog of Atg8, and its target molecule  
 (<sup>1</sup>Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Life Sciences, Hokkaido University,  
<sup>2</sup>Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido  
 University, <sup>3</sup>Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, <sup>4</sup>Department of  
 Cell Physiology, Tokyo Medical and Dental University)

○ Kenji Satoo<sup>1</sup>, Hiroyuki Kumeta<sup>2</sup>, Nobuo N Noda<sup>1,2</sup>, Kenji Ogura<sup>1,2</sup>, Yuko Fujioka<sup>2</sup>,  
 Noboru Mizushima<sup>4</sup>, Yoshinori Ohsumi<sup>3</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>1,2</sup>

LC3, a mammalian homolog of yeast Atg8, plays an essential role in mammalian autophagy, the bulk degradation of cytoplasmic components by the lysosomal system. Recent studies revealed that polyubiquitinated protein aggregates are selectively degraded by autophagy that prevents accumulation of protein aggregates and progression of neurodegenerative diseases. Polyubiquitin-binding protein p62/SQSTM1 was reported to bind directly to LC3 suggesting that p62 is important for degradation of polyubiquitinated protein aggregates by autophagy. Here, we report NMR analysis of the complex of LC3 and p62 peptide and discuss their interaction mode.

[はじめに] オートファジーとはユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ細胞内成分の主要な分解機構であり、真核生物において広く保存されている。オートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜構造体が細胞内成分を取り囲み、液胞/リソソームへと輸送する。輸送された細胞内成分は液胞/リソソーム内の酵素により分解され、細胞内成分の原料としてリサイクルされる。通常、オートファジーは非選択的な分解機構であるとされているが、一部のタンパク質に対して選択的に分解を行っており、この選択的オートファジーが異常タンパク質の蓄積に起因する神経変性疾患の予防に深く関与していることが報告されている。ポリユビキチン鎖結合タンパク質である p62/SQSTM1 はポリユビキチン化されたタンパク質凝集体中に存在しており、タンパク質凝集体とともにオートファジーによって分解されることが知られてい

Key words: Autophagy, LC3, Atg8 homolog

さとう けんじ, くめた ひろゆき, のだ のぶお, おぐら けんじ, ふじおか ゆうこ,  
 みずしま のぼる, おおすみ よしのり, いながき ふゆひこ

る. 近年, p62が哺乳類オートファジーのマーカータンパク質であるLC3と直接結合することが報告され, p62 が選択的オートファジーの標的認識に重要な役割を担っていることが示唆された. 本発表では, LC3 の p62 認識機構に関する考察について報告する.

[方法・結果] LC3 の p62 結合部位を特定するため, 滴定実験を行なった. 0.5 mM<sup>15</sup>NラベルLC3に対して, LC3結合領域として報告されたp62のアミノ酸残基321-342のペプチド(以下, p62(321-342))を0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5モル等量となるよう加え, それぞれ[<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N]HSQCを測定した. 結果, slow exchangeでのピーク摂動が確認され, 1.0モル等量において飽和した. ほぼ全ての残基由来の信号において摂動が確認されたが, 特にβ2ストランド近傍において摂動が顕著であった(figure A). <sup>15</sup>Nラベル p62(321-342)に対して, LC3を同様のモル等量となるよう加え滴定実験を行なったところ, 342残基目よりC末端側の残基も結合に関与する可能性が示唆された. 結合に関与していないN末端領域を削り, C末端を延長した332-347領域のペプチド(以下, p62(332-347))を新たに作成し, 同様の実験を行なった. <sup>15</sup>NラベルLC3に対するp62(332-347)の[<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N]HSQCを用いた滴定実験の結果は, p62(321-342)のそれとほぼ同じであった.

p62におけるLC3結合に関与する領域について検討するために, 前述した2種類の領域の<sup>15</sup>Nラベルp62ペプチド + ノンラベルLC3複合体におけるsteady state NOE測定を行なった(figure B). p62(321-342)において結合に関与していない残基は非常に運動性が高いことが示された. また, p62(332-347)のC末端に延ばした領域においても比較的運動性が低い領域が存在した. これらの結果から, 以降のLC3とp62の相互作用様式検討にはp62(332-347)を用いることとした.

より詳細な相互作用様式については, 討論会当日に議論する.

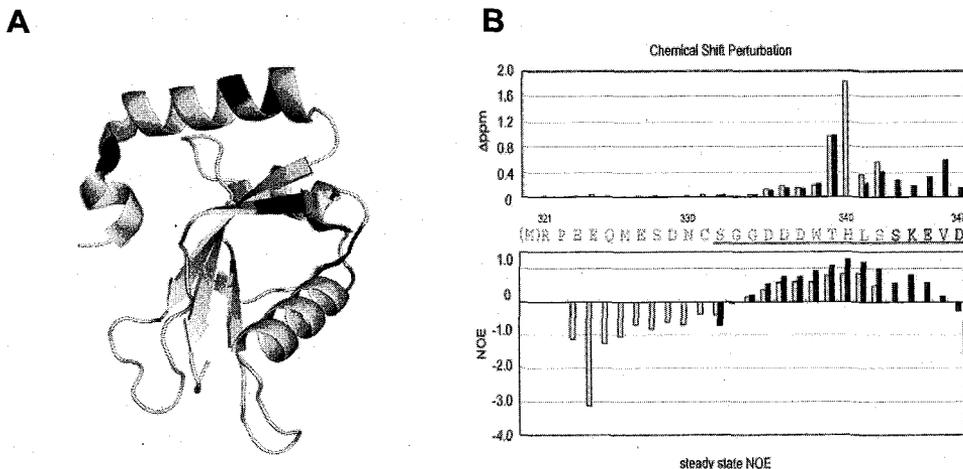


Figure A, mapping p62 binding site on ribbon diagram of LC3. The residues that <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N chemical shift perturbations are observed in the presence of p62(332-347) are colored black. B, comparison of two p62 peptides by chemical shift perturbation and steady state NOE upon complex formation with LC3. p62(321-342) is colored gray, p62(332-347) is colored black.

## NMR を用いた RAGE (receptor for AGE) 可変領域様ドメインの立体構造解析

(<sup>1</sup>阪大院薬, <sup>2</sup>金沢大院医, <sup>3</sup>大阪薬大) ○松本篤幸<sup>1</sup>, 吉田卓也<sup>1</sup>, 村田紘子<sup>1</sup>, 山本博<sup>2</sup>, 小林祐次<sup>1,3</sup>, 大久保忠恭<sup>1</sup>

### Solution Structure of Variable-type Domain of Receptor for Advanced Glycation Endproducts

<sup>1</sup>Grad. Sch. of Pharm. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. of Med. Sci., Kanazawa Univ., and <sup>3</sup>Osaka Univ. of Pharm. Sci.

Shigeyuki Matsumoto<sup>1</sup>, Takuya Yoshida<sup>1</sup>, Hiroko Murata<sup>1</sup>, Hiroshi Yamamoto<sup>2</sup>, Yuji Kobayashi<sup>1,3</sup> and Tadayasu Ohkubo<sup>1</sup>

Diabetes is defined by chronic hyperglycemia due to deficiency in insulin action. It has been found that advanced glycation endproducts (AGEs) of Maillard reaction between proteins and sugar molecules increase in blood of diabetic patients and further that AGE binding to their cell surface receptor (RAGE) triggers both macrovascular and microvascular impairments to cause diabetic complications. We determined by NMR the three-dimensional structure of the recombinant variable-type domain of RAGE, which contains the binding site of AGE. The combination of the structural data and the results of mutagenesis studies indicate that the 3 basic amino acids play a key role in the recognition of negatively charged AGE.

【序論】古くから還元糖の共存下で、蛋白質が非酵素的に糖化・修飾され終末糖化産物 (advanced glycation endproducts ; AGE) が生成される事は広く知られている。近年、高血糖状態下で生じる AGE とその細胞膜受容体 RAGE との相互作用が、糖尿病性血管障害の発症に深く関係しているということが報告され、RAGE をターゲットとした新規医薬品の開発が期待されている(1,2)。そこで、RAGE の立体構造情報および AGE-RAGE の相互作用様式についての原子レベルでの情報に基づいた新規薬剤の開発を目的に、我々は AGE 結合部位を含む RAGE の可変領域様ドメイン(vRAGE, 101aa, 11kDa)の三次元構造を決定した。

【方法】大腸菌による大量発現系を用いて、<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N標識vRAGEサンプルの調製を

キーワード：糖尿病、AGE、RAGE

著者ふりがな：○まつもとしげゆき、よしだたくや、むらたひろこ、やまもとひろし、こばやしゆうじ、おおくぼただやす

行った。多核多次元 NMR 測定により NMR シグナルの帰属及び NOE 収集を行い、vRAGE の溶液構造を simulated annealing 法により決定した。測定は Varian 社製 INOVA600、INOVA500 を用い、25°C で行った。

【結果・考察】構造計算の結果、イムノグロブリン様フォールドをもつ  $\beta$  シートに富んだ立体構造が得られた (Figure.1)。vRAGE の分子表面には多くの塩基性残基が露出しており、静電ポテンシャル解析の結果、分子全体が正電荷を帯びていることが明らかとなった。AGE はその生成過程においてアミノ基が修飾され、見かけの負電荷が増加することが知られており、これら vRAGE 分子表面の塩基性アミノ酸残基が一連の AGE 化合物に含まれる負電荷との相互作用に関与することが予測された。これらの仮説を証明する為アラニン置換体 vRAGE を作成し、AGE 分子との結合能の評価を ELISA 法で行った結果、Lys23、Lys24、Arg84 の 3 残基が AGE-RAGE 結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た。

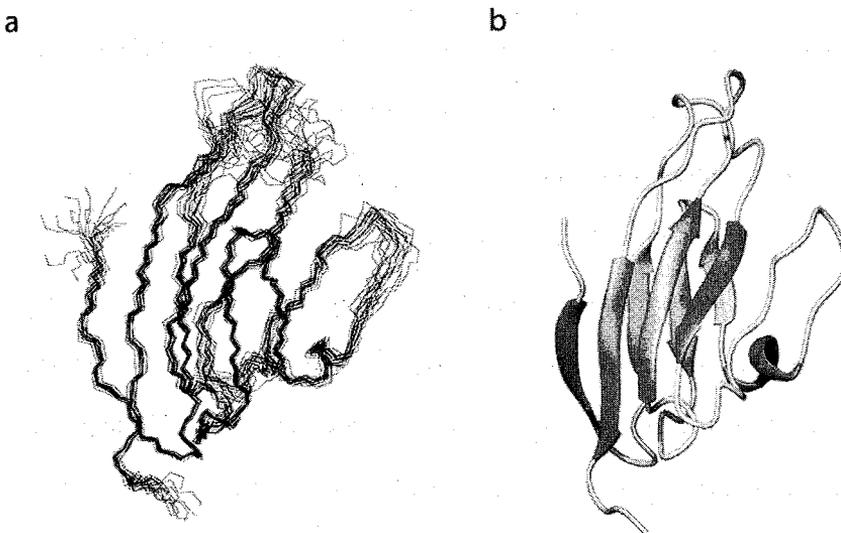


Figure 1. Structure of vRAGE

- (a) The ensemble of 15 structures with the lowest energy of target function.  
(b) Ribbon representations of vRAGE.

【参考文献】

1. Sakurai, S., Yonekura, H., Yamamoto, Y., Watanabe, T., Tanaka, N., Li, H., Rahman, A. K., Myint, K. M., Kim, C. H., and Yamamoto, H. (2003) *J Am Soc Nephrol* 14(8 Suppl 3), S259-263
2. Neepser, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., Elliston, K., Stern, D., and Shaw, A. (1992) *J Biol Chem* 267(21), 14998-15004

P044

## **Structure and orientation of a voltage sensor toxin in lipid membranes**

Hyun Ho Jung<sup>1†</sup>, Hoi Jong Jung<sup>1†</sup>, Mirela Milesco<sup>2</sup>, Hyun Jin Kim<sup>1</sup>, Dong-kyun Kang<sup>1</sup>,  
Wang Taek Hwang<sup>1</sup>, Hyo Jeong Kim<sup>1</sup>, Song Yub Shin<sup>3</sup>, Kenton J Swartz<sup>2</sup> & Jae Il Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Life Science, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju, 500-712, Korea.*

<sup>2</sup>*Molecular Physiology and Biophysics Section, Porter Neuroscience Research Center, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.*

<sup>3</sup>*Department of Cellular & Molecular Medicine, School of Medicine and Research Center for Proteinaceous Materials, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea*

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to J.I.K. (jikim@gist.ac.kr).

**A number of protein toxins, isolated from spiders, scorpion and sea anemone venom, have been shown to modify voltage-dependent gating by interacting with the voltage sensing domains, S1-S4 segments, of voltage-activated ion channels. Although the mechanisms that these toxins modify channel gating remain to be fully understood, Hanatoxin, a kind of tarantula venom, has been shown to inhibit Kv channels by stabilizing a conformation of the voltage sensor paddle, helix-turn-helix motif composing the S3b and S4 helix. The possible gating movement of voltage sensor paddle with membrane has predicted that this toxin may partition into the membrane before binding to the channel. The ability of this toxin to interact with membranes proved from partitioning into membrane vesicles, and resulted from a common feature in its solution structure; one face of the toxin is highly amphipathic, containing a cluster of solvent exposed hydrophobic residues that are surrounded by highly polar residues.**

**SGTx1, a Kv channel inhibitor isolated from the venom of spider *Scodra griseipes*, is**

very similar to Hanatoxin in terms of structure and activity. Also, the amphipathic face of SGTx has been shown to be an important in toxin activity. However, little is known about how this toxin interacts with membranes. In the present study, we reveal the interaction and orientation of SGTx1 in lipid membrane using fluorescence and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. In particular, we employ recently described transferred cross-saturation (TCS) NMR methods to identify the binding residues on SGTx involved in partitioning into the membrane. Hydrophobic patch region and C-terminus of SGTx1 are extended toward hydrophobic core and surrounding polar residues are located in the interface region of outer layer in lipid membrane. Also, mapping of TCS results reveals the two-fold symmetrical structure of SGTx1 resulting in proper orientation for binding of toxin to voltage sensor paddle. The information on interaction between SGTx1 and membrane utilize in understanding mechanism of gating modifier toward voltage-activated ion channel and movement of voltage sensor paddle.

P045 高等動植物の構造プロテオミクス

(<sup>1</sup>理研 GSC, <sup>2</sup>東工大総理工, <sup>3</sup>産総研 ADRC, <sup>4</sup>東大院理)

木川隆則<sup>1,2</sup>, 武藤裕<sup>1</sup>, 林文昌<sup>1</sup>, 山崎和彦<sup>1,3</sup>, 廣田洋<sup>1</sup>, 山崎俊夫<sup>1</sup>,  
Peter Güntert<sup>1\*</sup>, 前田秀明<sup>1</sup>, 好田真由美<sup>1</sup>, 白水美香子<sup>1</sup>, 田仲昭  
子<sup>1</sup>, 横山茂之<sup>1,4</sup>

**Structural proteomics of animals and a plant**

Takanori Kigawa<sup>1,2</sup>, Yutaka Muto<sup>1</sup>, Fumiaki Hayashi<sup>1</sup>, Kazuhiko Yamasaki<sup>1,3</sup>, Hiroshi Hirota<sup>1</sup>,  
Peter Güntert<sup>1\*</sup>, Toshio Yamazaki<sup>1</sup>, Mayumi Yoshida<sup>1</sup>, Mikako Shirouzu<sup>1</sup>, Akiko Tanaka<sup>1</sup>,  
and Shige-yuki Yokoyama<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>RIKEN Genomic Sciences Center, <sup>2</sup>Interdisciplinary Graduate School of Science and  
Engineering, Tokyo Institute of Technology, <sup>3</sup>Age Dimension Research Center, National  
Institute of Advanced Industrial Science and Technology, and <sup>4</sup>Graduate School of Science,  
The University of Tokyo, Japan.

\*Present affiliation: Institute of Biophysical Chemistry, University of Frankfurt, Germany

RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI) (<http://www.rsgi.riken.jp>) was  
organized by RIKEN Genomic Sciences Center (GSC) and RIKEN SPring-8 Center 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. The RSGI aims to  
study both structures and molecular functions of protein families. In this framework,  
RIKEN GSC is mainly targeting mouse, human, and *Arabidopsis thaliana* proteins, from the  
viewpoint of domain families involved in phenomena of biological and medical importance.

Domain(s) belonging to selected families are further screened in terms of the suitability for  
the structure determination. The *E. coli* cell-free protein synthesis system is used for protein  
expression method because it is more suitable for efficient expression of a large number of

Keywords: 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, タンパク質機能ドメイン

著者ふりがな: 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, ペーター ぎゅんたーと, 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, よこやま しげ  
ゆき

constructs than in vivo protein expression systems. Throughout the screening stages, the protein samples were prepared directly from PCR-amplified linear DNA fragments without any cloning procedures. The winners in the screening stage are subjected to larger-scale cell-free production of the uniformly  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled samples for the NMR spectroscopy, and then step to structure determination. A part of the samples that are judged to be more suitable for the X-ray crystallography are prepared in the selenomethionine-substituted form for structure determination by MAD phasing.

The large-scale NMR facility housing 40 high-field NMR spectrometers have been constructed at RIKEN Yokohama Campus. We have developed several key software such as a program package, KUJIRA, which is used for systematic and interactive NMR data analysis, and the program CYANA for automated structure calculation. Thanks to these programs, structure determination process by NMR have been dramatically accelerated.

In these 5 years, we have determined more than 1,300 structures by NMR spectroscopy according to this workflow, and more than 1,300 structure by X-ray crystallography. We have established the structure platform of domains related to the protein interaction network to understand them based on the structure.

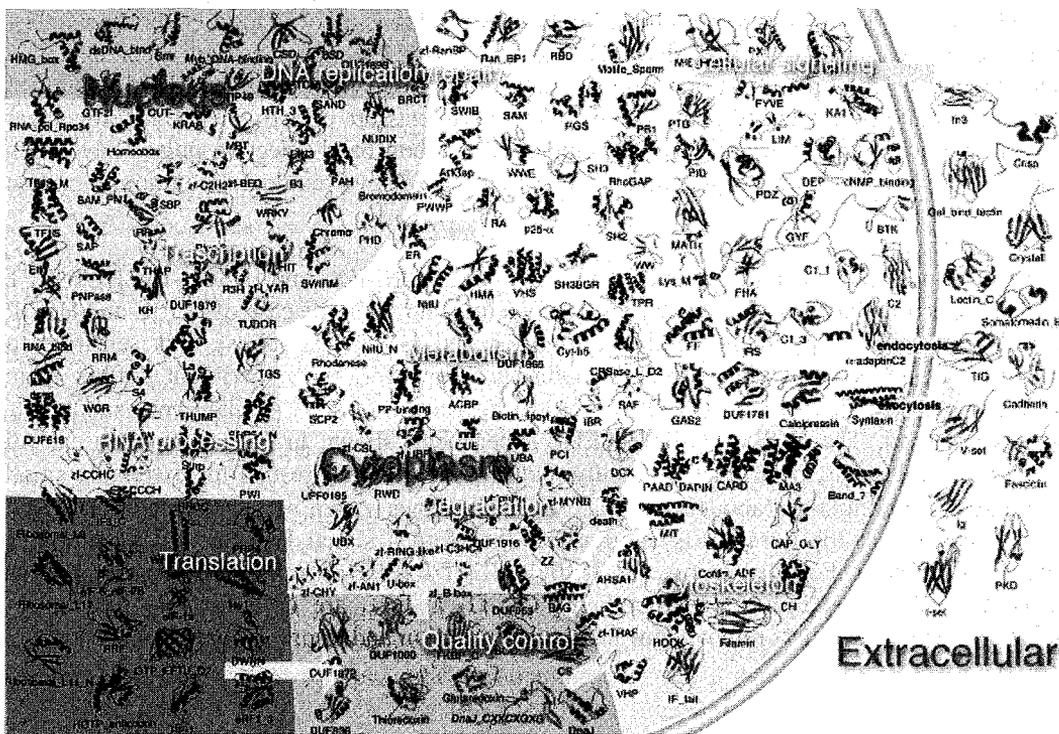


Figure. The structure platform of domains related to protein interaction network

## Assignment of silylated polyphenols by long-range triple-resonance H/Si/C experiments at natural abundance

Michal MALOŇ, Shunya TAKAHASHI and Hiroyuki KOSHINO

RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research), 2-1 Hirosawa, Wako,

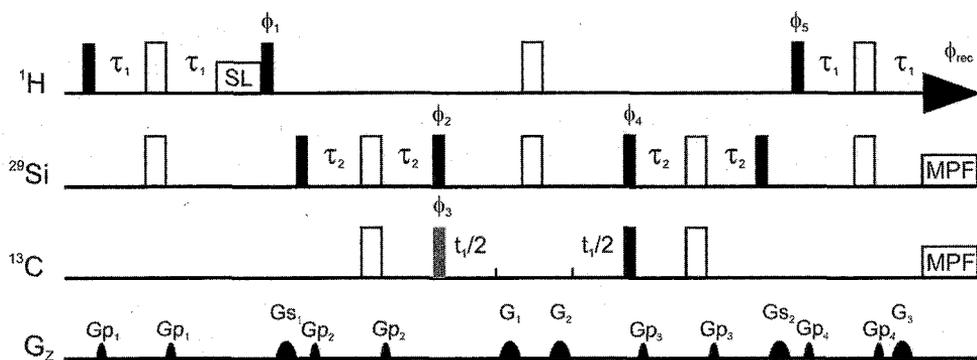
Saitama 351-0198, Japan

Polyphenols represent a numerous class of natural products having many interesting biological effects. They have been extensively studied for anti-oxidative, free-radical scavenging, anti-inflammatory, anti-aging and anticancer activity and so on.<sup>1,2</sup> Structure elucidation and signal assignment based on routine homonuclear and heteronuclear NMR experiments often fail or lead to ambiguities, especially in the case of highly oxygenated condensed species. For this reason, new two-dimensional H(Si)C triple-resonance experiments have been developed and applied to silylated phenolic compounds at natural abundance in order to overcome inherent limitations of classical correlation experiments. The pulse sequences based on INEPT/HMQC<sup>3</sup> and INEPT/INEPT<sup>4</sup> schemes have been designed and evaluated. Due to application of proton detection, pulsed field gradients (PFG), spinlock pulses (SL) and sophisticated phase cycles, the experiments are effective while heteronuclear long-range couplings  ${}^nJ_{\text{SiH}}$  and  ${}^nJ_{\text{SiC}}$  are employed. Carbon band-selective pulses have been used in order to shorten experimental time necessary to achieve required resolution in carbon dimension.

Generally speaking, the application of the H(Si)C-INEPT/HMQC and H(Si)C-INEPT/INEPT leads to spectra of comparable quality, as was recently shown in the case of H(P)C and H(C)P correlations.<sup>5</sup> The experiment combining INEPT and HMQC is robust, less sensitive to improper adjustment and instrumental conditions. However, the experiment suffers from severe signal loss due to long HMQC durations  $\tau_2$  based on  $1/(2J_{\text{SiC}})$  when very small  ${}^nJ_{\text{SiC}}$  values are used. The H(Si)C-INEPT/INEPT experiment, shown in Fig. 1, requires careful adjustment and great spectrometer stability, but it leads to better results for extremely small silicon-carbon couplings (about 1.5 Hz). INEPT durations  $\tau_2$  are set according to  $1/(4J_{\text{SiC}})$  which means that the duration is shorter and therefore a signal loss due to relaxation is significantly lower. For this reason, the H(Si)C-INEPT/INEPT should usually be preferred as a method of choice. Pulsed field gradients  $G_1$ ,  $G_2$  and  $G_3$  are used for  ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$  gradient selection, while the others remove unwanted magnetization and improve quality of spectra.

---

Keywords: Phenol; Silylation; Triple-resonance; Long-range couplings; Natural products

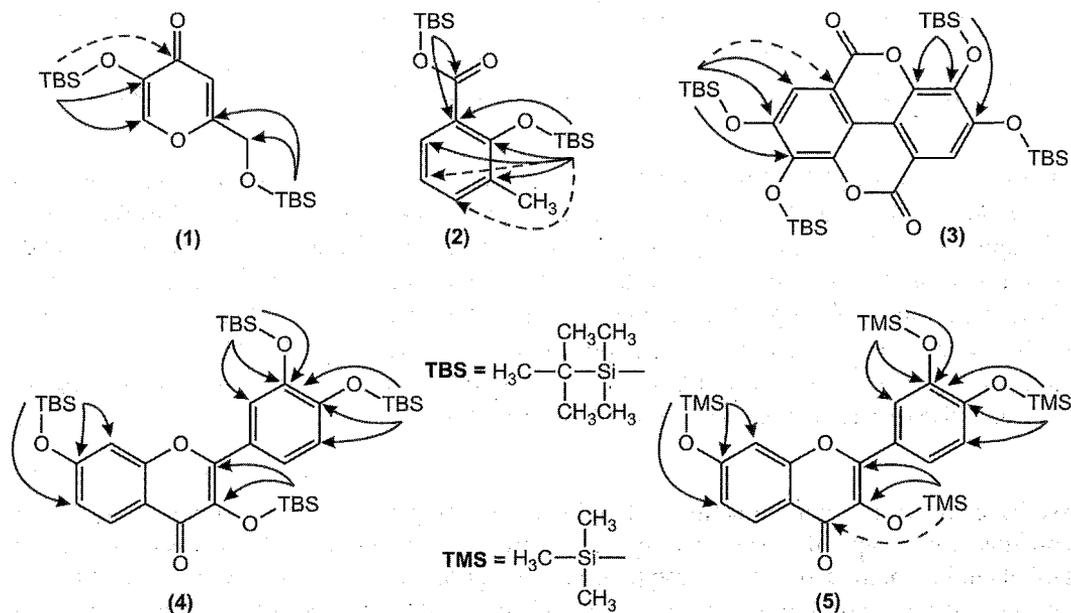


**Figure 1.** The PFG-H(Si)C-INEPT/INEPT pulse sequence used in this study. Filled and open bars represent  $90^\circ$  and  $180^\circ$  pulses, respectively, while open boxes correspond to broadband decoupling (MPF) or spinlock pulse (SL). A grey bar in  $^{13}\text{C}$ -channel represents a band-selective pulse. Composite  $\pi$ -pulses ( $90^\circ_x/180^\circ_y/90^\circ_x$ ) should be used in  $^{13}\text{C}$ -channel. Delays, phase cycles and ratio of gradient strengths are as follows:  $\tau_1 = 1/(4J_{\text{SiH}})$ ;  $\tau_2 = 1/(4J_{\text{SiC}})$ ;  $\phi_1 = y$ ;  $\phi_2 = y$ ;  $\phi_3 = x, -x$ ;  $\phi_4 = 2(y), 2(-y)$ ;  $\phi_5 = y$ ;  $\phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x$ ;  $G_1 : G_2 : G_3 = \gamma_{\text{H}}/(2\gamma_{\text{C}}) : \gamma_{\text{H}}/(2\gamma_{\text{C}}) : 1$ , i.e.  $G_1 : G_2 : G_3 = 1.988 : 1.988 : 1.000$ . Gradient strengths of  $G_{s_n}$  and  $G_{p_n}$  are arbitrary. The experiment is performed in absolute mode.

We have chosen *tert*-butyldimethylsilyl (TBS) protective group for several reasons. At first, it contains two groups of chemically equivalent protons which may be very useful in case of polyphenolic compounds and overlapping signals. Further, its proton spectrum contains two singlet signals, representing 6 or 9 equivalent protons, respectively. Thus, sensitivity enhancement is great. Finally, TBS ethers of phenols are usually easy to handle. Trimethylsilylated compound (**5**) has been studied for comparison.

We measured two H(Si)C-INEPT/INEPT spectra for each silylated compound shown in Fig. 2. In both measurements, the value of  $^nJ_{\text{SiH}}$  was adjusted to 6.7 Hz. One triple-resonance experiment was optimized to observe  $^2J_{\text{SiC}}$  couplings using value of 2.5 Hz (100 ms), while the other was optimized to  $^3J_{\text{SiC}}$  couplings using value of 1.5 Hz (167 ms). In the former condition, correlations based on  $^3J_{\text{SiC}}$  usually appeared in spectra either, but with lower intensity compared to two-bond silicon-carbon correlations. In latter condition, two-bond correlations were greatly suppressed or disappeared completely, thus the spectra usually contained three-bond correlations solely. It is worth to say that correlations of a low intensity, based on  $^{4-5}J_{\text{SiC}}$ , were apparent in some cases. According to our observation, they are hardly observable using proton detection and samples of rather low concentration, so they should be omitted in structure elucidation and signal assignment of real samples. Observed long-range/long-range H(Si)C-correlations are summarized in Fig. 2. Detection of quaternary carbon atoms directly bonded to oxygen was possible in all the cases. Similarly, H(Si)C correlations allowed us to assign carbon atoms in ortho-positions with respect to the TBSO group. However, no correlation signal was observed for carbonyl carbon in the case of compound (**4**). In similar polyphenolic compound, trimethylsilylated quercetin, the value of  $^3J_{\text{SiC}}$  was published to be 0.5 Hz.<sup>6</sup> For that reason, we prepared compound (**5**) and measured triple-resonance spectra again. Finally, we obtained correlation signal between trimethylsilyl methyl protons and the carbonyl carbon. Therefore, the value of  $^3J_{\text{SiC}}$  in (**5**) is probably

similar to one found in silylated quercetin and the correlation signal was observed. In the case of compound (4), bulky TBS group probably caused a conformational change and vanishing of  $^3J_{SiC}$ . Therefore we could not detect any signal even if many scans and relatively high concentration of the sample were used. Based on this experience, in case of structure elucidation and signal assignment of unknown compound, careful inspection and awareness is necessary.



**Figure 2.** Long-range/long-range H(Si)C correlations observed by H(Si)C-INEPT/INEPT experiment in silylated phenolic compounds (1-5). Durations  $\tau_1$  and  $\tau_2$  were optimized to observe: a)  $^nJ_{SiH} = 6.7$  Hz ( $n = 2-3$ ),  $^nJ_{SiC} = 2.5$  Hz ( $n = 2$ ), b)  $^nJ_{SiH} = 6.7$  Hz ( $n = 2-3$ ),  $^nJ_{SiC} = 1.5$  Hz ( $n = 3$ ). Solid arrows depict H(Si)C-correlations observable in measurement a). Dashed arrows correspond to additional correlation signals detectable in b).

For comparison, we modified  $^{29}Si$ -detected experiment combining  $^1H$ - $^{29}Si$  INEPT and  $^{29}Si$ - $^{13}C$  HMQC<sup>7</sup> in order to check its performance on our instrument equipped with an inverse probe. We implemented  $^{29}Si$ - $^{13}C$  gradient selection, homospoil gradient and  $^{13}C$  band-selective pulse in order to improve quality of triple-resonance spectra. We got some interesting results, but it is appropriate to emphasize that a high sample amount was necessary (about 50 mg) as well many scans (128 scans). For comparison, the INEPT/INEPT spectrum was recorded with 16 scans for the same sample. Moreover, when we tried to focused on very small  $^nJ_{SiC}$  (about 1.5 Hz), a severe signal intensity loss was observed. Thus performance of the silicon detected experiment is very low on our instrument and proton detected experiments provide much better results.

The spectra were recorded on a JEOL ECA 600 operating at 600.17 ( $^1\text{H}$ ), 150.91 ( $^{13}\text{C}$ ) and 119.24 ( $^{29}\text{Si}$ ) MHz, at 25°C. The spectrometer was equipped with a 5 mm inverse triple-resonance  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/\text{X}$  probe, where X-channel was tunable over the range of resonance frequencies from  $^{31}\text{P}$  (242.95 MHz) to  $^{15}\text{N}$  (60.82 MHz), and z-axis pulsed field gradients. The spectra were processed with a Delta NMR Processing and Control Software version 4.3.6 (JEOL USA, Inc.).

### Acknowledgements

This work was supported by the Grant-in-Aid for JSPS Fellows No. 17-05865 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and The Special Project Funding for Basic Science (Chemical Biology Project) from RIKEN. M.M. is grateful Japan Society for the Promotion of Science for The JSPS Postdoctoral Fellowship for Foreign Researchers.

### References

1. Arts, I. C. W.; Hollman, P. C. H. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 317S-325S.
2. Lu, Y.; Foo, L. Y. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 117-140.
3. Berger, S.; Bast, P. *Magn. Res. Chem.* **1993**, *31*, 1021-1023.
4. Marino, J. P.; Schwalbe, H.; Anklin, C.; Bermel, W.; Crothers, D. M.; Griesinger, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6472-6473.
5. Maloň, M.; Koshino, H. *Magn. Res. Chem.* **2007**, in press.
6. Schraml, J.; Blechta, V.; Sýkora, J.; Soukupová, L.; Cuřínová, P.; Proněk, D.; Lachman, J. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 829-834.
7. Berger, S. *J. Magn. Reson. A* **1993**, *101*, 329-332.

P047

## 腫瘍マーカーに対する糖鎖修飾が誘導する立体構造変化

北海道大学大学院先端生命科学研究所

○藤谷直樹、黒河内政樹、高暁冬、松下隆彦、比能洋、篠原康郎、西村紳一郎

### “Glycosylations Induced Structural Transition of Tumor Markers”

Division of Advanced Chemical Biology, Graduate School of Advanced Life Science, Frontier Research Center for Post-Genome Science and Technology, Hokkaido University.

Naoki Fujitani, Masaki Kuroguchi, Xiao-Dong Gao, Takahiko Matsushita, Hiroshi Hinou, Yasuro Shinohara and Shin-Ichiro Nishimura.

Abstract: Mucin glycoproteins (mucins) are extracellular proteins expressed on epithelial surfaces and organs as a major component of mucosa, and they include heavily *O*-glycosylated sites that are usually comprised of tandemly repeated sequence rich in threonine (Thr) and serine (Ser) residues. The canceration induces the structure alteration of *O*-glycan, therefore mucins in tumor cells have gotten a lot of attention recently as diagnostic and therapeutic application for cancer treatment. In this study, we have synthesized the glycopeptides and characterized their structural features through ppGalNAc-T2 enzymatic reactions, MALDI-TOF/TOF and NMR analyses. The obtained results suggested that the GalNAc incorporation to Thr residue stabilized the peptide structure with hydrophobic interaction and hydrogen bond.

#### 【背景】

ムチンは粘膜の代表的な成分であり、現在ヒトにおいて 21 種類が同定されている。この内、3 つのムチンを除く全てのムチンに糖鎖付加が起こると考えられるタンデムリピート配列が存在するが、生理学的にその機能は未解明なものが多い。ムチンは疾患の種類や部位によって、その発現量に顕著な差が認められる場合が多く、腫瘍マーカーや癌ワクチンへの応用が期待されている。ムチンのタンデムリピート配列はセリン、スレオニン残基に富み、*O*-結合型の糖鎖修飾を受ける(*O*-グリカンが形成される)。生体内における *O*-グリカンの形成は、一般的に *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が ppGalNAc-T とよばれる糖転移酵素によってセリン、またはスレオニン残基に結合することから開始され、その後、様々な糖転移酵素によって糖鎖伸長が起きる。本研究では、分泌型ムチンの 1 つである MUC5AC のタンデムリピート配列における GalNAc 転移の順序と、それに伴う立体構造変化を、糖転移反応実験、MALDI-TOF/TOF 解析、さらに NMR 解析を用いて明らかにした。

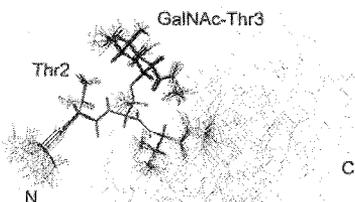
キーワード: 糖鎖修飾、疾患マーカー、立体構造変化

著者ふりがな: ふじたに なおき、くろごうち まさき、こう ぎょうとう、まつした たかひこ、  
ひのう ひろし、しのはら やすろう、にしむら しんいちろう

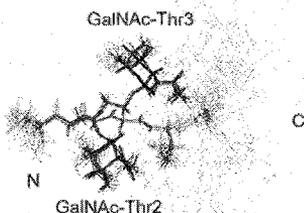
## 【実験】

アミノ酸配列 PTTVGSTTVG からなる分泌型ムチンであるヒト MUC5AC のタンデムリピート配列を電磁波照射で固相合成した。ムチンが糖鎖修飾されていく過程とそれに伴う立体構造変化を観察するため、合成したペプチドに対し、糖ヌクレオチドである UDP-GalNAc と大腸菌を用いて発現させた糖転移酵素である ppGalNAc-T2 を用いて糖転移反応を行い、糖鎖修飾が起きた部位を MALDI-LIFT-TOF/TOF MS によって決定した。この糖転移反応によって生成した糖ペプチドを同様に合成し、NMR 測定の結果を元に立体構造を算出した。さらに合成した糖ペプチドに対して同様の糖転移反応を行い、成熟したムチンが形成される過程を追跡した (Scheme 1)。

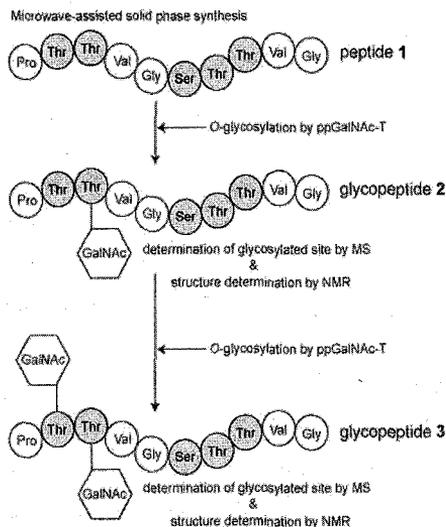
a)



b)



**Fig. 1.** Well-converged 30 structures of glycopeptides determined by structure calculations with restraints from NMR experiments. a) and b) represent 30 structures of glycopeptide 2 and 3, respectively. They are superimposed by the heavy atoms of Thr-Val<sup>1</sup> and GalNAc(s).



**Scheme 1.** Strategy for the investigation of the relationship between O-glycosylation and structure alteration. The potential residues for O-glycosylation are indicated by grey.

## 【結果・考察】

合成したペプチド PTTVGSTTVG に ppGalNAc-T2 による糖転移反応を行った結果、Thr3 に GalNAc 付加が MS/MS 解析によって認められた。Thr3 に GalNAc が付加した糖ペプチドを合成し、NMR によって立体構造を算出した (Figure 1a)。この結果、GalNAc が付加した Thr3 近傍は収束した立体構造を得ることに成功し、一定のコンフォメーションを形成していることが明らかとなった。その際、GalNAc 付加が起きた 1 つ前の残基である Thr2 の側鎖が疎水性相互作用によって安定化されていることも明らかになった。この糖ペプチドに対してさらに糖転移反応を行ったところ、Thr2 に対して優先的に GalNAc 付加が起こることが確認された。Thr2 のコンフォメーションが固定化されることが、この糖転移に強く影響を及ぼしたものと考えられる。2 糖付加した糖ペプチドの立体構造も求めたところ、GalNAc 付加によって Thr2 の側鎖が反転し、安定なコンフォメーションを形成していることが明らかになった (Figure 1b)。

\*1. T. Matsushita et al. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 877-880.

\*2. M. Kuroguchi et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4071-4075

○鵜澤 洵、馬場崇行、関 宏子、丑田公規

理研 環境ソフトマテリアル研究ユニット、千葉大 分析センター

**An NMR study of novel mucin extracted from “*Aurelia aurita*”**

Jun Uzawa<sup>1,2)</sup>, Takayuki Baba<sup>1)</sup>, Hiroko Seki<sup>2)</sup> and Kiminori Ushida<sup>1)</sup>

1) Eco-Soft Materials Research Unit, RIKEN,

2) Chemical Analysis Center, Chiba University

**Abstract**

NMR is supposed to be a powerful technique to solve the structure of glycoproteins where both saccharide units and amino acids are involved. We combined several two-dimensional (2D) methods (DQF COSY, HMQC/HSQC, HMBC and <sup>1</sup>H selective HMBC) with a selective one-dimensional (1D) one (DPFGSE-TOCSY/NOESY) to clarify the connecting structure between threonines and GalNAc in qniumucin, a novel mucin extracted from a jellyfish, *Aurelia aurita*. The sequence of 8 amino acids in the repeating unit of qniumucin was confirmed by a <sup>1</sup>H selective HMBC strategy. DPGFSE-NOESY with homo spin decoupling (HSD) was found to be very efficient for the assignment of bridging bond structure because the essential information were promptly obtained in a relatively short period.

**【はじめに】**

くらげは日本海で大量に発生し、近年、漁業被害をもたらしているため、この解決策が急がれている。くらげから有益な物質が見つければ、新たな資源として利用できるようになり、これこそが有効な解決策となると考えられる。

くらげから抽出したゲル状の物質をアミノ酸分析、アミノ酸配列解析等で分析した結果、8 個のアミノ酸配列を基本繰り返し1次構造 (Tandem Repeat) とする高分子ペプチドに N-acetyl galactosamine (GalNAc) が結合したムチン (高分子糖タンパク質) の一種であることが推定され、これを qniumucin と命名した<sup>1)</sup>。この試料を高速液体クロマトグラフによる精製によって NMR 測定において解析可能な試料を得ることができた。

ムチンについては、合成された model-glycopeptides について、水素結合による研究<sup>2)</sup>や、mucin-like glycoprotein について合成による研究がされている<sup>3)</sup>。

NMRによるタンパク質の構造解析は一般に <sup>13</sup>C と <sup>15</sup>N がラベルされた試料を使って、最近ではほとんどルーチン的に行われるようになった。一方で、糖タンパク質/糖ペプチドの NMRによる構造解析研究はそれ程進展していない。それは、これらの研究の重要性の問題ではなく、ラベルの困難さ (費用も含めた) やシフトの分布の違いによる測定法が未開発などの理由による<sup>4)</sup>。ラベル化されない化合物の場合は、むしろ天然物としての構造決定手法が役に立つと考えられる。

混合物を対象とする NMR 測定法にはいくつかあるが、Double Pulsed Field Gradient Spin Echo

キーワード：くらげ、ムチン、DPFGSE、HMBC、糖蛋白質

うざわ じゅん、ばば たかゆき、せき ひろこ、うしだ きみのり

(DPFGSE)により選択的にプロトンを照射して、そのプロトンとスカラー相互作用や双極子相互作用を通じた平面構造や立体構造を解析する測定法が確立されている<sup>5-8)</sup>。

本報告では、最初に CP/MAS を含む各種 NMR スペクトルを検討した後、<sup>1</sup>H selective HMBC<sup>9)</sup> スペクトルから 8 個のアミノ酸の配列を確認したのち、Thr と GalNAc の結合部分を解析した結果について述べる。次に、DPFGSE-NOE に homo spin decoupling (HSD) を組み合わせた測定法<sup>10)</sup> が threonine (Thr) と糖の結合情報を得るのに有益であると考えて実験を行い、Thr と GalNAc の結合を短時間で証明することができたので、これを報告する。

## 【結果および考察】

### 1. 固体高分解のスペクトルとの比較結果

ムチンのように、本来混合物として存在し、溶液に溶かしても長い時間濁っている試料を測定した場合、果たして何を見ているか不安を持った。溶けない他の成分があるならば、それとの混合割合を見極めなければ正しい解析とは言えなくなる。そこで、CP/MAS スペクトルと溶液の <sup>13</sup>C スペクトルを比較検討することによって全体の構造を確認した。

### 2. 1D NMR, DQF-COSY, HMQC/HSQC の結果と特徴

Qniumucin のスペクトルと、合成された 8 残基 {Val(1)-Val(2)-Glu-Thr(1)-Thr(2)-Ala(1)-Ala(2)-Pro} のペプチド、GalNAc のそれぞれの 1D NMR スペクトルを比較するといくつかの夾雑物と見られるピークが見られるが、主要なパターンは一致していることを確認した。

DQF-COSY, HMQC/HSQC, HMBC, DPGSE-TOCSY, DPGSE-NOE の結果を基にスペクトルの帰属を行った。各種 NMR データから、Thr beta カーボンが単独の場合の 67 ppm 付近から 80 ppm まで低磁場シフトした。これは糖などが結合した結果によるものと考えた。

### 3. <sup>1</sup>H selective HMBC によるアミノ酸配列の証明

<sup>1</sup>H selective HMBC による測定結果を Fig.1 に示す。1 個のカルボニルカーボンに 2 個の alpha プロトンからのクロスピークが見られ、図中に示すようにこれを線で結ぶことによって、-(Val(1)-Val(2)-Glu-Thr(1)-Thr(2)-Ala(1)-Ala(2)-Pro-) というアミノ酸配列が証明された。なお、帰属不可能なクロスピークも存在しているが今回は精査しない。

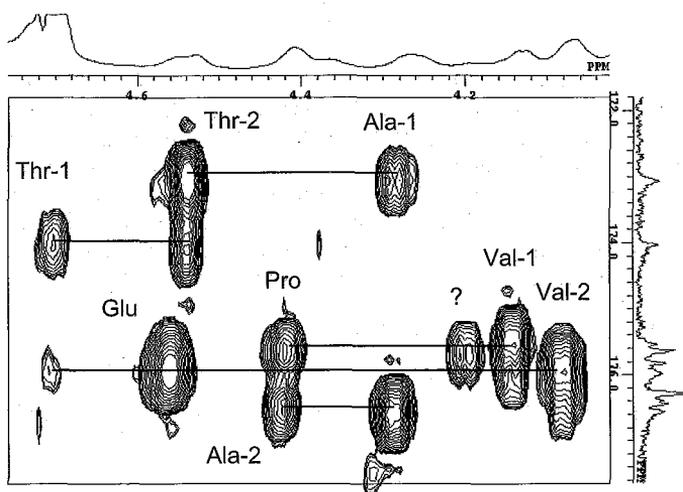


Fig. 1. 600MHz <sup>1</sup>H selective HMBC spectra for an aqueous solution of qniumucin. The figure shows the connectivity of alpha protons and carbonyl carbons and 4 days of experimental period was required.

#### 4. HMBC法とDPFGSE-NOE法によるアミノ酸と糖の結合状態の解明

通常の HMBC 法により、GalNAc の H-1 と Thr-beta カーボンのクロスピーク群、Thr-beta プロトンと GalNAc の C1 のクロスピーク群など、Thr に GalNAc が結合していることを証明する結果が得られた。

DPFGSE-NOE の実験ではすべてマイナスの NOE が得られた。GalNAc (1) の H-1 (4.90)からは 4.38 ppm に NOE が見られ、これは TOCSY など他の実験から Thr (1)-beta プロトンと帰属されている。同じく、GalNAc(2) H-1 (4.94) から 4.26 ppm に NOE が見られた。4.26 ppm のプロトンは TOCSY など他の実験から Thr (2)-beta プロトンと帰属されている。4.55 ppm は Thr (2)-alpha プロトンと帰属されている。Thr (1) のメチル基(1.32 ppm)からは Thr (1)-beta プロトン(4.38 ppm)の他 Thr (1)-alpha プロトン(4.71ppm)、GalNAc(1) の H-1 (4.90 ppm) に NOE が見られた。同じく、Thr (2) のメチル基(1.28ppm)からは Thr(2)-beta プロトン(4.26ppm)の他、Thr(2)-alpha プロトン(4.55 ppm)、GalNAc (2) の H-1(4.94 ppm)に NOE が見られた。

Thr (1)と Thr (2)および GalNAc (1)と GalNAc (2)の判別は、8 個のアミノ酸からなるモデルペプチドの精密なデータ解析結果、Ala や Glu など独立した信号からの NOE および上記の結果を総合して決定した。

#### 5. DPGSE-NOE-HSDによるスペクトル解析

HMBC による結果だけでは、Thr や GalNAc の2個をそれぞれ判別することは困難であり、この測定に4日間を要しており、測定時間をこれ以上掛けても好結果は得られないと予想した。前記の NOE の結果より得た Thr と GalNAcの結合をより確実に証明するため、DPFGSE-NOE-HSD を適用した。この実験は HMBC よりはるかに短時間(4日間で4時間)でキーポイントとなる情報を得ることができるので、より少ない試料のときは特に有益である。

Fig. 2 に示す通り、H-1 から Thr-beta プロトンに NOE が見られたとき、この条件で Thr のメチル基をデカップリングすると信号は先鋭化する。これは NOE が見られた信号が Thr-beta プロトンで

あることを証明している。また、Thr-beta プロトンと alpha プロトンのスピン結合定数はほとんどの場合、2Hz 以下であると報告されており<sup>2)</sup>、特に beta プロトンに分裂がみられないこの結果を支持している。

以上の結果を化学構造式上に表せば、Fig. 3 の結果となり、溶液中の Thr と GalNAc の相対的な立体関係を解明したことになる。

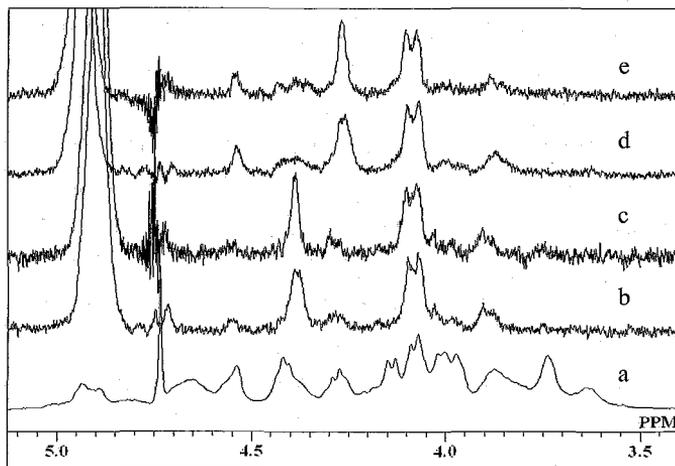


Fig. 2. Expanded 1D NMR spectra of qniumucin: (a) 400MHz  $^1\text{H}$  NMR spectrum. (b) DPGSE-NOE spectrum: DPGSE selective irradiation of GalNAc (1) H-1. (c) DPGSE-NOE-HSD spectrum; DPGSE selective irradiation of GalNAc (1) H-1 and HSD of Thr (1) methyl proton. (d) DPGSE-NOE spectrum: DPGSE selective irradiation of GalNAc (2) H-1'. (e) DPGSE-NOE-HSD spectrum; DPGSE selective irradiation of GalNAc (2) H-1 and HSD of Thr (2) methyl proton. Only 4 hours are sufficient to achieve the whole experiment.

### 【おわりに】

最初に、8個のアミノ酸配列を<sup>1</sup>H selective HMBCにより証明した。

ThrとGalNAcの結合がHMBCによりわかった。この結合をさらに詳細に決定するためにDPFGSE-NOE-HSDにより短時間で二つのThrがそれぞれ別のGalNAcに結合していることを明らかにした。この測定法は、短時間で混合物の中からもキーポイントとなる構造情報が得られるので、今後、複雑にピークが重なったムチンや糖鎖等への活用が期待できる。

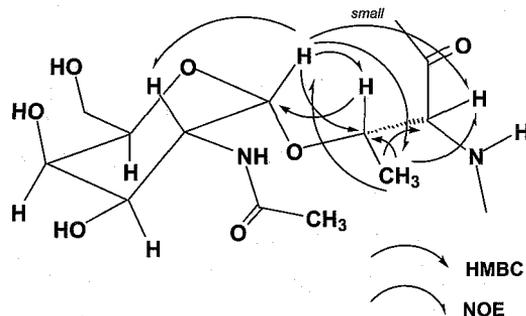


Fig. 3. Key interactions in HMBC and NOE correlations observed for qniumucin. This figure shows stereo structure of qniumucin in D<sub>2</sub>O.

### 【装置および試料】

NMR装置は、2D NMR測定については日本電子製 ECA600型装置に HCN5FG および TH5ATFG2型プローブを用いた。2D測定法ではすべて磁場勾配パルス法を使った測定法を用いた。<sup>1</sup>H selective HMBC測定は<sup>1</sup>H照射パルスは4msとした。DPFGSE-NOE-HSD測定は日本電子製 Alpha 400装置に TH5FGを用いた。DPFGSE照射パルス幅は66msとし、デカップリング条件は通常のシングルパルスで適当な値をチェックした後、これをそのまま使った。NOEのミキシングタイムは400msで測定した。測定は全て30°Cで行った。化学シフト値は重水に溶かしたDSSを0ppmとし、外部基準とした。

くらげから抽出したムチンの試料(qniumucin)約20mgを(株)シグマ製の5mm径の対象型試料管に入れ、重水0.14mlに溶解させ、一週間以上室温に置いて懸濁物を沈澱させてから、スピニングを止めて測定した。

### 【参考文献】

- 1) A. Masuda, T. Baba, N. Dohmae, M. Yamamura, H. Wada and K. Ushida, *J. Nat. Products*, in press.  
国際公開番号 WO 2007/020889 A1, “新規ムチン型糖タンパク質及びその用途, 2007年2月22日。
- 2) Y. Mimura, Y. Yamamoto, Y. Inoue and R. Chûjô, *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**, 242(1992).
- 3) Y. Tachibana, N. Matsubara, F. Nakajima, T. Tsuda, S. Tsuda, K. Monde and S. Nishimura, *Tetrahedron*, **58**, 10213(2002).
- 4) 山口芳樹、加藤晃一、蛋白質核酸酵素、**48**, 1184(2003).
- 5) T.L.Hwang and A.J.Shaka. *J. Magn. Reson.* **A112**, 275(1995).
- 6) K. Stott, J.Stonehouse, J. Keeler, T. L. Hawang and A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 4199(1995).
- 7) C. Roumestand, P. Mutzenhardt, C. Delay and D. Canet, *Magn. Reson. Chem.*, **34**, 807(1996).
- 8) M. Gradwell, H. Kogelberg and T. A. Frenkel, *J. Magn. Reson.*, **124**, 267(1997).
- 9) Ad. Bax, K.A. Farley and G. S. Walker, *J. Magn. Reson.* **A119**, 134(1997).
- 10) J. Uzawa, Y. Fujimoto and S. Yoshida, *Magn. Reson. Chem.*, **44**, 45(2006).

(微生物センター<sup>1</sup>、玉川大 農学部<sup>2</sup>、千葉大 分析センター<sup>3</sup>、  
理研 環境ソフトマテリアル<sup>4</sup>)

○久保田由美子<sup>1</sup>、堀 浩<sup>2</sup>、関 宏子<sup>3</sup>、赤松 穰<sup>1</sup>、鶴澤 洵<sup>3,4</sup>

### Structural analysis of oligosaccharides using DPGSE technique

(<sup>1</sup>Microbial Chemistry Research Center, <sup>2</sup>Dept. Life Science Tamagawa University, <sup>3</sup>Chemical Analysis Center Chiba University, <sup>4</sup>Eco-Soft Material Research unit RIKEN)  
Yumiko Kubota<sup>1</sup>, Hiroshi Hori<sup>2</sup>, Hiroko Seki<sup>3</sup>, Yuzuru Akamatsu<sup>1</sup> and Jun Uzawa<sup>3,4</sup>

The “structural reporter group” proposed by Vliegenthalt *et al.* is very useful for the analysis of primary structure of *N*-glycans. However, precise assignments of non-“structural reporter group” protons are also important for analysis of unknown oligosaccharides or for the studies of conformation and biochemical interactions. We applied TOCSY, NOE/ROE and SPT with DPGSE technique to analyze a branched mannopentose as a model of high mannose type *N*-glycan. The spectrum of the model is very complex and difficult to analyze due to signal overlapping. Superior selective irradiation ability of DPGSE technique was useful for fine structural and conformational analysis of such complex oligosaccharide.

#### 緒言

近年、糖鎖分子は核酸(DNA)、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として注目され、核酸やタンパク質を対象とするポストゲノム研究と平行して進めていくべき重要な課題と考えられている。研究の重要性は確認されているが糖鎖は構造的に類似した単糖が組み合わせられて多様で複雑な構造を作り出しているため、その構造の解析が困難である。構造解析の手段として以前よりNMR が使用されているが、Vliegenthartらの提唱する“structural reporter group”と呼ばれるスペクトル上で分離して観測できるアノメリックプロトンシグナルをよりどころに解析しているものが一般的である<sup>1)</sup>。この方法は生体でよく見られる一定の構造パターンを持つオリゴ糖の一次構造を推定するには有効であるが、その範囲を超える分子の場合、さらに詳細なNMR情報が必要となる。また、分子量が大きく、類似の構造を持つものの混合物においてはその解析は困難を極める。特にアスパラギン型糖鎖などによく見られるmannoseでは1位と2位のスピン結合定数(*J* 値)が小さく、1位からの1D-TOCSYの結果からも2位、最大3位までの相関しか得られない。

今回、堀らがアスパラギン型糖鎖の研究の際に合成したmannose 5残基から成るhigh mannose type糖鎖モデルオリゴ糖(M5、Fig. 1の四角内)について測定及び解析を行った。

キーワード: DPGSE, TOCSY, オーバーハウザー効果, oligosaccharide, 糖鎖の立体構造

○ くばたゆみこ、ほりひろし、せきひろこ、あかまつゆずる、うざわじゅん

アスパラギン型糖鎖high mannose typeの基本構造をFig. 1に示す。各mannose残基は結合の仕方によりケミカルシフト値に差が生じるが、D<sub>2</sub>,D<sub>3</sub> mannoseの違いは僅かであり対応するシグナルが極めて接近している。今回、このように判別困難なオリゴ糖において、Double Pulsed Field Gradient Spin Echo (DPFGSE) 法によるSelective Population Transfer (SPT) の実験<sup>3)</sup>を行った。この実験で非常に近接している3個のmannoseの2位のプロトンのケミカルシフト値(シフト値)とJ値を読み取ることができた。また、ROESYにスピンドカップリングを組み合わせる方法<sup>4)</sup>で立体構造の解析を行った。

さらに、従来からのアプローチとは異なる方法として、6位からDPFGSE-1D-TOCSY<sup>5)</sup>を試みた。これにスピンドカップリングを組み合わせる方法も試みた。

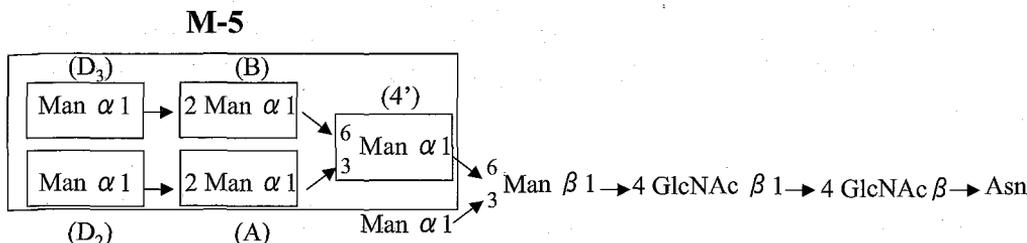


Fig. 1 Structure of asparagine linked high mannose type sugar chain.

### 実験法

装置は日本電子 ECA600型NMR装置(600 MHz、5 mm FG/HCN プローブ)を用いた。DPFGSEの照射パルス幅は66 msとし、照射信号が最大となる減衰値を求めた。SPT照射時間は100 msとした。ROESYのmixing timeは400 msとした。

試料は、位置選択的脱ベンジル化反応<sup>6)</sup>を用いた効率的な手法で合成し、約5 mgを重水に溶解して5 mm管に封入し測定した。測定は全て30°Cで行った。シフト値は、重水に溶かしたDSSを0 ppmとし、外部基準とした。

### 結果と考察

今回、解析したM5(構造式をFig. 2に示す)は、3個のmannoseの2位シグナルがほとんど重なっている。選択的照射に優れているDPFGSE\_SPT法により各糖の1位を照射することで、隣接する2位のシグナルのみが観測され、それぞれのシフト値とJ値を解析することができた(Fig. 3)。

次に、グリコシド結合周囲の立体配座情報を得るためにROE実験を試みた。Man-A残基1位からのDPFGSE-ROESYにMan-4'残基の2位プロトンを照射することで、ROESYで分裂(3.0 Hz)していたMan-4'残基3位プロトンのカップリングが消えることが観測された(Fig. 4)。この試料は、3位などのプロトンが重なっており、ROEの出たシグナルを確定す

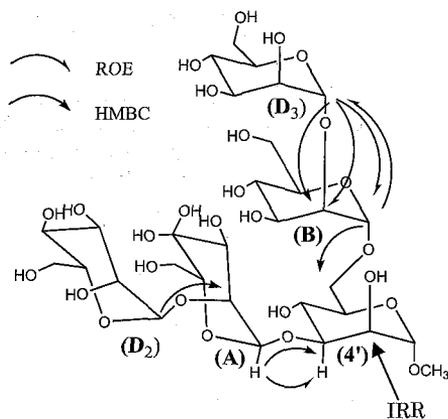


Fig. 2 Structure of M5 and the selected HMBC and ROE correlations.

ることが困難であるが、Man-4' 残基2位のプロトンをデカップリングしたときのスペクトル変化から、確実に帰属することができた。そのことに加え、Man-A残基1位とMan-4' 残基3位間にHMBC相関が観測されることから、Man-4' 残基とMan-A残基間のグリコシド結合の立体配座もFig. 2のように絞り込める。これは安定立体配座として一般に予測されるものと一致している。このように、重なったシグナルの中からNOE/ROEによるシグナルが現われた時に、離れたシグナルをデカップリングすることにより、特定のシグナルを帰属するのに有益であった。

従来、糖のNMRによる構造解析は、分離しているシグナルである1位プロトンをTOCSYで照射するのが常識であった。Mannoseは1位と2位のスピ結合定数が小さく、磁化移動がほとんどないために、二次元による帰属においても3位までしか決められない。そこで、6位のメチレンプロトンの方のプロトンシグナルを照射したTOCSY に1位のプロトンをデカップリングすることで、2位と3位のシフト値と $J$  値を確認することを試みた。その結果、1位が分離していれば1位をデカップリング照射することで隣接する2位のシフト値と $J$  値の解析が可能であった。

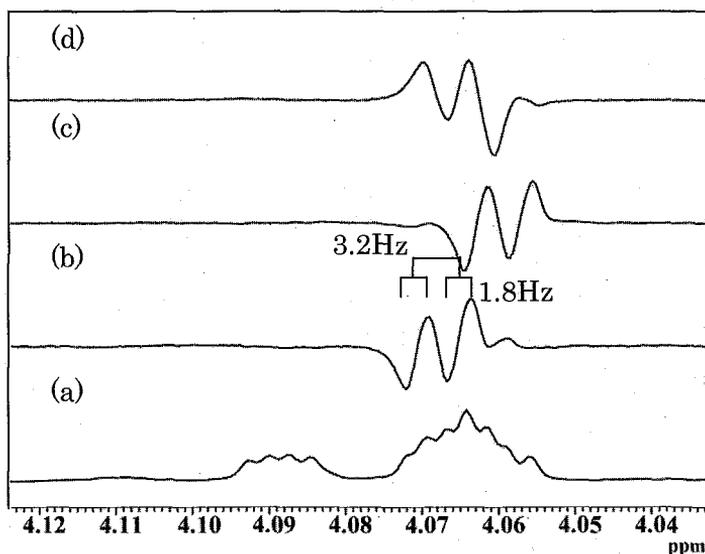


Fig.3 (a) 600 MHz  $^1\text{H}$  spectrum of M5. (b) - (d) DPFGE SPT spectra irradiation at (b) 4.72 ppm (Man-4' H-1 lower field line). (c) 5.04 ppm (Man-D<sub>2</sub> H-1 lower field line). (d) 5.03 ppm (Man-D<sub>3</sub> H-1 lower field line).

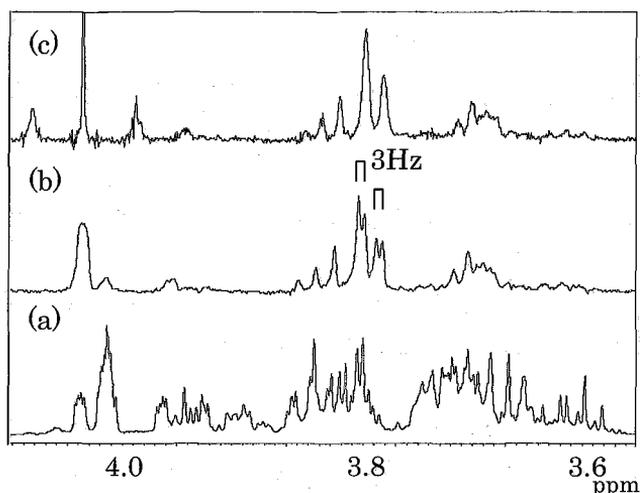


Fig. 4 (a)  $^1\text{H}$  spectrum of M5. (b) DPGSE ROESY spectrum. (Man-A H-1) (5.33ppm) was irradiated by DPGSE method. (c) DPGSE ROESY spectrum with homo spin decoupling. (Man-A H-1) (5.33ppm) was irradiated by DPGSE method and (Man-4' H-2) 4.09 ppm irradiated for spin decoupling.

#### 結語

シグナルの重なりが多く、解析困難なhigh mannose type の糖鎖においても、一次元と二次元の測定法を適切に使い分けることにより構造を決定することができた。特に照射位置の選択性に優れているDPFGSE法のTOCSY、SPT、ROEと、これにスピンドカップリングを組み合わせた測定法によりシフト値、 $J$ 値及び立体構造を比較的短時間で決定できた。今後は本測定法が糖鎖解析の重要な手段となり、利用されることを期待している。

#### 参考文献

- 1) J. F. G. Vliegthart, L. Dorland and H. van Halbeek, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **41**, 209 (1983).
- 2) J. F. G. Vliegthart, H. V. Halbeek, and L. Dorland, *Pure Appl. Chem.*, **53**, 45 (1981).
- 3) J. Uzawa and S. Yoshida, *Magn. Reson. Chem.*, **42**, 1046 (2004).  
 鵜澤 洵、吉田茂男、第43回NMR討論会要旨集、30頁、東京、2004.
- 4) J. Uzawa, Y. Fujimoto and S. Yoshida, *Magn. Reson. Chem.*, **44**, 45 (2006).  
 越野広雪、鵜澤 洵、第34回NMR討論会要旨集、207頁、筑波、1995.
- 5) T. L. Hwang and A. J. Shaka. *J. Magn. Reson.* A112, 275 (1995). K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T. L. Hawang and A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 4199 (1995). C. Roumestand, P. Mutzenhardt, C. Delay and D. Canet, *Magn. Reson. Chem.*, **34**, 807 (1996). M. Gradwell, H. Kogelberg and T. A. Frenkel, *J. Magn. Reson.*, **124**, 267 (1997).
- 6) H. Hori, Y. Nishida, H. Ohruai and H. Meguro, *J. Org. Chem.*, **54**, 1346 (1989).

DOSY 法によるヘテロダイマーカプセルの  
ゲスト包接の解析日本電子（株）・応用研究グループ<sup>1</sup>、静岡大学 理学部<sup>2</sup>)○末松孝子<sup>1</sup>、内海博明<sup>1</sup>、小林健二<sup>2</sup>

Analysis of the Heterodimeric Capsule-Guest Complexation by DOSY method

(Application & Research Group, JEOL Ltd.<sup>1</sup>,Department of Chemistry, Faculty of Science, Shizuoka University<sup>2</sup>)Takako Suematsu<sup>1</sup>, Hiroaki Utsumi<sup>1</sup>, Kenji Kobayashi<sup>2</sup>

Tetrakis (4-hydroxyphenyl)-cavitand **1** and tetra (4-pyridyl)-cavitand **2** self-assemble into a heterodimeric capsule **1·2** via four Ar-OH···pyridyl hydrogen bonds in CDCl<sub>3</sub>. The **1·2** has a cavity large enough to include guest molecule. For example, *p*-diacetoxybenzene is encapsulated by **1·2** in CDCl<sub>3</sub> solution. The <sup>1</sup>H-spectrum of a 1:1 mixture of **1** and **2** and *p*-diacetoxybenzene in CDCl<sub>3</sub> showed quantitative formation of guest-encapsulating, which was observed as shifted <sup>1</sup>H signal due to the complexation. To obtain further evidence of the heterodimeric capsule - *p*-acetoxybenzene complexation, we performed diffusion measurement and DOSY analysis. These results strongly supported heterodimeric capsule - *p*-acetoxybenzene complexation.

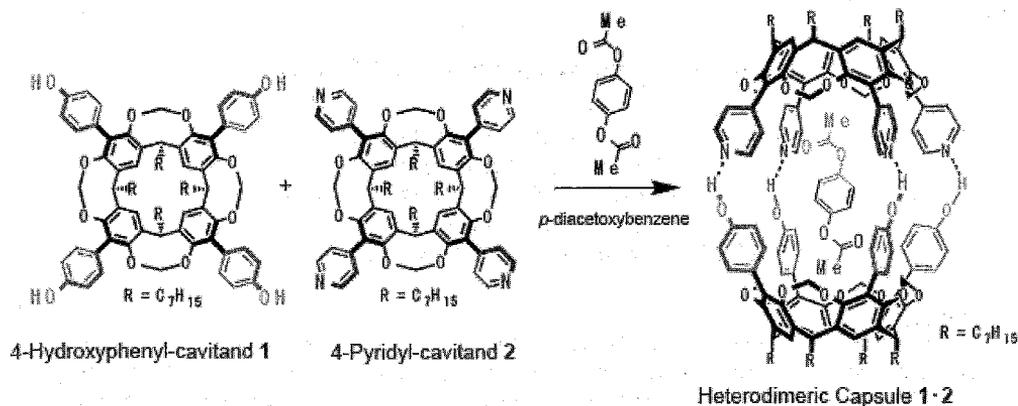
## &lt;はじめに&gt;

テトラキス(4-ヒドロキシフェニル)キャビタンド **1** とテトラ(4-ピリジル)キャビタンド **2** はクロロホルム溶液中において水素結合により自己集合しヘテロダイマーカプセル **1·2** を形成する。このヘテロダイマーカプセルは内部に空間を有し、ゲストをカプセル内に包接する。例えば、*p*-ジアセトキシベンゼンをヘテロダイマーカプセルに対して1当量加えると1:1で錯形成をする。この挙動は<sup>1</sup>Hスペクトルの化学シフトの変化より確認することができる。さらにNOESYスペクトルはヘテロダイマーカプセルの空間内に包接された形で錯形成していること示す結果となった。

*p*-アセトキシベンゼンを包接したヘテロダイマーカプセルと*p*-ジアセトキシベンゼンの1:1重クロロホルム溶液を作成し、拡散係数測定とDOSY法による解析を行った。その結果、包接されている*p*-ジアセトキシベンゼンとフリーの*p*-ジアセトキシベンゼンの拡散係数が異なっていることが明らかとなった。DOSY解析はスペクトル分離の良好な結果となり、ヘテロダイマーカプセルと*p*-ジアセトキシベンゼンの錯形成挙動を強く支持する結果を得ることができた。

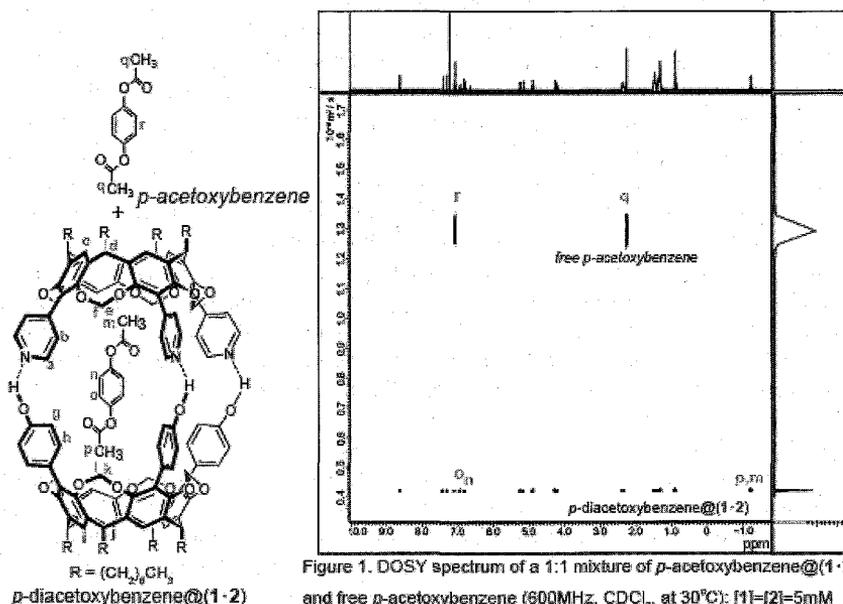
キーワード：DOSY、分子認識

ふりがな：すえまつたかこ、うつみひろあき、こばやしけんじ



### <結果>

$p$ -アセトキシベンゼンを包接したヘテロダイマーカプセルと  $p$ -ジアセトキシベンゼンの 1:1 重クロロホルム溶液において、包接された  $p$ -ジアセトキシベンゼンとフリーの  $p$ -ジアセトキシベンゼンの拡散係数値は  $4.28 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$  と  $13.03 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$  であり、明らかに異なっていることが確認できた。Fig 1 に DOSY スペクトルを示す。



### <考察>

$p$ -ジアセトキシベンゼンのケミカルシフトは包接体とフリーの状態が大きく違うため、DOSY スペクトルにおいて結果は明らかである。包接されている  $p$ -ジアセトキシベンゼンの拡散係数はヘテロダイマーカプセルとほぼ同じであることを示しており、この結果は  $p$ -ジアセトキシベンゼンが包接されていることを強く支持している。

## Analysis of Plant Metabolites by DNP-NMR

Steven Reynolds<sup>1</sup>, Takamasa Abe<sup>2</sup> and Jun Kikuchi<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>*Molecular Biotoools, Oxford Instruments, UK*

<sup>2</sup>*MRI/NMR Division, Oxford Instruments KK, Japan*

<sup>3</sup>*Plant Science Center, RIKEN, Japan*

<sup>4</sup>*Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Japan*

### Introduction

Dynamic nuclear polarisation (DNP) has been shown to greatly enhanced signal intensity of NMR nuclei in solution-state NMR spectroscopy.<sup>1</sup> The technique involves cooling a sample to <4 K in a strong magnetic field ( $B_0=3.35$  T) in the presence of a trityl radical.<sup>2</sup> Under such conditions, the unpaired electrons on the trityl radical become strongly polarised, and this polarisation can be transferred to nearby atomic nuclei using microwave irradiation ( $\nu \approx 94$  GHz). Once the polarisation has built up to a sufficient level (typical over 0.5-4 hours), the sample is dissolved by the injection of an aliquot (typically 3-5 mL) of hot solvent and rapidly (<1 s) transferred to a conventional NMR spectrometer for measurement. During sample polarisation the NMR spectrometer is available to other users. Work to date has been concerned with the polarisation of single molecules and simple mixtures. We now extend this work to show that it is possible to obtain hyperpolarised NMR spectra of compounds extracted from plants.

### Experimental considerations

<sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C labelled plant metabolites were prepared by feeding rice plants with <sup>15</sup>N or <sup>13</sup>C labelled nutrients.<sup>3,4</sup> The metabolites were then extracted using methanol. Two sets of rice seed extract (RSE) supplied labelled with either <sup>15</sup>N; Batch 1N(20mg RSE/ml), 2N(30mg RSE/ml) or <sup>13</sup>C; Batch 1C(3mg RSE/ml), 2C(10mg RSE/ml). Samples were then prepared for polarisation by taking 130  $\mu$ l of plant extract/methanol solution and mixing it with 70  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O: required to form a glass when frozen. To this was dissolved 10-15mM radical. Two radicals were used for this study, and are known as OX63 and Finland.<sup>5</sup> Both are based on a trityl radical and differ in their outer groups that influences hydrophobicity. Previous studies have shown that the degree of polarisation obtained can depend upon the choice of radical used and both radicals are tested with a polarisation target.<sup>6</sup> A 200  $\mu$ l polarisation sample was inserted into a HyperSense DNP polariser operating at 1.4K and polarised overnight in order to ensure maximum polarisation of the sample. The sample was automatically transferred using 4ml of hot methanol to a 10mm NMR tube placed in the NMR magnet. A single scan spectrum was recorded using an inverse gated 90° pulse-acquire sequence using a broadband observe probe on a JEOL ECA 400MHz spectrometer.

### Results and Discussion

Initial experiments were conducted on three metabolically relevant molecules that were polarised individually first to determine these level of enhancement and subsequently combined as a mixture and polarised.<sup>7</sup> The degree of enhancement observe for a particular spectrum was found to be not only dependent on temperature and microwave frequency but the choice of radical used. A second experiment was performed to determine whether a mixture of <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C labelled amino acids (purchased from Shoko Ltd) could be polarised and all components enhanced. Figure 1 shows the <sup>13</sup>C hyperpolarised (a) and thermally acquired (b) NMR spectra. The expanded the carbonyl region of figure 1 shows 8 distinct resonances in both spectra. A second sample of identical composition

dynamic nuclear polarization, hyperpolarization, DNP-NMR, metabonomics, plants

Steven Reynolds、あべたかまさ、きくちじゅん

was polarised again and the  $^{15}\text{N}$  NMR spectrum was acquired (Figure 2), no thermal NMR was observable from this sample after 3000 scans. Spectra from figures 1 and 2 show that both  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  nuclei of the sample are being polarised and in principle both spectra could be acquired simultaneously.

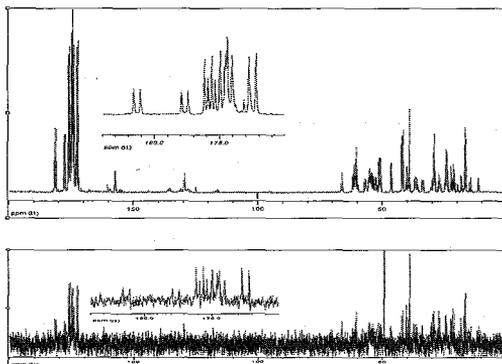
Batch 1N of RSE was prepared containing 2.6mg of RSE and 3.5mg of OX63, dissolution was performed with 4ml of methanol. The  $^{15}\text{N}$  NMR spectrum acquired from which 7 distinct resonances are resolved in the region of 40-141ppm. Batch 1N was prepared again, in this case using the 3.4mg of Finland radical and transferred using 4ml of methanol in which an additional two resonances can be observed at 33.2 and 68.6ppm. This shows that radical interaction with the polarisation target(s) is important to the enhancement.

A sample containing 130 $\mu\text{l}$  (1.3mg RSE) of Batch2C and 4.00mg OX63 was prepared and dissolution performed with 4ml methanol. Initially only a single resonance was observed 170.2ppm (data not shown). The experiment was repeated with the pH of the polarisation sample adjusted to pH13 and showed two additional resonances. Clearly pH has an effect of the level of polarisation or  $T_1$  of the target molecules: the lack of other resonances shows that relaxation loss of other  $^{13}\text{C}$  sites is occurring.

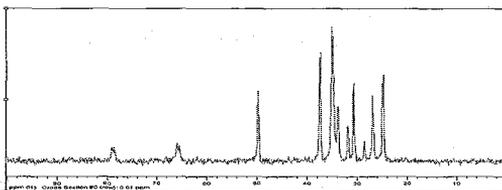
Batch 2N was prepared containing 3.9mg of  $^{15}\text{N}$  labelled RSE and 3.34mg Finland, dissolution was performed with 4ml methanol. This yielded only three peaks all of which could be matched to resonances in figures 1 or 2. The sample was prepared again (2.97mg Finland) in which the pH of the polarisation sample was adjusted to pH13.05 with 10 $\mu\text{l}$  10mM sodium hydroxide solution. The peaks at 43.3, 68.3, 72.9 and 102ppm match with those in the previous figures 1 and 2, however, there are additional resonances at 24.7, 89.8, 99.3 potential indicating the presence of other metabolites. Again changing the sample pH influence the degree of polarisation, further investigation is required into whether pH effects radical contact with the target molecules or alter the  $T_1$  of the polarised nuclei.

#### References

- [1] Ardenkjaer-Larsen, J. H.; *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, 10158.
- [2] Wolber, J.; *et al.*, *Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. A*, **2004**, *526*, 173.
- [3] Kikuchi J. and Hirayama T. *Biotech. Agri. Forest.*, **2006**, *57*, 93.
- [4] Kikuchi J. and Hirayama T. *Method Mol. Biol.*, **2007**, *358*, 273.
- [5] The OX63 and Finland trityl radicals, patented by GE Healthcare.
- [6] Blazina D., Reynolds S. and Slade R., "Influence of Trityl Radical on the DNP Process", Application note, **2006**.
- [7] Slade R., Hutton G and Blazina D., "Characterising Solid-State DNP", Application note, **2006**.



**Figure 1:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 2.7mg U- $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -amino acid mixture (Shoko ltd).  
(a) hyperpolarised over night, single scan.  
(b) thermal NMR spectrum of same sample 1700 scans, 45deg pulse, 10s delay



**Figure 2:**  $^{15}\text{N}$  NMR spectrum of 2.1mg U- $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -amino acid mixture (Shoko ltd).  
Hyperpolarised overnight, single scan.

# P052 DPGSE 法を用いた Macarbomycin の立体構造の解析

(<sup>1</sup>微化研センター、<sup>2</sup>理研 環境ソフトマテリアル、<sup>3</sup>千葉大 分析センター)  
○ 澤 竜一<sup>1</sup>、久保田 由美子<sup>1</sup>、梅沢 洋二<sup>1</sup>、梅北 まや<sup>1</sup>、五十嵐 雅之<sup>1</sup>、  
高橋 良和<sup>1</sup>、赤松 穰<sup>1</sup>、鶴澤 洵<sup>2,3</sup>、関 宏子<sup>3</sup>

## Structural Analysis of Macarbomycin using DPGSE technique.

(<sup>1</sup>Microbial Chemistry Research Center, <sup>2</sup>Eco-Soft Material Research unit RIKEN  
<sup>3</sup>Chemical Analysis Center Chiba University,)

Ryuichi Sawa<sup>1</sup>, Yumiko Kubota<sup>1</sup>, Yoji Umezawa<sup>1</sup>, Maya Umekita<sup>1</sup>, Masayuki Igarashi<sup>1</sup>,  
Yoshikazu Takahashi<sup>1</sup>, Yuzuru Akamatsu<sup>1</sup>, Jun Uzawa<sup>2,3</sup> and Hiroko Seki<sup>3</sup>

Macarbomycin was isolated as an antibiotic active against Gram positive bacteria in 1970. This compound was known to be a kind of a glycopospholipid antibiotic related with moenomycin and diumycin, but the structure of macarbomycin was not determined to the present. The difficulty to elucidate the chemical structure of macarbomycin is overlapping of <sup>1</sup>H signals. Moreover, only a very small amount of sample was available for the NMR measurement because of the physico-chemical properties like moenomycin.

Here, we report on the structure elucidation of the sugar part of macarbomycin using some DPGSE method such as DFFGSE-SPT, DPGSE-TOCSY-ZQF and DPGSE-NOE-ZQF.

### 1 緒言

抗生物質 macarbomycin<sup>1)</sup>は、1970年に梅沢らによって、グラム陽性菌に対して有効な物質として発見された。本物質は、moenomycin<sup>2)</sup>に代表される glycopospholipid 抗生物質の一種であり、diumycin<sup>3)</sup>ときわめて類似していることは知られているが、本物質の構造は決定されるに至っていなかった。moenomycin は、細胞壁ペプチドグリカン生合成の重合段階を触媒する膜結合型酵素であるグリコシルトランスフェラーゼに作用することが知られており、過去に飼料添加剤として用いられていたこともある。グリコシルトランスフェラーゼは、あらゆる細菌でよく保存されていることからその酵素をターゲットとした創薬が注目されている<sup>4)</sup>。

macarbomycin は、moenomycin と同様に化合物の性質上、濃度を上げて溶解すると粘性が高くなりプロトンシグナルがブロードとなるために NMR 測定には、微量の試料しか用いることができず、さらに構造中に複数の糖を含むことから 3~5 ppm のプロトンシグナルが複雑に重なり合い解析は困難を極めた。

今回、我々は、各種 NMR スペクトルを用いて macarbomycin の平面構造を決定し、Double Pulsed Field Gradient Spin-Echo (DPFGSE)<sup>5)</sup>を組み合わせたプロトン 1 次元 (1D)パルスシーケンス DFFGSE\_SPT<sup>6)</sup>、あるいは DPGSE\_TOCSY 用いて糖鎖のケミカルシフト値 (シフト値) およびスピン結合定数 ( $J$  値) の解析を行い、さらに DPGSE\_NOE 等を用いて主として糖鎖部分の立体構造の解析を行ったので報告する。

キーワード: Macarbomycin, glycopospholipid 抗生物質, DPGSE, NOE/ROE, 立体構造  
さわ りゅういち、くぼた ゆみこ、うめざわ ようじ、うめきた まや、いがらし まさゆき、  
たかはし よしかず、あかまつ ゆずる、うざわ じゅん、せき ひろこ

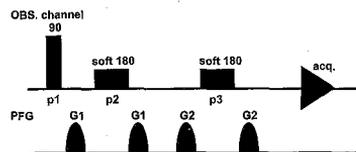
## 2 実験

装置：日本電子 ECA600 型 NMR 装置 (600 MHz) (5 mm FG/HCN プローブ) を使用した。

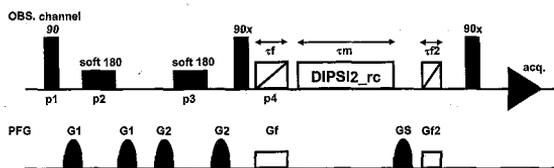
試料：macarbomycin の 2.1 mM (2 mg/0.6 mL) D<sub>2</sub>O 溶液を調製して用いた。

測定方法：平面構造の決定には、<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C、DEPT135 の 1D スペクトルと <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、HSQC、HMBC の 2 次元スペクトルを用いた。糖鎖部分のシフト値および *J* 値の解析には DPGFSE\_SPT (Fig. 1-b) および Zero Quantum Coherence (ZQC)由来のアンチフェーズ波形を消去する Zero Quantum Filter (ZQF)を加えた DPGFSE-TOCSY-ZQF<sup>7)</sup> (Fig. 1-c) を空間的相関については、DPGFSE-NOE-ZQF<sup>7)</sup> (Fig. 1-d) の各種 1D スペクトルを用いた。これら DPGFSE 法を用いた測定に際し、選択的 180 度パルス幅と照射強度の設定には、DPGFSE チェックパルスシーケンス (Fig. 1-a) を用いた。すべてのスペクトルは 5°C で測定した。

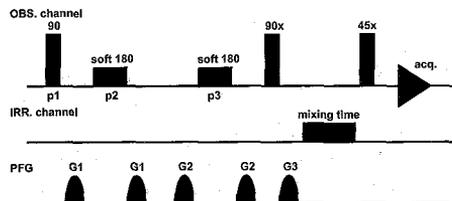
(a) DPGFSE check pulse sequence



(c) DPGFSE-TOCSY-ZQF pulse sequence



(b) DPGFSE-SPT pulse sequence



(d) DPGFSE-NOESY-ZQF pulse sequence

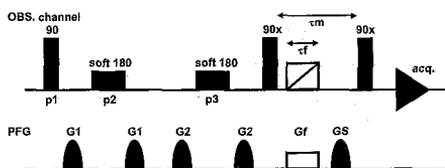


Fig. 1 . (a) DPGFSE check pulse sequence (b) DPGFSE-SPT pulse sequence. (c) DPGFSE-TOCSY-ZQF pulse sequence and (d) DPGFSE-NOE-ZQF pulse sequence. The phase was cycled as follows: p1= (x,-x), p2 = {2(x),2(y),2(-x),2(-y)}, p3 = {8(x),8(y), 8(-x),8(-y)}, p4= (x,-x), acq = 2(x,-x,x,x), 2(-x,x,x,-x). The phase cycle provides a difference mode. The PFGs are Z-axis gradients, all 1 ms in duration with the following levels: G1 = 6, G2 = 9, G3 = 3, Gf = 2.4, GS = 0.6 gauss/cm. The soft 180° pulses are Gaussian shaped, from 66 to 80 ms length. The mixing time were DPGFSE-SPT; 100ms, DPGFSE-TOCSY-ZQF (tm); 50ms, and DPGFSE-NOE-ZQF (tm); 400 ms, respectively. The chirp pulse (tf) for ZQF in DPGFSE-NOE-ZQF was 50 ms and tf1 and tf2 in DPGFSE-TOCSY-ZQF was 50 and 30 ms, respectively.

## 3 結果

macarbomycin の分子式は、高分解能 ESIMS より C<sub>69</sub>H<sub>108</sub>N<sub>5</sub>O<sub>35</sub>P であると決定した。本物質の各種 NMR スペクトルの解析を行った結果、<sup>1</sup>H NMR の 3~5 ppm および <sup>13</sup>C NMR の 65~80 ppm に糖由来の重複するシグナルが存在するために HSQC、HMBC スペクトルにおいても判別しにくい箇所が多かったが、Haiyin らによって報告された AC-326α<sup>8)</sup> と同一の平面構造であることが推定された。しかし糖鎖の構造については moenomycin との比較あるいは MS/MS 解析によるもののみであったことから本物質の糖鎖部分について 1D DPGFSE 法を用いた詳細なシフト値、*J* 値および NOE を解析することで糖の種類および糖相互間の立体配置の検討を行った。

Fig. 2 には一例として混合時間 80 ms で A~E の糖のアノメリックプロトンを選択励起した DPGFSE-TOCSY-ZQF のスペクトルを示した。糖 A、D および E については、混合時間が 20 ms、40 ms のスペクトルと比較することで明確にシフト値と *J* 値を解析することができたが、糖 B および C については、さらに重なり合っている部分があるために、糖 B については、1 位および

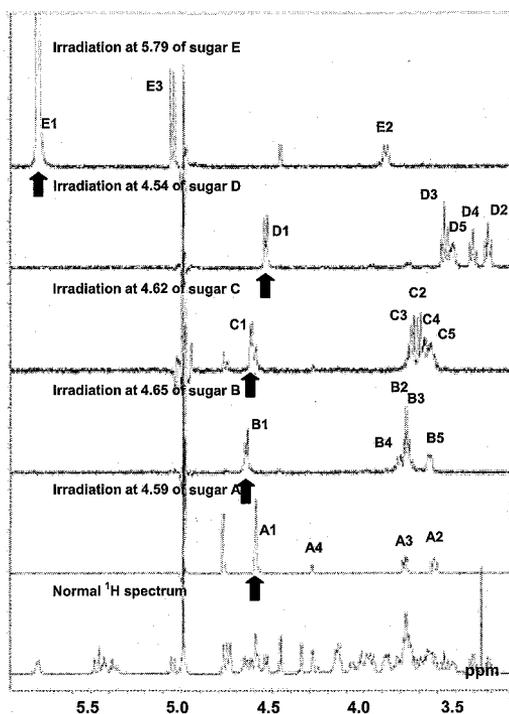


Fig. 2 DPGSE-TOCSY-ZQF spectra of macabomycin. The bold allows indicate the irradiating positions of the anomer proton in the sugar moieties.

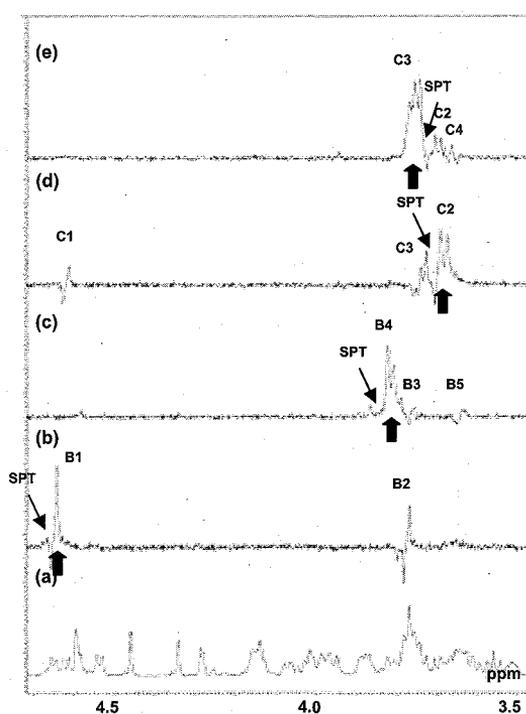


Fig. 3 (a) 600 MHz  $^1\text{H}$  spectrum of macabomycin. The bold allows indicate the DPGSE irradiating positions and the labels of {SPT} indicate the SPT irradiating positions. (b) Results of DPGSE-SPT irradiation at position 1 of sugar B. (c) Results of DPGSE-SPT irradiation at position 4 of sugar B. (d) Results of DPGSE-SPT irradiation at position 2 of sugar C. (e) Results of DPGSE-SPT irradiation at position 3 of sugar C.

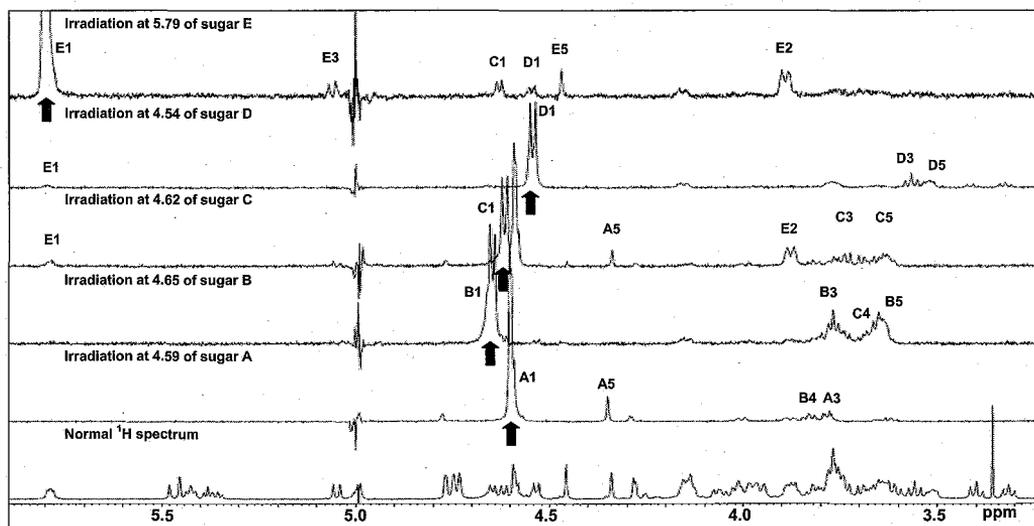


Fig. 4 DPGSE-NOE-ZQF spectra of macabomycin. The bold allows indicate the irradiating positions of the anomer proton in the sugar moieties.

4位のシグナルについて、糖Cについては、2位および3位についてDPFGSE\_SPTを用いてシフト値およびJ値の解析を行った。(Fig. 3) また、立体構造の解析のために測定の一例としてそ

それぞれのアノメリックプロトンからの DPGSE\_NOE スペクトルを示した (Fig. 4)。これらの結果から、糖 A は、ガラクトツロン酸、糖 B および C は N アセチルグルコサミン、糖 D は、グルコース、糖 E は 3-カルバモイル-4-メチルグルコピランウロアミドであることが判明した。また  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC においてそれぞれのアノメリックプロトンから隣接する糖の結合位置に相関が出ていることから、糖 A,B および糖 B,C は  $\beta$ -1,4 結合、糖 D,C は  $\beta$ -1,6 結合、糖 C,E は  $\beta$ -1,2 結合であること、さらに NOE の結果とあわせて Fig. 5 のようなコンフォーメーションをとることが推定できた。糖 E は 2 位 1 との  $J$  値および 1 位からの  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HMBC の相関より、リン酸と  $\alpha$  結合していることがわかった。

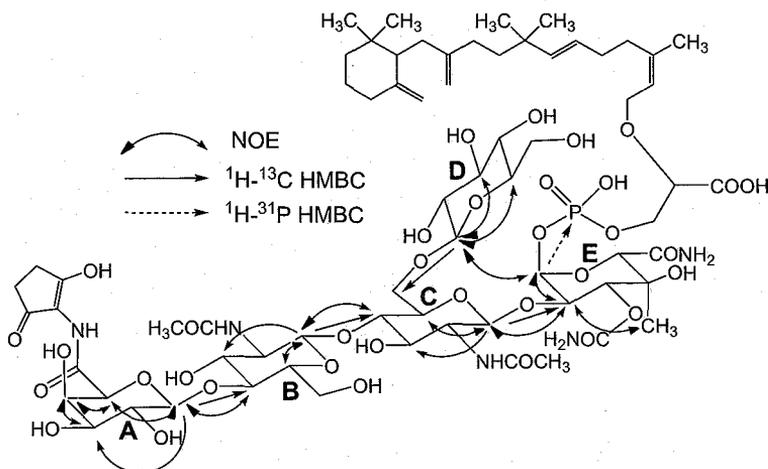


Fig. 5 Selected NOE and HMBC analyses of macarbomycin.

#### 4 まとめ

macarbomycin のような比較的分子量の大きい化合物においては、2次元 NMR スペクトルを多用されることが通常であるが、プロトンの  $J$  値を解析することは困難である。しかしこれらに加えて優れた選択励起法である DPGSE 法を用いた 1D NMR 測定法の DPGSE-SPT、DPGSE-TOCSY-ZQF、あるいは DPGSE-NOE-ZQF との相補的な解析を詳細に行うことで、今回示した複数個の糖を含む化合物のように複雑に重なり合った  $^1\text{H}$  NMR を与える天然有機化合物をはじめとする物質の構造解析においてその威力を発揮するものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Takahashi S., Okanishi A., Utahara R., Nitta K., Maeda K., Umezawa H., *J. Antibiot.* **23**, 48 (1970).
- 2) Wallhauser KH., Neesemann G., Prave P., Steigler A., *Antimicrobial Agents Chemother (Bethesda)*, **5**, 734 (1965).
- 3) Slusarchyk WA., Osband JA., Weisenborn FL., *J Am Chem Soc.*, **92**, 4486 (1970).
- 4) Lovering AL., de Castro LH., Lim D., Strynadka NC., *Science*, **315**, 1402 (2007).
- 5) Hwang TL, Shaka AJ. *J. Magn. Reson. A*, **112**, 275 (1995).
- 6) Uzawa J., Yoshida S., *Magn. Reson. Chem.*, **42**, 1046 (2004).  
鵜澤 洵、吉田茂男、第 43 回 NMR 討論会要旨集、p30、2004 年、東京。
- 7) Thrippleton M. J., Keeler J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 3938 (2003).  
櫻井智司、JEOL Application Note, NM161 (2005).
- 8) Haiyin H., Shen B., Korshalla J., Siegel M. M., Carter G. T., *J. Antibiot.* **53**, 191 (2000).

神戸薬大<sup>1</sup>、生産開発研<sup>2</sup>○都出 千里<sup>1</sup>、眞岡 孝至<sup>2</sup>、杉浦 眞喜子<sup>1</sup>

**Application of DOSY to Extracted Lipid  
Containing Carotenoids From Spiny Lobster**

Chisato Tode<sup>1</sup>, Takashi Maoka<sup>2</sup>, Makiko Sugiura<sup>1</sup><sup>1</sup>*Kobe Pharmaceutical University,*<sup>2</sup>*Research Institute for Production Development*

**Abstract :** DOSY is the new method to separate the NMR signals of different species in the mixture according to their diffusion coefficients. However, there are not so many examples of DOSY employed for a natural products. Therefore, we examined that DOSY was applied to extracted lipid containing carotenoids from Spiny Lobster. In the results, mostly separated spectrum of carotenoids were obtained.

《緒言》DOSY (diffusion-ordered spectroscopy)は、溶液中での混合物のNMRシグナルを拡散係数の違いによって分離する測定法である。例えば、観測したい化合物のシグナルと測定溶媒のシグナルが重なってしまうような場合でも、対象とする化合物の自己拡散係数と測定溶媒のそれは大きく異なるため、溶媒フリーのスペクトルが得られることになる。また分子量が異なるなど条件を整えば、天然物から抽出された混合物を単離精製することなく、同定できる可能性もある。さらに、DOSY-COSYなど二次元法を組み合わせた3D DOSYを用いれば、それぞれの成分の構造解析も可能になる。このように有用性の非常に高い測定法であるにもかかわらず、DOSYはこれまで一部の限られた化合物にしか適用されておらず、天然物へ応用されている例は少ない。

カロテノイドは近年、ビタミンCやEと並んで、活性酸素を消去する「バイオフィクター」の一つとして脚光を浴びている。中でもアスタキサンチンは、非常に高い有機フリーラジカル捕捉活性をもつことが知られている。カロテノイドは、天然に広く分布しているが、これらを種々の動植物から単離する際、トリグリセリドや長鎖の脂肪酸など分子量も分子の形も異なるものの混合物として得られ、その分離はHPLCを繰り返してもしばしば困難となることがある。また、分離操作を行ううちに、変質

**Key Words :** DOSY, carotenoid ester, natural products, separation, DOSY-COSY

とでちさと、まおかたかし、すぎうらまきこ

してしまったり、単離した化合物が既知化合物であったりすることも多い。以上のようなことを踏まえ、この分野への DOSY の適用を考えた。すなわち、天然から抽出したカロテノイドをある程度精製した段階で DOSY 測定を行い、その適用の可能性を探るとともに、限界を見極めることとした。今回は、試料としてイセエビ(*Panulirus japonicus*)の殻からの抽出物を取り上げ、精製段階の違いと DOSY 適用の可能性を検討した。

《実験》イセエビ(*Panulirus japonicus*)の殻からアセトンで脂質を抽出後、ヘキサン-エーテル(1:1)と水で分配、有機層を乾燥後、濃縮してシリカゲルカラムクロマトグラフィーで粗精製し、HPLC で精製を行った。その際、カロテノイド含有量の多い順にサンプル 1、2、3 とした。 $^1\text{H}$  NMR 測定は Varian UNITY INOVA-500 ( $^1\text{H}$ :499.8 MHz)を用いた。DOSY 測定は対流を抑えるために 3mm の試料管を用い、溶媒は汎用性を考慮して  $\text{CDCl}_3$  を用いた。

《結果と考察》Fig. 1 にサンプル 1 の  $^1\text{H}$ -DOSY のスペクトルを示した。オレフィン領域にシグナルが観察できる 3.6 $\text{m}^2/\text{s}$  付近にカロテノイド由来のシグナルがあると予想でき、その投影スペクトルから、アスタキサンチンの脂肪酸モノエステルの可能性が示唆された。さらにこのサンプルについて DOSY-COSY の測定を行ったところ、アスタキサンチンの脂肪酸モノエステルに相当するクロスピークを分離観測することができ、その存在を確認できた。一方、カロテノイド含有量の一番少ないサンプル 3 では、高磁場側は非常に複雑なシグナルであったため、カロテノイドのみのシグナルの分離はできなかったが、低磁場側では分離することができた。

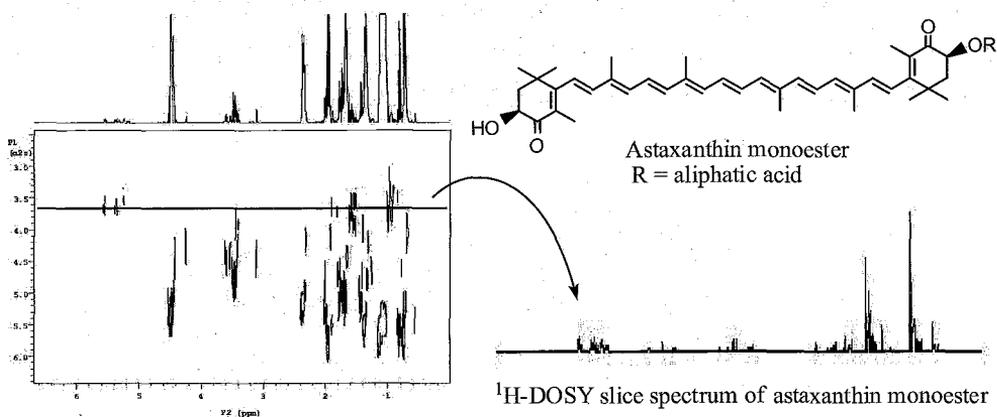


Fig. 1  $^1\text{H}$ -DOSY spectrum of sample 1

以上、イセエビから抽出したカロテノイド含有脂質混合物についてある程度精製した段階で DOSY を測定したところ、比較的カロテノイドの含有量が多い画分については、その含有カロテノイドの分離観測が可能であり、DOSY-COSY を組み合わせることによって、その構造を推定または同定でき、天然物へ適用できることがわかった。

(神戸薬科大学) ○杉浦 眞喜子, 都出 千里, 岩川 精吾,  
辰見 明俊

*H-D Exchange Reaction of Warfarin in D<sub>2</sub>O Solvent*

Makiko Sugiura, Chisato Tode, Seigo Iwakawa, Akitoshi Tatsumi

*Kobe Pharmaceutical University*

Warfarin (I) is a widely used anticoagulant that binds to the protein human serum albumin (HAS) with high affinity. In this study, H-D exchange reaction of this compound in D<sub>2</sub>O solvent was examined by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR.

The changes in the <sup>1</sup>H NMR spectral pattern of H-12 and H-11 over time suggested that one proton of H-12 was displaced with deuterium of D<sub>2</sub>O according to the reaction mechanism as shown in Fig. 3.

【はじめに】

Warfarin (I) は、抗凝血薬として汎用されているクマリン系医薬品であり、また血中の血清アルブミンと高い割合で結合することが知られている。従って D<sub>2</sub>O 溶液中での NMR 観測実験も多くなされているが、12 位のメチレン水素が、溶媒 D<sub>2</sub>O の重水素と交換反応することが見落とされがちである。現に、D<sub>2</sub>O 溶媒中の <sup>1</sup>H NMR の変化を Warfarin 分子の分解とみなして、この薬物の「安定性」の議論がなされている。<sup>1)</sup> 今回演者らは、<sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C NMR の経時変化（経日変化）を検討し、観測されるスペクトル変化が、12 位のメチレン水素の H-D 交換によるものであることを証明すると共に、その反応の詳細を検討した。

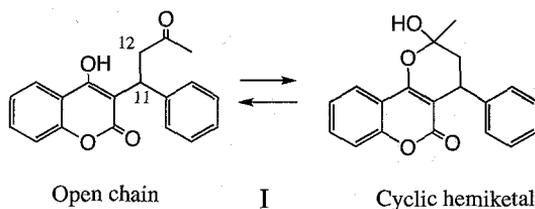


Fig. 1 The open chain and cyclic form of I

Key Word: Warfarin    H-D Exchange reaction    D<sub>2</sub>O solvent

すぎうら まきこ, とで ちさと, いわかわ せいご, たつみ あきとし

### 【実験】

以下の 4 種類のサンプルを用意し, A, B, C については  $^1\text{H}$  NMR, D については  $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR を経時的に観測した。

A: I 0.6 mg 《リン酸バッファー/ $\text{D}_2\text{O}$  (pD 7.20) 0.8 ml》 (2.4 m M), B: I 2.9 mg 《 $\text{DMSO-d}_6$  0.4 ml + リン酸バッファー/ $\text{D}_2\text{O}$  (pD 7.20) 0.4 ml》 (11.8 m M), C: I 3.4 mg 《 $\text{DMSO-d}_6$  0.4 ml + リン酸バッファー/ $\text{H}_2\text{O}$  (pH 7.28) 0.4 ml》 (13.8 m M), D: I 4.7 mg 《 $\text{DMSO-d}_6$  0.5 ml + リン酸バッファー/ $\text{D}_2\text{O}$  (pD 7.20) 0.3 ml》 (19.1 m M)。NMR の測定は, Varian UNITY INOVA 500 及び AS500 ( $^1\text{H}$ :499.8 MHz,  $^{13}\text{C}$ :125.7 MHz) を用い, サンプル調整直後から, A, B, C は 192 日目まで, D は 106 日目まで測定を続けた。

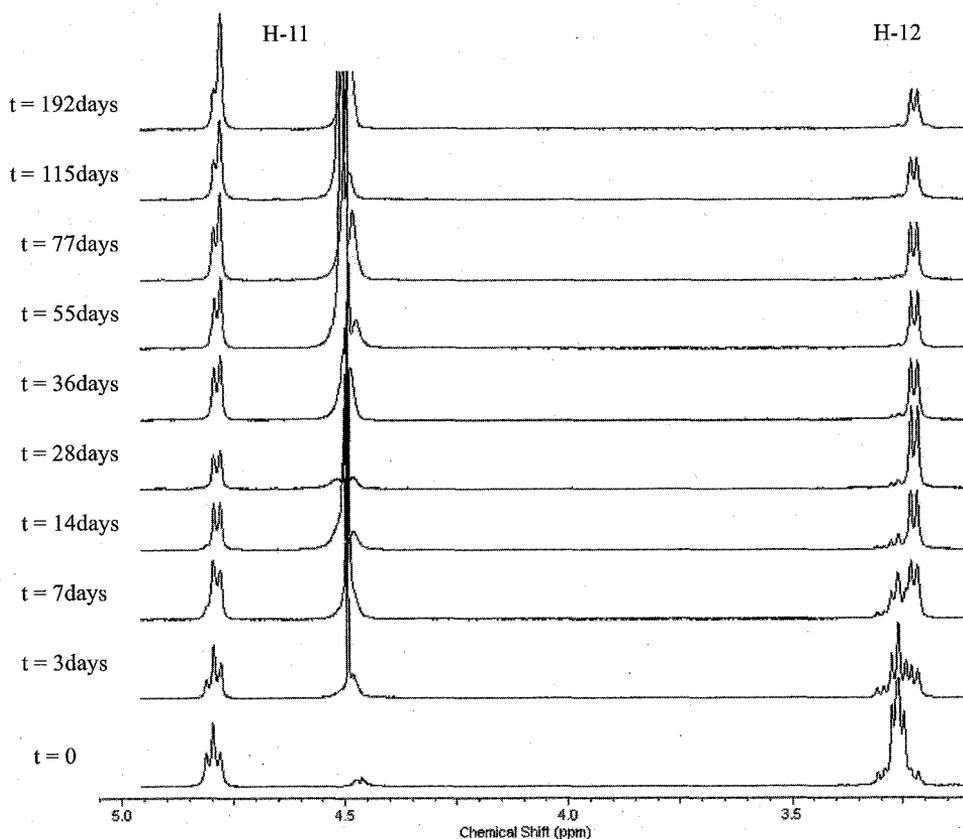


Fig.2. Changes in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of I in sample B over time.

### 【結果と考察】

I は, 溶液中では Fig 1 に示されるような平衡状態にあることが知られているが,

今回測定に用いた pH (pD) 7.2 付近では、ほぼ Open chain に偏っていることが分かっている、また観測されるスペクトルからもそのことは明らかである。

A の  $^1\text{H}$  NMR では、調整後数時間後から 12 位の  $\text{CH}_2$  に帰属される 3.46 ppm 付近のダブルットピークの少し高磁場側に新しいダブルットが現れ、3 日目には、元のピークとほぼ等量ぐらいになる。時間の経過と共に、元のダブルットのシグナルは消失し、新しく現れた高磁場側のダブルットも徐々に小さくなっていく。またその変化に呼応して 11 位の  $\text{CH}$  に帰属される 4.96 ppm 付近のトリプレットがダブルットに変わりさらにシングレットに近くなっていく。B も、調整直後のスペクトルパターンは違う (ABX パターン) が、また変化の速度も異なるが、基本的には A と同様な変化が観測された。(Fig. 2)

一方、C では、調整直後のスペクトルパターンは B と同じであるが、時間経過に伴う変化は見られなかった。このことから、A, B で見られる変化は、溶媒の  $\text{D}_2\text{O}$  に由来することは明らかである。

D は、 $^1\text{H}$  スペクトルは B と同じような変化を示すが、HSQC スペクトルで、12 位の炭素が、時間経過と共に  $\text{CH}_2$  から  $\text{CH}$  ( $\text{CHD}$ ) に変化してしていく様子が観測できた。また、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでは、12 位の変化に伴って、いくつかの炭素で重水素による同位体効果と思われる興味深い変化も観測されている。

以上のような知見から、 $^1\text{H}$  スペクトルにおける経時変化は、12 位の  $\text{CH}_2$  が  $\text{CHD}$  に、さらに  $\text{CD}_2$  に変化していく課程であることは明らかであり、その反応のメカニズムを、Fig. 3 のように考えた。

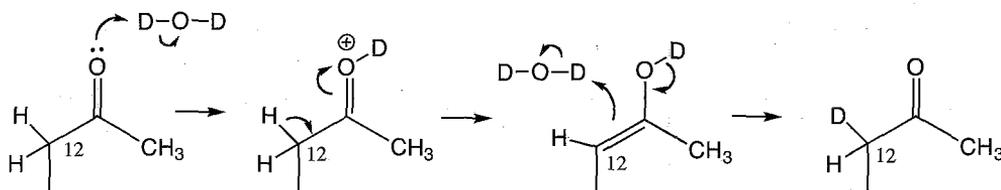


Fig. 3 Proposed mechanism for H-D exchange reaction on C-12 of I.

この反応メカニズムに従うと、最初は、 $\text{H} \rightarrow \text{D}$  の反応が大部分であるので、12 位水素に相当するシグナルの面積強度比は大きく減少していくが、反応が進むに従って、 $\text{H} \rightarrow \text{D}$  だけでなく、生成した  $\text{CHD}$  または  $\text{CD}_2$  も反応する、すなわち  $\text{D} \rightarrow \text{D}$  も起こりうるので、12 位のシグナルの減少度は落ちていくことが予想される。Fig. 4 に B における H-12 のシグナルの面積強度比の経時変化を示したが、これにより、初期は一次の反応となるが、その後指数関数的に減少していく様子が分かる。

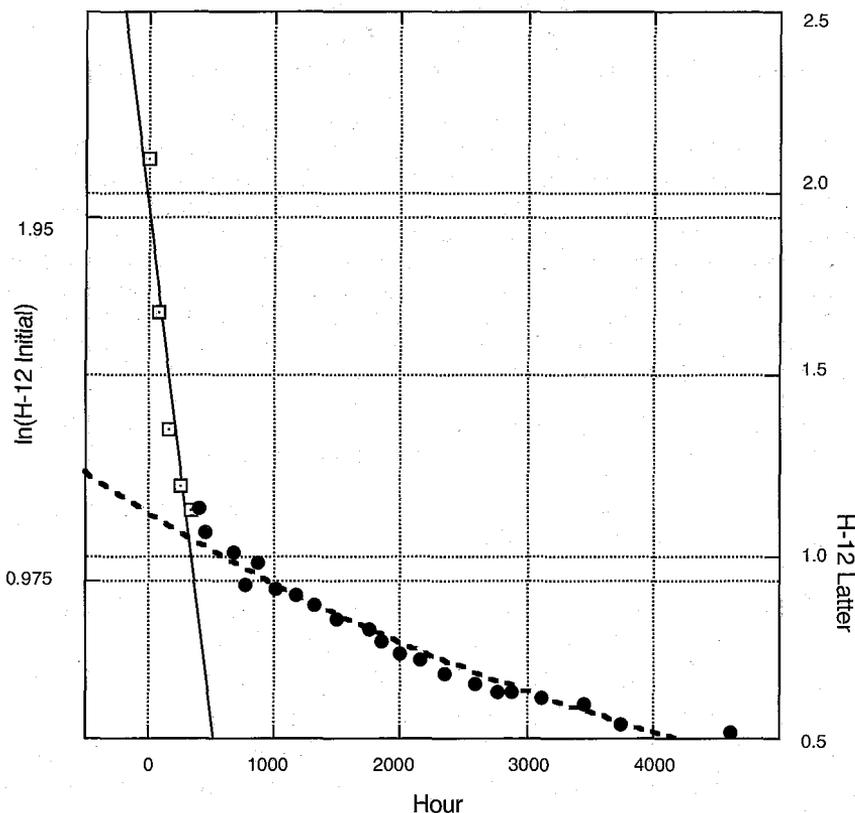


Fig.4. Plots of the integrated peak area of H-12 vs. times for sample B.

【結論】

Warfarin の  $D_2O$  溶媒中での  $^1H$  NMR のスペクトルパターンの変化は、12 位の水素が重水素に置き換わることによる変化であること、またその反応メカニズムは、Fig. 3 に従うことを明らかにした。

【文献】

1) A.C. Moser, C. Kingsbury, D.S. Hage, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** 1101 (2006).

# HMBC 法の新しい応用測定

P055

---Selective-J-resolved-HMBC 法について---

東大院農・応生化、\*東京農大

○降旗一夫、\*瀬戸治男

Selective J-resolved -HMBC, A New Method for Measuring Heteronuclear Long Range Coupling Constants.

Kazuo Furihata and \*Haruo Seto

Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo

\* Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture

Determination of long-range C-H couplings ( $J_{C-H}$ ) is getting important for stereochemical studies of natural products. The J-resolved HMBC-1 method we had previously proposed is a method of choice for this purpose with high sensitivity. The shapes of cross peaks, however, become complex by H-H couplings and long-range  $J_{C-H}$  resulting in difficult analysis of complicated spin systems.

New alternatives to solve this problem, J-resolved HMBC-2 and HR-HMBC, were not satisfactory for application to complicated molecules with short  $T_2$  for their low sensitivity. In order to overcome these problems associated with J-resolved HMBC-1, we have developed a new technique, Selective J-resolved HMBC.

The new method incorporating proton-proton decoupling into J-resolved HMBC-1 enables to suppress  $J_{H-H}$  and to observe only long-range C-H couplings with complicated molecules having short  $T_2$ .

Application of this new technique to a model compound, monazomycin, has proved that this method is useful for determination of  $J_{C-H}$  of complicated molecules.

## はじめに

天然有機化合物の構造解析において、long range  $J_{CH}$  を如何にして効率よく観測するかが重要な課題の一つである。HMBC 法はプロトン観測を行いプロトンと炭素とのスピン結合の関係を明らかにする方法であり、感度の点で非常に優れた方法であるが、通常の HMBC 法からは直接 long range  $J_{CH}$  を読みとることは困難であった。

既にこの問題を解決する方法として J-resolved HMBC-1 と-2 を報告した<sup>(1)</sup>。J-resolved HMBC-1 は  $t_1$  展開を初期値=0 から測定が可能であるため、delay time 導入に伴う感度の低下は免れ、S/N の良い cross peak を得ることができた。しかし、複雑なスピン系の解析ではプロトン-プロトンのスピン結合と long range  $J_{CH}$  が同時に観測されるため、cross peak は複雑に分裂し、その cross peak の解析が困難になるという問題があった。一方 J-resolved HMBC-2 は constant time 法を用いて、プロトン-プロトンのスピン結合を decoupling し、long range  $J_{CH}$  のみを観測する優れた方法であった。しかし、この方法は長い constant time delay を用いるために、 $T_2$  による S/N の低下が避けられず複雑な化合物では測定は困難であった。

Long range  $J_{CH}$  を観測する方法としては、J-resolved HMBC-1 と J-resolved HMBC-2 の問題点を解決し、複雑な化合物においても S/N が高く、しかも、解析が容易な cross peak を如何に観測するかが重要な課題であった。この課題を解決する方法として、プロトン-プロトンのスピン結合を decoupling し、long range  $J_{CH}$  のみを観測する方法として、selective J-resolved HMBC 法を検討し、良好な結果を得ることができたので報告する。

## Selective J-resolved HMBC

Selective J-resolved HMBC 法は、プロトン-プロトンのスピン結合した相手のプロトンを decouple し、特定のプロトンのみを J-resolved HMBC-1 法と同じように測定する。この方法は  $F_1$  軸で long range  $J_{CH}$  を測定するために、J-scaling 法<sup>(3,4,5)</sup>を導入し  $nt_1 \max$  を 300msec から 500msec 以上にスピン展開する。例えば、 $J=2\text{Hz}$  を観測するためには、

## Selective J-resolved HMBC

ふりはた かずお、せと はるお

digital resolution を  $2n$  Hz 以下、 $nt_1\max$  を 500msec 以上になるように、測定ポイントと scaling factor( $n$ )を設定する。その結果、スピン結合定数は実際の値に対し  $n$  倍の値として観測される。

Selective J-resolved HMBC 法のパルス系列は J-resolved

HMBC-1 のパルス系列において、プロトン-プロトンの decoupling を導入するために、J-分解法のプロトンの  $180^\circ$  パルスを selective  $180^\circ$  パルスに置き換える(図 1.)。そして、それに続く HMBC のパルス系列を CT-HMBC パルス<sup>(2)</sup>に置き換える。これは、Selective J-分解法と CT-HMBC 法との組み合わせである。

一方、J-resolved HMBC-1 の二つのプロトン  $180^\circ$  パルスを selective  $180^\circ$  パルスに置き換える方法は考えられるが、HMBC の展開期( $t_1$ )の中心に selective  $180^\circ$  パルスを用いた場合、そのパルスの励起領域以外のプロトンとの  $J_{CH}$  の分裂した cross peak が生じるため 4 級炭素の観測以外は実用的ではない。また、既に、この selective J-resolved HMBC 法と同じような方法として EXIDE 法が報告されている<sup>(5)</sup>。この EXIDE 法は、long range HSQC(HSMBC)法を使用した方法であるが、パルス系列が複雑であり、S/N の点からも実用的ではない。

Selective pulse としては、複数のプロトンを同時に励起しても、スピン結合にも化学シフトにも影響されず、位相が揃い、なおかつ、シグナルの選択性が高いことが重要である。ここでは、re-burp を使用した<sup>(6)</sup>。この re-burp を使用するにあたっては、pulse 巾を短くなるように、出来るだけ広い範囲を励起するように設定することと、プロトン-プロトンの decouple する相手のプロトンには磁場が及ばないように設定することが重要である。

図 2 は J-resolved HMBC-1 スペクトルの模式図である。(a)は J-resolved HMBC-1 である。ダブルット、トリプレットに分裂したプロトンからのクロスピークが J-分解スペクトルのようにそれぞれ傾斜して観測される。(b)は J-resolved HMBC-1 の一つのクロスピークを拡大したものである。J-resolved-HMBC-1 スペクトルにおいて、クロスピークは  $J_{CH}$  と  $J_{HH}$  が scale up されるために J-分裂が鮮明に観測される。そのクロスピークは、J-分解スペクトルにおけるクロスピークのパターンと同じであり、プロトン-プロトンの J-分解クロスピークとプロトン-炭素の J-分解クロスピークの二種類が同時に検出される。一つのプロトンに対する  $F_1$  方向のクロスピークは、 $n$  倍の  $J_{CH}$  と  $(n+1)$  倍の  $J_{HH}$  に分裂して観測される ( $n$  は scaling factor)。この  $nJ_{CH}$  と  $(n+1)J_{HH}$  から、long range  $J_{CH}$  と  $J_{HH}$  の値を算出する。J-resolved-HMBC-2 においては

(c)、プロトン-プロトンのスピン結合は decouple されている。そのためシグナルは  $n$  倍の  $J_{CH}$  のみが観測され解析は非常に簡単になる。Selective J-resolved HMBC 法はプロトン-プロトンのスピン結合を decouple するために、目的のプロトンのみを励起しスピン結合

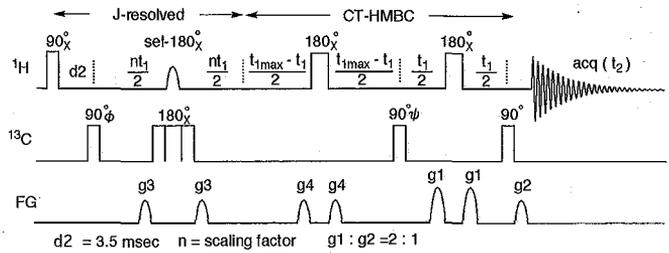


図1. Selective J-resolved HMBCパルス系列

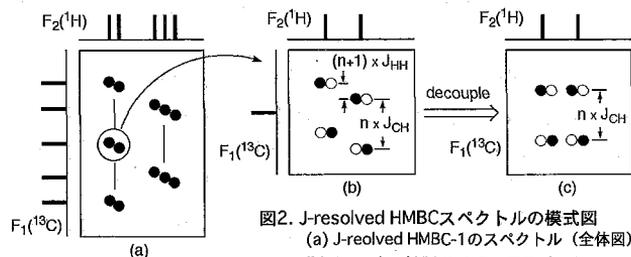


図2. J-resolved HMBCスペクトルの模式図  
(a) J-resolved HMBC-1のスペクトル(全体図)  
(b) J-resolved HMBC-1のクロスピーク  
(c) Sel-J-resolved HMBC, J-resolved HMBC-2

した相手のプロトンは励起しない方法をとる。その結果プロトン-プロトンの相互作用は遮断される。これを 2D 展開した場合その cross peak は decouple されたスペクトルとなり、J-resolved HMBC-2 と同様、 $n$  倍の  $J_{CH}$  で分裂した cross peak のみを与える(c)。しかし、実際のスペクトルでは観測するプロトンとスピン結合した相手のプロトンの化学シフトが接近して、十分な decoupling がされないことがある。その場合は J-resolved HMBC-1 のような cross peak を与える。

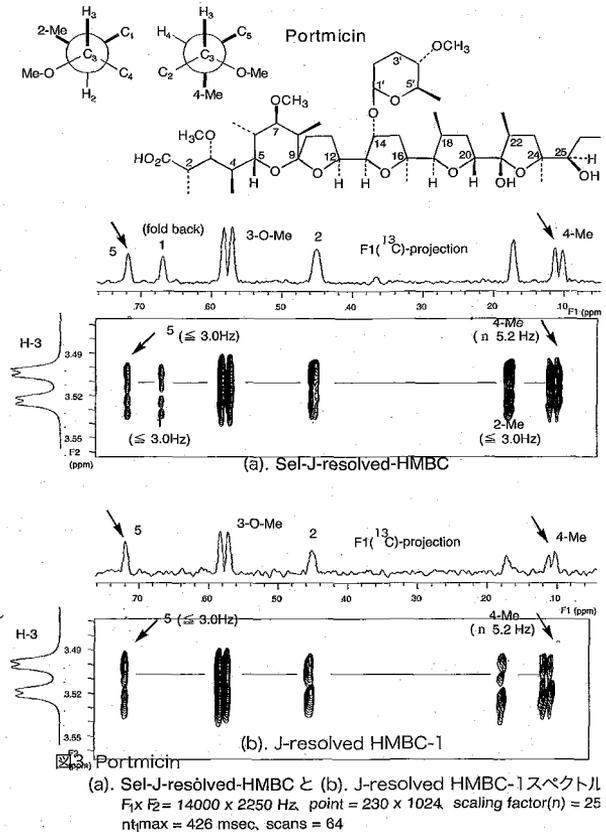
図 3. では、ポートミシンの(a) selective J-resolved HMBC と (b) J-resolved-HMBC-2 のスペクトルも示す。F<sub>1</sub> 軸のプロトン-プロトンのスピン分裂はすべて decouple され、F<sub>2</sub> 軸に平行な縦長の一重線の cross peak を与えている。また、long range  $J_{CH}$  で分裂したシグナルは二重線で分裂している。この二重線の分裂から long range  $J_{CH}$  を読み取ることが可能である。また、一重線の cross peak からは、long range  $J_{CH}$  の値は読み取ることが出来ないが、long range  $J_{CH}$  の値は 2~3 Hz 以下であることが示され、anti か guche かの判別には十分である。この二つのスペクトルの比較において、projection スペクトルに示されるように、selective J-resolved HMBC スペクトルは J-resolved HMBC-2 のスペクトルに比べ、スペクトルの S/N が高まっていることがわかる。

モナゾマイシンの Selective J-resolved-HMBC スペクトル

図 5 には monazomycin の Selective J-resolved-HMBC と J-resolved HMBC-1 のスペクトルを示す。Selective pulse は re-burp を使用した。パルス幅は 6.1msec を使用し、4.35 ppm から 5.95 ppm と広い範囲 (band-selective) を励起した。ポリケタイドのような化合物では、酸素が結合したオキシメチンの領域と酸素の結合しないヒドロカーボンの領域に分かれる傾向のスペクトルを得る。このような化合物において、オキシメチンのプロトンをターゲットにした場合、オキシメチン領域のみを広い範囲 (band-selective) で励起し、パルス幅を短くなるように設定することが重要である。

H47 において、J-resolved HMBC-1 のスペクトルでは、それぞれの cross peak はプロトン-プロトンの分裂により、斜め二本にねじれて観測される。C49 の cross peak は S/N が悪く分裂パターンが不明確である。projection スペクトルではそれぞれ二重線として観測されているが、C49 は四重線として観測されている。

これに対して、selective J-resolved HMBC ではプロトン-プロトンのスピン結合は decouple され、すべて F<sub>2</sub> 軸に平行の一重線として観測されている。そして、long range



(a) Sel-J-resolved-HMBC と (b) J-resolved HMBC-1 スペクトル  
Fix F<sub>2</sub> = 14000 x 2250 Hz, point = 230 x 1024, scaling factor(n) = 25  
nt<sub>max</sub> = 426 msec, scans = 64

$J_{CH}$  を観測したシグナルは二重線として観測され、その分裂から容易に long range  $J_{CH}$  の値を読み取ることが可能である。このように、Selective J-resolved HMBC スペクトルでは、J-resolved HMBC-1 スペクトルと比較し、スペクトルの S/N の低下もなく、cross peak は単純化され、long range  $J_{CH}$  の解析が非常に容易になっている。H47 と H48 は 3 Hz でスピン結合し、gauche の関係にあるが、48-Me と C49 は、H47 に対してどちらが anti で、どちらが gauche であるかを判別することは出来ない。しかし、スペクトルから、H47 と C49 の間で  $25 \times J = 110\text{Hz}$  の分裂が観測され、H47 と 48-Me との間では分裂は観測されず、H47 と C49 は anti、H47 と 48-Me は gauche の関係にあることが容易に判明した。また、46-Me、C45 の間のスピン結合定数は分裂は観測されず 3Hz 以下であることから、H47 位のプロトンに対して gauche の相対配置をとっていることが判明した。

### まとめ

天然有機化合物の立体化学の研究において、long range  $J_{CH}$  の解析は不可欠になっており、long range  $J_{CH}$  を如何に観測するかは NMR の測定として重要なポイントである。Selective J-resolved HMBC 法は long range  $J_{CH}$  を観測する一つの方法であり、J-resolved HMBC-1 法で解析困難であった cross peak の解析は非常に容易になり、しかも、J-resolved HMBC-2 法に比べ、スペクトルの S/N を高めることが判明した。この方法は selective pulse を使用した部分励起法であるため、目的とするプロトン領域とスピン系を考慮し測定領域を設定することが大事である。また、J-resolved HMBC-1 法と同様、観測するスピン結合定数の大きさに応じて、 $nt_1\text{max}$  を 250msec(4Hz) から 500msec(2Hz) ぐらい、あるいは、それ以上まで時間展開しなければならない。そのため、通常の HMBC 法に比べて、かなりスペクトルの S/N が低下する。実際の測定に当たっては、この S/N の低下を考慮して積算時間を設定することが重要である。

- 1). K. Furihata and H. Seto: Tetrahedron Lett., 40, 6271 (1999)
- 2). K. Furihata and H. Seto: Tetrahedron Lett., 39, 7337 (1998)
- 3). R. V. Hosur, M. Ravikumar and A. Sheth, J. Magn. Reson. 65,375(1985).
- 4). V. V. Krishnamurthy, J. Magn. Reson. B 113,46(1996).
- 5). V. V. Krishnamurthy, J. Magn. Reson. A 121,33(1996).
- 6). H. Green, R. Freeman, J. Magn. Reson. A 121,33(1996).

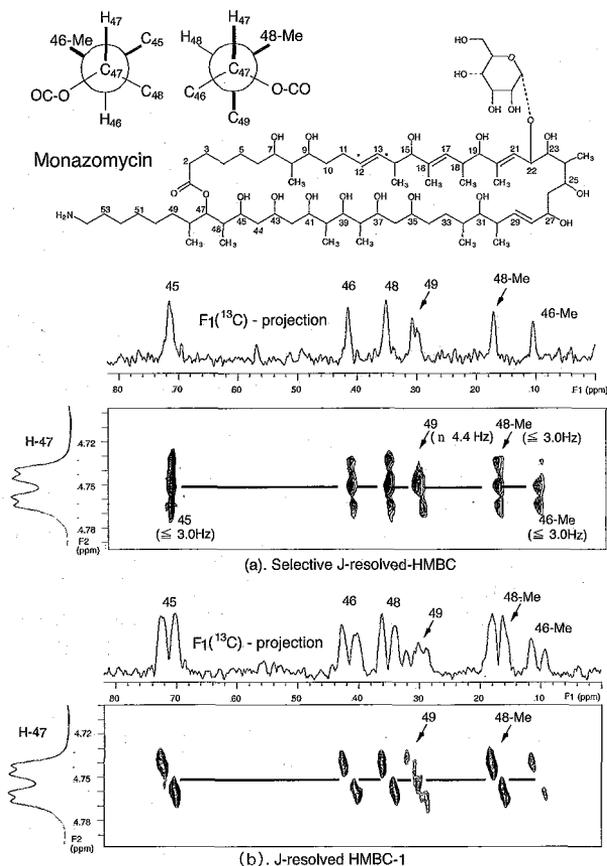


図4. Monazomycin

(a). Selective J-resolved-HMBC と (b). J-resolved HMBC-1 スペクトル  
 $F_1 \times F_2 = 23000 \times 2900$  Hz, point = 512 x 4000, scaling factor(n) = 25,  
 $nt_1\text{max} = 555$  msec, scans = 64, re-burp-180 pulse = 6.1 msec

**$^{13}\text{C}$  DNP of fullerenes**

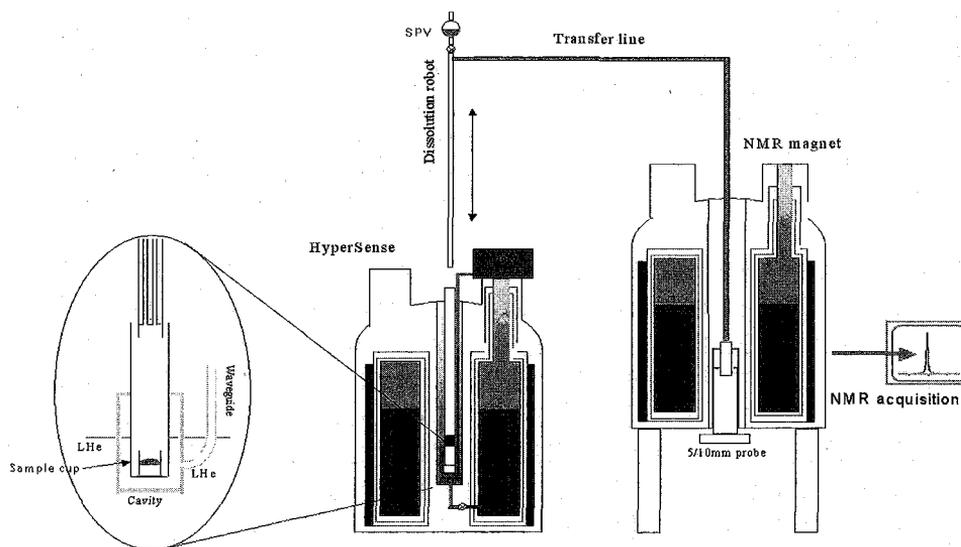
Steven Reynolds, Alan Kook, Devendra Babu Nama and Andrew Illsley

Oxford Instruments Molecular Biotoools Ltd., Tubney Woods, Abingdon, Oxon, OX13 5QX, UK

Dynamic Nuclear Polarisation (DNP) is a hyperpolarisation technique that offers an increase of over 10,000 times<sup>1</sup> in the signal-to-noise ratio (SNR) for many spin=1/2 NMR nuclei ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) in solution-state NMR spectroscopy.

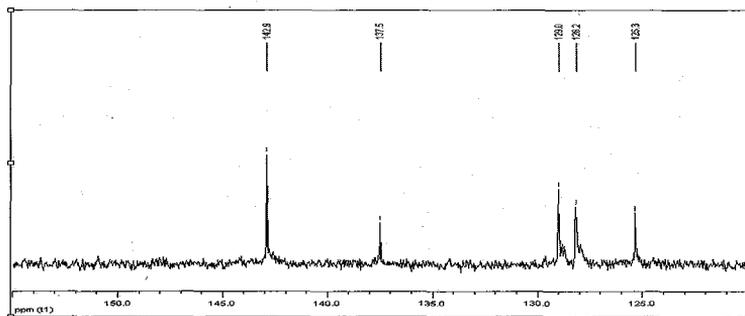
The sample of interest is doped with a trityl radical and dissolved in a mixture of solvent that will form a glass when frozen. It is then exposed to a very low temperature ( $\sim 1.4$  K) in the presence of a strong magnetic field (3.35 T). Under these conditions, the unpaired electrons on the trityl radical attain a high degree of Boltzmann polarisation (>90%). By applying microwave irradiation at the appropriate frequency (ca. 94 GHz) polarisation is transferred to atomic nuclei. Once a sufficient level of hyperpolarisation has been reached, the sample is rapidly, <1s, thawed using a dissolution solvent (e.g. water, methanol, toluene) and rapidly ( $\sim 1$  s) introduced into a high-resolution NMR spectrometer<sup>2</sup> where the hyperpolarised spectrum is acquired, figure 1.

Figure 1: Schematic layout of HyperSense along side a conventional NMR magnet.



The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of fullerenes has been shown previously in characterising C60 and C70.<sup>3</sup> The relative insolubility of these molecules makes the acquisition of NMR spectrum challenging and time consuming. By utilising the sensitivity enhancement of DNP a  $^{13}\text{C}$  spectrum of sub milligram quantities of fullerene can be obtained in a few hours, figure 2. We also show a  $^{13}\text{C}$  spectrum of functionalised fullerenes that have been of recent interest in drug discover.

Figure 2:  $^{13}\text{C}$  spectrum containing 2.3mg C60( $\delta$  142.9) dissolved in toluene



#### References:

1. Ardenkjaer-Larsen, J. H.; Fridlung, B.; Gram, A; Hansson, G.; Hansson, L.; Lerche, M.H.; Servin, R.; Thaning, M.; Golman, K. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 10158.
2. Wolber, J.; Ellner, F.; Fridlund, B.; Gram, A.; Johannesson, H.; Hansson, G.; Hansson, L.H.; Lerche, M.H.; Mansson, S.; Servin, R.; Thaning, M.; Golman, K.; Ardenkjaer-Larsen, J. H. *Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. A* **2004**, *526*, 173.
3. Taylor R., Hare J. P, Abdul-Sada A. K., Kroto H. W. *J. Chem. Soc, Chem Commun*, 1990, 1423-1425.

## 米飯老化の検出とその抑制

(<sup>1</sup>味の素(株)ライフサイエンス研、<sup>2</sup>横浜市大院・国際総合科学、<sup>3</sup>京大院・工)

○山口秀幸<sup>1</sup>、杉原文徳<sup>2</sup>、榛葉信久<sup>1</sup>、品川麻衣<sup>1</sup>、岡本武<sup>1</sup>、  
若林秀彦<sup>1</sup>、白川昌宏<sup>3</sup>、鈴木榮一郎<sup>1</sup>

Rice retrogradation slowing down by  $\alpha$ -glucosidase

(<sup>1</sup>Institute of Life Sciences, Ajinomoto Co.,

<sup>2</sup>International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University,

<sup>3</sup>Department of Molecular Engineering, Kyoto University)

○Hideyuki Yamaguchi<sup>1</sup>, Buntoku Sugihara<sup>2</sup>, Nobuhisa Shimba<sup>1</sup>,  
Mai Shinagawa<sup>1</sup>, Takeshi Okamoto<sup>1</sup>, Hidehiko Wakabayashi<sup>1</sup>,  
Masahiro Shirakawa<sup>3</sup>, Ei-ichiro Suzuki<sup>1</sup>

Starch is the major component of rice grains. The amylose and amylopectine contents of the starch are considered to be one of the important factors affecting the cooking quality of rice. In amylose, the residues are connected by  $\alpha$ -1,4 linkages to give a linear polymer. In the large branched amylopectine molecule, side chains are grafted to the linear  $\alpha$ -1,4 polymer by  $\alpha$ -1,6 linkage.  $\alpha$ -glucosidase is an enzyme, which catalyzes the hydrolysis of  $\alpha$ -1,4 linkages and transglucosylation to form  $\alpha$ -1,6 linkages. We have found that the texture of steamed rice that includes starch is kept longer after treating with  $\alpha$ -glucosidase. In the present work, rice retrogradation with and without  $\alpha$ -glucosidase was evaluated, using MRI T2 measurements and texture assessment.

## 【序論】

コンビニ等で様々な米飯食品が販売されているが、炊き立ての食感を長く維持することは難しい。その主な原因として、澱粉の老化が挙げられる。澱粉の老化とは、炊飯により澱粉結晶が解け、柔らかく粘りのある糊化状態となったものが、澱粉の再結晶化により硬く粘りの無い状態になることである。澱粉はアミロースとアミロペクチンから構成されており、前者は  $\alpha$ -1,4 結合によってグルコースが直鎖状に連なった螺旋構造をとり、相互の規則的な水素結合の形成により再結晶化し易い。後者は  $\alpha$ -1,6

キーワード: グルコシダーゼ、澱粉、NMR マイクロイメージング、緩和時間

やまぐちひでゆき、すぎはらぶんとく、しんばのぶひさ、しながわまい、  
おかもとたけし、わかばやしひでひこ、しらかわまさひろ、すずきえいいちろう

結合を含む不規則な分岐鎖を持つ分子構造を有するので、水素結合を形成し難い。このような背景のもと、我々は、 $\alpha$ -1,6 転移活性を有する  $\alpha$ -グルコシダーゼに注目し、酵素反応を利用した澱粉の老化抑制を試みている。

【結果・考察】

物性評価や T2 イメージング測定によって、 $\alpha$ -グルコシダーゼ処理した米飯と無処理の米飯を比較した。まず、炊飯米を 24 時間保存し、硬さと粘りの変化をプロットしたところ、時間の経過に伴う物性の変化が抑制されていることがわかった (Fig.1)。さらに、時間経過に伴う炊飯米の糊化状態を比較したところ、 $\alpha$ -グルコシダーゼを添加した米飯では、糊化状態が長く維持されていることが判明した (Fig.2)。さらに、T2 イメージング測定を実施し、T2 マップ画像を作成した。 $\alpha$ グルコシダーゼ処理米では T2 値の経時的な低下が遅く、水分子の運動性が高く維持されることが明らかである (Fig.3)。以上の結果より、 $\alpha$ グルコシダーゼは米飯の老化を抑制する効果があることが示唆された。

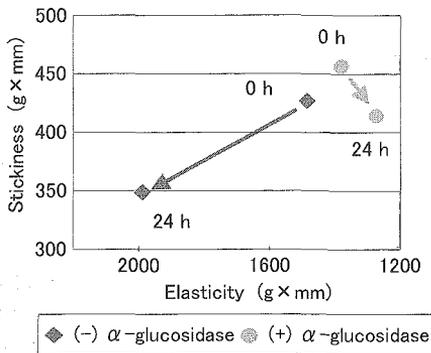


Fig. 1 Texture assessment of steamed rice (4°C)

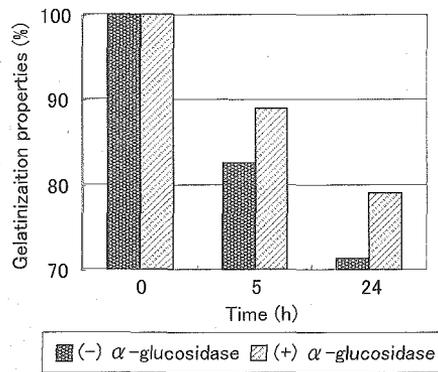


Fig. 2 Time dependency for the gelatinization properties

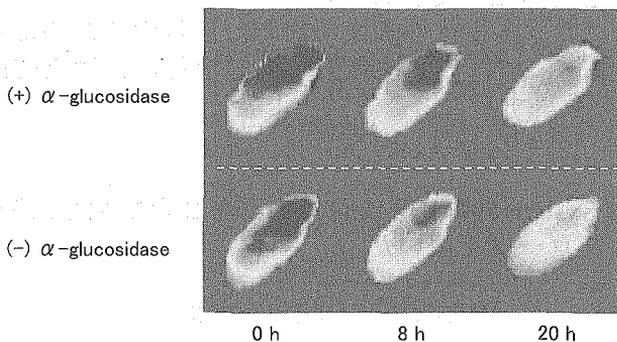


Fig. 3 Rice retrogradation detected by MRI T2 measurements

○ 芦田淳<sup>1</sup>、Boban K. John<sup>2</sup>、David M. Rice<sup>2</sup>  
(バリアンテクノロジーズジャパン<sup>1</sup>、Varian Inc.<sup>2</sup>)

Parallel Heteronuclear Data Acquisition for Solid-State NMR with Multiple Receivers.

Jun Ashida<sup>1</sup>, Boban K. John<sup>2</sup>, David M. Rice<sup>2</sup>  
(Varian Technologies Japan Ltd.<sup>1</sup>, Varian Inc.<sup>2</sup>)

The capability to place a receiver on more than one channel of an NMR Spectrometer creates new opportunities for simultaneous, parallel acquisition of FID data from multiple nuclear species. Recently, multiple receivers have been used by Kupce *et al* to obtain simultaneous, heteronuclear 2D solution-state data[1,2]. In this presentation we present examples of the practical use of multiple receivers for a variety of HXY solid-state NMR experiments, including HCN experiments, as well as those with quadrupole nuclei. One example is an extension of <sup>1</sup>H-X HETCOR where the two F2 nuclei are <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N. HETCOR with parallel acquisition takes less time and signal to noise is unaffected. The F1 FSLG preparation is identical for the two nuclei, eliminating uncertainty associated with the FSLG scale factor.

#### 【緒言】

現在あまたある分析手法の中でも、高分解能 NMR は特に有用な手法として広く使われている。これは、高分解能 NMR では全体構造だけでなく局所構造の詳細な情報も得られることに起因しているからであると思われる。例えば、昔は分解能が悪いと言われていた固体 NMR でも、数十残基の蛋白質の多次元 NMR スペクトルが非常に分解能良く得られ、個々の残基の情報が取得できるようになってきている。

しかし、NMR の最大の欠点は感度が他の分析手法と比較して桁外れに小さい点である[3]。この問題を克服するために、ここ数年パルス系列やデータ取込を工夫して測定時間を短縮する様々な手法が、溶液 NMR のみならず固体 NMR でも開発されている[4-6]。

本発表では、マルチレシーバを用いて固体 NMR において多核種の同時測定で 1 次元、2 次元 NMR を行ったので報告する。マルチレシーバそのものは、すでに NMR イメージングでは多検体の画像を同時に取得するために用いられているが、本研究では一検体における多核種同時測定を行い、測定時間を短縮して一度に多面的な情報を取得することを目的とした。

#### 【実験】

実験は Varian NMR System 500MHz にレシーバを 2 台搭載した分光計、および 3.2mm T3 HXY MAS プローブを用いた。

---

多核種測定、マルチレシーバ、HETCOR、MQHETCOR

あしだ じゅん、Boban K. John、David M. Rice

### 【結果と考察】

一般的な $^1\text{H-X}$  FSLG HETCORパルス系列をマルチレシーバ用に改良した $^1\text{H-X-Y}$  HETCORパルス系列 (図1)、およびそれを用いた、 $[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ N-アセチルバリンの $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ および $^1\text{H-}^{15}\text{N}$  HETCORスペクトル (図2) を示す。

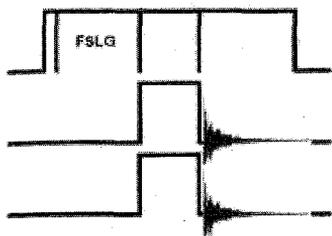


Fig.1 Pulse sequence of parallel acquisition  $^1\text{H-X-Y}$  HETCOR.

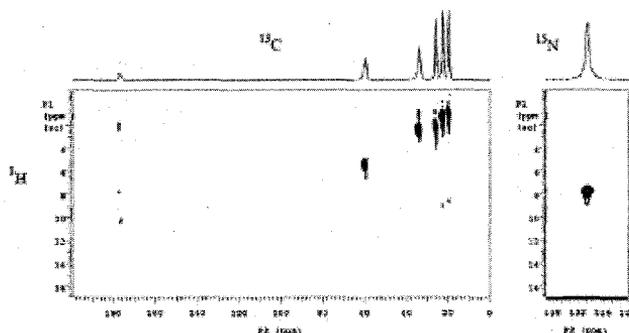


Fig.2  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$  HETCOR spectra of  $[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$  N-acetylvaline obtained simultaneously by using the parallel acquisition HETCOR pulse sequence. Contact time was 100us.

このようにHETCORのような2次元相関NMRでは、複数の核種 (ここでは $^{13}\text{C}$ と $^{15}\text{N}$ ) を同時に観測することで、通常得られる $^1\text{H-X}$ ,  $^1\text{H-Y}$ 間の相関情報以外に、新たなX-Y間の相関情報も同時に取得することができる。実験時間の短縮という面では、デュアルレシーバでは最大で1/2しか短縮できないが、4チャンネルのシステムおよび4チャンネル対応のHFXYPローブを用いて、 $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ , 中周波数、低周波数の4核種の同時測定を行えば、最大で実験時間を1/4に短縮することが可能である。

発表当日は、四極子核を用いたMQMAS/MQHETCORの同時測定についても報告する。

### 【参考文献】

1. E. Kupce, R. Freeman, B. K. John, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 9606 (2006)
2. E. Kupce, S. Cheatham, R. Freeman, *Magn. Reson. Chem.*, 45, 378 (2007)
3. A. G. Webb, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 31, 1 (1997)
4. J. Ashida, T. Nakai, T. Terao, *Chem. Phys. Lett.*, 168, 523 (1990)
5. J. Ashida, J.-P. Amoureux, E. Kupce, *J. Magn. Reson.*, 178, 129 (2006)
6. R. Bhattacharyya, L. Frydman, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 16014 (2006)

$^{14}\text{N}$  オーバートーン照射による選択的近接  $^{13}\text{C}$  線幅増大を利用したペプチド二次構造解析

( $^1$ 京大院理, $^2$ 群馬大工)  $\circ^1$ 深澤隼,  $^1$ 竹腰清乃理,  $^2$ 莊司顯

Peptide secondary structure analysis using selective  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum line broadening due to overtone NMR irradiation to neighboring  $^{14}\text{N}$

$^1$ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University,

$^2$ Department of Biological Sciences, University of Gunma

$\circ^1$ Jun Fukazawa,  $^1$ K. Takegoshi,  $^2$ Akira Shoji

$^{14}\text{N}$  high-resolution solid-state NMR is not very feasible because of its large linewidth due to the first-order quadrupolar coupling. In order to conquer this problem, we proposed  $^{14}\text{N}$  indirect spectroscopy using  $^{13}\text{C}$ - $^{14}\text{N}$  recoupling under MAS[1]. In this research, the indirect  $^{14}\text{N}$  overtone spectra of several peptide samples with different secondary structures ( $\alpha$ -helix/ $\beta$ -sheet) were measured and compared with simulated ones. It is shown that amide nitrogens in  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet have different quadrupolar coupling constants (-4.305MHz for  $\alpha$ -helix and -4.023MHz for  $\beta$ -sheet.)

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  $^{14}\text{N}$  はその天然存在比が 99.63% と高いにもかかわらず、その四極子相互作用が数 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  $^{14}\text{N}$  の  $|+1\rangle$  と  $|-1\rangle$  の状態間の遷移、すなわち overtone 遷移を観測する手法が開発された[2]。  $^{14}\text{N}$  の overtone 遷移の共鳴周波数は四重極相互作用の 1 次のシフトの影響を受けず、それより一般に小さい 2 次の影響を受ける。そのため、四極子相互作用の 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。

Stewart らは、単結晶のペプチドの  $^{14}\text{N}$  overtone NMR スペクトルを測定することによって主鎖の二

$^{14}\text{N}$ , オーバートーン, 四極子, 二次構造, ab initio

ふかざわじゅん たけごしきよのり しょうじあきら

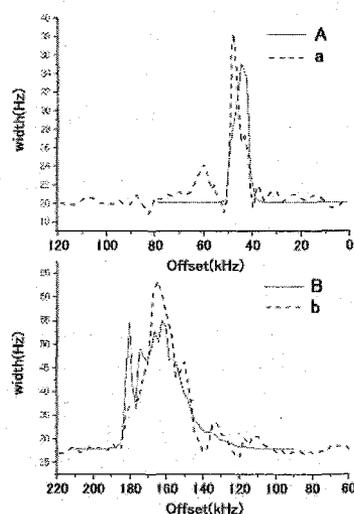


Figure 1.  $^{14}\text{N}$  indirect overtone spectra plotting the width of  $^{13}\text{C}$  spectra; experimental (dotted line) and simulation (solid line)

a, A: alanine ( $e\text{Qq}=1.148\text{MHz}$ ,  $\eta=0.276$ )

b, B:  $N$ -acetyl-D,L-valine ( $e\text{Qq}=3.21\text{MHz}$ ,  $\eta=0.31$ )

	$eQq/\text{MHz}$	$\eta$
$\alpha$ -helix	-4.305	0.2931
$\beta$ -sheet	-4.023	0.4399

Table 1. Polyalanine's secondary structure and quadrupolar constants calculated by Gaussian03.

面角に対する知見を得ることを提案している[3]。本発表では我々が開発した、粉末試料に  $^{14}\text{N}$  overtone 照射をすることによって  $^{13}\text{C}$ - $^{14}\text{N}$  相互作用を復活させ、 $^{13}\text{C}$  の線幅の増大量との関係を調べることにより間接的に  $^{14}\text{N}$  overtone スペクトルを得て、構造の知見を得ることを試みた。

$^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  の共鳴周波数はそれぞれ 299.5202MHz および 75.323MHz, MAS 回転速度は 5.5kHz, オーバートーン照射強度は 75G で測定を行うと、 $^{14}\text{N}$  間接 NMR スペクトルの線形に、 $\alpha$ -helix と  $\beta$ -sheet の間で有意の差異がみられた[4]。

この差異を裏付けるため、Wi らの式[5]を修正した正しい式を用いて  $^{14}\text{N}$  オーバートーン照射下での  $^{13}\text{C}$  の線幅のシミュレーションプログラムを作成し四極子結合定数および不均一パラメータが既知のサンプル(alanine, N-acetyl-D,L-valine)で線形をシミュレーションし、これが実測スペクトルによく一致することを確認した(Figure 1)。このプログラムを  $\alpha$ -helix および  $\beta$ -sheet を含むペプチドに対して適用するのだが、これらのペプチドの  $^{14}\text{N}$  の四極子結合定数および不均一パラメータは実測情報がない。そのため Gaussian03[6]によりそれぞれのモデル構造( $\alpha$ -helix:(Ala)<sub>9</sub>,  $\beta$ -sheet:(Ala)<sub>3</sub> の三量体)の構造最適化(B3LYP/6-31G\*)を行い、さらにこの構造を用いた四極子の *ab initio* 計算(B3LYP/6-311G\*\*)によってパラメータを求め(Table 1), その値を用いたシミュレーションの結果と実測を比較した(Figure 2)。得られた結果はよい一致を示しており、 $\alpha$ -helix と  $\beta$ -sheet における  $^{14}\text{N}$  の四極子パラメータを得ることができた。また、このアプローチにより  $^{14}\text{N}$  の四極子相互作用を定量的に研究できることが示された。

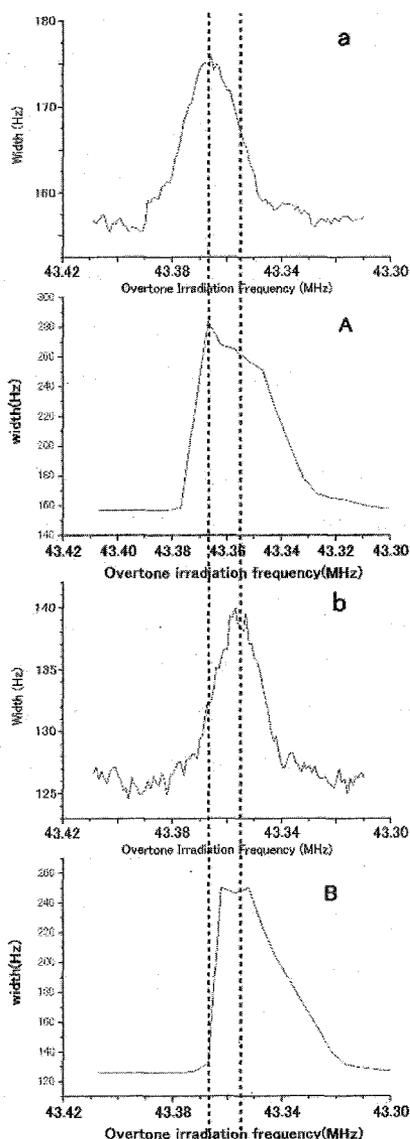


Figure 2.  $^{14}\text{N}$  indirect overtone spectra plotting the width of  $^{13}\text{C}$  spectra; experimental (small letters) and simulation (capital letters.)  
a, A: (Ala<sub>9</sub>, Ala)=50:50( $\alpha$ ) and the simulation  
b, B: (Ala)<sub>3</sub>-Ala\*(Ala)<sub>3</sub>( $\beta$ ) and the simulation

#### References

- [1] K. Takegoshi, T. Yano, K. Takeda, and T. Terno, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10786(2001).
- [2] R. Tycko and S. J. Opella, *J. Chem. Phys.* 86, 1761(1987).
- [3] P. L. Stewart, R. Tycko, and S. J. Opella, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 84(11), 3803(1988).
- [4] U. N. Fukazawa, K. Takegoshi, A. Shoji, *Abstracts of The 45th Annual Meeting of the NMR Society of Japan*(2006)
- [5] S. Wi, L. Frydman, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10354(2001).
- [6] Gaussian 03, Revision C.02, M. J. Frisch, et al. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

固体  $^1\text{H}$  MQNMR を用いた原子核の空間分布の研究

京都大学理学研究科

○石川 洋土、 福地 将志、 最上 祐貴、 竹腰 清乃理

**Spatial Distribution of  $^1\text{H}$  nuclei studied by Solid-State  $^1\text{H}$  MQNMR**

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

Hiroto Ishikawa, Masashi Fukuchi, Yuuki Mogami, Kiyonori Takegoshi

In this work, we applied solid-state  $^1\text{H}$  MQNMR to examine spacial distribution of  $^1\text{H}$  nuclei. In a simple view, the longer the MQ excitation (pumping) time is, the observable MQ number  $n$  becomes larger. Further, the observed intensity  $I(n)$  for a  $n$ -th MQ coherence should reflect spacial distribution of spins. We chose  $n$ -alkane/ $d$ -urea inclusion compounds as a 1D sample, whose  $^1\text{H}$  nuclei align approximately in 1D, and compared with the MQ spectrum  $I(n)$  obtained for adamantane, which we regards as a 3D sample. The difference of each spectra was explained with an aid of the percolation theory.

本研究の目的は、スピンをもつ原子核の空間分布を NMR で決めるということである。取り上げる原子核はスピン  $1/2$  をもつ  $^1\text{H}$  で、MQNMR によって原子核が 1 次元的に並んでいるか、あるいは 3 次元的に広がっているかを区別できないかを検討した。

用いた MQNMR のパルスシーケンスを Fig.1 に示した。多量子コヒーレンス (MQ) を生成させる excitation パルスの間の平均ハミルトニアンは

$$H = -\frac{1}{2} \sum_{j < k} D_{jk} (I_{j+} I_{k+} + I_{j-} I_{k-}) \quad \left( \text{ただし } D_{jk} = -\frac{\gamma_I^2 \hbar^2}{r_{jk}^3} \frac{3 \cos^2 \theta_{jk} - 1}{2} \right)$$

で表わされ、偶数の MQ が励起される。励起された MQ は、位相  $\phi$  を変化させ  $\phi$  で FT することで量子数ごとに分離され、 $I(n)$  ( $n$  量子コヒーレンスがどれだけ生成したか) を得ることができる。excitation パルスの照射時間  $\tau$  (以降、MQ pumping time) の増加に伴い、大きな多量子コヒーレンスが観測されるようになる。

Keywords: MQNMR 空間分布の次元性

いしかわ ひろと、 ふくち まさし、 もがみ ゆうき、 たけごし きよりのり

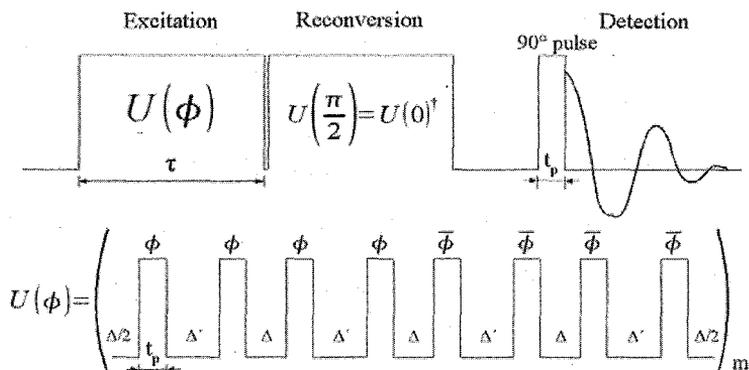


Fig.1: The pulse sequence for MQNMR[1]. We used  $t_p = 2.5 \mu\text{s}$ ,  $\Delta = 2.5 \mu\text{s}$ , and  $\Delta' = 2\Delta + t_p = 7.5 \mu\text{s}$ , so  $\tau = (8t_p + 4\Delta + 4\Delta') \times m = 60\text{m} \mu\text{s}$ . We measured a amplitude of magnetization with the phase of pulse,  $\phi$ , varied from 0 to  $2\pi$ .

1次元系の試料としては、重水素化した尿素と直鎖アルカンの包接化合物[2]を用いた。この化合物では、尿素が蜂の巣状の入れ物を作り、その中にアルカンがまっすぐに入り込む。このアルカンの $^1\text{H}$ は、ほぼ一直線に並ぶことになるため、近似的に1次元系として考えられる。3次元系としては、アダマンタン( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ )を用いた。excitationで生じる多量子コヒーレンスの成長について考えると、1次元系では一方向にしかつながっていないため、 $\tau$ を長くしていったときには、3次元系と比べると、大きなMQをもつものの数の増え方が遅いのではないかと考えられる。すなわち、 $I(m)/I(n)$ の $\tau$ に対する振る舞いが、 $^1\text{H}$ の分布の次元性により異なると予想される。

Fig.3(a), (b)に、 $n\text{-C}_{20}\text{H}_{42}/d\text{-urea}$ とアダマンタンの $^1\text{H}$ の静止粉末スペクトルを示した。両者の線幅に大きな差はなく、双極子相互作用の強さに大差はないことが示されている。しかしながら、Fig.3(c), (d)に示したMQスペクトル( $I(n)$ )は大きく異なっている。 $\tau$ の増加に従ってどんどん大きな多量子コヒーレンスが観測されているアダマンタンでは、 $I(4)/I(2)$ ,  $I(6)/I(2)$ が急激に大きくなっている。一方、 $n\text{-C}_{20}\text{H}_{42}/d\text{-urea}$ ではせいぜい8量子コヒーレンスまでしか観測されず、 $I(4)/I(2)$ ,  $I(6)/I(2)$ が緩やかに増加するにとどまっている。この結果は、先の予想に一致している。この違いについてパーコレーション理論を用いた解析を試みた。

それぞれの系を、1つの炭素について2つの水素( $\text{C-H}_2$ )が1次元的、3次元的に空間分

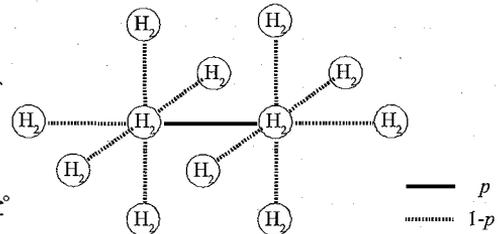
布しているものとする。アダマンタンには C-H も存在するが、ここでは近似的にすべて C-H<sub>2</sub> として扱う。用いた  $\tau$  のタイムスケールでは、C-H<sub>2</sub> 内の <sup>1</sup>H は  $n=2$  の MQ が生じているとみなし、ここでは異なる (C-)H<sub>2</sub> 同士の相互作用を通じて生じる多スピン系の MQ が観測に表れるとして議論する。 $\tau$  時間 excitation パルスを照射したときに、最近接の (C-)H<sub>2</sub> 同士がつながって 4 スピン系となる確率を  $p$  とする。この確率  $p$  は、 $\tau$  が長いほど大きくなるはずである。パーコレーション理論のボンド過程を考えると、(C-)H<sub>2</sub> が無限に 1 次元格子に並んでいるとき、excitation パルスによりつながって生じる  $n$  スピン系の数  $N_{1D}(n)$  は

$$N_{1D}(n) = p^{n/2-1} (1-p)^2 \quad (1)$$

と表される[3]。ただし、これは規格化されており、2 スピン系を単位としているため  $n$  は偶数である。3 次元の場合は、つながりの形状 (lattice animals) の数も考慮に入れなければならないので、

$$N_{3D}(n) = \sum_t g_n p^{n/2-1} (1-p)^t \quad (2)$$

となる。ここで  $g_n$  は、つながっていない周縁のボンドの数が  $t$  である  $n$  スピン系の形状の数である。4 スピン系 ( $n=4$ ) の場合は右のようになり、つながるボンドは  $1 (= 4/2 - 1)$  個で周縁のボンドは  $t=10$  (個) である。この形状の空間的な配置の数  $g_{4,10}$  は、3 次元のため  $g_{4,10} = 3$  となる。4 スピン系の場合はこの形状以外存在しないが、 $n$  が大きくなると  $g_n$  は著しく大きくなる。



(1), (2) 式をもとに 8 スピン系までを考え、観測される 2Q と 4Q の強度の比をシミュレートしたものが Fig.4 である。ただし、たとえば 2Q は 2 スピン系からだけでなく 4, 6, 8 スピン系からも生じるので、それぞれの準位の数に応じてファクターを乗じて足し合わせている。先の予想通り、1 次元の方が 3 次元より  $I(4)/I(2)$  の増加が緩やかになっており、パーコレーション理論によりスペクトルを定性的に説明できている。さらに次元性の定量的な解析に、上記のようなパーコレーション理論を用いることができるのかどうか現在検討中である。

<参考文献>

[1] D. N. Shykind, J. Baum, S.-B. Liu, A. Pines, *J. Magn. Reson.* **76** (1988) 149-154  
 [2] F. Bengen, W. Schlenk jr., *Experientia* **5** (1949) 200  
 [3] D. スタウファー, A. アハロニー 著, 小田垣 孝 訳. パーコレーションの基本原理, 京都, 吉岡書店, 2001, 309p

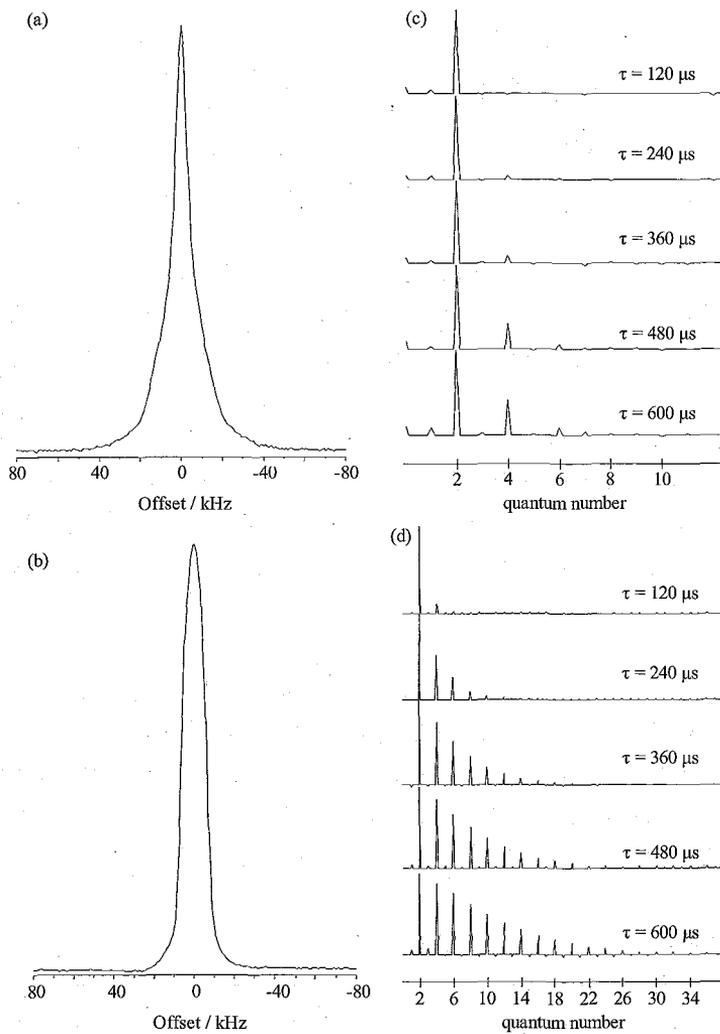


Fig.3: (a) and (b) are  $^1\text{H}$  NMR spectra of  $n\text{-C}_{20}\text{H}_{42}/d\text{-urea}$  and adamantane, respectively. (c) and (d) are  $^1\text{H}$  MQNMR spectra of  $1n\text{-C}_{20}\text{H}_{42}/d\text{-urea}$  and adamantane, respectively, for various MQ pumping times designated in the figure.

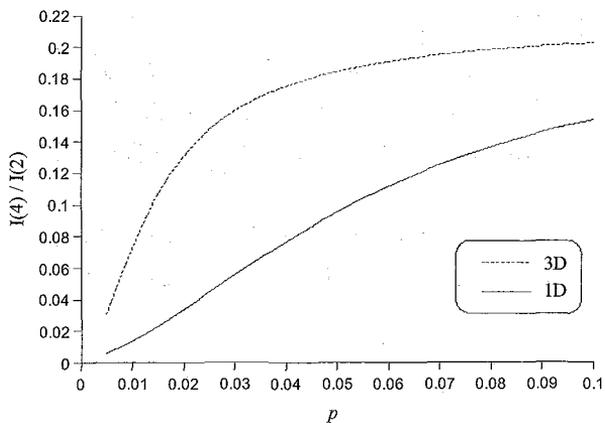


Fig.4: Calculated  $I(4)/I(2)$  ratio using the equations (1) and (2) for 1D (the solid line) and 3D (the dotted line) alignment of  $^1\text{H}$ .

## 固体 NMR による溶媒和の研究

京都大学理学研究科

○ 最上祐貴、石川洋土、福地将志、竹腰清乃理

### The study of solvent effect by using solid NMR

Department of chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

Yuuki Mogami, Hiroto Ishikawa, Masashi Fukuchi, Kiyonori Takegoshi

The size of molecular cluster formed by  $\gamma$ -picoline in two different solvents (one is non-polar  $C_6D_6$  the other is polar  $D_2O$ ) is studied using the multiple-quantum (MQ) NMR method. We show spectroscopically for the first time the formation of molecular cluster of  $\gamma$ -picoline in  $C_6D_6$ . While in  $D_2O$ , the  $\gamma$ -picoline dispensed uniformly.

本研究では池田らによって製作された試料を液体He温度以下まで冷却できるNMRプローブ[1]と多量子固体 NMR(Multiple-quantum: MQ) 法[2]を用い凝集相において分子クラスターの生成を分光学的に示すことを目的とした。測定対象には $\gamma$ ピコリンを選んだ。極性溶質である $\gamma$ ピコリンを極性溶媒である重水および非極性溶媒である重ベンゼン内に溶かして測定した。これらを比較することにより、極性による溶媒和効果の違いをNMR 分光学的に測定した。

#### OMQ 法を用いた測定

核スピン間の双極子相互作用によって生成するスピン間の多量子コヒーレンスを測定することで核スピンによって形成されるクラスターの大きさを研究することが出来る。そのために用いられるパルスシーケンスを Fig1 に示す。これは最初の  $\tau$  の間にパルス法で実現した双極子相互作用の  $H_{yy}-H_{xx}$  項により偶数の多量子コヒーレンスを励起し、 $t_1$  後に時間反転パルスを照射することで観測可能な横磁化にして観測をするというものである[2]

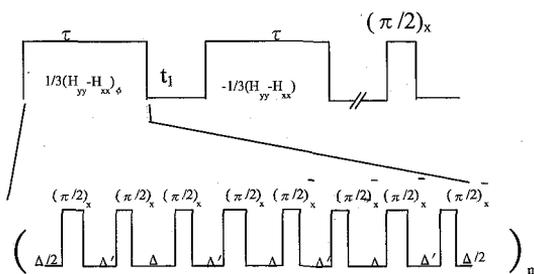


Fig1 The pulse sequence for MQNMR

Keywords: multiple quantum、分子クラスター、極低温

もがみゆうき、いしかわひろと、ふくちまさし、たけごしきよりのり

## OMQを用いた低温での $\gamma$ -ピコリンの測定

このパルスシーケンスと低温用 NMR プローブを用いて $\gamma$ -ピコリン/重水(5%)を、液体 He 温度で固体にして測定をした。その結果を Fig2 に示す。今回用いたパルスシーケンスは偶数の量子数のみがあるため、奇数の量子数に出ているピークはノイズである。この測定では  $m=2$  の時には 6 量子までしかピークは出てきていない。今回用いた $\gamma$ -ピコリンは 7 スピン系であるため、これは分子内のスピンのみが観測された結果であると考えられる。また、 $m=3$  のときは 8 量子まで現れている。しかし、その前後に現れているノイズと強度がそれほど変わらないためにノイズではないかと考えている。

次に濃度を 20% にし、同様の測定を $\gamma$ -ピコリン/重水

および、 $\gamma$ -ピコリン/重ベンゼンについて行った(Fig3)。今回の測定結果からはどちらも 6 量子までしか観測できていない。しかし、重水中での $\gamma$ -ピコリンの 2 量子と 4 量子・6 量子とのピーク強度比がベンゼン中でのピーク強度比にくらべて大きくなっている。これは重水中では $\gamma$ -ピコリンは単分子として存在しているためピークが 6 量子で頭打ちをしている結果であり、重ベンゼン中では MQ 信号が 8 以上の量子数に分布している為だと考えられる。Fig3 のスペクトル内に  $^1\text{H}$  が均一に分布している場合に予測されるガウス分布を実線で示した。重水中での結果はガウス曲線では fit できず、単分散による分布であると考えられる。一方、重ベンゼン中の結果は 8 量子まではガウス分布で近似される。これは、 $\gamma$ -ピコリンがクラスターとして存在していることに矛盾しない。現在パルスシーケンスに工夫をし、プローブの改良を行い重水溶媒中での 8 以上の量子数のピークを観測するための測定を行っている。

<参考文献>

- [1] Y.Mogami, A.Ikeda, T.Momose, and K.Takegoshi, 第 44 回 NMR 討論会 要旨集 254
- [2] D. N. Shykind, J. Baum, S. B. Liu, and A. Pines, J. Magn. Reson., 76, 149 (1988)

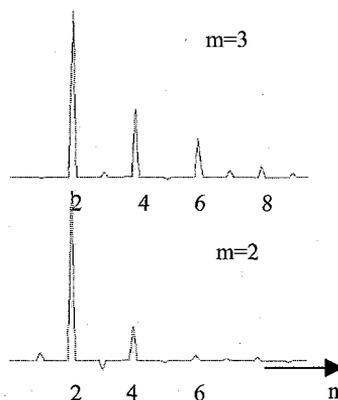


Fig2. MQNMR spectra of  $\gamma$ -picoline in  $\text{D}_2\text{O}$  (5%).

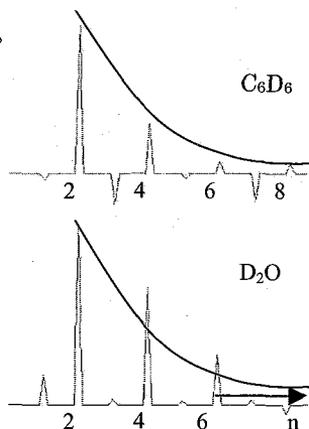


Fig3. MQNMR spectra of  $\gamma$ -picoline in  $\text{D}_2\text{O}$  and  $\text{C}_6\text{D}_6$ . The solid line represents a Gaussian distribution function.

## 固体 NMR によるウシラクトフェリシンの抗菌活性中心と酸性リン脂質二重膜との相互作用解析

○梅山万左子<sup>1</sup>, 吉良敦史<sup>2</sup>, 内藤晶<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>横浜国大・院工, <sup>2</sup>アルバック)

Interaction of Antimicrobial Active Center of Bovine Lactoferricin with Acidic Phospholipid Bilayers by Solid-state NMR Spectroscopy

○Masako Umeyama<sup>1</sup>, Atsushi Kira<sup>2</sup>, Akira Naito<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Yokohama National University,

<sup>2</sup>Research and Development Division, ULVAC. Inc.

Bovine lactoferricin (LfcinB) is an antimicrobial peptide which consists of 25-amino acid residues with the sequence FKCR<sup>4</sup>RWQWR<sup>9</sup>MKKLGAPSITCVRRAF (LfcinB-25). R<sup>4</sup>RWQWR<sup>9</sup> (LfcinB-6) is known to be an antimicrobial active center. In this work, the interaction of LfcinB-25 and LfcinB-6 with acidic phospholipid bilayers as a mimic of cell membrane of *Staphylococcus aureus* was investigated by means of QCM, solid-state <sup>31</sup>P, <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, potassium ion selective electrode (ISE) and optical microscopy. <sup>31</sup>P static NMR spectra indicated that there was specific interaction between LfcinB and acidic phospholipid bilayers and bilayer defects were appeared in the bilayer systems. <sup>1</sup>H MAS NMR spectra indicated that Trp residues were located at the interfacial region of lipid bilayers. To characterize the bilayer defects, we could observe potassium ion permeation across the membrane by potassium ion selective electrode. These results indicate that LfcinB causes pores in the membrane. This pore formation can be related to the antimicrobial activity of LfcinB.

### 【序論】

抗菌ペプチド ウシラクトフェリシン(LfcinB)は、乳汁中に存在する鉄結合性糖タンパク質であるウシラクトフェリン(bLF, 689 アミノ酸残基, 分子量約 80kDa)の N 末端から 17-41 残基にあり, bLF が胃の中でペプシンによって消化されることにより生成される。LfcinB の抗菌活性は元のタンパクの bLF よりも強いと考えられている。LfcinB は 25 アミノ酸残基(分子量 3123.9)からなり, 一次構造は Phe-Lys-Cys-Arg<sup>4</sup>-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg<sup>9</sup>-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe (LfcinB-25)である。bLF の X 線結晶構造解析によると LfcinB の 1-13 残基にあたる部分は α-ヘリックス構造を形成しているが, 溶液 NMR 構造解析では LfcinB は幾分ゆがんだ逆平行 β-シートを含む環状構造を形成している。疎水性残基の多くは片側に集まっているのに対して, 正に帯電した側鎖の大部分は反対側に位置しており, LfcinB に両親媒性の性質を与えている。LfcinB の抗菌活性中心は Arg<sup>4</sup>-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg<sup>9</sup>-NH<sub>2</sub> (LfcinB-6, 分子量 987.1)であることが知られている。

固体 NMR, ウシラクトフェリシン, 酸性混合リン脂質二重膜, ゲル-液晶相転移点, 抗菌作用

うめやまさこ, きらあつし, ないとうあきら

本研究では、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酸性混合リン脂質二重膜をモデル膜として用いた。この酸性混合膜と LfcinB との選択的相互作用解析およびその抗菌作用の解明を QCM 測定, 固体  $^{31}\text{P}$  DD-static,  $^1\text{H}$  MAS NMR 測定, カリウムイオン濃度測定, 光学顕微鏡観察によって行った。さらに LfcinB-25 と抗菌活性中心である LfcinB-6 の相互作用を比較した。

## 【実験】

LfcinB-25 と LfcinB-6 は Fmoc アミノ酸を用いて固相法により化学合成した。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。65% DMPG, 10% CL (カルジオリピン), 25% DMPC の重量百分率の脂質からなる酸性混合リン脂質二重膜を調製した。ペプチド対脂質のモル比は 1:20 とした。

固体 NMR スペクトルは Chemagnetics 社製 CMX Infinity-400 FT-NMR 分光器を用いて、 $90^\circ$  パルスによる励起の後に高出力デカップリング下で信号を観測する dipolar decoupled single pulse excitation (DD) 法により, static 条件または magic angle spinning (MAS) 条件下で測定した。共鳴周波数は  $^1\text{H}=398.1\text{MHz}$ ,  $^{31}\text{P}=161.1\text{MHz}$ ,  $^{13}\text{C}=100.1\text{MHz}$  に設定した。固体  $^{31}\text{P}$  DD-static,  $^1\text{H}$  MAS NMR スペクトルをゲル-液晶相転移点 ( $T_c$ ) 以上および  $T_c$  以下の温度で測定した。

## 【結果と考察】

### 1. LfcinB-6 と酸性混合リン脂質二重膜との相互作用解析

DMPG と DMPC の混合比を変化させた場合の LfcinB-6 の QCM 測定結果より, LfcinB-6 は DMPG の割合が増加するにつれて結合定数も増加した。LfcinB-6 は中性膜よりも酸性膜に対して親和性を持つことが明らかになった。これは混合膜に含まれる酸性脂質と LfcinB-6 の塩基性アミノ酸側鎖との間の静電相互作用によると考えられる。しかし, LfcinB-25 に比較すると増加の割合は少なかった。また QCM 測定により LfcinB-25 および LfcinB-6-酸性混合膜系の結合定数はそれぞれ  $9.64 \times 10^6$  ( $\text{M}^{-1}$ ),  $8.13 \times 10^5$  ( $\text{M}^{-1}$ ) と決定した(表1)。LfcinB-6-酸性混合膜系の結合定数は, LfcinB-25-酸性混合膜系の約 1/12 であった。

つぎに, LfcinB-酸性混合膜系の固体 NMR スペクトルを示す。固体  $^{31}\text{P}$  DD-static NMR 測定ではリン脂質二重膜の極性基を観測することができる。固体  $^1\text{H}$  MAS NMR 測定ではリン脂質二重膜のアシル鎖を観測することができる。両者を組合せることで, リン脂質二重膜の極性基とアシル鎖の動的挙動を別々に観測した。<sup>1,2</sup>

LfcinB-酸性混合膜系の固体  $^{31}\text{P}$  DD-static NMR スペクトル(図1)では, 酸性混合膜のみの NMR スペクトル(a)を測定した後, 同じ膜に LfcinB-6 を添加して 30 分後に NMR 測定を行って得たスペクトル(c)では, LfcinB-25 を添加した場合(b)と同様に 0 ppm の位置に等方成分が液晶温度で観測された。この結果は LfcinB-6 の作用により二重膜に欠陥が生じた

Table 1 The association constants of LfcinB-25- or LfcinB-6-acidic phospholipid bilayer systems (lipid: 65% DMPG, 10% CL, 25% DMPC)

	association constants ( $\text{M}^{-1}$ )
LfcinB-25-acidic phospholipid bilayer systems	$9.46 \times 10^6$
LfcinB-6-acidic phospholipid bilayer systems	$5.89 \times 10^5$

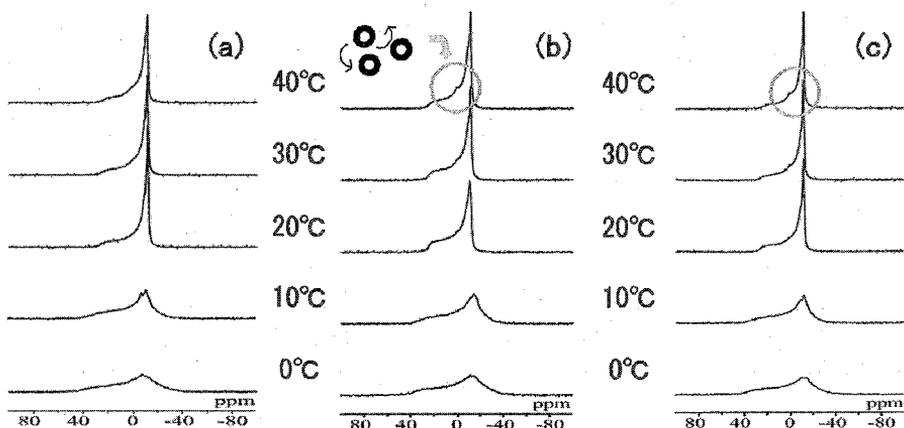


Fig. 1.

Temperature variation of  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of LfcinB-acidic phospholipid bilayer systems for (a): acidic phospholipid bilayers, (b): addition of LfcinB-25 to (a), and (c): addition of LfcinB-6 to (a) (lipid : DMPG 65%, CL 10%, DMPC 25%)

ことを示唆している。表2に  $^{31}\text{P}$  化学シフト異方性を示す。表2より、脂質膜に LfcinB を加えることにより線幅が広がる温度が上がったことから Tc の上昇が観測されたが、正確に膜の運動性の変化を解析するために、リン脂質の  $^1\text{H}$  MAS NMR 測定により、温度変化に伴うアシル鎖を示すピークの強度変化を観測することにより Tc を測定した (図2, 3)。その結果、酸性混合膜、LfcinB-25-酸性混合膜系、LfcinB-6-酸性混合膜系の Tc はそれぞれ 21.5°C, 22.0°C, 24.0°C と求められた。DMPC の Tc は 23°C であることがすでに報告されているので、黄色ブドウ球菌の細胞膜のリン脂質の相互作用は DMPC よりも弱いことが明らかになった。この結果は黄色ブドウ球菌の細胞膜のリン脂質中に含まれる過剰な負電荷による静電反発と CL の4本のアシル鎖に起因する。混合膜と比較して LfcinB-25-混合膜系の Tc は 2.5°C だけ上昇したのに対して、LfcinB-6-混合膜系の Tc は 0.5°C だけ上昇したのにとどまった。LfcinB の正電荷が膜表面の負電荷同士の反発を中和して、酸性膜を硬くしたと考えられるが、その相互作用は LfcinB-6 の方が LfcinB-25 に比較して小さいことがわかった。またこのことは  $^{31}\text{P}$  DD-static NMR スペクトルにおける異方性の増加と一致した。

Table 2 Anisotropic  $^{31}\text{P}$  chemical shift values ( $\delta_{\perp}$  and  $\delta_{\parallel}$ ) for (a): acidic phospholipid bilayers, (b): addition of LfcinB-25 to (a), and (c): addition of LfcinB-6 to (a) (lipid : DMPG 65%, CL 10%, DMPC 25%)

	$\delta_{\perp}$			$\delta_{\parallel}$		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
40°C	-11.45	-11.46	-7.34	21.90	24.90	20.10
30°C	-11.71	-11.71	-10.29	24.15	24.31	23.06
20°C	-11.98	-11.05	-10.16	25.42	24.43	22.83
10°C	-12.02	-12.73	-12.18	30.55	32.50	31.09
0°C	-7.89	-11.82	-12.88	38.71	39.06	38.86

## 2. 酸性リン脂質二重膜中における LfcinB-6 の結合部位

リン脂質の固体  $^1\text{H}$  MAS NMR 測定により, Trp の環電流効果による化学シフト値の変化が観測できた。リン脂質のグリセロール基の  $\text{CH}(\beta)$  部位のみが低磁場シフトをしたことから, Trp 残基が二重膜の界面に存在し,  $\text{CH}(\beta)$  に影響を与えていることが示唆された。この結果は, リン脂質二重膜の界面に Trp を含む LfcinB の塩基性部位(LfcinB-6)が結合していることを示している。さらにリン脂質二重膜に LfcinB-25 を添加すると直ちに凝集したことが光学顕微鏡により観察された。この結果は塩基性部位(LfcinB-6)が主に細菌の酸性モデル膜と静電相互作用をするが, Trp が界面に存在するために膜の外側に現れた疎水性基の疎水性相互作用により膜同士が凝集したものと考えられる。

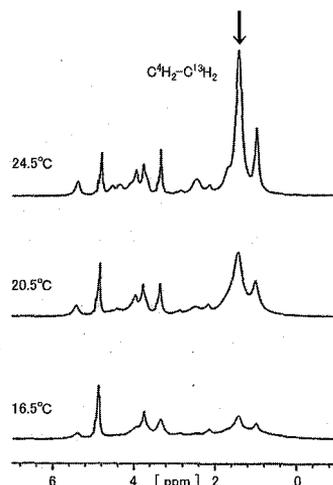


Fig. 2. Temperature variation of solid-state  $^1\text{H}$  MAS NMR spectra of acidic phospholipid bilayers. The signals with arrow indicate the methylene protons of acyl chains.

## 3. イオン透過と LfcinB の抗菌作用の分子機構

$^{31}\text{P}$  DD-static NMR 測定結果(図 1)より, 混合膜の調製後に LfcinB を後から加えると 0 ppm の等方成分が観測され, LfcinB は膜に欠陥を生じる可能性が示された。しかし,  $^{31}\text{P}$  DD-static NMR 測定結果だけでは単に膜が乱されてミセルを生じたのか, 孔を形成したのかが区別できない。そこで, カリウムイオンを内側に含む大きな一重膜小胞(LUV)に LfcinB を加えることにより生じるカリウムイオンの透過を, カリウムイオン選択性電極を用いて LUV 外側のカリウムイオン濃度変化から測定した。その結果, LfcinB の作用によるカリウムイオンの膜透過が確認できた。

### 【結論】

QCM や NMR 測定の結果から, LfcinB は中性脂質が多い哺乳類の細胞膜に比べて, 酸性脂質を多く含む細菌の細胞膜と特異的に相互作用をする。この相互作用は LfcinB-6 の方が LfcinB-25 よりも小さい。この結果, 孔を形成する欠陥が生じてイオン透過を促進することがわかった。このため, 細胞膜内外のイオンの濃度勾配を保てなくなるために抗菌作用が発現する分子機構が明らかになった。

### 【文献】

1. M. Umeyama, A. Kira, K. Nishimura, A. Naito, *Biochim. Biophys. Acta* **1758** (2006) 1523-1528.
2. 梅山, 吉良, 内藤『ラクトフェリン 2007』2007, (株)日本医学館, pp.134-140.

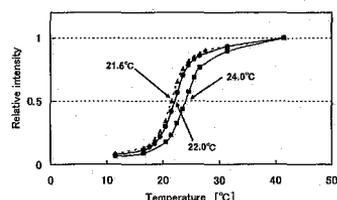


Fig. 3. Plot of relative intensities of  $^1\text{H}$  MAS NMR signals of methylene protons of acyl chains in LfcinB-acidic phospholipid bilayer systems. Tc values of LfcinB-acidic phospholipid bilayer systems were determined by taking the mid points of the curves of the intensity variations. (▲): acidic phospholipid bilayers, (●): LfcinB-6-acidic phospholipid bilayer systems, (■): LfcinB-25-acidic phospholipid bilayer systems.

## P064 アラニンオリゴマーの平行および逆平行 $\beta$ シート構造に関する 固体 NMR 構造解析

(農工大院工・織博)

○堀口紅実子、池永万希子、山内 一夫、朝倉 哲郎

Structural analyses of parallel and anti-parallel  $\beta$ -sheet structures of alanine oligomers by solid-state NMR.

(Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology,  
Museum of Fiber Science and Technology)

○Kumiko Horiguchi, Makiko Ikenaga, Kazuo Yamauchi and Tetsuo Asakura

The detailed structure and dynamics of alanine oligomers were studied with solid-state NMR at atomic level. Trialanine has been studied in detail in our laboratory and tetraalanine will be studied here. This can form both parallel (P) and anti-parallel (AP)  $\beta$ -sheet structures by changing solvent-treatment. P-structure consists of two independent molecules in the asymmetric unit, whereas AP-structure consists of molecules with the same conformation. Complete  $^{13}\text{C}$  spectral assignments were performed using  $^{13}\text{C}$  labelled tetraalanine, and intra-molecular and inter-molecular atomic distances were estimated from the RFDR spectra. A drastic difference in  $^{13}\text{C}$  spin-lattice relaxation time,  $T_1$  values was observed between AP- and P-structures; for example, the P-structure has longer  $T_1$  values 2.8 times compared with the AP-structure for the Ala C $\beta$  carbon. The longer alanine oligomers were also investigated. The broad and asymmetric C $\beta$  peaks as well as the case of *Samia cynthia ricini* silk fibroin were observed for alanine oligomers longer than hexaalanine.

### 【緒言】

$\beta$  シート構造は平行型または逆平行型を取ることが知られているが、それらを区別することは容易ではない。これまで当研究室ではアラニン三量体( $\text{Ala}_3$ )の平行型および逆平行型 $\beta$ シート構造について、特徴的な NMR パラメーターを検討してきた。

今回、アラニン四量体( $\text{Ala}_4$ )の $\beta$ シート構造を、試料調整法を変えることによって平行型と逆平行型に作り分けることに成功し、固体 NMR 構造解析、X 線構造解析を行うことによって、平行型と逆平行型に関する構造や運動性の違いを検討した。さらに選択的安定同位体ラベル化した一連のアラニンオリゴマーを合成し、 $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR、RFDR の測定<sup>1)</sup>、 $^{13}\text{C}$  スピン-格子緩和時間( $T_1$ )測定を行うとともに分子動力学(MD)を用いた構造解析を進め、アラニン連鎖長の違いによる構造変化についても検討を加えた。

### 【実験】

Fmoc 固相法により、 $^{13}\text{C}$  ユニフォームラベル化ならびに残基特異的ラベル化されたアラニンオリゴマーを合成した。特に、 $\text{Ala}_4$  は溶媒処理をかえることによって、平行型と逆平行型 $\beta$ シート構造に調整した。作成した試料の $^{13}\text{C}$  CP/MAS 測定、さらに RFDR 測定は mixing time を 5.7ms-22.4ms の範囲に設定し、Bruker Avance 400 を用いて行った。 $T_1$  測定は CMX Infinity 400 で行った。また、MD(Material Studio Discover)を用い、平行型または逆平行型  $\text{Ala}_4$  構造モデルの作成を試みた。

---

平行および逆平行 $\beta$ シート構造・アラニンオリゴマー・固体原子間距離測定・

$T_1$ 緩和時間・分子間水素結合

ほりぐちくみこ、いけながまきこ、やまうちかずお、あさくらてつお

**【結果】**

**Ala<sub>n</sub>の平行および逆平行型 β シート構造**

Ala<sub>3</sub>と同様に Ala<sub>4</sub>の平行型と逆平行型のスペクトルはその分子間構造の違いを反映して、著しく異なった <sup>13</sup>C CP/MAS スペクトルを与える (Fig.1)。Ala<sub>3</sub>の場合、逆平行型、平行型ともに残基毎に対応するピークが2本存在し、構造の異なる2分子で構成されていたが、Ala<sub>4</sub>の場合、平行型は同様に2分子存在するが、逆平行型は、1種類の構造であることがわかった。

また、RFDR 測定において、<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C の相関を示す交差ピーク(Fig.2)から分子中の残基間ならびに分子間の距離情報が得られた。平行型 β シート構造を例にとると、同一分子残基間の 1Cβ-2Cα 間ならびに異種分子間の 1CO-1Cβ 間距離は、Ala<sub>3</sub>の RFDR 測定における mixing time と距離の関係<sup>1)</sup>を基準にして推測すると、4.0±0.5 Å と決定できる。

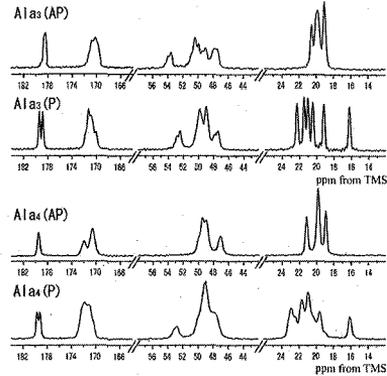


Fig.1 <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectra of Ala<sub>3</sub> and Ala<sub>4</sub> with Anti-Parallel and Parallel β-sheet structures.

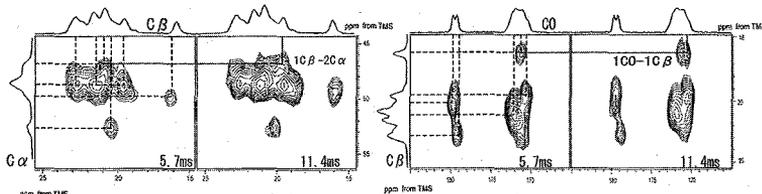


Fig.2 The series of expanded 2D <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C RFDR spectra of P-([U-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N]Ala)<sub>4</sub> recorded with different mixing times. Dotted lines show peak correlations for assignments. Red peaks indicate correlations among <sup>13</sup>C nuclei of inter residues.

**逆平行型 β シート構造のアラニンオリゴマーの <sup>13</sup>C NMR スピン-格子緩和時間**

アラニンオリゴマーの <sup>13</sup>C ピークの平均 T<sub>1</sub> 値を平行型と逆平行型で比較すると、すべての <sup>13</sup>C 核で、前者が、約2-3倍長い(ただし、Ala<sub>n</sub>の C 末端 Cβ の極端に長い T<sub>1</sub> 値は例外である)。その T<sub>1</sub> の違いによって、平行型と逆平行型を区別することができる。

次に Fig.3 に連鎖長の異なるアラニンオリゴマーについて、Cβ 領域のスペクトルと T<sub>1</sub> の実測値を示した。線形に着目すると、Ala<sub>7</sub>から、突然、Cβピークはブロードで非対称な線形となる。T<sub>1</sub> 値の測定結果から、Ala 連鎖が 7 以上で逆平行型および平行型(最低磁場ピーク)が混在した不均一な β-sheet 構造を形成することがわかった。これはアラニン連鎖が 12 の場合のエリ蚕フィブロインの Cβ 領域のスペクトルと一致する。

**【謝辞】**

この開発は独立行政法人科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業による成果である。

- 1) Asakura, T. ; Okonogi, M. ; Nakazawa, Y. ; Yamauchi, K. JACS, 2006, 128, 6231-6238.

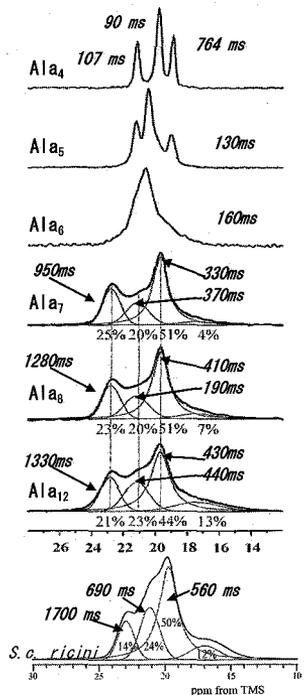


Fig.3 <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectra of Ala Cβ region of a series of alanine oligomers and [3-<sup>13</sup>C]Ala-labeled *S.c. ricini* silk fiber, together with T<sub>1</sub> values (msec).

P065

## 固体 NMR を用いたアミロイド $\beta$ 凝集体の立体構造解析

(京大院理) ○中西 梓、大橋竜太郎、竹腰清乃理

(京大院農) 増田裕一、上村諭子、入江一浩

### Structural analysis of fibrous amyloid- $\beta$ using solid-state NMR

(Graduate School of Science, Kyoto Univ.) ○A.Nakanishi, R.Ohashi, K.Takegoshi

(Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.) Y.Masuda, S.Uemura, K.Irie

One of the supreme features of solid-state NMR is that it is applicable to structural investigation using powder samples which can not be crystallized or dissolved. One of such samples is fibrous amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ), which is closely related to Alzheimer's disease. In this work, we studied a 3D structure of fibrous wild-type  $A\beta$  42 and its E22K mutant (Italian) using  $^{13}\text{C}$  high-resolution NMR techniques.

The aggregative ability and neurotoxicity of E22K- $A\beta$  22 is much stronger than those of wild-type  $A\beta$  42 [1]. Irie and colleagues have recently proposed a new aggregation model (malignant conformation) of  $A\beta$  42, which is illustrated in Fig1 [2,3]. This model is different from the other models proposed so far as it includes two turn regions.

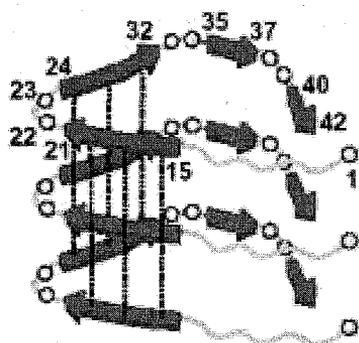


Fig1 ..... parallel intermolecular  
 $\beta$ -sheet

The first turn is formed by Ala-21, Lys-22, Asp-23, and Val-24, and the second turn is formed by Gly-37, Gly-38, Val-39, and Val-40. In order to conform these turn structures, we measure  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  distance correlation using  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  broadband dipolar recoupling techniques, namely,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar assisted rotational resonance (DARR) [4] and rotational resonance (R2)[5]. Several cross-peaks observed in the 2D DARR and R2 spectra clearly support the presence of turns at positions 22 and 23 in the E22K- $A\beta$  42 [6] and at 38 and 39 in the wild-type  $A\beta$  42.

Keywords: Solid-state NMR, Amyloid- $\beta$

○ なかにしあずさ、おおはしりゅうたろう、たけごしきよりの  
ますだゆういち、うえむらさとこ、いりえかずひろ

We also show that each molecule aligns to form parallel intermolecular  $\beta$ -sheet as illustrated in Fig1 in E22K A  $\beta$  42.

Close examination of the observed 2D cross-peak patterns and the corresponding chemical shifts of 23Asp- $\gamma$  and 25Gly- $\alpha$  shows that there are two conformers; one is a major conformer with its relative ratio to the minor conformer being 60%(wild-type) and 52%(Italian). Further, it is suggested from the chemical shift of 25Gly- $\alpha$  that major conformer has its turn at positions 25 and 26 as illustrated in Fig2.

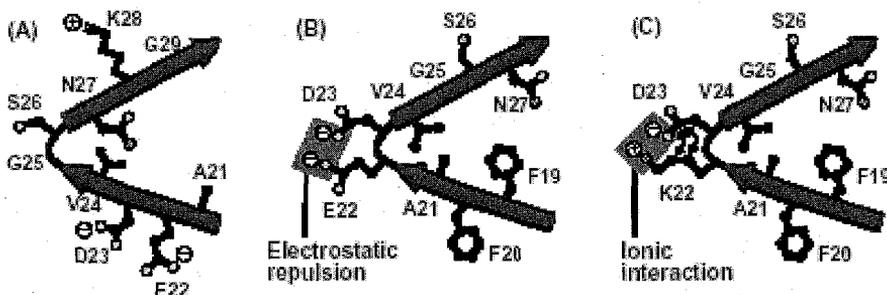


Fig2 turn structures of fibrous A  $\beta$  42 that are inferred from the results of solid-state NMR

- (A) major conformer of wild-type A  $\beta$  42
- (B) minor conformer of wild-type A  $\beta$  42
- (C) minor conformer of E22K A  $\beta$  42

#### references

- [1] K.Murakami, et al., J. Biol. Chem., 278, 46179 (2003)
- [2] A.Morimoto, et al., J. Biol. Chem., 279, 52781 (2004)
- [3] K.Murakami, et al., J. Am. Chem. Soc., 127, 15168 (2005)
- [4] K.Takegoshi, et al., J. Chem. Phys., 118, 2325 (2003)
- [5] D.P.Raleigh, et al., Chem. Phys. Lett., 136, 71 (1988)
- [6] Y.Masuda, et al., Bioorg. Med. Chem., 13, 6803 (2005)

P066 高磁場固体<sup>1</sup>H及び<sup>17</sup>O-NMR法によるアラニンオリゴマーの  
構造解析と化学シフト計算

(農工大院工・織博<sup>1</sup>、奈良女子大<sup>2</sup>、物質・材料研究機構<sup>3</sup>)

鈴木悠<sup>1</sup>、山内一夫<sup>1</sup>、黒子弘道<sup>2</sup>、清水禎<sup>3</sup>、丹所正孝<sup>3</sup>、朝倉哲郎<sup>1</sup>

Structure Analysis of Alanine Oligomers by High Field Solid State  
<sup>1</sup>H and <sup>17</sup>O-NMR and Chemical Shift Calculation

(Museum of Fiber Science and Technology, Department of Biotechnology, Tokyo  
University of Agriculture and Technology<sup>1</sup>, Nara Women's University<sup>2</sup>, National  
Institute for Materials Science<sup>3</sup>)

Yu Suzuki<sup>1</sup>, Kazuo Yamauchi<sup>1</sup>, Hiromichi Kurosu<sup>2</sup>, Tadashi Shimizu<sup>3</sup>,  
Masataka Tansho<sup>3</sup>, and Tetsuo Asakura<sup>1</sup>

The solid state <sup>1</sup>H and <sup>17</sup>O NMR spectra of trialanine with parallel(P) and anti-parallel(AP) β-sheet structures were measured by high field / fast MAS NMR. NH <sup>1</sup>H signal of (Ala)<sub>3</sub> with P structure was observed at higher field than that of AP structure. This is consistent with difference in the hydrogen bond lengths of the inter-strand N-H...O=C bonds. When the numbers of Ala residues increase from 5 to 8, the peak of the P structure appears partially from 7 other than those of AP structure in the NH resonance region. The NH chemical shift of (Ala)<sub>7</sub> with P structure is close to that of (Ala)<sub>3</sub> with P structure.

【緒言】 多くの生体高分子にみられるβシート構造は、その分子間水素結合の様式により、平行(P)及び逆平行(AP)型の2種類が存在し、その識別を行うことは構造を明らかにするために重要である。我々は<sup>13</sup>C固体NMRによりP構造、AP構造の判別が可能であることを示してきたが<sup>1)</sup>、より詳細なβシート構造の違いを明らかにするためには分子間水素結合に直接関与している<sup>1</sup>H核及び<sup>17</sup>O核の観測が有効である。しかし、<sup>1</sup>H核は強い<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H双極子相互作用によりシグナルがブロード化するため、また<sup>17</sup>O核はスピン数が5/2の四極子核であるため通常の固体NMR装置では観測が極めて困難である。本研究では、これを克服するために、高磁場NMR装置でMAS法を用いる事により先鋭化を試みた。

【実験】 100%のP及びAP βシート構造を形成させることができる試料<sup>2,3)</sup>として L-alanyl-L-alanyl-L-alanine (Ala)<sub>3</sub>を用いた。さらに、鎖長を長くした場合の水素結

高磁場NMR, 固体<sup>1</sup>H NMR, アラニンオリゴマー, βシート構造, 化学シフト計算

すずきゆう、やまうちかずお、くろすひろみち、しみずただし、たんしよまさたか、あさくらてつお

合構造の変化を観測するためにAlaオリゴマー(Ala)<sub>3-8</sub>を用いた。ノンラベル(Ala)<sub>3-6</sub>はBachem AGから購入し、<sup>17</sup>Oラベル(Ala)<sub>3</sub>、及びノンラベル(Ala)<sub>7,8</sub>はFmoc固相法により合成した。<sup>1</sup>H MAS NMR及び<sup>17</sup>O DD/MAS NMR測定はJEOL ECA930を用い、回転数20kHzで行った。DFT化学シフト計算は、Gaussian03プログラムを利用したGIAO-CHF法[基底関数：6-311G(d,p)]で行った。

【結果・考察】 (Ala)<sub>3</sub>のP構造, AP構造の<sup>1</sup>H MAS NMRスペクトルおよび化学シフト計算結果をFig. 1に示す。今回注目する水素結合に関与するアミドプロトン(NH/NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)の化学シフト領域において、AP構造では9.4, 8.5ppmにピークが、P構造では8.9, 7.5ppmに2つの分離したピークが観測された(Fig.1A)。結晶構造から得られている水素結合長の違い及びシグナル強度比から、P構造, AP構造ともに低磁場側をNH<sub>3</sub><sup>+</sup>プロトン、高磁場側をNHプロトン由来と帰属することができる。NHピークに着目すると、P構造(7.5ppm)がAP構造(8.5ppm)よりも約1.0ppm高磁場に現れるが、GIAO-CHF法による化学シフト計算によってこれが再現された(Fig.1B)。この結果より、水素結合状態の違いに由来するNHプロトンの化学シフトから、P構造, AP構造の識別が可能であることが示された<sup>4)</sup>。

また、Ala鎖長を一残基ずつ伸張すると、NH/NH<sub>3</sub><sup>+</sup>領域において、(Ala)<sub>4-6</sub>までは9.5ppm付近にほぼシングルピークであったのが、(Ala)<sub>7,8</sub>と伸ばしていくと高磁場側に新たなピークが現れ、(Ala)<sub>7</sub>からP構造の出現が示唆された。(Fig.2)これは、当研究室で<sup>13</sup>C CP/MAS NMRを用いて得られた結果とも一致している。

発表では、(Ala)<sub>3</sub>の<sup>17</sup>O-NMR測定結果及び、<sup>2</sup>Hラベルによる、よりシャープなピークから決定された<sup>1</sup>H化学シフト値と経験的化学シフト計算を組み合わせることで、水素結合に代表される分子間相互作用の<sup>1</sup>H化学シフトへの寄与について検討した結果についても報告する予定である。

#### 【参考文献】

- 1) Asakura, T. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 6231.
- 2) Fawcett, J. K. *et al.*, *Acta Cryst.* **1975**, *B31*, 658.
- 3) Hempel, A. *et al.*, *Biopolymers* **1991**, *31*, 187.
- 4) Suzuki, Y. *et al.*, *J. Phys. Chem. B* in press

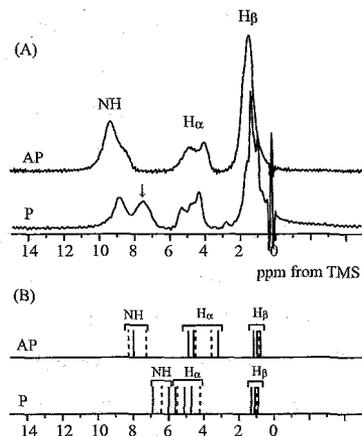


Fig.1 (A) <sup>1</sup>H MAS NMR spectra of (Ala)<sub>3</sub> with AP and P structures (B) Stick spectra of <sup>1</sup>H chemical shifts of (Ala)<sub>3</sub> calculated by DFT method.

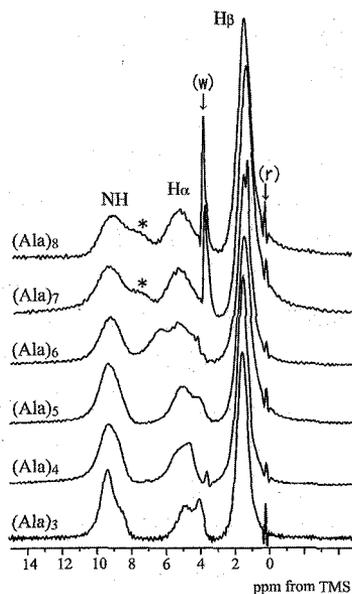


Fig.2 <sup>1</sup>H MAS NMR spectra of (Ala)<sub>n</sub> (n=3~8). (w) is water peak and (r) is the internal chemical shift reference (silicon rubber).

マジック角回転条件  $^{13}\text{C}$ -スピン拡散法で得られる核間距離情報○江川文子<sup>1</sup>、阿久津秀雄<sup>1</sup>、藤原敏道<sup>1</sup><sup>1</sup>阪大・蛋白研 $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  distance information obtained from completely  $^{13}\text{C}$  labeled compoundsby  $^{13}\text{C}$  spin diffusion under magic-angle spinningAyako Egawa<sup>1</sup>, Hideo Akutsu<sup>1</sup> and Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute for Protein Research, Osaka University

Solid-state NMR provides homonuclear distances for the structural analysis of molecular complexes from the spin-diffusion. We have evaluated the quality of  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  distances obtained from spin diffusion experiments for  $^{13}\text{C}$  uniformly labeled complexes consisting of BChl *c*. Magnetization transfer rates due to direct dipolar couplings were determined by the polarization-transfer matrix analysis of the spectral intensities. The distances were obtained from the polarization-transfer matrix by the perturbation theory for the spin diffusion under magic-angle spinning, where the zero-quantum lineshape functions were estimated experimentally. The experimental distances are compared with known intramolecular distances and intermolecular distances in the determined structure. This procedure gives distances up to 7 Å with an accuracy of 25%. We discuss factors that affect the accuracy of distances.

【序】 固体 NMR 法では、結晶化できない生体高分子複合体から核間距離など構造情報を直接得ることができ、膜蛋白質やアミロイドなどの構造解析などに有効である。 $^{13}\text{C}$  均一安定同位体標識試料について  $^{13}\text{C}$  スピン拡散法で距離情報を得ようとする、共有結合した  $^{13}\text{C}$  間の強い双極子結合が弱い結合による遠距離情報の観測を難しくする、分子内・分子間距離の区別の問題、試料回転条件で  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  以外に  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  や  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  双極子結合、化学シフト異方性など多くの相互作用が分子の向きに依存して分極移動に影響するなどが原因で正確な距離には懸念がもたれる。以前、私達は完全  $^{13}\text{C}$  均一標識したバクテリオクロフィル *c* の高次会合体にマジック角高速回転 2 次元  $^1\text{H}$  駆動  $^{13}\text{C}$  スピン拡散法を適用して、100 以上の  $^{13}\text{C}$  間距離を得て、原子分解能の構造決定を行った<sup>1</sup>。この方法で、得られる  $^{13}\text{C}$  間距離の上限、距離精度、分極移動行列法の有効性、強い双極子結合を弱める効果、集団平均した時間依存摂動論で分極移動速度から距離を求める方法とその妥当性、などを理論

キーワード: 固体 NMR、スピン拡散法、 $^{13}\text{C}$  均一安定同位体標識

著者ふりがな: えがわあやこ、あくつひでお、ふじわらとしみち

的、実験的に検討したので報告する。

**【実験】** 固体 NMR の測定は Chemagnetic Infinity-plus 500 分光計を用いた。 $^{13}\text{C}$  共鳴周波数は 125.7 MHz、マジック角試料回転は 12.5 kHz、測定中の試料温度は  $10^\circ\text{C}$  で行った。C-C 距離情報を得るために、8 つの混合時間 (0, 3, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ms) について、2 次元  $^{13}\text{C}$  スピン拡散スペクトルを測定した<sup>1,2,3</sup>。

試料は、 $^{13}\text{C}$  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フレンチプレスした後、ショ糖密度勾配にかけて超速心により分画したものを固体 NMR 試料とした。

**【解析法】** 分極移動解析で使った理論を示す。ある混合時間  $\tau_{\text{mix}}$  の交差ピーク強度

$M(\tau_{\text{mix}})$  と  $\tau_{\text{mix}} = 0$  の対角ピークの強度  $M(0)$  と分極移動行列  $\mathbf{R}$  の関係を(1)式<sup>4</sup>に示す。

$$\mathbf{M}(\tau_{\text{mix}}) = \exp(-\mathbf{R}\tau_{\text{mix}})\mathbf{M}(0) \quad (1)$$

距離への換算には、(2)式<sup>5</sup>を用いた。

$$R_{j,k} \approx \frac{\gamma^4 \hbar^2}{15 r_{j,k}^{\text{eff}6}} \left( K_{\text{ZQ}}^{(j,k)}(\omega_R) + K_{\text{ZQ}}^{(j,k)}(-\omega_R) + \frac{1}{2} K_{\text{ZQ}}^{(j,k)}(2\omega_R) + \frac{1}{2} K_{\text{ZQ}}^{(j,k)}(-2\omega_R) \right), \quad (2)$$

$$\left( \frac{1}{r_{j,k}^{\text{eff}}} \right)^6 = \left( \sum_{m=1}^{18} \sum_{l=1}^n \frac{1}{n r_{j,k,l,m}^6} \right)$$

ここで、 $R_{ij}$  はスピン間分極移動速度、 $r_{j,k,l,m}$  は分子  $l$  のスピン  $j$  と分子  $m$  のスピン  $k$  の距離、

$n$  は単位格子の分子数である。ゼロ量子線形関数  $K_{\text{ZQ}}^{(j,k)}(n\omega_R)$  は、(3)式のように近似した。

$$K_{\text{ZQ}}^{(j,k)}(n\omega_R) \approx \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F_j(n\omega_R - \omega) F_k(\omega) d\omega \quad (3)$$

ここで、 $F_j(\omega)$  は  $j$  の一量子線形関数、 $\omega_R$  は試料回転周波数である。

この理論を適用するために、スピン拡散スペクトルの各混合時間から信号強度行列を作成した。 $\mathbf{R}$  は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算出した。このとき、 $\mathbf{R}$  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する。なお、 $\mathbf{R}$  は  $31 \times 31$  の行列である。

一量子線形関数は、MAS 下の等方化学シフト分解 CH カップリング 2 次元  $^{13}\text{C}$  スペクトルから、31 個の各スピンについての対角信号の線幅と高さを読み取り、ローレンツ関数で作成した。この時、 $^1\text{H}$  等の不均一性による線幅への寄与は差し引いた。そして(3)式から、観測

された全ての C-C 相関についてゼロ量子線形関数を合成した。

このようにして求められた分極移動速度行列  $\mathbf{R}$  とゼロ量子線形関数を使って、(2)式より距離を算出した。なお、構造計算には NMR より得られた距離を拘束条件に 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、水素結合は OH と C=O の O-O と O-H の距離情報として設定した。距離相関の帰属と構造最適化は再帰的に行った。

**【結果】** 分極移動行列の計算は、計算信号強度が実験値によく一致した結果が得られた(Fig.1)。フィッティングの精度は平均 23% となった。Fig1 からわかるように、10 ms 程度の早い立ち上がりの信号だけでなく、100 ms 以上の遅い立ち上がりの信号も観測されていた。これは分子内の短い距離情報とともに、分子間の遠距離情報が得られたということになる。

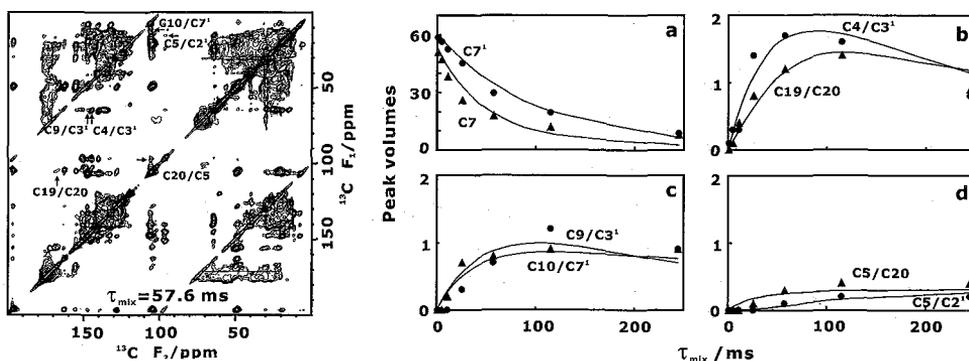


Fig1<sup>1</sup>. <sup>13</sup>C spin diffusion spectrum at 57.6 ms and build-up curves. Experimental (symbols) and simulated (lines) cross-peak intensities are presented. (a) Intensities of diagonal peaks. (b) Cross-peaks for distances of -3.5 Å. (c) Cross-peaks for distances of 3.5-4.5 Å. (d) Cross-peaks for distances of 4.5-5.5 Å.

ゼロ量子線形関数による誤差について検証する。観測された C-C 相関のゼロ量子線形関数を化学シフト差に対してプロットしたグラフは Fig2 に示す。この結果は、サイドバンド領域の化学シフト差  $100 \pm 2$  ppm は正確なゼロ量子関数を求めることはできなかった。つまり、回転共鳴の影響は非常に狭い範囲であることを示唆している。また、スペクトルから読み取った線幅がゼロ量子線形関数に及ぼす影響は最大 2.5 倍程度、距離にして 5% 程度であった。

分極移動行列解析によって算出された 68 個の分子内距離は既知の距離と 25% の精度で一致した。ゼロ量子線形関数を使った補正をしなかった場合、その精度は 30% になった。Fig3 からわかるように、ゼロ量子線形関数で補正をした方がより高い精度で距離を求めることができた。

今回の実験で得られた 7 Å までの約 100 個の C-C 距離から、シミュレーテッド・アニーリ

ング法による構造計算で構造を決定した。その結果、分子間距離の誤差が分子内距離より大きかった。これは分子間の小さい信号強度の読み取り誤差や分子間構造の揺らぎの影響が予想される。しかし、分極移動行列解析で得られた分子間距離は、クロロフィルのような固い分子からなる複合体の構造決定に十分な情報であることがわかった。

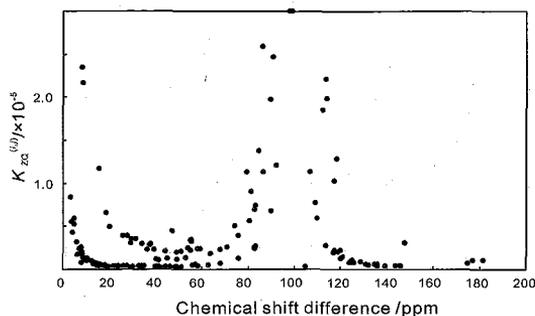


Fig2. The zero-quantum lineshape functions dependent on the chemical shift difference.

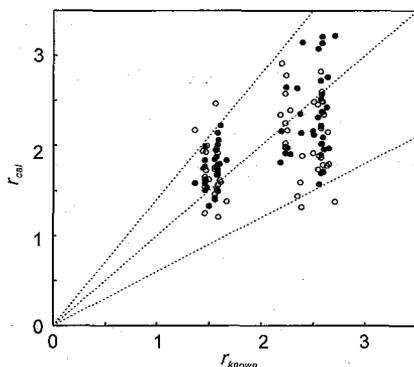


Fig3.  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  experimental intramolecular distances vs known distances. Corrected distances (●) with zero-quantum lineshape functions and non-corrected (○) distances are shown.

【考察】 以上のことから、次のようなことがわかった。MAS 条件での  $^{13}\text{C}$  スピン拡散は(1)式を与える、連立 1 次微分方程式でリレー分極移動などその現象を記述できる。分極移動速度は摂動理論に基づく解析により誤差約 25% で  $^{13}\text{C}$  間距離を求められる。完全標識試料でも分極移動速度から 7 Å 程度までの距離を求められる。ゼロ量子線形を実験的に考慮することで、測定距離精度は約 2 割向上する。信号強度測定 of 誤差やゼロ量子線形の合成誤差を考慮してもスピン拡散法では、距離測定に約 2 割程度の誤差がある。

しかし、今回の結果は、プロトン駆動スピン拡散法を使った分極移動行列解析で得られる多数の距離が、構造解析に有効な精度で得られることを示している。

【謝辞】試料を提供して下さった関西学院大の小山泰教授、溝口正博士に感謝いたします。

【参考文献】(1)A. Egawa, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 709. (2) N. M. Szeverenyi, et al, *J. Magn. Reson.* **1982**, *47*, 462. (3) F. Castellani, et al, *Nature* **2002**, *420*, 98. (4) T. Kato, et al, *J. Biol. NMR* **1993**, *3*, 653. (5) A. Kubo, et al, *J. Chem. Soc. Faraday. Trans. 1* **1988**, *84*, 3713.

水溶性およびカルシウム結合性を付与した  
新規絹フィブロインモデルペプチドの固体 NMR 構造解析

農工大院工・織博<sup>1</sup>、日産化学物質研<sup>2</sup>

○佐藤博彦<sup>1,2</sup>、菊池有加<sup>1</sup>、山口恵理香<sup>1</sup>、中澤靖元<sup>1</sup>、朝倉哲郎<sup>1</sup>

Structural Analysis of Water-soluble Model Peptides of Silk Fibroin with Ca<sup>2+</sup>  
binding sites using Solid-state NMR

<sup>1</sup>Dept of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology,

<sup>2</sup>Chemical Research Laboratories, Nissan Chemical Industries, Ltd.

Hirohiko Sato<sup>1,2</sup>, Yuka Kikuchi<sup>1</sup>, Erika Yamaguchi<sup>1</sup>, Yasumoto Nakazawa<sup>1</sup>, Tetsuo Asakura<sup>1</sup>

The structures of silk fibroins before and after spinning have been determined with 2D spin-diffusion NMR and REDOR for the site-specific stable isotope labeled model peptides in our laboratory. In this study, we synthesized silk fibroin model peptides with water-soluble sequence, poly (glutamic acid) at the N terminus which was also Ca<sup>2+</sup> binding sites. The structures of the crystalline domain of *B. mori* silk fibroin before and after spinning could be reproduced from the aqueous solutions of these model peptides by changing pH.

【緒言】

当研究室では、家蚕やジョロウグモなどが生産する絹の繊維化前後の構造について、部位特異的に安定同位体ラベルを施したモデルペプチドを種々合成し、固体 2 次元スピンドiffusion NMR、REDOR法などを用いて詳細な構造解析を行ってきた。その結果、家蚕絹フィブロイン結晶部の繊維化前後の構造として type II  $\beta$ -turn と呼ばれる Silk I 型、ラメラ構造を有する Silk II 型を提案してきた<sup>1,2</sup>。また、クモの絹について、繊維化後の Ala 連鎖領域が  $\beta$  sheet 構造を形成することを明らかにした。天然の蚕やクモの絹は、その体内において水に可溶化して存在しているが、吐糸されることで繊維状態となる。

本研究では、より天然に近いモデル系として、水溶性である Glu 連鎖を付与した新規絹モデルペプチドを合成し、繊維化前後の構造を再現するとともに、内部回転角を含めた詳細構造について、主に固体 NMR 手法 (2 次元スピンドiffusion NMR、<sup>13</sup>C CP/MAS NMR) を用いて検討した。なお、Glu 連鎖はカルシウム結合性を有するので、再生医療材料としても有望である。

【実験】

一連のモデルペプチドは、Fmoc 固相合成法により合成した (Table1)。  
固体<sup>13</sup>C CP/MAS NMR測定はCMX Infinity400(Chemagnetics)、溶液NMR測定は、

固体 NMR、絹フィブロイン、水溶性、2 次元スピンドiffusion

さとうひろひこ、きくちゆか、やまぐちえりか、なかざわやすもと、あさくらてつお

ECA700(JEOL) を用いた。2次元スピンド拡散 NMR 測定は、Inova400 (Varian) を使い、Off MAS 条件下で行った(Contact time:2ms,Mixing time:2s,Spinning rate:5kHz)。

Table1. Amino acid sequences of silk fibroin model peptides with different  $^{13}\text{C}$  labeled positions

No.	amino acid sequence
1	$\text{E}_4\text{AGSGAGAGSGAGAGSGAGAGSGAG}$
2	$\text{E}_4\text{AGS} [1-^{13}\text{C}]\text{G} [1-^{13}\text{C}]\text{AGAGSGAG} [3-^{13}\text{C}]\text{AGSGAGAGSGAG}$
3	$\text{E}_4\text{AGSGAGAGSGA} [1-^{13}\text{C}]\text{G} [1-^{13}\text{C}]\text{AGSGAG} [3-^{13}\text{C}]\text{AGSGAG}$
4	$\text{E}_4\text{AGSG} [3-^{13}\text{C}]\text{AGAGSGAGAGSGA} [1-^{13}\text{C}]\text{G} [1-^{13}\text{C}]\text{AGSGAG}$
5	$\text{E}_8\text{AGSGAGAGSGAGAGSGAGAGSGAG}$
6	$\text{E}_8\text{AGS} [1-^{13}\text{C}]\text{G} [1-^{13}\text{C}]\text{AGAGSGAG} [3-^{13}\text{C}]\text{AGSGAGAGSGAG}$
7	$\text{E}_8\text{AGSGAGAGSGA} [1-^{13}\text{C}]\text{G} [1-^{13}\text{C}]\text{AGSGAG} [3-^{13}\text{C}]\text{AGSGAG}$
8	$\text{E}_8\text{AGSG} [3-^{13}\text{C}]\text{AGAGSGAGAGSGA} [1-^{13}\text{C}]\text{G} [1-^{13}\text{C}]\text{AGSGAG}$

### 【結果・考察】

N末端にGlu連鎖を導入した家蚕絹フィブロインモデルペプチドは、pH8 以上で水に可溶化することができ、 $^{13}\text{C}$  溶液NMRの測定から、溶液状態ではランダムコイルをとることがわかった。Gluが4残基の凍結乾燥ペプチドをTFAで処理した場合、その $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMRスペクトルからSilk I構造(繊維化前構造)をとることがわかったが、処理しない場合は、ランダムコイルと $\beta$ シート構造が共存した。

Figure 1 に、Silk I 構造を形成したときの2次元スピンド拡散NMRスペクトルとシミュレーション結果を示した。Figure1(b)は、 $\text{E}_4(\text{AGSGAG})_4$ 中17番目のAlaについての実測スペクトルであり、シミュレーションの結果、内部回転角を $(\phi, \psi) = (-60^\circ, 140^\circ)$ と決定した(Figure(d))。この結果は、以前に報告された $(\text{AG})_{15}$ のAla内部回転角 $(\phi, \psi) = (-62^\circ, 125^\circ)$ <sup>3</sup>と類似の結果であり、 $(\text{AGSGAG})_n$ 配列においてもSilk I構造をとることが示唆された。また、Glu連鎖に近い9番目のAla内部回転角は $(\phi, \psi) = (-80^\circ, 160^\circ)$ であり、 $3_1$ -helixに類似したスペクトルパターンを示した(Figure(c))。Silk I および  $3_1$ -helixの化学シフト値の違いは小さいことから、部位特異的な安定同位体ラベルと2次元スピンド拡散NMRを併用することで、化学シフト値のみで明確な違いがでない場合においても、より詳細な構造情報を得ることが可能である。

本発表では、家蚕絹フィブロインモデルペプチド以外に、クモ牽引糸モデルペプチドについても水溶性を付与するためにGlu連鎖を導入し、凝集後の局所構造解析およびカルシウム添加による構造変化について検討したので併せて報告する。

### 【References】

- (1) Asakura, T. et al., *Protein Science* **2005**, *14*, 2654.
- (2) Asakura, T. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 5703.
- (3) Asakura, T. et al., *Macromolecules.*, **2005**, *38*, 7397.

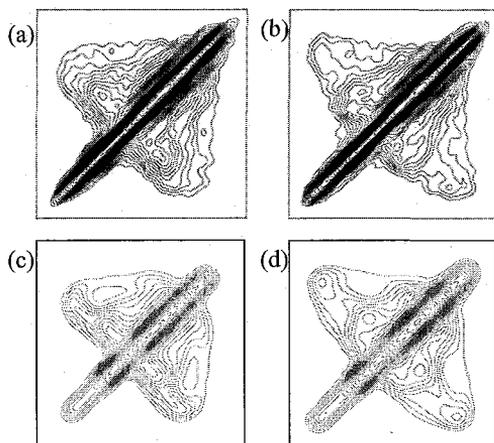


Figure 1 2D spin-diffusion NMR spectra of (a) sample No.2 and (b) sample No.3 observed under Off MAS condition. The corresponding simulated spectra of (c) Ala<sup>9</sup>( $\phi = -80^\circ, \psi = 160^\circ$ ) and (d)Ala<sup>17</sup>( $\phi = -60^\circ, \psi = 140^\circ$ ).

P069

固体 NMR によるアミロイド形成ペプチドのアミロイド線維  
形成機構と線維阻害機構の解明

横浜国大・院工

○ 内藤 晶、大道寺謙吾、藤田英樹、伊藤ひかり、山根衣寿美、川村 出

Amyloid fibrillation and fibril inhibition mechanism of amyloidogenic peptides as studied by  
solid state NMR

Graduate School of Engineering, Yokohama National University

Akira Naito, Kengo Daidoji, Hideki Fujita, Hikari Itoh, Izumi Yamane, Izuru Kawamura

Amyloid fibril formation was examined for human calcitonin (hCT) and glucagon as amyloidogenic peptides using solid state NMR. Monomer and fibril states during the fibril formation were separately observed by means of DD-MAS and CP-MAS NMR methods, respectively.  $^{13}\text{C}$  chemical shift values indicated that  $\alpha$ -helix changed to  $\beta$ -sheet structure in hCT, and  $\alpha$ -helix changed to  $\beta$ -sheet structure in the N- and C-terminal regions of glucagons. Fibril-formation kinetics were examined by looking at the time course of the CP-MAS NMR signals. The results indicated that amyloid fibril for these peptides explained by two step auto catalytic reaction mechanism. We further revealed that fibrillation rate of  $\text{L}_3\text{Y-hCT}$  was significantly decreased. In case of glucagons, fibrillation rate for nucleation step was increased while fibrillation rate for elongation step was decreased in the presence of lipids.

【序論】

アミロイド線維形成はアルツハイマー病や狂牛病などの神経細胞毒性の原因になると考えられており、この線維形成機構やさらには線維形成阻害機構を明らかにすることは病気の治療や予防の観点からも重要である。しかしながら、アミロイド線維は結晶を形成しないので、X-線回折法を用いることは容易でない。我々はこのアミロイド線維に対して固体 NMR の手法を適用することによって、線維構造に関する詳細な情報を提供することを示してきた。カルシトニン<sup>1</sup>は甲状腺で分泌されるペプチドホルモンであり破骨細胞に存在するカルシトニン受容体に作用してカルシウムの溶出を制御する働きをもつ。このカルシトニンは中性溶液中で容易にアミロイド様線維を形成することが知られている。我々の以前の研究から、カルシトニンは中央部で $\alpha$ - $\beta$  転移を起こして逆平行 $\beta$ -シート構造の線維を形成することを明らかにした。本研究ではカルシトニンの Phe を Leu に換えた  $\text{L}_3\text{Y-hCT}$  変異体において線維形成速度の変化を観測し、Phe を変えることによる阻害効果を検証した。また、グルカゴンはすい臓のランゲルハンス島で分泌される血糖値の上昇に関与するペプチドホルモンである。このグルカゴンも溶液中で容易にアミロイド様線維形成することが知られている。

化学シフト、原子間距離、アミロイド線維、カルシトニン、グルカゴン

ないとう あきら、だいどうじ けんご、ふじた ひでき、いとう ひかり、やまね いずみ、かわむら いずる

グルカゴンに関しては水溶液中と脂質膜存在下での線維機構を固体 NMR により解析し、生理条件に近い脂質の存在が線維構造や線維形成機構にどのように影響を与えるかを合わせて検証する。

### 【実験】

カルシトニン・変異体カルシトニン(L<sub>3</sub>Y-hCT; Y12L/F16L/F19L/F22Y-hCT)・グルカゴンは固相法により化学合成を行い、逆相クロマトグラフィーにより精製して得た。この精製ペプチドをカルシトニンに関しては pH3.3 と pH7.5、グルカゴンに関しては pH3.3 の緩衝液に溶かして線維形成を開始した。溶液試料は固体 NMR 測定用のジルコニア試料管に封入して NMR 測定を開始した。固体 NMR 測定には線維形成前のモノマーの状態に対しては 1 パルス励起とプロトンデカップリングを組み合わせた DD-MAS 法を用い、線維状態の測定に対しては交差分極とデカップリングを組み合わせた CP-MAS 法により線維の信号を分離して観測した。

### 【結果と考察】

#### 線維形成に伴う構造転移の観測

DD-MAS 法および CP-MAS 法により観測したカルシトニンおよびグルカゴンのモノマー状態および線維状態の二次構造情報を同位体標識した <sup>13</sup>C 等方化学シフト値の 2 次構造相関から構造変化を決定し (Fig. 1)、Table 1 に結果をまとめて示す。WT-hCT においては中性では分子中央部において  $\alpha$ -ヘリックス構造が  $\beta$ -シート構造に転移することが分かった。一方、酸性においては C-末端部まで  $\beta$ -シートの領域が広がることが判明した。グルカゴンに関しては N-末端および C-末端では  $\alpha$ -ヘリックス構造が  $\beta$ -シート構造に転移したが、分子中央部はモノマーおよび線維の両状態においてランダムコイルであり構造を形成しない状態であることが分かった。さらに、脂質が共存している場合には N-末端部位の  $\alpha$ -ヘリックス構造は線維を形成しても保存されることが分かった。

#### アミロイド形成ペプチドの線維形成機構

アミロイド線維形成の過程を CP-MAS 信号の成長から観測した。この結果、線維成長は一定の遅延時間の後に信号強度が成長する時間変化を示した。このような信号成長の過程を線維がモノマー状態からミセルを形成し、このミセルから線維の核ができる核形成と過程を経て、次にモノマーが核に結合して線維が成長する反応機構において核形成と線維成長を律速段階とする 2 段階自己触媒反応として動力学的解析を行った (Fig. 2)。この結果、カルシトニン、L<sub>3</sub>Y-hCT、グルカゴン、グルカゴン (脂質存在下) におけるそれぞれの核形成反応の速度定数( $k_1$ )、および線維成長の速度定数( $k_2$ )をそれぞれ分離して決定することができた。これらの値を WT-hCT[1]、D75N-hCT[2] の値とともに Table 2 にまとめて示す。WT-hCT において pH7.5 と pH3.3 を比較したところ、核形成速度( $k_1$ )は pH によって変化はなかったものの、中性に比べて酸性の方が、線維成長速度( $k_2$ )は 1000 倍も遅くなることが分かった。この結果は Asp15 の電荷の変化によることが考えられるが、D15N-hCT においても中

Table 1.  $^{13}\text{C}$  chemical shifts (ppm from TMS) of hCT and glucagons, and their secondary structure

Sample	Condition	Group	Monomer	Fibril
hCT	pH7.5	Gly10 C=O	171.8 ( $\alpha$ -helix)	169.1 ( $\beta$ -sheet)
	pH3.3	Gly10 C=O	171.8 ( $\alpha$ -helix)	168.8 ( $\beta$ -sheet)
L <sub>3</sub> Y-hCT	pH7.4	Gly10 C=O	172.0 ( $\alpha$ -helix)	169.7 ( $\beta$ -sheet)
	pH3.3	Gly10 C=O	172.0 ( $\alpha$ -helix)	169.7 ( $\beta$ -sheet)
Glucagon	pH3.3	Gly4 C=O	171.7 ( $\alpha$ -helix)	169.2 ( $\beta$ -sheet)
	pH3.3	Ala19 CH <sub>3</sub>	16.4 ( $\alpha$ -helix)	21.0 ( $\beta$ -sheet)
Glucagon(L)*	pH3.3	Gly4 C=O	171.6 ( $\alpha$ -helix)	171.6 ( $\alpha$ -helix)
	pH3.3	Ala19 CH <sub>3</sub>	16.5 ( $\alpha$ -helix)	19.3 ( $\beta$ -sheet)

\* Glucagon in the presence of lipids

Table 2. Rate constants,  $k_1$  and  $k_2$  in a two step autocatalytic reaction mechanism for the fibril formation of hCT and glucagons.

Sample	Condition	$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	Ref.
hCT	pH 7.5	$2.8 \times 10^{-6}$	2.2	[1]
hCT	pH 3.3	$3.3 \times 10^{-6}$	$2.4 \times 10^{-3}$	[1]
D75N-hCT	pH 7.2	$1.6 \times 10^{-5}$	5.5	[2]
D75N-hCT	pH 2.9	$6.2 \times 10^{-7}$	$5.4 \times 10^{-3}$	[2]
L <sub>3</sub> Y-hCT	pH 7.5	$5.9 \times 10^{-8}$	$1.5 \times 10^{-2}$	This work
L <sub>3</sub> Y-hCT	pH 3.3	$2.4 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{-3}$	This work
Glucagon	pH 3.2	$3.3 \times 10^{-8}$	$1.7 \times 10^{-2}$	This work
Glucagon (with lipids)	pH 3.2	$1.2 \times 10^{-5}$	$4.0 \times 10^{-5}$	This work

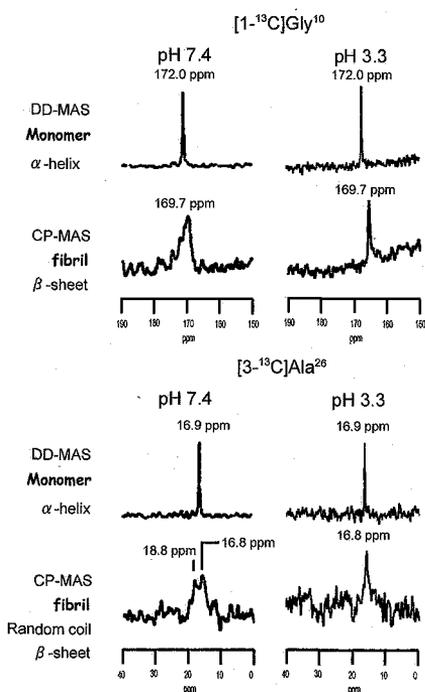


Fig. 1.  $^{13}\text{C}$  DD-MAS and CP-MAS NMR spectra of  $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ ,  $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ - L<sub>3</sub>Y-hCT

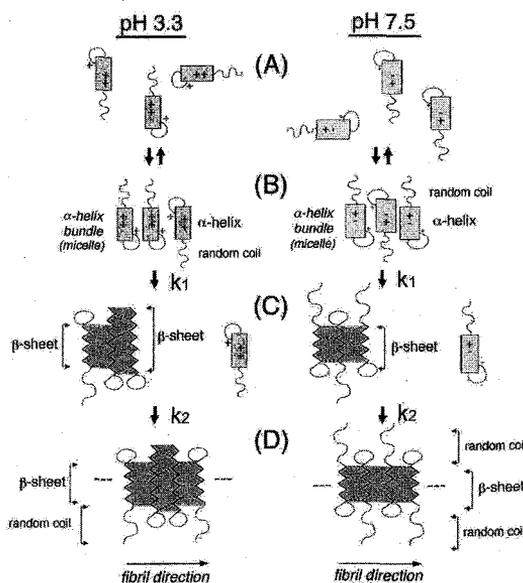


Fig. 2. Fibrillation mechanism of hCT at pH 3.3 and 7.5. (A) hCT monomers; (B) micelles; (C) nuclei; (D) fibrils

性と酸性における速度定数の変化は WT-hCT とほぼ同じであったことから、Asp の電荷は線維成長反応に大きな影響を与えていないことが分かった。

#### アミロイド線維形成阻害機構

Table 2 において中性の場合について WT-hCT と L<sub>3</sub>Y-hCT の反応速度定数を比較してみると線維成長反応においては 1000 倍遅くなっていることが判明した。我々の以前の研究では原子間距離を精密に測定して線維構造を決定し、ベンゼン間の $\pi$ - $\pi$ 相互作用が形成していることを明らかにした[3]。したがって L<sub>3</sub>Y-hCT で線維成長速度が遅くなった理由として $\pi$ - $\pi$ 相互作用の減少が関与していると考えられる。次にグルカゴンについて脂質の非存在下と存在下における線維形成速度定数を比較したところ、脂質が存在した場合、線維核形成速度は速くなったが、逆に線維成長速度は遅くなった。グルカゴンは膜表面に結合する性質があるので、膜表面で 2 次元的に濃縮される結果、核形成速度は速くなったと考えられる。線維成長段階では核で形成された鑄型にモノマーが結合して線維が成長するが、この鑄型につく線維構造は膜表面で形成される核の鑄型が溶液中で形成される核の鑄型より不安定であるため線維形成速度は遅くなったと考えられる。

#### 【まとめ】

固体 NMR の手法を用いることによって、アミロイド線維形成ペプチドの線維形成機構と線維形成阻害機構に関して詳細な情報を得ることができた。カルシトニンに関しては分子コアーにおいて $\alpha$ -ヘリックスから $\beta$ -シート構造への構造転移が観測された。さらに分子内においてベンゼン環の数をへらすことによって $\pi$ - $\pi$ 相互作用が減少し線維形成が阻害されることが明らかになった。グルカゴンに関しては水溶液中では N-末端と C-末端において $\beta$ -シート構造を持つ繊維が形成される。一方、脂質が存在する場合 N-末端が $\alpha$ -ヘリックスで C-末端が $\beta$ -シートの線維構造になることが判明した。そして脂質が存在すると、グルカゴンと脂質の相互作用のために核形成は速くなり線維成長速度は遅くなることが判明した。細胞毒性はプロトフィブリルの方が強いことが報告されているが、今回の結果は細胞膜がプロトフィブリルの生成を促進する可能性を示唆する点で重要である。

#### 【文献】

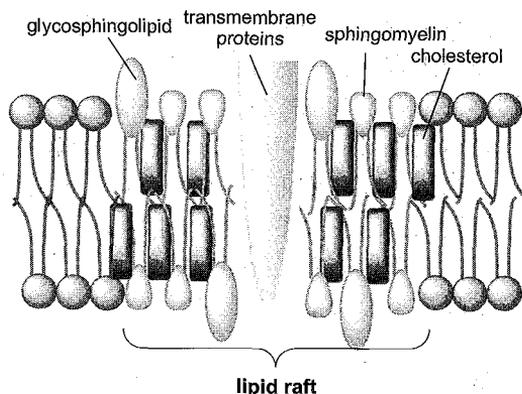
- [1] M. Kamihira, A. Naito, S. Tuzi, A.Y. Nosaka, H. Saitô, *Protein Sci.* 9 (2000) 867-877.
- [2] M. Kamihira, Y. Ohshiro, S. Tuzi, A.Y. Nosaka, H. Saitô, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2859-2865.
- [3] A. Naito, M. Kamihira, R. Inoue, H. Saitô, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 247-257.

**Studies on intermolecular interactions in lipid rafts using solid-state NMR***Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University*Nobuaki Matsumori, Hiroki Okazaki, Kohei Nozu, Tohru Oishi, and Michio Murata

Sphingomyelin and cholesterol are known to form domains called lipid rafts in biological membranes. Lipid rafts are shown to play roles in numerous biological functions such as signal transductions. However, details on the molecular recognitions in lipid rafts have yet to be revealed. In the present work, we prepared  $^{13}\text{C}$ - or  $^{19}\text{F}$ -labeled sphingomyelin and  $^{19}\text{F}$ -labeled cholesterol, and measured intermolecular distances in lipid rafts using the  $^{13}\text{C}$ - $^{19}\text{F}$  REDOR method. In addition,  $^2\text{H}$ -labeled sphingomyelin was also synthesized and subjected to  $^2\text{H}$  solid-state NMR to determine the mobility and orientation of sphingomyelin when forming lipid rafts.

脂質ラフトはスフィンゴミエリン(SM)およびコレステロールを主成分とする細胞膜ドメインであり、周囲の細胞膜とは異なる相状態を有している(Fig. 1)。この脂質ラフトは、特異的に集積した膜タンパク質を介したシグナル伝達のプラットフォームとして機能していると考えられている。しかし、脂質ラフトは形成と離散を繰り返しているため、分子レベルでの相互作用解析はほとんど行われていない。そこで本研究では、SMとコレステロール間の相互作用解析を目指し、 $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR法による分子間距離測定を行った。また、ラフト形成時におけるSMの運動性および配向についても重水素NMRを用いて検討を行ったので、併せて報告する。

SMとコレステロールの相互作用において、SMのアミド部分とコレステロールのOH基との水素結合の重要性が指摘されている。そこで、 $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ REDOR法の適用に



**Figure 1.** Schematic illustration of a lipid raft.

キーワード：脂質ラフト、重水素 NMR、REDOR、スフィンゴミエリン、コレステロール

まつもりのぶあき、おかざきひろき、のづこうへい、おおいしとおる、むらたみちお

際して、SMアミド炭素を $^{13}\text{C}$ 標識したSM(1)および6位をフッ素標識したコレステロール(2)を合成した(Fig. 2a)。同様に2位にフッ素を導入したSM(3)も調製し、市販の $4\text{-}^{13}\text{C}$ コレステロール(4)とのREDOR測定を検討した(Fig. 2b)。この際、フッ素標識体である2および3については、非標識体と同等のラフト形成能を有することを確認した。これら標識体についてFig. 2aおよび2bの組み合わせでREDOR測定を行った結果、 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ の低温下においても有意なREDORを観測できなかった。これは、ラフトにおいてこれらの標識原子間の距離が比較的遠い可能性を示唆している。現在スフィンゴシン骨格部分に標識を導入した標識体を調製しREDOR測定を検討している。

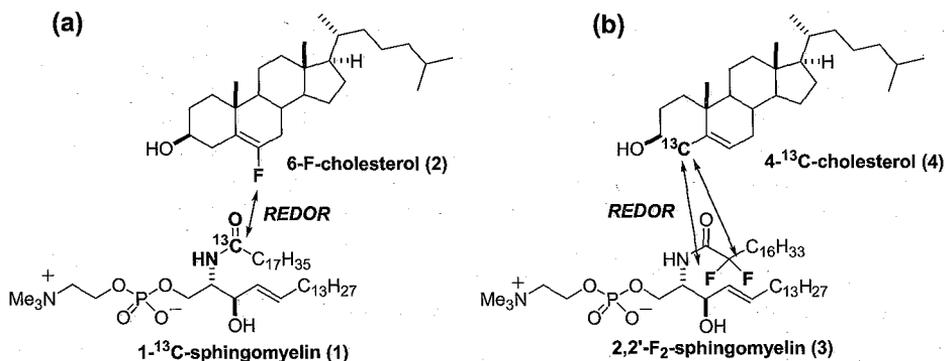


Figure 2.  $^{13}\text{C}$ - or  $^{19}\text{F}$ -labeled cholesterol and SM, and their combinations for REDOR measurements.

次に、ラフトにおけるSMの運動性および配向に関する情報を得るために、アシル鎖の2位に重水素を2つ導入した標識体(5)を調製した。この標識体を用いて脂質膜を調製し、コレステロールの有無による四極子分裂幅の変化を観測した(Fig. 3)。その結果、コレステロールが存在する場合、すなわちラフト相においては、液晶相と比べ2つの四極子分裂の比が大きくなっていった。これは、ラフト相において分子回転軸に対するアシル鎖部分の傾きが大きくなったことを示唆している。現在さらに詳しい運動性や配向情報を得るために、標識体1の $^{13}\text{C}$ 化学シフト異方性の測定も検討している。

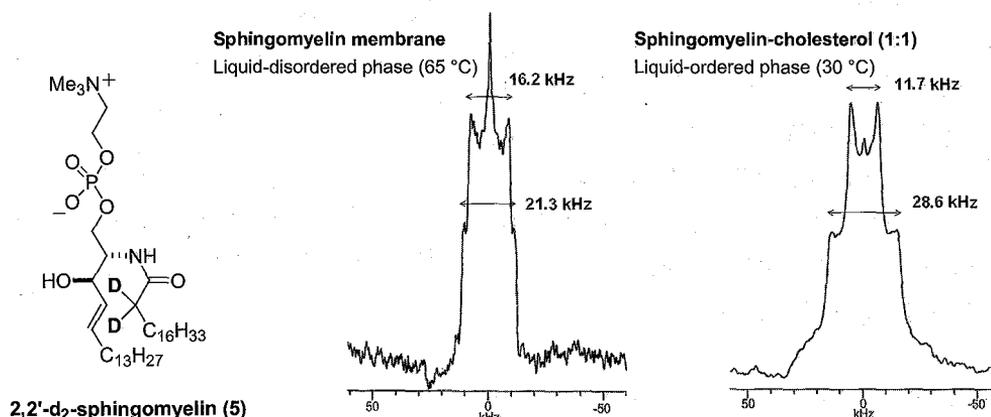


Figure 3.  $^2\text{H}$  NMR spectra of deuterated sphingomyelin in the presence and absence of cholesterol.

# 固体 NMR によるポリグルタミン酸金属錯体の構造研究

北大院工<sup>1</sup>・日鐵テクノサーチ<sup>2</sup>・新日本製鐵先端研<sup>3</sup>

○藤江正樹<sup>1</sup>・畠山盛明<sup>2</sup>・齋藤公児<sup>3</sup>・平沖敏文<sup>1</sup>

## Metal ion Complexes of Poly(D-glutamic acid) by solid state NMR

Graduate School of Engineering, Hokkaido University<sup>1</sup>,

Nippon Steel Techno Research<sup>2</sup>,

Nippon steel Corporation Advanced Technology Research Lab<sup>3</sup>.

Masaki FUJIE<sup>1</sup>, Moriaki HATAKEYAMA<sup>2</sup>, Koji SAITO<sup>3</sup> and Toshifumi HIRAOKI<sup>1</sup>

The conformation of poly(D-glutamic acid)-metal ion complexes with Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and La<sup>3+</sup> was characterized by <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectroscopy. All complexes prepared in ambient temperature have an  $\alpha$ -helical conformation as judged from the chemical shift values of the main-chain carbon resonances. The chemical shift values of C <sub>$\gamma$</sub>  and C <sub>$\delta$</sub>  resonances depend on the ionic radius of the metal ion used. <sup>25</sup>Mg MAS and MQMAS NMR experiments were carried out in order to understand the local structure of metal binding site on Mg-PGA. Their spectra show the presence of two different binding sites.

【序論】ポリペプチドは様々な規則構造をとることが知られている。Keithらはポリグルタミン酸(PGA)の側鎖にMg、Ca、Ba、Srが結合した錯体の固体構造をX線回折、電子線回折により調べ、Mg-PGAは $\alpha$ -helix、その他のPGA金属錯体は $\beta$ -sheetであることを示した。<sup>(1)</sup>この構造の差は用いた金属のイオン半径に起因すると考えられている。本研究では試料の調製温度に着目し、イオン半径の異なる幾つかの金属イオンが結合したPGA金属錯体の二次構造を<sup>13</sup>C CP/MAS NMRにより検討した。またMg-PGAの金属結合部の構造を直接調べるため、<sup>25</sup>Mg MAS NMR及びMQMAS NMR測定をおこなった。

【実験】Na-PGAとその10倍量の金属イオンからなる混合水溶液を、(a)室温でエタノールを加えて沈殿させて得た試料(室温調製)と、(b)90℃まで加熱し、その後冷却して得られた試料(90℃調製)を用いた。また<sup>25</sup>Mg MQMAS NMR測定のため、99%濃縮の<sup>25</sup>Mgを用いてMg-PGAを作製した。固体<sup>13</sup>C CP/MAS NMRは<sup>13</sup>C共鳴周波数を75MHz(7.05T)でおこなった。90°パルスは3.5 $\mu$ s、MAS速度は4kHzである。<sup>25</sup>Mg MQMAS NMRは共鳴周波数42.9MHz(16.4T)で測定した。

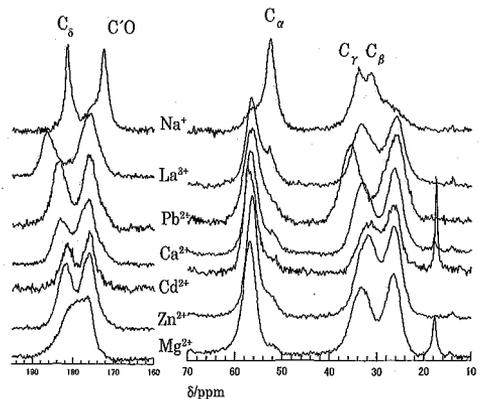


Fig.1 <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectra of PGA-metal ion complexes prepared in ambient temperature.

keyword: Poly(glutamic acid), MQMAS, metal ion

○ふじえ まさき、はたけやま もりあき、さいとう こうじ、 ひらおき としふみ

【結果・考察】(1)  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR

室温調製試料の  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR スペクトルを Fig.1 に示す。ランダムコイル構造をとる Na-PGA に比べ、 $^{(2)}\text{PGA}$  金属錯体主鎖の  $\text{C}_\alpha$ 、 $\text{C}'$  のシグナルは低磁場側へ、側鎖の  $\text{C}_\beta$  のシグナルは高磁場側へ変化した。これは室温調製の試料は全て  $\alpha$ -helix 構造をとることを示している。また Fig.2(a)、(b) にそれぞれ、イオン半径と  $\text{C}_\gamma$ 、 $\text{C}_\delta$  の化学シフトとの関係を示す。この結果は側鎖  $\text{C}_\gamma$  と  $\text{C}_\delta$  の化学シフト値は金属イオン半径に依存して変化することを示している。一方、 $90^\circ\text{C}$  調製の試料では金属イオン種に応じて、 $\alpha$ -helix 構造またはランダムコイル構造をとることがわかった。これらの結果は PGA 金属錯体の二次構造は試料調製温度に依存することを示している。

(2)  $^{25}\text{Mg}$  MQMAS NMR

金属結合部の構造を明らかにするため  $^{25}\text{Mg}$  NMR 測定をおこなった。Fig.3 に示すように  $^{25}\text{Mg}$  MAS NMR スペクトルは、 $-13.1\text{ppm}$  に裾が広い比較的シャープなピークが観測された。Fig.4 に示す  $^{25}\text{Mg}$  3QMAS NMR スペクトルには、 $\delta_{CS} = -12.2\text{ppm}$  と  $\delta_{CS} = -0.2\text{ppm}$  に2つのピークが観測された。これらの四極子結合定数  $C_Q$  はそれぞれ  $1.6\text{MHz}$  と  $2.8\text{MHz}$  である。従って、Mg-PGA には2つの異なる Mg 結合状態があることが示唆された。

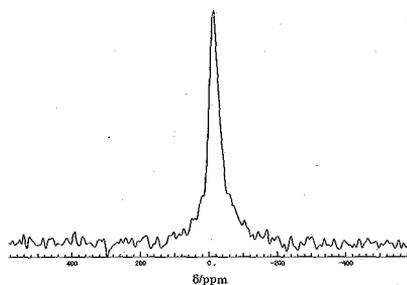


Fig.3 1D  $^{25}\text{Mg}$  MAS NMR spectra of  $^{25}\text{Mg}$ -PGA.

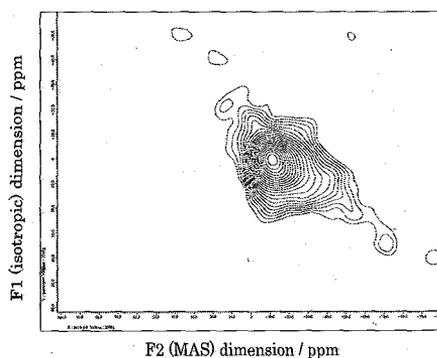


Fig.4  $^{25}\text{Mg}$  3QMAS NMR spectra of  $^{25}\text{Mg}$ -PGA..

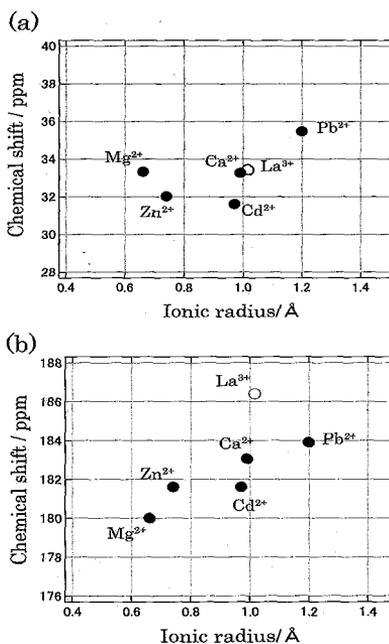


Fig.2 Metal-ion radius dependence of chemical shift values of (a)  $\text{C}_\gamma$  and (b)  $\text{C}_\delta$ .

References

- (1) H. D. Keith, G. Giannoni, and F. J. Padde, *Biopolymers*, 7, 775(1969).
- (2) H. Pivcova, V. Saudek, P. Schmidt, D. Hlavata, and J. Plestil, *Polymer*, 28, 991(1987).

## P072 エラストマーの固体高分解能NMRスペクトルに及ぼすMAS速度の効果

(防大応化) 浅野敦志、○堀俊祐、黒津卓三、  
(バリアンテクノロジーズジャパン) 芦田淳

### Effect of MAS Speed on Solid-State High-Resolution NMR Spectra of Elastomers

Atsushi Asano<sup>1</sup>, Shunsuke Hori<sup>1</sup>, Takuzo Kurotsu<sup>1</sup>, Jun Ashida<sup>2</sup>

1: Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Japan

2: Varian Technologies Japan Ltd.

When we apply a high speed MAS (magic-angle spinning) technique to observe solid-state NMR spectra of an elastomer, the observed  $^1\text{H}$  or  $^{13}\text{C}$  NMR spectra will show a very narrow line shape like a liquid state because the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  or  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction is relatively weaker than the usual solid polymers: high-speed MAS reduces effectively the weakened dipolar interactions. Nowadays, we can use the probe that rotor can be spun over 60kHz. However, the temperature of the sample increases greatly under such a high speed MAS. Therefore it is important and significant whether the narrowing of a solid-state NMR peak under high speed MAS is due to the reduction of dipolar interaction caused by temperature, that is the increasing of molecular motion, or simply MAS effect. In this study, we investigated the cause of the narrowing.

【はじめに】固体高分解能 $^{13}\text{C}$  NMR法を用いて固体高分子を測定する場合、通常は炭素の化学シフト異方性を除去するため、高速MAS法を用いる。一方、エラストマーやゴムといった固体高分子のなかでも運動性の良い材料では、C-H間やH-H間の双極子相互作用が比較的弱い。したがって高速MAS法において、MAS速度を上げるとデカップリング効果が働き、通常の固体高分子ではあまり顕著ではない線幅の先鋭化が容易におきる。その結果 $^{13}\text{C}$ ならびに $^1\text{H}$  NMRスペクトルは溶液状態と同程度の線幅になることが期待される。近年、25kHz程度までの固体NMR用プローブは容易に購入可能となり、また最近では60kHzの超高速回転を誇るプローブも開発され市販されるに至っている。しかしながら、高速MASを行うと空気との摩擦熱により試料が感じる温度が急速に上昇する。エラストマーのガラス転移点は室温より十分低く、温度上昇に伴い運動性は高くなり線幅が先鋭化すると考えられる。つまり、線幅の先鋭化が高速MASの影響なのか温度上昇の効果なのか区別する必要がある。そこで本研究では、エラストマー系材料のNMRピーク線幅に与えるMAS速度と温度との影響を検討した。実験はVarian NMR systems 400MHz WB型を用いて、スチレンーブチレンラバー(SBR)の $^1\text{H}$ と $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルならびにそれら核種の $T_1$ の測定を温度とMAS速度を変えながら行った。またローター径は3.2mmφのローターを用いた。

Keywords : 高速MAS, 固体高分解能 NMR, エラストマー

著者ふりがな : あさのあつし、ほりしゅんすけ、くろつたくぞう、あしだじゅん

【結果と考察】 図1にSBRの25℃、35℃、50℃で測定した $^{13}\text{C}$  DDMAS NMR スペクトルと $^1\text{H}$  MAS NMRスペクトルを示した。MAS速度は5kHz、10kHz、15kHz、20kHz、25kHzである。図1左の $^{13}\text{C}$ スペクトルから、MAS=5kHz下の室温(25℃)で得られたスペクトルは固体特有のブロードなシグナルとして観測されていることがわかる。しかしMAS速度を上げるにつれて線幅は徐々に先鋭化し、MAS=25kHzにおいては溶液状態の線幅に迫るほどシャープになっていることがわかる。 $^{13}\text{C}$ スペクトルの観測におけるデカップリングパワーは、すべて120kHzで行っている。このデカップリング強度はSBRに対しては、C-H双極子相互作用を効果的に減少させるに十分強力である。図1の右側には、同様に温度とMAS速度を変えて測定した $^1\text{H}$  NMRスペクトルを示した。このスペクトルも通常の固体高分子に比べれば、はるかに先鋭化したピークとして観測されていることがわかる。 $^1\text{H}$  NMRスペクトルの先鋭化は、高速MASによるH-H双極子相互作用の減少が最もよく働いていると考えられる。もちろん室温に設定された雰囲気中においてもMAS速度の上昇につれて、サンプルが実際に感じる温度は上昇しており、そのためSBRの分子運動性が極端によくなったとも考えられる。このことは $^{13}\text{C}$ 、 $^1\text{H}$ スペクトルどちらも、50℃においてMAS=5kHzで測定したスペクトルと25℃でMAS=20kHzで測定したスペクトルが類似していることから類推できる。この点については現在、温度校正をおこなっており、NMR討論会において議論する。また、緩和時間の測定から温度の影響と高速MASによるエラストマーの分子配向の効果とを議論する。さらに $^1\text{H}$ デカップリング強度についても言及する。

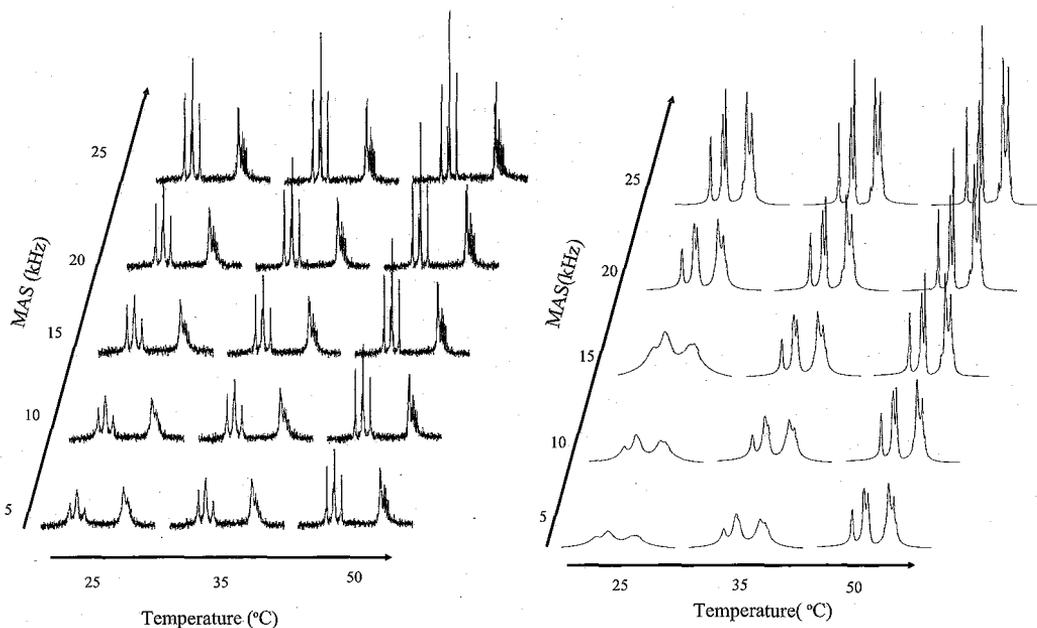


Figure 1.  $^{13}\text{C}$  DDMAS (left) and  $^1\text{H}$  MAS (right) NMR spectra at MAS = 5, 10, 15, 20, and 25 kHz. The observed temperatures are 25, 35, and 50 C. The temperature is not calibrated but shows each regulated value.

## PBLA の二次構造転移の研究：

高速 SASS 法による  $^{13}\text{C}$  化学シフト異方性の測定○神原 孝之<sup>1</sup>、水野 敬<sup>2</sup>、中西 梓<sup>1</sup>、竹腰 清乃理<sup>1</sup>、莊司 顕<sup>3</sup><sup>1</sup>京都大学大学院理学研究科、<sup>2</sup>日本電子(株)、<sup>3</sup>群馬大学工学部生物化学工学科

Solid-State  $^{13}\text{C}$  NMR studies on conformational transformation of Poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) : measurements of the  $^{13}\text{C}$  chemical shift anisotropy using high-speed Switching-Angle Sample-Spinning spectroscopy

Takayuki Kamihara<sup>1</sup>, Takashi Mizuno<sup>2</sup>, Kiyonori Takegoshi<sup>1</sup>, and Azusa Nakanishi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, <sup>2</sup>JEOL Ltd.

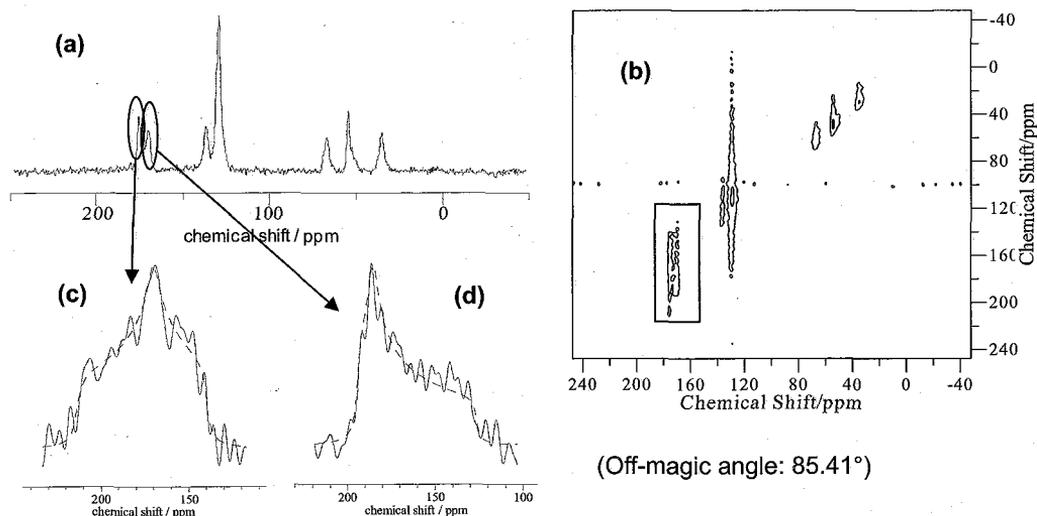
Investigations of irreversible conformational transformation of poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PBLA) with heat treatments have been done by x-ray diffraction and solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR. In this work, we apply high-speed Switching-Angle Sample-Spinning spectroscopy (SASS) to determine chemical shift anisotropies in PBLA under transformation.

生体高分子の不可逆的な構造転移は、物理化学的にも医学・生物学的にも興味深い研究対象である。ポリ- $\beta$ -ベンジル-L-アスパルテート(PBLA)については、加熱により不可逆的に二次構造が転移することが知られており、これまでにX線回折や固体 $^{13}\text{C}$  NMRを用いた、二次構造転移の研究が行われている[1]。我々はこれまでに、一定時間の加熱後に瞬間的に冷却したPBLA試料の $^{13}\text{C}$ 固体高分解能NMRを行い、化学シフト等方値で区別された異なる二次構造の分率を決定し、転移の時間変化を追跡する研究を行ってきた[2]。しかし、等方値のみを手がかりにしたスペクトル解析では、異なる二次構造の混在状況や、二次構造のローカルな分布状況について、やや恣意的な仮定を置かざるを得ない。また、帰属に関しても不確かさが残る。そこで我々は、化学シフト異方性(CSA; chemical shift anisotropy)の情報を高速SASS(Switching Angle Sample Spinning)法[3]を用いて決定する。ここで用いられる二次元 $^{13}\text{C}$ -SASS法では、1次元目で試料回転角をoff-magic角にし、2次元目で試料回転角をmagic角に戻し、スケーリングされたCSAパウダーパターンを化学シフト等方値により分離する。SASS法は、化学シフト異方性に対するスケーリングファクターが他の方法と比べて大きいため、異方性の実験精度が高いという利点がある。本実験では、二次構造はほとんど $\alpha_{\text{R}}$ -helixをとっていることが知られている熱処理のないPBLAに対して、二次元SASS法を適用し、スペクトルを得た結果を示す。特に

---

キーワード：Poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate)、SASS法、二次構造転移、化学シフト異方性(CSA)  
 ○かみはらたかゆき、みずのたかし、たけごしきよのり、なかにしあずさ、しょうじあきら

異方性の大きい主鎖(Fig.1c)及び側鎖(Fig.1d)のカルボニル基の異方性について検討した。実験で得られたスペクトルに対して、線形解析シミュレーションを行い、化学シフト異方値を最小二乗フィッティングにより得ることができた(Table.1)。シミュレーションで得られた線形は、実験で得られたものと良く一致している。今後、他の二次構造( $\omega$ -helix、 $\beta$ -sheet、 $\alpha_L$ -helix)をとっているとされる熱処理サンプルに対して、同法による CSA の測定を行い、得られたデータを基に分子モデルを構築し、PBLA の二次構造転移の詳細な検討を行う。



**Fig.1** (a)  $^{13}\text{C}$  SASS-NMR 1D spectrum of PBLA., (b)  $^{13}\text{C}$  SASS-NMR 2D spectrum of PBLA., (c) The cross-section spectra at  $\sigma_{\text{iso}}=169.7$  ppm(main chain C=O), (d) The cross-section spectra at  $\sigma_{\text{iso}}=175.0$  ppm(side chain C=O).; solid line: experimental lineshape, broken line: calculated lineshape

**Table.1** Comparison of chemical shift parameters of  $\alpha_R$ -helical PBLA.

化学シフト/ppm	$\sigma_{11}$	$\sigma_{22}$	$\sigma_{33}$	$(\sigma_{11}+\sigma_{22}+\sigma_{33})/3$	$\sigma_{\text{iso}}$ (MASでの値)	(文献値[1])
主鎖 C=O	245.52	183.72	94.97	174.74	175.3	174.9
側鎖 C=O	254.75	134.86	116.31	168.64	169.8	167.0

[参考文献]

- [1] 『高分子の固体NMR』安藤 勲 編 pp.127-131
- [2] A. Nakanishi, et al., 第45回 NMR 討論会要旨集、pp.336-337 (2006)
- [3] T. Mizuno, et al., *J. Magn. Reson.* **171**,15-19 (2004)

## Poly(methyl propiolate)の動的構造の研究

北大院工、室蘭工大\* ○荒樋周・鈴木晃生・馬渡康輝\*・田畑昌祥\*・平沖敏文

## Dynamics Structure of Poly(methyl propiolate) Studied by Solid State NMR

*Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo*

*\*Support Organization for Education & Research, Muroran Institute of Technology*

Shu ARAHI, Kouo SUZUKI, Yasuteru MAWATARI\*, Masayoshi TABATA\*  
and Toshifumi HIRAOKI

Poly(methyl- $d_3$  propiolate) were characterized by  $^2\text{H}$  NMR spectroscopy. Their spectra and  $T_1$  values indicate that the methyl group of poly(methyl- $d_3$  propiolate) reorients fast 3-site jump about the  $C_3$  axis, and that the additional side-chain motions are appeared above 85 °C. Thermal isomerization from cis-transoid to trans-transoid, which produced simultaneously radicals, was detected in the  $^{13}\text{C}$  CP/MAS spectra after the heating process.

<諸言> Rh 触媒により重合した置換ポリアセチレンは cis-transoid 構造をもち、その主鎖はラセン構造をとると推定される立体規則性高分子である。置換ポリアセチレンのうち側鎖にエステルをもつポリプロピオレートもラセン構造をとると推定されるが、そのダイナミクスは不明である。本研究では側鎖メチル基を重水素化した poly(methyl- $d_3$  propiolate)の動的構造を、主に固体重水素 NMR を用いて検討した。

<実験> methyl- $d_3$  propiolate 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 時間重合して、目的の高分子を得た。 $^2\text{H}$  NMR 測定は Bruker DSX300 (46MHz) を用い行い、スペクトルと  $T_1$  の温度依存性を調べた。

<結果・考察> Fig.1 に poly(methyl- $d_3$  propiolate) (PMeP- $d_3$ ) のスペクトル温度依存性を示す。-122°Cでは、四重極分裂幅が 38.3kHz の軸対称な線形を示し、メチル基の速い  $C_3$  軸回転を示す。昇温に伴い分裂幅はわずかに減少するが線形はほとんど変化しない。20°Cでも分裂幅が 37.1kHz であった。154°Cでは分裂幅が 35.2kHz の軸対称な線形を示し、中央部に小さな等方成分が現れた。

速い  $C_3$  軸回転の理論的分裂幅は 41.7kHz なので、これらの結果は PMeP- $d_3$  のメチル基は速い  $C_3$  軸回転に加えて、半頂角20度くらいのコーンの中で速い libration していることを示している。

---

**Key Words:** poly(methyl propiolate) / dynamic structure / solid-state  $^2\text{H}$  NMR

○あらひしゅう、すずきこうお、まわたりやすてる、たばたまさよし、ひらおきとしふみ

Fig.2 に、PMeP-d<sub>3</sub> の T<sub>1</sub> の温度依存性を示す。重水素 NMR スペクトルの垂直成分のスピン-格子緩和時間 T<sub>1</sub> は平行成分のそれよりもほぼ二倍長く、メチル基の速い C<sub>3</sub> 軸回転が 3-site jump であることを示している。昇温に伴い T<sub>1</sub> は単調に増加し、約 85°C で極大値をとり、さらに高温では減少した。この結果は 85°C 以上の高温で、C<sub>3</sub> 軸回転に加えてメチル基自体の速い運動が存在していることを示している。高温でも線形は変化していないので、この運動は C<sub>3</sub> 軸に平行である C<sub>β</sub>-C<sub>γ</sub> 軸まわりの運動と考えられる。

T<sub>1</sub> 値から求めた C<sub>3</sub> 軸回転の回転相関時間は 300K で 2.2ps である。相関時間の温度依存性はアレニウス型になり、その活性化エネルギーは 6.0kJ/mol である。この値は主鎖がヘリックス構造を有する poly(β-methyl L-aspartate) の側鎖メチル基の値 6.8kJ/mol より少し小さい。得られた値を用いて求めた 3-site jump の T<sub>1</sub> の計算値を Fig.2 の実線で示した。

Fig.3 に、高温測定前後における PMeP-d<sub>3</sub> の室温で測定した <sup>13</sup>C CP/MAS NMR スペクトルを示す。高温測定後のスペクトルには、C<sub>γ</sub> の低磁場側に新たなピークが観測された。さらに C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub>, C<sub>ε</sub> の線幅が広幅化した。この結果は、高温測定の際に cis-transoid 構造から trans-transoid 構造へと熱異性化が起き、同時にラジカルが生じたことを示している。この試料の溶液 <sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいてもシグナルの広幅化が観測され、ラジカルの生成が確認できた。

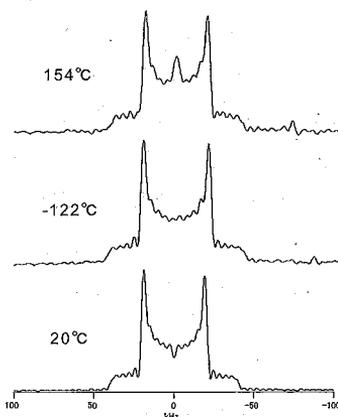


Fig. 1. <sup>2</sup>H NMR spectra of PMeP-d<sub>3</sub>

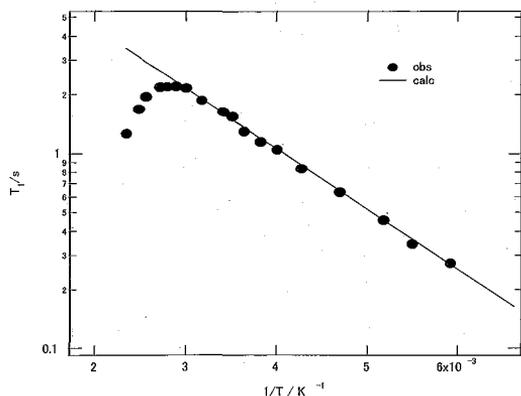


Fig. 2. Temperature dependent T<sub>1</sub> of PMeP-d<sub>3</sub>

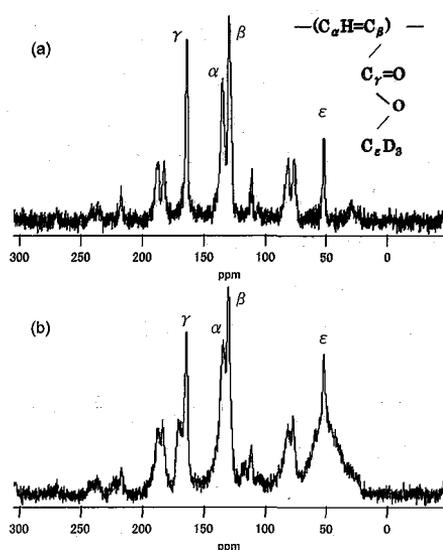


Fig. 3. <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectra of PMeP-d<sub>3</sub> before (a) and after (b) heating process

P075 固体高分解能NMRによる微生物産生高分子ポリ(ε-L-リジン)／  
カルボキシメチルセルロースブレンドフィルムの分子構造解析

福井大院工<sup>1</sup>, 徳島大工<sup>2</sup>, 金沢大院自然<sup>3</sup>  
前田史郎<sup>1</sup>, ○加藤久美子<sup>1</sup>, 佐々木千鶴<sup>2</sup>, 国本浩喜<sup>3</sup>

**Molecular Structure Analysis of Microbial Poly(ε-L-Lysine)/Carboxymethyl Cellulose  
Blend Films by High-Resolution Solid-State NMR**

Shiro Maeda\*<sup>1</sup>, Kumiko Kato<sup>1</sup>, Chizuru Sasaki<sup>2</sup>, and Ko-Ki Kunimoto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering,  
University of Fukui, Japan, <sup>2</sup>Department of Life System, Institute of Technology and Science,  
The University of Tokushima, Japan, and <sup>3</sup>Division of Applied Science, Graduate School of  
Natural Science and Technology, Kanazawa University, Japan

Microbial poly(ε-L-Lysine) (ε-PL) is a product of a variant of *Streptomyces albulus*, having amide linkage between ε-amino and α-carboxyl group. ε-PL is biodegradable, antibiotic and water soluble. Due to antibacterial activities against a broad spectrum of microorganisms, ε-PL has found application as a preservative for various food products. Carboxymethyl cellulose (CMC) is also a biodegradable and water soluble polymer made from natural cellulose. Blending of ε-PL and CMC to make a polymer blend ε-PL/CMC may be an effective way of obtaining more useful characteristics and improving defects of both ε-PL and CMC. Molecular structure and phase structure of ε-PL/CMC were studied by using solid-state NMR.  $T_{1\rho}^H$  measurements of ε-PL/CMC=2/1 blend film show ε-PL and CMC are miscible in the blend films on a scale of 2-5 nm.

．【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) (Figure 1)は、天然に存在するポリアミノ酸のひとつであり、必須アミノ酸 L-リジンの α-カルボキシル基と ε-アミノ基がアミド結合で直鎖状に連なった結晶性高分子である[1]。ε-PL は抗菌性、生分解性、吸水性という特徴をもつ。しかし、平均重合度が 32 と小さく水溶性であるため、そのまま機能性材料として応用しにくい。そこで、私たちは、ε-PL の誘導体[2]、また種々の天然および合成高分子との複合体あるいはブレンドフィルムの創製を試みている。カルボキシメチルセルロース(CMC)は、生分解性、吸水性という特徴をもつ。この ε-PL と CMC をブレンドすることにより互いの欠点を補う新機能性材料の開発を目指し、<sup>13</sup>C および <sup>15</sup>N NMR を用いて分子構造解析を行った。

キーワード：ポリ(ε-リジン), 微生物産生高分子, 固体 <sup>13</sup>C NMR, 固体 <sup>15</sup>N NMR

まえだしろう, かとうくみこ, ささきちづる, くにもとこうき

【実験】 $\epsilon$ -PLは放線菌の一種 *Streptomyces albulus* が産生したものでありチツソ (株) から提供されたものである ( $M_n=4090$ ,  $T_m=172.8^\circ\text{C}$  and  $T_g=88^\circ\text{C}$ )。CMC-Na (ICN Biomedicals, viscosity of a 4% aqueous solution is 145cP)はそのまま用いた。固体高分解能  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  NMR スペクトル, ならびに  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  核磁気緩和時間は Chemagnetics CMX Infinity 300 を用いて, 室温で測定した。 $^{13}\text{C}$  化学シフトは, ヘキサメチルベンゼンのメチル炭素を Tetramethylsilane から 17.35ppm とした。 $^{15}\text{N}$  化学シフトは, グリシンを液体  $\text{NH}_3(25^\circ\text{C})$  から 32.5ppm とした。 $\epsilon$ -PL と CMC-Na を, それぞれ別々に蒸留水に溶解させた。それぞれ1時間攪拌した後、 $\epsilon$ -PL と CMC-Na の溶液を混合しさらに1時間攪拌した。テフロン製シャーレに混合水溶液をキャストし4日間自然乾燥させた後、3日間減圧乾燥して、透明で柔らかいブレンドフィルムを得た。

【結果と考察】Figure 2 に  $\epsilon$ -PL,  $\epsilon$ -PL/CMC=1/2, 1/1, 2/1 ブレンドフィルム, *N*-BOC- $\epsilon$ -PL の  $^{15}\text{N}$  NMR スペクトルを示す。*N*-BOC- $\epsilon$ -PL は、BOC (*t*-butoxy carbonyl) 基が  $\epsilon$ -PL の側鎖  $\alpha$ -アミノ基とアミド結合を形成している化合物であり、 $\alpha$ -アミド結合を持った化合物の例として比較のために用いた。*N*-BOC- $\epsilon$ -PL の 92ppm のピークは  $\alpha$ -NHCOO-に、119ppm のピークは  $\epsilon$ -NHCO に帰属した。1/1, 2/1 のブレンドフィルムのスペクトルの 90ppm に新しく現れたピークは  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> が CMC とアミド結合を形成したのではないかと考えられる。このピークと  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> のピーク強度比から、 $\epsilon$ -PL/CMC=2/1 ブレンドフィルムにおいて  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> の 25%がア

ミド結合を形成していると推定した。相溶性を評価するために  $T_{1\rho}^H$  を測定した。 $\epsilon$ -PL/CMC = 2/1 ブレンドフィルムの  $T_{1\rho}^H$  値はほぼ均一で、 $\epsilon$ -PL と CMC のホモポリマーの値の間であり、 $\epsilon$ -PL と CMC は 2-5nm のスケールで相溶していると考えられる。

#### 【引用文献】

- [1] S. Maeda, *et al.*, *J. Mol. Struct.*, **655**, 149-155 (2003)  
 [2] S. Maeda, *et al.*, *Polym. Bull.*, **53**, 259-267 (2005)

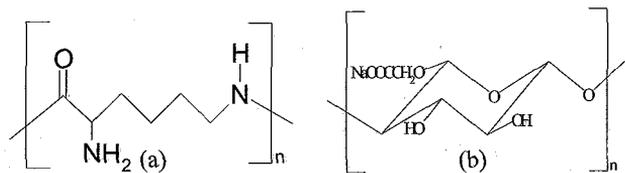


Figure 1. Chemical structure of (a) poly ( $\epsilon$ -L-lysine) and (b) carboxymethyl cellulose, respectively

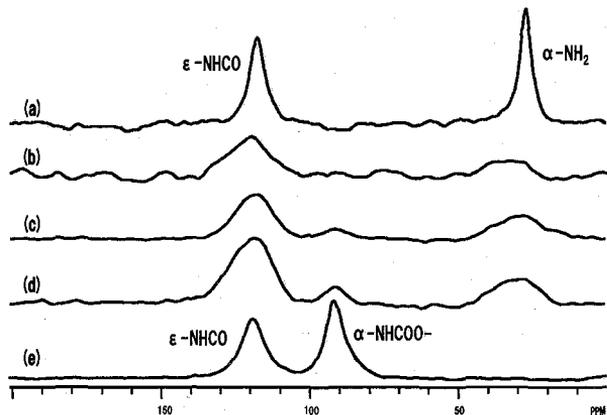


Figure 2.  $^{15}\text{N}$  NMR spectra of (a)  $\epsilon$ -PL powder, (b)  $\epsilon$ -PL/CMC=1/2 blend film, (c)  $\epsilon$ -PL/CMC=1/1 blend film, (d)  $\epsilon$ -PL/CMC=2/1 blend film, and (e) *N*-BOC- $\epsilon$ -PL.

# 固体 $^{15}\text{N}$ MAS NMR における $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$ リカップル法を用いた構造研究

京都大学大学院 理学研究科<sup>1</sup>、群馬大学大学院 工学研究科<sup>2</sup>

分子科学研究所 物質分子科学研究領域<sup>3</sup>

九州大学大学院 工学研究院<sup>4</sup>

○福地 将志<sup>1</sup>、竹腰 清乃理<sup>1</sup>、荘司 顯<sup>2</sup>、石塚 智也<sup>3</sup>、古田 弘幸<sup>4</sup>

## Structural analysis using solid-state $^{15}\text{N}$ MAS NMR with $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$ recoupling

Graduate School of Science, Kyoto University<sup>1</sup>, Faculty of Engineering, Gunma University<sup>2</sup>

Institute for Molecular Science<sup>3</sup>, Graduate School of Engineering, Kyushu University<sup>4</sup>

○Masashi Fukuchi<sup>1</sup>, K. Takegoshi<sup>1</sup>, Akira Shoji<sup>2</sup>, Tomoya Ishizuka<sup>3</sup>, and Hiroyuki Furuta<sup>4</sup>

Using  $^{15}\text{N}$  high-resolution solid-state NMR, structures of N-confused porphyrin (NCP) and polypeptides in the solid state were studied. With regard to NCP, a 1D  $^{15}\text{N}$  MAS experiment and a 2D DARR  $^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$  spin exchange experiment of N-confused tetratolylporphyrin (Tol) crystallized from  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /hexane indicate that Tol is the inner 3H-type tautomer and has two magnetically different molecules in the unit cell. Further, a FSLG-242  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolar recoupling NMR measurement indicates no fast ring flipping motion, which is consistent with a planar structure determined by an X-ray analysis. With regard to polypeptides, a PMLG-242 experiment, which is a variation of the FSLG-242, shows that the N-H distance in  $\beta$ -sheet is slightly longer than that in  $\alpha$ -helix, indicating difference in strength of hydrogen bond in these two secondary structures.

Hydrogen bonds in various organic compounds containing N nuclei play very important role in chemical/physical/biological properties. In this work, we report the results of  $^{15}\text{N}$  high-resolution solid-state NMR studies on 99%  $^{15}\text{N}$ -labeled N-confused tetratolylporphyrin (Tol; Ar = *p*-Tol in Fig. 1) and some  $^{15}\text{N}$ -labeled polypeptides.

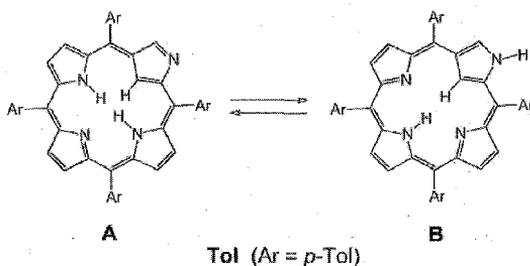


Fig.1 NH tautomers of N-confused porphyrin.

Figure 2 shows the 2D DARR exchange spectrum of Tol crystallized from  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /hexane with the DARR mixing time of 3 s. This spectrum shows cross peaks between the two peaks at 94.4 and 197.9 ppm, indicating that these two peaks are assigned to the inner

キーワード : Solid-state NMR,  $^{15}\text{N}$ , FSLG-242, Secondary structure, Disorder

著者ふりがな : ふくち まさし、たけごし きよのり、しょうじ あきら、  
いしづか ともや、ふるた ひろゆき

nitrogen nuclei; one is NH and the other is N. The two peaks at 265.0 and 283.0 ppm are assigned to the outer nitrogen nuclei. The absence of the cross peak between the two outer nitrogen nuclei indicates that these two  $^{15}\text{N}$  nuclei are not in close proximity. Thus, the Tol molecule in the crystal can be assigned to the A-tautomer.

Figure 3 shows the  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  recoupled spectrum using the FSLG-242 sequence, which enables us to determine the  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  distance under fast MAS. The experimental lineshape at 94.4 ppm is consistent with the calculated  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  dipolar-coupled lineshape using a  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  distance of 0.111 nm (the overlaid lineshape in Fig. 3). The obtained N-H distance of 0.111 nm is consistent with those estimated for related compounds by Langer et al.;<sup>1</sup> 0.110 nm in porphycene and 0.103 nm in porphyrin.

Concerning to polypeptides, we focused on a relation between hydrogen-bond distances and secondary structures. To evaluate N-H distances by measuring a  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  heteronuclear dipolar interaction, we firstly tried to use the FSLG-242 sequence, however, because of some limitation of our machine, a PMLG-242 experiment was used instead, which is a variation of the FSLG-242. Owing to distribution of local structure, it's difficult to determine an exact distance, nevertheless, the PMLG-242 experiments show that the N-H distance in  $\beta$ -sheet is slightly longer than that in  $\alpha$ -helix, indicating difference in strength of hydrogen bond in these two secondary structures.

## REFERENCE

- [1] Langer U, Hoelger C, Wehrle B, ppm.  
Latanowicz L, Vogel E, Limbach H-H. *J. Phys. Org. Chem.* 2000; 13: 23-34.

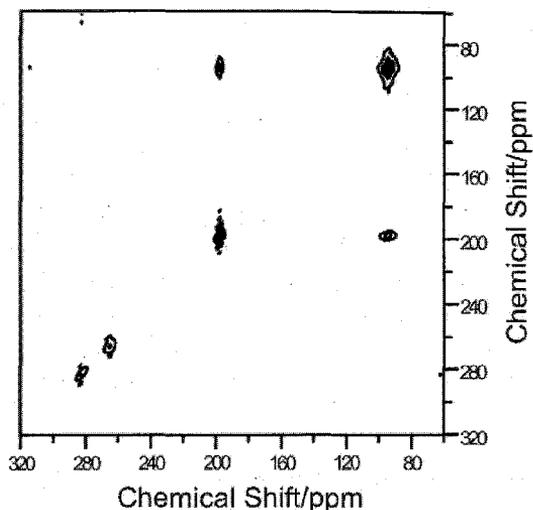


Fig.2 Contour plot of 2D  $^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$  exchange spectrum of 99%  $^{15}\text{N}$ -labeled Tol with the DARR mixing time of 3 s. During the mixing time, DARR to enhance  $^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$  polarization transfer with the  $n=1$  DARR condition was applied.

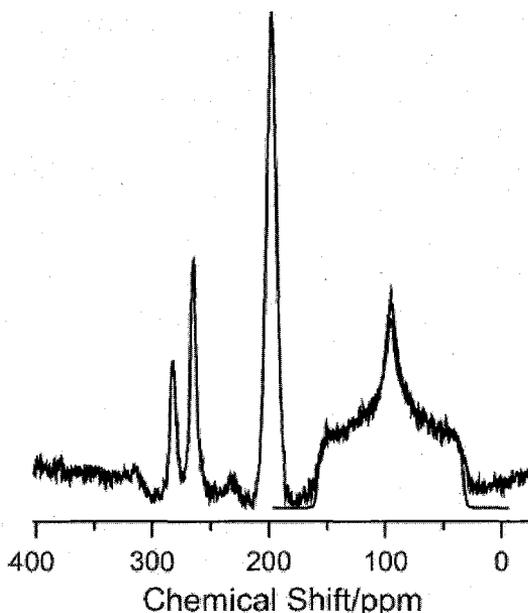


Fig.3  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  dipolar recoupled spectrum of 99%  $^{15}\text{N}$ -labeled Tol using FSLG-242 observed at the spinning speed of 10 kHz with overlay of simulation for a  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  distance of 0.111 nm for the peak at 94.4

固体 NMR による微生物産生高分子ポリ(ε-リジン)/  
ポリアクリル酸複合体の分子構造解析  
(<sup>1</sup>福井大院工, <sup>2</sup>徳島大工, <sup>3</sup>金沢大院自然)  
前田史郎<sup>1</sup>, ○藤原康博<sup>1</sup>, 佐々木千鶴<sup>2</sup>, 国本浩喜<sup>3</sup>

Molecular Structural Analysis of Microbial Poly(ε-lysine)  
/Poly(acrylic acid) Complex by Solid-State NMR

Shiro Maeda<sup>1</sup>, ○Yasuhiro Fujiwara<sup>1</sup>, Chizuru Sasaki<sup>2</sup> and Ko-Ki Kunimoto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Japan, <sup>2</sup>Department of Life System, Institute of Technology and Science, The University of Tokushima, Japan, <sup>3</sup>Division of Applied Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Japan

The molecular structure of poly(ε-lysine)/poly(acrylic acid) complex has been investigated by using high-resolution solid-state NMR spectroscopy. The observed upfield shift of C=O resonance of ε-PL in ε-PL/PAA complexes is probably attributed to destruction of intermolecular hydrogen bonding of C=O···NH in ε-PL, and formation of another type of interaction with PAA. In addition, α-carbon and γ-carbon resonance of ε-PL component in ε-PL/PAA complexes shifts upfield. These experimental results imply that complex formation may cause conformational change in ε-PL component.

【緒言】微生物由来のポリ(ε-リジン), (ε-PL)(Fig.1) は, 放線菌の一種 *Streptomyces albulus* がグルコース等を炭素源, 硫酸アンモニウム等を窒素源として分泌するもので, その培養濾液から単離される. ε-PLは水溶性で, 生分解性, 抗菌性, 免疫増強性, 凝集・吸水性等, 多様で有用な特性を有する. ε-PLは, 側鎖に反応性の高いα-アミノ基(α-NH<sub>2</sub>)があるため, 化学修飾による機能性の高いポリマーへの応用が期待される. そこで, 新しい機能性ポリマーの開発を目的として, ε-PLと水溶性を有すポリアクリル酸, (PAA)という異なったポリマーをブレンドし, 生成物の構造を固体高分解能NMR, IR測定から解析を試みた.

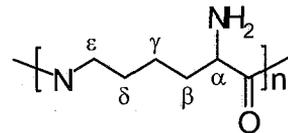


Fig.1 Structure of poly(ε-lysine)

【実験】ε-PLとPAAをそれぞれメタノールに溶解後, 両方を混合した. 攪拌中, 徐々に白色沈殿が生じたので, 遠心分離を行うことで上澄みを除去し, 沈殿のみを回収した. 溶媒を除去するため, 減圧乾燥処理を行い, 様々な比率のブレンド粉末を作製した. この粉末を赤外分光法(IR), 固体高分解能NMR測定から構造解析を行った. 固体高分解能<sup>13</sup>Cおよび<sup>15</sup>N NMR測定にはChemagnetics CMX Infinity 300を用いて, それぞれ75.56MHzと30.45MHzで測定した. <sup>13</sup>C化学シフトはHMBのメチル炭素をTMSから17.35ppm, <sup>15</sup>N化学シフトはGlycineをNH<sub>3</sub>(liq.)から32.50ppmとした.

キーワード: 微生物産生, ポリ(ε-リジン), ポリアクリル酸, 固体 NMR

まえだしろ, ふじわらやすひろ, ささきちづる, くにもとこうき

【結果と考察】 $\epsilon$ -PL,  $\epsilon$ -PL/PAA複合体およびPAAの固体 $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMRスペクトルをFig.2 に示す。 $\epsilon$ -PLとPAAをブレンドすることにより、複合体中の $\epsilon$ -PLのカルボニル基( $\text{C}=\text{O}$ )のピークが高磁場に、PAAの $\text{C}=\text{O}$ ピークが低磁場にシフトした。 $\epsilon$ -PLと $\epsilon$ -PL塩酸塩, ( $\epsilon$ -PL/HCl)の $\text{C}=\text{O}$ ピークの化学シフトを比較すると<sup>1,2)</sup>,  $\epsilon$ -PLは,  $\text{C}=\text{O}\cdots\text{NH}$ の水素結合のために $\epsilon$ -PL/HClよりも低磁場シフトする。複合体中の $\epsilon$ -PLの $\text{C}=\text{O}$ ピークが高磁場シフトした原因は、ブレンドにより $\epsilon$ -PLの $\text{C}=\text{O}\cdots\text{NH}$ の水素結合が切れ、PAAと新たな相互作用が形成されたためであると考えられる。また、複合体中の $\epsilon$ -PLの $\alpha$ -炭素,  $\gamma$ -炭素ピークが高磁場シフトした。これは、おそらく $\gamma$ -gauche効果によるもので、 $\epsilon$ -PLのコンフォメーション変化を示唆する。

Fig.3 に $\epsilon$ -PL,  $\epsilon$ -PL/HCl, Methyl Orangeを化学修飾した $\epsilon$ -PL, ( $\epsilon$ -PL/MO) (Scheme1) および $\epsilon$ -PL/PAA (1/1)複合体の固体 $^{15}\text{N}$  CP/MAS NMRスペクトルを示す。 $\epsilon$ -PL/PAA (1/1)の主鎖 $\epsilon$ -NHCOは121ppm, 側鎖 $\alpha$ -NH<sub>2</sub>は38ppmに現れた。これらのピークは $\epsilon$ -PLと比較すると、 $\epsilon$ -PL/HCl,  $\epsilon$ -PL/MOと同様に低磁場シフトしている。 $\epsilon$ -PL/MOはイオンコンプレックスを形成しているため、低磁場シフトを示す<sup>2)</sup>。以上の結果は、PAAをブレンドすることにより、 $\epsilon$ -PLのコンフォメーション変化、イオンコンプレックスの形成を示唆する。

《引用文献》

- 1) S. Maeda, K. Kunimoto, C. Sasaki, A. Kuwae, and K. Hanai, *J. Mol. Struct.*, **655**, 149-155 (2003)
- 2) S. Maeda, T. Mori, C. Sasaki, K. Kunimoto, A. Kuwae, and K. Hanai, *Polym. Bull.*, **53**, 259-267 (2005)

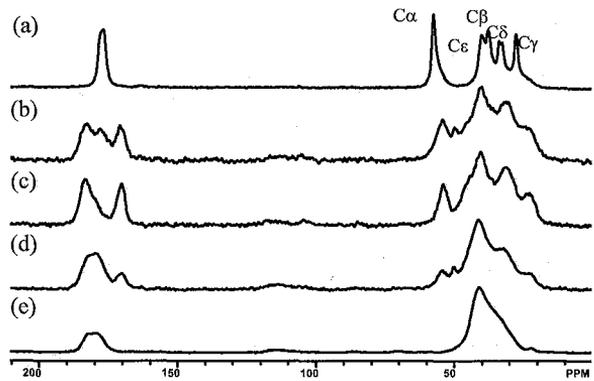
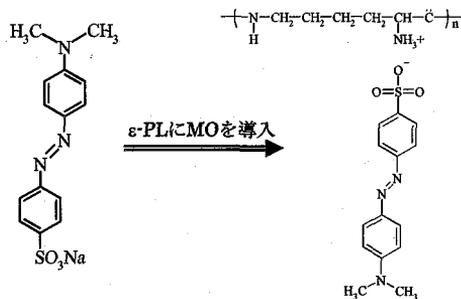


Fig.2  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectra of (a) pure  $\epsilon$ -PL, (b)  $\epsilon$ -PL/PAA(3/1), (c)  $\epsilon$ -PL/PAA(1/1), (d)  $\epsilon$ -PL/PAA(1/3) and (e) pure PAA.



Scheme1. Structure of  $\epsilon$ -PL/MO<sup>2)</sup>.

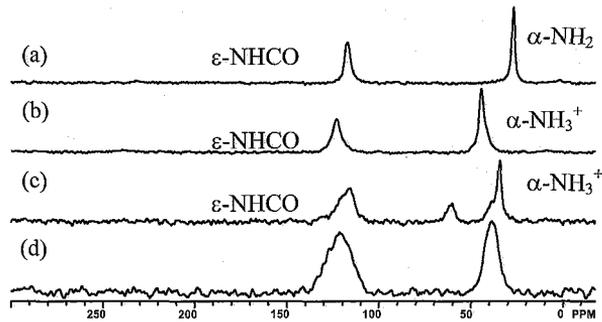


Fig.3 Solid state  $^{15}\text{N}$  NMR spectra of (a) pure  $\epsilon$ -PL, (b)  $\epsilon$ -PL/HCl, (c)  $\epsilon$ -PL/MO and (d)  $\epsilon$ -PL/PAA(1/1).

産総研中部 ○西田雅一・早川由夫、愛産研三河 田中利幸・西村美郎

Characterization of material properties of polymer alloys consisting of poly(L-lactide) by solid-state NMR

Masakazu NISHIDA<sup>1</sup>, Yoshio HAYAKAWA<sup>1</sup>, Toshiyuki TANAKA<sup>2</sup>, and Yoshiro NISHIMURA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Chubu (AIST Chubu)

<sup>2</sup>Mikawa Textile Research Institute, Aichi Industrial Technology Institute

**Abstract:** The solid-state <sup>13</sup>C NMR spectra of three kinds of polymer alloys, that is, L-lactide (LA) / ε-caprolactone (CL) copolymers produced by the reaction extrusion process (the extrusion copolymer), block copolymers whose segments were separately synthesized and coupled by experimental scale (the block copolymer), and poly(L-lactide) (PLA) / poly(ε-caprolactone) (PCL) polymer blends by the solution-cast method (the polymer blend), were measured to investigate the producing process of the PLA/PCL polymer alloys. The relaxation times of carbon nuclei (T<sub>1</sub>C) of the polymer alloys were measured by the Torchia method. The T<sub>1</sub>C values of the extrusion copolymer's carbonyl carbon obviously decreased with increase of the CL content while those of the polymer blends almost unchanged. The T<sub>1</sub>H values were determined by the inversion recovery method in <sup>13</sup>C CP-MAS NMR, which decreased with increase of the CL content, similarly to T<sub>1</sub>C. The tensile modulus of the extrusion copolymers (extrusion) and films (blend) showed a better correlation to the values of T<sub>1</sub>C than the CL contents in the polymer alloys.

### 【緒言】

ポリ乳酸は環境調和材料として産業界から期待されているが、その実用化のためには剛性や脆性などの機械的特性の改善が不可欠である。この機械的特性の改善法として、ポリε-カプロラク톤など他の軟質なユニットとの共重合体やポリマーブレンドを製造する方法があるが、これらの乳酸系ポリマーアロイについては製品特性の再現性に問題があるなど、その製造プロセスは必ずしも実用に耐えうるものとして確立していない。我々は材料機能特性に優れた材料を得ることを目的とし、製品の固体 NMR スペクトルや緩和時間を測定することにより製造プロセスの評価・改善を行ってきたが、その結果、緩和時間と機械的特性との間に興味深い相関関係を見出したので、報告する。

**Key Word:** PLLA/PCL copolymer, solid-state NMR, relaxation time, mechanical property

にしだ まさかず、はやかわ よしお、たなか としゆき、にしむら よしろう

## 【実験】

1. 逐次溶融共重合が可能な反応押出成形装置を用いて、無溶媒で共重合を行い、押出成形を行うことで繊維状の試料 (Extrusion 体) を得るとともに、実験室スケールでトルエン溶媒中二段階重合反応することにより粉末の試料 (Block 体) を得た。
2. 混合比の異なる市販のポリ乳酸 (PLA) とポリε-カプロラクトン (PCL) をクロロホルムに溶解させ、室温常圧で溶液キャストを行うことで、膜状の試料 (Blend 体) を得た。
3. 固体 NMR は Varian 社製 Inova 300 で Doty 社製 7mm 固体用プローブを用い、試料回転数: 4k rpm, CP time: 2 msec でスペクトル測定を行った。

## 【結果・考察】

図1に LA:CL=8:2 であるポリマーアロイの  $^{13}\text{C}$  固体 NMR のスペクトルを示す。CP-MAS NMR では、いずれの方法で製造したポリマーアロイについても、CL 部分のピーク強度は弱く、LA 部分と比較して CL 部分の CP 効率は低くなっていた。一方、DD-MAS NMR では Blend 体のみはっきりと CL 部分のピークが確認できた。

Extrusion 体においては、CL の添加量が増えることで共重合体全体の運動性が大きくなり、 $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR におけるすべてのピークの強度が減少するとともに、 $T_{1C}$  や  $T_{1H}$  などの緩和時間が CL 含有量の増加とともに減少した。一方、Blend 体については、緩和時間の減少はほとんどなく、20% の CL 添加によりわずかに  $T_{1C}$  が減少したのみであった。

引張強度や引張弾性率などの繊維としての機械的特性と固体 NMR における緩和時間との関係では、図2に示したように、Extrusion 体の引張弾性率が増加するにつれて C=O 基や CH 基の  $T_{1C}$  が増加するという機械的特性と固体 NMR における緩和時間と強い相関関係が見られた。Blend 体については膜としての引張弾性率を測定したが、その変化は  $T_{1C}$  と同じく、小さいものであった。さらに、製造プロセスや CL 含有量の違いによる交差緩和過程や回転座標系の緩和時間  $T_{1\rho}$  の値の変化についても比較検討を行い、それらと機械的特性などの材料機能特性との相関関係についても報告する。

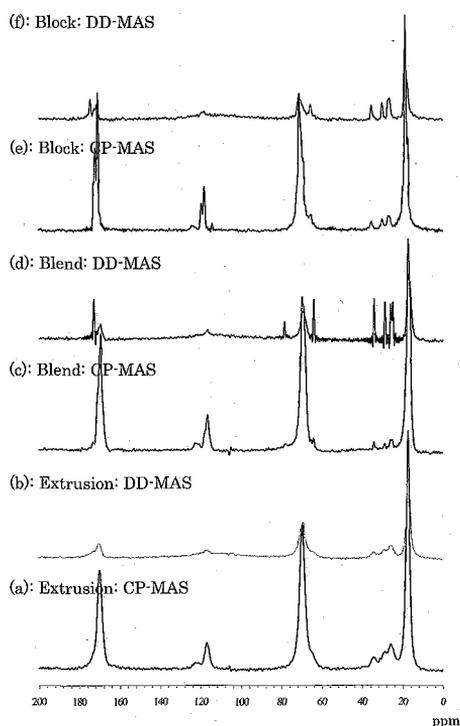


Fig.1. Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of LA/CL polymer alloys (8:2)

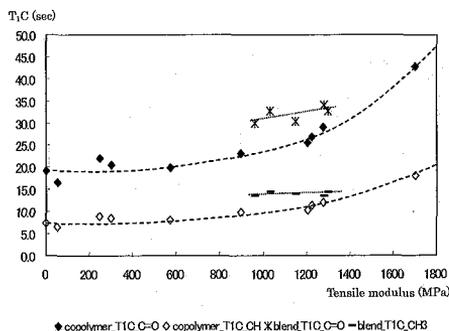


Fig.2. Correlation between tensile modulus and  $T_{1C}$  values of polymer alloys

### Static and Dynamic Molecular Structural Analysis for Chitosan Derived from $\alpha$ -chitin and $\beta$ -chitin by Solid-State NMR

Shiro Maeda<sup>1\*</sup>, Yuko Fujimoto<sup>1</sup>, Kensuke Sakurai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Chemistry and Biotechnology and <sup>2</sup>Division of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Japan

The molecular structure and morphology of chitosan (CS) from crab shell and squid pen were studied by using high-resolution solid-state NMR spectroscopy. CPMAS spectrum of crab CS obtained by using normal cross-polarization pulse sequence shows sharp doublet C4 peaks. On the other hand that of squid CS shows broad C4 peak. Morphology of crab CS and squid CS was investigated by <sup>13</sup>C spin-lattice relaxation time (T<sub>1</sub>) measurements. The crystallinity of the former determined from T<sub>1</sub> measurements was higher than the latter. Sharp doublet C4 peaks which have longer T<sub>1</sub> than the broad C4 peak were assigned to crystalline component and the broad C4 peak to amorphous component.

#### 【緒言】

キトサン(CS)は 2-amino-2-deoxy-D-glucose が  $\beta$ -(1→4)結合した多糖であり、セルロースと同様に 2 回ラセン構造で分子鎖が互いに逆平行にならんだ構造をとっている。一般にキチンの脱アセチル化より得られるが、キチンには、 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ 型の三種の結晶構造が存在する。また、 $\alpha$ 型は $\beta$ 型よりも水素結合が多く安定な構造をとっている。本研究では、固体高分解能 NMR を用いて、 $\alpha$ 型および $\beta$ 型キチンを脱アセチル化して得られるキトサンの相構造の違いを明らかにすることを試みた。

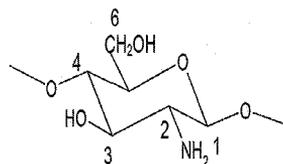


Fig.1 Structure of chitosan.

#### 【実験】

試料は crab shell 由来 CS(片倉チッカリン製, DA=97%) (crab CS)と squid 由来 CS(DA=90%) (squid CS)を 5% 過ホウ酸ナトリウム水溶液で 8 時間解重合処理した試料を用いた。また, crab CS は 200°C でアニーリング処理した試料も作成した。

Keyword: 固体 NMR、キトサン、キチン

まえだ しろう、ふじもと ゆうこ、さくらい けんすけ

固体 $^{13}\text{C}$  NMR測定はChemagnetics CMX Infinity 300を用い、室温で行なった。化学シフトはヘキサメチルベンゼンを外部基準とし、そのメチル炭素をテトラメチルシラン基準で17.35ppmとした。 $^{13}\text{C}$ スピン-格子緩和時間( $T_1^{\text{C}}$ )測定にはTorchiaのT1CPシーケンスと飽和回復法を用いた。

### 【結果と考察】

Fig. 2 に(a) Crab CS および (b) Squid CS の $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR スペクトルを示す[1]。C4 ピークに関してはCrab CSが2本の角のようなピークが現れた。この分裂は多形のためであり、200°Cでアニール処理するとブロードな1本のピークになった。これはSaitoらの結果と一致する[2]。また、Squid CSでは86.5-81.5 ppmにブロードなピークが現れた。C4ピークを線形分離すると、2本の角のようなピーク由来のC4aとC4bだけでなく、真中のブロードなピークが得られ、これをC4cとした。これらの3つのピークの化学シフトはCrab CSおよびSquid CSで一致した。 $^{13}\text{C}$ スピン-格子緩和時間 $T_1^{\text{C}}$ の測定結果を、Table. 1に示す。

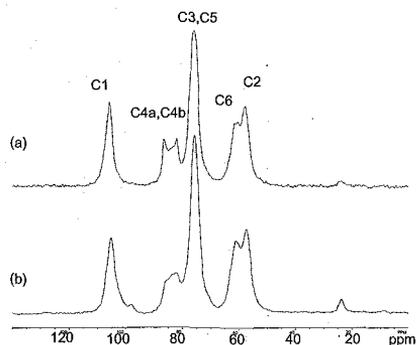


Fig. 2  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spectra of (a)crab CS and (b)squid CS.

Table 1.  $^{13}\text{C}$  spin-lattice relaxation time  $T_1^{\text{C}}$  of CS (sec).

Carbon types		C1	C4a	C4b	C4c	C5	C3	C6	C2
Crab shell	Crystalline	61.9	43.0	41.7		50.2	40.8	18.9	57.6
	Amorphous	14.0			19.6	10.7	7.7	0.83	9.5
Squid	Crystalline	32.9	41.4	47.5		29.3	25.8	9.2	26.8
	Amorphous	6.7			15.1	6.3	4.7	0.51	5.5

Crab CS と Squid CS の  $T_1^{\text{C}}$  decay は、共に2つの指数関数でフィットでき、 $T_1^{\text{C}}$ の長い成分を結晶成分、 $T_1^{\text{C}}$ の短い成分を非晶成分と帰属した。C4ピークの各成分はそれぞれ単一指数関数でフィットできた。また、C6シグナルの非晶成分の $T_1^{\text{C}}$ が極端に短いことから、キトサンの非晶成分のC6は分子間で水素結合しておらず、自由に運動していると考えられる。さらに、 $T_1^{\text{C}}$ 測定から得られた初期磁化の割合から結晶化度を求めたところ、Crab CSでは約60%であり、Squid CSでは約40%であった。また、Crab CSと比較してSquid CSの $T_1^{\text{C}}$ は全体的に値が短い。これはCrab CSがよりリジッドな構造を取っていることを意味している。

### 【引用文献】

1. S. Maeda, R. Komatsu, and K. Sakurai, *Polymer Preprints, Japan*, **54**, 1214(2005)
2. H. Saito, R. Tabeta and K. Ogawa, *Macromolecules*, **20**, 2424 (1987).

## 高温in-situ $^{27}\text{Al}$ NMRによるカルシウムアルミノシリケートガラス・融体の構造とダイナミクス

新日鐵先端研[1]、Stanford大学[2]

○金橋康二[1]、Jonathan F. Stebbins[2]

### In-situ high temperature $^{27}\text{Al}$ NMR study of structure and dynamics in a calcium aluminosilicate glass and melt

Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation[1],

Department of Geological and Environmental Sciences, Stanford University[2]

Koji Kanehashi[1], Jonathan F. Stebbins[2]

#### Abstract

The temperature dependence (25 to 1400 ° C) of  $^{27}\text{Al}$  NMR spectra and spin-lattice relaxation time constants  $T_1$  have been studied for a calcium aluminosilicate glass and melt using an in-situ high temperature probe, and the glass has been characterized by ambient temperature, high field (18.8 T) MAS NMR. The peak positions and the line widths show a consistent behavior as motional averaging of the quadrupolar satellites increases with increasing temperature. A change in  $T_1$  dependence on temperature near the glass transition temperature  $T_g$  suggests a change in NMR relaxation process from vibrational to translational motions. Above the  $T_1$  minimum ( $\approx 1200$  ° C), The relationship between NMR correlation times and shear relaxation times suggests that microscopic nuclear spin relaxation is controlled by the same dynamics as macroscopic structural relaxation.

#### 【緒言】

アルミノシリケートは地質学的のみならず、産業界においてもガラスやスラグの主要成分であることから重要な成分系の一つである。アルミノシリケートの巨視的な物理的・化学的特性は分子レベルの挙動に支配されることが多いため、局所的な構造・ダイナミクスの情報を得ることが重要である。特に、高温下でのガラス・融体転移の現象解明のためには、従来のメルトクエンチ法によって合成したガラス構造からの融体挙動の推定だけでなく、高温下での反応を直接観測できる技術が非常に有効となりうる。

固体NMRは核種別の短・中距離構造情報が得られる有効な手法としてガラス融体の材料解析に広く適用されており、高温in-situ NMRスペクトルによる $^{29}\text{Si}$ 、 $^{27}\text{Al}$ 、 $^{11}\text{B}$ 、 $^{23}\text{Na}$ 、 $^7\text{Li}$ 、 $^{25}\text{Mg}$ の構造解析がなされてきた。それと平行して、 $^{29}\text{Si}$ 、 $^{23}\text{Na}$ 、 $^7\text{Li}$ 等の高温下でのダイナミクス変化についても、緩和時間のデータを元に研究されてきたが、 $^{27}\text{Al}$ に関しては報告例が非常に限られているのが現状であり、この原因としては(1) $^{29}\text{Si}$ と異なり四極子核であるため、データ解釈がしばしば困難になること、(2) $^{23}\text{Na}$ や $^7\text{Li}$ ほど運動性が高くないため、高温にて $T_1$ の極小値が観測されにくく、緩和メカニズムの変化が考察しにくい等が考えられる。しかしながら、AlはSi同様、アルミノシリケート骨格の主要成分であり、組成によっては5配位Al[1]やトリクラスター[2]等が存在し、粘性等の物性に影響すると考えられていることから、その詳細な構造・ダイナミクス情報を得ることは重要である。

今回、アルミノシリケートの代表的な成分系であり、産業的にも非常に重要なカルシウムアルミノシリケート(CAS)のAlの構造・ダイナミクス変化を高温in-situ NMRによって

高温in-situ  $^{27}\text{Al}$  NMR、アルミノシリケート、ガラス・融体、構造、ダイナミクス

かねはしこうじ、じよなさんえふすてびんず

解析し、融体の粘性から得られる物性との相関について検討した結果、有益な情報を得たので報告する。

## 【実験】

### <試料合成>

43.1 CaO-12.5 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-44.4 SiO<sub>2</sub> (融点: 約1265°C) の組成比となるように、試薬のCaCO<sub>3</sub>、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、SiO<sub>2</sub>を秤量・混合し、大気中1500°Cにて熔融、その後水中にクエンチさせてCASガラスを得た。均一なガラスを得るために、上記ガラスを粉砕し、再熔融する作業を3回繰り返した。

### <NMR>

CASガラスの高分解能<sup>27</sup>Al MASスペクトルの測定には、Varian Inova 800 (18.8 T, <sup>27</sup>Al: 208.40 MHz) 及び 600 (14.1 T, <sup>27</sup>Al: 156.28 MHz) を用いた。Varian/Chemagnetics製3.2 mm MASプローブを用い、試料回転速度は20 kHzとした。

高温in-situ <sup>27</sup>Al NMRの測定には、Varian Infinityplus 400 (9.4 T) を用いた(<sup>27</sup>Al共鳴周波数: 104.17 MHz)。プローブは自作のStaticプローブを用いた[3]。RFコイルは耐熱性・耐酸化性に優れたMo線(2ターン)を用い、BN製の試料管(8.4 mm径、16.8 mm長)のすぐ外側を取り囲むように配置した。コイルに隣接する部分には、<sup>27</sup>Alのバックグラウンドを避けるために断熱用セラミックスとしてAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>の代わりにZrO<sub>2</sub>を使用した。BN製試料管、Mo製のコイル及びヒーターの酸化を防ぐために、プローブ内の高温スペースには98%N<sub>2</sub>-2%H<sub>2</sub>混合ガスをフローさせた。また、T<sub>1</sub>測定には飽和回復法を用いた。高温in-situ実験後のガラスの<sup>27</sup>Alスペクトルの線形、90°パルス幅及びT<sub>1</sub>は、実験前のガラスのそれらと同一であったことから、高温実験中の組成変化は無視できる程度であると考えられる。各温度での実験には、毎回新たなCASガラスを用い、特に1050~1200°Cの温度範囲においては、測定時間は3分以内とした。これより長くなると、試料の結晶化が観察された。

## 【結果・考察】

### <CASガラスの構造>

室温にて測定されたCASガラスの<sup>27</sup>Al MASスペクトルをFig. 1に示す。9.4 Tまたはそれ以下の磁場強度にてガラスの<sup>27</sup>Al MASスペクトルを測定した場合、しばしば低周波数側に長い裾を有する特色の無いブロードなピークしか観測されないが、14.1 Tにおいては2次の核四極子相互作用によるブロードニングが減少するため、5配位Alの存在が明らかとなり、18.8 Tではその存在がさらに顕著となった。今回のCASガラスの組成は、CaO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>>1の範囲にあり、(AlO<sub>4</sub>)<sup>-</sup>四面体の負電荷を補償するためのCa<sup>2+</sup>イオンは十分存在していることから、化学量論的にはAlは4配位としてのみ存在していると考えられるが、実際には4配位Alの他にわずかながら5配位Alも存在していることがわかった。類似の組成を持つCASガラスにおいても、同様の報告がなされている[1]。

以下の2式を用いて、異なる磁場におけるそれぞれのピークの重心値から核四極子結合定数C<sub>Q</sub>及び等方化学シフトδ<sub>iso</sub>を求めた。

$$C_Q \text{ (MHz)} = \{(\delta_{cg(1)} - \delta_{cg(2)})[(\nu_{0(1)}^2 \nu_{0(2)}^2) / (\nu_{0(1)}^2 - \nu_{0(2)}^2)](1/6000)(1 + \eta^2/3)^{-1}\}^{1/2} \quad (1)$$

$$\delta_{iso} \text{ (ppm)} = \delta_{cg(1)} + 6000(C_Q^2/\nu_{0(1)}^2)(1 + \eta^2/3) \quad (2)$$

ここで、δ<sub>cg</sub>は重心、ν<sub>0</sub>はラーモア周波数、ηは非対称パラメーターである。η = 0と仮定すると5配位Alを含めたC<sub>Q</sub>及びδ<sub>iso</sub>の平均値はそれぞれ7.2 MHz、67.4 ppmと見積もら

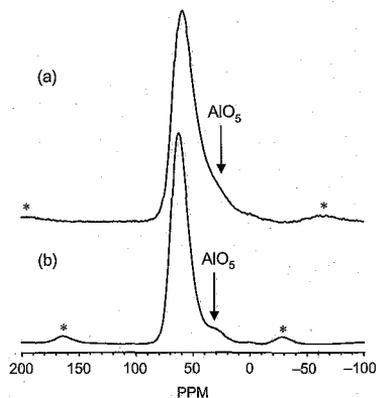


Fig. 1 <sup>27</sup>Al MAS spectra for the CAS glass at 14.1 T (a) and 18.8 T (b). \* denotes spinning sidebands.

れ、類似組成を有する過去の報告に近い値となった[1]。

### ＜高温での構造変化＞

$^{27}\text{Al}$  staticスペクトルの温度依存性をFig. 2に示す。ピークの最大値の位置は室温から850°Cにかけて3 ppm程度しか変化が見られなかったが、重心値は室温及び850°Cでそれぞれ50.6 ppm及び38.5 ppmと、大きく異なっていた。ここで、(1)、(2)式から求めた $C_Q$ 及び $\delta_{iso}$ の平均値から9.4 Tにおけるガラスの重心値を計算すると38.7 ppmと見積もられ、ガラス転移温度 $T_g$ (810°C)を少し超えた温度である850°Cの重心値と同等であった。この結果は、室温におけるガラスの重心値をかなり高周波数側に評価していることを意味する。非常にブロードな室温におけるガラスのstaticスペクトルの低周波数側に伸びる低強度且つ広周波数範囲に及ぶ裾の一部がベースラインに埋もれており、重心値をかなり高周波数側に見積もったことが原因であると考えられる。

過冷却融体領域である850~1000°Cにかけて、大きな変化が観測された。まず、見かけのピークが明らかに低周波数側にシフトした。過去、同様のシフトが $\text{Na}^+$ イオンにおいても報告されているが[4]、今回の $\text{Al}^{3+}$ イオンよりもずっと低い温度域で観測されている。この原因としては、両イオンの運動性の違いによるものであると考えられる。1000°Cにおける重心値は33.5 ppmに達しており、ガラス状態の重心値(38.7 ppm)よりもさらに低周波数側にシフトしていることから、 $T_g$ を超えて温度上昇に伴い、Alの平均配位数が増加していると予想される。

第二に、線幅の急激な減少が見られた。線幅が最も狭い1000°CにおけるピークはLorentz型であり一見"liquid-like"であるが、nutatonの実験結果から、90°パルス幅は同温度での $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ の値と同等であり、該温度においてはNMRタイムスケールでは未だ"solid-like"であることがわかった。 $T_g$ 以上において、該試料の粘度 $\eta$ は温度に対して"non-Arrhenian"な挙動(fragileガラス)を示すことから、過去に報告された同組成のCAS融体の粘度の実測値(1338~1724°C)[5]及び $T_g$ での粘度( $= 10^{12} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ )から粘度と温度の関係を表すVFT(Vogel-Fulcher-Tamman)曲線を作成した(Fig. 3)。内挿法によって得られた粘度から、Maxwellの関係式( $\eta = G_\infty \tau_s$ 、 $G_\infty$ はinfinite frequency shear modulus ( $\sim 10^{10} \text{ Pa}$ ))を用いて各温度におけるずれ緩和時間 $\tau_s$ を求めた。その結果、1000°Cにおいては $1/\tau_s = 1.75 \text{ MHz}$ であり、10 MHz以上の広範囲に及ぶサテライト遷移を完全に平均化できるほどの運動性を有していないことがわかった。以上の考察から、850~1000°Cにかけての線幅の急激な減少は、隣接する $\text{Si}^{4+}$ 或いは $\text{Al}^{3+}$ イオンとの交換反応に基づく中央遷移のmotional averagingによって、異方的効果が減少したことに起因していると考えられる。

1000°C以上になると、今度は逆に高周波数側にピークがシフトしていく傾向が見られ

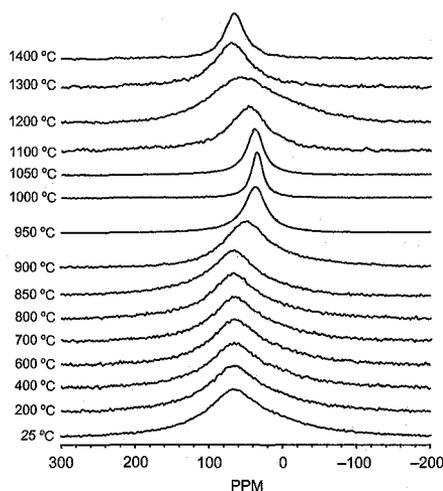


Fig. 2  $^{27}\text{Al}$  static spectra for the CAS glass and melt from 25 to 1400 °C.

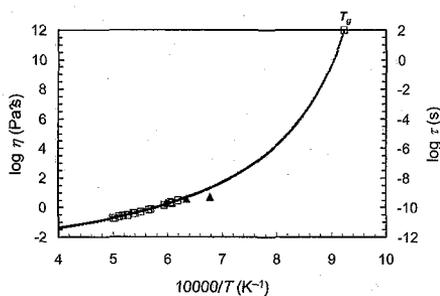


Fig. 3 Plot of  $\log_{10}$  of viscosity  $\eta$ ,  $\log_{10}$  of shear relaxation time  $\tau_s$ , and  $\log_{10}$  of NMR correlation time  $\tau_c$  for the CAS glass and melt versus inverse temperature. Open squares show measured viscosities (scale on left) [4], and solid triangles the correlation times derived from  $T_g$  (scale on right). The solid curve represents a fit by the VFT equation.

た。これは分子運動性の更なる増加によって、サテライト遷移が徐々に平均化され、2次の核四極子シフトが減少し、 $\delta_{iso}$ に近づいていくためであると理解できる。それに伴い、ピークのブロードニングが観測されるが、これはサテライト遷移の motional averaging によって、中央遷移に吸収されていく過程を示すものであり、過去に $^{23}\text{Na}$ において同様の現象が報告されている[4]。

1300°Cにおいては、融点以上であることから、分子運動によって核四極子相互作用を含めたNMRの異方的相互作用は平均化されているはずである。実際、該温度の $1/\tau_c$ は2 GHz以上となり、十分大きな分子運動性を有していると考えられる。しかしながら、 $\delta_{iso}$ は65.1 ppmであり、(1)及び(2)式から求めたガラスの $\delta_{iso}$ よりも低周波数シフトしている。これは、1000°Cのときと同様、 $T_g$ のときに比べて5配位Alの割合がわずかに増加したためと理解できる。 $T_g$ 以上の過冷却融体及び融体において、温度上昇に伴う5配位Al比率の増加はいくつかの系について報告されており[6,7]、それらに矛盾しない結果となった。さらに1400°Cまで温度を上昇させると、 $\delta_{iso}$ は低周波数側にシフトしたことから、更なるAl平均配位数の増加及び熱膨張に伴う平均結合長の増加が起こっていることが示唆される。

以上の知見から、 $T_g$ 以上の温度域における粘性発現メカニズムについて検討した。温度上昇に伴い増加すると考えられる5配位Alは、粘性発現に寄与する $\text{Al}^{3+}$ イオンの移動反応における中間体である見なすことができる。Al-O結合及び開裂を伴った隣接する $\text{Si}^{4+}$ 或いは $\text{Al}^{3+}$ イオンとの交換反応によって、粘性(流動)が発現していると考えられる。温度が上昇するにつれて、この結合・開裂の頻度が増加するため、5配位Alの割合も増加するものと理解できる。

上述のスペクトル解析の他に、温度に対する $T_1$ の依存性についても検討し、Alイオンのダイナミクスに関する情報を得た(詳細は当日説明)。 $T_g$ 付近を境に、Alイオンの運動モードが明らかに変化していることを示唆する結果が得られた。Arrhenius式を用いて求めた活性化エネルギーの値の変化は上記粘性発現モデルに矛盾しない結果であった。さらに、 $T_1$ 極小値を示す温度( $\sim 1200^\circ\text{C}$ )以上において、 $T_1$ 値からNMR相関時間 $\tau_c$ を算出したところ、上述の $\tau_c$ と非常に良く一致することがわかった(Fig. 3)。すなわち、NMR緩和時間とずれ緩和時間は、同じタイプの運動モードによって支配されており、ミクロな分子レベルの運動性は、巨視的物性である粘性と密接な関係があることを明らかにした。

以上のように、高温in-situ NMR法は、従来のメルトクエンチ法による常温でのガラスの固体NMR測定では得ることのできない、固体～熔融にかけての各核種の化学構造・ダイナミクス変化を捉えるのに非常に有効であることがわかった。

#### 【文献】

- [1] D. R. Neuville, L. Cormier, D. Massiot, *Chem. Geol.* 229 (2006) 173.
- [2] J. F. Stebbins, S. K. Lee, J. V. Oglesby, *Am. Mineral.* 84 (1999) 983.
- [3] J. F. Stebbins, *Chem. Rev.* 91 (1991) 1353.
- [4] A. M. George, J. F. Stebbins, *Phys. Chem. Minerals* 23 (1996) 526.
- [5] G. Urbain, Y. Bottinga, P. Richet, *Geochim. Cosmochim. Acta* 46 (1982) 1061.
- [6] D. Massiot, D. Trumeau, B. Touzo, I. Farnan, J. C. Rifflet, A. Douy, J. P. Coutures, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 16455.
- [7] E. V. Dubinsky, J. F. Stebbins, *Am. Geophys. Union, Fall Mtg.*, Abstr. MR43B-1075 (2006).

(北大院 理) ○山田 哲也、丸田 悟朗、武田 定

**Magnetic property of one-dimensional magnetic copper(II) complex studied by  
solid-state high resolution NMR**○Tetuya Yamada, Goro Maruta, Sadamu Takeda  
(Graduate School of Science, Hokkaido University)

We investigated magnetic interaction pathway using solid-state high resolution NMR measurement, which causes strong antiferromagnetic interaction for  $S=1/2$  one-dimensional chain  $[\text{Cu}(\text{pydz})(\text{NO}_3)(\text{OH})]\text{H}_2\text{O}$ . We also attempted to clarify spin susceptibility and spin energy gap for this complex by means of NMR method.

【はじめに】特異的な性質を持つ低次元磁性体の中で、 $S=1/2$  一次元反強磁性鎖は長年に渡る多くの研究により外部磁場の有無に関わらず基底状態からのエネルギーギャップを持たないことが定説となっていた。しかし近年これを覆す磁場誘起ギャップが発見されて以来多くの注目を集めている。この磁場誘起ギャップは磁氣的相互作用の強さに依存して大きくなるため、より詳細に研究する上ではそのような物質が望ましい。我々は磁場誘起ギャップが期待でき、且つ非常に強い反強磁性相互作用を持つ、 $S=1/2$  一次元磁性銅 (II) 錯体  $[\text{Cu}(\text{pydz})(\text{NO}_3)(\text{OH})]\text{H}_2\text{O}$  (pydz=pyridazine) について固体高分解能 NMR を用いて磁氣的性質を明らかにすることを試みた。

$[\text{Cu}(\text{pydz})(\text{NO}_3)(\text{OH})]\text{H}_2\text{O}$  は非常に強く反強磁性の磁氣的相互作用をすることがみこまれる。一方、この錯体の類似一次元物質である  $[\text{CuCl}_2(\text{pydz})]$  の磁氣的相互作用の大きさは  $[\text{Cu}(\text{pydz})(\text{NO}_3)(\text{OH})]\text{H}_2\text{O}$  と比較すると小さいと予想される。磁氣的相互作用は銅-銅間の架橋配位子を通じて行われるので、相互作用の大きさの違いは磁氣的な相互作用経路の違いである。NMR を用いて超微細結合を求め、量子計算結果と比較検討することによりこの磁氣的相互作用経路の解明を試みた。また超微細結合がスピン帯磁率と関連していることを利用して、相互作用が強く、磁氣測定では正確に見積もることが難しいこの錯体のスピン帯磁率を NMR 測定から得て、相互作用の大きさの見積もりを行った。そして縦緩和測定の温度依存性を求めることから、この物質に予想される磁場誘起ギャップの存在の有無を検証した。

【実験】粉末試料を用いて NMR 測定を行った。核種は  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  を用いた。 $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  については重水素化した試料を使った。外部磁場は約 7 テスラ、NMR の測定周波数は  $^1\text{H} \sim 300\text{MHz}$ ,  $^{13}\text{C} \sim 75\text{MHz}$  の固体高分解能 NMR を用いている。マジック角回転 ( $\nu = 7 \sim 25\text{KHz}$ ) を使って固体高分解能 NMR を測定し、緩和時間は MASNMR、広幅 NMR によりその温度依存性を調べた。

キーワード 固体高分解能 NMR 分子磁性 超微細結合定数 配位高分子

やまだ てつや、まるた ごろう、たけだ さだむ

## 【結果と考察】

室温で得られた  $^1\text{H}$ -、 $^2\text{H}$ -、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを Fig1 に示す。常磁性 NMR シフトと磁化率の関係から超微細結合定数が求められる。それぞれのスペクトルのピークについて温度変化を調べ、磁化率に対するシフトの依存性を見ることで超微細結合定数が求められた。得られた値は全て正の符号をもつ。観測されている C,H 原子は Fig1 の分子図に対応しているのもので、この正の符号はスピンの銅から分子内に広がっている様子を表していると考えられる。またここで得られた超微細結合定数を銅 2 核のモデルクラスターを用いて DFT 量子計算を行った結果と比較したところ、良い対応を示していることがわかった。このことから今回の計算結果は信頼の置ける精度を持っていることが分かる。計算結果で得られた各原子のスピンの密度を調べたところ隣接する銅間を架橋する配位子 pydz,OH,NO<sub>3</sub> の中で、OH がほかの数倍の大きさを持っていることが分かった。このことから相互作用を強くする磁氣的相互作用経路が OH であることが明らかとなった。

また  $^{13}\text{C}$ -NMR シフトの温度変化を調べることから 2 種類の炭素原子についてそれぞれスピンの磁率を求めることができた。得られたスピンの磁率は一次元モデルの理論式で説明できる。ここから一次元鎖内の銅-銅間の交換相互作用  $2J \sim 630\text{K}$  が得られた。この値はこれまで報告されている磁場誘起ギャップ系と比べ、数倍の大きさを持つことから、それに応じたエネルギーギャップを持つことが期待できる。

次に、縦緩和時間の温度依存性を調べた。 $[\text{CuCl}_2(\text{pydz})]$  の緩和率は  $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{OH})(\text{pydz})]\text{H}_2\text{O}$  よりも数倍大きいことがわかった。緩和率は一次元鎖内交換相互作用の大きさと反比例の関係にあるので、磁化率で得られている 2 つの錯体の相互作用の強さと対応していると言える。また、緩和率の温度依存性が電子緩和の寄与を考えた、アレニウスプロットで再現できることから、予想していたエネルギーギャップを観測していると考えられる。 $\text{Cu}(\text{pydz})(\text{NO}_3)(\text{OH})\text{H}_2\text{O}$  では温度領域により活性化エネルギーが異なる。指数関数の係数が異なる 2 つの緩和率がみられる。これは異なる 2 種類のエネルギーギャップを見ている可能性がある。

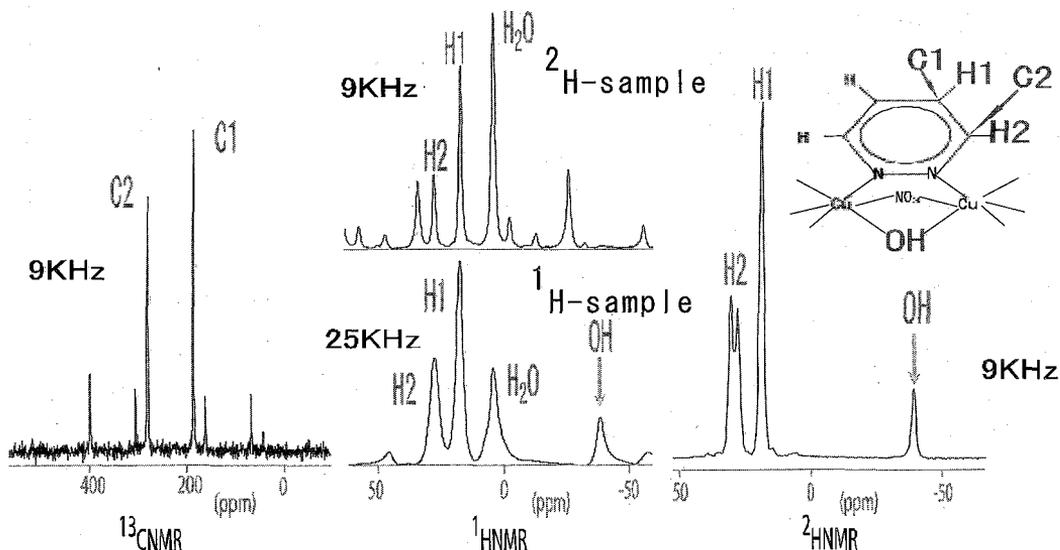


Fig 1  $^{13}\text{C}$ -、 $^1\text{H}$ -、 $^2\text{H}$ -NMR spectrum observed at room temperature. Each frequency indicates rotation velocity of magic angle spinning.

# P083 固体 NMR で見たデカメチルフェロセン・アセナフテンキノン錯体の相転移前後におけるダイナミクス

(電気通信大学量子・物質工学科<sup>1</sup>・東邦大学理学部<sup>2</sup>)  
○中村英章<sup>1</sup>・桑原大介<sup>1</sup>・持田智行<sup>2</sup>

Hideaki Nakamura<sup>1</sup>, Daisuke Kuwahara<sup>1</sup>, and Tomoyuki Mochida<sup>2</sup>

(The University of Electro-Communications<sup>1</sup>, Department of science, Toho University<sup>2</sup>)

## Dynamics around the phase transition temperature of decamethyl-ferrocene acenaphthenequinone studied by solid state NMR

### Abstract

Decamethyl-ferrocene acenaphthenequinone complex (DA) is a new substance, which was recently synthesized by Mochida et. al., in Toho University. This complex has electronic function based on organometallic characteristic. In addition, it has a distinctive molecular structure. Therefore, this complex and its derivatives should serve as functional materials. In order to employ the functionality of this complex, it is necessary to elucidate the molecular structure and physical property. Differential scanning calorimetric experiments have shown that DA has a phase transition near  $-20^{\circ}\text{C}$ . However, little is known about the origin of the phase transition and the molecular behavior around the phase transition. We have, therefore, performed the solid-state NMR experiments on DA in order to investigate the molecular dynamics. We will present the detailed experimental results in the conference.

### 1.緒言

デカメチルフェロセン・アセナフテンキノン錯体 (DA 錯体) は最近、東邦大学の持田研究室で合成された新規物質である。この錯体は、有機金属の特性を生かした新しい物質系である。電子機能を内在し、特徴的な分子骨格を持つことから、機能性材料として幅広い展開につながりうる。DA 錯体が潜在的に有する機能を引き出すためには、DA 錯体の構造と物性を知ることは必要不可欠である。DA 錯体は  $-20^{\circ}\text{C}$  付近で相転移を起こすことが熱測定実験によって分かっているが、相転移前後の詳しい挙動は未だ明らかになっていない。そこで我々は固体 NMR の手法を用いて、この錯体の相転移前後における静的・動的構造を調べることを試みた。

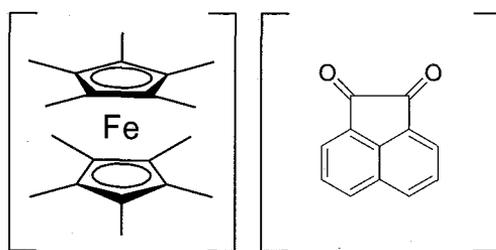


Figure 1. Structure of decamethyl-ferrocene acenaphthenequinone.

キーワード：固体 NMR、重水素 NMR、プロトンスピン拡散

なかむらひであき、くわはらだいすけ、もちだともゆき

## 1. 実験

最初に、CP/MAS、SP/MAS、dipolar dephasing法を用いた $^{13}\text{C}$  NMR測定を行い、DA錯体のNMRスペクトルの帰属を行った。次に、DA錯体とアセナフテンキノン分子について、低温 ( $20^\circ\text{C}\sim-70^\circ\text{C}$ ) で $^{13}\text{C}$  NMR CP/MAS測定を行った。測定は、7.05Tの超伝導磁石で行った。

## 2. 結果と考察

Figure 2は、DA錯体中のアセナフテンキノン分子の低温での $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルである。この結果から、アセナフテンキノン分子が $-50^\circ\text{C}$ 以下で相転移を起こしていることが分かる。アセナフテンキノン分子単体の低温実験では、相転移は確認されなかった。これより、DA錯体の相転移は、錯体中のフェロセン分子がアセナフテンキノン分子に何らかの影響を及ぼしていることが原因と考えられる。

Figure 3には、DA錯体とアセナフテンキノン単体の常温における $^1\text{H}$  NMRスペクトルを示した。実線と点線はそれぞれDA錯体、アセナフテンキノン単体の $^1\text{H}$  NMRスペクトルである。12kHzの試料回転において、 $\text{CH}_3$ プロトンの共鳴線とアセナフテンキノン分子のプロトン共鳴線が分離して観測された。ことから、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ 双極子相互作用はrigidな系と比較して弱いことがわかる。

$-100^\circ\text{C}$ と常温において $^1\text{H}$ の $T_1$ を測定すると、Table 1のようになった。相転移温度以下の低温では、 $^1\text{H}$ スピンの拡散により2つの共鳴線が同じ $T_1$ を示す。一方、常温では、2つの共鳴線は異なる $T_1$ を与える。このことから、低温相では、デカメチルフェロセンとアセナフテンキノン間に $^1\text{H}-^1\text{H}$ 双極子結合による秩序が存在していることが分かる。一方、相転移後においては、メチル基の回転とフェロセン5員環の回転により、分子間 $^1\text{H}$ 双極子結合が断ち切られていると考えられる。アセナフテンキノンのプロトンダイナミクスについての詳細な実験結果は、会場にて報告する。

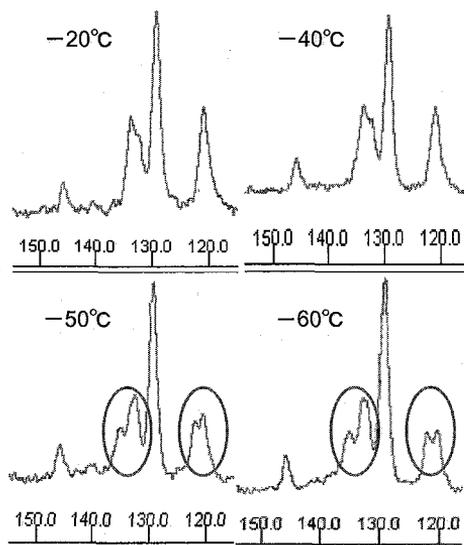


Figure 2. The variation in the spectra of decamethyl ferrocene acenaphtenequinine with indicated temperature.

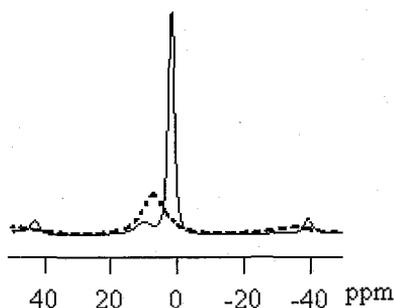


Figure 3.  $^1\text{H}$  NMR spectra of DA and acenaphtenequinine.

Table 1.  $^1\text{H}$  nuclear spin-lattice relaxation time  $T_1$  in DA and acenaphtenequinine.

	DA(s)	acenaphtenequinine(s)
room temperature	8.48	9.24
$-100^\circ\text{C}$	3.11	3.21

## P084 $^{25}\text{Mg}$ 3QMAS NMR 法による珪酸塩ガラス中のマグネシウムの構造解析

(新日鐵先端研) ○下田景士, 齋藤公児  
(日本電子) 根本貴宏

Structural complexity of magnesium in silicate glasses by  $^{25}\text{Mg}$  3QMAS NMR technique

Keiji Shimoda<sup>1</sup>, Takahiro Nemoto<sup>2</sup>, Koji Saito<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation,  
<sup>2</sup>JEOL Ltd.

E-mail: [shimoda.keiji@nsc.co.jp](mailto:shimoda.keiji@nsc.co.jp)

### Abstract

Structural information on divalent cations such as  $\text{Mg}^{2+}$  should have important implications for magmatic liquids because of their abundance in the Earth's interior; nevertheless, little is confirmed about their coordination environments. We report the  $^{25}\text{Mg}$  triple-quantum magic-angle spinning (3QMAS) NMR spectra for several silicate glasses, and show an interesting feature of multiple sites in the glass structures. The present study suggests the highly distorted Mg coordination polyhedra in the glasses. The coordination states are discussed in terms of cation field strength; tetrahedral coordination with decreasing the field strength of the coexisting modifier cation. These results clearly indicate that the 3QMAS NMR technique is a very useful method to analyze the local environments of ions in such non-crystalline solids.

### 《序論》

マグネシウムは地球を構成する元素の中で比較的多く存在しており、その重要性は計り知れない。しかしながらその重要性にもかかわらず、珪酸塩ガラス/融体中の  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの配位環境に焦点を当てた研究は少なく、はっきりしていない。NMR は強力な構造解析法ではあるが、 $^{25}\text{Mg}$  は低共鳴周波数核種であり、且つ四極子核(核スピン  $I = -5/2$ )であるために極めてブロードなシグナルになるという欠点がある。このような場合高磁場マグネットを利用することが大きなメリットになる。本研究では Mg 含有合成珪酸塩ガラスに対して  $^{25}\text{Mg}$  3QMAS 法を適用し、ガラス構造中の  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの局所環境を解明することを目的とした。

*Key words:* silicate glass;  $^{25}\text{Mg}$  3QMAS NMR spectroscopy

しもだけいじ、さいとうこうじ、ねもとたかひろ

## 《実験》

MAS測定及び3QMAS測定はJEOL ECA700 (16.4 T)を使用して行われた。 $^{25}\text{Mg}$ 同位体エンリッチされたガラス試料( $\text{MgSiO}_3$ ,  $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ,  $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$ ,  $\text{Mg}_3\text{Al}_2\text{Si}_3\text{O}_{12}$ ,  $\text{Na}_2\text{MgSi}_2\text{O}_6$ ,  $\text{K}_2\text{MgSi}_2\text{O}_6$ ,  $\text{K}_2\text{MgSi}_5\text{O}_{12}$ 組成)は1300–1700°Cで熔融、急冷して作成された。

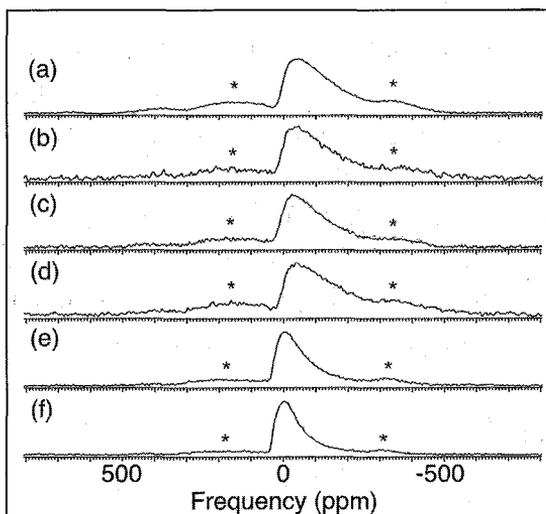
## 《結果と考察》

図1は物材研の930 MHz超高磁場マグネットでのMASスペクトルを示す。アルカリ金属を含む珪酸塩ガラス(e,f)では、それ以外のガラス((a)-(d))に対して、 $^{25}\text{Mg}$ ピーク位置が低磁場側にシフトしており、スペクトル幅も狭く、これらのガラスの構造の違いを明瞭に示している。

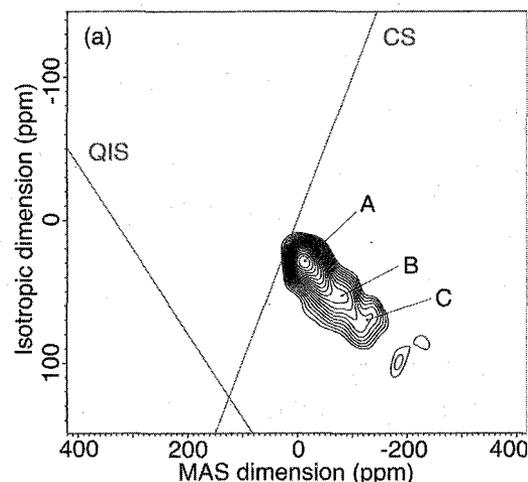
我々はさらに、これらのガラスの $^{25}\text{Mg}$  3QMASスペクトルを取得することで、珪酸塩ガラス中の $\text{Mg}^{2+}$ イオンのマルチサイトを確認することに成功した(図2)。これらのサイトの化学シフトから、 $\text{MgSiO}_3$ ガラスのMg配位数は主に六配位であると結論付けられる。また、これらのマルチサイトは配位数の違いではなく、配位多面体の歪み度合い( $P_q$ )の違いで区別されることが分かった。本研究は回折やXAS法による結論[1,2]とは異なり、MQMAS NMR分光の有効性が示された。

[1] Li et al. (1999), *Can Mineral* 37, 199;

[2] Wilding et al. (2004), *Chem Geol* 213, 281.



**Figure 1.**  $^{25}\text{Mg}$  MAS NMR spectra at 21.8 T for (a)  $\text{MgSiO}_3$ , (b)  $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ , (c)  $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$ , (d)  $\text{Mg}_3\text{Al}_2\text{Si}_3\text{O}_{12}$ , (e)  $\text{Na}_2\text{MgSi}_2\text{O}_6$  and (f)  $\text{K}_2\text{MgSi}_2\text{O}_6$  glasses.



**Figure 2.**  $^{25}\text{Mg}$  3QMAS spectrum at 16.4 T for  $\text{MgSiO}_3$  glass.

P085

## $^{19}\text{F}$ -NMRによる非晶質フルフェナム酸の結晶化過程の解析

(国立衛研) ○阿曾幸男、吉岡澄江、川西 徹

Study on crystallization rate of amorphous flufenamic acid by  $^{19}\text{F}$ -NMR measurements.

(National Institute of Health Sciences) Yukio Aso, Sumie Yoshioka, Toru Kawanishi

The crystallization of flufenamic acid in PVP- and HPMC-solid dispersions was successfully followed by  $^{19}\text{F}$  spin-spin relaxation measurements for flufenamic acid. Crystallization of amorphous flufenamic acid in the HPMC solid dispersion was faster than that in the PVP solid dispersion.  $T_1$  and  $T_2$  values of flufenamic acid indicated that flufenamic acid in the HPMC solid dispersion has higher molecular mobility than that in the PVP solid dispersions. These results suggest that the faster crystallization of flufenamic acid in the HPMC solid dispersion may result from its higher molecular mobility.

### はじめに

水に溶けにくい医薬品を水溶性高分子と非晶質固体分散体化することによって溶解性を改善する試みが多数行われている。非晶質化した医薬品は保存中の結晶化が問題となるため、非晶質医薬品の安定性の簡便な評価法が必要である。本研究においては、フッ素を含有するフルフェナム酸をモデルとし、 $^{19}\text{F}$ -NMRによって観測されるフルフェナム酸のスピンスピン緩和過程を経時的に測定することによって、結晶化過程の解析が可能であるかを検討し、また、高分子と非晶質医薬品の安定化効果をスピンスピン格子緩和時間の変化によって解析し、フッ素含有非晶質医薬品の安定性評価法として $^{19}\text{F}$ -NMRの有用性を明らかにする。

### 実験

フルフェナム酸とPVPあるいはHPMCとの固体分散体は溶融法により調製した。 $^{19}\text{F}$ -NMR測定はNM-25型パルスNMR(日本電子データム)を用いて行った。 $T_2$ の測定はソリッドエコーシグナルをロレンツおよびガウス型の減衰曲線にフィッティングすることにより算出した。 $T_1$ の測定はInversion-recovery法によって行った。

### 結果および考察

PVPとの固体分散体(重量比4:1)中のフルフェナム酸のソリッドエコーシグナル

緩和時間、結晶化、非晶質、 $^{19}\text{F}$ -NMR

あそゆきお、よしおかすみえ、かわにしとおる

を Fig.1 に示す。調製直後はロレンツ型の減衰曲線を示すが、保存試料ではロレンツ型の減衰曲線とガウス型の減衰曲線の和で表され、ガウス型の減衰を示すフルフェナム酸の比率は経時的に増加した。ロレンツ型の減衰を示す非晶質フルフェナム酸が保存中に結晶化し、ガウス型の減衰を示すようになるものと考えられる。ガウス型を示すフルフェナム酸の比率から算出した結晶化度の時間変化は、DSC において観測されるガラス転移温度における比熱変化の大きさから算出した結晶化度の変化と同様であった。従って、 $^{19}\text{F}$  のスピン-スピン緩和測定によって結晶化過程を解析できることが明らかとなった。

固体分散体中のフルフェナム酸の結晶化速度は高分子添加剤によって差があることが示された。Fig. 2 に示すように結晶化度は PVP に比べ HPMC を添加剤として用いた分散体が速やかに増加した。フルフェナム酸の  $T_2$  は HPMC 分散体のほうが大きく、 $T_1$  は HPMC 分散体のほうが小さかったことから、フルフェナム酸の  $T_1$  や  $T_2$  に反映される分子運動性は HPMC 分散体のほうが高いことが示された。添加剤による分子運動性の違いが結晶化速度の違いをもたらしたものと考えられる。

PVP 固体分散体中のフルフェナム酸の  $T_{1\rho}$  は  $T_g$  以下の温度において2つ観察され、異なる運動性を有するフルフェナム酸の存在が示された。大きな  $T_{1\rho}$  の値を示すフルフェナム酸の比率は PVP 含量が上昇とともに大きくなり、PVP と相互作用することにより運動性が抑制されていることが示唆された。

## まとめ

$^{19}\text{F}$ -NMR はフッ素含有非晶質医薬品の結晶化速度に及ぼす添加剤の影響を解析する上で有用であることが明らかになった。

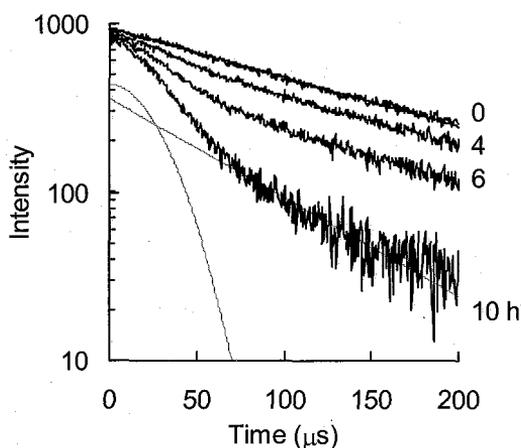


Fig. 1 Solid echo signal of flufenamic acid in PVP solid dispersion stored at 60 °C.

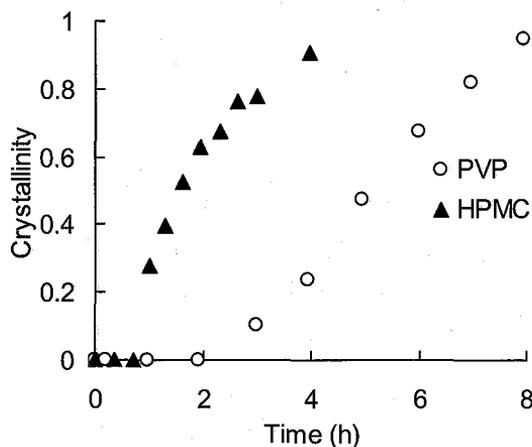


Fig. 2 Crystallization of flufenamic acid in HPMC- and PVP-solid dispersions at 60 °C. Flufenamic acid:polymer=4:1

## 固体 NMR による配位高分子錯体 $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz}]_n$ の 重水素吸蔵状態の解明

○武内大隼<sup>1</sup> 丸田悟朗<sup>1</sup> 武田定<sup>1</sup> 高見澤 聡<sup>2</sup>  
(北大院理・化<sup>1</sup> 横浜市国際総合<sup>2</sup>)

Solid-State NMR Study of Adsorbed  $\text{D}_2$  in Coordination Polymer  $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz}]_n$

H. Takeuchi<sup>1</sup>, G. Maruta<sup>1</sup>, S. Takeda<sup>1</sup>, S. Takamizawa<sup>2</sup>

Department of Chemistry, Graduate school of Science, Hokkaido University.<sup>1</sup>

International Graduate school of Arts and Science, Yokohama City University<sup>2</sup>.

$[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz}]_n$  complex has ability of adsorbing various gases, such as carbon dioxide and hydrogen as molecules. In this study, we studied dynamic property of pyrazine and phenyl group of the Rh complex and adsorption property of  $\text{D}_2$  molecules. Solid state D-NMR measurement of  $\text{D}_2$  adsorbed complex carried out from 20 to 760mmHg at 81K, and from 4.2 to 295K at 760mmHg. The D-NMR signal of adsorbed  $\text{D}_2$  was similar to solid para- $\text{D}_2$ . The solid state D-NMR spectrum of deuterated pyrazine and phenyl group of  $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz-d}_4]_n$  indicated  $180^\circ$  flip flop motion of pyrazine and phenyl groups with activation energy 49kJ/mol and 40kJ/mol respectively.

### 【序】

新たなエネルギー源として、水素が注目を集めている。しかし、水素利用のためには解決しなければならない問題が多い。現在、水素を安全に貯蔵できる水素吸蔵物質の開発が盛んに行なわれている。本研究では、高見澤らにより合成された、水素を分子のまま吸蔵する配位高分子錯体 $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz}]_n$ <sup>1)</sup> (bza:  $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}$ , pyz:  $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2$  以下 Rh 錯体)の、結晶相における動的挙動と水素吸蔵状態を解明することを目的とする。

### 【理論】

吸蔵される  $\text{H}_2$  は量子効果が顕著であり、核スピン量子数  $I$  と回転量子数  $J$  の値の組み合わせによって、核スピン異性体を生じる。水素分子の2つの核スピンの交換に対し、スピン波動関数が対称なものを ortho, 反対称になるものを para と呼んでいる。

$\text{D}_2$  では、重水素原子核は  $I=1$  であるので、粒子の交換に対して全波動関数は対称である必要がある。つまり、回転量子数が  $J=\text{even}$  である  $\text{D}_2$  分子の核スピンは  $I=0,2$  となり、ortho- $\text{D}_2$  であり、 $J=\text{odd}$  の  $\text{D}_2$  分子の核スピンは  $I=1$  で para- $\text{D}_2$  である。また、低温において、ortho- $\text{D}_2$  ( $J=0$ ) では分子が球状であるのに対し、para- $\text{D}_2$  ( $J=1$ ) では二原子分子状(直線分子状)である。その結果、ortho- $\text{D}_2$  では電気多極子モーメントのすべての次数が0になるのに対し、para- $\text{D}_2$  は電気四極子モーメントを持つことになる。そのため、para- $\text{D}_2$  の分子間力が大きくなり、より、吸蔵されやすいことが期待される。

<sup>1</sup> キーワード: 固体 NMR オルソ・パラ水素吸蔵 配位高分子 分子間引力  
たけうちひろとし まるたごろう たけださだむ たかみざわさとし

## 【実験】

### 1. $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz-d}_4]_n$ のピラジン配位子の運動状態

ピラジン基を重水素化した  $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz-d}_4]_n$  を Bruker DSX-300 を用いて、215~295K の範囲で固体重水素核 NMR 測定を行った。

### 2. 固体重水素核 NMR による、 $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz}]_n$ の $\text{D}_2$ 吸蔵状態

$\text{D}_2$  吸蔵状態を固体重水素核 NMR 測定を用いて調べるために、研究室既設のヘリウムクライオスタットにガス導入システムを構築した。測定は共鳴周波数は 46.07MHz、とし、81K で  $\text{D}_2$  圧 20~760mmHg、また  $\text{D}_2$  圧 760mmHg で 4.2~295K の範囲で測定を行った。

## 【結果・考察】

### 1. $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz-d}_4]_n$ のピラジン配位子の運動状態

固体重水素核 NMR 測定によって得られたスペクトルと、ピラジンの  $180^\circ$  フリップフロップ回転運動のシミュレーションを対比させた結果、Figure.1 のようになった。さらに、シミュレーションから見積もられる回転速度のアレニウスプロットから、ピラジンの  $180^\circ$  フリップフロップ回転の活性化エネルギーは 49kJ/mol と見積もられた。当研究室で以前に測定した安息香酸イオンのフェニル基の  $180^\circ$  フリップフロップ回転の活性化エネルギーは 40kJ/mol である。このことから、この錯体ではフェニル基やピラジンの回転運動が起こっており、これが気体分子を吸蔵する際に格子サイズが若干大きくなるという Rh 錯体の柔らかさに対応していると考えられる。

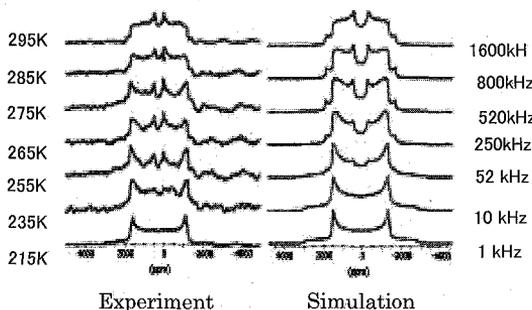


Figure 1 D-NMR spectrum of  $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz-d}_4]_n$  compared with simulation of  $180^\circ$  flip-flop motion between 215K and 295K

### 2. 固体重水素核 NMR による、 $[\text{Rh}_2(\text{bza})_4\text{pyz}]_n$ の $\text{D}_2$ 吸蔵状態

温度 81K,  $\text{D}_2$  圧 760mmHg で測定を行ったところ、幅の狭いピークと幅の広い独特な形をした 2 種類のシグナルを含むスペクトルが得られた。幅の狭いピークは粉末の Rh 錯体の間にある気体  $\text{D}_2$  であると帰属された。また、固体  $\text{D}_2$  の NMR スペクトルと比較した結果、幅の広いピークは吸蔵された para- $\text{D}_2$  であると推測された。

$\text{D}_2$  圧力を変化させて測定し、吸蔵された  $\text{D}_2$  分子のスペクトルの積分強度のプロットを行った結果、以前高見澤らによって報告された  $\text{H}_2$  の吸着等温線と酷似していることが分かった。また、260K 以上では吸蔵された  $\text{D}_2$  の NMR 信号が見えなくなる。

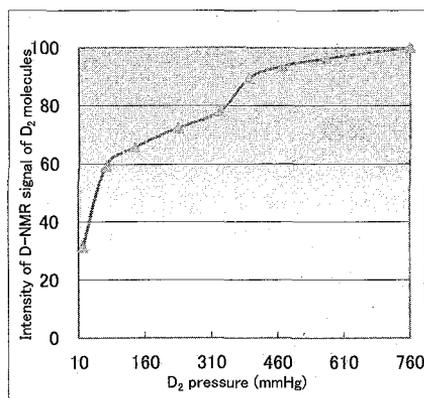


Figure 2  $\text{D}_2$  pressure dependence of D-NMR Intensity of  $\text{D}_2$  molecule adsorbed in Rh complexes at 81K

1) S. Takamizawa, E. Nakata CrystEngComm, 2005,

○黒島寛之 丸田悟朗 武田定  
(北大院理)

Solid-State NMR Study of Spin Crossover in  $[\text{Fe}(\text{bpy})_2(\text{CN})_4\text{Cu}_2]$ 

H. Kuroshima G. Maruta and S. Takeda

Department of Chemistry, Graduate school of Science, Hokkaido University

2D cyanide bridged Fe(II)-Cu(I) complex  $[\text{Fe}(\text{bpy})_2(\text{CN})_4\text{Cu}_2]$  shows gradual spin-crossover behavior between high-spin and low-spin state in the wide temperature region. We studied local structure of  $[\text{Fe}(\text{bpy})_2(\text{CN})_4\text{Cu}_2]$  by solid-state  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectra. Temperature dependence of  $T_1^{-1}$  of  $^1\text{H}$ -NMR suggests that high spin species Fe(II) do not form domains but distribute uniformly in the low concentration region.

## 1) はじめに

スピנקロスオーバー錯体は光、温度、圧力などの外部要因によりスピンの転移を起こす錯体である。本研究でとりあげた二次元 CN 架橋 Fe(II)-Cu(I) 錯体  $[\text{Fe}(\text{bpy})_2(\text{CN})_4\text{Cu}_2]$  についてはメスバウアー分光、磁化率測定の結果から広い領域にわたって low spin(LS,  $S=0$ ) と high spin(HS,  $S=2$ ) の間のスピנקロスオーバー現象を起こすという報告がなされている。しかし、メスバウアー分光では Fe(II):HS が試料内に均一に分布して発生しているのか、あるいはドメインを作って局在化しているのかを判別できない。また、Fe(II)-NC 構造を持つスピנקロスオーバー錯体の報告例は多いが、Fe(II)-CN 構造を持つスピנקロスオーバー錯体の例は極めて少ない。これは CN の炭素原子が強い配位子場を作るためである。そこで今回、固体 NMR 測定を行い、Fe(II)-NC 構造が混在していないかどうかと、高温側で割合が増えている Fe(II):HS が試料内に均一に分布しているか否かについて明らかにすることを試みた。

## 2) 実験

## 合成

試料の合成は文献に従い窒素雰囲気下で行った。ここで、シアン化物イオンについては  $^{13}\text{C}$  N と  $^{15}\text{N}$  をそれぞれ 50% ずつエンリッチした。

## 磁化率測定

## NMR 測定

Bruker DSX-300 を用いて  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ -NMR 測定を行った。

キーワード：固体 NMR スピנקロスオーバー

くろしまひろゆき まるたごろう たけださだむ

### 3) 実験結果

#### 磁化率測定

5K から 300K までの温度領域で直流磁化率を測定した結果、文献値をほぼ再現した。Fig.1 の(a)は反磁性磁化率の補正を行った結果である。300K の磁化率の値から見積もった HS の割合は6%となった。温度上昇にともない  $\chi_{mT}$  が大きくなっているが、これは常磁性成分である Fe(II):HS の濃度が大きくなっているためである。

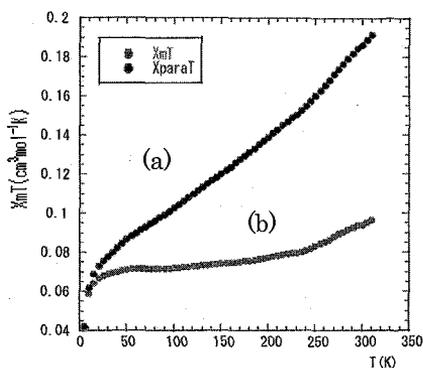


Figure1 Magnetic Susceptibility

#### <sup>13</sup>CNMR 測定

Fig.2 の(a)が MAS-NMR、(b)が CP-MAS-NMR の測定結果である。MAS-NMR、CP-MAS-NMR とともに反磁性化合物の CN に期待されるピーク位置(150ppm 付近)に信号が観測された。CP をかけると高磁場側の 2 つのピークが大きくなったが、この 2 つを Fe(II):LS と結合している CN と帰属した。CP-MAS で 125ppm 辺りにピークが検出された。現時点でははっきりとはわからないが、強度の関係から反磁性の Fe(II)-NC 構造の信号ではないかと考えている。<sup>15</sup>N-NMR 測定においても同様に、反磁性化合物の CN に期待されるピーク位置にピークが検出された。<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N-NMR とともに常磁性の Fe(II):HS の CN のピークが検出できなかったが、Fe(II):HS の濃度が小さく、信号の幅が広く強度が弱いためだと考えている。

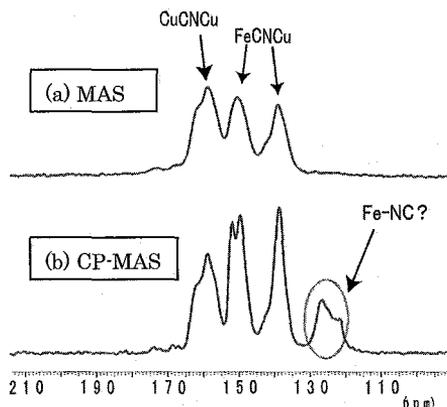


Figure2 <sup>13</sup>C MAS NMR spectra

#### 広幅 <sup>1</sup>H-NMR による緩和時間測定

150K~360K の温度範囲で 30K ごとに測定を行った。270K の測定結果を示す。他の温度でも同様の傾向を示した。各温度において測定した磁化の回復  $\rho(t)$  に対してフィットをかけた結果、どれも以下の式

$$\rho(t) = M_0 \exp\{- (t/T_1)^n\}$$

において n の値が 0.5 程度になった。これは常磁性スピン Fe(II):HS によりプロトンの緩和が支配されていることを示している。測定されたプロトンのスピン格子緩和速度 ( $1/T_1$ ) は、試料の単位体積中の常磁性スピン種 Fe(II):HS の数の 2 乗に比例する。この  $1/\sqrt{T_1}$  の温度依存性は磁化率  $\chi_{mT}$  の温度依存性と対応することがわかった。つまり、Fe(II):HS はドメインを作ることなく試料中に均一に分布している。

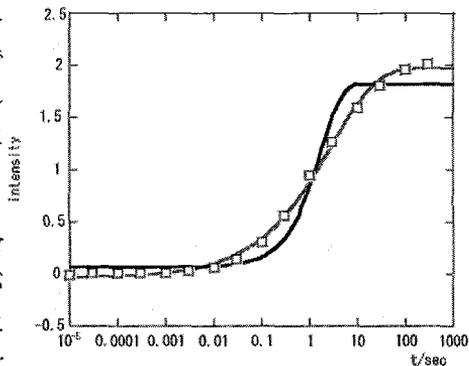


Figure3 relaxation-time of <sup>1</sup>H spectra

ポリマー被覆された反強磁性体ナノ粒子の  
表面スピンによる磁気的特異性

北大院・理 中村 泰規 鷲谷 隆太 丸田 吾朗 武田 定

Surface Spins and Magnetic Ordering of Nano-particles  
Studied by Solid-state NMR

Graduated School of Science, Hokkaido University

Yasunori Nakamura, Ryuta Washiya, Goro Maruta and Sadamu Takeda

For antiferromagnetic nano-particles, surface electron spins cannot be ignored compared with electron spins inside and remnant magnetic moment in the surface of the antiferromagnetic nano-particles plays an important role for magnetism. We prepared several sizes of nano-particles of antiferromagnetic compound of  $\text{NH}_4\text{MnF}_3$  and  $\text{ND}_4\text{MnF}_3$  and measured deuterium NMR spectrum to investigate surface electron spin states and magnetic ordering of nanoparticles.

概要

巨視的なサイズの反強磁性体は、ネール温度より十分低温では上向きスピンと下向きスピンが打ち消しあい、表面のスピンの効果は無視できる。しかし、ナノサイズの粒子では、粒子表面の打ち消されないスピンの割合が無視できなくなり、特異な磁性を引き起こすと考えられている。本研究では、ペロブスカイト構造を持ち、ネール温度 75K をもつ典型的な反強磁性体  $\text{ND}_4\text{MnF}_3$  の、サイズの異なるナノ粒子を逆ミセル法により合成し、広幅重水素核 NMR を測定することにより、表面スピンの状態を調べ、また反強磁性磁気秩序の粒子サイズ依存性を調べた。また、 $\text{NH}_4\text{MnF}_3$  ナノ粒子の交流磁化率の測定により、ネール温度以下の低温で表面スピンの由来する緩和現象を見出した。

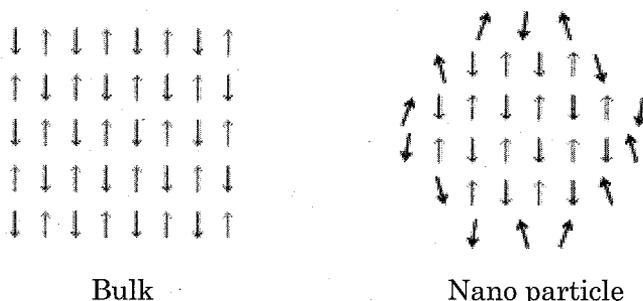


Fig.1 は、 $\text{NH}_4\text{MnF}_3$  の結晶構造を示している。中央のアンモニウムイオンは、電子スピン  $s=5/2$  の  $\text{Mn}^{2+}$  イオン 8 個に囲まれている。重水素化したアンモニウムイオン  $\text{ND}_4^+$  の重水素核は、この  $\text{Mn}^{2+}$  の電子スピンの作る局所磁場を感じる。反強磁

キーワード: ナノ粒子 反強磁性体 固体 NMR

著者: なかむらやすのり わしやりゆうた まるたごろう たけださだむ

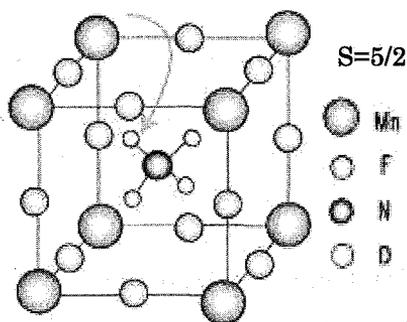


Fig.1 Crystal structure of  $\text{ND}_4\text{MnF}_3$

性転移温度(ネール温度)75K 以下では、重水素核は反強磁性秩序状態の内部磁場を見ることになり NMR スペクトルは幅広くなる。このため、測定にはエコー法を用い、照射するラジオ波の周波数を変化させて測定した。

Fig.2 は、 $\text{ND}_4\text{MnF}_3$  の(a)バルク試料(b)約 30nm のナノ粒子(c)約 10nm のナノ粒子 について 4.2K で測定を行った結果である。全てのエコー信号の包絡線がスペクトルの形状を表す。(a)のバルク試料の D-NMR スペクトルの形状は、結晶構造と磁気構造をもとにしたスペクトルのシミュレーションでほぼ再現できた。これに対し、(b)の約 30nm のナノ粒子では、中央に幅の

狭い成分が見える。この強度は約 7%であるが、これは表面第一層にある  $\text{ND}_4^+$  イオンの割合と一致する。これは、表面の電子スピンは秩序化していないことを示している。30nm ナノ粒子内部は、バルク試料と同様の磁気秩序を示している。

一方(c)の約 10nm のナノ粒子では、4.2K でも D-NMR スペクトルの線幅は狭く、磁気秩序は殆どない。

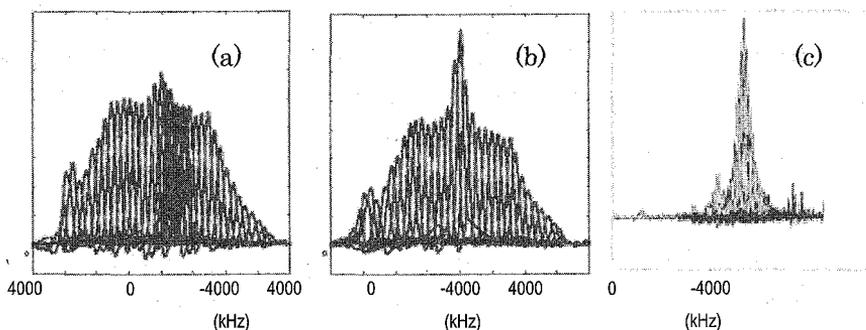


Fig.2 Wide line deuterium NMR of (a)bulk, (b)30nm and (c)10nm  $\text{ND}_4\text{MnF}_3$  at 4.2K

Fig.3 は、バルク試料と約 10nm ナノ粒子の D-NMR スペクトルの半値幅を温度に対してプロットしたものである。バルク試料がネール温度近傍で反強磁性転移による典型的な臨界現象を示すのに対し、約 10nm のナノ粒子では、4.2K でも内部磁場が小さく、殆ど消滅している。このことから、30~10nm の間に、反強磁性磁気秩序を保てる限界のサイズがあるということがわかる。

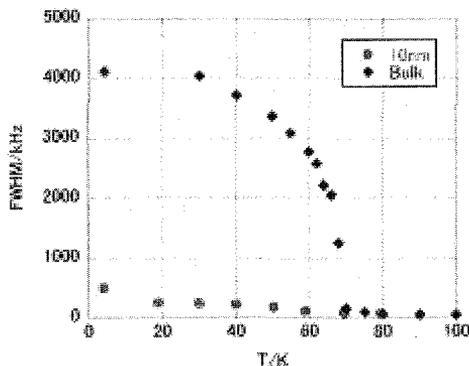


Fig.3 Temperature dependence of internal magnetic field.

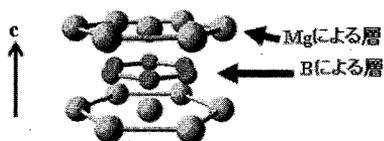
MgB<sub>2</sub>の常伝導相に関する固体NMRによる研究京都大学大学院 理学研究科 化学専攻<sup>1</sup>物質・材料研究機構 ナノ計測センター<sup>2</sup>○山路俊樹<sup>1</sup>、村上美和<sup>2</sup>、清水禎<sup>2</sup>、竹腰清乃理<sup>1</sup>Investigation of the normal phase of MgB<sub>2</sub> by solid-state NMR spectroscopyDepartment of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University<sup>1</sup>,

National Institute for Materials Science (NIMS), Advanced Nano

Characterization Center<sup>2</sup>Toshiki Yamaji<sup>1</sup>, Miwa Murakami<sup>2</sup>, Tadashi Shimizu<sup>2</sup>, Kiyonori Takegoshi<sup>1</sup>

Abstract: <sup>11</sup>B NMR measurements have been performed in commercially available MgB<sub>2</sub> powder sample in the magnetic fields between 6.3 to 21.9 T. Because of the higher resolution with a Knight shift, the 21.9 T solid-state <sup>11</sup>B NMR enabled us to interpret the axially symmetric powder-pattern spectrum with the NMR parameters (Knight shift and quadrupole coupling). The spectral simulations for the other magnetic fields using the obtained parameters at 21.9 T, furthermore, successfully reproduced the experimental spectra and its magnetic-field dependence.

[背景] MgB<sub>2</sub>は2001年に青山学院大学のグループにより、超伝導物質である事が発見され[1]、それまで知られていた金属化合物が超伝導になる転移温度に比べ約2倍も高温の39 Kで超伝導になることが確認された。下図にMgB<sub>2</sub>の結晶構造を示す。図に示す通り、MgB<sub>2</sub>は結晶c軸方向にMg層とB層が交互に積み重なった構造を持ち、六方晶系の空間群に分類される。このように、その高い超伝導転移温度に加え、シンプルな結晶構造のため、基礎から応用的研究まで多くの研究が行われている。超伝導層については様々な研究が行われおり、その機構について解明がなされている。一方で、MgB<sub>2</sub>の常伝導状態における電気伝導機構については、あまり注目されてこ

Figure 1. Crystal structure of MgB<sub>2</sub>.

Keywords: solid-state NMR, MgB<sub>2</sub>, super high-magnetic field, normal phase, <sup>11</sup>B NMR

やまじ としき、むらかみ みわ、しみず ただし、たけごし きよのり

なく、詳細な研究はほとんど行われていない。固体NMR分野においては、Canfieldらのグループにより常伝導相における $^{11}\text{B}$  NMR測定と第一原理計算が行われている[2]。しかし、電気伝導の異方性については様々な研究結果があり、未だ決定されていないのが現状である。我々は $\text{MgB}_2$ の常伝導機構を明らかにすべく、近年ますます発展を遂げている固体NMR法を用いた研究を行った。NMRパラメータの中でも、ナイトシフトは核スピンと伝導電子スピンの相互作用由来であるため、伝導状態を直接反映している。そこで、 $^{11}\text{B}$ のナイトシフトの異方性に注目し、詳細な常伝導機構を明らかにしようとするのが我々の研究目的である。 $^{11}\text{B}$ のスペクトルは四極子の二次の相互作用によっても影響される為に、四極子とナイトシフトの分離が必要であり、本研究では、四極子の二次相互作用が磁場に反比例することを用いて分離を試みた。[試料及び測定方法]  $\text{MgB}_2$ 粉末サンプルはアルドリッチ社から購入したものをそのまま用いた。6.3 から 21.9 Tの広い磁場範囲で単純な1パルスFID測定(30° パルス)を行い、フーリエ変換してスペクトルを得た。

[実験結果及び解析] 下右図に、21.9 Tで得られた $^{11}\text{B}$  NMR実測スペクトル (上) とシミュレーション結果 (下) を示す。低磁場測定ではブロードなスペクトルであったが、超高磁場での測定により高い分解能のスペクトルを得る事ができ、線形シミュレーションを行い、パラメータを帰属することができた。軸対称性を持つ二次の四極子相互作用とナイトシフトを反映した広幅なスペクトルを得る事ができた。 $|+1/2\rangle \leftrightarrow |-1/2\rangle$ のセントラル遷移を観測しているため一次の四極子相互作用による効果はない。シミュレーションでは、テンソルパラメータの軸対称性及びセントラル遷移のみ観測という仮定の下[3]、双極子相互作用は最近接B核のみ考慮に入れた。値は過去の文献値を用いた[2]。

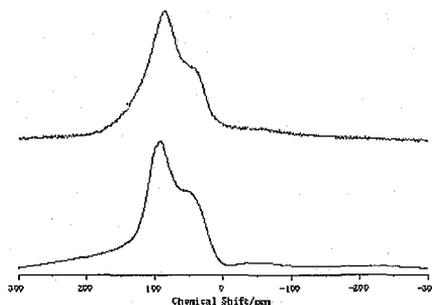


Figure 2.  $^{11}\text{B}$  NMR spectrum at 21.9T.

Top: Experimental, Bottom: Simulation.

21.9Tで得られたNMRパラメータを用いたシミュレーションにより、低磁場でのスペクトルも再現することができた。以上のように、本研究では21.9 Tもの超高磁場固体NMR測定により、精度良く $\text{MgB}_2$ のNMRパラメータについて異方性を含めて得ることができ、スペクトルの磁場変化も再現することができた。

[Reference]

- [1] J. Nagamatsu et al., *Nature* (London). 410, 63(2001).
- [2] S. H. Baek et al., *Phys. Rev B*. 66, 104510(2002)、E. Pavarini et al., *Supercond. Sci. Technol.* 16, 147(2003)、S. Serventi et al., *Supercond. Sci. Technol.* 16, 152(2003).
- [3] W. H. Jones et al., *Phys. Rev.*, 132(5), 1898(1963).

超偏極  $^{129}\text{Xe}$  NMR による Low-k 膜用多孔質シリカ材料のポア評価  
 産業技術総合研究所 光技術研究部門<sup>1</sup>、次世代半導体研究センター<sup>2</sup>  
 ○服部峰之<sup>1</sup>、早水紀久子<sup>1</sup>、平賀隆<sup>1</sup>、山本典孝<sup>1</sup>、高田省三<sup>2</sup>、秦信宏<sup>2</sup>

Characterization of mesoporous silica for low-k membrane using hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$  NMR.

<sup>1</sup>Photonics Research Institute, <sup>2</sup>Advanced Semiconductor Research Center,  
 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology.  
 Mineyuki Hattori<sup>1</sup>, Kikuko Hayamizu<sup>1</sup>, Takashi Hiraga<sup>1</sup>, Noritaka Yamamoto<sup>1</sup>,  
 Shouzou Takada<sup>2</sup>, and Nobuhiro Hata<sup>2</sup>.

$^{129}\text{Xe}$  NMR spectra of natural abundant xenon gas trapped in fully dehydrated mesoporous materials with pore sizes smaller than 2 nm in diameter were observed under atmospheric pressure in the temperature range between 168 and 373 K. The diameters of three porous materials studied in this paper were 0.5, 1 and ~ 2 nm for molecular sieves 5A and 13X and synthesized mesoporous silica, respectively. The samples were fully dehydrated using an ultra-high vacuum (UHV) system and xenon gas was introduced into pre-cooled state at 168 K just above the boiling point of xenon. The  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra were observed by increasing temperature and the  $^{129}\text{Xe}$  shift, line width and area intensity were observed at each temperature for the three samples under atmospheric pressure. The behaviors of xenon atoms in small pores observed in equilibrium states can provide important information on relationships between the pore structure and  $^{129}\text{Xe}$  chemical shift.

#### [Introduction]

Advanced materials with nano-structures, such as nano-particles, permselective membranes, and mesoporous silica for low-permittivity are of current interest for adding new functions to materials of conventional compositions. One of expected methods of measuring the pore sizes and interactions between trapped species and inner-wall of the pores is hyperpolarized (HP)  $^{129}\text{Xe}$  NMR techniques. HP  $^{129}\text{Xe}$  NMR techniques have been applied to probe porosity of mesoporous silica and the pore size is known to relate with the  $^{129}\text{Xe}$  chemical shift. Since the Van der Waals radius of xenon is known to be 0.216 nm and the kinetic diameter is 0.396 nm, the possible pore size to absorb xenon should be larger than 0.4 nm in diameter. Then the mean pore diameters ranging from 0.4 to 300 nm are the possible target to show the relationship experimentally. The HP  $^{129}\text{Xe}$  gas can be utilized to enhance the sensitivity of the  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra. The applications of the HP  $^{129}\text{Xe}$  NMR to the mesoporous materials are also reported [1-5].

We have developed an apparatus to produce the laser induced hyperpolarized (HP) Xe gas [6], and tried to apply it to a self-assembled porous silica sample, which is known as a candidate of low-dielectric constant materials for interconnects in future ultra-large scale integrated circuits (ULSIs) [7]. The self-assembled porous silica sample was synthesized into powder form for the present experiment from electric-grade silica precursor to minimize metal impurities. The sample consisted of Si, O and H and had monodisperse mesopores. Since these mesoporous materials usually possess a large amount of adsorbed water inside, it is inevitable to treat the sample under ultra-high vacuum at elevated temperature for a long time so as to expel the adsorbed water entirely just before introducing HP xenon gas. After pumping out of the sample powder (~ 0.25g) under high vacuum ( $10^{-6}$  Pa), we started to measure HP  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra by varying the temperature. Since the pore size is small and the diameter is ~ 2 nm, the comparison was focused on materials having small pore sizes of commercial available molecular sieves 5A (0.5 nm) and 13X (1 nm).

The  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra for mesoporous materials measure the averages of the residence times or numbers of xenon atoms in the mesopores under gas-liquid equilibrium at each temperature. The residence times or numbers in the mesopores vary depending on temperature and pressure, which influences the  $^{129}\text{Xe}$  chemical shift. When a sealed NMR sample tube is used, the change of temperature brings the inner pressure change. It is really desirable to measure the temperature dependent  $^{129}\text{Xe}$  NMR under a constant pressure. Fortunately, we observed  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra of the well-fabricated impurity-free mesoporous silica used for the low-k membrane, together with the well-known porous molecular sieves 5A and 13X under atmospheric pressure. The  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectrum for the fully-dried molecular sieve 4A gave weak signals around free gas signal to show that the adsorption inside the pore is impossible because the pore size.

超偏極、高感度化、光ポンピング、Low-k、ポア

はっとりみねゆき、はやみずきくこ、ひらがたかし、やまもとのりたか、たかだしょうぞう、はたのぶひろ

## [Experimental Procedure]

**Samples:** The self-assembled porous silica sample was prepared from acidic silica sol mixed with the cationic template of cetyltrimethylammonium chloride [7]. Metal impurities in the sample was minimized by using the electronic-grade silica sol. The sample was fine powder named as Lowk1 and the amount of the fully degassed sample was  $\sim 0.27$  g. Molecular sieves of 5A and 13X were purchased from Nacalai Tesque, Inc. as pellet and the fully degassed sample of 0.39 and 0.30g of 5A and 13X were used, respectively.

**Degassing procedure:** Fully dehydrated samples were prepared as follows. The sample was put in a 10-mm NMR sample tube and connected to a vacuum line, gradually evacuated and then the temperature was increased to 200 °C and kept over 1 week until the pressure became below  $5 \times 10^{-6}$  Pa by an ultra-high vacuum system (UHV) on a Varian V70 turbo molecular pump.

**Generation of hyperpolarized xenon gas:** We have developed a practical device that uses a batch method to provide a continuous supply of HP xenon gas with a sufficient rate of polarization for practical NMR/MRI experiments [6]. The HP xenon gas was generated by a Toyoko Kagaku HPXE2101S-1/2. The optical pumping cell was heated to 140 °C in a magnetic field of approximately 12 mT and irradiated by circularly polarized light of  $794.75 \pm 0.13$  nm using a 27W line-narrowed semiconductor laser (PD-LD: LuxxMasterTM, LML-794.7B-05) and a quarter-wave plate (CVI: QWPO-795-08-4-R10). After 30 minutes, the HP xenon gas was produced at a polarization rate of 2 to 3% of  $^{129}\text{Xe}$  from the mixed gas of the Xe (98%) and  $\text{N}_2$  (2%). The HP xenon gas was transported to a 60-ML plastic syringe.

**Introduction of xenon gas:** The sample temperature was set below 168 K before the introduction of the xenon gas under vacuum. The room-temperature HP xenon gas was introduced by a 60-ML plastic syringe by using a home-made apparatus shown in Figure 1. The residual xenon gas in the syringe controls the inner pressure as an atmospheric pressure. The HP xenon gas introduced at 168 K lost the HP property in a short period but large amount of natural abundant  $^{129}\text{Xe}$  gas was trapped in the enormous number of pores, and the intense  $^{129}\text{Xe}$  NMR signal was detected. The temperature was gradually increased without further addition of xenon gas.

**$^{129}\text{Xe}$  NMR measurements:** The  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra were measured by a Tecmag Apollo equipped by a wide-bore 6.3 T SCM at the frequency of 74.7 MHz. The 90 degree pulse width was 30  $\mu\text{s}$ . The temperature dependent  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra were measured from 168 to 373 K. Since the spin-lattice relaxation time  $T_1$  was found to be short for the 5A and 13X, the  $^{129}\text{Xe}$   $T_1$  was measured to determine the parameters for the quantitative measurements at each temperature as shown in Figure 2. Each spectrum was observed with 64 accumulations at 90° pulse with 2 s repetition time. Since the longest  $T_1$  of  $^{129}\text{Xe}$  in 5A and 13X was  $\sim 0.35$  s, the magnetization was fully recovered at each scan. The tuning of the probe was adjusted at every temperature because of the wide temperature range observation. Before measuring at each temperature, the sample was kept at least 30 m. The measurement of the  $T_1$  for Lowk1 was possible from the intense signal in the low temperature region and the longer  $T_1$  was observed for the metal free sample as shown in Figure 2. The much longer  $T_1$  of the broad signals at the elevated temperatures was not attempted to measure and the quantitative observation was not conducted at the increased temperature region.

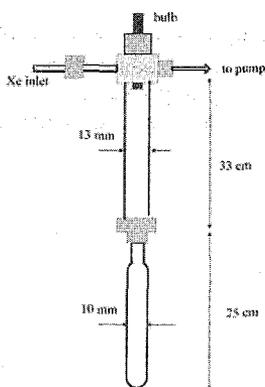


Figure 1. The sample cell to introduce Xe gas.

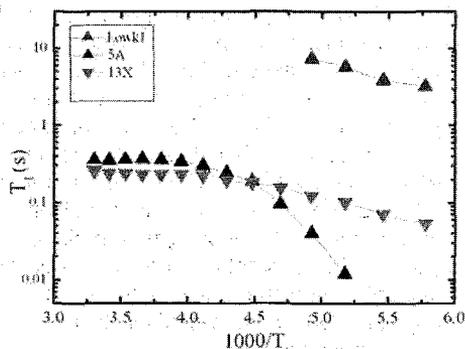


Figure 2. The spin-lattice relaxation time  $T_1$  was plotted against the temperature

## [RESULTS]

**$^{129}\text{Xe}$  spectral patterns from 173 to 373 K:** When the HP xenon gas was introduced into the samples at room temperature, the  $^{129}\text{Xe}$  NMR signal always moved a little to the lower field side to reach an equilibrium state and the life-time of the HP xenon was shorter in 5A and 13X compared with Lowk1. Into the pre-cooled samples at 168 K the HP xenon gas was introduced and the  $^{129}\text{Xe}$  NMR signal was adjusted to absorption mode. The broad signal in the initial stage moved to the lower field with narrowing to approach equilibrium states, accompanied by the gradual decrease of signal intensity and the HP  $^{129}\text{Xe}$  signal disappeared. After a little while, at the same position the normal  $^{129}\text{Xe}$  signal came out and gradually the intensity increased in the opposite phase to approach to equilibrium states in intensity.

The measurements of the normal  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra in the absorption phase were started from 173 K and the amount of xenon atoms decreased as the temperature increased. Since the sample cell was not strictly sealed, the gas was lost from the cell at the higher temperatures. The  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra for the 5A, 13X and Lowk1 are shown in Figures 3, 4 and 5, respectively. The changes were continuous in the spectra for the 5A according to the temperature increase, that is, the decreases of the signal intensity, narrowing the line width and the higher field shift. On the other hand, the  $^{129}\text{Xe}$  spectral patterns for the 13X varied in a quite different manner. The signal intensity and the position changed in the similar way as the 5A until 223 K and then the signal became narrower between 233 and 263 K and the signal intensity became smaller above 323 K. The  $^{129}\text{Xe}$  spectrum of the Lowk1 at 173 K was an intense signal and able to observe by one scan until 213 K as shown in Figure 5 (a) which can afford quantitative peak areas. As the temperature increased, the signal became broader and the accumulations were necessary to obtain reasonable signal to noise ratio. The accumulation of the spectra was necessary for the Lowk1 as shown in Figure 5(b) up to 333K.

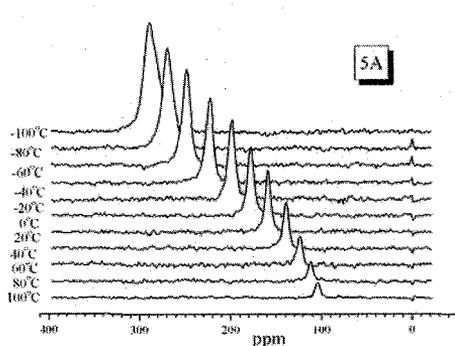


Figure 3. The temperature dependent  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra trapped in the 5A measured under the atmospheric pressure. The HP xenon gas was trapped at 168K. Since the life time of the hyperpolarization was short, the enhancement disappeared in a short time. The normal  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra were measured with the increase of the temperature under the condition that a small amount of xenon gas remained in the syringe. The atmospheric pressure was almost constant during the whole day. The measuring conditions:  $90^\circ$  pulse, repetition time 1.1 s, and 64 accumulations.

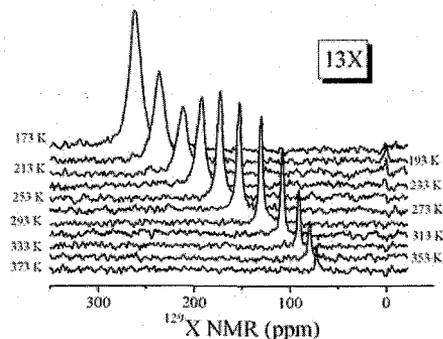


Figure 4. The temperature dependent  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra of 13X. The measuring procedures were similar to 5A. The measuring conditions:  $90^\circ$  pulse, repetition time 2s, and 64 accumulations.

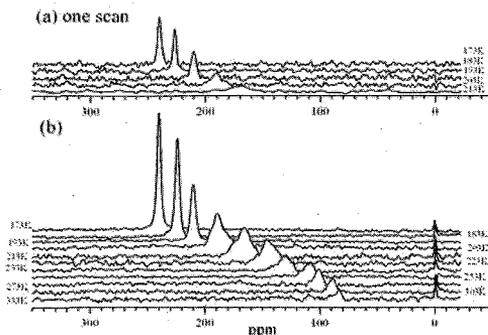


Figure 5. (a) One-scan  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra of Lowk1 measured from 273 to 213K. The line broadening of the windows function were 100 Hz from 273 to 203K spectra while 300 Hz for 213K spectrum. Since the signal intensities decreased at the higher temperatures, the one-scan spectra were not observed. (b) The accumulated  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra of Lowk1. Since the  $T_1$  is much longer compared with 5A and 13X, the measuring conditions were varied to obtain reasonable S/N spectra as following; at 173 K,  $45^\circ$  pulse, repetition time 10 s, 40 accumulations, at 213 K,  $45^\circ$  pulse, repetition time 12 s, 40 accumulations, at 273 K,  $60^\circ$  pulse, repetition time 20 s, 80 accumulations, and at 333K,  $60^\circ$  pulse, repetition time 120 s and 320 accumulations (overnight accumulation)

**$^{129}\text{Xe}$  shift, line width and area intensity:** As shown in Figures 3-5, the  $^{129}\text{Xe}$  peak positions moved to the higher field as the temperature increased and temperature dependencies of the  $^{129}\text{Xe}$  shift referred to gas signal are shown in Figure 6. Since the life time of HP xenon was relatively long in Lowk1, the observation of the  $^{129}\text{Xe}$  shifts were made by introducing the room temperature HP xenon gas into the temperature setting NMR cell. Waiting  $\sim 10$  min, the  $^{129}\text{Xe}$  shift values were obtained as shown in Figure 6. In the low temperature region, the HP  $^{129}\text{Xe}$  shifts were always a little higher field indicating the xenon gas was not equilibrated. Since the temperature dependency in the  $^{129}\text{Xe}$  shift was smaller in the medium temperature region, the agreements were better for the measurements in the normal and HP  $^{129}\text{Xe}$  NMR. Then the HP  $^{129}\text{Xe}$  shift data at the higher temperatures were added where the sensitivity was too low to observe the normal  $^{129}\text{Xe}$  signals.

The changes in the line widths are plotted versus temperature in Figure 7. Generally, 5A is composed of Ca, Na, Al, O and H, and 13X is composed of Na, Al, Si, O and H without description paramagnetic metals. The wide line width of the 5A and 13X at 173 K can be assumed to be influenced by paramagnetic impurities, which is consistent with the short  $T_1$  given in Figure 2. Since the synthesis of the Lowk1 was made using the electronic-grade starting materials, the signals between 173 and 193 K were extremely sharp as shown in Figures 5 and 7, and the longer  $T_1$  values in Figure 2 are consistent with a narrower line width. The area intensities calculated from the line width and the peak height are plotted versus temperature in Figure 8, where the area was normalized to the signal observed at 173 K.

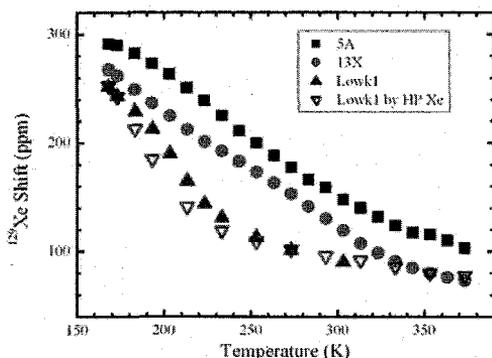


Figure 6. The temperature dependence of the  $^{129}\text{Xe}$  NMR shifts of 5A (solid square), 13X (solid circle) and Lowk1 (solid triangle) by the normal xenon. For the Lowk1 sample, the  $^{129}\text{Xe}$  shifts measured by introduction of the HP  $^{129}\text{Xe}$  at each temperature were added (open triangle). In the lower temperatures the HP  $^{129}\text{Xe}$  shifts showed a little higher field side probably due to insufficient time to wait until the equilibrium state.

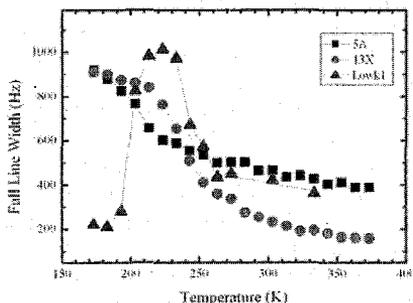


Figure 7. The temperature dependence of the  $^{129}\text{Xe}$  full line width at half height. From the line width and the intensity, the signal area was calculated and their temperature dependencies are shown in Figure 8.

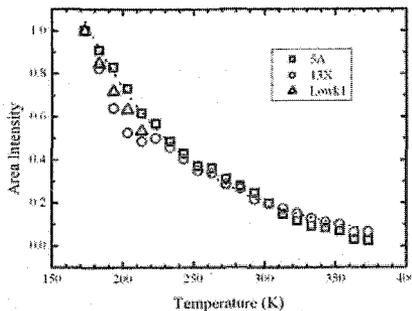


Figure 8. The signal areas normalized to the area measured at 173 K are plotted versus temperature. The signal areas of Lowk1 determined from the one-scan spectra are shown. The simulated exponential decay curve is shown for the molecular sieve 5A.

### [Discussion]

The melting and boiling points of xenon is known to be 161.4 and 165.1 K, respectively. By using the sample cell in Figure 1, we observed  $^{129}\text{Xe}$  NMR spectra by introducing the HP xenon gas into the pre-cooled empty cell at 160 K. The van der Waals radius of xenon gas is known to be 0.216 nm and the pore diameter of 5A is designed to be 0.5 nm. The  $^{129}\text{Xe}$  NMR shift of 291 ppm for the xenon confined in 5A at 168 K in the present study is very close to the shift of liquid xenon in free space. As the temperature increased, the ratio of the xenon confined in a pore of 5A relative to the gas in free space decrease due to adsorbed and gas phase equilibrium. The  $^{129}\text{Xe}$  shift moved to the higher field because of the larger contribution of gas in free space or the decrease of resident time or number inside the pore. At the same time the line width became narrower almost monotonously with the temperature increase as shown in Figure 7. The area intensity of the  $^{129}\text{Xe}$  signals can be assumed to be proportional to the total number of the resident xenon atoms in the 5A pores. As shown in Figure 8, the area intensity for the 5A decreased almost exponentially as the temperature increased under the atmospheric pressure. The xenon atoms trapped in the 5A pores at 173 K gradually moved to free space as the temperature increased. The residence number in the pores decreased exponentially, and the  $^{129}\text{Xe}$  shift moved to the higher field side also exponentially. The  $^{129}\text{Xe}$  shift can be assumed to be proportional to the resident number of xenon atoms in the 5A pores under the atmospheric pressure.

The pore size of 13X is designed to be larger than 5A and  $\sim 1$  nm. The possible number of xenon atoms to enter a 13X pore is twice as that of 5A and it is true for the present 13X. A half of the xenon atoms trapped in a 13X pore at 168 K moved to free space with the temperature increase. Around 223K the area intensity became a half of that in the initial temperature 173 K as shown in Figure 8. At the same time, the line width became narrower as shown in Figures 4 and 7. Above 223K a xenon atom in a 13X pore gradually moves to free space, and the area intensity for the resident xenon atoms decrease exponentially, the line width ( $\sim 910$  Hz) became sharper ( $\sim 750$  Hz) at the same time. In the lower temperatures the two states coexist and above 230 K only the state that xenon atoms occupies a half of the space in the pores under an atmospheric pressure. At 373 K the line width of 13X was much narrower ( $\sim 160$  Hz) than 5A ( $\sim 400$  Hz), and this suggests that the xenon gas in the 13X pore can move more freely in the wider space than 5A pore. The temperature dependent shift, line width and area intensity of  $^{129}\text{Xe}$  NMR for molecular sieves 5A and 13X under atmospheric pressure can be interpreted consistently by adsorbed and gas phase equilibrium. With the temperature increase the  $^{129}\text{Xe}$  shift approached to an equilibrium value for the molecular sieves.

Different from the molecular sieves, (1) the Lowk1 has not highly-concentrated paramagnetic metal impurities in it, and (2) the pores of the Lowk1 are in two-dimensional-hexagonally-ordered cylindrical shapes with the diameter of  $\sim 2$  nm. The  $^{129}\text{Xe}$  shift of the Lowk1 at 168 K was a little higher field (15 ppm) than that of 13X and the differences became larger as the temperature increased ( $\sim 60$  ppm between 233 and 283 K), and again became smaller. Above 353 K the  $^{129}\text{Xe}$  shifts of 13X and the Lowk1 were coincident. Since the pore sizes of Lowk1 are larger than 13X, the number of xenon atoms absorbed in the Lowk1 pores should decrease faster as the temperature increases. The steeper decrease of the  $^{129}\text{Xe}$  shift (higher field shift) with the temperature corresponds to the quicker decrease of the resident number inside Lowk1 pores between 183 and 253 K. The resident number decreased gradually as the increase of temperature above 260 K. Since the HP  $^{129}\text{Xe}$  signal for the resident xenon

was observed at 373 K at the equilibrated position, Lowk1 owns the adsorptive affinity for xenon gas even at the high temperatures.

The line width of Lowk1 was extremely sharp (200 Hz) at 173 K. With the temperature increase, the line width became very broad to be ~ 1,000 Hz between 233 and 253 K and narrowed to be ~ 400 Hz above 263 K. The broadening occurred in the same temperature region where the  $^{129}\text{Xe}$  shift changed largely. Then the wide line width can be explained as inhomogeneous width by the distribution of the  $^{129}\text{Xe}$  shifts. Actually, at 223 K the line width in ppm unit was 13.5 and the change of the shift between 223 and 213 K was 21 ppm. The line width at the equilibrium state at high temperatures was ~ 360 Hz and broader than that at 173 K where the distribution of the environment around xenon atoms is smaller. In the high temperature region the line width of a xenon atom in the 13X pore was 160 Hz. Then the broader line wide for a xenon atom in the Lowk1 can be assumed the distribution of the  $^{129}\text{Xe}$  shifts induced by the two-dimensional environments inside Lowk1 pores.

Finally, since we can utilize easily HP  $^{129}\text{Xe}$  [6], it is worthwhile to discuss shortly the merits of the HP  $^{129}\text{Xe}$  NMR for the present samples. Since the life-time of the HP is sensitive to paramagnetic materials, the HP of the xenon in the pores of 5A and 13X were lost in a short period after the introduction of the xenon gas, especially at the low temperatures. Even at the room temperature ~ 20 s was necessary to reach the equilibrium state for the  $^{129}\text{Xe}$  shift of the 5A after the introduction of the room-temperature HP Xe gas. The  $T_1$  of  $^{129}\text{Xe}$  NMR for the metal free Lowk1 sample is extremely longer, the life time of the HP was also longer. Then it was possible to obtain the HP  $^{129}\text{Xe}$  spectrum in the equilibrium state at 173 K after the introduction of the room-temperature gas in the pre-cooled sample.

From the Figure 5, the sensitivity of the normal  $^{129}\text{Xe}$  spectra around the room temperature was poor for the sample amount of 0.27 g. For the practical low-k silica samples, the sample amount is critical. Then the tests were made to decrease the sample amount and the reasonable sensitivity was obtained at room temperature for the sample of 0.02 g by using the HP  $^{129}\text{Xe}$  under atmospheric pressure. The evaluation of the pore structures from the  $^{129}\text{Xe}$  shift is very important as a practical method of measurement in material science near room temperature under atmospheric pressure. In the present experiments, the  $^{129}\text{Xe}$  shifts of the normal and HP xenon was demonstrated to be the same. Although the line width,  $T_1$  and also the life time of the HP were affected by the paramagnetic species, the  $^{129}\text{Xe}$  shift trapped in the pores is mainly determined by the pore structures and number of resident xenon atoms at every temperature for the porous materials having small pore sizes.

In conclusion, a  $^{129}\text{Xe}$  NMR study on mesoporous materials under atmospheric pressure has established. Combination of UHV treatment of the sample and the hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$  NMR techniques at atmospheric pressure indicate that estimation of the size and distribution of pore by measurements of both chemical shift and line width. The present method for evaluation of nano-particles, permselective membranes and mesoporous materials for low-permittivity are promising to know the pore structures averaged in whole samples in addition to the local structures.

#### [References]

- [1] Pietrass, T.; Gaede, H. C. *Advanced Materials* 1995, **7**, 826.
- [2] Moudrakovski, I. L.; Terskikh, V. V.; Ratcliffe, C. I.; Ripmeester, J. A.; Wang, L.-Q.; Shin, Y.; Exarhos, G. J. *J. Phys. Chem. B* 2002, **106**, 5938.
- [3] F. Guenneau, M. Nader, P. Salamé, F. Launay, V. Semmer-Herledan and A. Gédéon *Catalysis Today* 2006, **113**, 126.
- [4] (a) Nossov, A.; Haddad, E.; Guenneau, F.; Mignon, C.; Gédéon, A.; Grosso, D.; Babonneau, F.; Bonhomme, C.; Sanchez, C. *Chem. Commun.* 2002, **21**, 2476. (b) Nossov, A.; Haddad, E.; Guenneau, F.; Gédéon, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003, **5**, 4473.
- [5] Nossov, A.; Guenneau, Springuel-Huet, M.-A.; Haddad, E.; Montouillout, V.; Knott, B.; Engelke, F.; Fernandez, C.; C.; Gédéon, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003, **5**, 4479.
- [6] (a) Hattori, M. *Engineering Materials*, 2004, **52**, 86 (in Japanese). (b) Ohtake, N.; Murayama, M.; Hiraga, T.; Hattori, M.; Homma, K. *Japanese Patent* 2003-4304, January 10, 2003.
- [7] Hata, N.; Negoro, C.; Yamada, K.; Kikkawa, T. *Jpn. J. Appl. Phys.* 2004, **43**, 1323.

## 二次元 NMR 法による常磁性試料の固体重水素 MAS NMR スペクトルの分離

金沢大院自然<sup>1</sup>, 物材機構<sup>2</sup> ○水野 元博<sup>1</sup>, 鈴木 陽<sup>1</sup>, 遠藤 一央<sup>1</sup>,  
村上 美和<sup>2</sup>, 丹所 正孝<sup>2</sup>, 清水 禎<sup>2</sup>

Separation of <sup>2</sup>H MAS NMR Spectra in Paramagnetic Compounds by Two-Dimensional Spectroscopy

<sup>1</sup>Graduate School of Natural Science and Technology,

Kanazawa University, Kanazawa Kakuma-machi 920-1192, Japan

<sup>2</sup>National Institute for Materials Science, 3-13 Sakura, Tsukuba, Ibaraki 305-0003, Japan

Motohiro Mizuno<sup>1</sup>, You Suzuki<sup>1</sup>, Kazunaka Endo<sup>1</sup>, Miwa Murakami<sup>2</sup>, Masataka Tansho<sup>2</sup>,  
Tadashi Shimizu<sup>2</sup>

The technique of <sup>2</sup>H MAS NMR spectroscopy is presented for the investigation of molecular dynamics in paramagnetic materials. For paramagnetic samples with several structurally nonequivalent sites, the isotropic paramagnetic shift due to the Fermi-contact interaction is useful for separation of the spinning sideband patterns of the deuterons in the different sites. The use of two-dimensional NMR spectroscopy for separation of the spinning sidebands is discussed. The two-dimensional single-quantum and double-quantum <sup>2</sup>H MAS NMR spectra were measured for paramagnetic compounds. The observed two-dimensional <sup>2</sup>H MAS NMR spectra were well reproduced by the simulation including paramagnetic effects and molecular motions. For the further separation of <sup>2</sup>H MAS NMR spectra in the different sites, application of a strong field of 21.8 T to this technique is discussed.

【序】固体重水素 NMR 法によってさまざまな物質の分子ダイナミクスの研究が行われている。異なったサイトの重水素の MAS NMR スペクトルを等方性シフトによって分離し、それぞれのサイトのダイナミクスを解析できる二次元 NMR 法も提案されている<sup>1)</sup>。ただし、これらの方法の常磁性物質への応用はまだ検討されていない。我々はこれまで、重水素 NMR のスピニングサイドバンドスペクトルの分子運動による線形変化を調べ、反磁性物質だけでなく常磁性物質においてもスピニングサイドバンドスペクトルのシミュレーション解析によって分子運動の情報が得られることを示してきた。常磁性試料の <sup>2</sup>H NMR においては、MAS によって核四極子相互作用や電子スピンと重水素核との磁気双極子相互作用などの異方的相互作用による信号の減衰はリフォーカスされ、MAS の周期ごとにエコー信号 (rotational echo) が生じる。この一連の rotational echo を検出することによってスピニングサイドバンドスペクトルが得られる。ただし、MAS ではフェルミのコンタクトシフトのような等方性シフトによる信号の減衰はリフォーカスされない。このような MAS の特徴は常磁性物質の解析に役立つと考えられる。本研究では等方性シフトの分離に量子コヒーレンスや二量子コヒーレンスを用い、常磁性物質におけるフェルミのコンタクトシフトを利用して異なった環境の重水素 MAS NMR スペクトルを分離し分子ダイナミクスの解析を行う方法を考察した。また、強磁場 (21.8 T) のこれらの方法への応用も検討した。

Keywords: 重水素 NMR, MAS, 二次元 NMR

みずのもとひろ, すずき よう, えんどう かづなか,  
むらかみ みわ, たんしょ まさたか, しみず ただし

【実験】 固体重水素 NMR スペクトルの測定は Chemagnetics CMX-300 分光器を用い、共鳴周波数 45.826 MHz, MAS 速度 5 kHz で行なった。強磁場での測定は、JEOL ECA-930 分光器を用い、共鳴周波数 142.76 MHz, MAS 速度 16 kHz で行った。試料は常磁性  $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  の重水素化物を用いた。Fig.1 に示すパルス系列を用い、 $t_1$  時間では MAS と同期させることで、磁化を等方性シフトのみで発展させた。 $t_2$  時間に異方的相互作用も含めた磁化の時間発展を測定することで二次元スペクトルを得た。

【結果と考察】 Fig.2 に一量子コヒーレンス法を用い、共鳴周波数 45.826 MHz で測定したスペクトルを示す。縦軸は等方性シフト、横軸は一本のスピンサイドバンドを拡大して示している。 $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  の 6 つの水分子のうち直接  $\text{Sm}^{3+}$  と配位した配位水と直接配位していない結晶水のピークがフェルミのコンタクトシフトによって 2 本に分離し、分裂幅は 0.4 kHz であった。Fig.3 に二量子コヒーレンス法を用い、共鳴周波数 45.826 MHz で測定したスペクトルを示す。縦軸の等方性シフトの分裂幅が二倍になり、配位水と結晶水のピークがそれぞれさらに細かく分裂し始めていることがわかる。Fig.4 は共鳴周波数 142.76 MHz で、二量子コヒーレンス法を用いて測定したスペクトルである。強磁場と二量子コヒーレンス法を用いることにより、個々の配位水および結晶水のピークを分離することができ、水分子に関してより詳細な解析が可能になると期待できる。

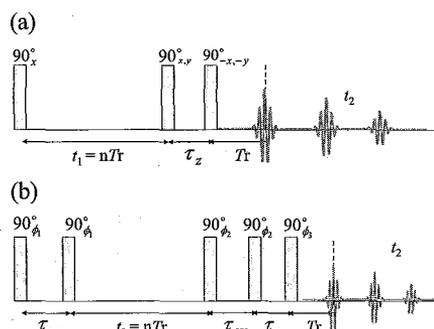


Fig.1 Pulse sequences for the measurement of two-dimensional  $^2\text{H}$  MAS NMR spectrum. (a) single quantum method, (b) double quantum method

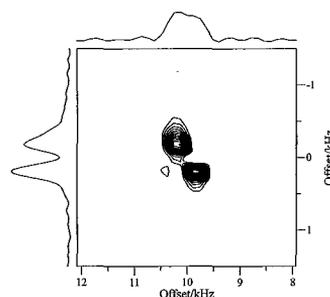


Fig.2 Two-dimensional  $^2\text{H}$  MAS NMR spectrum using single quantum method.  $\nu_0 = 45.826$  MHz

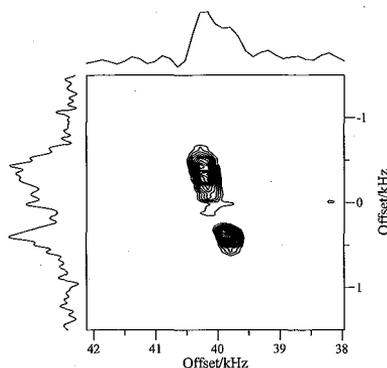


Fig.3 Two-dimensional  $^2\text{H}$  MAS NMR spectrum using double quantum method.  $\nu_0 = 45.826$  MHz

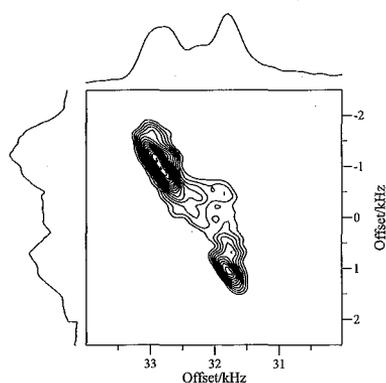


Fig.4 Two-dimensional  $^2\text{H}$  MAS NMR spectrum using double quantum method.  $\nu_0 = 142.76$  MHz

1) M. Cutajar, S. E. Ashbrook, S. Wimperis, Chem. Phys. Lett. **423**, (2006) 276.

P092

**<sup>133</sup>Cs-NMR Study of the Metastable Bilayer-hydrate of Cs<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub>yH<sub>2</sub>O**

Ming-Yuan Liao<sup>1</sup>, Chung-Chin Lin<sup>1</sup>, Chia-Wei Su<sup>2</sup>, Jean-Lien Liu<sup>2</sup>, Horng-Yi Tang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan

<sup>2</sup>Department of Applied Chemistry, National Chi-Nan University, Puli, Taiwan

The metastable bilayer-hydrate of Cs<sub>x</sub>CoO<sub>2</sub>yH<sub>2</sub>O has been grown in crystal form. X-ray analysis reveals the hexagonal structure with Co-O interplanar distance of 10.02(5) Å. Vary temperature <sup>133</sup>Cs-NMR experiments are performed to probe the local environment of the cesium ions in the hydrous and anhydrous cobaltates. Our data suggest either a dramatic change in the Co 3d-electron spin dynamics below 200 K interpreted as the evidence for a tendency to electron localization, or a slow exchange among different cesium sites in the layered structure.



P093

## 液晶物質 CBOOA のスメクチック相形成時における 分子ダイナミクス

日本大学大学院総合基礎科学研究科

○萩原祥子・岩間陽子・藤森裕基

Molecular dynamics at a smectic-nematic transition in a liquid crystal of CBOOA

○Shoko HAGIWARA, Yoko IWAMA, and Hiroki FUJIMORI

Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University, Sakurajosui, Setagaya-ku,  
Tokyo 156-8550, Japan

$^{13}\text{C}$  high-resolution NMR experiments were carried out in smectic A ( $S_A$ ), nematic (N) and isotropic (I) phases of a liquid crystal, 4-octyloxy-*N*-(4-cyanobenzylidene)aniline (CBOOA). The temperature dependences of the spin-lattice relaxation times of almost carbon atoms showed continuous in the liquid crystalline phases, but of the carbon atom in the cyano end group discontinuous at the  $S_A$ -N transition temperature. It is suggested that the intermolecular interaction which is not in the N phase is caused around the cyano end group in the  $S_A$  phase.

〔緒言〕 液晶物質である 4-octyloxy-*N*-(4-cyanobenzylidene)aniline (CBOOA, 図1)は高温側から、分子の位置も配向も無秩序な等方性液体(I)相、分子配向の秩序が形成されるネマチック(N)相、分子配向秩序と共に一次元の並進格子が形成されるスメクチック( $S_A$ )相、位置も秩序化する結晶(Cry)相、という相転移系列を持つ。これら液晶相の形成には、分子構造やそれに伴う様々な分子運動が密接に関係している。そのため、液晶相を発現させる分子間相互作用を設計するうえで、分子運動を考慮することはとても重要となる。CBOOAにおける高圧下の相転移系列は、高温側から I 相-N 相- $S_A$  相-リエントラントネマチック(RN)相-Cry 相と変化し、 $S_A$  相の低温側で再び N 相が出現することが報告されている[1, 2]。しかし、RN 相出現機構の微視的理解による一貫した理論は未だない。我々はこの RN 相の出現に関与する液晶の構造および分子ダイナミクスを明らかにすることを最終目的とし、本研究では CBOOA における大気圧下での  $^{13}\text{C}$  NMR におけるスピナー格子緩和時間( $T_1$ )の測定を行った。今回測定したスピナー格子緩和時間は、分子運動によって引き起こされる局所磁場のゆらぎの影響を受けるため、液晶相形成時に関与する分子部分の運動性の違いを観測することができる。

〔実験〕 CBOOA は宮島らにより合成された試料[3]を用いた。 $^{13}\text{C}$  NMR 測定は、大気圧下

Key words: 液晶, 固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR, 緩和時間

はぎわら しょうこ・いわま ようこ・ふじもり ひろき

において磁場中で配向させた静止試料に対し行い、反転回復法を用いて  $T_1$  を測定した。

[結果・考察] 図2はCBOOAのIso相と $S_A$ 相における $^{13}\text{C}$  NMR吸収線を示す。図中の数字は各吸収線の帰属を示す[4]。図3は代表的な炭素における $T_1$ の温度依存性の結果を示す。分子骨格部に属する炭素(□)およびアルキル鎖部の炭素(△)における $T_1$ についてはほぼ連続的な温度依存性を示した。しかし分子末端のシアノ基に属する1位炭素(○)においては $S_A$ 相とN相で $T_1$ の温度依存性に明らかな不連続が見出された。これは、1位炭素における分子間相互作用が $S_A$ 相とN相で変化した可能性を示唆している。 $S_A$ 相の層間距離が分子長の約1.5倍である[1,2]ことを合わせて考えると、CBOOAの $S_A$ 相では分子骨格が重なり合っ層を形成し、分子末端のシアノ基と隣接分子の酸素原子近傍とで分子間相互作用が生じた結果 $T_1$ の温度依存性に不連続が生じたと考えられる。つまりこの分子間相互作用が $S_A$ 相における並進秩序の形成において重要な役割を果たしていると考えられる。

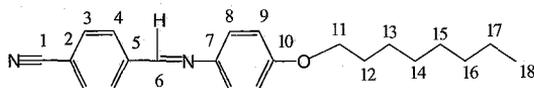


Fig. 1. Molecular structure of CBOOA and the numbering for carbon atoms.

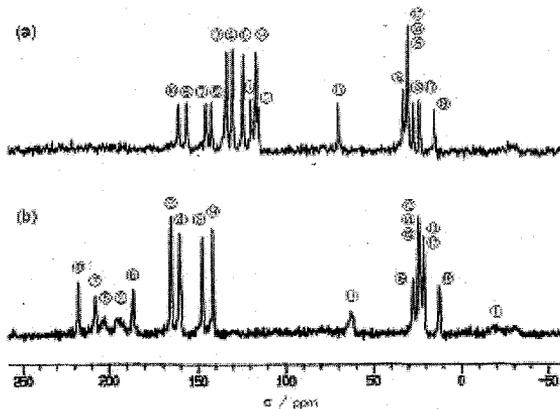


Fig. 2.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of CBOOA in the isotropic phase (a) and the smectic phase (b).

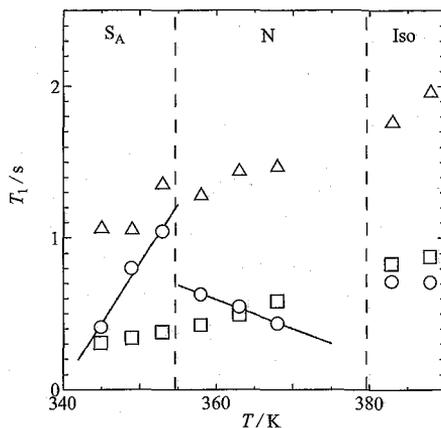


Fig. 3. The temperature dependence of spin-lattice relaxation( $T_1$ ) for the carbon atoms 1(○), 3(□), and 16(△).

[1] P. E. Cladis, R. K. Bogardus, and D. Aadsen, *Phys. Rev. A*18, 2292 (1978).

[2] D. Guillon, P. E. Cladis, D. Aadsen, and W. B. Daniels, *Phys. Rev. A*21, 658 (1980).

[3] S. Miyajima, T. Enomoto, T. Kusanagi, and T. Chiba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 64, 1679 (1991).

[4] 藤森裕基, 神保珠美, 浅地哲夫, 日本大学文理学部自然科学研究所研究紀要, 39, 405 (2004).

P094 イメージングによるヒト脳の $T_1$ 緩和時間の測定と解析  
国立環境研究所 ○高屋 展宏, 渡邊 英宏, 三森 文行

$T_1$  relaxation times in the human brain at 4.7Tesla.  
National Institute for Environmental Studies  
Nobuhiro Takaya, Hidehiro Watanabe, Fumiyuki Mitsumori

$T_1$  relaxation time of tissue water in human body is an important parameter to reveal its microscopic circumstances. We measured  $T_1$  values in human brain at 4.7T using an IR-TurboFlash sequence. The  $T_1$  values obtained from ROIs in various regions in the brain was 10~29% increased compared with those at 4T. We will also discuss about a technique to analyze the  $T_1$  distribution in brain tissues using corresponding tissue segmentation maps.

【はじめに】

生体組織水の縦緩和時間( $T_1$ )は横緩和時間とともに生体の状態を反映し、診断にも用いられる重要なパラメータである。組織内の制限された分子運動状態では $T_1$ は静磁場の増加に伴って延長する。我々は4.7Teslaにおけるヒト脳の $T_1$ 値をTurboFlash法を用いて迅速測定し、灰白質、白質、脳脊髄液(CSF)の $T_1$ 値を正確に解析するための方法の検討を行った。

【方法】

装置はVarian社製4.7T/92.5cmシステムに $^1\text{H}$ TEMコイルを使用した。健常被験者10人(男性3名24~30歳, 女性7名26~38歳)からIR-TurboFlashシークエンスで反転回復時間の異なる大脳基底核を含むTransaxial面の画像を9枚測定した。条件はTR/TE=9.0/4.0ms, FOV=25.6x25.6cm, マトリックス=256x256, スライス厚=2.5mm, フリップ角度=10°, 反転回復時間=0.01, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.5, 15秒。待ち時間は15秒、2回積算で全測定時間は11分30秒である。これらの画像より作成された $T_1$ マップ上に、region of interest (ROI)を設定して、前頭皮質、尾状核、視床、前頭白質、脳梁の $T_1$ 値を測定した。異なる組織間のpartial volume effectを回避するために、ROIは、同時に測定した $T_1$ マップと位置合わせ(コレジストレーション)した1mmの空間分解能をもつ3D MDEFT画像上で注意深く設定し、これを $T_1$ マップ上に移した。この方法では、正確な値を測定できるが、ROIの設定に熟練を要し、得られた値は代表値なので、組織内での $T_1$ 値の分布は求められない。この点を解決するために、MDEFT画像から作成した組織分画画像を $T_1$ マップに重ねてマスク処理することにより、 $T_1$ マップの組織分画画像を作成し、各組織の $T_1$ 値のヒストグラムを求め解析法についても検討した。

【結果と考察】

表1にROI法により得られた10人の被験者の各組織 $T_1$ 値の平均値とSDを示す。この値は4Teslaに比べて皮質灰白質で29%、前頭白質で10%延長している。[1]

キーワード:  $T_1$ 緩和時間、脳、高磁場MRI、イメージング、画像解析

たかやのぶひろ、わたなべひでひろ、みつもりふみゆき

一方、ヒストグラムによる解析では、図1に示すように脳全体の $T_1$ 値分布は、灰白質と白質、CSFの3つのピークに分画できる。さらに、組織分画した各組織の $T_1$ ヒストグラムはGaussian関数でフィッティングできることを確認した(図2)。現在、脳内部位ごとのヒストグラムを解析することにより、各部位の $T_1$ 値の分布を解析する方法の検証を行っている。

	cortical GM	caudate	thalamus	frontal WM	corpus callosum
$T_1$ Value (s)	1.74	1.63	1.57	1.04	1.06
SD	0.052	0.072	0.093	0.029	0.055

Table1.  $T_1$  values of tissue water at various regions in the human brain obtained at 4.7T.

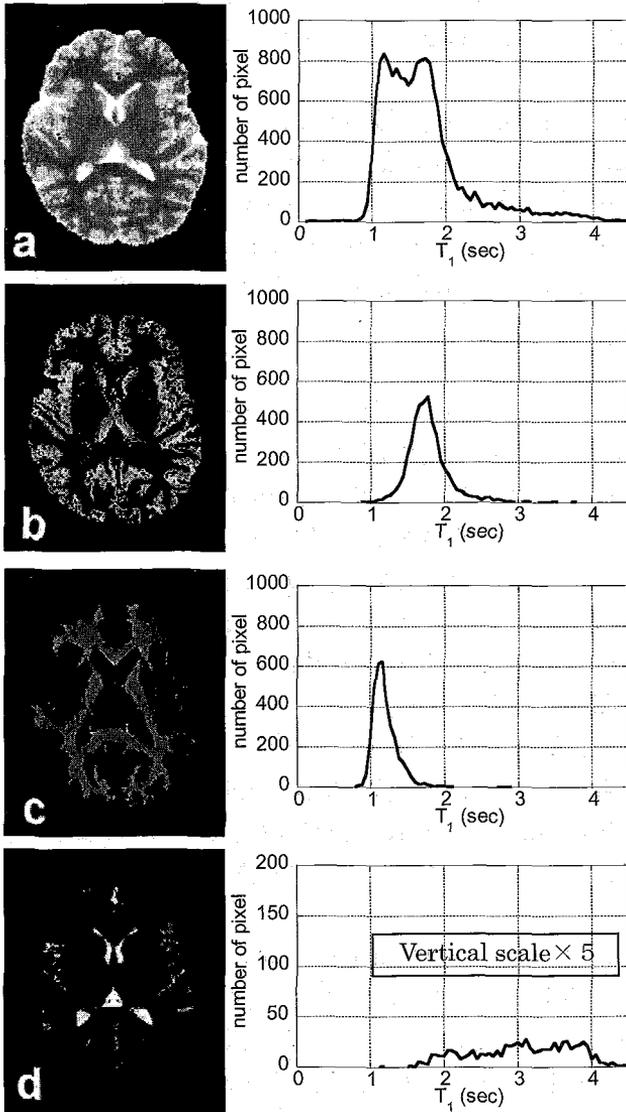


Fig. 1  
 $T_1$  maps (left column) of water molecule in (a) whole brain, (b) grey matter, (c) white matter, and (d) CSF segments in the human brain, and the distribution of  $T_1$  values in each fraction (right column).

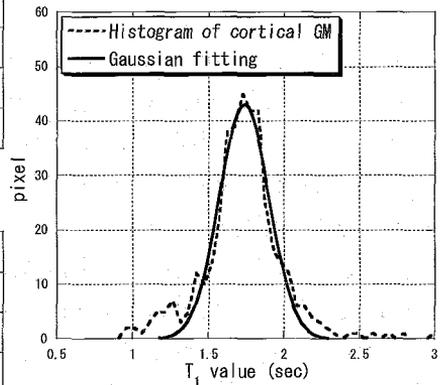


Fig.2  
Gaussian fitting curve (solid line) overlaid on the distribution of  $T_1$  in the segmented cortical grey matter (broken line).

【参考文献】

[1] Kim SG, Hu X, Ugurbil K. Accurate  $T_1$  determination from inversion recovery images: application to human brain at 4 Tesla. Magn. Reson. Med. 1994; 31(4):445.

マンガン増感MRIに対する高速T<sub>1</sub>定量マッピングの検証

放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター

米山操○、Jeff Kershaw、菅野巖、青木伊知男

Quantitative T<sub>1</sub> maps of manganese enhancement  
using inversion-recovery TrueFISPMR Molecular Imaging Team (MRMIT) Biophysics Group, Molecular Imaging  
Center (MIC) National Institute of Radiological Sciences (NIRS)

Misao Yoneyama, Jeff Kershaw, Iwao Knno, Ichio Aoki

There has been growing interest in using manganese-enhanced MRI (MEMRI) to detect neuronal activation, neural architecture and neuronal connections. To obtain quantitative T<sub>1</sub> maps, spin-echo inversion-recovery is conventionally used. However, this method requires a long imaging time because of repeated measurements with different TIs. Here we propose to quantify T<sub>1</sub> using TrueFISP as a significantly faster alternative.

近年、2価の Mn イオンが Ca イオンチャネルを通過するという性質を利用したマンガン増感 MRI が、基礎研究を中心に注目され、適用範囲が拡大している。全身性投与による「神経構造マンガン増感法」では、神経の層構造を描出できることに加え (1)、神経機能を反映した蓄積が生じることで知られている (2)。長期における造影剤の神経蓄積を観察するためには定量値による比較が必要であり、高速かつ高い空間分解能で、かつ歪みの少ない計測法が望まれている。スピネコー法による Inversion Recovery あるいは Saturation Recovery 法は、高い空間分解能を実現でき、かつ歪みが少ないが、一般的に長い撮像時間が必要とされる。一方、EPI 法を利用した 3 次元 Lock-Locker 法による手法では (3)、短時間での撮像が可能であるが、空間的歪みが発生し、また空間分解能として制限がある。今回の報告では、True-FISP シーケンスを使用し、歪みが少なく、かつ 200 μm 以下の高い空間分解能での T<sub>1</sub> および T<sub>2</sub> (緩和時間) のラット脳マッピングを行い、マンガン造影剤の脳内の取り込みを定量的に評価することを目的とした。

S.D.ラットを対象とし、浸透圧を調整した 50mM 塩化マンガン水溶液を尾静脈より投与した (75 mg/kg, 2 ml/hour)。投与後、3時間および24時間後に、1.5% イソフルレン麻酔下にて MRI 撮像を行った。撮像は、実験用 7 T 高磁場 MRI (Kobelco 社製磁石、Bruker 製 console) にて、ボリュームコイル送信 (Bruker 社製)、頭部用表面コイル受信 (Rapid Biomedical 社製) を用い、Spin echo 法による T<sub>1</sub> 強調画像 (TR/TE = 350/9 ms, FOV = 25.6 mm, matrix = 256\*256, slice thickness = 1.5 mm) にて矢状断像を得た。さらに、TrueFISP シーケンス (全体の繰り返し時間 =

10000 ms, TR/TE = 4.0/2.0 ms, FOV = 25.6 mm, matrix = 64\*64, slice thickness = 1.2 mm) にて撮像後、位相マップによる位相補正を行うと共に、 $T_1$  および  $T_2$  (緩和時間) を算出、定量値マップを作成した。また、Spin-echo Inversion Recovery およびマルチエコー法による従来法でも撮像を行った。

ラット脳冠状断において、TrueFISP シーケンスを用いた良好な  $T_1$  および  $T_2$  定量値マップが作成された。本法は、長い期間において造影剤の生体内追跡を行う際に、有用な手法になると考えられた。一方、問題点として、1) RF 照射が過剰となり体温上昇が生じる、2) 脳よりも大きな対象については、位相補正が不十分となり、正確な定量値が算出されない、などの問題点も判明し、今後、繰り返し時間の延長、Flip Angle の低減など最適化が必要であると考えられた。

(1) Aoki I, Wu YJ, Silva AC, Lynch RM, Koretsky AP. Neuroimage. 2004; 22: 1046-1059 (2) Yu X, Wadghiri YZ, Sanes DH, Turnbull DH. Nat Neurosci. 2005; 8: 961-968 (3) Chuang KH, Koretsky A. Magn Reson Med. 2006; 55: 604-611

## P096 唾液成分のNMR：微分絶対強度の評価

○ 高橋征三<sup>1</sup>, 荻野孝史<sup>2</sup>, 山口行治<sup>3</sup>

1 日本女子大学理学部物質生物科学科 2 独法人 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

### Salivary NMR: Evaluation of Differential Absolute-Intensity Method

Seizo Takahashi<sup>1</sup>, Takashi Ogino<sup>2</sup> and Yukiharu Yamaguchi<sup>3</sup>

1 Dept. Chem. & Biol. Sci., Japan Women's Univ. 2. Natl. Inst. Neuroscience, NCNP

3. Div. Clinical Tech., Pfizer Global R & D, Pfizer Japan Inc.

Differential absolute-intensity (DAI) of single Lorentzian line gives rise to a real part of Lorentzian curve. The fact has prompted to use for the quantitative analyses of metabonimics, *etc.* However, the method works only for a single line without any overlaps. This drawback has been evaluated comparing to the results of conventional absorption spectra for salivary samples. The resolution enhancement pre-treatment would be especially effective to overcome the intensity attenuation due to the line-width against the DAI method. Quantitative estimation works only to the well isolated prominent peaks with negligible noise. Overlapped peaks or multiplets tend to be smaller than the real absorptions. The intensity estimation was found unreliable to the smaller peaks than a certain threshold. The applicaion of the power's rule would be useful to the segregation of such peaks

周波数を $\omega = \omega' - \omega_0$ 、横緩和速度を $\lambda = 1/T_2$ とすると、複素ローレンツ曲線は $L = 1/(\lambda + i\omega)$ で表され、ローレンツ型の吸収曲線は $\text{Re } L = \lambda/(\lambda^2 + \omega^2)$ で与えられる。いっぽう、複素ローレンツ曲線を微分してその絶対値をとると

$$\frac{dL}{d\omega} = \frac{-i}{(\lambda + i\omega)^2} \Rightarrow \left| \frac{dL}{d\omega} \right| = \sqrt{\frac{dL}{d\omega} \frac{dL^*}{d\omega}} = \frac{1}{\lambda^2 + \omega^2} = \frac{1}{\lambda} \text{Re } L$$

になり、吸収曲線と同じローレンツ曲線を得る。この原理を利用してスペクトルを表示する方法を微分絶対強度(DAI)法と呼ぶことにする。

DAI法はスペクトルの位相補正なしに吸収曲線が得られる。したがって信号強度の簡易定量法として、近年はメタボノミックスやLC-NMRの自動解析などに多用されている。ところが上式は、重なりのないローレンツ型の単一ピークにしか成り立たず、強度は線幅に依存する欠点を抱えている。本研究では、この負の側面が、唾液という生体試料にたいして、どのような問題をもたらすか、欠点をどう克服したらよいかを探った。

[実験] 唾液は起床時に基礎体温の測定と同時に約1ヵ月分を採取した。その唾液を $-80^\circ\text{C}$ で長期冷凍保存したものを解凍してNMR試料管に秤取し、400MHzで1量子および2量子遷移の $^1\text{H-NMR}$ を測定した。解析はMATLABによる自作の解析ソフトを用い、必要に応じて統計ソフトJMPおよびSTATAを用いた。べき乗則の解析は、4K点のスペクトルの対数強度を大きい順に並べて、二本の直線でフィットした。

キーワード スペクトル強度、微分絶対強度 吸収強度 唾液 定量

## [結果]

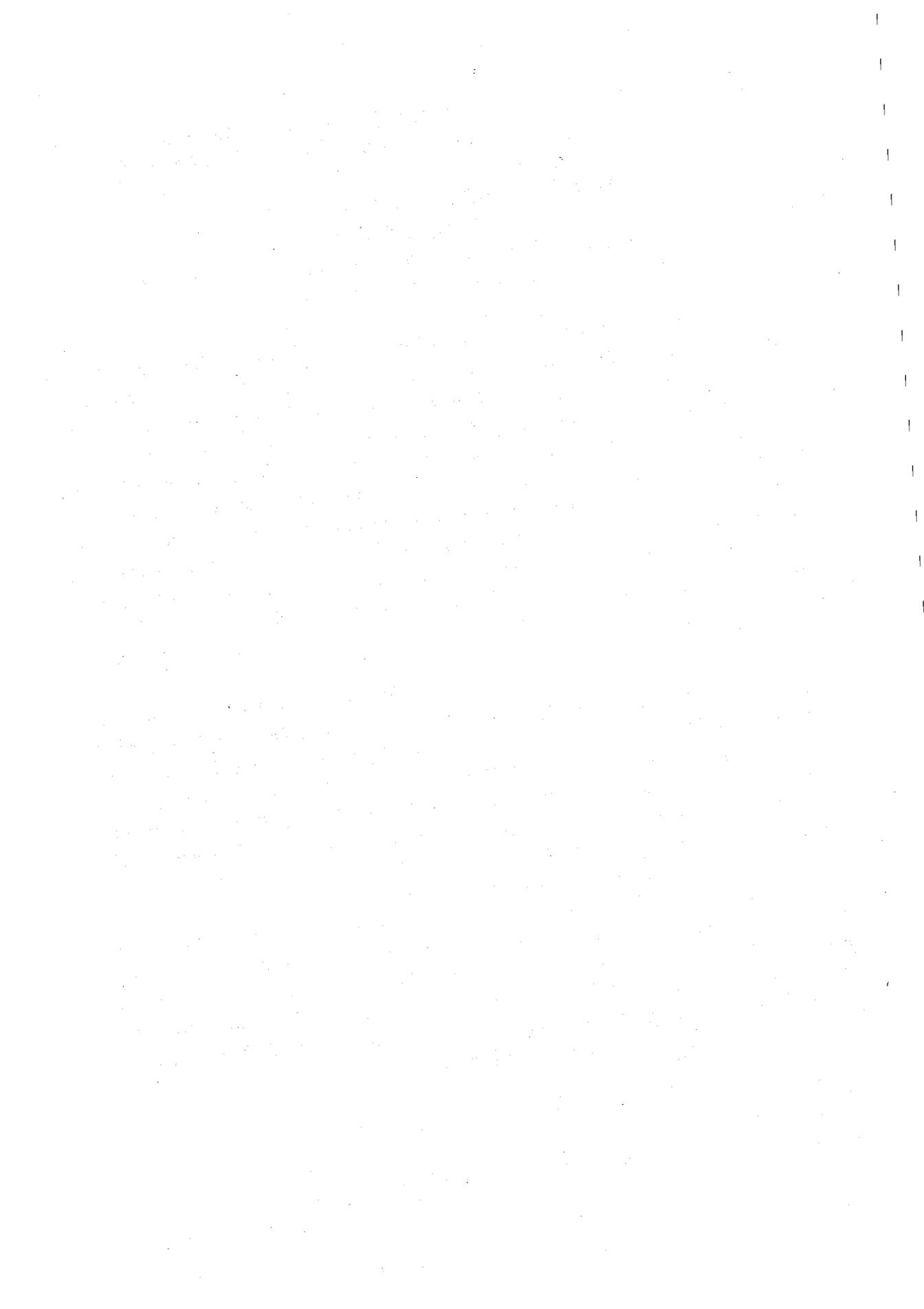
1. DAI 法のベースラインはフラットで、水の消え残りによるベースラインのうねりは見られなかった。したがってベースラインレベルの評価が簡単であるという意味で、スペクトル強度の自動評価に適していることが分かった。
2. DAI 法は吸収法より S/N 比が極端に低下した。またピーク強度が線幅に逆比例するので、あたかも resolution enhance 処理したスペクトルのように見える。単純な Zero-fill はさらに S/N 比を低下させた。したがって DAI 法はノイズとピークの重なりが無視できる 1 次元の超高磁場 NMR に適した手法であるといえる。
3. ピークの分離が良い大きなピーク強度の代謝物について、試料の違いによる強度分布を調べたところ、DAI 法と吸収法とで本質的な違いは見出せなかった。重なりが無視できる程度に十分に孤立したピークで相対強度を比較する限り DAI 法で十分であることが分かった。
4. DAI 法でもべき乗則が成り立ち、信号強度にしたがって 2 群に分離できた。しかし DAI 法では、第 2 群の切片と勾配の間に強い相関を示した。つまり吸収法と異なって、第 2 群から得られる情報の一部が失われたことが明らかになった。
5. DAI 法は、第 2 群の切片や勾配の値と酢酸の強度や 2 量子スペクトルの強度との相関が失われていた。つまり DAI 法の第 2 群にはノイズ以外の有用な情報を含まない。
6. 吸収法の強度と DAI 法の強度を比較したところ、予想通り、1 重線の相関が高く、多重線や他のピークが重なると相関が低下した。しかも一定強度以下では、強度に比例して分散が大きくなった。つまり線幅を補正しても、一定以上の強度がなければ、代謝物濃度変動の解析対象にすべきでないことが分かった。
7. シミュレーションの結果、ピークが重なると面積強度が低下する傾向を示した。つまり多重線は強度が期待より小さく評価され、他成分の重なりの場合は、重なりによるが、強度は常に低下した。
8. DAI 法の強度は線幅に逆比例し、ピークの重なり具合によって面積強度が低下するので、強度補正係数をシミュレーションで求めた結果、面積強度とピークの高さで求めた補正係数は有意に異なった。
9. 5. 第 2 群の勾配と 2 量子遷移の酢酸信号強度の間に B は相関したが A は相関しなかった。6. 単一ピークは A と B が相関するが、多重線や他のピークが重なると A と B の相関の程度は低下した。

[考察] 他成分の重なりが危惧される場合には、単一ピークでも微分絶対強度スペクトルを吸収スペクトルの代替に使うのは危険を伴う。とくに低強度信号の定量には使うべきでないことが明らかになった。当該信号が解析に使えるかどうかの必要条件は、べき乗則で第 1 群に属するかどうかで判別できよう。

分解能や成分の重なりの変動が無視できる限り、DAI 法で求めた強度に適当な強度補正をすれば、一応もってもらいたい強度が得られるように思われる。原理的には、少なくとも 1 つのスペクトルについて吸収法で正確な強度を求めて、補正係数を算出できる。

補正の影響を小さくするには、resolution enhancement の前処理が有効であろう。ただしノイズレベルも増大するので最適値があるだろう。条件決定のアルゴリズムは今後の検討課題である。

唾液などの生体試料の場合は、試料ごとのピークシフトが無視できない。その場合、ピーク位置を中心とする一定領域から面積強度を計算するしかない。それでも他成分の重なりの程度が試料ごとに異なり、分解能も同じに保つのは難しいので、DAI法の解析結果の解釈には慎重な検討が欠かせない。



## Simultaneous quantitation of glutamate and GABA in the human brain using localized 2D CT-COSY : 2nd report

○渡邊英宏, 高屋展宏, 三森文行

独立行政法人 国立環境研究所

Hidehiro Watanabe, Nobuhiro Takaya, Fumiyuki Mitsumori

National Institute for Environmental Studies

### **Abstract**

Quantitation method of glutamate and GABA on localized 2D CT-COSY spectra in human brain was improved on data sampling scheme along  $t_1$  direction and spectral analysis technique. To realize absorption shape in  $F_1$  direction and to maximize sensitivity, asymmetric sampling scheme along  $t_1$  direction was used. Narrow line shape along  $F_1$  direction could be obtained in a magnitude mode. For quantitation, human brain spectrum was curve fitted with basis spectrum obtained with the same  $T_{ct}$  as that of *in vivo* spectrum. In the human studies, two spectra of  $T_{ct} = 130$  ms and 270 ms were obtained. Using improved quantitation method, concentrations of glutamate and GABA were calculated as 8.7 mM and 0.9 mM respectively. These values were in good agreement with the previously reported values.

### **Introduction**

Glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) which are major neurotransmitters in human brain are implicated in many psychiatric and neurological disorders. Spectral analysis techniques, such as linear combination of model spectra (LC-model), can estimate concentrations of metabolites in 1D spectrum from human brain *in vivo*. However, these metabolite resonances are overlapped due to strong coupled spin systems. In addition, there is overlapping of macromolecules and baseline on 1D spectrum. Then, estimation error has occurred even using the spectral analysis techniques especially on low concentration of GABA.

We have developed localized 2D constant time (CT) COSY method to resolve those resonances at 4.7 T in human brain (1). We have also developed quantitation method based on  $T_2$  correction in  $J$  coupled spin systems, spectral analysis method for 2D spectra and water reference method to obtain concentrations of glutamate and GABA in human brain (2). In this work, we have improved the quantitation method on data sampling scheme and on the spectral analysis.

Keywords: human brain, glutamate, GABA, CT COSY, *in vivo*

わたなべひでひろ, たかやのぶひろ, みつもりふみゆき

## Methods

### 1: Sampling scheme along $t_1$ direction

Figure 1 shows a localized CT-COSY sequence. This sequence consists of four modules; water suppression (VAPOR), outer volume suppression (OVS), ISIS localization (ISIS) and CT-COSY modules. To minimize number of RF pulses, no refocusing pulses are used after the polarization transfer one in the CT-COSY module.

Reconstructed spectra are displayed in a magnitude mode. Absorption shape even

in this mode can be generated by symmetric sampling scheme between plus and minus regions in the  $t_1$  domain whose scheme is like spin echo manner. Coherence transfer echo is acquired only in the minus region. Then, asymmetric sampling scheme was used to maximize sensitivity. Figure 2 showed pulse sequence (a) in the CT-COSY module along with profile along  $t_1$  direction (b) on time domain data (c) and corresponding FIDs (d). Coherence transfer echoes were generated in upper two FIDs acquired in minus region on  $t_1$  domain. Simulated results showed that FT of 14% asymmetric spin echo led to absorption spectrum with only 3% intensity loss (Fig. 3). Diagonal peaks of glutamate C4H on 2D spectra of the human brain were viewed from  $F_1$  axis both in a magnitude mode and in an absorption mode (Fig. 4). The linewidths were almost equivalent and absorption shape could be obtained even in a magnitude mode.

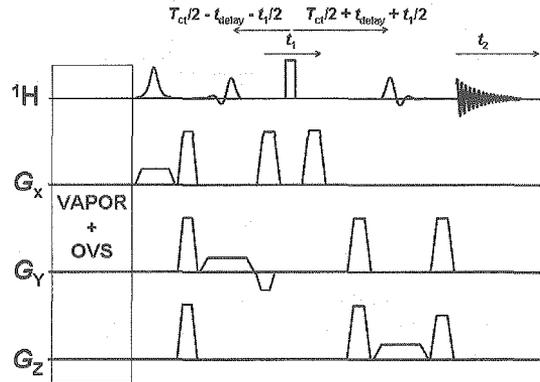


Fig. 1. localized 2D CT-COSY sequence

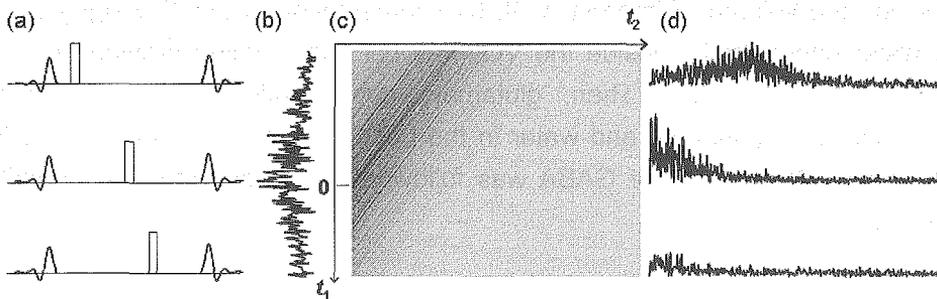


Fig. 2. Asymmetric data sampling scheme along  $t_1$  direction. Larger number of FIDs were acquired in minus regions on  $t_1$  domain. Coherence transfer echoes were generated in the minus region.

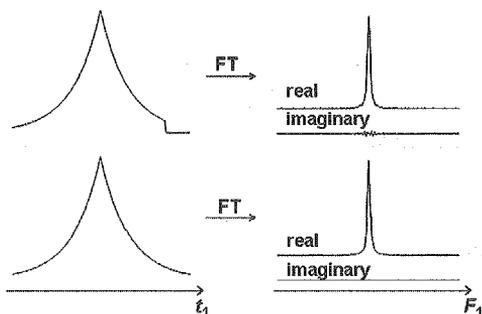


Fig. 3. Simulation results. FT of 14% asymmetric spin echo data led to only 3% loss of spectrum of symmetric data.

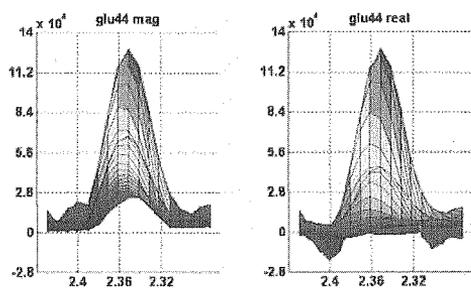


Fig. 4. Diagonal peak shapes of glutamate C4H on human brain spectra. Absorption shape along  $F_1$  direction could be obtained with asymmetric sampling scheme.

## 2: Quantitation protocol

Resolved diagonal peaks of glutamate C4H at 2.35 ppm and GABA C2H at 2.28 ppm were quantitated. The whole protocol is shown in Fig. 5. First, two CT-COSY spectra with different  $T_{ct}$  were obtained. Next, glutamate C4H peak was extracted from the 2D spectrum for spectral analysis. The extracted data were curve fitted with basis spectrum obtained from glutamate sample with the same  $T_{ct}$  as that *in vivo*. After minimization using SIMPLEX method, peak volume of glutamate C4H *in vivo* was obtained as the ratio to that on basis spectrum. These codes were developed on MATLAB 7.4. After two peak volume ratios were calculated from spectra with different  $T_{ct}$ ,  $T_2$  decay was corrected by curve fitting using  $M_0 * \exp(-T_{ct}/T_{2app})$  where  $1/T_{2app}$  was determined by  $1/T_{2in vivo} - 1/T_{2basis}$ .

Finally, concentration of glutamate was calculated through comparison between water concentrations of the basis glutamate sample and the human brain. In this step, we first obtained ratios of gray matter, GM, white matter, WM, and cerebrospinal fluid, CSF inside the volume of interest, VOI, by segmentation of 3D  $T_1$  weighted image. Next, water concentration inside the VOI was calculated using previously reported values of GM and WM. Then, glutamate concentration was obtained using concentrations of glutamate and water in the basis sample and that of water in the human brain. Quantitation of GABA was followed after that glutamate quantitation procedure.

## 3: Human studies

All studies were done using a whole-body 4.7 T NMR spectrometer (Varian, INOVA) with a volume TEM coil. VOI of 36-ml was selected inside parieto-occipital region on gradient echo images. Two spectra with  $T_{ct}$  of 130 ms and 270 ms were obtained. Number of  $t_1$  increment was 150 and number of averages was 4. TR was set to 4 s to neglect  $T_1$  effect in human brain. Each measurement time was 40 min.

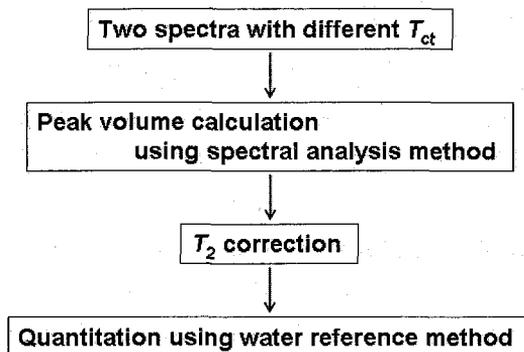


Fig. 5. Quantitation protocol on localized CT-COSY

### **Results and Discussions**

Concentrations of glutamate and GABA were calculated as 8.7 mM and 0.9 mM respectively and as 9.7 mM and 1.0 mM excluding CSF region. These values were in good agreement with previously reported values. Therefore, glutamate and GABA in human brain could be quantitated by the proposed method.

### **References**

1. Watanebe, H., Takaya, N., Mitsumori, F., *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 13, 2496, 2005.
2. Watanebe, H., Takaya, N., Mitsumori, F., *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 15, 201, 2007.

## 異種核多次元 NMR を用いた細胞内大量発現蛋白質の解析

(<sup>1</sup>首都大学東京, <sup>2</sup>CREST/JST, <sup>3</sup>理化学研究所, <sup>4</sup>藤田保健衛生大学)  
 ○榊原大介<sup>1,2</sup>, 佐々木敦子<sup>1,2</sup>, 飯島亜季<sup>1</sup>, 末永智子<sup>1</sup>, 小山博子<sup>1</sup>,  
 浜津順平<sup>1</sup>, 吉益雅俊<sup>3</sup>, 林 宣宏<sup>4</sup>, 三島正規<sup>1,2</sup>, 伊藤 隆<sup>1,2</sup>

## Heteronuclear multi-dimensional NMR of proteins overexpressed in cells

Daisuke Sakakibara<sup>1,2</sup>, Atsuko Sasaki<sup>1,2</sup>, Aki Iijima<sup>1</sup>, Satoko Suenaga<sup>1</sup>,  
 Junpei hamatu<sup>1</sup>, Hiroko Koyama<sup>1</sup>, Masatoshi Yoshimasu<sup>3</sup>, Nobuhiro Hayashi<sup>4</sup>,  
 Masaki Mishima<sup>1,2</sup> and Yutaka Ito<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; <sup>2</sup>CREST, JST

<sup>3</sup>RIKEN; <sup>4</sup>Fujita Health University

*In vivo* detection of protein dynamics, structural changes or interactions is strongly required for the explicit understanding of structural basis of their functions in living systems. Recent developments of NMR spectroscopy allow us *in vivo* observation of high-resolution heteronuclear multi-dimensional NMR spectra of an overexpressed protein.

In this presentation, we report our recent studies on this “In-Cell NMR” method applied to several proteins expressed in *E.coli* cells. Backbone resonance assignments have been shown to be achievable by applying methods for rapid acquisition of multi-dimensional NMR spectra. Further, we will also report our recent trial of obtaining side-chain resonance assignments and long-range distance restraints from In-Cell NMR samples.

【序】 In-Cell NMR 法は、蛋白質を発現させた細胞そのものを試料として異種核多次元 NMR スペクトルを測定するものである。近年では大腸菌内発現系、アフリカツメガエル卵へのマイクロインジェクションを利用した系で解析例が報告されるようになり、細胞内の蛋白質間相互作用や翻訳後修飾の経時的変化を追跡できるようになってきている。また、大腸菌内発現系を用いた解析例では、細胞内蛋白質の主鎖ダイナミクスも解析されている。このように、In-Cell NMR 法は蛋白質の細胞内動態を高分解能で測定できるという長所があるが、その一方で生細胞内試料の寿命や絶対的な感度の不足などの問題があり、多くの場合その短所のために主鎖の帰属を行うことすら困難であった。

本研究では、大腸菌内発現系を用いた複数の蛋白質をターゲット試料とし、triple-resonance NMR スペクトルの解析による主鎖 NMR シグナルの帰属や、選択的標識を用いた高次構造情報の取得を試みた。測定の際には、In-Cell NMR の持つ絶対的な

In-Cell NMR, 異種核多次元 NMR, 非線形サンプリング, 選択的プロトン標識, カルモジュリン

さかきばら だいすけ, ささき あつこ, いいじま あき, すえなが さとこ, こやま ひろこ,  
 はまつ じゅんぺい, よしまた まさとし, はやし のぶひろ, みしま まさき, いたう ゆたか

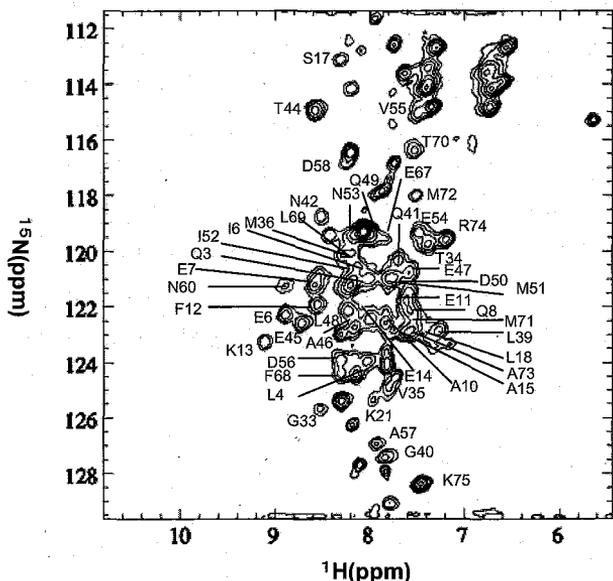
感度不足を補うため、短時間で高感度のスペクトルを得ることが可能な非線形サンプリングを用いた。

【実験、結果および今後の展望】 ターゲット試料としては、Calmodulin (CaM) の全長、N末端およびC末端ドメイン、酵母 Mre11 のC末端領域を用いて解析を行ってきた。今回はこれらの試料に加えて高度好熱菌由来の蛋白質 10 種についても検討を行った。いずれの試料についても、大腸菌内発現系を用いた。

主鎖の帰属のためには、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 均一標識試料を調製し、6 種の 3D NMR (HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH, HNCACO, HNCO) の測定を行った。測定の際には、間接観測軸に非線形サンプリング法を適用し、短時間で良好なスペクトルを得ることに成功した。スペクトルを解析した結果、CaM のN末端ドメイン (77 残基) については、主鎖シグナルの約70%の帰属に成功した。帰属されなかった約 30%の領域は $\text{Ca}^{2+}$ 結合領域に近接していた。大腸菌細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は  $0.1\sim 1\ \mu\text{M}$  であることが知られている。したがって、当該領域が $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下でフレキシブルな性質を示すことにより、主鎖NMRシグナルがブロードニングしている可能性が考えられる。

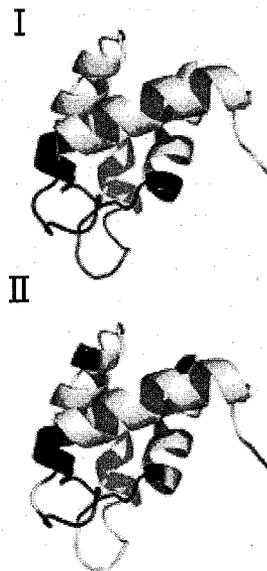
また、メチル基選択的プロトン標識試料を調製し、3D NOESYを測定することによって、メチル基間のNOEを選択的に観測することにも成功した。アミノ酸選択的に $^{19}\text{F}$ 標識を行うことで選択的な構造情報を取得する試みも行っている。現在はより網羅的な高次構造情報の収集・解析を試みており、細胞内における蛋白質のグローバルフォールドの決定を目指す。

Figure (a)



(a)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of the  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  labelled N-terminal domain of CaM

(b)



(b) N-terminal domain of apo-CaM NMR structure (1DMO)

I **black**:  $\text{Ca}^{2+}$  binding site    II **black**: unassigned residues

P099

ラット脳における高偏極キセノン縦緩和時間推定に  
与える肺動態の影響

(秋田県立脳血管研究センター) ○中村和浩、近藤靖、

David Wright、三浦修一、木下俊文

(放射線医学総合研究所) 若井篤志、Jeff Kershaw、菅野巖、

Influence of lung kinetics on longitudinal decay estimation of hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$   
in rat brain

○ K.Nakamura, Y. Kondoh, D. Wright, S. Miura, T. Kinoshita (Akita Research  
Institute for Brain and Blood Vessels) A.Wakai, J. Kershaw, I. Kanno  
(National Institute for Radiological Sciences)

We measured the longitudinal decay of in vivo  $^{129}\text{Xe}$  in rat brain by acquiring two spectra at 4 seconds and  $\Delta\text{TR}$  seconds after xenon delivery. This two-pulse measurement procedure assumed that xenon delivery from the lung was completely finished prior to acquiring the first spectra. In order to confirm our assumption, we have analyzed the kinetics in 23 rats and determined that xenon delivery to the brain is completed within 4 seconds from the cessation of xenon inhalation.

1. はじめに

高偏極キセノンの脳内縦緩和時間( $\text{XeT}_{1,\text{brain}}$ )は組織代謝や病態に依存して変化する可能性があり、 $\text{XeT}_{1,\text{brain}}$ の精密で再現性の高い測定方法が求められている。これまで $\text{XeT}_{1,\text{brain}}$ は様々に推定されているが[1-4]、報告によりその値は数秒から数10秒と大きく異なっている。こうした中、我々は時間間隔を変化させ2回の核磁気共鳴信号をキセノン吸入後に測定する手法(2パルス法)により、高偏極キセノン信号の $\text{XeT}_{1,\text{brain}}$ を計測し、 $\text{XeT}_{1,\text{brain}}$ は15秒~25秒程度であると推測してきた[1,2]。この手法は、フリップ角の仮定を必要とせず、高感度な表面コイルから得られたデータの解析に適用できる手法であるが、1回目の核磁気共鳴信号の取得時(吸入4秒後)に肺からのキセノン供給がなくなっていることが前提である。この前提が妥当であるかどうかを検証するため、肺におけるキセノン保持時間( $\tau_A$ )をラット頭部から得られた高偏極キセノン信号の動態データのモデル解析により推定した。

キーワード：高偏極キセノン、MRS、ラット脳、動態解析

著者：なかむら かずひろ、こんどう やすし、でいびつど らいと、みうら し  
ゆういち、きのした としふみ、わかい あつし、じえふ かーしょう、かんの い  
わお

## 2. 方法

雄性 SD ラット (n=23) について計測をおこなった。高偏極キセノンガスは市販偏極装置 (東横化学;HPXE2104H) により生成され、25 cc の高偏極  $^{129}\text{Xe}$  ガスを 40 秒間にわたって手で押し出すことで肺に吸入させた。MRI 計測は、4.7T の Varian 製 MRI 計測装置でおこない、自家製の表面コイルをもちいた。吸入開始 5 秒前から、ハードパルス (パルス幅 24  $\mu\text{sec}$ 、パルス強度約 10 W) を印加し、1.25 秒間隔で、高偏極キセノンスペクトラムの計測をおこなった。動態解析には既報のモデル式 [4] を適用し、RF 照射前後の高偏極核種の縦磁化に注目し、 $\cos \theta$  減衰項

を漸化式により行列式で補正する解析モデルを利用した [5]。モデル式において、肺におけるキセノン濃度の時間変化  $C_A(t)$  は定数  $\varepsilon$  と  $\tau_A$  を用いて、 $C_A(t) = 0; 0 < t \leq 5 \text{ sec}$ ,  $C_A(t) = \varepsilon \cdot (1 - e^{-(t-5)/\tau_A}); 5 < t < 45 \text{ sec}$ ,  $C_A(t) = C_A(45 \text{ sec}) \cdot e^{-(t-45)/\tau_A}; 45 \text{ sec} \leq t$  であらわされ、脳におけるキセノン濃度の入力関数  $C_a(t)$  は  $C_A(t)$  と肺から脳への遷移時間  $t_b$  及び血液中での縦緩和時間  $T_{1,\text{blood}}$  を用いて  $C_a(t) = C_A(t) \cdot (t - t_b) e^{-t_b/T_{1,\text{blood}}}$  となる。脳組織におけるキセノンの濃度関数  $C_i(t)$  は  $C_a(t)$  と残留関数  $e^{-t/T_i}$  の畳み込み積分として  $C_i(t) = f_i \cdot C_a(t) \otimes e^{-t/T_i}$  で表現される。残留関数における時定数  $\tau_i$  は脳血流量  $f_i$  と脳でのキセノンの分配定数  $\lambda_i$  を用いて  $1/\tau_i = f_i/\lambda_i + 1/T_{1,\text{brain}}$  である。解析モデルでは、 $\text{Xe}T_{1,\text{brain}}$  を 15 秒、フリップ角を 30 度、 $f_i$  を 106 ml/100g/min、 $\lambda_i$  を 1.015、 $T_{1,\text{blood}}$  を 6.4 秒、 $t_b$  を 2 秒とおいた

## 3. 結果・考察

測定された典型的な動態データを Fig.1 に示す。図中黒点が測定データであり、ガス相のスペクトラムピークを 0 ppm とした時、195 ppm 付近に観測されるピーク高の時間変化を示したものである。実線は  $\tau_A$  を 1.42 秒として動態モデル式から推定した結果である。23 匹から得られた 78 例において  $\tau_A$ 、 $\varepsilon$  を自由変数としてモデル推定したところ、 $\tau_A$  は  $3.03 \pm 1.98$  秒であった。大部分の解析例で 4 秒以下であったが、5 秒を超える値が算出される例もあった。2 パルス法を用いる場合、1 回目の核磁気共鳴信号の取得時間は 4 秒で十分であると考えられるが、測定例によっては、解析結果に影響を与える可能性は否定できなかった。

## 参考文献

- [1] Wakai et al, Magn Reson Med Sci 4 (2005) 19 - 25, [2] 中村ら, 生体医工学 42 (2004) 378 - 383, [3] Wilson et al, Magn Reson Med 41 (1999) 933 - 938, [4] Choquet et al, Magn Reson Med 49 (2003) 1014 - 1018, [5] Nakamura et al, Proc Brain & BrainPET05 (2005) 360

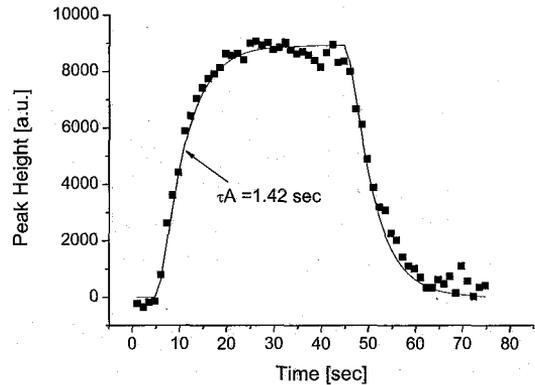


Fig. 1 : Typical Kinetics of a  $^{129}\text{Xe}$  resolvable peak at 195 ppm in a rat brain (solid square). The solid line corresponds to estimated data from kinetic model.

## NMR メタボロミクスを用いた出血性ショック時の病態解析

- 1) 日本医科大学 NMR研究施設 2) 京都大学大学院医学研究科、  
 3) 日本医科大学 救急医学講座、4) 東京医科歯科大学 救急災害医学教室、  
 5) 日本医科大学大学院医学研究科  
 ○平川慶子<sup>1)</sup>、佐野哲孝<sup>3)</sup>、増野智彦<sup>3)</sup>、小池薫<sup>2) 3)</sup>、小野寺謙吾<sup>3) 5)</sup>、植草協子<sup>1)</sup>、  
 佐藤格夫<sup>3)</sup>、鈴木崇生<sup>3)</sup>、相星淳一<sup>3) 4)</sup>、大野曜吉<sup>1) 5)</sup>、山本保博<sup>3) 5)</sup>

**Monitoring the metabolome in the rat tissues following hemorrhagic shock using NMR based metabolomics technique.**

- 1) NMR Laboratory, Nippon Medical School  
 2) Kyoto University, Graduate School of Medicine  
 3) Department of Critical Care Medicine, Nippon Medical School  
 4) Department of Acute Critical Care and Disaster Medicine, Tokyo Medical and Dental University  
 5) Nippon Medical School Graduate School of Medicine

Keiko Hirakawa<sup>1</sup>, Tetsutaka Sano<sup>3</sup>, Tomohiko Masuno, Kaoru Koike<sup>2 and 3</sup>, Kengo Onodera<sup>3 and 5</sup>, Kyoko Uekusa<sup>1</sup>, Norio Sato<sup>3</sup>, Takao Suzuki<sup>3</sup>, Junichi Aiboshi<sup>3 and 4</sup>, Youkichi Ohno<sup>1 and 5</sup>, and Yasuhiro Yamamoto<sup>3 and 5</sup>

<sup>1</sup>H NMR based metabolomics technique was employed for monitoring the metabolome in the rat tissues following hemorrhagic shock by withdrawing blood and resuscitating with shed blood. All the data of spectral processing and multivariate analysis were performed within Alice2 for metabolome™ (JEOL DETUM) and ADMETWorks/Modelbuilder™ (FUJITSU).

We were successful to visualizing the metabolic profiles of the tissues in each time point.

【背景】出血性ショック後の急性肺傷害や多臓器不全は、重傷外傷患者の主要な死亡原因である。サイトカイン、遺伝子、ホルモン、神経系等が複雑に関与しあう multifactorial な病態と考えられるが、発生機序や病態生理は解明されていない。ショック時の腸管血流の低下が遠隔臓器障害の発生に深く関わることを示されている。

キーワード：NMR、metabolomics、shock、多臓器不全、多変量解析

著者ふりがな：ひらかわけいこ

一方、近年ゲノミクス、プロテオミクスの発展により細胞内の遺伝情報や蛋白解析による生命現象の解明が急速に進んでいる。メタボロミクスは生体の代謝情報を網羅的に分析する手法であり、表現形に近いレベルでの生体の情報を包括的にとらえることができる点において、特に医学領域では有用性が高いと考えられる。

今回、ラットを用いた実験を行い、出血性ショック後の腸管および肺組織について、NMRメタボロミクスによる解析を行ったところ、以下の結果を得ることができた。

**【方法】**①動物実験（雄性 Sprague-Dawley ラットを使用）：ショック群は全身麻酔後、大腿動静脈にそれぞれカニューレションし、大腿静脈から脱血してMAP平均動脈圧40mmHgを30分間維持した後、(脱血血液+2倍量の細胞外液)/120minの速度で輸液蘇生を行った。脱血前(pre-shock)、蘇生開始前(shock0)、60分後(shock60)、120分後に腸管および肺を迅速に摘出、液体窒素にて急速冷凍した。対照群(sham0、sham60、sham120)は、全身麻酔および大腿動静脈のカニューレションと血圧測定のみを行った。②NMR測定およびデータ処理：各臓器より抽出した水溶性代謝物について日本電子(株)製 ECX300にて<sup>1</sup>H-NMR測定を行い、日本電子データム(株)と共同開発した Alice2 for Metabolome™にてスペクトル処理を行った。③スペクトルのパターン認識による解析：Alice2 for Metabolome™と富士通(株)のADMEWORKS/Modelbuilder™ ver3.1を用いて主成分分析(PCA)によるマッピングやSIMCA法などによる解析を行った。

**【結果】**ショック群と対照群についての主成分分析によるマッピングでは、スコアプロット上でそれぞれの時点で2群がクラスター化して存在した。蘇生120分後(shock120とsham120)でも、肺ではそれぞれの群が明らかにクラスター化した。ショック群(pre-shock、shock0、shock60、shock120)についての主成分分析でのマッピングでは、腸管および肺の各群はそれぞれクラスター化して存在し、shock60群はshock0群に近く、shock120群はpre-shock群近くに位置した。SIMCA法による解析結果では、ショック群と対照群、またショック群の4グループは、それぞれ明らかに異なるデータ群であることが示された。

各データは各検体中に含まれる水溶性代謝物の種類や量を反映した<sup>1</sup>H-NMRスペクトルパターンに基づいており、metabolomicsにより出血性ショック発生から蘇生後120分にいたるまでの腸管および肺組織内での代謝変化を描出することができた。

**【結論】**以上の結果から、出血性ショック後のさまざまな臓器障害の発生のメカニズムや病態を解明するうえで、<sup>1</sup>H-NMRmetabolomicsは極めて有用な手段であると考えられた。将来的にはin vivo MRS法への応用も期待できるので、臨床医学的にも有用性の高い手法であると思われる。

## RELOS(Y) (RELaxation Ordered SpectroscopY)による <sup>1</sup>H-NMR の重畳シグナルの分離と運動性解析 (花王株) ○中村文彦、川口高広

Signal Separation and Molecular Dynamics Analysis from Low-resolution  
<sup>1</sup>H-NMR Spectrum by Relaxation Ordered Spectroscopy

(Kao Corporation) ○Fumihiko Nakamura, Takahiro Kawaguchi

<sup>1</sup>H-NMR experiments give useful information about the molecular dynamics. But <sup>1</sup>H-NMR often gives broad signals, and their overlap makes the analysis difficult. We developed a novel method for signal separation by making good use of relaxation. By means of this method, called RELOS(Y), we can do signal separation and relaxation time determination in coincidence, even for very broad spectrum.

We applied this method to a detergent powder and found that its spectrum consists of four signals, while only two components were detected by conventional method.

【緒言】 NMRは、構造解析はもとより、ケミカルシフトの変化や緩和時間等の情報を活用することで状態解析ツールとしても有効である。しかし、状態解析ではサンプルを溶媒に溶かしたりすることなく、そのまま測定を行なう必要があり、不均一サンプルや運動性の低いサンプルでは分解能が低下するという問題がしばしば発生する。分解能が低い場合には、波形分離処理が行なわれることが多く、単一の1次元スペクトルからでも、標準波形のフィッティングによる分離や、デコンボリューションなどの方法がとられている。しかし、標準波形のフィッティングは、もともとの分離が悪い場合、シグナルの位置などの前提条件を与えないと一義的な解を与えないことがあり、また、デコンボリューションでは、データのノイズレベルが低いと、信頼できる結果が得られない。

そうした場合の対処法としては、なんらかの別の軸で展開してやることが考えられるが、今回、著しく分解能の低いスペクトルの波形分離には、緩和時間の違いを利用する方法が有効であることを見出したので報告する。本法では、シグナルが分離されるとともに、それぞれのシグナルの緩和時間も同時に決定されるため、状態解析手法として非常に有効である。

【原理】 CPMGなどの、横緩和時間測定用の各種シーケンスを用いて遅延時間  $\tau$  で測定したスペクトル  $f_{\tau}(x)$  は、 $i$  番目の成分の  $\tau = 0$  でのスペクトルを  $f_i(x)$ 、その横緩和時間  $T_{2i}$  を  $T_{2i}$  とすると、式(1)のように表せる。

$$f_{\tau}(x) = \sum \{ f_i(x) \cdot \exp(-\tau / T_{2i}) \} \quad (1)$$

式(1)の形式は、数学的には自己拡散係数の違いを利用してスペクトルの分離を行なうDOSYと全く同じであり、DOSYで使用されている様々な計算方法を適用することで、シグナル分離とともに、それぞれの成分の緩和時間を決定することが原理的には可能である。この方法をRELOS(Y) (RELaxation Ordered SpectroscopY) と命名することにするが、従来からのDOSYに使用されている計算方法は、比較的、高品質な測定データが必要である。そこで

キーワード：<sup>1</sup>H-NMR、緩和時間、波形分離

著者ふりがな：なかむら ふみひこ、かわぐち たかひろ

我々は、ノイズレベルが高く、また、初期の分離が著しく悪いスペクトルでも解析可能な方法として、単独シグナルのピーク形状を仮定して行なう以下の2つの方法、逐次法と一括フィッティング法を考案した。

### (A) 逐次法

以下に述べる逐次的な手続きによりスペクトルを分割する。(図1参照)

1. 最も長い  $T_2$  を有する成分だけが残るような  $\tau$  の長いスペクトルに対して、標準波形として特定の関数形を用いてカーブフィッティングを行ない、そのシグナルの位置、幅等の形状を決定するパラメータ(形状因子)を決定する。標準波形としては、ガウス関数、ローレンツ関数、それらの和やコンボリューションなど、種々のものが利用可能である。

2. 先のスペクトルよりも少し短い  $\tau$  でのスペクトルに対して、ピーク高さだけを変化させてフィッティングを行ない、スペクトルを構成する各成分の強度を決定する。フィッティングが良好であればこの操作を繰り返す。
3. 2でフィットしきれない部分(比較的  $T_2$  の短い成分)が残差として現れたら、成分を追加し、フィッティングにより、その形状因子を決定し、上記2へ戻る。

以上を繰り返し、もっとも  $\tau$  の短いスペクトルまでフィッティングし終わると、各シグナルの形状因子と、シグナル強度の  $\tau$  に対する依存性が決定される。各成分のシグナル強度を  $\tau$  に対し対数プロットし、これが直線になれば分離終了であり、その傾きが  $-1/T_2$  となることから、該当成分の  $T_2$  も同時に求められる。しかし、対数プロットが下に凸な曲線になるのであれば、緩和時間が異なる複数の成分から成っているということであるので、さらに複数の  $T_2$  を仮定したカーブフィッティングを行なって分割する。

### (B) 一括フィッティング法

式(1)を用いて、直接、 $\tau$  を変化させた一連のスペクトルに対し一括でカーブフィッティングを行なう。ただし、このとき、データの質が比較的低い場合でも安定した解析が行なえるよう、単独シグナルのピーク形状は標準波形で表わせると仮定しておく。

**【実験】** 衣料用粉末洗剤の  $^1\text{H-NMR}$  解析に上述の逐次法及び一括フィッティング法を適用した。本洗剤の主成分は、種々の無機物と界面活性剤であるが、主な界面活性剤としては直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムとポリオキシエチレンアルキルエーテルを含んでおり、溶液条件の  $^1\text{H-NMR}$  で検出可能な部位のうち含量が多いものとしては界面活性剤由来のアルキル基とポリオキシエチレン鎖(EO鎖)、そして、水分(水酸基)が挙げられる。

5mm  $\phi$  のNMR測定チューブに約5cmの高さまで洗剤粉末を入れ、そのままスピニング無しで  $^1\text{H-NMR}$  の通常の1次元測定及びCMPG法による測定を行なった。測定装置は Varian Inova<sup>UNITY</sup> 300 単位遅延時間 0.00002 秒で遅延時間  $\tau$  が 0.00008, 0.00016, 0.00032, 0.00064, 0.00128, 0.00256, 0.00512, 0.01024, 0.02048, 0.04096, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28 秒の各スペクトルを得た。

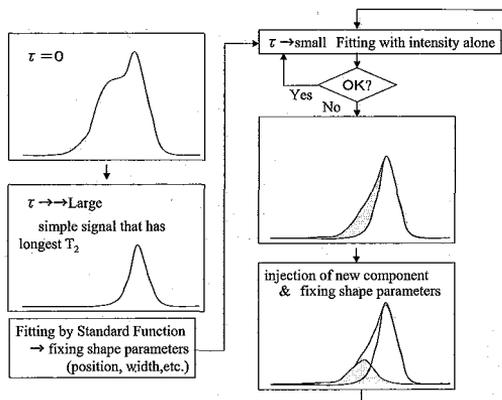


Fig.1 Procedure of stepwise method

なお、解析に使用する標準波形はガウス関数とローレンツ関数の重ね合わせとした。(両関数の比率も一つのパラメータとした)

【結果と考察】 1次元測定(普通の測定条件)の結果は図2に示したような極めてブロードなスペクトルとなる。

CPMG法を用いた測定により得られた遅延時間  $\tau$  の寄与を受けたスペクトルを、図3に示す。 $\tau$  が 0.32s以上のところでは、信号がもはや観測されなかったが、その直前では、単一ピークと思われる左右対称形になっており、これを起点として逐次法を適用して決定した3つのピークを図4に、その強度変化を図5に示す。

図5より、3.3ppm、4.6ppm のピークについては対数プロットが直線となることから、それぞれ、緩和時間的にも単一シグナルから成ることがわかったが、1.2ppmのピークについては、明らかに下に凸な曲線を描き、複数成分からなると推定された。そこで 1.2ppmの強度変化データに対しては、さらに図6に示したように、カーブフィッティングを行ない、ピークを2成分に分割した。

以上の操作から、図2のスペクトルはケミカルシフト的には図4の3成分より成り、また、緩和時間も考慮すると、4成分から成ることがわかった。結果を表1にまとめたが、それぞれ、表1に示したように帰属でき、アルキル鎖が緩和挙動的に2種類存在するのも、界面活性剤が2種類配合されていることを考えると妥当である。

さらに、同じデータに一括フィッティング法を適用した。成分数を変えてフィッティングを行なうと、4成分目までは残差2乗和が減少したが、5成分目の導入はほとんど効果が見られなかった。この結果より、逐次法と同様に4成分としてフィッティングすることが妥当であると判断された。一括フィッティング法による解析結果を表2に示す。定性的には逐次法と同様の結果が得られている。

主として手作業に頼る逐次法より、一括フィッティング結果のほうが、精度は高いと考えられるが、いきなり一括フィッティングにかけると収束しにくいので、逐次法により、おおよその解を把握した上で一括フィッティングを行なうのが良いと思われる。

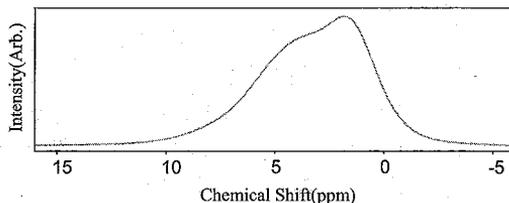


Fig.2  $^1\text{H-NMR}$  of detergent powder

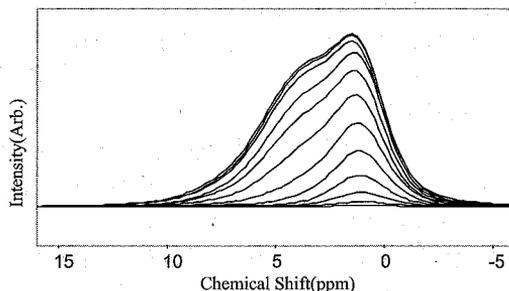


Fig.3 Each spectrum for  $\tau = 0.00008, 0.00016, 0.00032, 0.00064, 0.00128, 0.00256, 0.00512, 0.01024, 0.02048, 0.04096, 0.08, 0.16(\text{s})$

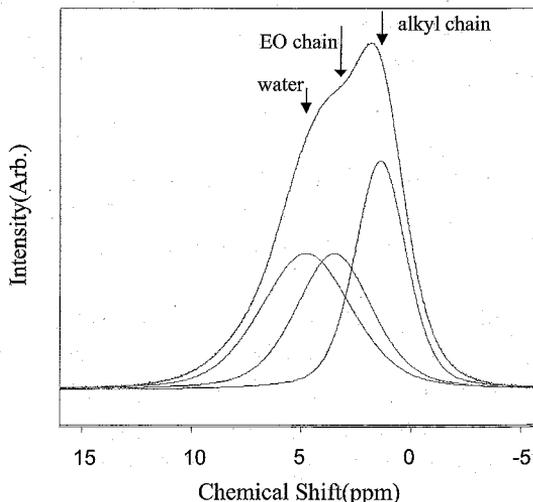


Fig.4 Signals extracted by stepwise method

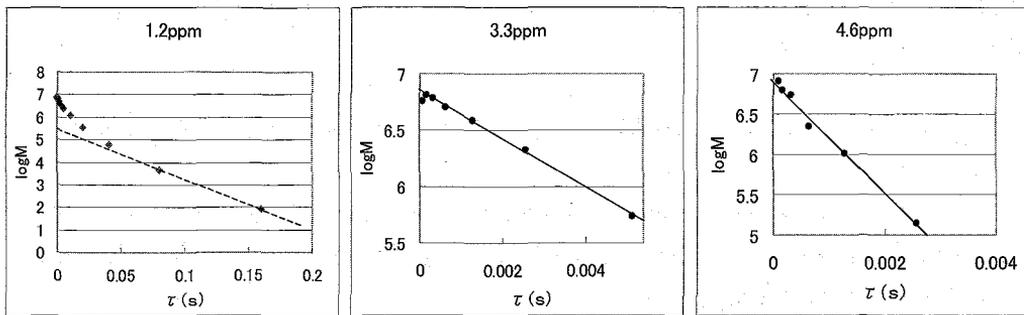


Fig.5 Intensity profile of each peak

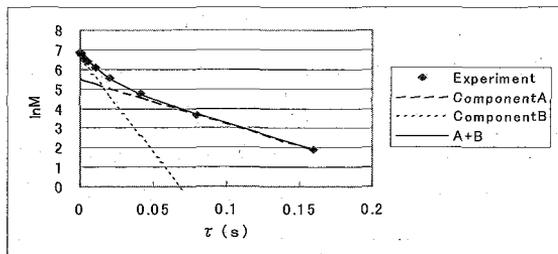


Fig.6 Further separation of signal at 1.2ppm

Table 1 Result of stepwise method

\* Normalized for total intensity at 1.2ppm to 100

Chemical shift	Intensity*	$T_2$ (s)
1.2ppmA	27	$4.4 \times 10^{-2}$
1.2ppmB	73	$1.0 \times 10^{-2}$
3.3ppm	97	$5.2 \times 10^{-3}$
4.6ppm	108	$1.4 \times 10^{-3}$

Table2 Result of whole-fitting method

\* Normalized for total intensity at 1.1,1.2ppm to 100

Chemical shift	Intensity*	$T_2$ (s)
1.1ppm	39	$2.7 \times 10^{-3}$
1.2ppm	61	$2.1 \times 10^{-2}$
3.8ppm	84	$3.1 \times 10^{-3}$
5.9ppm	38	$1.0 \times 10^{-3}$

比較のために、同じ条件で測定した1次元スペクトル(遅延時間無し)に対して、単純なフィッティングを行なうと、2つの標準波形を用いるだけで、スペクトル形状を再現でき(図7参照)、それ以上の成分は検出できなかった。すなわち、このデータに関しては、従来法では不完全な分離しか行なえず、緩和軸を考慮した本法の優位性が示された。

【結言】 以上、緩和挙動を利用することで、著しく分解能が低下したスペクトルの解析に成功した。緩和時間がシグナル毎に算出できているので、一連のサンプルに関して同様の測定・解析を行なうことで、各成分の運動性を相対的に比較することが可能となる。

今回は試料の問題で分解能が低下したサンプルへの適用であったが、本手法の応用範囲は、もともと分解能の低い低磁場型のNMRに適用するなど、かなり広いと考えられる。

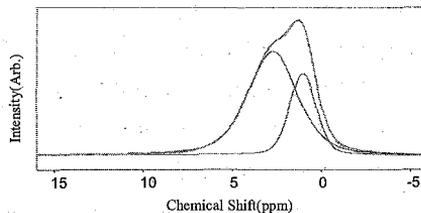


Fig.7 Separation result by conventional method

## Automated Structure Determination of SAIL Ubiquitin Using the SAIL-FLYA System

○ Teppei Ikeya<sup>1</sup>, Hitoshi Yoshida<sup>1</sup>, Tsutomu Terauchi<sup>1</sup>, Peter Güntert<sup>1,2</sup> and Masatsune Kainosho<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, <sup>2</sup>Institute of Biophysical Chemistry, J. W. Goethe-University Frankfurt, Germany, <sup>3</sup>Graduate School of Science, Nagoya University)

### Introduction

Our recently developed SAIL (Stereo-Array Isotope Labeling) method provides a complete stereo- and regiospecific pattern of stable isotopes, which yields much sharper resonance lines and reduced signal overlap without loss of information. SAIL makes it possible to rapidly and precisely determine 3D structures of proteins with higher molecular weight. One of our major goals is to determine the structures of larger than 50 KDa proteins using NMR. Another goal is to determine the structures of SAIL proteins with fully automatic data analysis. The SAIL approach facilitates the recognition and assignment of signals by computational approaches because of the high spectral resolution and the reduced number and ambiguity of the peaks.

Recently we developed a new computational system designed to handle the whole NMR structure determination process, the fully automated NMR structure determination algorithm (FLYA). The FLYA algorithm is an iterative procedure comprising peak picking, preparation of peak lists (removal of peaks near the diagonal or water line, etc.), chemical shift assignments by multiple runs of a modified version of the GARANT algorithm with different seed values, determination of a consensus chemical shift assignment, assignments of NOE peaks and structure calculations by CYANA. The FLYA program is able to solve three-dimensional structures of proteins using as experimental input data only the amino acid sequence and a set of multi-dimensional NMR spectra without manual handling such as removing noise peaks. The combination of both approaches is advantageous for the automatic process because SAIL yields much sharper resonance lines and reduced signal overlap without loss of information.

We performed fully automatic structure determinations of SAIL ubiquitin as a model protein to analyze the performance of the SAIL-FLYA system and to evaluate the number and types of spectra that are required to solve structures automatically.

Keywords: SAIL, FLYA, CYANA, Automated structure determination

## Experimental

A 0.4 mM SAIL ubiquitin sample was produced by *E.coli* cell-free synthesis. NMR measurements were performed at 298K on a Bruker DRX 600 spectrometer, with the exception of the NOESY spectra that were recorded on a Bruker AV 800 spectrometer. The programs NMRPipe, NMRview and Ansig were used for spectral processing, automated peak picking and spectrum visualization.

## Results and Discussion

The fully automated approach achieved assignments of 99.1% of the backbone and 96.5% of all  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  nuclei, and yielded a structure within less than 1.0 Å backbone RMSD from the structure obtained with conventional manual assignment. Even with only three 3D spectra as input (two HSQC, CBCACONH and two NOESYs), FLYA was able to assign the chemical shifts of 96.6 % of the backbone and 92.8% of the all nuclei, and produced a structure with a backbone RMSD of 1.24 Å compared to the conventional structure. These results for SAIL ubiquitin show a higher accuracy of the structure than in the case of the similarly large but uniformly  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  labeled Fes SH2 protein (backbone RMSD 2.87 Å)<sup>3</sup> which was calculated with the same minimal set of spectra. This indicates that structures of SAIL proteins can be solved by fully automatic structure calculation from minimal sets of spectra. The possibility to determine structures from strongly reduced sets of spectra suggests that SAIL-FLYA can be applied to difficult cases such as proteins with marginally stable samples which cannot be subjected to prolonged measurements that would be necessary to acquire an extensive set of spectra.

## References

- 1) Kainosho M., Torizawa T., Iwashita Y., Terauchi T., Ono A.M. and Güntert P., Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. *Nature*, 440, 52 (2006).
- 2) Ikeya T., Terauchi T., Güntert P. and Kainosho M., Evaluations of stereo-array isotope labeling (SAIL) patterns for automated structural analysis of proteins with CYANA. *Magn. Reson. Chem.*, 44, S152-S157 (2006).
- 3) Scott A., López-Méndez B. and Güntert P., Fully automated structure determinations of the Fes SH2 domain using different sets of NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* 44, S83-S88 (2006).
- 4) López-Méndez, B. and Güntert, P. Automated protein structure determination from NMR spectra. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 13112-13122 (2006).

## リアルタイム自動帰属プラットフォームの開発

<sup>1</sup>北海道大学大学院薬学研究院, <sup>2</sup>Varian Ltd. Oxford,<sup>3</sup>Jesus College, Cambridge University<sup>1</sup>横地政志, <sup>1</sup>小橋川敬博, <sup>1</sup>関口真二, <sup>2</sup>Eriks Kupce. <sup>3</sup>Ray Freeman, <sup>1</sup>稲垣冬彦

## A real-time protein backbone assignment technique

<sup>1</sup>Masashi Yokochi, <sup>1</sup>Yoshihiro Kobashigawa, <sup>1</sup>Shinji Sekiguchi, <sup>2</sup>Eriks Kupce,<sup>3</sup>Ray Freeman and <sup>1</sup>Fuyuhiko Inagaki<sup>1</sup>Hokkaido University, <sup>2</sup>Varian Ltd. Oxford, <sup>3</sup>Cambridge University

We present a real-time technique for protein main chain assignment based on interactive use of the assignment program (Olivia) and NMR spectrometer to determine the connectivity between amino-acid residues of a protein. We start with a basic set of experiments. A three-dimensional NMR correlation spectrum is recorded using one of the commonly used pulse sequences. The measurements are speeded up by using the projection-reconstruction technique, with an adaptive subroutine to select projection angles that avoid overlap. Olivia then assesses whether there is sufficient NMR correlation information to make a valid assignment; if not, it selects the next NMR pulse sequence and instructs the spectrometer computer to take further measurements. In the examples studied, convergence was rapid and unambiguous.

従来のDFTによるNMR測定法に代わる、新しいNMRの測定法の開発(PR, FDM, ノンリニア)によって、測定時間の大幅な短縮が可能になった。これらの高速なNMR測定法は特定のデータ処理と密接に結びついていて、ユーザーレベルで普及を妨げる要因となる。今回、NMR測定・データ変換・シグナル解析までを一つのシステム上に統合して、ユーザーが最新のNMR測定法を利用しようとする際に必要な一連の機能を解析システムOliviaに実装した。

キーワード : Projection! Reconstruction! NMR,! Filter! Diagonalization! Method, Nonlinear!Sampling!Method

著者ふりがな : よこちまさし

クロレラ由来のユビキチン(8.5 kDa)及び Vav SH2 ドメイン(13.5 kDa)を試料として用い、測定法としてプロジェクションリコンストラクション(PR-NMR)法を使い、(分光器制御を含む)測定から解析までが一体となったシステム上で主鎖連鎖帰属を行なった。ユビキチンを用いた結果を以下に示す。今回の場合、測定開始から解析完了まで半日程度であった。

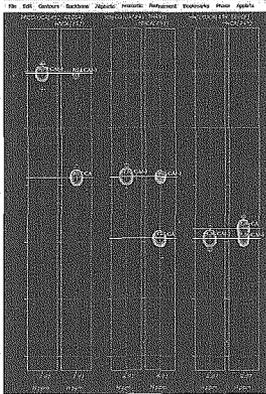


Fig.1a Conventional DFT

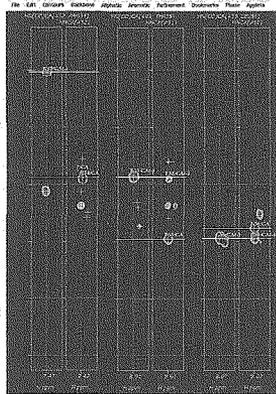


Fig.1b PR-NMR (1.4mM Chlorella Ubiquitin)

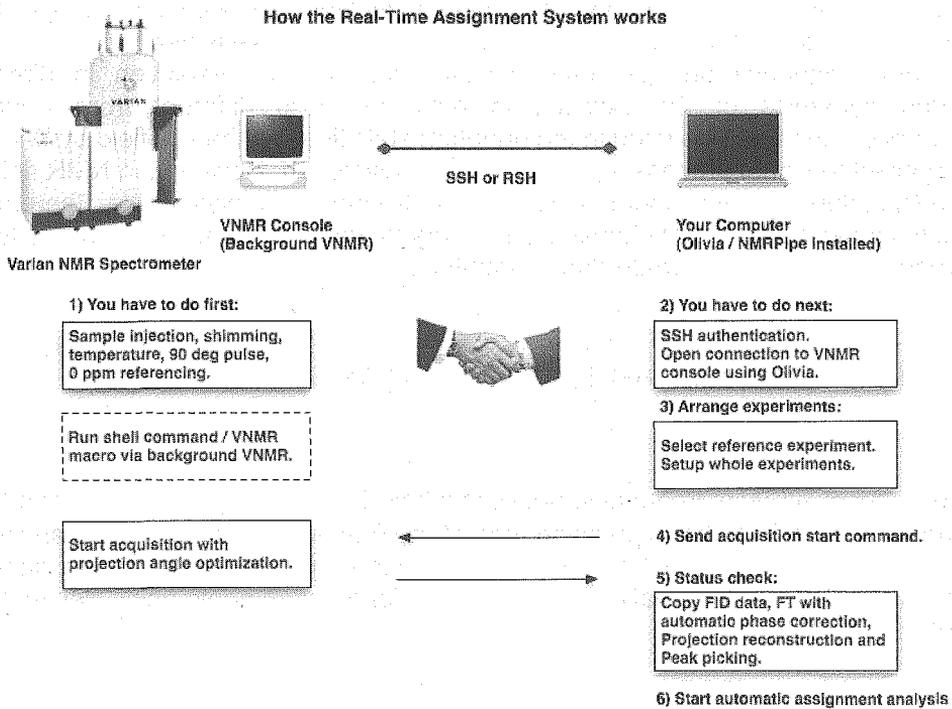


Fig.2 Configuration of a real-time assignment system

## P104 新しい NMR 分光法: 時間周波数 NMR 分光法の試み

○近山英輔<sup>1</sup>、菊地淳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>理研PSC、<sup>2</sup>名大院生命農

Time-frequency NMR spectroscopy

○Eisuke Chikayama<sup>1</sup> and Jun Kikuchi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>RIKEN PSC, <sup>2</sup>Grad. Sch. of Bioagri. Sci., Nagoya Univ.

### Abstract

Pulsed Fourier-transform NMR spectroscopy in which a Free Induction Decay (FID) responding to a sequence of electro-magnetic pulses is Fourier-transformed to obtain a frequency spectrum is currently the most standard method in the NMR realm. Other methods using no Fourier transformation, however, are possible and developed, for example, such as Radon or Hadamard transformation for fast multidimensional NMR spectroscopy, or Laplace transformation for a spectroscopy related to relaxation constants.

Sequential measurements of a sample by NMR are needed to directly track a dynamical state of the sample. In principle, using such the conventional sequential way, the time resolution is limited to sub-second to seconds, which is the sum of the time of an acquisition and a recovery. There is another indirect way of obtaining time-resolved spectra in which a parameter representing an elapsed time from the initial state is increased step by step during multiple experiments though the reproducibility of the initial state and the dynamics of the sample is needed.

Time-frequency analysis can achieve smaller time resolution in directly measured dynamics of the sample, in principle. It is different from Fourier transformation and first was used in the quantum statistical mechanics field by Wigner. It was applied to signal processing field and then developed. However, in NMR fields, there is no elaborate development using time-frequency analysis. We, therefore, analyzed spectra in which 1H chemical shifts vary in time using one of the methods of time-frequency analysis, Born-Jordan distribution,

$$S(t, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\frac{t}{2}}^{\frac{t}{2}} \frac{1}{|\tau|} \exp(-i\omega\tau) \int_{-\frac{t}{2}}^{\frac{t}{2}} s^*\left(u - \frac{\tau}{2}\right) s\left(u + \frac{\tau}{2}\right) du d\tau$$

, where  $t$  is time;  $\omega/(2\pi)$  is frequency;  $S(t, \omega)$  is a time-frequency spectrum;  $s(t)$  is a FID. As understandable from the expression, one of the feature in time-frequency analysis is obtaining a two dimensional spectrum from a one dimensional FID. In the annual meeting, we will report the analysis of simulations and experiments using decoupling ON/OFF pulse sequences.

Keywords: 時間周波数解析、時間分解 NMR

ちかやまえいすけ、きくちじゅん

## 要旨

NMRの世界では電磁波パルスに対する応答である自由誘導減衰信号(FID)をフーリエ変換で周波数スペクトルに変換するパルスフーリエ変換 NMR が現在では標準的手法となっている。しかしながら例えばラドン変換、アダマール変換などを用いた高速測定法や、ラプラス変換を用いた緩和時間スペクトルなどのフーリエ変換を用いない NMR 法も可能であり提案されてきた。

NMRで試料のダイナミクスを追跡したい場合、直接的には連続で試料のNMRを測定することが必要である。このように直接にダイナミクスをパルスフーリエ変換 NMR で計測する方法では、原理的に時間分解能は1回のFID取得時間に制限される。つまりそれはFID取得と回復時間の合計となり、伝統的な方法では一般にサブ秒から秒オーダーに制限される。間接的には試料(ダイナミクスを再現可能な試料)を初期状態に戻し時間パラメタを変えて複数回測定するという方法も考えられる。

試料のダイナミクスを直接計測する方法として、フーリエ変換とは異なる「時間周波数解析」法で原理的により短い時間分解能達成が可能であると考えられる。時間周波数解析は最初ウイグナーにより量子統計力学の解析に用いられた方法に依っており、その後主に信号処理の分野で用いられ発展してきた。しかしながらNMRにおいては時間周波数解析を用いた効果的な分光方法論はほとんど発展していない。そこで今回我々は<sup>1</sup>Hケミカルシフトが時間で移り変わるスペクトルを時間周波数分布の1つであるBorn-Jordan分布

$$S(t, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\frac{|t|}{2}}^{\frac{|t|}{2}} \frac{1}{|\tau|} \exp(-i\omega\tau) \int_{-\frac{\tau}{2}}^{\frac{\tau}{2}} s^*\left(u - \frac{\tau}{2}\right) s\left(u + \frac{\tau}{2}\right) du d\tau$$

を用いて解析した。ここで、 $t$ は時間、 $\omega/(2\pi)$ は周波数、 $S(t, \omega)$ は時間周波数スペクトル、 $s(t)$ は自由誘導減衰である。このように1次元の1つの自由誘導減衰  $s(t)$  から2次元の時間周波数スペクトルを得ることができることが時間周波数解析の特徴である。年会ではシミュレーション結果と、実際にデカップリング ON/OFF パルスシーケンスを用いた実験の解析例について詳細に報告する。

## 高磁場 DNP のための高出力サブミリ波 発生装置(ジャイロトロン)の開発

(阪大蛋白研<sup>1</sup>、福井大遠赤センター<sup>2</sup>)

○高橋大樹<sup>1</sup>、出原敏孝<sup>2</sup>、小川勇<sup>2</sup>、ラ・アグス<sup>2</sup>、印牧知廣<sup>2</sup>、光藤誠太郎<sup>2</sup>、斉藤輝夫<sup>2</sup>、  
江川文子<sup>1</sup>、阿久津秀雄<sup>1</sup>、藤原敏道<sup>1</sup>

### Development of High-Power Submillimeter Wave Radiation Source (Gyrotron) for High-Field DNP

1 Institute for Protein Research, Osaka University

2 Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui

Hiroki Takahashi<sup>1</sup>, Toshitaka Idehara<sup>2</sup>, Isamu Ogawa<sup>2</sup>, La Agusu<sup>2</sup>, Tomohiro Kanemaki<sup>2</sup>,  
Seitaro Mitsudo<sup>2</sup>, Teruo Saito<sup>2</sup>, Ayako Egawa<sup>1</sup>, Hideo Akutsu<sup>1</sup>, and Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup>

High-field dynamic nuclear polarization (DNP) using electron spins is a promising technique for biological systems which can significantly enhance the sensitivity of high-resolution solid-state NMR. This report presents the instrumentation for DNP at 14.1 T with a 394-GHz second harmonic gyrotron. A fabrication error of about 10  $\mu\text{m}$  in the cavity diameter shifted the submillimeter wave frequency by about 0.6 %. This error was compensated for by the step-tunability of this gyrotron, FU CW II. Gyrotron FU CW II generated 394.3-GHz submillimeter wave at the  $\text{TE}_{0,6}$  mode with the output power above 30 W in complete CW operation. The submillimeter wave is transmitted to a liquid- $\text{N}_2$  temperature magic-angle-spinning rotor through a circular waveguide.

#### 【緒言】

近年、構造決定のために、多数の洗練された固体 NMR 実験法が開発されているが、巨大な生体分子への応用は分解能や感度の低さのために難しい。感度を 100 倍以上向上させる方法としては、電子スピンの分極を核スピンの核分極(DNP)法が知られている。高磁場での DNP 実験は電子スピン遷移を飽和させる高出力テラヘルツ波光源や極低温マジック角回転などが必要であり、技術的な難しさのために実施困難であった。本発表では、我々は高磁場 DNP 用の高輝度光源としてジャイロトロンを製作したので報告する。

---

キーワード : DNP、ジャイロトロン、固体 NMR、電子スピン、感度向上

たかはしひろき、いではらとしたか、おがわいさむ、ら・あぐす、かねまきともひろ、みつどうせい太郎、さいとうてるお、えがわあやこ、あくつひでお、ふじわらとしみち

## 【高磁場 DNP】

NMRの検出部はESRと違いサブミリ波に対する共振構造をとっていないため、Q値が低くなり、数W以上のサブミリ波が要求される。伝送系での損失も考慮すると、数10~100W発振する高出力サブミリ波光源が必要である。また、電子スピンの緩和を抑制して効率を高めるために極低温で測定する必要がある。さらに、固体高分解能スペクトルのためにはマジック角試料回転(MAS)用のプローブが必要であり、我々はこの低温システムを開発し昨年度のNMR討論会で報告した(ポスター番号:P111)。他にも高磁場DNPには試料中に常磁性中心が存在する必要がある。そのため試料に均一にラジカルを添加する。電子スピンの平衡分極は $^1\text{H}$ スピンのより約660倍大きい。その巨大な電子スピンの分極を近傍にある核スピン( $^1\text{H}$ )へ移し(DNP)、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 間双極子相互作用を通じて拡散させ試料全体の $^1\text{H}$ スピンの分極を増大させる。本研究では、14.1Tの固体NMR用マグネットを用いるため、 $^1\text{H}$ の共鳴周波数は約600MHzであり、電子スピンを励起させるために必要なサブミリ波の周波数はおよそ394.7GHzである。ただし、g値を $g=2.000$ として計算した。以上のことから、14.1TのDNPでは約394.7GHzのサブミリ波を高出力(数10~100W)発振できるジャイロトロンを作成する必要がある。

## 【ジャイロトロンの原理】

ジャイロトロンはサイクロトロンメーザー作用を発振原理とする高周波光源である。電子銃により放射された電子は軸方向磁場に沿って螺旋運動をしながら空洞共振器部分に入る。そこで電場と相互作用をしてサブミリ波が発生し、上部のウィンドウから伝送系を通りプローブへと伝わる。また、空洞部を通り抜けた電子は冷却水によって冷やされコレクターで回収される。

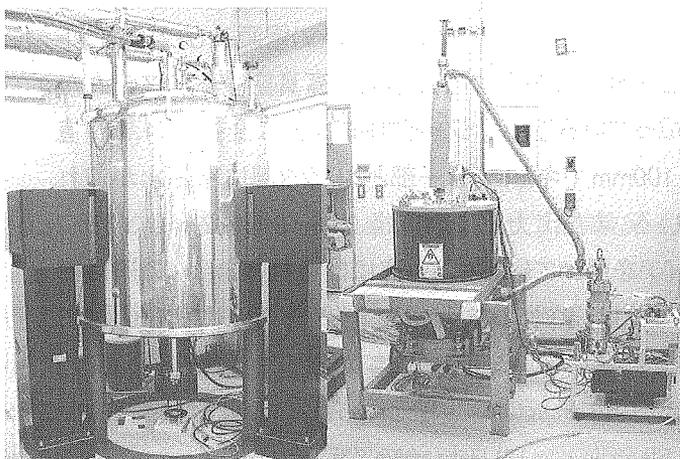


Fig. 1. 14.1 T high-resolution solid-state NMR magnet and 394 GHz CW gyrotron.

## 【ジャイロトロン管の設計】

電子ビームを発生させるためにカソード半径 4.5mm の三極電子銃を用いる。また、ビー

ム半径及びピッチファクターは最大 0.13T のガンコイルで調整する。キャビティーの形状は  $TE_{2,6}$  モード2次高調波で 394.6GHz を発振するように設計した。すなわち、全長 15mm 半径 2.36mm の銅製円形導波管に傾き  $6.0^\circ$  のアップテーパ(入力側)と  $2.5^\circ$  のダウンテーパ(出力側)を 4mm ずつ接続した(図2上)。図2下はキャビティーの位置による電磁場強度を表している。

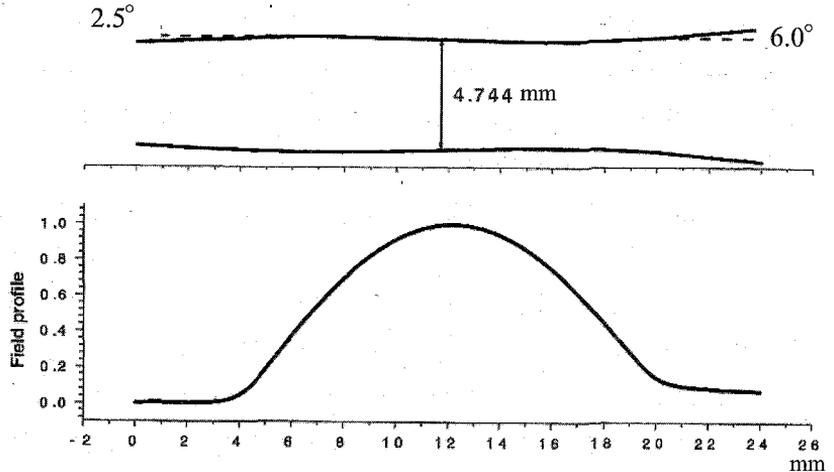


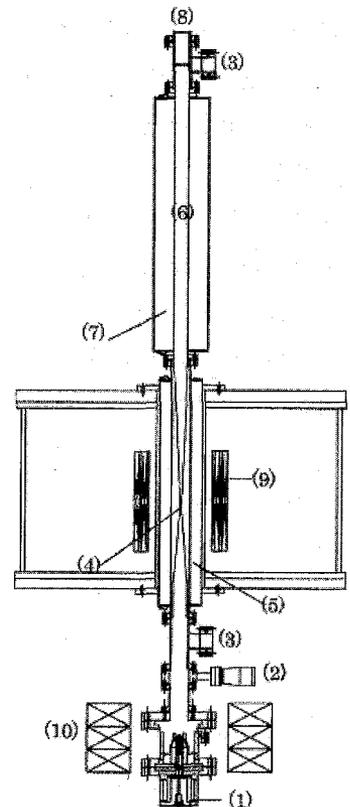
Fig. 2. Cross-section of a 394.6 GHz gyrotron cavity with the axial field profile for the second harmonic  $TE_{2,6}$  mode.

### 【ジャイロトン FU CW II】

ジャイロトン FU CW II はジャイロトン管、8T ヘリウムフリー超伝導マグネット、ガンコイル、電子銃(カソード・アノード用高電圧(max : 30kV)電源及びフィラメント用ヒーター電源を含む)、及び、高真空排気システムから成っている(図3)。ジャイロトン管は全長約 1.7m、直径 100mm でキャビティー部とコレクタ部に冷却水が流れている。また出力窓には直径 33mm、厚さ 2.5mm のサファイアを用いている。出力窓には直径 28mm の円形導波管が接続されており、サブミリ波を NMR プローブまで伝送する。

Fig. 3. Cross-section of Gyrotron FU CW II.

- (1) Electron gun, (2) Gate valve, (3) Tees to the ion pump, (4) Cylindrical resonant cavity, (5) Water jacket for cooling the cavity, (6) Electron collector, (7) Water jacket for cooling the collector, (8) Output window, (9) Superconducting magnet, (10) Gun coil



## 【結果】

CWモードにおいて水負荷を用いて出力測定を行った。基本波発振のとき100-200Wの出力を、2次高調波発振のとき10-30Wの出力を得た。サブミリ波の周波数測定はミキサ及びローカルオシレータとしてシンセサイザーを用いたヘテロダイン検波により、スペクトラムアナライザで観測した。全ての周波数領域において、キャビティの形状から計算される周波数よりも0.57%低い周波数が観測された。この違いはキャビティの加工誤差から生じておりその値は $14\mu\text{m}$ である。このジャイロトロンには、静磁場強度を変えて共鳴発振モードを選ぶことにより、発生させるサブミリ波周波数を変えることができるステップ・チューナビリティがある。このことを利用して、加工精度誤差を補償した。つまり、600 MHz、 $^1\text{H-NMR}$ の高感度化に必要な394.7 GHz近傍のサブミリ波を発生させるために、設計時に予定していた $\text{TE}_{2,6}$ モード(計算値:394.6GHz、実測値:392.25GHz)ではなく $\text{TE}_{0,6}$ モード(実測値:394.27GHz)を用いることにする。基本波モードである $\text{TE}_{2,3}$ モードが競合するモードであるが、磁場をうまく調節すれば $\text{TE}_{0,6}$ モードは単独で発振することができる(図4)。

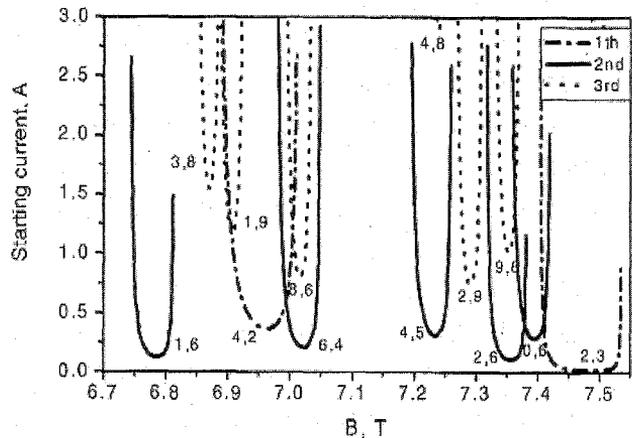


Fig. 4. The starting currents for the resonant cavity as a function of static magnetic field.

## 【まとめ】

高分解能固体NMRの高感度化に必要な高磁場DNPのための高出力サブミリ波発生装置であるジャイロトロンを開発した。14.1TでDNP実験を行うためにはおよそ394.7 GHzのサブミリ波を数W程度試料に照射し、電子スピンを励起させる必要がある。作成したジャイロトロンFU CW IIは $\text{TE}_{0,6}$ モード、2次高調波で30 Wの出力で発振した。今後、このサブミリ波を低温プローブまで導波管で伝送し、高磁場DNP実験を行う予定である。

## 【参考文献】

- T. Idehara. et al, Int. J. Infrared Milli Waves, 28 (2007) 433-442  
La Agusu. et al, Int. J. Infrared Milli Waves, 28 (2007) 499-511

## 新方式NMR用多核プローブの開発

(株)日立製作所日立研究所<sup>1</sup>、物質・材料研究機構<sup>2</sup>○ 田中 秀樹<sup>1</sup>、長谷川 学<sup>1</sup>、岡田 道哉<sup>1</sup>、北口 仁<sup>2</sup>

## Development of multinuclear NMR probe for advanced NMR system

<sup>1</sup>Hitachi Research Laboratory, Hitachi, Ltd., <sup>2</sup>National Institute for Materials ScienceH. Tanaka<sup>1</sup>, M. Hasegawa<sup>1</sup>, M. Okada<sup>1</sup> and H. Kitaguchi<sup>2</sup>

We present a solution 300MHz NMR probe with a solenoidal RF coil, which is combined with a superconducting split magnet. This probe has  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  channels and z pulsed field gradients, and is inserted in the horizontal direction. We can use standard 5mm sample tubes as usual. Moreover, long vertical sample tubes are selectable, because the magnet has a cross-bore. The fundamental characteristics of the probe have been tested that including pulse widths, RF homogeneities, etc. In addition, water suppression experiment using WATERGATE has succeeded.

## 1. はじめに

NMR 信号測定に用いるアンテナコイルにおいて、ソレノイドアンテナはサドルアンテナよりも高感度である<sup>1)</sup>。従来の超電導磁石では、ソレノイドアンテナ内に液状サンプルを配置するためには工夫が必要であり、ソレノイドアンテナと通常試験管の組み合わせは困難であった。一方、我々が開発を行っている NMR システムでは、スプリット型超電導磁石を用いることで、ソレノイドアンテナと通常試験管の組み合わせを可能としている。

Fig. 1 にスプリット型超電導磁石とプローブの組み合わせ概念図を示す。スプリット型超電導磁石には水平方向および鉛直方向に 2 軸の室温ボア (Cross-bore) が設けられている。プローブを水平方向から挿入し、試験管を鉛直方向から挿入することで、磁石中心にてソレノイドアンテナの中に試験管を組み合わせる。なお、スプリット型超電導磁石で発生させる静磁場 ( $B_0$ ) は水平方向である。

本発表ではソレノイドアンテナを搭載した多核プローブのアンテナ位置関係、プローブと 300MHz スプリット型超電導磁石<sup>2)3)</sup>とを組み合わせ得られたスペクトル、およびプローブ基本特性について報告する。

キーワード：スプリット型超電導磁石、溶液 NMR、ソレノイドアンテナ、プローブ

田中 秀樹 (たなか ひでき)

## 2. プローブ構成

プローブには $^1\text{H}$ 、 $^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ （または $^{15}\text{N}$ ）の高周波チャンネルと、1軸の傾斜磁場コイルを搭載した。 $^1\text{H}$ 共鳴周波数は300MHz、測定可能な試験管外径は $\Phi 5\text{mm}$ である。本プローブの特徴であるソレノイドアンテナでは $^1\text{H}$ 、 $^2\text{H}$ の送受信を行い、この外側に配置したサドルアンテナで $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ を担当する。Fig. 2に二つのアンテナコイル、傾斜磁場コイル、試験管の軸関係を示す。 $^1\text{H}$ 高周波磁場（ $B_1$ ）方向と試験管軸は同一、静磁場（ $B_0$ ）方向と試験管軸とは直交となり、従来のNMRシステムとは軸関係が異なる。

傾斜磁場方向は静磁場方向である。傾斜磁場の漏れ磁場を抑制するため、傾斜磁場コイルはアクティブシールド型を採用した。最大傾斜磁場強度は42Gauss/cmである。

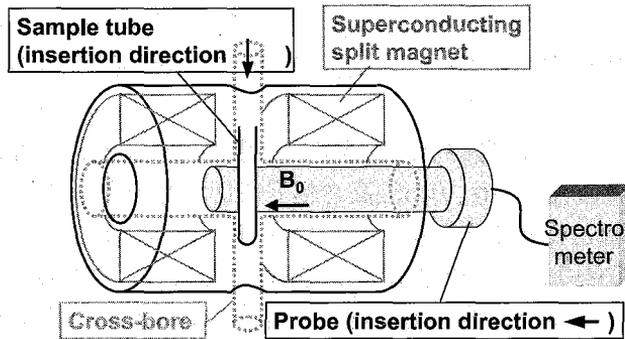


Fig. 1. Schematic diagram of superconducting split-magnet with cross-bore.

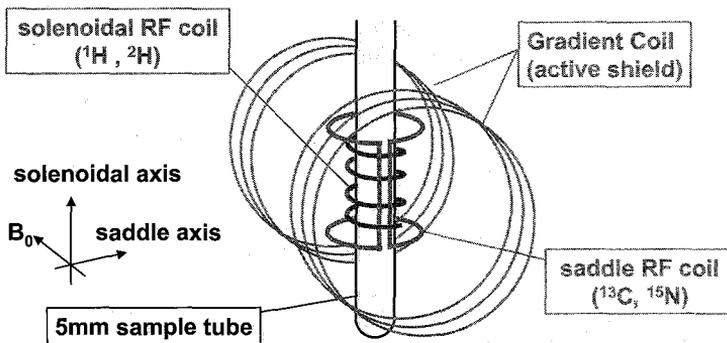


Fig. 2. Positional relation between RF coils, Gradient coils and sample tube.

## 3. プローブ基本特性

Fig. 3に高周波磁場均一度測定結果を示す。Fig. 3(a)は磁化率調整プラグで試料空間を限定した場合の $^1\text{H}$ スペクトル測定結果であり、均一度の指標である810/90の値は95%となった。この限定した試料空間の高さは、本NMRシステムに組み合わせる循環フロー型試験管<sup>4)</sup>と同一である。試料空間を限定していないサンプルでは810/90は83%と低下するが、実用上問題ない値と判断した。

Fig. 3(b)は $^1\text{H}$ デカップルを行いながら取得した $^{13}\text{C}$ スペクトルの測定結果を示しており、810/90の値は88%となった。 $^1\text{H}$ デカップルを行わない場合も同様に88%が得られた。以上に示すように、ソレノイドアンテナ、サドルアンテナ共に高周波磁場均一度が十分高いことを確認した。なお、90度パルス幅は $^1\text{H}$ で $8\mu\text{s}$ 、 $^{13}\text{C}$ で $14\mu\text{s}$ であり、十分広い照射帯域を確保した。

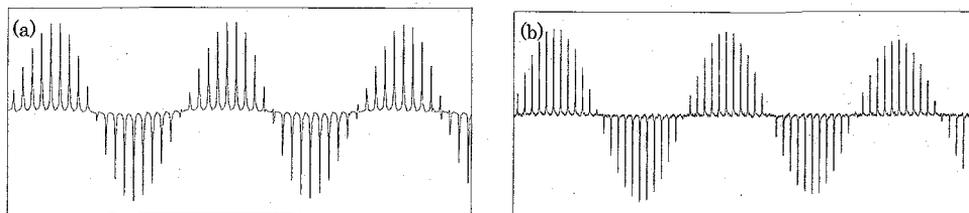


Fig. 3. RF homogeneity test results. (a)  $^1\text{H}$  810/90 = 95% with Susceptibility Plugs. ( 810/90 = 83% without plugs ) (b)  $^{13}\text{C}$  810/90 = 88% without plugs.

Fig. 4に $^1\text{H}$ スペクトル線幅評価結果を示す。回転していない1%クロロホルムから得られた線幅は、半値幅0.6Hz、0.55%高さ幅8.1Hzとなった。従来のNMRシステムで得られている線幅と比較すると、0.55%高さ幅は2割程度広い。ただし、同一の静磁場調整方法を用いた $^1\text{H}$ 測定感度は218（試料回転無し）であり、従来の300MHz NMRと同程度の測定感度を達成している。今後、静磁場調整の高精度化により、スペクトル裾野の幅を狭くし、測定感度の向上を目指す。

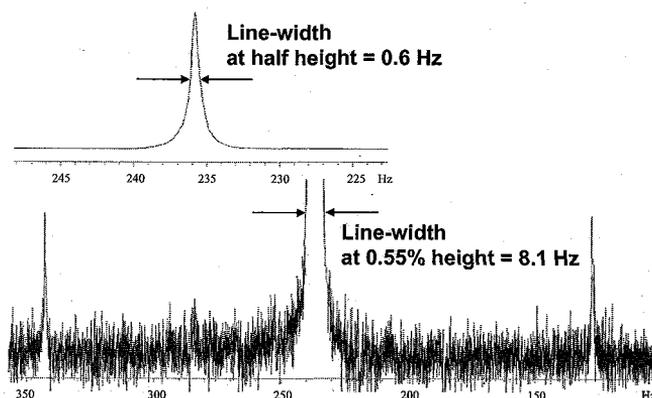


Fig. 4. Line Shape test results. Sample: 1% chloroform in D6 acetone (non-spin)

Fig. 5に水溶媒信号抑制試験結果を示す。試料は5mM Sucrose (溶媒90% $\text{H}_2\text{O}$ , 10% $\text{D}_2\text{O}$ )であり、その容積はおよそ $150\mu\text{L}$ である。この試料に対し3-9-19 WATERGATEを適用した結果、水溶媒信号を抑制しない場合と比べ、FID振幅を1/100程度まで抑制できた。消え残った $\text{H}_2\text{O}$ 信号が0.2 PPMまで広がっている原因は、前述のようにスペクトル裾野の幅が広いためと推測している。

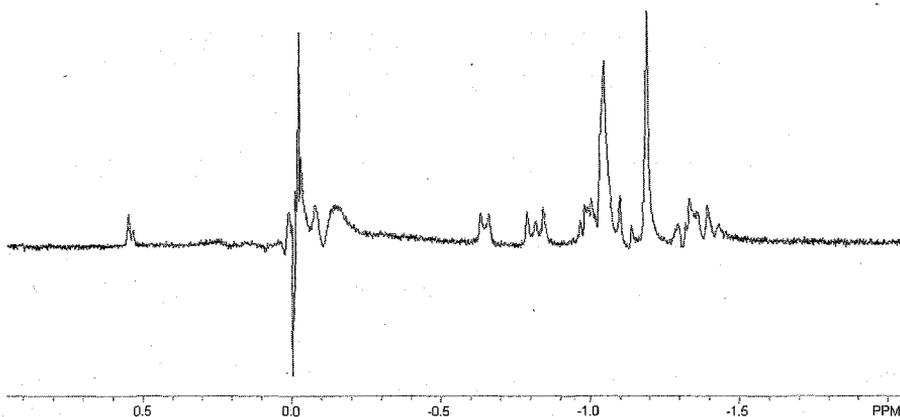


Fig. 5. 3-9-19 WATERGATE test results.

Sample : 5mM Sucrose in H<sub>2</sub>O 90% D<sub>2</sub>O 10% with Plugs, Number of scans : 16,  
Pulse Field Gradient : 42 Gauss/cm (1ms)

Fig. 5 の測定に用いた傾斜磁場パルスは、強度 42 Gauss/cm、パルス幅 1ms であるが、現状の本システムでこの傾斜磁場パルスを照射した場合の渦電流残留時間 (ring down delay time) はおよそ 1ms である。平均強度 10 Gauss/cm、パルス幅 1ms の傾斜磁場パルスを照射した場合、渦電流残留時間は数十 $\mu$ s まで短縮されるが、前述の傾斜磁場パルスと比べ、抑制できずに残った水溶媒の信号強度が 4 倍程度大きくなってしまふ。現在、水溶媒抑制能力が高く、かつ渦電流残留時間が数十 $\mu$ s となる傾斜磁場パルスを目標に調整を行っている。

#### 4. 謝辞

本プロジェクトを推進するにあたり、鉄道総合技術研究所 正田英介 会長、木村 錫一 先生、茨城大学 高妻孝光 教授、九州大学 神田大輔 教授、愛媛大学 森田 勇人 准教授のご指導、ご支援を賜りました。また、本研究の一部は、文部科学省科学技術振興調整費委託研究 (17文科振260号、18文科振489号) の一環として行われました。

#### 5. 参考文献 ((2)~(4)は第 46 回 NMR 討論会にて発表予定)

- (1) D. I. Hoult and R. E. Recharts, J. Magn. Resonance 24, 71 (1976)
- (2) 新方式 NMR 用 スプリット方式超電導磁石の開発 岡田 他
- (3) 新方式 NMR 用 300MHz 超電導磁石の均一磁場特性 土屋 他
- (4) 超電導スプリット型マグネット NMR システム向けの循環型滴定計測システム 北川 他

## 新たな評価関数を用いた磁場ロック装置の開発

(株)日立製作所日立研究所<sup>1</sup>、物質・材料研究機構<sup>2</sup>

○朴ミンソク<sup>1</sup>、岡田道哉<sup>1</sup>、北口 仁<sup>2</sup>

### A field-lock system with a novel field-evaluation function

<sup>1</sup>Hitachi Research Laboratory, Hitachi, Ltd., <sup>2</sup>National Institute for Materials Science, Minseok Park<sup>1</sup>, Michiya Okada<sup>1</sup>, and Hitoshi Kitaguchi<sup>2</sup>

We developed a novel field-evaluation function and a field-lock system including a digital-lock board. The field-lock system is a feedback-control apparatus which compensates drift and disturbance of the magnetic field strength in the sample. To enhance the performance of the field-lock system, it is necessary to improve the accuracy and stability of the field-evaluation function which assesses the deviation of the field strength from the acquired NMR signal. The field-evaluation function we developed has more linear nature than the dispersion signal, which has been used traditionally. The new function is implemented on the digital-lock board which has a 50MS/s A/D converter, a FPGA, and a DSP. In the test using 50% D2O solvent, the field-lock system compensates a step disturbance of 1.3Hz size in 0.5 second.

#### 1. 緒言

磁場ロック装置は磁場変動をフィードバック補正し、磁場安定性を向上させる。磁場変動を評価するために、磁場ロック装置は伝統的に重水素核信号の分散成分を用いて来た。分散成分を用いる磁場ロック装置は、アナログ回路でも簡便に実装できたため、1960年代に導入されてからNMR装置の高分解能化に大きく貢献した<sup>1)</sup>。一方で、磁場強度が一定値を越えて分散成分の絶対値が減少すると、磁場ロックが不安定になり補正不能になることがあった。我々は、磁場ロックの安定性および応答性を改善するため、磁場変動を評価する新たな関数を導出し、デジタル・ロック・ボードに実装した。本報告では、新たな評価関数の特徴と、それを用いて新方式NMR装置で行った磁場ロック実験について報告する。

#### 2. 新たな磁場評価関数

核スピンの作る巨視的磁化の期待値( $M_x, M_y, M_z$ )は、回転座標系の Bloch 方程式

$$\dot{M}_x = M_y \delta - M_x / T_2 \quad (1)$$

キーワード 磁場ロック 外乱 制御 Bloch方程式

ぱくみんそく

$$\dot{M}_y = M_z \omega_1 - M_x \delta - M_y / T_2 \quad (2)$$

$$\dot{M}_z = -M_y \omega_1 + (M_0 - M_z) / T_1 \quad (3)$$

で記述されることが知られている<sup>2)</sup>。ただし、 $\dot{M} = dM/dt$ である。 $\delta$ が磁場強度 $\gamma B_0$ とロック周波数 $\omega_{lock}$ との差 $\gamma B_0 - \omega_{lock}$ であり磁場変動量である。 $\omega_1$ は照射される高周波磁場の強度 $\gamma B_1$ 、 $M_0$ は $B_1 = 0$ での磁化の大きさである。

我々は、式(1)と(2)を連立し磁場変動量 $\delta$ に対し解くことで、以下の式を得た。

$$\delta = M_z \omega_1 \frac{M_x}{M_x^2 + M_y^2} + \frac{M_x \dot{M}_y - \dot{M}_x M_y}{M_x^2 + M_y^2} \quad (4)$$

NMR 信号は回転する磁化ベクトルから検出した信号を直交検波して得られ、吸収信号 $A = -gM_y$ と分散信号 $D = gM_x$ となる。 $g$ はサンプルと分光器により決まる信号強度の常数である。従って、式(4)は、吸収信号 $A$ と分散信号 $D$ を用いて、

$$\delta \approx gM_0 \omega_1 \frac{D}{D^2 + A^2} + \frac{D\dot{A} - \dot{D}A}{D^2 + A^2} \quad (5)$$

に書き改められる。式(5)では、磁場ロックでフリップ角が0に近いことから、 $M_z \approx M_0$ とした。式(5)の関数系から、我々は磁場変動量の評価関数

$$f(D, A) = c_s \frac{D}{D^2 + A^2} + c_d \frac{D\dot{A} - \dot{D}A}{D^2 + A^2} = c_s f_s(D, A) + c_d f_d(D, \dot{D}, A, \dot{A}) \quad (6)$$

を得た。以下では、時間微分を含まない $f_s(D, A)$ を用いた磁場ロックに関して報告する。なお、 $f_d(D, \dot{D}, A, \dot{A})$ を含む磁場ロックは、現在開発を進めている。

図1は、スピン系が磁場変動量 $\delta$ の下で定常状態になった場合に、 $f_s(D, A)$ と分散信号 $D$ が持つ値を示す。 $f_s(D, A)$ は磁場変動量 $\delta$ にほぼ比例した値である。一方、 $D$ は $\delta = 0$ 近傍では $\delta$ に比例するが、 $|\delta| > 1/T_2$ では $\delta$ の絶対値が増加しても $D$ の絶対値は減衰する。図1から、 $f_s(D, A)$ が磁場変動量 $\delta$ を $D$ より精確に評価していることが分かる。

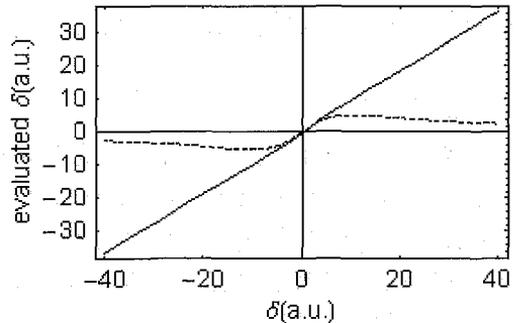


Fig.1. Steady-state value of field-evaluation functions: proposed function  $f_s(D, A)$  (solid line) and dispersion function  $D$  (dashed line)

### 3. 磁場ロック装置と実験

図2は本研究で開発した磁場ロック装置のブロック図である。ロック周波数 $F_{lock}$ の受信信号はミキサで中間周波数 $IF$ に変換され、デジタル・ロック・ボードでデジタル直交検波を受け吸収信号 $A$ と分散信号 $D$ となる。DSPは式(6)の $f_s(D, A)$ を用い $A$ と $D$ から磁場変動量を評価して、ロック電源 $DC$ の出力電流を増減させる。



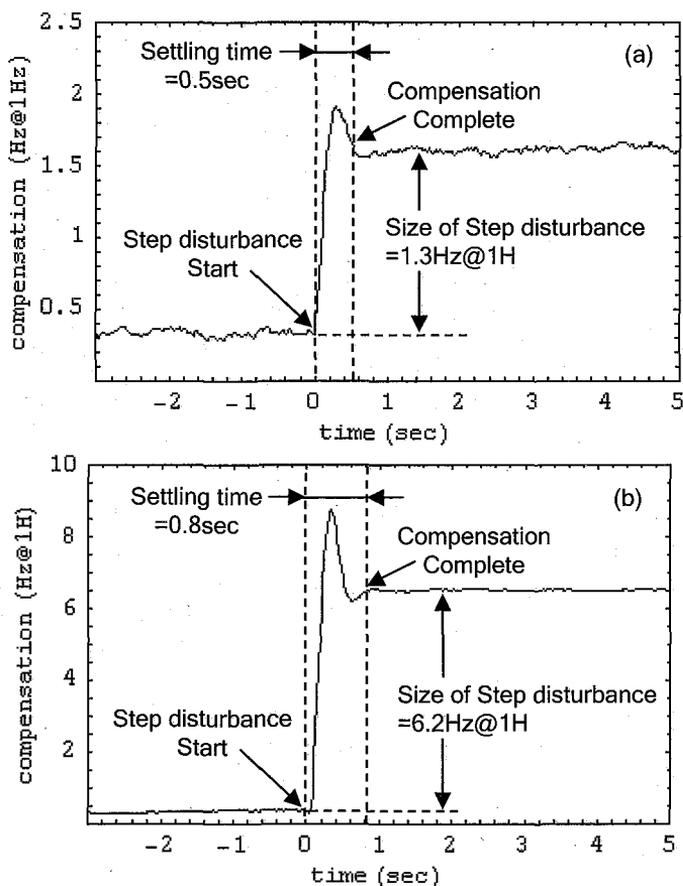


Fig.3. Compensation of step disturbances of size (a)1.3Hz and (b)6.2Hz. 50% H<sub>2</sub>O+50%D<sub>2</sub>O sample in 5mm tube is used.

本研究の推進に際して、正田英介先生、木村錫一先生、神田大輔先生、森田勇人先生、高妻孝光先生のご指導を戴きました。

本研究の一部は、文部科学省科学技術振興費委託研究、18 文科振 489 号)の一環として行われた。

## 5. 参考文献

- (1) R. Varian, Gyromagnetic Resonance Methods and Apparatus, US Patent, No. 3109138(1963)
- (2) C. P. Slichter, Principles of Magnetic Resonance(Springer, 1996)

(株)日立製作所日立研究所<sup>1</sup>、基礎研究所<sup>2</sup>、機械研究所<sup>3</sup>

物質・材料研究機構<sup>4</sup>

福田 祐三<sup>1</sup>、川崎 健一<sup>1</sup>、土屋 貢俊<sup>1</sup>、椎野 俊之<sup>1</sup>、萩原 修哉<sup>1</sup>、岡田 道哉<sup>1</sup>、  
山本 浩之<sup>2</sup>、齊藤 和夫<sup>2</sup>、田中 弘之<sup>3</sup>、佐保 典英<sup>3</sup>、北口 仁<sup>4</sup>

### Development of Cryogenic Probe System for NMR Spectrometer with Superconducting Split-Magnet

<sup>1</sup>Hitachi Research Laboratory, Hitachi LTD.,

<sup>2</sup>Advanced Research Laboratory, Hitachi LTD.,

<sup>3</sup>Mechanical Engineering Research Laboratory, Hitachi LTD.

<sup>4</sup>National Institute for Materials Science

Y. Fukuda<sup>1</sup>, K. Kawasaki<sup>1</sup>, M. Tsuchiya<sup>1</sup>, T. Shiino<sup>1</sup>, S. Hagiwara<sup>1</sup>, M. Okada<sup>1</sup>,  
H. Yamamoto<sup>2</sup>, K. Saitoh<sup>2</sup>, H. Tanaka<sup>3</sup>, N. Saho<sup>3</sup>, H. Kitaguchi<sup>4</sup>

An effective approach to improve the signal-to-noise ratio (SNR) in NMR measurements is to use a cryogenic probe. This paper describes the design and some preliminary test results of a recently developed NMR spectrometer. The most significant feature of this system is its utilization of a split-type superconducting magnet. The magnet structure makes it possible to employ a solenoid antenna to increase the SNR. The main specifications of the present design are as follows: objective temperature was set at 10K to reduce thermal noise by a unique cooling system with a double GM cryocooler. A low-noise amplifier and related switch circuits were carefully designed, as well. As a result, noise figure is less than 0.5 dB at the operating temperature.

#### 1. はじめに

核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)分光装置は、たんぱく質などの分子構造解析に有用な分析装置である。分子量が大きい物質を高速に解析するには、一層の高感度化が望まれる。日立では、超電導マグネットを分割構造とし、検知能に優れるソレノイド型プローブアンテナを適用可能とした新方式 NMR 装置を開発している。ソレノイド型アンテナを用いることにより、従来機のサドル型アンテナに対して 1.5~2 倍の検出感度向上が期待できる[1]。また、この開発の一部として、さらなる高感度化のため低温プローブを開発している。冷却ヘリウムガスを利用した低温プローブでは、20K 以下のアンテナの冷却により共振の Q 値(Q-factor)の向上とアンテナの発する熱雑音を低減しつつ、さらに受信機中の前置増幅器を冷却することで受信機の雑音を低減することで、信号対雑音比(SNR)の大幅な向上が得られる。

本研究では、NMR 装置の高感度化を目的として新方式 NMR 用低温プローブの基本構成を検討し、試作機の冷却システム、プローブアンテナ及び低温受信回路を評価した。

キーワード: スプリット型超電導磁石、溶液 NMR、低温プローブ、ソレノイド、高感度化

ふくだゆうぞう

## 2. 新方式 NMR 用低温プローブの構成

### i) 全体構成

低温プローブシステムの概略構造を Fig.1 に示す。低温プローブシステムは、プローブアンテナ、冷却装置と低温受信回路とからなる。プローブアンテナと低温受信回路はプローブ筐体の内部に設置されている。プローブ筐体はスプリット超電導マグネットがもつクロスボアの水平方向から挿入する。サンプルの挿入は垂直管の上方から行う。

Table1 に低温プローブの目標仕様を示す。SNR は次式により簡略的に表される。

$$SNR \propto \sqrt{\frac{Q}{T_a + T_r}} \quad (1)$$

ここで、 $Q$  はプローブアンテナの  $Q$  値、 $T_a$  はアンテナの温度、 $T_r$  は受信機の等価雑音温度であり、受信機の雑音指数 (Noise Figure, NF) を用いて  $T_r = 290 \times (10^{NF/10} - 1)$  として表される。開発の目標である  $SNR > 10000$  の仕様として、プローブアンテナの冷却温度 10K、プローブアンテナの  $Q$  値 10000、受信機の NF0.5dB と定めた。また、ラインシェイプの目標は従来機同等の半値幅: 0.5Hz、0.55% 幅: 5Hz、0.11% 幅: 10Hz とした。

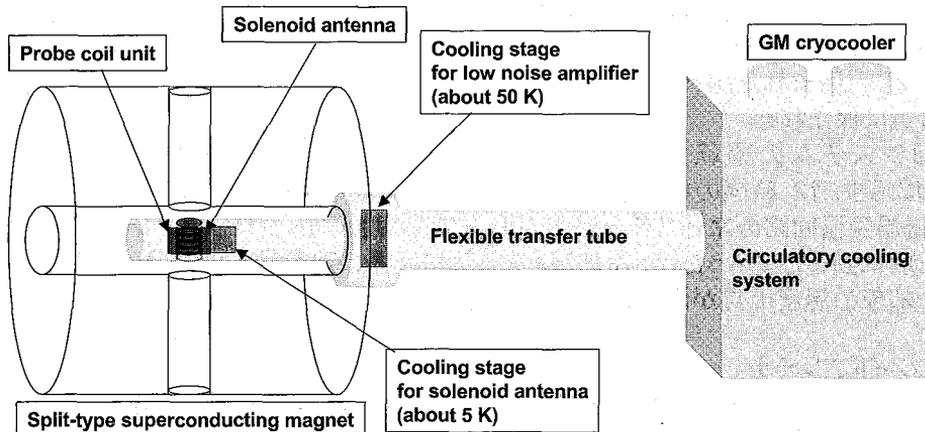


Fig.1 Schematic of cryogenic probe system for superconducting split-magnet.

Table 1 Design and test results of cryogenic probe system.

	Target	Test results
Resonance frequency of 1H	600MHz	
Shape of probe antenna	Solenoidal	
Quality-factor, Q	>10000	>10000
Antenna temperature	<10K	12K
Noise figure of cryogenic receiver circuits	<0.5dB	0.5dB
Line shape (50%/0.55%/0.11% at CHCl3)	0.5Hz/5Hz/10Hz	N/A
sample inserting direction	vertical	
probe inserting direction	horizontal	

### ii) 冷却システム

Fig.2 に低温プローブ用冷却システムの系統図を示す。冷却装置は 2 台の GM 冷凍機によりヘリウムガスを冷却し、圧縮機を用いてヘリウムガスを循環する。ガスラインはアンテナ

冷却システムと熱シールド冷却システムの 2 系統であり、それぞれ 5K と 50K のヘリウムガスをプローブに供給する。室温と 50K のライン、50K のラインと 5K のラインの間にはそれぞれ熱交換器を設置した。プローブ筐体と冷却装置の間は、長さ約 3m のトランスファーチューブで接続した。GM 冷凍機の振動を遮断するため、トランスファーチューブの支持脚を設けた。近傍に設置した熱交換器を冷却源として、アンテナの支持構造を通してプローブアンテナを伝導冷却した。プローブアンテナの同調と整合を行う共振回路も同様に熱交換器を冷却源として伝導冷却した。プローブ筐体は真空断熱構造となっており、プローブアンテナが約 10K まで冷却される一方で、アンテナに取り囲まれた試料挿入空間は室温付近に保たれる。

冷却システムの運転試験結果を Fig.3 に示す。12 時間の初期冷却で、プローブ内は定常温度に達し、プローブアンテナは 12K、低温受信回路の冷却ステージは 40K まで冷却された。プローブアンテナの温度は目標の 10K に到達しなかったが、冷却源となる熱交換器の温度は 5.3K まで冷却されており、伝導冷却部の温度上昇が原因であると考えられる。

### iii) ソレノイドアンテナ

想定している測定対象は水素核であり、開発スプリット型超電導マグネットの発生磁場 14.1T 中における水素核の共鳴周波数は 600MHz である。プローブアンテナの共振の Q 値は、ネットワークアナライザにより評価した。共振回路は 2 つの可変コンデンサ(トリマコンデンサ)を用い、同調と整合を調整した。アンテナの材料は磁性を調整した金属材料を用いた。冷却によってアンテナ共振回路の抵抗が減少するため、プローブアンテナの Q 値は室温の 760 から 12K では 2916 に増加した。検出信号強度はプローブアンテナの Q 値の平方根に比例する関係にあり、1.9 倍の検出信号増加が見込める。

また、より高感度を目指して、超電導体を材料としたソレノイドアンテナを開発している。開発した超電導アンテナ素子の一例を Fig.4 に示す。Fig.4 の超電導アンテナ素子は、サファイア基板上に MgB<sub>2</sub> 超電

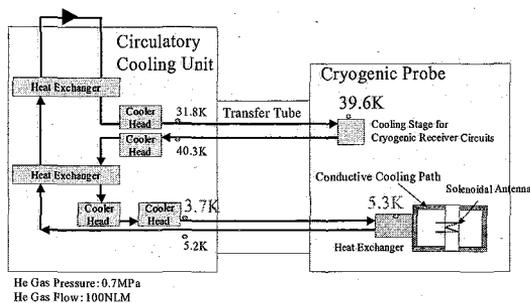


Fig. 2 Cooling system.

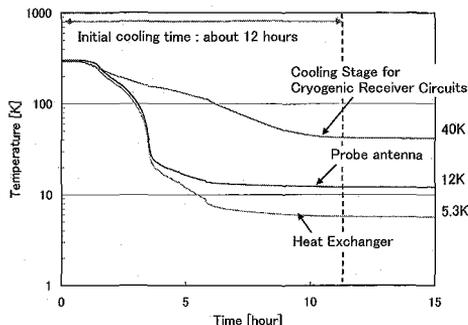


Fig.3 Test results of cooling system.

Table 2 Test results of Q-factor.

Temperature	Quality-factor	Material
300K	760	Metal
12K	2916	Metal
4.2K	10640	Superconductor

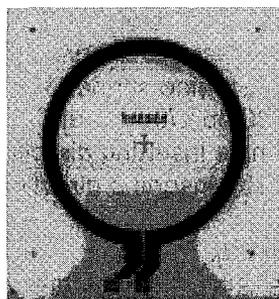


Fig. 4 Shape of Superconducting antenna element.

導体薄膜をリング状に形成したものである。超電導アンテナでは、液体ヘリウム冷却(4.2K)で 10000 を超える Q を得た。

#### iv) 低温受信回路

Fig.5 に低温プローブ用受信回路のブロック図を示す。低温受信回路は、送受信機系統とプローブアンテナとの接続を切り替えるスイッチと低雑音アンプ(LNA)で構成される。プローブ筐体内の LNA で増幅された信号は、室温に置かれたミキサーユニットにより中間周波数に変換され、アナログデジタル変換(ADC)後デジタル検波される。ミキサーユニットはゲイン可変アンプを備えており、ADC への信号入力レベルを調整することができる。

低温切替スイッチは、PIN ダイオードを用いた SPDT(Single Pole Double Throw)スイッチを作成した。低温 LNA は HEMT(High Electron Mobility Transistor)を用いて作成した。低温受信回路は熱輻射シールド上の冷却ステージに設置し、40K まで冷却した。

低温受信回路の雑音指数(Noise Figure, NF)を NF メータにより評価した。室温及び冷却動作時の NF とゲインの測定結果を Fig.6 に示す。低温受信回路の NF は 50K の動作温度で 0.5dB であり、室温の雑音指数 2.1dB から大きく改善しており冷却による熱雑音低減の効果が示された。アンテナの冷却を含めると、室温の動作と比較して雑音強度は 3 分の 1 の低減が期待される。

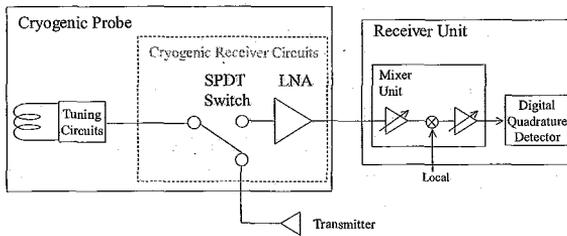


Fig. 5 Block diagrams of receiver circuits.

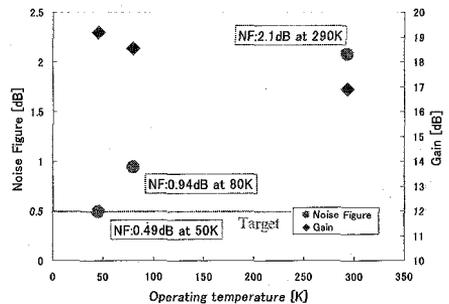


Fig.6 Test results of cryogenic receiver circuits.

### 3. まとめ

本研究では、新方式 NMR 装置 600MHz 機にて SNR>10000 を達する低温プローブについて検討し、その主要コンポーネントを試作評価した。

プローブアンテナを 12K に冷却し、金属材料のアンテナで Q 値 2916 を得た。また、超電導化により目標である 10000 を超える Q 値をアンテナの達成する見通しを得ている。受信機の雑音指数は、50K への冷却で目標の 0.5dB を達成しており、低温受信回路の 40K までの冷却でさらに雑音低減が見込める。

### 参考文献

- [1] D.I.Hoult and R.E.Rechards, J. Magn. Resonance 24, 71(1976)

### 謝辞

本研究の推進に際して、正田英介先生、木村錫一先生、神田大輔先生、森田勇人先生、高妻孝光先生のご指導を戴きました。

本研究の一部は、文部科学省科学技術振興費委託研究、18 文科振 489 号)の一環として行われた。

## 新方式 NMR 用 600 MHz 超電導磁石の 均一磁場特性

(株)日立製作所日立研究所<sup>1</sup>、機械研究所<sup>2</sup>、日立事業所<sup>3</sup>、  
物質・材料研究機構<sup>4</sup>

○ 椎野俊之<sup>1</sup>、和久田毅<sup>3</sup>、土屋貢俊<sup>1</sup>、牧晃司<sup>1</sup>、岡田道哉<sup>1</sup>、田中弘之<sup>2</sup>、  
佐保典英<sup>2</sup>、木戸修一<sup>3</sup>、塚本英雄<sup>3</sup>、竹内一浩<sup>3</sup>、北口仁<sup>4</sup>

### Field uniformity of Superconducting Split Magnet for 600 MHz Advanced NMR Spectrometer

<sup>1</sup>Hitachi Research Laboratory, Hitachi, Ltd.,

<sup>2</sup>Mechanical Engineering Research Laboratory, Hitachi, Ltd.,

<sup>3</sup>Hitachi Works, Hitachi, Ltd.,

<sup>4</sup>National Institute for Materials Science

T. Shiino<sup>1</sup>, T. Wakuda<sup>3</sup>, M. Tsuchiya<sup>1</sup>, K. Maki<sup>1</sup>, M. Okada<sup>1</sup>, H. Tanaka<sup>2</sup>, N. Saho<sup>2</sup>,  
S. Kido<sup>3</sup>, H. Tsukamoto<sup>3</sup>, K. Takeuchi<sup>3</sup>, H. Kitaguchi<sup>4</sup>

We have been developing an advanced NMR spectrometer for improving the sensitivity of NMR measurement. In order to improve the sensitivity, we applied solenoid shaped pick up coil with superconducting split magnet. Developed magnet was ramped to 14.1 T and succeeded in a persistent-mode operation at that field. Subsequent experiment showed that field stability was less than 1 Hz/h and field uniformity was less than 0.1 ppm at 20 mm DSV after correction with superconducting shim coil. In addition, long-term operation over a year showed that developed magnet was stable enough for a high-sensitivity NMR measurement. We present here the summary and performance of developed superconducting split magnet for 600 MHz advanced NMR spectrometer.

#### 1. はじめに

文部科学省リーディングプロジェクトにより、高感度化及び高分解能化を目指した新方式 NMR 装置の開発が進められている<sup>(1)</sup>。この新方式 NMR は、感度向上のためにソレノイド型プローブコイルとスプリット型超電導磁石を用いることが特徴である。新方式 NMR では、超電導磁石がスプリット型であることから十字型の室温ポアとすることができ、これを利用した新規アプリケーションの開発も期待できる。これまでの磁石開発の結果、新方式 NMR 用と

キーワード：スプリット型超電導磁石、磁場安定度、磁場調整、磁場均一度

しいの としゆき

して 300 MHz、600 MHz スプリット型超電導磁石を開発し、NMR 磁石として稼動開始した<sup>(2)-(4)</sup>。今回は、600 MHz スプリット型超電導磁石の開発機の概要と磁石基本性能について報告する。

## 2. 新方式 NMR 用 600 MHz 超電導磁石の概要

開発した新方式 NMR 用 600 MHz スプリット型超電導磁石の構成図を Fig. 1 に示す。超電導磁石は、水平方向に磁場を発生する横置きスプリット型であり、定格発生磁場は 14.1 T である。この磁場強度は水素 NMR 共鳴周波数 600 MHz に対応する。スプリット型磁石はコイル容器に収納され、液体ヘリウムにより浸漬冷却される。コイル容器は荷重支持体を介して断熱真空容器に支持される。コイル容器への輻射熱侵入量を低減するために液体窒素により冷却される 80 K シールドが断熱真空容器とコイル容器との間に設置されている。室温ボアの形状は、従来の NMR 用磁石にはない十字型である。このため、水平方向と垂直方向から磁石中心へのアクセスが可能となる。水平方向の室温ボア内に NMR プローブや磁場調整用の室温シムコイルが設置される。垂直方向の室温ボアには、サンプル温度調整機構や回転機構が設置される。さらに、十字型室温ボアを利用することによりタイトレーションなどの新規アプリケーションが可能となる。

スプリット型磁石の構成図を Fig. 1 の右側に示す。図中では、主磁場が水平方向になるようにコイルが描かれている。スプリット型磁石は、主磁場発生用超電導主コイル、漏洩磁場抑制用シールドコイル及び磁場調整用超電導シムコイルから構成される。経験磁場強度の小さい外シムと主コイルの外側部分の線材は NbTi であり、14 T を発生する主コイルの大部分と 14 T 中にある内シムの線材は Nb<sub>3</sub>Sn である。

高分解能 NMR 計測を可能とするために、磁石中心付近の磁場分布は均一度が高くなっ

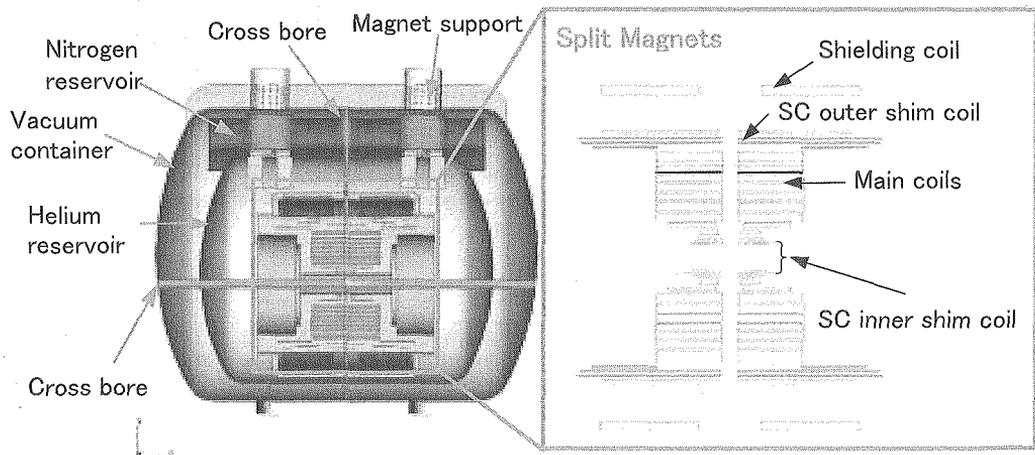


Fig. 1 Schematic cross-sectional view of the split magnets for 600 MHz NMR spectrometer

ていることが必要である。このため、開発したスプリット型磁石や従来のソレノイド型 NMR 用超電導磁石では、不整磁場を補正するために超電導シムコイルを主コイルの外側に設置している(外シム)。従来型超電導磁石では、一次及び二次以上の不整磁場成分を外シムで補正できる。スプリット型磁石では、一次の不整磁場成分を外シムで補正できるが、スプリットギャップ部に磁場発生源がないため、二次以上の不整磁場成分の補正は難しい。さらに、製作誤差に起因する高次の不整磁場成分が大きくなるため、磁場中心付近に磁場調整用コイルが必要となる。このために、外シムに加え主コイルの内側にも超電導シムコイル(内シム)が設置される。

### 3. 超電導磁石の均一磁場特性

600 MHz 用スプリット型超伝導磁石の製作終了後、定格励磁試験を行った。この結果、定格磁場である 14.1 T に到達し、06 年 6 月より永久電流モード運転を開始した。

永久電流モード運転を開始した後に初期磁場減衰が緩和し、磁場安定度が 3 Hz/h 以下となったところで磁場調整を実施した。磁場調整は、磁場分布計測による不整磁場強度測定とその不整磁場を補正するためにシムへ電流を投入することから構成される。磁場分布は、直径 17 mm の円筒上をらせん状に運動する水サンプルの NMR 共鳴周波数を磁場強度に換算することにより測定した。また、外シムを励磁すると磁気結合により内シムに大きな誘導電流が流れてクエンチ発生の可能性があるため、はじめに外シムを用いて磁場調

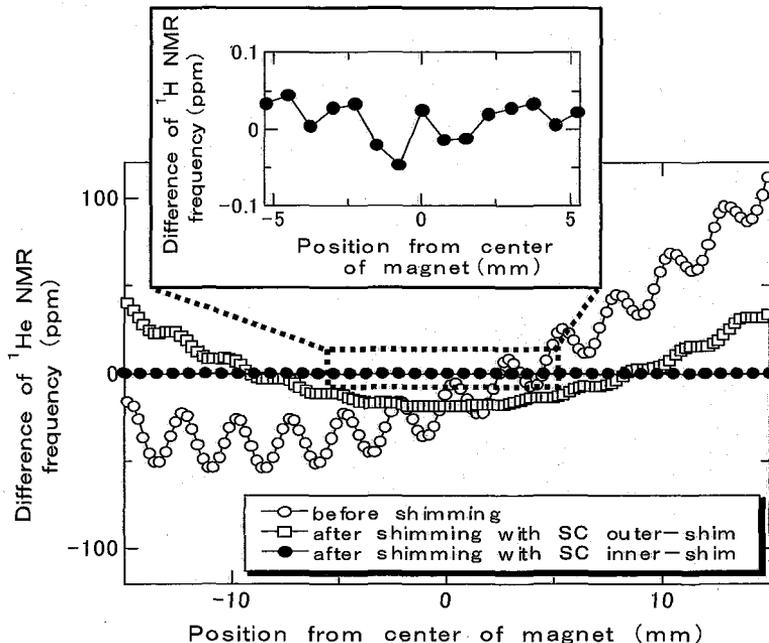


Fig. 2 Field distribution around the center of magnet for 600 MHz NMR spectrometer. Room-temperature shim coils had not been installed.

整し、その後に、内シムによる磁場調整を実施した。

Fig. 2 に内、外シムを用いた磁場調整前後の磁場分布を示す。磁場調整実施前の主コイルが発生する不整磁場は一次や二次の成分が混ざった状態と考えられ、不整磁場振幅は 50 ~ 100 ppm であった。外シムによる磁場調整の結果、一次の不整磁場成分が補正され不整磁場振幅は 50 ppm 以下となったが、二次の成分が大きく残っている。その後の内シムを用いた磁場調整により、二次の不整磁場成分をほぼ完全に補正することができ、不整磁場振幅は、Fig. 2 中の拡大図に示したように磁石中心の直径 20 mm 球(20 mmDSV)内において 0.1 ppm 以下である。ここで、磁場計測はらせん状にデータを取得するために Fig.2 中の磁石中心から $\pm 5.3$  mm の領域が 20 mmDSV 内となる。

定格励磁直後の磁場安定度は 3 Hz/h 程度であったが、定格励磁 6 ヶ月後に 1 Hz/h 以下に到達した。さらに定格励磁後の一年以上にわたリクエンチは発生せずに安定した状態を維持して運転を継続中である。

以上に述べた新方式 NMR 用 600 MHz スプリット型超電導磁石の定格励磁試験、磁場調整により、高感度 NMR 計測に必要と考えられる磁場強度、磁場均一度、磁場安定度を達成し、その後の連続運転により、磁石安定度が NMR 用超電導磁石として十分適用可能であることを確認した。

#### 4. 謝辞

本研究の推進に際して、正田英介先生、木村錫一先生、神田大輔先生、森田勇人先生、高妻孝光先生のご指導を戴きました。なお、本研究の一部は、文部科学省科学技術振興調整費委託研究(18 文科振 489 号)の一環として行われました。

#### 5. 参考文献

- (1) 岡田道哉、塚本英雄、竹内一浩、和久田毅、土屋貢俊、牧 晃司、北口 仁、第 75 回 2006 年度秋季低温工学・超電導学会講演概要集、p.33 (2006)
- (2) 岡田道哉、塚本英雄、木戸修一、竹内一浩、和久田毅、土屋貢俊、椎野俊之、牧 晃司、北口 仁、第 76 回 2007 年度春季低温工学・超電導学会講演概要集、p.15 (2007)
- (3) 椎野俊之、土屋貢俊、和久田毅、牧 晃司、田中弘之、佐保典英、木戸修一、塚本英雄、竹内一浩、岡田道哉、北口 仁、第 76 回 2007 年度春季低温工学・超電導学会講演概要集、p.161 (2007)
- (4) 土屋貢俊、和久田毅、牧 晃司、椎野俊之、田中弘之、佐保典英、塚本英雄、竹内一浩、岡田道哉、北口 仁、第 76 回 2007 年度春季低温工学・超電導学会講演概要集、p.162 (2007)

## 新方式 NMR 用高感度 NMR プローブの開発

(株)日立製作所日立研究所<sup>1</sup>, (株)日立製作所基礎研究所<sup>2</sup>,  
物質・材料研究機構<sup>3</sup>

○川崎 健司<sup>1</sup>, 福田 祐三<sup>1</sup>, 土屋 貢俊<sup>1</sup>, 椎野 俊之<sup>1</sup>, 岡田 道哉<sup>1</sup>,  
山本浩之<sup>2</sup>, 齊藤和夫<sup>2</sup>, 北口 仁<sup>3</sup>

## Development of High Sensitivity NMR Probes for High-Resolution NMR Spectrometers

<sup>1</sup>Hitachi Research Laboratory, Hitachi, Ltd.,

<sup>2</sup>Advanced Research Laboratory, Hitachi, Ltd.,

<sup>3</sup>National Institute for Materials Science

Kenji Kawasaki<sup>1</sup>, Yuzo Fukuda<sup>1</sup>, Mitsuyoshi Tsuchiya<sup>1</sup>, Toshiyuki Shiino<sup>1</sup>,  
Michiya Okada<sup>1</sup>, Hiroyuki Yamamoto<sup>2</sup>, Kazuo Saitoh<sup>2</sup>, Hitoshi Kitaguchi<sup>3</sup>

A key feature of our high-resolution NMR spectrometers is a split-type superconducting magnet, which has a cross bore. This makes it possible to measure solution NMRs with a solenoidal radio frequency (RF) coil, which has high sensitivity. To verify that solenoidal RF coils are, in fact, highly sensitive for solution NMRs, we conducted sensitivity tests with NMR probes utilizing the solenoidal RF coil. These sensitivity tests indicated that signal-to-noise ratios are 416 at 300 MHz and 1487 at 600 MHz.

## 1. 緒言

我々のグループが開発する「新方式 NMR」の特徴は、スプリット型超電導磁石にある。またスプリット型超電導磁石が十字構造のボアを持つことから、高感度化の期待ができるソレノイド型 RF (radio frequency) コイルを使用しての溶液 NMR 計測が可能である<sup>1)</sup>。我々はソレノイド型 RF コイルの使用によって溶液 NMR 計測の感度が向上することを実証するための実験を行った。実験を行うに当たり、まずソレノイド型 RF コイルおよびそれを搭載した高感度 NMR プローブを試作した。次にそれとスプリット型超電導磁石を組合せ、サンプルに 0.1% ethyl benzene (外径 5mm のサンプル管)を用いて SNR (信号雑音比)を計測するという手順で実験を進めた。今回は、ソレノイド型 RF コイル搭載の高感度 NMR プローブを用いて計測した SNR の計測結果について報告する。

## 2. 高感度 NMR プローブの開発

Fig. 1 はソレノイド型 RF コイルとサンプルの配置の概要を示す。スプリット型超電導磁石は十字構造ボアを持ち、サンプルはその鉛直方向のボアの上から磁場中心へ挿入される。磁石の水平方向のボアと主磁場の方向は一致している。よって Fig. 1 の拡大図のようにソレノイド型 RF コイルを設置すれば、溶液のサンプルから NMR 信号を検出することが可能となる。

キーワード：スプリット型超電導マグネット, 溶液 NMR, プローブ,  
ソレノイドアンテナ, 感度

かわさきけんじ

SNR 計測は、それぞれ 7T (300MHz) と 14T (600MHz) を出力する 2 台のスプリット型超電導磁石を用いて実施した。今回試作した高感度 NMR プローブは 1 台である。NMR プローブの回路の共振周波数は、使用する磁石に応じ調整した。300MHz と 600MHz の周波数に調整した RF コイルを含めた回路の Q 値は、0.1% ethyl benzene を入れた状態の計測でそれぞれ  $Q=470$  と  $Q=530$  であった。

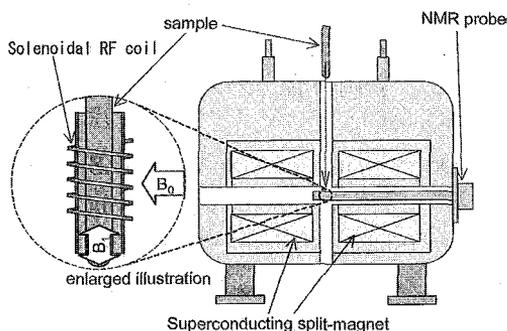


Fig. 1. Setup of sample and solenoidal RF coil

### 3.測定結果

高感度 NMR プローブの測定は、0.1% ethyl benzene を用いた SNR 計測の他に、5%  $\text{CHCl}_3$  を用いたラインシェイプ計測を実施した。サンプルの回転(スピニング)は必要に応じて行った。Table 1 に SNR 計測とラインシェイプ計測の結果を示す。Fig. 2 と Fig. 3 は SNR 計測で得た NMR スペクトルであり、SNR 計測の結果は 300MHz で  $SNR = 416$ 、600MHz で  $SNR = 1487$  であった。これらは従来機の値の概ね 1.5~2 倍であり、ソレノイド型 RF コイルの使用による感度向上の効果が確かめられた。

Table 1 Summary of sensitivity tests and line shape tests

	300 MHz	600 MHz
SNR	416	1487
50% linewidth	0.28 Hz	0.4 Hz
0.55% linewidth	3.4 Hz	7.1 Hz
0.11% linewidth	7.4 Hz	17.3 Hz

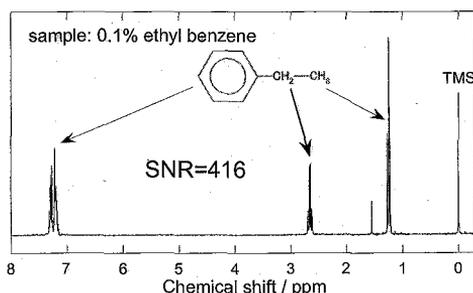


Fig. 2.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 0.1% ethyl benzene at 300 MHz

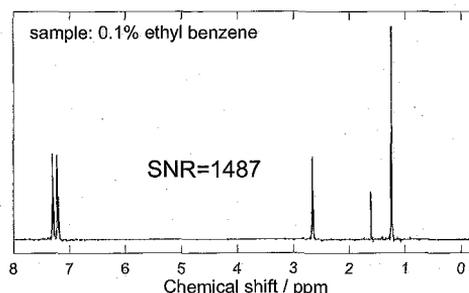


Fig. 3.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 0.1% ethyl benzene at 600 MHz

### 3.謝辞

本研究の推進に際して、正田英介先生、木村錫一先生、神田大輔先生、森田勇人先生、高妻孝光先生のご指導、ご支援を賜りました。また本研究の一部は、文部科学省科学技術振興調整費委託研究(17文科振260号、18文科振489号)の一環として行われました。

### 4.参考文献

- (1) 岡田道哉、塚本英雄、竹内一浩、和久田毅、土屋貢俊、牧晃司、北口仁、第 76 回 2006 年度秋季低温工学・超電導学会講演概要集、p33 (2006)

## Cryo-Coil MAS プローブの開発

○水野 敬、樋岡克哉 (日本電子・CREST/JST)、  
藤岡耕治 (クライオウェア)、竹腰清乃理 (京都大・CREST/JST)

Development of Cryo-Coil MAS NMR probe for high-sensitivity measurement  
at usual sample temperature

Takashi Mizuno,<sup>1,4</sup> Katsuya Hioka,<sup>1,4</sup> Koji Fujioka<sup>2</sup> and K. Takegoshi<sup>3,4</sup>  
(<sup>1</sup>JEOL Ltd., <sup>2</sup>Cryo Ware Inc., <sup>3</sup>Kyoto University, <sup>4</sup>CREST/JST)

Recently, pursuing for the sensitivity enhancement of NMR, various methods, such as DNP and CP, to gain the signal intensity by attenuating spin temperature of the sample itself have been developed. On the other hand, the sensitivity enhancement by thermal insulation of the detection system from sample space is distinguished from the former ones because it intends to attenuate the thermal noise, which had been investigated in detail and in fact such developed for solution-state NMR has been successfully done. Now, we designed and assembled a trial probe for high-resolution solid-state NMR to reduce the thermal noise, which is called as "Cryo-Coil MAS probe". In this work, we discuss the signal-to-noise ratio in NMR. FID signal is detected as the induced electrical force generated between the terminals of the sampling coil. The important development items for sensitivity enhancement are sampling coil temperature, its conductor's arrangement, and assembling spinning system and sampling-coil to be insulated.

Cryo-Coil MAS プローブとは、試料温度を室温から可変な範囲の領域に置き、検出系の温度を極低温とした固体高分解能 NMR プローブである。本プローブは、特に無機材料の開発に資することを念頭に置いた、固体高分解能 NMR 方法論の感度向上を目的としている。応用例として、単核のシングルパルス法・MQMAS 法等による非常に感度の弱い試料 (低磁気回転比, 低天然存在比, 微量含有元素など) への適用が考えられる。

近年、NMR の高感度化に向けた方法論の開発研究が盛んに行われている。それらは、サンプルのスピンの温度を下げてシグナルを増大する方法論 (高磁場 NMR、DNP、光ポンピング、極低温 MAS など) と、検出系の熱雑音を低下させることでノイズを減少する方法論 (溶液クライオプローブ、Cryo-Coil MAS) とに大別される。前者の方法論が特殊な実験環境や試料系を要求するのに対し、後者の方法論は、試料温度が室温 (もしくは可変) 下であるため、汎用性が高い実用材料の測定に向いている。もっとも、これらの方法論は互いに相補的な関係にあり、技術を組み合わせることで、感度をより上げることができる。

開発内容は、低温設計・機械設計・電気設計に分けられ、それぞれについて、以下で説明するように、開発課題を検討した。初年度から第2年度前半にかけて、構想設計と各分

1

Key Words: MAS, probe, cryo, solid-state NMR

○みずの たかし、ひおか かつや、ふじおか こうじ、たけごし きよのり



3) 電気設計… サンプルコイルの設計 NMRのS/Nは、サンプルコイル中の試料空間に発生されるRF磁場強度の強さと共鳴核磁化の誘導起電力の大きさ、そして導体の熱雑音によって決定され、たとえば導体線が円形断面のソレノイドのサンプルコイルに対して、以下のように書き下すことができる。[1, 2, 3]

$$\begin{aligned} \frac{V_s^2}{V_n^2} &= \frac{\mu^2 \mu_0^2 Q_s^2 N_s^2 \omega_s^2 M_0^2 v_s^2 \sin^2 \theta_m}{16g^2 \{1 + 4(a/g)^2\} k_B Q_s^2 r_s (T_s + T_N) \Delta f} \\ &= \frac{\mu^2 \mu_0^2 N_s^2 \omega_s^2 M_0^2 v_s^2 \sin^2 \theta_m}{16g^2 \{1 + 4(a/g)^2\} k_B r_s (T_s + T_N) \Delta f} \end{aligned} \quad (1)$$

ただし、

$$Q_s = \frac{\omega_s L_s}{r_s} \quad (2)$$

で、 $\mu$  比透磁率、 $\mu_0$  真空の透磁率、 $Q_s$  サンプルコイルQ、 $N_s$  サンプルコイルターン数、 $r_s$  サンプルコイル損失、 $M_0$  体積磁化率、 $v_s$  サンプル体積、 $T_s$  サンプルコイル温度、 $T_N$  プリアンプ雑音温度、 $\theta_m$  コイル軸角(マジック角)、 $k_B$  ボルツマン定数、 $\Delta f$  観測帯域、 $\omega_s$  共鳴周波数、 $a$  コイル内径、 $g$  コイル長である。これらのうち、 $\omega_s$  (=300 MHz)、 $a$  (=6.5 mm)、 $g$  (=13 mm) は、機械設計段階で与えられる。よって、電気設計の段階では、 $Q_s$ 、 $N_s$ 、 $r_s$ 、 $T_s$ 、および $T_N$ を最適化することで、S/Nを上げる。

試作1号機においては、 $a$  は対照機のおよそ2倍であるから、S/N(電圧比)は、 $\sqrt{0.25}$ にスケールされるため、この分を克服しなければならない。もし、 $T_N$ が無視できるほど小さければ、 $T_s$ が300Kから30Kに低下したとき、S/Nは3倍となる。4Kまで下げることができれば、S/Nは約8倍に相当するため、30K以下まで温度を低下させることで、より感度を稼ぐことができる。また、温度を下げることにより、導体の電気伝導度が上がるため、コイル損失 $r_s$ も低下する。したがって、到達コイル温度をどこまで最小化できるかが、最も重要な開発項目となる。

我々は、サンプルコイルを作るに当たり、熱伝導的利点(被冷却体(導体)と導熱体(ボビン)との接合、広い接触表面積)と電氣的利点(製膜による高純度・低抵抗導体、コイル形状のCAD/CAMによる最適化、接着剤フリーでバックグランド信号をなくす)の双方から検討し、コイルの固定と導熱体を兼ねたセラミック製ボビンの外周面に、薄膜を導体としたリボン状のソレノイドコイルを形成する案を採用した。

$Q_s$ は、サンプルコイルにおいて蓄積されるエネルギーと、消費されるエネルギーとの比であり、インダクタンス $L_s$ と導体損失 $r_s$ を、コイルのディメンジョンから、それぞれ独立に計算することで与えられる。

導体の断面形状が長方形のリボン状ソレノイドのインダクタンス $L_s^D$ は、以下の式で与えられる。[4]

$$L_s^D = \frac{4\mu\mu_0 N_s^2 a^2 (1 - 0.2/N_s)}{g + 1.2a^{0.9}} \quad (3)$$

高周波導体損失としてのサンプル抵抗成分 $r_s$ は、導体表面への電流の集中による表皮効果に、隣接導体からの磁束の影響による近接効果を入れて、以下の式によって表される。

$$r_s = \xi \left( \frac{l}{p} \right) \sqrt{\frac{\mu\mu_0 \omega_s \rho}{2}} \quad (4)$$

ただし、 $\xi$ は近接効果因子で3を与え、 $l$ は導体線路長、 $p$ は導体の断面周、 $\rho$ は導体の比抵抗(体積抵抗率)で直流抵抗の測定値より得られる。 $Q_s$ は、搬送波300MHzにおいて、ターン数4-5付近で極大値( $Q_s \sim 300$ )を持つことが示される。予備試作・本試作では、ターン数3.4を採用した。

薄膜ソレノイドコイルの実用性を検討するために、複数の製膜法で異なる厚さの数種類の予備試作品を作った。それぞれについて、室温から4Kまで数回のサイクルを適用し、温度サイクルに対する耐久性を確認した。また、直流抵抗を測定することで、導体薄膜の比抵抗の温度依存性を調べ、製膜法の違いにより、比抵抗の低温における振る舞いに変化すること、残留抵抗比が500以上の無酸素銅と同様の比抵抗を示すサンプルを確認し、薄膜ソレノイドコイルの基本的な有用性を示すことができた。

導体損失のモデル式(4)によれば、 $Q_s$ は比抵抗の1/2乗に依存するから、たとえば比抵抗が極低温下で室温時の0.01倍になれば、 $Q_s$ は10倍の増加をすると予想される。しかし、実験的にはコイル温度の低下に伴う回路 $Q$ の増加は約2倍に留まった。この実験結果を説明するべく、導体損失モデルの補正を検討している。

今後は、能動素子(ダイオード、プリアンプ)も含めたプローブ電気回路の製作とNMR実験を行い、Cryo-Coil MASの性能を評価すると共に、さらに性能を上げるための開発項目について検討を行う。

**Acknowledgement:** 本研究は、(独)科学技術振興機構(JST)/戦略的創造研究推進事業(CREST; H17年度採択)の研究領域:「物質現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」における、研究課題:「材料開発に資する高感度多核固体NMR法の開発」として行われている。

## References

- [1] D. I. Hoult and R. E. Richards, *J. Magn. Reson.* 24, 71-85 (1976)
- [2] J. Lepaisant, D. Bloyet and E. Varoquaux, *Rev. Sci. Instrum.* 55, 521-526 (1984)
- [3] M. G. Richards, A. R. Andrews, C. P. Lusher and J. Schratte, *Rev. Sci. Instrum.* 57, 404-409 (1986)
- [4] F. D. Doty, *Encyclopedia of NMR "Probe design & construction"*, 3753-3762 (1999)

## 超電導スプリット型マグネットNMRシステム向けの循環型滴定 計測システム

(株)日立製作所 基礎研究所 北川 功○

(株)日立製作所 日立研究所 田中 秀樹

(株)日立製作所 日立研究所 岡田 道哉

茨城大学大学院 理工学研究科 応用粒子線科学専攻 高妻 孝光  
物質・材料研究機構 北口 仁

A new titration system of high-resolution NMR spectrometer with split-magnet and cross-bore

Advanced Research Laboratory, Hitachi Ltd., Japan; Isao Kitagawa

Hitachi Research Laboratory, Hitachi Ltd., Japan; Hideki Tanaka

Hitachi Research Laboratory, Hitachi Ltd., Japan; Michiya Okada

Institute of Applied Beam Science, Ibaraki University, Mito, Japan; Takamitsu Kohzuma

National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan; Hitoshi Kitaguchi

We have developed a titration system for NMR spectrometer having superconducting split-magnet with a cross-shaped bore. The titration system has a sample tube and a sample control unit; the sample reservoir is set at the center of the cross-bore and the control unit is placed at the outside of the split-magnet. While keeping the protein concentration constant, the titration system controls the ligand concentration in the sample solution by the sample control unit. By injecting ligand solution, the concentration of the sample can be controlled up to 2.0mM. Using titration system, one can perform repeatable titration measurement in NMR measurement. In this measurement, the concentration of protein can be kept to be constant.

十字型ボアを持つ超電導スプリット型マグネットを用いたNMR計測向けの試料溶液循環型滴定計測システムを開発した。この滴定計測システムはマグネット内に設置した計測サンプル管と溶液濃度制御ユニットを循環路で接続し、タンパク質濃度を一定に保ったまま、リガンドなどの低分子化合物の濃度を制御する特徴を持つ。試料溶液循環下での低分子化合物注入により、2.0mM以下の範囲で濃度制御を実現し、NMR滴定計測に適した溶液制御が可能であることを確認した。本システムを用いて一定量のタンパク質試料で任意回の滴定計測が可能となる。

titration 計測、タンパク質—低分子化合物、サンプル循環型

きたがわ いさお

十字型ボアを持つ超電導スプリット型マグネットを用いたNMR計測向けの試料溶液循環型滴定計測システムを開発した。図1にスプリットマグネット、サンプル管、試料制御ユニットの配置を示す。サンプル管は十字ボアの中心に位置する。サンプル管および循環路設置に十字ボアの垂直方向を用いた。循環ポンプと試料制御ユニットはスプリットマグネットの外部に位置する。サンプル管と試料制御ユニットは PEEK 製のチューブにより循環的に接続した。試料制御ユニットは、フィルタ、シリンジポンプ、切り替えバルブ、廃液およびバッファ液瓶からなる。循環路内部の溶液の流れは、バルブ切替えによる循環モード、排出モードの選択と、循環ポンプにより制御される。タンパク質とリガンドはシリンジポンプから注入する。循環モード下でタンパク質溶液を注入すると、循環路から外へのタンパク質の排出をフィルタが抑制するので、循環路内部のタンパク質濃度は一定になる。一方、リガンドは低分子のためフィルタを通過するので、リガンド溶液注入において、一定体積を保ちながらリガンド濃度を変えることが可能である。

注入条件の最適化を行うことで、リガンド濃度を均一化するまでの経過時間は6.2分まで短縮した。図2に注入回数に対するリガンド濃度の変化を示す。リガンドとしてL-tryptophanを用いた。測定した循環路内部のリガンド濃度を三角および丸のプロットで示す。三角、丸のプロットはそれぞれ、注入濃度が10mMおよび3mMでの結果を示す。循環路内部のリガンド濃度は2.0mMまで増加した。実線および破線で示した各注入濃度に対する曲線は、測定値と良く一致している。この結果は注入回数によってサンプル管内部の濃度を制御できることを示している。

本プロジェクトを推進するにあたり、正田英介先生、木村錫一先生、神田大輔先生、森田勇人先生のご指導、ご支援を賜りました。また、本研究の一部は、文部科学省科学技術振興調整費委託研究(17文科振260号、18文科振489号)の一環として行われました。

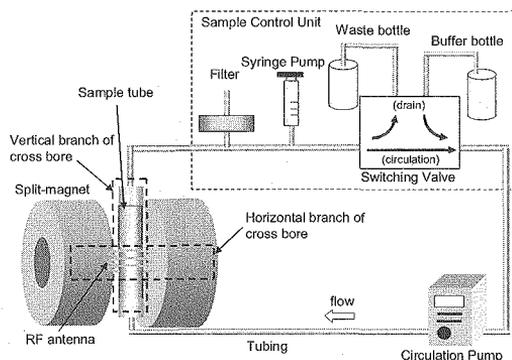


Fig.1 Schematic drawing of the spatial relation between titration system and split-magnet.

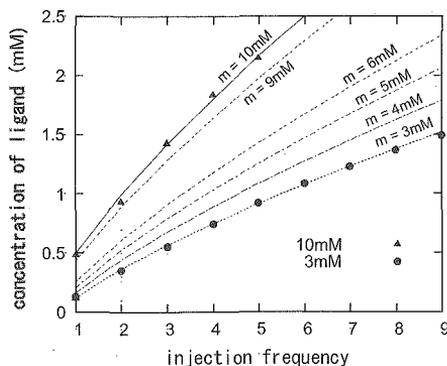


Fig.2 The concentration of ligand as a function of injection frequency.

## 極めて高精度な NMR 試料回転制御とその応用

(日本電子㈱) ○山崎 千春、朝倉 克夫、田中 良二、岡地 淑夫、  
山腰 良晃、穴井 孝弘

A precise spinner control for a rotating NMR sample and its application  
(JEOL Ltd.) Chiharu Yamasaki, Katsuo Asakura, Ryoji Tanaka, Toshio Okachi,  
Yoshiaki Yamakoshi, Takahiro Anai

In order to suppress spinning sideband(SSB) in liquid state NMR, precise spinner control system is required. We developed new spinner control system with a PID control by a microprocessor, and confirmed that the r.m.s. rotation error was less than 2mHz at a usual spinning speed(15Hz). SSB free signals are deconvolved with the frequency-modulated signals in the magnetic field gradient by a kernel originated in the modulation.

はじめに

溶液 NMR 用でスピニングサイドバンド(SSB)を消去するためには、極めて高い精度の回転制御系が必要である。我々はマイクロプロセッサを用いた PID 制御による新たな試料回転制御系を開発し、その結果、rms 回転変動が 2mHz を下回ることを確認した。SSB フリーの信号は、磁場勾配により FM 変調された信号と、この変調由来のカーネルでデコンボリューションすることにより得られる。

### 実験 1

本スピニングシステムは、電磁比例弁によるエア流量をマイクロプロセッサにより Robust な PID(A proportional-integral-derivative)制御で行っていることが特徴である。4000 秒間、制御を続けたときの回転安定度を Fig. 1 に示す。回転変動の rms は 1.76mHz であった。

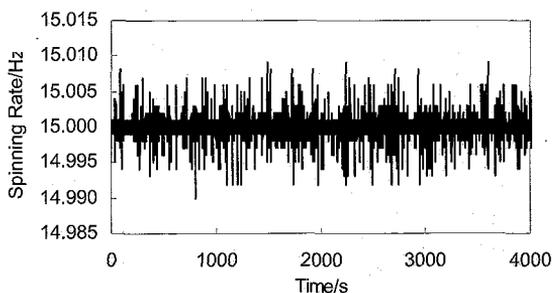


Fig. 1 Long-term stability of the sample spinning system

キーワード： スピニングサイドバンド、SSB、試料回転、消去

著者： やまざきはる、あさくらかつお、たなかりょうじ、おかちとしお、  
やまこしよしあき、あないたかひろ

## SSB 消去

NMR のマグネット中の静磁場はその勾配が極めて小さいため、1 次の SSB が支配的である。位相補正済みのスペクトル  $S(\omega)$  に対し、もし試料回転数の精度が極めて高ければ、次のデコンボリューション演算により 1 次の SSB を完全に消去できる。ここで  $m$  は磁場勾配と 1 次のベッセル関数に関係する定数である。

$$S'(\omega) = FT[IFT[S(\omega)](1 - m \cos(\omega_s t))] \quad (1)$$

## 実験 2

acetone d6 中の 3% chloroform の  $^1\text{H-NMR}$  を室温で測定した (Fig. 2(下))。X 軸の磁場勾配は意図的に大きくしている。回転速度は 15.000 Hz である。

変調指数  $m$  を適当に選び、式(1)を使って得られた SSB 消去スペクトルを Fig. 2(上) に示す。

## 結果と考察

SSB 消去の効果は信号の線幅と試料回転数の変動の比で決まる。回転変動が大きい場合、SSB の線幅が広がるため、消去効率が悪化する。ローレンツ型ピークを仮定した理論的な消去効率は、回転変動が線幅の 1/10 の場合 35%、1/100 の場合 99.4% である。

本回転制御系は、極めて高い安定性を持つため、chloroform のような線幅の狭い信号に対しても良好な消去が可能であることが分かった。

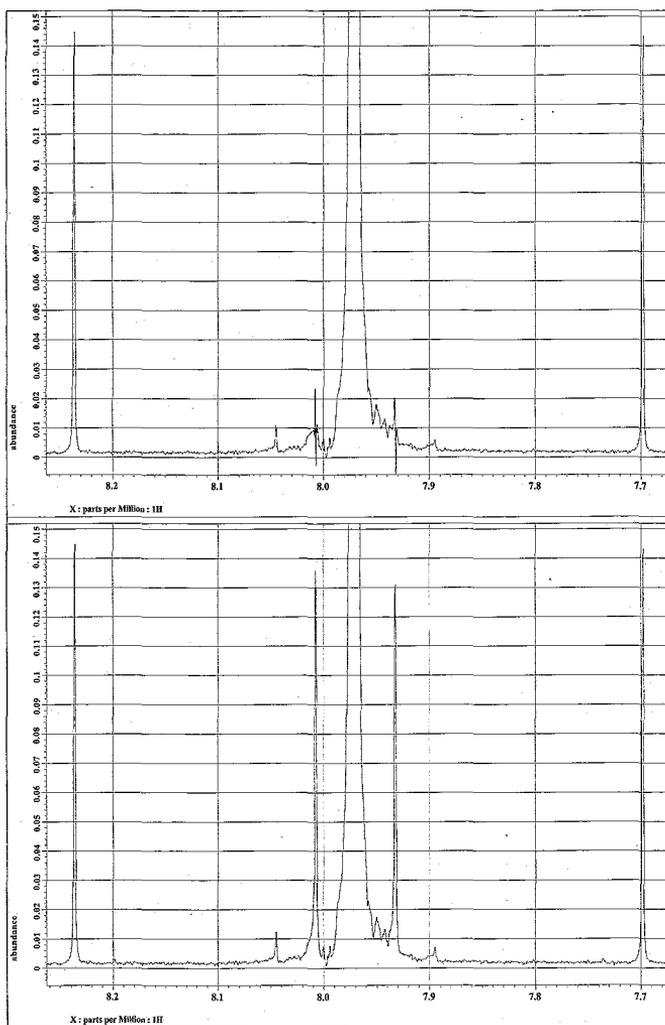


Fig. 2 Proton Spectra of 3% chloroform in acetone d-6; lower: in linear field gradient along X axis at a rotation speed of 15Hz; upper: sideband suppressed spectrum using a modulation index ( $m=0.033$ ).

## 新方式 NMR 用 300MHz 超電導磁石の開発

(株)日立製作所日立研究所<sup>1</sup>、(株)日立製作所日立事業所<sup>2</sup>、  
(株)日立製作所機械研究所<sup>3</sup>、物質・材料研究機構<sup>4</sup>

○土屋 貢俊<sup>1</sup>、和久田 毅<sup>2</sup>、牧 晃司<sup>1</sup>、椎野 俊之<sup>1</sup>、田中 弘之<sup>3</sup>、佐保 典英<sup>3</sup>、  
塚本 英雄<sup>2</sup>、竹内 一浩<sup>2</sup>、岡田 道哉<sup>1</sup>、北口 仁<sup>4</sup>

### Development of 300MHz Superconducting Magnet for advanced NMR Spectrometer

<sup>1</sup>Hitachi Research Laboratory, Hitachi, Ltd., <sup>2</sup>Hitachi Works, Hitachi, Ltd.,

<sup>3</sup>Mechanical Engineering Research Laboratory, Hitachi, Ltd.,

<sup>4</sup>National Institute for Materials Science

Mitsuyoshi Tsuchiya<sup>1</sup>, Tsuyoshi Wakuda<sup>2</sup>, Koji Maki<sup>1</sup>, Toshiyuki Shiino<sup>1</sup>,  
Hiroyuki Tanaka<sup>3</sup>, Norihide Saho<sup>3</sup>, Hideo Tsukamoto<sup>2</sup>, Kazuhiro Takeuchi<sup>2</sup>,  
Michiya Okada<sup>1</sup>, Hitoshi Kitaguchi<sup>4</sup>

We have developed a high-resolution NMR spectrometer with a superconducting split magnet and a cross-shaped bore. Because of the spatial limitations of the magnet structure design, the split magnet requires many pairs of coils to generate a homogeneous magnetic field. For this reason, it is difficult to achieve high stability and homogeneity of the magnetic field, compared with conventional NMR magnets. Therefore, we have adopted novel ideas to design the split-magnet coils and a superconducting shimming system. Furthermore, we successfully fabricated a 7T (300MHz) split-magnet system, which consists of 12 NbTi coils with 15 joints and a stored energy of 0.7MJ. Its field drift was smaller than 1Hz/h in persistent current mode operation.

#### 1. はじめに

現在、我々はスプリット型超電導磁石とソレノイド型検出コイルを用いた新方式 NMR 装置の開発を進めている<sup>(1)(2)</sup>。新方式 NMR 装置では、ソレノイド型検出コイルによる NMR 感度の大幅向上や、従来の NMR システムでは実現できなかった十字ボア構造を活かした新アプリケーションへの適用が期待されている<sup>(1)</sup>。しかし、スプリット型磁石は、中心磁場強度を確保するために多数の主磁場発生用コイル（メインコイル）が必要であり、これらのコイル端部は磁場中心付近に設置される。

---

スプリット型超電導磁石、超電導シムコイル、磁場均一度、磁場減衰

つちやみつよし

そのため、メインコイルの寸法誤差や製作公差によって非常に大きな不整磁場が発生することになり、磁場補正能力の向上が新方式 NMR 装置開発における課題である。

そこで、本報告では、新方式 NMR の中でも特に 300MHz システムの超電導磁石に関して、メインコイル構成および磁場補正能力向上を図った超電導シムコイル構成について述べる。また、本構成を基に試作されたスプリット型超電導磁石の仕様および性能について述べる。

## 2. 新方式 NMR 用超電導磁石の構成

Fig.1 に 300MHz システムの超電導磁石におけるメインコイルおよび超電導シムコイルの配置を示す。メインコイル配置の大きな特徴は 2 点あり、蓄積エネルギーを小さくするために外側のコイルほどコイル高さが小さくなっている点と、コンパクト化を図るために逆方向励磁のコイルが別に磁場調整用に配置されている点である。これらは、スプリット型超電導磁石の本質的な課題である蓄積エネルギーの増大とメインコイル大型化を改善するために適用した構造である。

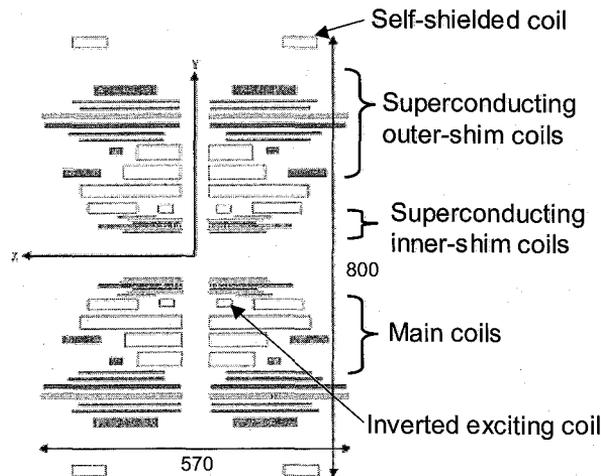


Fig.1 Schematic coil configuration of 300MHz superconducting split-magnet system.

超電導シムコイル配置にも特徴が 2 つある。1 つは、メインコイルの外側だけでなく内側にも設置したことであり、同じコイル断面積かつ電流密度であっても磁場補正能力の増大が見込まれる。計測空間に近い位置に設置することになるため、特に高次の磁場成分に対して大きな効果が期待できる。もう 1 つは、非軸対称成分の磁場補正コイルとして、Fig.2 に示すような楕円型コイルと波打型コイルを適用したことである。これらのコイルは円筒面上を一周回る間に 1 回あるいは 2 回波打つように巻線したコイルであり、巻数を増やしても安定して支持できるコイル形状であるため、従来の鞍型コイルよりも大きい磁場補正能力を有することが可能になる。なお、楕円型コイルや波打型コイルは、このままでは軸対称成分も同時に発生してしまうため、ほぼ同半径で楕円型コイルでは  $180^\circ$ 、波打型コイルでは  $90^\circ$  位相が異なるコイルを組み合わせている。

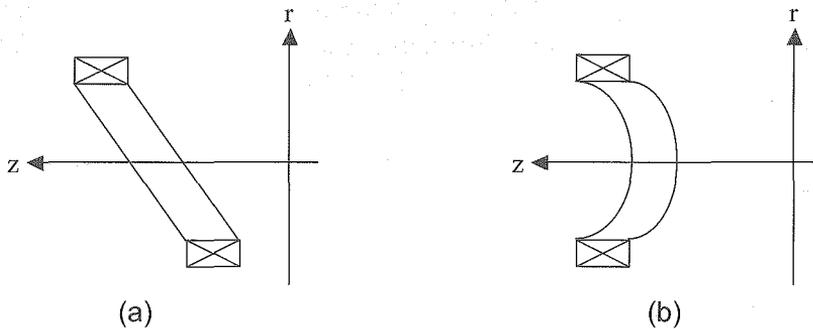


Fig.2 Superconducting shim coil shapes to correct non-axial inhomogeneous magnetic field.

((a): elliptic type, (b): wavy type)

### 3. 新方式 NMR 用超電導磁石の仕様および性能試験結果

前章で述べたメインコイルおよび超電導シムコイルの構成を基にして、実際に 300MHz システムのスプリット型超電導磁石を 2 台製作した。1 台は新方式 NMR の原理実証用として世界で初めて試作したものであり、もう 1 台はアプリケーション開発機としてクライオスタットの小型化とワイドボア化を図ったものである。これらを Fig.3 に示す。また、これらの超電導磁石の仕様を Table1 に示す。いずれの超電導磁石も主磁場発生用コイル（メインコイル）構成は同じであるが、アプリケーション開発機用超電導磁石では、水平方向のワイドボア化のために、原理実証機ではメインコイル内側に 28 個設置していた超電導シムコイルを 14 個に減少させた。その結果、水平ボア径は 54.5mm から 77.2mm まで拡げることができた。さらに、アプリケーション開発機では、クライオスタットの大型化抑制のため液体ヘリウムの液溜空間を非円筒形状に変更し、外形寸法は縦方向と高さ方向を約 3 分の 2、横方向を約半分にするまで小型化することができた。

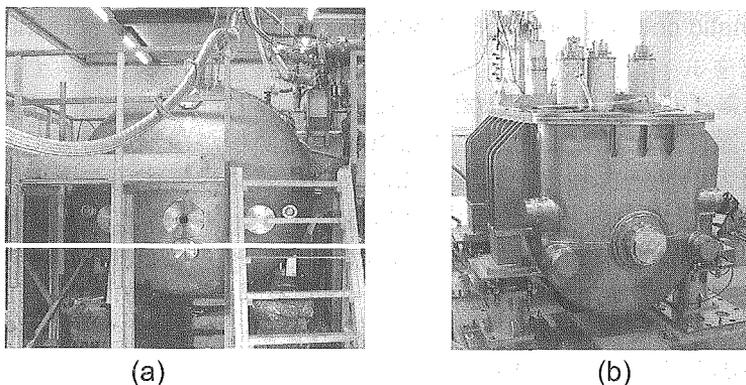


Fig.3 Facility for 300MHz superconducting split magnet.

((a): Prototype(300MHz #1), (b): 300MHz #2)

Table1 Structures of superconducting split magnets.

	Prototype (300MHz #1)	300MHz #2
Number of SC main coils	10	10
Number of SC shield coils	2	2
Number of SC shim coils	28 (inner) 18 (outer)	14 (inner) 20 (outer)
Stored energy	0.7MJ	0.7MJ
Cryostat size	2.5m x 2.2m x 2.0m	1.7m x 1.1m x 1.3m
Horizontal bore diameter	54.5mm	77.2 mm
Weight	8 ton	4.3 ton

Fig.3 で示した超電導磁石の性能試験結果を Table2 に示す。Table2 に示すように、いずれの超電導磁石でも半値幅で 0.3Hz 以下を満たす磁場均一度と 1Hz/h 以下の磁場安定度を十分に満たす結果が得られた。これにより、原理実証機では、スプリット型超電導磁石においてたんぱく質の NMR 信号測定に必要な超電導磁石性能が得られること、アプリケーション開発機では、超電導磁石性能を維持したまま原理実証機からの小型化とワイドボア化を達成したことを示すことができた。

Table2 Characteristics of superconducting split magnets.

	Prototype (300MHz #1)	300MHz #2
Variation of magnetic field	< 0.1 Hz/h	< 0.1 Hz/h
Magnetic homogeneity without shimming	<< 100ppm	<< 50ppm
Half-width	< 0.3Hz	< 0.3Hz

なお、本研究の推進にあたり、正田英介先生、木村錫一先生、神田大輔先生、高妻孝光先生、森田勇人先生に御指導戴きました。また、本研究の一部は、文部科学省科学技術振興費委託研究(18文科振489号)の一環として行われました。

#### 参考文献

- (1) 岡田ほか：「新方式 NMR 用スプリット型超電導磁石の開発(I)」，2006 年度秋季低温工学・超電導学会講演概要集、p.33(2006)
- (2) 岡田ほか：「新方式 NMR 用スプリット型超電導磁石の開発(II)」，2007 年度春季低温工学・超電導学会講演概要集、p.15(2007)

# P116 生体高分子の NMR データベース : BMRB の新登録ウェブ

## インターフェイス (ADIT-NMR) の日本サイト公開

<sup>1</sup>大阪大学蛋白質研究所、<sup>2</sup>科学技術振興機構-BIRD

○中谷 英一<sup>1,2</sup>、原野 陽子<sup>1</sup>、阿久津 秀雄<sup>1</sup>、中村 春木<sup>1</sup>、藤原 敏道<sup>1</sup>

### Release of New BMRB deposition website "ADIT-NMR" at Japan

<sup>1</sup>Institute for Protein Research, Osaka University,

<sup>2</sup>Japan Science and Technology Agency-BMRB

New version of ADIT-NMR, data deposition website of BMRB (BioMagResBank, University of Wisconsin-Madison, PI John L. Markley Ph. D.), has been released at BioMagResBank in September, 2006 and at PDBj in May, 2007. Previously, researchers had to input same data and upload files of assigned NMR data to BMRB deposition website and atomic coordinates to PDB website, respectively. However now, these deposition websites are integrated into single website. In new ADIT-NMR, some input items in data category such as citation and general entry information, description for molecule and source are input only once into blanks for inputting items. Such data can be shared with BMRB and PDB depositions. Many default values are also indicated. Researcher can select a value from a pulldown. These improvements are summarized in figure 1. These results would contribute to reducing the deposition workload of researchers. In this system, PDBj-BMRB and -PDB groups process BMRB and PDB entries when entries are deposited via new ADIT-NMR at PDBj.

#### 【登録ウェブサイト】

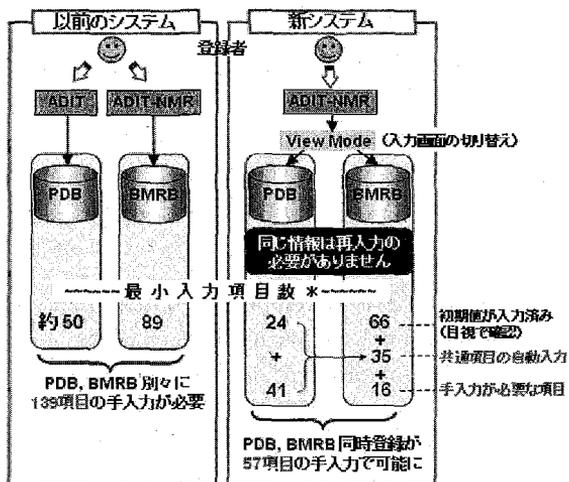
生体高分子の NMR データベースである BMRB の新しいデータ登録ウェブインターフェイス (ADIT-NMR) の日本ウェブサイト (<http://nmradit.protein.osaka-u.ac.jp/bmr-badit>) が 2007 年 5 月 18 日に大阪大学蛋白質研究所の PDBj (Protein Data Bank Japan) で公開した。

新 ADIT-NMR では、帰属された化学シフトのような NMR 実験データの登録だけではなく、生体高分子の原子座標データの PDB (Protein Data Bank) 登録も一つのウェブサイトのできるようにした。両データベース登録に必要な共通データは一度の入力で済み、プルダウンリストからの入力データの選択や、既定表示される標準的データの目視確認 (必要に応じて修正) を行なう項目を増加させるなど、研究者に対する登録作業の手数を減少させた。例えば、新 ADIT-NMR におけるリガンドや金属を含まない単量体タンパク質の化学シフトと原子座標データの BMRB と PDB 登録では、最小入力項目数が従来のそれに対して約 41%に減少した。(Figure 1)

データ入力の画面や方法は従来の ADIT-NMR および PDB のデータ登録ウェブインターフェイス (ADIT) を踏襲した。ウェブページの入力項目は登録者や引用、分子記述や NMR 実験といったようにそれぞれ範疇化された入力項目の空欄にデータの入力あるいは選択を行う。幾度か登録を行ったことのある研究者は躊躇なく利用でしょう。(Figure 2)

キーワード : NMR データベース、BMRB、新 ADIT-NMR、データ登録、PDB

なかたにえいいち、はらのようこ、あくつひでお、なかむらはるき、ふじわらとしみち



- (注1) 金属やリガンドを含まない単量体タンパク質の登録の場合の最小入力項目数  
 (注2) データ入力に加え、化学シフトと原子座標ファイルの提供が必要です。

Figure 1 The difference of new and previous system of BMRB and PDB data depositions

【データディクショナリとフォーマットの改新】

BMRB では PDB とデータの記述形式を統一するために、データディクショナリとフォーマット (NMR-STAR) が改新された。これらのデータ定義と記述形式を PDB の mmCIF 形式 (Macromolecular Crystallographic Information Format ; フラット形式と比べよりデータ間のひも付け情報を付加させたもの) により近づけることで、両者におけるデータ記述形式の一貫性が高められた。その結果、利用者にとって記述形式の理解が容易となり、また、データの欠損がなく NMR-STAR と mmCIF との間でデータ転換が可能となった。

【登録番号の発行】

従来の BMRB 登録では、登録番号の発行は BMRB の登録処理担当者が研究者からの登録データを確認した上で BMRB の登録番号を発行していたが、新システムでは PDB と同様、研究者が ADIT-NMR でのデータ入力が完了した時点で発行される。

【登録処理の担当】

新 ADIT-NMR は、アメリカ・ウィスコンシン大学マディソンの BioMagResBank と PDBj に設置された。両者に登録された NMR 実験データの登録処理は、それぞれ BioMagResBank と PDBj が担当し、BioMagResBank に集めた上で最終処理が行なわれ、公開される。原子座標データの登録に関して、BioMagResBank の ADIT-NMR に登録されたものは RSCB (Rutgers, the State University of New Jersey, Department of Chemistry and Chemical Biology) の PDB に送られ、PDBj に登録されたものは、PDBj の PDB 登録処理グループに転送される。

本発表では新 ADIT-NMR の概要や利用について、さらに PDBj 日本登録サイトにおける BMRB と PDB データの登録処理、および BMRB データベースの最新の利用統計について説明したい。

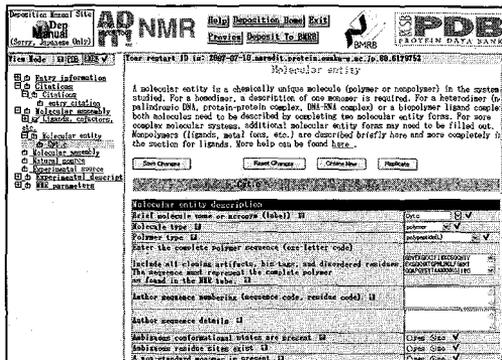


Figure 2 The session screen on new ADIT-NMR  
<http://nmradit.protein.osaka-u.ac.jp/bmrB-adit>

## High-resolution NMR under an unstable magnetic field II

T. Iijima<sup>1</sup>, K. Takegoshi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Molecular Science, <sup>2</sup>Department of Chemistry, Kyoto University*

A method for compensating effect of field fluctuation is developed to obtain high-resolution NMR spectra under an unstable magnetic field. This method employs simultaneous measurement of two NMR signals, one is for observation and the other is as a reference. A significant difference between the present NMR-NMR deconvolution method and the other reference-deconvolution methods is that the former includes reconstruction of the NMR phase-angle data of the reference signal. We show that without this reconstruction the deconvolution cannot compensate fast and large field fluctuation taking place in resistive and hybrid magnets. We demonstrate the method using a probe with a coil that can generate a fluctuation field artificially. A high-resolution <sup>1</sup>H NMR spectrum of ethylbenzene was obtained under the unstable field after compensation with this method.

NMR スペクトルの感度や分解能の向上のため、強磁場磁石を測定に用いることは有効な手段であり、我が国においても世界最高クラスの超電導磁石 (21.9 T) 等を用いた NMR 研究が近年活発に行われている。NMR 用の強磁場磁石としては超電導磁石が一般的であるが、ハイブリッド磁石を用いれば磁場強度を大幅に高くすることができる (30 T 超)。しかし、通常はハイブリッド磁石の磁場の安定度は極めて悪いため、普通の NMR 測定では高分解能スペクトルを得ることは困難である。我々は最近、揺動磁場下で高分解能スペクトルを測定する手法を開発し [1]、昨年度の本討論会で発表した。その方法は、NMR 測定は通常通り行い、これとの同期測定によって得られる磁場揺動データを用いて NMR 信号中の磁場揺動成分を補正する、というものであり、主としてある程度線幅のある固体用の方法であった。本研究では、より高分解能な溶液 NMR に適用できる方法として、NMR-NMR の同期測定を用いる磁場揺動補正方法を開発したので、発表したい。

NMR 信号の磁場揺動成分を補正するためには、磁場揺動に伴って生じる NMR 位相角を求めることが必要である。本法では、この位相を参照 NMR 信号から見積もる。つまり、観測用 *I* スピンの FID 信号と同期して、スペクトルが 1 本のピークから成る参照用 *S* スピンの FID 信号  $g_S(t)$  を測定する。磁場揺動による位相を求めるために、以下の 4 つの処理を行う。(I) 始めに  $g_S(t)$  から緩和の部分を取り除き、位相部分だけにする。(II) 位相角を得るため、位相部分の実部と虚部の逆正接を計算する。(III) この処理で求めた位相角の範囲は  $-90^\circ-90^\circ$  であるため、位相の再構成を行い正しい角度  $\xi(t)$  を求める。(IV)  $\xi(t)$  は参照核の位相であるため、観測核の磁場揺動による位相を  $\psi(t) = (\gamma_I/\gamma_S)\xi(t)$  により得

---

強磁場 NMR, 磁場揺動, deconvolution, 位相再構成, ハイブリッド磁石

いじまたかひろ、たけごしきよのり

る。4つのプロセスのうちでも特に重要なものが (III) であり、ハイブリッド磁石など大きな磁場の揺らぎが存在する場合には、この処理なしでは正しい補正はできない。以上のようにして得た  $\psi(t)$  を用いて観測核の FID 信号を deconvolution し、磁場揺動補正を行う。

本法の実証実験を、14.1 T の超電導磁石と、人工的に揺動磁場を発生させるためのコイルを装着させた溶液用二核プローブを用いて

行った。分光器は JEOL ECA をベースとした二核同時測定を可能とするデュアル分光器を組み立てて用いた。試料はベンゼン  $d_6$  に少量のエチルベンゼンを混ぜたものであり、共鳴周波数は  $^1\text{H}$ : 600.136 MHz,  $^2\text{H}$ : 92.125 MHz であった。

14.1 T の安定磁場の下で測定したエチルベンゼンの  $^1\text{H}$  NMR 及びベンゼン  $d_6$  の  $^2\text{H}$  NMR のスペクトルをそれぞれ Fig. 1(a-i), 1(a-ii) に示す。ベンゼン  $d_6$  の  $^2\text{H}$  NMR は  $-0.7$  ppm に生じる一本のピークから成るスペクトルであった。一方、エチルベンゼンの  $^1\text{H}$  NMR スペクトルは4本のピークから成り、それらはメチル基 ( $-6.9$  ppm)、メチン基 ( $-5.5$  ppm)、及びフェニル基 ( $-0.88, -0.76$  ppm) の  $^1\text{H}$  信号である。尚、化学シフトの基準は照射周波数を  $0$  ppm としている。Fig. 1(b) は、プローブ外側に巻きつけたコイルに電流を流し、揺動磁場を発生させて NMR 測定した時のスペクトルである。Fig. 1(b-ii) の  $^2\text{H}$  NMR スペクトルは  $-0.7$  ppm の大きなピークとその周りにある異なる強度と位相を持ったスパイク・ピークから成っている。スパイク・ピークは試料に照射した揺動磁場の周波数成分である。一方、Fig. 1(b-i) は磁場揺動下の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルで、このスペクトルから元のスペクトルを推測することは不可能に近い。

Fig. 1(b-iii) が、本法により、ベンゼン  $d_6$  の  $^2\text{H}$  NMR の FID 信号から磁場揺動に伴う位相情報を抽出し、位相再構成を行った後にエチルベンゼンの  $^1\text{H}$  FID 信号を deconvolution した結果である。本補正により静磁場下のスペクトル (Fig. 1(a-i)) をほぼ再現できていることが分かる。Fig. 1(b-iii) のスペクトルは S/N 比が僅かに悪くなっているが、これは揺動磁場を人為的に発生させた時に生じたノイズが NMR 信号に侵入したことによると考えられる。このノイズは信号の積算により容易に除去できる。

以上のように、本研究では、観測用 NMR 信号と参照用 NMR 信号の同期測定を行い、参照信号から得られる位相を再構成して磁場揺動補正に供する方法を開発し、溶液 NMR で実証した。文献 [1] の方法と本方法を併用することにより、溶液から固体まで様々な試料に対し 30 T 超の磁場での高分解能 NMR が可能となる。

尚、本研究は文部科学省科学技術振興調整費及び科学研究費補助金によって行われた。

[1] T. Iijima, K. Takegoshi, K. Hashi, T. Fujito, T. Shimizu, *J. Magn. Reson.* **184**, 258 (2007).

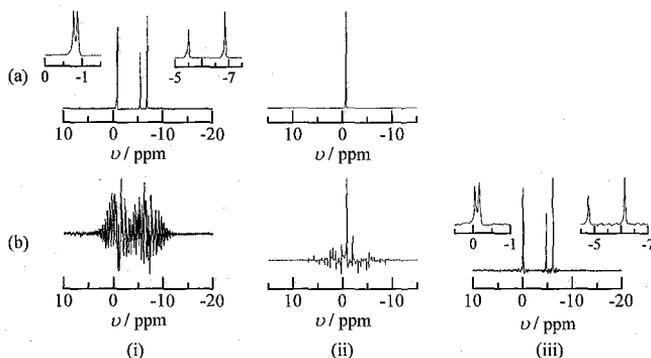


Fig. 1: NMR spectra measured under stable (a) and unstable (b) magnetic field. (i) and (ii) shows, respectively,  $^1\text{H}$  NMR of ethylbenzene and  $^2\text{H}$  NMR of benzene- $d_6$  that were measured synchronously. (iii) shows  $^1\text{H}$  NMR of ethylbenzene compensated by the present phase reconstruction method. Insets in (a-i) and (b-iii) are close-up of their spectra.

P118  $^{129}\text{Xe}$  NMR による細孔微粒子の吸着特性評価:  
ゼオライトへの応用

(大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻)

○佐治修吾、安達裕子、河田陽子、木村敦臣、藤原英明

Adsorption profile of nano-porous materials studied by  $^{129}\text{Xe}$  NMR:  
application to zeolites

○Shugo Saji, Yuko Adati, Yoko Kawata, Atuomi Kimura, Hideaki Fujiwara

$^{129}\text{Xe}$ NMR is known to offer a powerful technique to characterize surfaces in solids or polymers. In this study, we measured residence time ( $\tau$ ) of  $^{129}\text{Xe}$  in the adsorbed state on zeolites by applying selective inversion recovery method to CBV2314 and CBV28014 mixed in a sample tube. The  $\tau$  value thus determined was larger than that reported between red blood cell and plasma in blood<sup>1)</sup>, and stronger adsorption on the zeolite was suggested.

#### 背景

近年、プローブとして  $^{129}\text{Xe}$  を用いる  $^{129}\text{Xe}$  NMR 法は固体や高分子の構造及び物性を評価する効果的な方法として注目されている。ファンデルワールス直径 4.4 Å の Xe はゼオライトの細孔径(5 Å)に比べわずかに小さいことから、ゼオライト中の空洞を volume filling 的に充填することが可能である。今回の測定ではゼオライトにおける吸着の dynamics に焦点をあてて、 $^{129}\text{Xe}$  ガスの表面吸着の交換過程を観察するとともに吸着の強さを検討する。

#### 実験

ゼオライトとして ZSM-5 を選び、前処理としてサンプルチューブ(10 φ)に詰め、 $10^{-5}$  torr 以下の高真空下で、室温で 10 分間脱気した後、573 K まで  $2^\circ\text{C}/\text{min}$  程度の速度でゆっくりと温度を上昇させ、573 K に達したところでそのまま 8 時間保持した。その後室温まで戻し、空気にさらすことなくマグネット内にセットした。Xe 供給システムを用いてサンプルチューブに Xe ガスを所定圧まで供給し、圧力が一定になるまで 1~2 分待った後で NMR を測定した。ゼオライト上への  $^{129}\text{Xe}$  の吸着における交換過程の観察のため、2 種のゼオライトすなわち CBV2314 と CBV28014 の混合物について、一方の吸着信号を反転させた後の回復スペクトルをモニターし、両ゼオライトへの吸着 Xe の平均滞留時間( $\tau$ )を求めた。

測定に用いた NMR 装置は Varian Unity-INOVA (9.4 T)である。サンプルには ZSM-5 として  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$  が異なる CBV2314 ( $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3=23$ )と CBV28014 ( $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3=280$ ) (Zeolite International 製)を取り上げた。

#### 結果・考察

CBV28014 の吸着信号を反転させた時の回復スペクトルは Fig.1 となった。反転パルスには  $\text{sech}180^\circ$ パルスを用い( $p1=7000\mu\text{s}$ )、待ち時間  $d1=10\text{s}$  とした。

キーワード： $^{129}\text{Xe}$ NMR、ゼオライト、吸着、交換現象、滞留時間

著者ふりがな：さじ しゅうご、あだち、ゆうこ、かわた ようこ  
きむら あつおみ、ふじわら ひであき

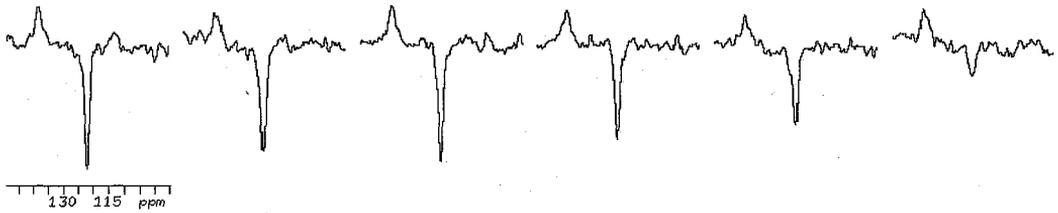


Fig.1  $^{129}\text{Xe}$  selective inversion recovery spectra (sw=54.28ppm).  $^{129}\text{Xe}$  signal at 122 ppm adsorbed on CBV28014 was selectively inverted. Delay time of inversion recovery: d2(sec)=0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 and 0.1 from left to right spectra.

得られたデータを基本式<sup>(1)</sup>に従い解析した

$$S_A = \left( S^0_A + S^0_B \right) \frac{\tau_A}{\tau_A + \tau_B} + S_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad S_B = \left( S^0_A + S^0_B \right) \frac{\tau_B}{\tau_A + \tau_B} - S_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

$$S^0 = S^0_A \frac{\tau_B}{\tau_A + \tau_B} - S^0_B \frac{\tau_A}{\tau_A + \tau_B} \quad S: \text{シグナル強度} \quad \tau: \text{滞留時間}$$

A は CBV2314、B は CBV28014 を示す。得られた吸着ピークの信号強度  $\Delta S$  ( $\Delta S = S_A - S_B$ ) と回復時間 d2(t) の関係を指数プロットしたグラフを Fig.2 に示す。

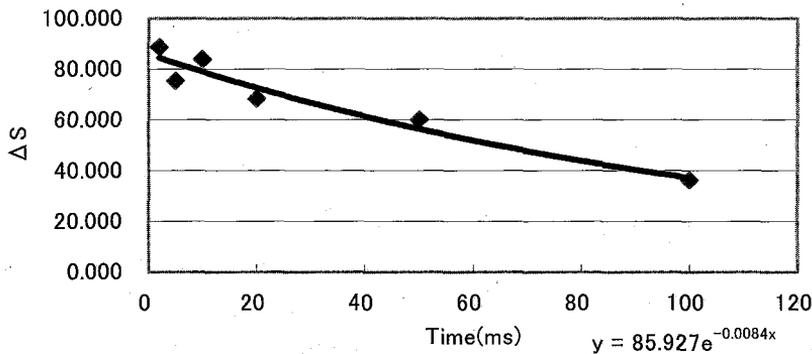


Fig.2 The plot of  $\Delta S$  versus inversion time(d2)

Fig.2 の指数減衰曲線へのフィッティングから得られたガスの吸着サイトへの滞留時間  $\tau$  は 120msec であった。この  $\tau$  の値は血漿—赤血球間の Xe の滞留時間<sup>1)</sup> ( $\tau = 12\text{msec}$ ) に比べて長く、吸着の束縛の強さを反映すると考えられる。なお、 $\tau$  の測定では、 $\tau < T_1$  が必要条件である。このことは、反転回復法で測った  $T_1$  が 0.2—0.3sec であったことから、裏付けられた。

今回の実験から同じ物質間であっても片方に inversion pulse を照射することによって、ガス交換速度の測定が可能であることがわかった。今後は超偏極  $^{129}\text{Xe}$  ガスを使用して、より感度を上げた交換の検討を行う。

#### 参考文献

- 1) A. BIFONE et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.93, pp.12932-12936, November 1996

## 高精度定量を目指した ERETIC 信号の安定化への取り組み

産業技術総合研究所計測標準研究部門

○齋藤 剛, 井原 俊英, 衣笠 晋一

An approach to stabilize ERETIC signal for high precision quantification measurements using NMR

National Metrology Institute of Japan, AIST

Takeshi SAITO, Toshihide IHARA, and Shinichi KINUGASA

ERETIC method (Electronic REference To access In vivo Concentrations)<sup>1</sup> is an attractive approach for quantification using NMR since the method do not require a reference material for each NMR run. In order to achieve quantification in NMR measurements at high precision level, the ERETIC signal requires its own stability. In this study, the stability of ERETIC signal was checked with several different cable connections and NMR sample conditions for establishing the ERETIC method for a quantification method with a high accuracy.

## 【概要】

<sup>1</sup>H NMR を利用した定量はその原理から測定される <sup>1</sup>H の元素数を比較する定量であり SI 単位に直結する標準測定法である。そこで我々はこれまで、内標準物質を利用した定量 NMR を利用することで高精度な定量を行い、純度や濃度の測定を高精度で行える<sup>ii</sup>ことや、その不確かさに関する評価<sup>iii</sup>を行ってきた。一方で、精密さは現時点では多少劣るが、汎用性の観点から優位性があると考えられる ERETIC 法を用いた定量について、定量性向上を目指した研究・評価を行っている。これまで ERETIC 法ではその信号の強度が NMR 試料間で大きく変動してしまうことが正確な定量を行うための大きな問題点であった。本研究ではこの信号を NMR 信号として安定に取り込む方法を検討したので報告する。

## 【実験】

NMR スペクトルは VARIAN UNITY INOVA 600A に <sup>1</sup>H{<sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P} 5 mm XYZ PFG Indirect Detection プローブを用いて測定した。基本的な ERETIC 法は、RF 信号を分光器のシンセサイザーで発生させ、WFG を利用して擬似 FID 信号に変換してデータ取り込み時にプローブの

ERETIC、定量

さいとうたけし、いはらとしひで、きぬがさしんいち

デカップラーチャンネルへ供給して NMR 信号として検出する。このブロックダイアグラムを図 1 に示した。ERETIC 信号の安定性を評価する目的で信号の供給方法等を変えてパルスをかけずに ERETIC 信号のみを 32 回積算した。通常の NMR の測定条件は  $\pi/2$  パルス、遅延時間 30 秒、取り込み時間 4 秒、32 回積算の定量を行う条件で行った。ERETIC 信号の強度はマグニチュードモードでの積分値で評価した。

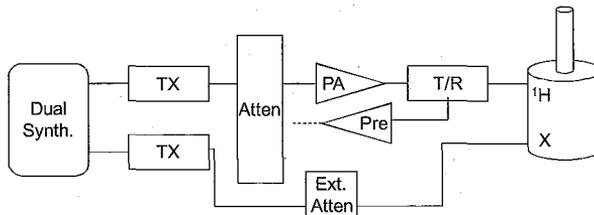


Figure 1 A block diagram of typical ERETIC configuration.

### 【結果】

図 2 に溶媒が同じ 9 種類の試料を約 30 分間隔で順次測定し、それを 5 回繰り返した際の ERETIC 信号の強度のばらつきを評価した結果を示した。ERETIC 信号は長時間にわたってある程度安定に観測された。入力信号を WFG で FID に成形を行うことで、極端に平均値から異なる信号強度を示したことが数回あった。一方、シンセサイザーで発生した信号を、オフセットをかけるのみで供給した場合は、信号強度が極端に平均から外れることなくより安定していることが判った。WFG を利用した信号強度はもう一方の強度と比較して高めに出ているが、強度変動の傾向はほぼ一致していた。異なった試料間についても、信号強度に優位な差は見られなかった。この他の条件や実際の測定を行った際に関する評価等、当日発表を行う予定である。

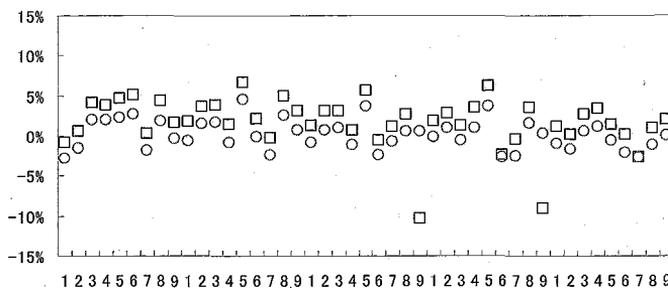


Figure 2 Stability of ERETIC signals over about one day period showing difference from a series overall average for two different ERETIC signal input, □: an FID signal formed by wave form generator; ○: a radio frequency signal without forming FID. Numbers on the X-axis are corresponded to nine different samples.

### 【Reference】

- <sup>i</sup> Akoka, S. *et al. Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2554-2557.
- <sup>ii</sup> 齋藤剛他 *分析化学* **2003**, *52*, 1029-1036.
- <sup>iii</sup> Saito, T. *et al. Metrologia*, **2004**, *41*, 213-218.

P120

理化学研究所・横浜研究所 NMR 施設の共用化  
理化学研究所 横浜研究所 ゲノム科学総合研究センター  
タンパク質基盤研究グループ

○好田真由美、木川隆則

NMR Facility at RIKEN Yokohama Institute

(RIKEN Genomic Sciences Center)

○Mayumi Yoshida, Takanori Kigawa

With a pipeline of analyzing three-dimensional structures by NMR mainly consisting of the large-scale NMR facility at RIKEN Yokohama Institute, a system that can determine the 3D structures of more than 300 proteins a year has been established. At RIKEN, we succeeded in analyzing nearly 1,300 3D structures with respect to the domain of protein function in higher eukaryotes during the past 5 years. Starting from the fiscal 2007, we offer sharing of capabilities possessed by this facility including high field and high sensitive NMR equipment and protein expression technologies widely to researchers of industry, academia and government. In so doing, we aim to promote R&D activities of a wide range of scientific and industrial areas without limitation to that of life sciences, thereby to contribute to creation of innovation. We will introduce the equipment and technologies available at the facility.

独立行政法人理化学研究所は、横浜研究所・ゲノム科学総合研究センターが所有する NMR 装置を核とした「NMR 立体構造解析パイプライン」を、平成 19 年度より、産官学の研究者に対して広く共用化していくことを決めました。この共用化を通じて、ライフサイエンス分野を始めとした、広範囲な科学・産業の研究開発活動の進展と、それによるイノベーションの創出にも貢献していくことを目指しています。本発表では、理化学研究所・横浜研究所の NMR 施設（NMR 立体構造解析パイプライン）の共用化について、特に、理研外の研究者の施設利用方法について説明します。

当 NMR 施設は、タンパク質の立体構造と機能の解析をおこなうことを主たる目的とした 40 台の高性能 NMR 装置を整備しており、世界最大の集積台数を誇る施設です。理研構造プロテオミクス研究 (RSGI, <http://www.rsgi.riken.jp>) として、当施設を活用して年間 300 以上のタンパク質の立体構造解析をおこなうことのできる体制、すなわち、タンパク質試料の試料調製・立体構造解析適合性判定→安定同位体標識タンパク質試料の調製→多次元 NMR データの測定→タンパク質立体構造の決定、という一

Keywords: NMR 施設、イノベーション、

よしだまゆみ、きがわたかのり

連のプロセスを一貫しておこなう「NMR 立体構造解析パイプライン」を構築しました。文部科学省の委託事業「タンパク 3000 プロジェクト」の「網羅的解析プログラム」においては、この体制を活用して NMR 法を用いて総計 1,342 個の立体構造を決定しました。平成 19 年度からの共用化においては、NMR 施設の 40 台の NMR 装置だけではなく、NMR 立体構造解析パイプラインも共用化の対象となっています。

理研外の研究者が当施設を利用する際の方法・形態は、以下の三通りがあります。

1. 企業向け利用（成果公開）
2. 大学・研究機関向け利用（成果公開）
3. 企業向け利用（成果非公開）

このうち、1については、文部科学省が今年度より開始した委託事業「先端研究施設共用イノベーション創出事業」【産業利用】の支援を受け実施するものであり、産業界の広範な分野における NMR 施設の幅広い利用を促進し、イノベーションにつながる成果を創出することを目的としています。年二回実施する公募により利用課題を募集し、\*NMR 課題選定委員会による審査を経て採択された課題に対して、利用時間を提供します。施設の利用料金は、上記事業が全額負担します。課題終了後には、上記事業が定める手続きに従った利用報告書の提出義務があります。

2については、NMR 施設を学術分野における幅広い利用に対して供することにより、最先端の科学技術の発展につながる成果を創出することを目指しています。公募による利用課題募集をおこない、\*NMR 課題選定委員会により課題が審査され、採択が決定されます。施設の利用料金については、機器運転費用、消耗品費用のうち一部を負担していただきます。課題終了後には、利用報告書の提出義務があります。

3については、主として産業界の研究者が成果非公開での施設利用をおこなうための利用形態であり、利用料金として、機器運転費用、消耗品費用、施設運転支援員の人員費相当分の全額を負担していただきます。

共用化に関するより詳細な情報等は、以下 Web サイトなどで公表していきます。

理化学研究所 横浜研究所

<http://www.yokohama.riken.jp>

理化学研究所 横浜研究所 NMR 施設

<http://www.ynmr.riken.jp>

\*「NMR 課題選定委員会」

NMR 利用研究について専門的知識を有し、産業界利用や産官学共同研究を中心としたイノベーション創出についても重大な関心を有する外部有識者および NMR 施設の運用に関して責任を有する内部委員で構成する課題選定委員会。

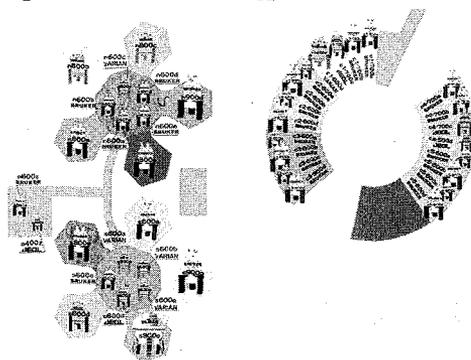


Fig. 1 The arrangement of NMR machines

○大窪 貴洋<sup>1</sup>、山口 真<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>原子力機構、<sup>2</sup>産業創造研

### Analysis of pore structure in compacted clay material using relaxometry

T. Ohkubo<sup>1</sup> and M. Yamaguchi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Japan Atomic Energy Agency and <sup>2</sup>Institute of Research and Innovation

#### Abstract

NMR relaxation of a fluid in a porous media is generally interpreted in terms of the Brownstein-Tarr model, in which the relaxation rate of the signal is inversely proportional to the pore size. In this study we measured the transverse and the longitudinal relaxation time ( $T_1$  and  $T_2$ ) distribution to investigate the pore structure in the mixed sample of compacted-clay and clay-sol. The obtained  $T_1$  spectrum indicated several peaks corresponding to interlayer and intralayer.

#### [緒言]

廃棄物の地下処分において、汚染物質の抑制するために、高密度に圧縮した粘土材料が廃棄物周辺に配置される。廃棄物処分の安全性を評価するため、この圧密粘土材料の透水係数や拡散係数が評価されているが、汚染物質の移行経路となる空隙構造は明らかになっていない。圧密粘土材料の空隙構造としては、層状化合物である粘土粒子の層間 (~nm) および粒子-粒子間の外部間隙 (>nm) が存在すると考えられている。前者の層間空隙は、回折実験による計測が可能なレンジであるが、後者の外部間隙に関しては、その不均質な形状とサイズを考慮すると回折実験による解析は、極めて困難である。また、水銀圧入法やガス吸着法による方法は、水が充填した圧密粘土に適用することができない。これら問題に対し、緩和時間から空隙サイズ分布を推定する NMR 緩和法は、水が充填した空隙そのものを計測できることと、その計測可能な空隙サイズのレンジから、圧密粘土材料の空隙を評価する有力な手法であると考えられる。しかしながら、一般的な NMR 緩和法による空隙構造の解析は、CPMG 法による  $\mu\text{m}\sim\text{mm}$  (横緩和時間  $T_2$  にして  $\text{ms}\sim\text{s}$ ) のサイズを対象にした手法であり、圧密粘土材料中の水 ( $T_2 < 1 \text{ ms}$ ) に対しては、適応されていない。そこで本研究では、緩和時間既知の粘土試料について緩和時間分布を測定し、その妥当性について検討したので報告する。

#### [実験]

緩和時間の測定は、偶数エコーのみを抽出した Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)  $\pi/2-[\tau-\pi-\tau]_n$  および完全回復した磁化  $M(\infty)$  からの差をとった Inversion-Recovery (IR)  $\pi-\tau-\pi/2$  法により行った。CPMG による測定は、 $\tau = 30 \mu\text{s}$  で、1024 ポイントの信号を得た。IR 法は、0.1ms~ 12.8 ms まで等間隔に 128 ポイントの  $\tau$  で信号を得た。完全回復した磁化の測定は、 $\tau = 1000 \text{ ms}$  にて 5 回測定した信号を平均して  $M(\infty)$  とした。多成分の緩和時間を持つ試料の NMR 信号の減衰は、多数の exp 型減衰の重ね合わせとなり以下の式で表される。

$$\frac{M(\infty) - M(\tau)}{2} = \sum_i M_{0,i} \exp\left(-\frac{1}{T_{1,i}}\right) \quad \text{[IR]} \quad (1)$$

$$M(\tau) = \sum_i M_{0,i} \exp\left(-\frac{1}{T_{2,i}}\right) \quad \text{[CPMG]} \quad (2)$$

緩和分布の解析は、式 (1) および (2) の左辺を汎用ラプラス逆変換プログラム CONTIN[1]

keywords: 空隙構造、緩和時間分布、多孔体  
 おおくぼ たかひろ、やまぐち まこと

により行った。CONTIN への入力は、すべての解析で、 $100 \mu\text{s}$  から  $1 \text{ s}$  の緩和時間領域で 256 ポイントの緩和時間とした。NMR 測定は、永久磁石 (0.55 T) を用いた Maran Ultra (Resonance Instrument, UK) により行った。プローブのデッドタイムは、 $15 \mu\text{s}$  である。粘土試料は、含水比 9% のベントナイト (クニミネ工業製 [粘土成分 59%]) を密度  $2.0 \text{ g/cm}^3$  に圧縮成形 (直径 14 mm, 高さ 10 mm) した圧密粘土および蒸留水と 10:1 で混合しゲル化させた粘土ゲルの 2 種類を準備した。これら試料をそれぞれ等しい水を含む重量 (圧密粘土 2.6g, 粘土ゲル 0.3g) でテフロンにより区切られたガラス容器 (混合試料) に入れ、NMR 測定を行った。

### 【結果】

最初に、圧密粘土および粘土ゲル単体で測定を行い、緩和時間分布の解析を行った。圧密粘土単体での緩和時間分布は、 $T_1 = 0.76 \text{ ms}$  および  $T_2 = 0.087 \text{ ms}$  に強いピークを示した。この緩和時間に相当する水分子は、粘土の層間水で層間での水の束縛状態と粘土の結晶構造中の常磁性イオンの影響を受け、著しく短くなる。また、粘土ゾルの緩和時間分布は、 $T_1 = 190 \text{ ms}$  および  $T_2 = 137 \text{ ms}$  の緩和時間にピークを示した。この緩和時間に相当するピークは、層間外の水に相当すると考えられる。

次に粘土ゲルと圧密粘土の混合試料の緩和時間を図 1 に示す。 $T_2$  の緩和時間分布は、130 ms にピークを示し、圧密粘土の層間水に相当するピークは、観測されなかった。それに対し、 $T_1$  の緩和時間分布は、1.3 ms と 84 ms に明瞭なピークを示し、これらピークの積分値の比は、1.0:1.1 であった。この比は、圧密粘土および粘土ゲルの予想される水分量とよく一致し、 $T_1$  の利用による緩和時間分布の測定から粘土試料中の水が充填した空隙を推定できることが示された。発表では、これら結果を踏まえ、水にて飽和させた圧密粘土材料の緩和時間分布の結果を報告する予定である。

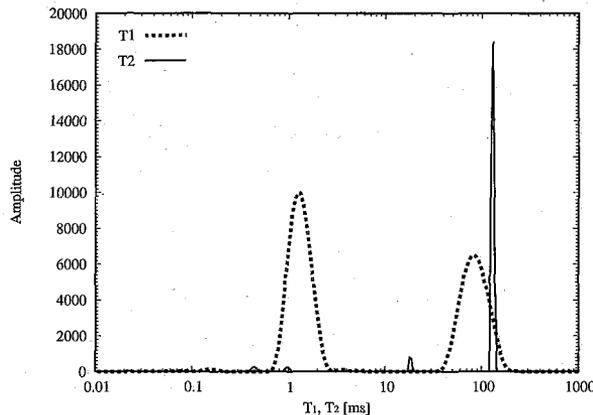


図 1  $T_1$  and  $T_2$  relaxation time distribution for the mixed sample of compacted-clay and sol-clay.

### 参考文献

- [1] S. W. Provencher, A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equation *Comput. Phys. Comm.*, **27**, 213-227 (1982).

P122 <sup>19</sup>F-NMR を用いたコラーゲンモデルペプチドのフォールディング機構の研究

(<sup>1</sup> 阪大院・薬、<sup>2</sup> 日本電子(株)、<sup>3</sup> 大阪薬大、<sup>4</sup> 和歌山高専、<sup>5</sup> 阪大院・工、<sup>6</sup> 奈良女子大・理、<sup>7</sup> (株)ペプチド研)

○河原一樹<sup>1</sup>、根本暢明<sup>2</sup>、元岡大祐<sup>3</sup>、西義則<sup>3</sup>、土井正光<sup>4</sup>、内山進<sup>5</sup>、中沢隆<sup>6</sup>、西内祐二<sup>7</sup>、吉田卓也<sup>1</sup>、大久保忠恭<sup>1</sup>、小林祐次<sup>1,3</sup>

**<sup>19</sup>F-NMR Study of Collagen Model Peptides Containing 4(R)-fluoroproline**

(<sup>1</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, <sup>2</sup> JEOL LTD., <sup>3</sup> Division of Rational Drug Design, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, <sup>4</sup> Department of Materials Science, Wakayama National College of Technology, <sup>5</sup> Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>6</sup> Department of Chemistry, Nara Women's University, <sup>7</sup> Peptide Institute Inc.)

○Kazuki Kawahara<sup>1</sup>, Nobuaki Nemoto<sup>2</sup>, Daisuke Motooka<sup>3</sup>, Yoshinori Nishi<sup>3</sup>, Masamitsu Doi<sup>4</sup>, Susumu Uchiyama<sup>5</sup>, Takashi Nakazawa<sup>6</sup>, Yuji Nishiuchi<sup>7</sup>, Takuya Yoshida<sup>1</sup>, Tadayasu Ohkubo<sup>1</sup>, and Yuji Kobayashi<sup>1,3</sup>

<sup>19</sup>F-NMR experiments have been carried out on collagen model peptides containing 4(R)-fluoroproline (fPro<sup>R</sup>). Due to much larger <sup>19</sup>F chemical shift dispersion than that of <sup>1</sup>H or <sup>13</sup>C, we found that <sup>19</sup>F $\gamma$  chemical shifts of fPro<sup>R</sup> in (Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>7</sub> are widely spread. This markedly differs from <sup>1</sup>H-NMR spectrum in which, for example, the <sup>1</sup>H $\gamma$  peaks in the fPro<sup>R</sup> residues completely overlapped into one peak. Analyses on <sup>19</sup>F-<sup>1</sup>H heteronuclear correlation and relaxation as well as on the temperature dependence helped us to clearly categorize the <sup>19</sup>F signals into three; those of monomer, intermediate, or triple-helix. Furthermore, 2D exchange spectroscopy has been used to investigate equilibrium properties of (Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>7</sub>. As a result, at high temperature, we successfully observed many exchange cross peaks for (Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>7</sub>. The combination of <sup>19</sup>F-NMR techniques shown here provides a clue to analyze the conformational transition, dynamics and stability of collagen triple helix.

[緒言]コラーゲン分子は(X-Y-Gly)<sub>n</sub> の繰り返しアミノ酸配列を持つペプチド鎖からなり、室温付近では三本のペプチド鎖が螺旋状に絡み合うトリプルヘリックス構造を形成している。配列中の X,Y 位には Pro や 4(R)-hydroxyproline(Hyp<sup>R</sup>)が頻繁に存在し、I

---

Key Words : <sup>19</sup>F-NMR, Collagen Model Peptides, Folding Mechanism

かわはらかずき、ねもとのぶあき、もとおかだいすけ、にしよしのり、どいまさみつ、うちやますすむ、なかざわたかし、にしうちゆうじ、よしだたくや、おおくぼただやす、こばやしゆうじ

型のコラーゲンにおいてはこれらのイミノ酸の含有量が全体の約 30%を占めることが知られている[1]。特に、Y 位の Hyp<sup>R</sup>はトリプルヘリックス構造の熱安定性を上昇させる役割をする事がモデルペプチドを用いた熱力学的研究から明らかとなり、更に、Hyp<sup>R</sup>を 4(R)-fluoroproline(fPro<sup>R</sup>)に置換したモデルペプチドがより熱安定性の高いトリプルヘリックス構造を形成することが近年報告されている[2-4]。

この様なコラーゲントリプルヘリックス構造の熱安定化とフォールディング機構を説明する為に NMR を使用した様々な研究が行われてきたが、特徴的な繰り返し配列及び配列中に多数存在するイミノ酸の cis/trans 異性化反応が原因で、<sup>1</sup>H ないし <sup>13</sup>C-NMR スペクトル上で複雑な信号の重なりが生じることから解析が非常に困難であった。この問題に対し、我々は fPro<sup>R</sup>を導入したモデルペプチド(Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>n</sub>を合成し <sup>19</sup>F-NMR による測定を行ってきた。<sup>19</sup>Fの化学シフトは、<sup>1</sup>H や <sup>13</sup>C に比べて、核周辺の小さな環境変化に敏感であり化学シフトがより広範囲に分散する傾向を持つため、信号の分離が期待できる。その結果、25℃における <sup>19</sup>F-NMR 実験において <sup>19</sup>F<sub>γ</sub> の化学シフトが広範囲に分散していることを観測することに成功した。これは <sup>1</sup>H-NMR スペクトル上で 1 本の信号に纏まってしまう fPro<sup>R</sup> 中の <sup>1</sup>H<sub>γ</sub>の結果と対照的である。更に、温度変化実験、{<sup>1</sup>H}-<sup>19</sup>F HOESY および <sup>19</sup>F-緩和測定の測定結果を組み合わせることで、<sup>19</sup>F-NMR 実験において観測された各信号は三本鎖状態だけでなく、一本鎖状態及び中間状態に由来する信号も含まれていることが明らかとなった。単純繰り返し配列のモデルペプチドのフォールディング過程において中間状態が検出されたのはこれが初めての例である。そこで、中間状態に関してより詳細な情報を得る為に <sup>19</sup>F-二次元交換実験を行った。また、一本鎖状態に由来する信号を帰属する目的で鎖長の異なるモデルペプチド(Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>n</sub> (n=1~6)を合成し解析を行ったので今回報告する。

**[実験]** 化学合成した(Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>n</sub> (n=1~7)を 90% H<sub>2</sub>O / 10% D<sub>2</sub>O に溶かし測定した。(Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>n</sub> (n=1~7)に関して <sup>19</sup>F-二次元交換実験を行った。また、(Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>n</sub> (n=1~6)に関して温度変化実験(5℃~85℃)、{<sup>1</sup>H}-<sup>19</sup>F HOESY, <sup>19</sup>F-緩和測定等を行った。

**[結果]** 高温における(Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>n</sub> (n=5~7)の <sup>19</sup>F-二次元交換実験において、多くの交換信号が観測され、三本鎖、中間体及び一本鎖の各状態間での平衡関係が明らかとなった。また、室温において三本鎖形成能を持たないモデルペプチド(Pro-fPro<sup>R</sup>-Gly)<sub>n</sub> (n=1~4)に関して、個々の信号強度の比較や <sup>19</sup>F-二次元交換実験の結果を組み合わせることで cis/trans 異性化反応に起因する一本鎖状態由来の信号の複雑な分離を説明することが可能となった。

#### [参考文献]

- 1, P. P. Fietzek and K. Kühn. (1975) *Mol. Cell. Biochem.* **8**, 141-157.
- 2, Kobayashi, Y. et al. (1970) *Biopolymers*, **9**, 414-425.
- 3, Holmgren, S. K. et al. (1998) *Nature* **392**, 666-667.
- 4, Hodges, Jonathan, A., and Raines, R.T. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9262-9263.

#### [謝辞]

名古屋大学物質国際研究センターでの測定に便宜をはかってくださいました前田裕博士ならびに篠原久典教授に感謝致します。







## キーワード索引

### (数字・アルファベット)

<sup>1</sup> H-NMR	P101
<sup>10</sup> B	3L8
<sup>11</sup> B	3L8
<sup>11</sup> B NMR	P089
<sup>129</sup> Xe	P118
<sup>13</sup> C 均一安定同位体標識	P067
<sup>133</sup> Cs-NMR	P092
<sup>14</sup> N	P059
<sup>15</sup> N	P076
<sup>19</sup> F NMR	2L11
<sup>19</sup> F および <sup>13</sup> C NMR	3L6
<sup>19</sup> F-NMR	P085
<sup>19</sup> F-NMR	P122
2次元スピン拡散	P068
<sup>25</sup> Mg 3QMAS NMR spectroscopy	P084
3 重共鳴NMR	P005
4D NMR	P005

### (A)

ab initio	P059
ACTH	YP09
AGE	P043
Alamethicin	YP11
AML1	P020
Amyloid- $\beta$	P065
anisotropic spin interactions	2L6
Aptamer	P020
ARID	P014
Atg19	P023
Atg8	P019
Atg8	P023
Atg8 homolog	P042
Automated structure determination	P102
Autophagy	P042
autophagy	P019

### (B)

B <sub>1</sub> Inhomogeneity	P006
Backbone Conformation	3L1
base triple	P020
Bem1p	P021
bilayer-hydrate	P092
Bloch方程式	P107
BMRB	P116
boroaluminosilicate glass	3L4
boron-doped diamond	3L8
$\beta$ シート構造	P066

### (C)

carotenoid ester	P053
cell polarity	P021

cell-free protein synthesis	P028
Ceramide trafficking protein (CERT)	YP06
chemical shift perturbation	YP05
Collagen Model Peptides	P122
complex	2L7
complex structure	P023
coordination structure	3L4
correlation	2L13
cryo	P111
Cryo-MAS	3L10
CT COSY	P097
Cvt pathway	P023
CYANA	P102
CYRモチーフ	P027

### (D)

D <sub>2</sub> O solvent	P054
D-type cysteine	P010
deconvolution	P117
deuterium labeling	2L6
Disulfide bond	P010
DNA binding	2L9
DNA binding	P016
DNA 結合ドメイン	P014
DNA修復	P027
DNP	P105
DNP-NMR	P051
domain-domain interaction	2L8
DOSY	P003
DOSY	P050
DOSY	P053
DOSY-COSY	P053
DPFGSE	P048
DPFGSE	P049
DPFGSE	P052
dynamic nuclear polarisation	P056
dynamic nuclear polarization	P051
dynamic structure	P074

### (E)

ERETIC	P119
--------	------

### (F)

Fe-S cluster protein	P028
Filter Diagonalization Method	P103
FLIPSY	P006
FLYA	P102
Folding Mechanism	P122
FSLG-242	P076

### (G)

GABA	P097
gating modifier toxin	P044
glutamate	P097
glycophospholipid 抗生物質	P052

glycoprotein	2L8	molecular alignment	2L6
GPVI	P038	Molecular mimicry	P020
	(H)	molecular recognition	2L8
H-D Exchange reaction	P054	motif	YP02
HETCOR	P058	MQHETCOR	P058
heteronuclei	P056	MQMAS	P071
High Magnetic Field	3L8	MQNMR	P060
high-pressure NMR	P019	MRS	P099
HMBC	P048	Multiple quantum	P061
HR-MAS	YP01		(N)
human brain	P097	Natural products	P046
Hybrid magnet	3L10	natural products	P053
hyperpolarization	P051	NDSB	1L3
	(I)	NMR	P014
<i>in vivo</i>	P097	NMR	P018
<i>in-situ</i> (その場)パルスNMR計測	YP12	NMR	P100
<i>in silico</i> スクリーニング	1L6	NMR マイクロイメージング	P057
In-Cell NMR	1L2	NMR 施設	P120
In-Cell NMR	2L10	NMRデータベース	P116
In-Cell NMR	P098	NOE/ROE	P052
intein	YP02	Nonlinear Sampling Method	P103
interaction	YP02	normal phase	P089
interaction	YP07	nuclear magnetic shielding tensor	2L12
isotropic bicelle	YP07	nucleic acids-binding protein	2L7
	(J)		(O)
J-resolved HMBC	P055	oligosaccharide	P049
Jumonji	P014	oocyte	2L10
	(L)	Oryza sativa	P028
LC3	P042		(P)
Long-range couplings	P046	p97	P032
Low-k	P090	paramagnetic relaxation enhancement	2L5
lachrymatory factor	P040	PB1	YP02
long range $J_{CH}$	P055	PDB	P116
	(M)	peptides	2L13
Macarbomycin	P052	PFG-NMR	3L14
macromolecular complex	2L5	Phenol	P046
MAS	3L13	photosystem	P028
MAS	3L8	plants	P051
MAS	P091	PLC- $\delta$ 1 PH ドメイン	YP10
MAS	P111	Pleckstrin homology (PH) domain	YP06
MBIP	P015	PLLA/PCL copolymer	P078
mechanical property	P078	Poly(glutamic acid)	P071
membrane	2L13	poly (methyl propiolate)	P074
metabolomics	P100	Poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate)	P073
metabonomics	P051	polyphenol	YP07
metabonomics	P056	PRE	2L7
metal ion	P071	PRE	YP04
methylated histone	2L9	Presequence	P010
MgB <sub>2</sub>	P089	probe	P111
MICCS	P007	Projection Reconstruction NMR	P103
MICCS-NMR	P007	protein fusion	2L5

Protein kinase	P041	T1定量	P095
protein-protein interaction	2L5	tea catechins	YP07
proton	2L13	TF <sub>II</sub> E	P018
	(Q)	titration 計測	P112
quality control	2L8	TOCSY	P049
	(R)	Tom20	P010
RAGE	P043	transcription	2L5
REDOR	P070	transferred cross-saturation	P044
REDOR Filter	3L1	Triple-resonance	P046
relativistic effect	2L12	TROSY	2L6
Relaxation analysis	P010	TROSY	P004
relaxation analysis	2L7	TrueFISP	P095
relaxation time	P078		(U)
residual dipolar coupling	P019	ubiquitin	2L10
RNA	P020	ubiquitin-like	P019
	(S)	UBX	P032
SAIL	P102	UPR	P031
SAIL 法	P001		(V)
SASS 法	P073	VCIP135	P032
Secondary structure	P076	voltage-activated potassium channel	P044
self-sumoylation	P016	voltage-sensor domain	P044
separation	P053		(W)
SH3	YP02	Warfarin	P054
SH3-CI	P021		(X)
shock	P100	Xenopus laevis	2L10
silicate glass	P084		(あ)
Silylation	P046	アミロイド線維	P069
Sld2	P033	アメロジェニン	P036
solid-state <sup>2</sup> H NMR	P074	アラニンオリゴマー	P064
Solid-state NMR	P065	アラニンオリゴマー	P066
Solid-state NMR	P076	アルミノシリケート	P080
solid-state NMR	P078	アンダーサンプリング	YP15
solid-state NMR	P089	アンフォールディング	P017
solid-state NMR	P111	亜鉛フィンガー	P027
Spin-echo法	P095	圧力	1L4
Split PH domain	P041	安定性	1L3
SSB	P113	安定同位体標識	3L13
ssNMR	2L13	安定同位体標識	P012
structure-function correlation	2L7	安定同位体利用NMR	P030
SUMO ligase	2L9		(い)
SUMO ligase	P016	イノベーション	P120
sumoylation	2L9	イメージング	P094
sumoylation	P016	イメージ周波数	YP15
super high-magnetic field	P089	位相再構成	P117
synthase	P040	異種核多次元NMR	1L2
	(T)	異種核多次元NMR	P098
+TIPs	P037	異方性スピン相互作用	P004
T <sub>1</sub> 緩和時間	P064		(う)
T <sub>1</sub> 緩和時間	P094	ウイルスペクター	P012
T <sub>2</sub> <sup>†</sup> 緩和時間	1L7	ウシラクトフェリシン	P063
T <sub>2</sub> フィルター	P003	運動性	3L2

運動性	YP10	凝集	1L3
(え)		絹フィブロイン	P068
エラストマー	P072	(く)	
栄養代謝	YP13	くらげ	P048
液晶	P093	空間分布の次元性	P060
(お)		空隙構造	P121
オーバートーン	P059	グルカゴン	P069
オーバーハウザー効果	P049	グルコシダーゼ	P057
オルソ・パラ水素吸蔵	P086	(け)	
遅い揺らぎ	1L4	結晶化	P085
(か)		結晶性高分子	3L7
カーボンナノファイバー	3L15	血小板凝集	P038
カルシトニン	P069	原子間距離	P069
カルモジュリン	P026	ゲノムプロジェクト	1L5
カルモジュリン	P098	ゲル-液晶相転移点	P063
化学シフト	P069	(こ)	
化学シフト異方性	YP11	コアクチベーター	P039
化学シフト異方性(CSA)	P073	コールドショックベクター	YP03
化学シフト計算	P066	コラーゲン	P038
化学シフト値	YP09	コレステロール	P070
可変圧力NMR	P034	コレステロール	YP09
可溶性タグ	YP03	コンホメーション	3L6
画像解析	P094	極低温	P061
外乱	P107	極低濃度サンプル	1L1
拡散係数	3L5	固体 <sup>1</sup> H NMR	P066
拡張ナノ空間	YP08	固体 <sup>13</sup> C NMR	P075
完全長cDNA	P045	固体 <sup>15</sup> N NMR	P075
感度	P110	固体NMR	3L1
感度向上	P105	固体NMR	3L15
簡易測定	P007	固体NMR	3L2
緩和	1L4	固体NMR	3L3
緩和	P118	固体NMR	P063
緩和時間	P057	固体NMR	P067
緩和時間	P085	固体NMR	P068
緩和時間	P093	固体NMR	P077
緩和時間	P101	固体NMR	P079
緩和時間	YP08	固体NMR	P083
緩和時間分布	P121	固体NMR	P086
緩和分散NMR法	P034	固体NMR	P087
含フッ素化合物	P002	固体NMR	P088
ガラス・融体	P080	固体NMR	P105
(き)		固体NMR	YP09
キチン	P079	固体NMR	YP10
キトサン	P079	固体NMR	YP11
キャビティ	P034	固体原子間距離測定	P064
基本転写因子	P018	固体高分解能 <sup>13</sup> C NMR	P093
吸収強度	P096	固体高分解能 NMR	P072
吸着状態解析	3L15	固体高分解能NMR	P082
吸着等温線	P118	固体高分子電解質膜	3L14
共発現	P011	交換現象	P118
強磁場NMR	P117	光合成	P022

抗菌ペプチド	P024	磁場調整	P109
抗菌作用	P063	磁場揺動	P117
構造	P080	自己凝集	P036
構造プロテオミクス	P045	自然免疫	P024
構造変化	3L12	自然免疫	P025
構造揺らぎ	P034	自動帰属	1L5
酵素	3L12	疾患マーカー	P047
酵素	P040	主鎖シグナル	1L5
酵素活性	P030	重水素NMR	P070
高温in-situ <sup>27</sup> Al NMR	P080	重水素NMR	P083
高温測定	1L3	重水素NMR	P091
高感度	3L11	重水素標識	P004
高感度化	P090	循環の電子伝達	P022
高磁場MRI	1L7	小胞体ストレス	P031
高磁場MRI	P094	消去	P113
高磁場NMR	P066	常磁性NMR	P017
高磁場NMR	YP14	常磁性シフト	2L11
高磁場NMR	YP16	植物細胞	P012
高速MAS	3L9	食塩電解	3L14
高速MAS	P072	食品素材	3L12
高分解能固体NMR	3L9	新ADIT-NMR	P116
高分子電解質膜	3L5	新規測定法	3L2
高分子量タンパク質	P001	新方式NMR	3L11
高分子量蛋白質	1L2	ジャイロトロン	P105
高偏極キセノン	P099		
	(さ)		
サンプル循環型	P112	スピニングサイドバンド	P113
催涙	P040	スピנקロスオーバー	P087
最大エントロピー法	1L2	スピン拡散法	P067
最大エントロピー法	P005	スフィンゴリエリン	P070
細胞骨格	P037	スプリットマグネット	3L11
酸性混合リン脂質二重膜	P063	スプリット型超電導マグネット	P110
酸性混合脂質膜	YP09	スプリット型超電導磁石	P106
	(し)	スプリット型超電導磁石	P108
シトクロムc	P017	スプリット型超電導磁石	P109
四極子	P059	スプリット型超電導磁石	P114
脂質ラフト	P070	スペクトル強度	P096
脂質二重膜	YP11	水素結合	3L3
脂質膜	3L2	水溶性	P068
試料回転	P113	水和	3L2
試料調製	P008		
時間周波数解析	P104	(せ)	
時間分解NMR	P104	セラミド	YP06
磁場ロック	P107	セルフリータンパク質合成	P001
磁場ロック	YP14	セルロース分解	3L13
磁場安定化	YP14	制御	P107
磁場安定化	YP16	選択のプロトン標識	P098
磁場安定度	P109	ゼオライト	P118
磁場均一度	P109		
磁場均一度	P114	(そ)	
磁場減衰	P114	ソレノイド	3L11
		ソレノイド	P108
		ソレノイドアンテナ	P106
		ソレノイドアンテナ	P110

相互作用	P013	添加剤	P003
相互作用	YP01	転移交差飽和	YP06
相互作用解析	P038	転移交差飽和法	P022
側鎖シグナル	1L5	転移交差飽和法	YP01
(た)		転写	P039
タグ分子	P009	澱粉	P057
タマネギ	P040	電子スピン	P105
タンパク3000プロジェクト	P045	電子構造	2L11
タンパク質	1L1	電子伝達	YP05
タンパク質	P012	データ登録	P116
タンパク質	P029	デカップリング	P002
タンパク質	P031	デジタルNMR分光計	YP15
タンパク質	P035	(と)	
タンパク質-低分子化合物	P112	等温滴定型熱量計	P029
タンパク質間相互作用	YP04	糖	P013
タンパク質間相互作用	YP05	糖結合タンパク質	P013
タンパク質機能ドメイン	P045	糖鎖の立体構造	P049
多核NMR	3L15	糖鎖修飾	P047
多核種測定	P058	糖蛋白質	P048
多孔体	P121	糖尿病	P043
多次元MEM	1L1	動態解析	P099
多次元非線形サンプリング	1L1	(な)	
多臓器不全	P100	ナノ粒子	P088
多変量解析	P100	(に)	
唾液	P096	二次元NMR	P091
代謝動態	3L13	二次構造	P059
大腸菌	P009	二次構造転移	P073
大腸菌	P011	(ね)	
大腸菌	YP03	燃料電池	3L14
大量発現	YP03	燃料電池	3L5
蛋白質	1L4	(の)	
蛋白質内部運動	P030	脳	1L7
蛋白質複合体	P037	脳	P094
ダイナミクス	1L4	(は)	
ダイナミクス	1L6	ハイブリッド磁石	P117
ダイナミクス	P080	波形分離	P101
(ち)		配位高分子	P082
腸内細菌	YP13	配位高分子	P086
腸内微生物	3L13	反強磁性体	P088
超高分子量ポリエチレン	YP12	非晶質	P085
超電導シムコイル	P114	非線形サンプリング	1L2
超微細結合定数	P082	非線形サンプリング	P005
超偏極	P090	非線形サンプリング	P098
(て)		バックリング構造	3L7
テトラフルオロエチレン-プロピレン交互共重合体	3L6	バルス磁場勾配	3L5
低温プローブ	3L11	(ひ)	
低温プローブ	P108	光ポンピング	P090
低濃度	P035	微細構造	3L7
低分子量G蛋白質	P041	微小管	P037
定量	P096	微生物産生	P077
定量	P119	微生物産生高分子	P075

微分絶対強度	P096	膜タンパク質	3L1
微量試料	3L9	膜タンパク質	P022
表面情報	3L15	膜タンパク質	YP10
	(ふ)	膜融合	P032
フェリチン	1L7		(み)
フェレドキシン	P022	ミオグロビン	2L11
フッ素化ヘム	2L11	水分子	YP08
フロー-NMR	P007		(む)
不均一系	YP01	ムチン	P048
不溶性高分子	3L7	無機固体酸塩	3L3
封入体	P011	無細胞タンパク質合成	P008
複合体	P029	無細胞タンパク質合成	P045
複数帯域	P002		(も)
物性	3L12	木質系バイオマス	3L13
分子イメージング	1L7		(ゆ)
分子クラスター	P061	ユビキチン鎖	YP04
分子間引力	P086	有機合成	1L6
分子間水素結合	P064	融合タンパク質	P009
分子鎖絡み合い	YP12		(よ)
分子磁性	P082	溶液NMR	P015
分子認識	P050	溶液NMR	P106
分子配向	P004	溶液NMR	P108
プリオン	1L6	溶液NMR	P110
プローブ	P106	溶媒の最適化	P035
プローブ	P110	溶媒消去	P006
プロトンスピン拡散	P083	溶融NMR	3L7
プロトンダイナミクス	3L3	溶融延伸	YP12
プロトン移動	YP08		(ら)
プロトン拡散	3L3	ラット脳	P099
プロファイリング	YP13		(り)
	(へ)	リアルタイム計測	YP13
ヘム配位構造	P017	リボ多糖	P024
平行および逆平行βシート構造	P064	リン酸化	P033
変異体	P030	立体構造	P029
変動磁場測定	YP16	立体構造	P031
ペプチド	P009	立体構造	P039
ペプチド	P029	立体構造	P041
ペプチド	YP11	立体構造	P052
	(ほ)	立体構造解析	P008
ポア	P090	立体構造解析	P015
ポリ(ε-リジン)	P075	立体構造変化	P047
ポリ(ε-リジン)	P077		(れ)
ポリアクリル酸	P077	レクチン	P013
ポリマー	P003	レチナール	3L1
	(ま)		(ろ)
マイクロコイル	3L9	論理的創薬	1L6
マトリクス蛋白質	P036		
マルチラメラベシクル	YP10		
マルチレシーバ	P058		
マンガン増感MRI(MEMRI)	P095		
膜	P024		

著者索引  
(アルファベット)

- |                        |      |                     |      |                   |      |
|------------------------|------|---------------------|------|-------------------|------|
| Akihiro Suzuki         | 2L11 | Kazuya Mizuseki     | 2L11 | Wei Li            | YP04 |
| Akira Tase             | 2L9  | Kazuyuki Hiratsuka  | 2L7  | Xin Zhao          | 2L13 |
| Akira Tase             | P016 | Kenton J Swartz     | P044 | Yasuhiko Yamamoto | 2L11 |
| Alan Kook              | P056 | Koichi Kato         | 2L8  | Yuji Nishiuchi    | 2L9  |
| Andrew Illsley         | P056 | Kosuke Inomata      | 2L10 | Yusuke Takada     | 2L7  |
| Ayako Furukawa         | 2L7  | Markus Walchli      | 1L2  | Yutaka Ito        | 2L10 |
| Boban K. John          | P058 | Markus Walchli      | P005 | Yuusuke Ootani    | 2L12 |
| Carine van Heijenoort  | 1L4  | Masahiro Shirakawa  | 2L10 | ラ・アグス             | P105 |
| Chia-Wei Su            | P092 | Masato Katahira     | 2L7  | (あ行)              |      |
| Christian Roumestand   | 1L4  | Masatsune Kainosho  | P102 | 相沢智康              | P009 |
| Chung-Chin Lin         | P092 | Michael Garwood     | 1L7  | 相沢智康              | P011 |
| Chung-ke Chang         | P001 | Michal Maloň        | P046 | 相沢智康              | P024 |
| Claudio A.P. Joazeiro  | YP04 | Ming-Yuan Liao      | P092 | 相沢智康              | P036 |
| Daniel Nietlispach     | 1L2  | Mirela Milesco      | P044 | 相沢智康              | YP05 |
| Daniel Nietlispach     | P005 | Mitsu Ikura         | 2L5  | 相星淳一              | P100 |
| David M. Rice          | P058 | Peter Guentert      | P045 | 相本三郎              | P001 |
| David Wright           | P099 | Peter Guntert       | P102 | 青木伊知男             | P095 |
| Devendra Babu Nama     | P056 | Fumitaka Horii      | 2L4  | 赤坂一之              | 1L4  |
| Dong-kyun Kang         | P044 | James H. Prestegard | 2L2  | 赤坂一之              | P034 |
| E.A. Ekimov            | 3L8  | Kevin M. Brindle    | 2L1  | 赤澤大輔              | P038 |
| Eriks Kupce            | P103 | Zhehong Gan         | 2L3  | 明石知子              | P018 |
| Frans A.A. Mulder      | P034 | Ray Freeman         | P103 | 赤松穰               | P049 |
| Frederick W. Dahlquist | P034 | Rintaro Suzuki      | 2L9  | 赤松穰               | P052 |
| Heisaburo Shindo       | 2L9  | Rintaro Suzuki      | P016 | 阿久津秀雄             | P067 |
| Heisaburo Shindo       | P016 | Ryuji Igarashi      | 2L10 | 阿久津秀雄             | P105 |
| Hidehito Tochio        | 2L10 | Saburo Aimoto       | 2L13 | 阿久津秀雄             | P116 |
| Hidekazu Hiroaki       | 2L10 | Satoshi Nagao       | 2L11 | 朝倉克夫              | P002 |
| Hideyuki Okano         | 2L7  | Shigenori Nagatomo  | 2L11 | 朝倉克夫              | P113 |
| Hiroyui Fukui          | 2L12 | Shin Kawano         | 2L11 | 朝倉哲郎              | 3L9  |
| Hiroyuki Koshino       | P046 | Shin-ichi Tate      | 2L6  | 朝倉哲郎              | P064 |
| Hitoshi Maeda          | 2L12 | Shota Ogara         | 2L7  | 朝倉哲郎              | P066 |
| Hitoshi Nakagama       | 2L7  | Shunya Takahashi    | P046 | 朝倉哲郎              | P068 |
| Hitoshi Yoshida        | P102 | Song Yub Shin       | P044 | 浅野敦志              | P072 |
| Hoi Jong Jung          | P044 | Steven O Smith      | 2L13 | 朝山宗彦              | P028 |
| Hong-Yi Tang           | P092 | Steven Reynolds     | P051 | 芦田淳               | P058 |
| Hyo Jeong Kim          | P044 | Steven Reynolds     | P056 | 芦田淳               | P072 |
| Hyun Ho Jung           | P044 | Tai-huang Huang     | P001 | 阿曾幸男              | P085 |
| Hyun Jin Kim           | P044 | Takako Ohyama       | 2L7  | 安達聡一郎             | P008 |
| Ing-jye Jiang          | P001 | Takamasa Abe        | P051 | 安達裕子              | P118 |
| Jae Il Kim             | P044 | Takao Imai          | 2L7  | 足立わかかな            | P023 |
| Jean-Lien Liu          | P092 | Takashi Nagata      | 2L7  | 穴井孝弘              | P113 |
| Jee JunGoo             | 1L1  | Takeshi Tenno       | 2L10 | 天野睦紀              | P041 |
| Jee JunGoo             | P029 | Tatsuya Miyoshi     | 2L7  | 雨宮晶子              | P003 |
| Jee JunGoo             | P031 | Teppei Ikeya        | P102 | 荒木弘之              | P033 |
| Jee JunGoo             | P035 | Tomomi Sakai        | 2L10 | 荒樋周               | P074 |
| Jeff Kershaw           | P095 | Toshiaki Tanaka     | 2L10 | 有吉眞理子             | P027 |
| Jeff Kershaw           | P099 | Toshimasa Yamazaki  | 2L9  | 有吉眞理子             | P033 |
| Jonathan F. Stebbins   | P080 | Toshimasa Yamazaki  | P016 | 飯島亜季              | P098 |
| Jun Kikuchi            | P051 | Tsutomu Terauchi    | P102 | 飯島隆広              | P117 |
|                        |      | V.A. Sidorov        | 3L8  | 飯淵宏昭              | P020 |
|                        |      | Wang Taek Hwang     | P044 | 五十嵐雅之             | P052 |

井倉真由美	P010	丑田公規	P048	小野克輝	P038
池上貴久	P027	内田毅	YP05	小野克輝	YP06
池上貴久	P033	内山進	P122	小野寺謙吾	P100
池永万希子	P064	内海博明	P002	帯田孝之	P010
石井聡	3L8	内海博明	P003	尾身洋典	3L3
石井毅	1L3	内海博明	P007		(か行)
石川 洋土	P061	内海博明	P050	甲斐莊正恒	P001
石川洋土	P060	梅北まや	P052	貝淵弘三	P037
石塚智也	P076	梅沢洋二	P052	貝淵弘三	P041
石森浩一郎	YP05	梅津喜崇	P009	攪上将規	YP12
磯貝信	P027	梅山万左子	P063	笠美由希	P037
出原敏孝	P105	江川文子	P067	片岡雅之	P018
伊藤茂泰	P013	江川文子	P105	加藤悦子	P028
伊藤隆司	P021	遠藤一央	P091	加藤悦子	P035
伊藤ひかり	P069	大石徹	P070	加藤久美子	P075
伊藤浩之	P026	大木進野	P012	加藤晃一	YP04
伊藤隆	1L2	大窪貴洋	P121	加藤こずえ	P038
伊藤隆	P005	大久保忠恭	P043	加藤静恵	P028
伊藤隆	P027	大久保忠恭	P122	加藤祐輔	P011
伊藤隆	P039	大久保知行	P024	金橋康二	P080
伊藤隆	P041	大澤匡範	YP01	印牧知廣	P105
伊藤隆	P098	大隅良典	P019	鎌足雄司	1L6
伊藤(新澤)恭子	YP05	大隅良典	P023	上島達朗	P009
稲垣冬彦	P008	大隅良典	P042	上島達郎	P024
稲垣冬彦	P019	大塚昭弘	YP14	神原孝之	P073
稲垣冬彦	P021	大野博司	YP13	上平美弥	YP07
稲垣冬彦	P023	大野曜吉	P100	神谷昌克	P009
稲垣冬彦	P025	大橋竜太郎	P065	神谷昌克	P011
稲垣冬彦	P026	大橋若奈	P040	神谷昌克	P024
稲垣冬彦	P028	大前英司	P030	神谷昌克	P036
稲垣冬彦	P042	岡崎宏紀	P070	神谷昌克	YP05
稲垣冬彦	P103	岡田 道哉	P108	河合剛太	P020
稲垣冬彦	YP02	岡田道哉	3L11	川口高広	P101
井上裕介	1L3	岡田道哉	P106	川崎健一	P108
井原俊英	P119	岡田道哉	P107	川崎健司	P110
今井真介	P040	岡田道哉	P109	河田陽子	P118
今川佑介	P031	岡田道哉	P110	川西徹	P085
今田愛子	P004	岡田道哉	P112	河野敬一	P009
入江一浩	P065	岡田道哉	P114	河野敬一	P011
岩川精吾	P054	岡地淑夫	P113	河野敬一	P024
岩津宇洸	P032	岡本武	P057	河野敬一	P036
岩間陽子	P093	小川勇	P105	河野敬一	YP05
上釜奈緒子	YP10	荻野孝史	P096	河野慎	P017
植草協子	P100	奥田昌彦	P018	川畑俊一郎	P024
植草義徳	YP07	小椋賢治	P008	河原郁美	P031
上田卓見	P022	小椋賢治	P021	河原一樹	P122
上原宏樹	YP12	小椋賢治	P023	川村出	3L1
上村諭子	P065	小椋賢治	P026	川村出	P069
鷺澤洵	P048	小椋賢治	P028	川村出	YP09
鷺澤洵	P049	小椋賢治	P042	川村出	YP11
鷺澤洵	P052	尾瀬農之	P010	菅野巖	P095

菅野巖	P099	久米田博之	YP02	齋藤剛	P119
菅野新一郎	P027	倉富博康	P033	齊藤輝雄	P105
木川隆則	1L5	黒木重樹	3L6	榊原大介	P098
木川隆則	P032	黒河内政樹	P047	坂田絵理	YP04
木川隆則	P033	黒島寛之	P087	坂本光一	YP05
木川隆則	P045	黒子弘道	P066	坂本泰一	P020
木川隆則	P120	黒津卓三	P072	桜井謙資	P079
菊地淳	3L13	桑田一夫	1L6	櫻井智司	P003
菊地淳	P104	桑原大介	P083	櫻井智司	P007
菊地淳	YP13	月向邦彦	P030	笹川拡明	YP04
菊池有加	P068	小池薫	P100	佐々木敦子	P098
北川功	P112	高曉冬	P047	佐々木千鶴	P075
北口仁	3L11	神田大輔	P010	佐々木千鶴	P077
北口仁	P106	神田大輔	P030	佐治修吾	P118
北口仁	P107	神津知子	P020	佐藤明子	P041
北口仁	P108	高妻孝光	P112	佐藤健次	P042
北口仁	P109	河野憲二	P031	佐藤格夫	P100
北口仁	P110	河野俊之	1L3	佐藤博彦	P068
北口仁	P112	河野俊之	P004	佐藤昌彦	P015
北口仁	P114	河野俊之	P031	佐野哲孝	P100
北原亮	1L4	河野俊之	P014	佐保典英	P108
北原亮	P034	向瓏	1L3	佐保典英	P109
北森武彦	YP08	小柴生造	1L5	佐保典英	P114
貴傳名甲	3L5	児嶋長次郎	1L1	澤竜一	P052
木戸修一	P109	児嶋長次郎	P029	椎野俊之	P108
衣笠晋一	P119	児嶋長次郎	P031	椎野俊之	P109
木下俊文	P099	児嶋長次郎	P035	椎野俊之	P110
木原尚樹	3L1	児嶋長次郎	YP03	椎野俊之	P114
金泰坤	3L15	小島理恵子	P010	重光佳基	1L2
木村敦臣	P118	児玉耕太	1L6	重光佳基	P005
木村悠一	YP13	小橋川敬博	P008	品川麻衣	3L12
木吉司	YP14	小橋川敬博	P019	品川麻衣	P057
木吉司	YP16	小橋川敬博	P103	篠原康郎	P047
吉良敦史	P063	小橋川敬博	YP02	嶋田一夫	P022
楠英樹	P014	小林健二	P050	嶋田一夫	P038
国本浩喜	P075	小林俊達	P035	嶋田一夫	YP01
国本浩喜	P077	小林直宏	1L5	嶋田一夫	YP06
久野敦	P013	小林祐次	P043	島本怜史	P009
窪田健二	1L3	小林祐次	P122	島本怜史	P024
久保田由美子	P049	小山博子	P098	清水禎	3L4
久保田由美子	P052	近藤靖	P099	清水禎	3L8
熊谷圭悟	YP06			清水禎	P066
熊木康裕	P036			清水禎	P089
久米田博之	P008	齊尾智英	P008	清水禎	P091
久米田博之	P019	齊尾智英	P028	清水禎	P084
久米田博之	P021	齊藤和夫	P110	下田景士	P076
久米田博之	P023	齊藤和夫	P108	莊司顯	P073
久米田博之	P025	齋藤公児	3L15	莊司顯	P059
久米田博之	P026	齋藤公児	P071	白川昌宏	P027
久米田博之	P026	齋藤公児	P084	白川昌宏	P032
久米田博之	P028	齋藤貴士	P030	白川昌宏	P033
久米田博之	P042	齋藤貴士	P010		

(さ行)

白川昌宏 P039  
 白川昌宏 P057  
 白水美香子 P045  
 榛葉信久 3L12  
 榛葉信久 P057  
 末永智子 P098  
 末松孝子 P003  
 末松孝子 P050  
 杉浦眞喜子 P053  
 杉浦眞喜子 P054  
 杉木俊彦 YP06  
 杉田圭太郎 P024  
 杉原文徳 P057  
 鈴木榮一郎 3L12  
 鈴木榮一郎 P057  
 鈴木浩一 3L3  
 鈴木晃生 P074  
 鈴木崇生 P100  
 鈴木匡 YP04  
 鈴木悠 P066  
 鈴木陽 P091  
 鈴木龍一郎 P013  
 住吉晃 YP04  
 関宏子 P048  
 関宏子 P049  
 関宏子 P052  
 関口眞二 P103  
 瀬戸治男 P055

(九行)

太虎林 P017  
 大道寺謙吾 P069  
 高久朋之 P021  
 高田省三 P090  
 高野誠 P035  
 高野義彦 3L8  
 高橋清大 P025  
 高橋清大 P026  
 高橋征三 P096  
 高橋栄夫 P038  
 高橋栄夫 YP06  
 高橋大樹 P105  
 高橋雅人 YP14  
 高橋雅人 YP16  
 高橋豊 P007  
 高橋良和 P052  
 高見澤聡 P086  
 高屋展宏 1L7  
 高屋展宏 P094  
 高屋展宏 P097  
 高山眞一 P017  
 竹内一浩 P109

竹内一浩 P114  
 竹内隆 P014  
 武内大隼 P086  
 竹岡裕子 3L5  
 竹腰清乃理 3L10  
 竹腰清乃理 3L8  
 竹腰清乃理 P059  
 竹腰清乃理 P060  
 竹腰清乃理 P061  
 竹腰清乃理 P065  
 竹腰清乃理 P073  
 竹腰清乃理 P076  
 竹腰清乃理 P089  
 竹腰清乃理 P111  
 竹腰清乃理 P117  
 武田和行 YP15  
 武田定 P082  
 武田定 P086  
 武田定 P087  
 武田定 P088  
 武田光広 P001  
 武本映美 YP04  
 多々見文恵 P009  
 多々見文恵 P024  
 辰見明俊 P054  
 楯真一 P004  
 楯真一 P030  
 田仲昭子 P045  
 田中卓 P020  
 田中利幸 P078  
 田中秀樹 P106  
 田中秀樹 P112  
 田中弘之 P108  
 田中弘之 P109  
 田中弘之 P114  
 田中陽一郎 P020  
 田中利好 P004  
 田中良二 P113  
 田辺純子 3L1  
 田畑昌祥 P074  
 丹所正孝 3L4  
 丹所正孝 3L8  
 丹所正孝 P066  
 丹所正孝 P091  
 近山英輔 P104  
 近山英輔 YP13  
 千葉学 P020  
 塚原剛彦 YP08  
 塚本英雄 P109  
 塚本英雄 P114  
 柘植信昭 P040

辻暁 3L1  
 辻暁 YP10  
 土江祐介 P005  
 土屋眞俊 P108  
 土屋眞俊 P109  
 土屋眞俊 P110  
 土屋眞俊 P114  
 手島圭三 P028  
 出村誠 P009  
 出村誠 P011  
 出村誠 P024  
 出村誠 P036  
 出村誠 YP05  
 寺内勉 P001  
 寺沢宏明 YP06  
 寺脇慎一 P041  
 土井正光 P122  
 戸田政明 P003  
 柘尾尚哉 1L5  
 柘尾尚哉 P032  
 柘尾尚哉 P033  
 柘尾豪人 P027  
 柘尾豪人 P032  
 柘尾豪人 P033  
 都出千里 P053  
 都出千里 P054  
 土肥浩二 P012  
 富沢忠 1L5  
 豊永翔 YP01

(な行)

内藤晶 3L1  
 内藤晶 P063  
 内藤晶 P069  
 内藤晶 YP09  
 内藤晶 YP11  
 内藤雅人 YP02  
 永井義崇 P039  
 永尾隆 YP11  
 中込秀樹 YP16  
 中込秀樹 YP16  
 中沢隆 P122  
 中澤靖元 P068  
 中田善三郎 P032  
 中谷英一 P116  
 長土居有隆 P015  
 長土居有隆 P018  
 中戸川仁 P019  
 中戸川仁 P023  
 長友重紀 P017  
 中西梓 P065  
 中西梓 P073

中西裕美子	YP13	花田賢太郎	YP06	富士原和也	P020
中村安里	P040	馬場崇行	P048	藤原敏道	P067
中村和浩	P099	濱田衛	YP14	藤原敏道	P105
中村健一郎	P001	濱田衛	YP16	藤原敏道	P116
中村浩蔵	YP07	浜津順平	P098	藤原英明	P118
中村春木	P116	早川由夫	P078	藤原康博	P077
中村英章	P083	林こころ	YP03	降旗一夫	P055
中村寛則	1L6	林繁信	3L3	古板恭子	P029
中村文彦	P101	林宣宏	P098	古川貴章	P004
中村泰規	P088	林文昌	P045	古川貴章	P030
中村義一	P020	林文晶	P040	古田弘幸	P076
中山勉	YP07	早野陽介	1L6	逸見光	P013
成田亮	P025	早水紀久子	P090	北條江里	P011
西義則	P122	原田幸祐	YP02	細田和男	1L3
西内祐二	P122	原野陽子	P116	細野政美	YP14
西ヶ谷有輝	P035	樋岡克哉	P111	細野政美	YP16
西島正弘	YP06	比能洋	P047	保母史郎	YP14
西田教行	1L6	火原彰秀	YP08	保母史郎	YP16
西田雅一	P078	平井玲子	P025	堀俊祐	P072
西堀達哉	P025	平尾武士	YP04	堀浩	P049
西村勝之	3L2	平冲敏文	P071	堀池則子	3L14
西村勝之	YP09	平冲敏文	P074	堀口紅実子	P064
西村勝之	YP10	平賀隆	P090		(ま行)
西村紳一郎	P047	平川慶子	P100	前崎綾子	P037
西村善文	P015	平林淳	P013	前田史郎	P075
西村善文	P018	平山隆志	3L13	前田史郎	P077
西村美郎	P078	廣明秀一	P032	前田史郎	P079
根来誠	YP15	広瀬進	P039	前田秀明	P045
根本貴宏	P084	廣田洋	P040	前田秀明	YP14
根本暢明	P006	廣田洋	P045	前田秀明	YP16
根本暢明	P122	深澤隼	P059	前仲勝実	P010
野口貴弘	YP09	深田はるみ	P029	前野覚大	P034
野田展生	P019	深田正紀	P037	眞岡孝至	P053
野田展生	P023	福崎智数	YP14	牧晃司	P109
野田展生	P042	福田真嗣	YP13	牧晃司	P114
野津浩平	P070	福田 祐三	P110	正村典也	P040
野村祐介	P020	福田祐三	P108	増田裕一	P065
野本直子	P022	福地 将志	P060	増野智彦	P100
	(は行)	福地 将志	P061	松下隆彦	P047
萩原修哉	P108	福地将志	P076	松本篤幸	P043
萩原祥子	P093	福永淳一	P020	松本友治	1L6
朴ミンソク	P107	藤江正樹	P071	松森信明	P070
箱嶋敏雄	P031	藤岡耕治	P111	丸田 吾朗	P088
箱嶋敏雄	P037	藤岡優子	P019	丸田悟朗	P082
箱嶋敏雄	P041	藤岡優子	P023	丸田悟朗	P086
橋本康博	3L14	藤岡優子	P042	丸田悟朗	P087
長谷川典巳	P013	藤田尚志	P025	馬渡康輝	P074
長谷川学	P106	藤田英樹	P069	三浦修一	P099
秦信宏	P090	藤谷直樹	P047	三浦純	P035
畠山盛明	P071	藤本侑子	P079	三島大輔	YP11
服部峰之	P090	藤森裕基	P093	三島正規	1L2

三島正規	P029	山口行治	P096	渡邊英宏	1L7
三島正規	P035	山口芳樹	YP04	渡邊英宏	P094
三島正規	P037	山口佳洋	P021	渡邊英宏	P097
三島正規	P039	山腰良晃	P113	渡部正博	P019
三島正規	P041	山崎和彦	P045		
三島正規	P098	山崎悟	3L14		
水口峰之	P024	山崎千春	P113		
水口峰之	P036	山崎俊夫	P045		
水島昇	P042	山崎俊夫	YP16		
水野敬	P073	山崎俊正	P035		
水野敬	P111	山路俊樹	P089		
水野元博	P091	山田哲也	P082		
光藤誠太郎	P105	山根衣寿美	P069		
三森文行	1L7	山延健	YP12		
三森文行	P094	山本清	3L4		
三森文行	P097	山本典孝	P090		
宮沢光博	P011	山本博	P043		
明賀博樹	YP09	山本浩之	P108		
三好利一	3L7	山本浩之	P110		
関庚薫	3L4	山本泰彦	P017		
武藤(細川)淳二	1L6	山本保博	P100		
武藤裕	P045	雪真弘	3L13		
村上美和	3L4	横川真梨子	YP01		
村上美和	3L8	横地政志	P019		
村上美和	P089	横地政志	P028		
村上美和	P091	横地政志	P103		
村田紘子	P043	横山茂之	1L5		
村田道雄	P070	横山茂之	P032		
最上 祐貴	P060	横山茂之	P033		
最上祐貴	P061	横山茂之	P034		
持田勲	3L15	横山茂之	P045		
持田智行	P083	吉岡澄江	P085		
元岡大祐	P122	吉川信也	YP05		
森哲哉	3L13	吉澤良隆	P038		
森正之	P012	吉田卓也	P043		
森園大輔	P007	吉田卓也	P122		
守屋繁春	3L13	好田真由美	P045		
	(や行)	好田真由美	P120		
八木澤仁	YP10	吉田良輔	P026		
山崎俊夫	YP14	吉益雅俊	P098		
矢澤道生	P026	米山操	P095		
安井明	P027	米山光俊	P025		
柳澤吉紀	YP14				
柳澤吉紀	YP16	(わ行)			
山内一夫	3L9	若井篤志	P099		
山内一夫	P064	若林秀彦	P057		
山内一夫	P066	若松馨	1L3		
山口恵理香	P068	和久田毅	P109		
山口秀幸	3L12	和久田毅	P114		
山口秀幸	P057	鷺谷隆太	P088		
山口真	P121	和田昭盛	3L1		
		渡辺崇	P037		

氏名	勤務先 住所	E-Mail
Dong-Kyun Kang	Life Science Gwangju Institute of Science and Technology 〒500-712 1 Oryoung-dong, Buk-gu Gwangju Gwangju Korea	
Hyo Jeong Kim	Life Science Gwangju Institute of Science and Technology 〒500-712 1 Oryoung-dong, Buk-gu Gwangju Gwangju Korea	
Hyun Ho Jung	Life Science Gwangju Institute of Science and Technology 〒500-712 1 Oryoung-dong, Buk-gu Gwangju Gwangju Korea	
Hyun Jin Kim	Life Science Gwangju Institute of Science and Technology 〒500-712 1 Oryoung-dong, Buk-gu Gwangju Gwangju Korea	
Jae Il Kim	Life Science Gwangju Institute of Science and Technology 〒500-712 1 Oryoung-dong, Buk-gu Gwangju Gwangju Korea	
Liao Ming-Yuan	National Chung-Hsing University Department of Chemistry 〒402-27 250, Kuo-Kuang Rd Taichung Taiwan	
Malon Michal	RIKEN Molecular Characterization Team 〒351-0198 2-1 Hirosawa Wako-shi Saitama Japan	
Reynolds Steven	Oxford Instruments Molecular Biotoools Molecular Biotoools 〒13-5 Tubney Woods, Tubney Woods, Abingdon, Oxfordshire, UK	
Song Yub Shin	Chosun University Department of Cellular and Molecular Medicine 〒501-759 Seosuk-dong, Dong-gu Gwangju Gwangju Korea	
Wang Taek Hwang	Life Science Gwangju Institute of Science and Technology 〒500-712 1 Oryoung-dong, Buk-gu Gwangju Gwangju Korea	
相沢 智康	北海道大学 大学院先端生命科学研究院 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	aizawa@mail.sci.hokudai.ac.jp
阿久津 秀雄	大阪大学 蛋白質研究所 〒565-0874 吹田市古江台6-2-3大阪大学バイオ関連多目的の研究施設	akutsu@protein.osaka-u.ac.jp
朝倉 克夫	日本電子株式会社 分析機器本部 応用研究グループ 〒196-8558 昭島市武蔵野3-1-2	kasakura@jeol.co.jp
朝倉 哲郎	東京農工大学 大学院共生科学研究院 〒184-8588 小金井市中町2-24-16	asakura@cc.tuat.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
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	asanoa@nda.ac.jp
芦田 淳	バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド 科学機器本部応用部NMRグループ 〒108-0023 港区芝浦4-16-36住友芝浦ビル	jun.ashida@varianinc.com
阿曾 幸男	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 〒158-8501 世田谷区上用賀1-18-1	aso@nihs.go.jp
安達 清治	大阪大学 理学研究科 〒562-0031 箕面市小野原東6丁目22番11号	sadachi@chem.sci.osaka-u.ac.jp
阿部 孝政	オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社 MRI/NMR事業本部 〒135-0047 江東区富岡2-11-6長谷萬ビル	takamasa.abe@oxinst.co.jp
雨宮 晶子	大日本インキ化学工業(株) 分析センター 〒592-0001 高石市高砂1-3	akiko-amemiya@mb.dic.co.jp
荒田 洋治	〒162-0805 東京都新宿区矢来町9番地	arata@blue.ocn.ne.jp
荒樋 周	北海道大学 大学院工学研究科 〒001-0020 札幌市北区北20条西8丁目2-10-106	s_arahi3@hotmail.com
安藤 勲	東京工業大学 名誉教授 〒247-0052 鎌倉市今泉2-19-3	Solidnmr@aol.com
飯島 隆広	分子科学研究所 物質分子科学研究領域 〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷38	ijjima@ims.ac.jp
飯原 亜希子	株式会社 三菱化学科学技術研究センター R&D部門 バイオ技術研究所 〒227-8502 横浜市青葉区鴨志田町1000番地	6308790@cc.m-kagaku.co.jp
池上 貴久	大阪大学 蛋白質研究所 構造プロテオミクス 〒565-0871 吹田市山田丘3-2	tiik@protein.osaka-u.ac.jp
池谷 鉄兵	首都大学東京 大学院理工学研究科 〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1広場B高磁場NMR施設	tikeya@nmr.chem.metro-u.ac.jp
石川 洋土	京都大学 大学院理学研究科化学専攻分子構造化学研究室 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	ishikawa-h@kuchem.kyoto-u.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
磯貝 信	京都大学 大学院工学研究科 〒615-8510 京都市西京区京都大学桂A4-134	isogai@a01.mbox.media.kyoto-u.ac.jp
伊藤 隆	首都大学東京 大学院理工学研究科 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	ito-yutaka@center.tmu.ac.jp
稲垣 冬彦	北海道大学 大学院薬学研究院 〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目	finagaki@pharm.hokudai.ac.jp
猪原 武男	小野薬品工業(株) 医薬品化学研究所構造解析室 〒618-8585 三島郡島本町桜井3-1-1	inohara@ono.co.jp
今田 愛子	広島大学 大学院理学研究科 〒739-0144 東広島市八本松南2-7-2	aiko-imada@hiroshima-u.ac.jp
岩瀬 由紀子	福岡大学 薬学部 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1	wase@fukuoka-u.ac.jp
岩津 宇洸	京都大学 大学院工学研究科分子工学専攻 〒610-1103 京都市西京区京都大学桂	iwazutakahiro@t02.mbox.media.kyoto-u.ac.jp
岩本 成人	熊本大学 薬学部薬科学科構造機能物理化学 〒862-0973 熊本県熊本市大江本町5番1号	iwamoto@structbiol.com
上釜 奈緒子	自然科学研究機構 分子科学研究所 物質分子科学研究領域 分子機能研究部門 〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中38番地	uekama@ims.ac.jp
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 つくば市二の宮3-21-5	
植草 義徳	静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科食品機能学研究室 〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1	p7301@mail.f.u-shizuoka-ken.ac.jp
上松 照幸	株式会社巴商会 開発部特殊ガス課 〒144-8505 大田区南蒲田1-1-25	uematsu@tomoeshokai.co.jp
鷓澤 洵	理化学研究所 環境ソフトマテリアル研究ユニット 〒351-198 和光市広沢2-1	juzawa@riken.jp
内田 健一	帝京大学 理工学部 バイオサイエンス学科 〒320-8551 宇都宮市豊郷台1-1	kuchida@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
内海 博明	日本電子株式会社 分析機器本部応用研究グループ 〒196-8558 昭島市武蔵野3-1-2	utumi@jeol.co.jp
梅津 喜崇	北海道大学 大学院理学院 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	umetsu@sci.hokudai.ac.jp
梅山 万左子	横浜国立大学 大学院工学府 〒245-0064 横浜市戸塚区影取町38-39	d05sa201@ynu.ac.jp
江川 文子	大阪大学 蛋白質研究所 〒565-0871 吹田市山田丘3-2	e-ayako@protein.osaka-u.ac.jp
江崎 芳	熊本大学 大学院薬学教育部 〒862-0970 熊本市渡鹿1丁目16-3-46	kaori@structbiol.com
江奈 英里	エーザイ株式会社 分析研究所 〒300-2635 つくば市東光台5-1-3	e-ena@hhc.eisai.co.jp
江奈 武一郎	(株)住化分析センター 組成解析グループ 〒300-3266 つくば市北原6番住友化学株式会社筑波研究所内	ena@scas.co.jp
大木 進野	北陸先端科学技術大学院大学 ナノマテリアルテクノロジーセンター 〒923-1292 能美市旭台1-1	shinya-o@jaist.ac.jp
大窪 貴洋	日本原子力研究開発機構 地層処分研究開発部門 〒319-1112 那珂郡東海村村松33682-2箕輪寮E-12	ohkubo.takahiro@jaea.go.jp
大島(坂本) 曜子	東邦大学 薬学部 NMR 〒274-8510 船橋市三山2-2-1	sakamoto@phar.toho-u.ac.jp
太田 将信	田辺製薬株式会社 医薬化学研究所 〒532-8505 大阪市淀川区加島3丁目16-99	ohta-m@tanabe.co.jp
大野 靖	日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 〒569-1125 高槻市紫町1-1	yasushi.ono@ims.jti.co.jp
大橋 若奈	理化学研究所 GSC 〒230-0045 横浜市鶴見区未広町1-7-22	wohashi@gsc.riken.jp
大原 智輝	京都大学 大学院理学研究科化学専攻分子構造化学研究室 〒573-0013 枚方市星丘4-22-1-201	ohrtmk@kuchem.kyoto-u.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
岡崎 宏紀	大阪大学 大学院理学研究科 〒560-0021 豊中市本町4丁目9-5エクレール豊中205号	hiroki@ch.wani.osaka-u.ac.jp
岡田 道哉	(株)日立製作所 日立研究所NMR研究プロジェクト 〒319-1292 日立市大みか町7-1-1	michiya.okada.qr@hitachi.com
荻野 孝史	国立精神・神経センター 神経研究所 〒187-8502 小平市小川東町4-1-1	ogino@ncnp.go.jp
小椋 賢治	北海道大学 大学院薬学研究院構造生物学研究室 〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目	ogura@pharm.hokudai.ac.jp
小野 克輝	JBIC 生物情報解析研究センター 〒135-0064 江東区青海2-41-6	kono@jbirc.aist.go.jp
甲斐荘 正恒	名古屋大学 大学院理学研究科構造生物学センター 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	kainosho@nmr.chem.metro-u.ac.jp
垣田 信吾	協和発酵工業株式会社 バイオフロンティア研究所 〒194-8533 町田市旭町3-6-6	skakita@kyowa.co.jp
片岡 雅之	横浜市立大学 大学院国際総合科学研究科 〒230-0017 横浜市鶴見区東寺尾中台31-20プチメゾンAOKI202号室	fanta@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
片平 正人	横浜市立大学 大学院国際総合科学研究科 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29	katahira@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
加藤 久美子	福井大学 生物応用化学専攻 〒919-0449 坂井市春江町中筋39-28-3	katou@acbio2.acbio.fukui-u.ac.jp
加藤 賢一	ブルカー・バイオスピン株式会社 マーケティング部 〒305-0051 つくば市二の宮3-21-5	
加藤 晃一	名古屋市立大学 大学院薬学研究科 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1	kkato@phar.nagoya-cu.ac.jp
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	kador@cc.kyoto-su.ac.jp
金橋 康二	新日本製鐵(株) 先端技術研究所 〒293-8511 富津市新富20-1	kojikane@xj9.so-net.ne.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
鎌足 雄司	岐阜大学 人獣感染防御研究センター 〒501-1194 岐阜市柳戸1-1	kamatari@gifu-u.ac.jp
神原 孝之	京都大学 大学院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	god@kuchem.kyoto-u.ac.jp
神谷 昌克	北海道大学 大学院生命科学院 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	mkamiya@sci.hokudai.ac.jp
川口 哲朗	ブルカー・バイオスピン株式会社 技術サービス部 〒305-0051 つくば市二の宮3-21-5	
川崎 健司	株式会社日立製作所 日立研究所 〒319-1292 日立市大みか町7丁目1番1号	kenji.kawasaki.pz@hitachi.com
川島 裕之	産業技術総合研究所 エネルギー技術研究部門新燃料グループ 〒305-8569 つくば市小野川16-1	h.kawashima@aist.go.jp
河原 一樹	大阪大学 大学院薬学研究科 〒565-0871 吹田市山田丘1番6号	kkkazuki@phs.osaka-u.ac.jp
川村 出	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大学院工学研究棟102室	izuruk@ynu.ac.jp
木川 隆則	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	kigawa@jota.gsc.riken.jp
菊地 淳	理化学研究所 植物科学研究センター 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	kikuchi@psc.riken.jp
菊地 淳	理化学研究所 植物科学研究センター 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	kikuchi@psc.riken.jp
北川 功	(株)日立製作所 基礎研究所 NM部 N08ユニット 〒185-8601 国分寺市東恋ヶ窪1-280	isao.kitagawa.zd@hitachi.com
北原 亮	理化学研究所 SPring-8センター 城生体金属科学研究室 〒679-5148 佐用郡佐用町光都1-1-1	kitahara@spring8.or.jp
貴傳名 甲	産業技術総合研究所 固体高分子形燃料電池先端基盤研究センター 〒135-0064 江東区青海2-41-6臨海副都心センター2階	k-kidena@aist.go.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
木村 由美子	日本大学 薬学部 〒274-8555 船橋市習志野台7-7-1	kimura@pha.nihon-u.ac.jp
楠 英樹	(株)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 町田市南大谷11	kusunoki@mitils.jp
国本 浩喜	金沢大学 大学院自然科学研究科 〒920-1154 金沢市角間町	kunimoto@sgkit.ge.kanazawa-u.ac.jp
久保田 由美子	財団法人 微生物化学研究会 分子構造検討グループ 〒141-0021 品川区上大崎3-14-23	kubotay@bikaken.or.jp
熊木 康裕	北海道大学 大学院理学研究院 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	kumaki@sci.hokudai.ac.jp
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丁目次世代ポストゲノム研究センター	kumeta@pharm.hokudai.ac.jp
倉富 博康	京都大学 大学院工学研究科 〒615-8510 京都市西京区京都大学桂A4-136	h-kuratomi@t02.mbox.media.kyoto-u.ac.jp
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 〒191-0065 日野市旭が丘1-7-23	junichi.kurita@varianinc.com
黒木 重樹	東京工業大学 大学院理工学研究科物質科学専攻 〒152-8552 目黒区大岡山2-12-1-S1-20	skuroki@polymer.titech.ac.jp
黒島 寛之	北海道大学 大学院理学院化学専攻 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目大学院理学院	slowcurve@mail.sci.hokudai.ac.jp
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 つくば市二の宮3-21-5	
黒津 卓三	防衛大学校 応用化学科 〒239-8686 横須賀市走水1-10-20	kurotu@nda.ac.jp
桑田 一夫	岐阜大学 人獣感染防御研究センター 〒501-1194 岐阜市柳戸1-1	kuwata@gifu-u.ac.jp
神田 大輔	九州大学 生体防御医学研究所 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1	kohda@bioreg.kyushu-u.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
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 町田市南大谷11号	tkohno@mitils.jp
向 隴	群馬大学 大学院工学研究科 〒376-8515 桐生市天神町1-5-1四号館4201室	xlong@mpx.bce.gunma-u.ac.jp
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	kojima@bs.naist.jp
小橋川 敬博	北海道大学 大学院薬学研究院 〒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2階	kob@sci.hokudai.ac.jp
小林 直宏	理化学研究所横浜研究所 タンパク質基盤研究グループ 〒230-0045 横浜市鶴見区未広町1-7-22	naohiro@gsc.riken.go.jp
小湊 健太郎	Japan Superconductor Technology Inc. マグネット部 〒651-2271 神戸市西区高塚台1-5-5神戸製鋼総合研究所内	kominato-jastec@kobelco.jp
斉尾 智英	北海道大学 生命科学院 〒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1FNMR測定室	saio@mail.sci.hokudai.ac.jp
齋藤 公児	新日本製鐵(株) 先端技術研究所 〒293-8511 富津市新富20-1	saito.koji@nsc.co.jp
齊藤 貴士	九州大学 生体防御医学研究所ワクチン開発構造生物学分野 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1	saitoh@bioreg.kyushu-u.ac.jp
齋藤 剛	(独)産業技術総合研究所 計測標準研究部門 〒305-8565 つくば市東1-1-1中央第5	takeshi.saito@aist.go.jp
榊原 大介	首都大学東京大学院 理工学研究科 分子物質化学専攻 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	sakakibara-daisuke@ed.tmu.ac.jp
坂本 光一	北海道大学 大学院理学院化学専攻 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目北海道大学理学部7号館7-1-03	koichi@sci.hokudai.ac.jp
坂本 泰一	千葉工業大学 工学部生命環境科学科 〒275-0016 習志野市津田沼2-17-1	tsakamoto@sky.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 八王子市堀之内1432-1	

氏名	勤務先 住所	E-Mail
櫻井 愛子	(株)三菱化学科学技術研究センター 四日市分析センター 有機分析グループ 〒510-8530 四日市市東邦町1番地	sakurai.aiko@mp.m-kagaku.co.jp
櫻井 智司	日本電子株式会社 分析機器本部応用研究グループ 〒196-8558 昭島市武蔵野3-1-2	sasakura@jeol.co.jp
佐々木 敦子	首都大学東京大学院 理工学研究科 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	sasaki-atuko@ed.tmu.ac.jp
佐治 修吾	大阪大学 大学院医学系研究科 〒599-8238 堺市中区土師町3丁26-32	babolatyonex@yahoo.co.jp
佐藤 明子	首都大学東京 理工学研究科 〒202-0005 西東京市住吉町1-6-3	sato-akiko1@ed.tmu.ac.jp
佐藤 健次	北海道大学 大学院生命科学院 〒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センター2F構造生物学研究室	satoo@mail.sci.hokudai.ac.jp
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 つくば市二の宮2-21-5	
佐藤 博彦	日産化学工業株式会社 物質科学研究所物質解析研究部 〒274-8507 船橋市坪井町722-1	satouh@nissanchem.co.jp
佐藤 昌彦	横浜市立大学 大学院国際総合科学研究科 〒230-0048 横浜市鶴見区本町通4-169-9モナート青野101号室	satoum71@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
沢辺 紀子	東京理科大学 薬学部 〒278-8510 野田市山崎2641	sawabe@rs.noda.tus.ac.jp
澤 竜一	財団法人 微生物化学研究会 分子構造検討グループ 〒141-0021 品川区上大崎3-14-23	rsawa@bikaken.or.jp
椎野 俊之	日立製作所 日立研究所 NMR研究プロジェクト 〒319-1292 日立市大みか町7-1-1(社内郵便番#335)	toshiyuki.shiino.zd@hitachi.com
重光 佳基	首都大学東京 大学院理工学研究科 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	sigemitsu-yosiki@ed.tmu.ac.jp
嶋田 一夫	東京大学 大学院薬学系研究科 〒113-0033 文京区本郷7-3-1	shimada@iw-nmr.f.u-tokyo.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
島田 裕康	持田製薬(株) 創薬研究所 基盤技術室 〒412-8524 御殿場市神場字上ノ原722	hshimada@mochida.co.jp
清水 弘樹	産業技術総合研究所 北海道センター 創薬シーズ探索研究ラボ 〒062-8517 札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1G1棟	hiroki.shimizu@aist.go.jp
下田 景士	新日本製鐵 先端技術研究所 〒293-8511 富津市新富20-1	shimoda.keiji@nsc.co.jp
白川 昌宏	京都大学 大学院工学研究科 〒615-8510 京都市西京区京都大学桂A4-136	shirakawa@moleng.kyoto-u.ac.jp
神藤 平三郎	農業生物資源研究所 タンパク質機能研 〒305-8602 つくば市観音台2-1-2	shindo2@affrc.go.jp
榛葉 信久	味の素(株) ライフサイエンス研究所 〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町1-1	nobuhisa_shimba@ajinomoto.com
末松 孝子	日本電子株式会社 分析機器本部 応用研究グループ 〒196-8558 昭島市武蔵野3-1-2	tfujimot@jeol.co.jp
菅瀬 謙治	財団法人サントリー生物有機科学研究所 第1研究部 〒618-8503 三島郡島本町若山台1-1-1	sugase@sunbor.or.jp
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	makiko-s@kobepharma-u.ac.jp
杉木 俊彦	社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 生物情報解析研究センター 〒135-0064 江東区青海2-41-6産総研臨海副都心センター内	tsugiki@jbirc.aist.go.jp
鈴木 榮一郎	味の素株式会社 ライフサイエンス研究所 〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町1-1	eiichiro_suzuki@ajinomoto.com
鈴木 浩一	ソニー株式会社 エナジー事業本部 開発部門 第3開発部 材料解析室 〒963-0534 郡山市日和田町高倉字下杉下1-1	KoichiA.Suzuki@jp.sony.com
鈴木 悠	東京農工大学 工学府生命工学専攻 〒184-8588 小金井市中町2-24-16	50005831701@st.tuat.ac.jp
鈴木 陽	金沢大学 大学院自然科学研究科 〒920-0923 金沢市桜町15-34ドエル風見鶏202	yoh-suzu@wiron1.s.kanazawa-u.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
鈴木 倫太郎	農業生物資源研究所 タンパク質機能研究ユニット 〒305-8602 つくば市観音台2-1-2	rsuzuki@nias.affrc.go.jp
住吉 晃	名古屋市立大学 大学院薬学研究科 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1	p012024@phar.nagoya-cu.ac.jp
藺田 晃弘	熊本大学 薬学部薬科学科構造機能物理化学 〒862-0973 熊本市大江本町5-1	sonoda@structbiol.com
太 虎林	筑波大学 数理物質科学研究科 〒305-0006 つくば市天王台2-1-の矢21-434	taihulin@dmb.chem.tsukuba.ac.jp
高井 茂樹	田辺製薬株式会社 医薬化学研究所 〒335-8505 戸田市川岸2-2-50	shigeki@tanabe.co.jp
高久 朋之	北海道大学 生命科学院 〒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センター	vanhalen_t@yahoo.co.jp
高橋 清大	北海道大学 大学院薬学院 〒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2階構造生物学研究室	kiyohiro@pharm.hokudai.ac.jp
高橋 征三	日本女子大学 理学部物質生物科学科 〒112-8687 文京区目白台2-1-1	t_seizo@fc.jwu.ac.jp
高橋 栄夫	産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター 〒135-0064 江東区青海2-41-6	hid@jbirc.aist.go.jp
高橋 大樹	大阪大学 蛋白質研究所 〒565-0871 吹田市山田丘3-2	daiki@protein.osaka-u.ac.jp
高橋 雅人	理化学研究所 タンパク質基盤研究グループ 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22C110	masatot@gsc.riken.go.jp
高橋 豊	日本電子株式会社 開発本部2グループ 〒196-8558 昭島市武蔵野3-1-2	tyutaka@jeol.co.jp
高屋 展宏	国立環境研究所 化学環境研究領域 〒305-8506 つくば市小野川16-2	takaya.nobuhiro@nies.go.jp
滝沢 剛	第一三共株式会社 創薬基盤研究所 〒140-8710 品川区広町1-2-58	takizawa.takeshi.xf@daiichisankyo.co.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
武内 大隼	北海道大学院 理学院化学専攻 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	Hirotooshi.Takeuchi@mc6.sings.jp
竹腰 清乃理	京都大学 大学院理学研究科化学 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	takeyan@kuchem.kyoto-u.ac.jp
武田 光広	名古屋大学 大学院理学系研究科 〒464-8602 名古屋市千種区不老町	takeda@nmr.chem.metro-u.ac.jp
楯 真一	広島大学 大学院理学研究科・数理分子生命理学専攻 〒739-8526 東広島市鏡山1-3-1	tate@hiroshima-u.ac.jp
田中 秀樹	(株)日立製作所 日立研究所 NMR研究プロジェクト 〒319-1292 日立市大みか町7-1-1	hideki.tanaka.cj@hitachi.com
田中 彬嗣	九州大学 大学院薬学府 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1	y.tanaka@adm.phar.kyushu-u.ac.jp
谷口 雅浩	熊本大学 薬学部薬科学科構造機能物理化学 〒862-0973 熊本市大江本町5-1	taniguchi@structbiol.com
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 〒305-0051 つくば市二の宮3-21-5	
丹所 正孝	(独)物質・材料研究機構 ナノ計測センター 〒305-0003 つくば市桜3-13	TANSHO.Masataka@nims.go.jp
近山 英輔	理化学研究所 植物科学研究センター 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22	chika@psc.riken.jp
趙 欣	大阪大学 蛋白質研究所 〒565-0871 吹田市山田丘3-2	xin.zhao@protein.osaka-u.ac.jp
塚原 剛彦	東京大学 大学院工学系研究科 〒113-8656 文京区本郷7-3-1	ptsuka@icl.t.u-tokyo.ac.jp
土屋 貢俊	日立製作所日立研究所 NMR研究プロジェクト 〒319-1292 日立市大みか町7-1-1	mitsuyoshi.tsuchiya.dh@hitachi.com
津野 慎治	富士フイルム 解析技術センター富士宮 〒418-8666 富士宮市大中里200	shinji_tsuno@fujifilm.co.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
出村 誠	北海道大学 大学院先端生命科学研究院 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	demura@sci.hokudai.ac.jp
寺尾 武彦	京都大学 大学院理学研究科 〒606-8317 京都市左京区吉田本町12	terao@beige.plala.or.jp
寺沢 宏明	熊本大学 大学院医学薬学研究部 〒862-0973 熊本市大江本町5-1	terasawa@gpo.kumamoto-u.ac.jp
戸井田 敏彦	千葉大学 大学院薬学研究院 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33	toida@p.chiba-u.ac.jp
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 つくば市二の宮3-21-5	
栢尾 豪人	京都大学 大学院工学研究科 〒615-8510 京都市西京区京都大学桂	tochio@moleng.kyoto-u.ac.jp
都出 千里	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	c-tode@kobepharma-u.ac.jp
豊永 翔	東京大学 大学院薬学系研究科 〒113-0033 文京区本郷7-3-1	toyonaga@nmrlab.f.u-tokyo.ac.jp
内藤 晶	横浜国立大学 大学院工学研究院 〒135-0044 江東区越中島1-3、17-605	naito@ynu.ac.jp
永井 義崇	首都大学東京 理工学研究科 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	nagai-yoshitaka@ed.tmu.ac.jp
中田 國夫	味の素株式会社 ライフサイエンス研究所 〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町1-1	kunio_nakata@ajinomoto.com
中田 直之	アステラス製薬株式会社 代謝研究所 〒174-8511 板橋区小豆沢1-1-8	naoyuki.nakada@jp.astellas.com
中谷 英一	大阪大学蛋白質研究所 蛋白質機能構造研究室 〒565-0871 吹田市山田丘3番2号	n-eiichi@protein.osaka-u.ac.jp
中西 梓	京都大学 大学院理学研究科 〒605-0066 京都市東山区古門前通石橋町309マシヤンプル佐々木203	nakanishi@kuchem.kyoto-u.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
中西 裕美子	横浜市立大学大学院 国際総合科学研究科 〒230-0041 横浜市鶴見区潮田町3-143-6-203	yumi-n9@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
中野 路子	自然科学研究機構 分子科学研究科 〒444-8787 岡崎市明大寺町字東山5-1	michiko@ims.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 秋田市千秋久保田町6-10	knam@akita-noken.go.jp
中村 英章	電気通信大学 大学院量子・物質工学専攻 〒211-0025 川崎市中原区木月3-10-28-21	nakamura@x-ray.cia.uec.ac.jp
中村 文彦	花王株式会社 解析科学研究所 〒640-8580 和歌山市湊1334	nakamura.fumihiko@kao.co.jp
中村 泰規	北海道大学 理学研究院 〒060-0081 札幌市北10条西8丁目	2007grad-283@mail.sci.hokudai.ac.jp
西ヶ谷 有輝	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 〒630-0192 奈良県生駒市高山町8916-5	yu-nishi@bs.naist.jp
西川 忠輝	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 つくば市二の宮3-21-5	
西田 雅一	産業技術総合研究所中部センター 計測フロンティア研究部門不均質性解析研究グループ 〒463-8560 名古屋市守山区下志段味穴ヶ洞2266-98	m-nishida@aist.go.jp
西村 勝之	分子科学研究所 物質分子科学研究領域 〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中38番地	nishimur@ims.ac.jp
根来 誠	大阪大学 基礎工学研究科 〒560-8531 豊中市待兼山町1-3	negoro@qc.ee.es.osaka-u.ac.jp
根本 暢明	日本電子(株) 分析機器本部 〒196-3558 昭島市武蔵野3-1-2	nnemoto@jeol.co.jp
野口 貴弘	横浜国立大学 大学院工学府 〒240-0065 横浜市保土ヶ谷区和田1-19-19サカエ・コーポA101	d06ga546@ynu.ac.jp
野田 康夫	関西学院大学 理工学部 〒669-1337 三田市学園2丁目1番地	yasuonoda@kwansei.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
野村 祐介	千葉工業大学 工学部 生命環境科学科 〒275-8588 習志野市津田沼2-17-1	yusuke.nomura@it-chiba.ac.jp
野本 直子	東京大学 大学院薬学系研究科 〒113-0033 文京区本郷7-3-1	nomoto@nmrlab.f.u-tokyo.ac.jp
萩原 祥子	日本大学 大学院総合基礎科学研究科 〒156-8550 世田谷区桜上水3-25-40	shagi@chs.nihon-u.ac.jp
朴 ミンソク	日立製作所 日立研究所 NMR研究プロジェクト 〒319-1292 日立市大みか町7-1-1	minseok.park.yw@hitachi.com
長谷川 憲一	日本電子株式会社 開発本部第3グループ 〒196-8558 昭島市武蔵野3-1-2	hasegawa@jeol.co.jp
畑中 稔	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 つくば市二の宮3-21-5	
服部 峰之	独立行政法人産業技術総合研究所 光技術研究部門 〒101-0041 千代田区神田須田町2-15クレアール神田1102号	mhattori@m.aist.go.jp
林 こころ	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 〒630-0101 奈良県生駒市高山町8916-5	ko-haya@bs.naist.jp
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 つくば市東1-1-1中央第5	hayashi.s@aist.go.jp
早野 陽介	岐阜大学 大学院工学研究科 〒501-1194 柳戸1-1	m3125025@edu.gifu-u.ac.jp
原 英之	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 つくば市二の宮3-21-5	
平沖 敏文	北海道大学 大学院工学研究科応用物理学専攻 〒060-8628 札幌市北区北13西8	hiraoki@eng.hokudai.ac.jp
平川 慶子	日本医科大学 NMR研究施設 〒113-8602 文京区千駄木1-1-5	hirakawa@nms.ac.jp
廣田 洋	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	hirota@gsc.riken.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
深澤 隼	京都大学 大学院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	fukazawa@kuchem.kyoto-u.ac.jp
福井 洋之	北見工業大学 工学部 〒090-8507 北見市公園町165	fukui@gaea.chem.kitami-it.ac.jp
福士 江里	北海道大学 大学院農学研究院 〒060-8589 札幌市北区北9西9	feria@cen.agr.hokudai.ac.jp
福田 健治	大陽日酸株式会社 つくば研究所SI合成研究室 〒300-2611 茨城県つくば市大久保10	Kenji.Fukuda@tn-sanso.co.jp
福田 祐三	日立製作所日立研究所 NMR研究プロジェクト 〒319-1292 日立市大みか町7-1-1	yuzo.fukuda.np@hitachi.com
福地 将志	京都大学 大学院理学研究科 〒567-0805 茨木市橋の内2-7-19-304	muku@kuchem.kyoto-u.ac.jp
藤江 正樹	北海道大学 大学院工学研究科 〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目	m-fujie@eng.hokudai.ac.jp
藤谷 直樹	北海道大学 大学院先端生命科学研究院 〒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センター6F	hujitani@glyco.sci.hokudai.ac.jp
藤本 侑子	福井大学 大学院工学研究科 〒910-8507 福井市文京3-9-1	fujimoto@acbio.fukui-u.ac.jp
藤森 裕基	日本大学 大学院総合基礎科学研究科 〒156-8550 世田谷区桜上水3-25-40	fujimori@chs.nihon-u.ac.jp
藤原 敏道	大阪大学 蛋白質研究所 〒565-0871 吹田市山田丘3-2	tfjwr@protein.osaka-u.ac.jp
藤原 英明	大阪大学 大学院医学系研究科 〒565-0871 吹田市山田丘1-7	fujiwara@sahs.med.osaka-u.ac.jp
藤原 康博	福井大学 大学院工学研究科 〒910-0016 福井市大宮4丁目5-22ポヌール大宮203号室	fujiwara@acbio2.acbio.fukui-u.ac.jp
降旗 一夫	東京大学 大学院農学生命科学研究科 〒113-8654 文京区弥生1-1-1	furihata@iam.u-tokyo.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
古板 恭子	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	k-furuit@bs.naist.jp
古川 貴章	広島大学 大学院理学研究科数理分子生命理学専攻 〒739-8526 東広島市鏡山1-3-1	ub034106@hi.enjoy.ne.jp
古田 浩祐	キョーリン製薬(株)創薬研究所 研究管理部 研究管理課 〒329-0114 下都賀郡野木町野木2399-1	hirosuke.furuta@mb.kyorin-pharm.co.jp
ベルヒリ マーカス	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	
逸見 光	(独)農研機構 食品総合研究所 状態分析ユニット 〒305-8642 つくば市観音台2-1-12	hemmi@affrc.go.jp
北條 江里	北海道大学 大学院理学院 〒060-0810 札幌市北区北10西8	hojo@sci.hokudai.ac.jp
堀井 文敬	京都大学 化学研究所 〒611-0011 宇治市五ヶ庄	horii@scl.kyoto-u.ac.jp
堀口 紅実子	東京農工大学 工学府 〒184-8588 小金井市中町2-24-16	50007641127@st.tuat.ac.jp
堀 俊祐	防衛大学校 理工学研究科 〒239-0811 横須賀市走水1-10-20研究科学生舎1-404-A	g46031@nda.ac.jp
前田 史郎	福井大学 大学院工学研究科生物応用化学専攻 〒910-8507 福井市文京3-9-1	maeda@acbio.fukui-u.ac.jp
前野 寛大	近畿大学 生物理工学研究科 〒649-6433 紀の川市西三谷930	bd6004ma@waka.kindai.ac.jp
松田 翔	財団法人 野口研究所 糖質基礎化学研究室 〒173-0003 板橋区加賀1-8-1	s.matsuda@noguchi.or.jp
松原 康史	三菱化学科学技術研究センター 横浜分析センター有機分析グループ 〒227-8502 横浜市青葉区鴨志田町1000	3709437@cc.m-kagaku.co.jp
松本 一史	京都大学 理学部 〒337-0053 さいたま市見沼区大和田町2-300	moonshine-expectation@nifty.com

氏名	勤務先 住所	E-Mail
松本 篤幸	大阪大学 大学院薬学研究科 〒565-0871 吹田市山田丘1番6号	shige@phs.osaka-u.ac.jp
松森 信明	大阪大学 大学院理学研究科 〒560-0043 豊中市待兼山町1-1	matumori@ch.wani.osaka-u.ac.jp
丸山 渉	RECマテリアルズ(株) 営業部 〒221-0061 横浜市神奈川区七島町17	w-maruyama-y@m7.dion.ne.jp
三木 孝史	(株)神戸製鋼所 電子技術研究所 〒651-2271 神戸市西区高塚台1-5-5	ta-miki@kobelco.jp
三島 大輔	横浜国立大学大学院 工学府機能発現工学専攻 〒239-0845 横須賀市粟田1-8-15	d06ga556@ynu.ac.jp
三島 正規	首都大学東京 理工学研究科 〒192-0397 八王子市南大沢1-1	mishima-masaki@center.tmu.ac.jp
水野 敬	日本電子株式会社 分析機器本部 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町京都大学理学部化学教室気付	mizuno@kuchem.kyoto-u.ac.jp
水野 元博	金沢大学 大学院自然科学研究科 〒920-1192 金沢市角間町	mizuno@wriron1.s.kanazawa-u.ac.jp
三森 文行	国立環境研究所 化学環境研究領域 〒305-8506 つくば市小野川16-2	mitumori@nies.go.jp
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	t-miyoshi@aist.go.jp
関 庚薫	旭硝子(株) 中央研究所 〒221-8755 横浜市神奈川区羽沢町1150番地	kyonhun-min@agc.co.jp
村上 美和	物質・材料研究機構 ナノ計測センター 〒305-0003 つくば市桜3-13	MURAKAMI.Miwa@nims.go.jp
最上 祐貴	京都大学 理学部分子構造化学研究科 〒606-8227 京都市左京区田中里の前町38フェニックス2203号室	y-mogami@nifty.com
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 つくば市二の宮3-21-5	

氏名	勤務先 住所	E-Mail
柳澤 吉紀	千葉大学 工学部都市環境システム学科 〒263-0024 千葉市稲毛区穴川2-13-5サンハウス202	yanagisawa_yoshinori@hotmail.co.jp
山内 一夫	東京農工大学 大学院共生科学技術研究院 〒184-8588 小金井市中町2-24-16	kyamauch@cc.tuat.ac.jp
山口 敏幸	大阪大学 大学院理学研究科 〒573-1148 枚方市西牧野3-21-4	tyama@ch.wani.osaka-u.ac.jp
山口 秀幸	味の素株式会社 ライフサイエンス研究所 生体高分子構造研究グループ 〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町1-1KA棟	hideyuki_yamaguchi@ajinomoto.com
山崎 千春	日本電子株式会社 分析機器本部 〒196-8558 昭島市武蔵野3-1-2	yamasaki@jeol.co.jp
山崎 俊正	農業生物資源研究所 タンパク質機能研究ユニット 〒305-8602 つくば市観音台2-1-2	tyamazak@nias.affrc.go.jp
山路 俊樹	京都大学 大学院理学研究科化学専攻 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町	toshiki-y@nirvana.mbox.media.kyoto-u.ac.jp
山田 哲也	北海道大学 大学院理学院 〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目	tetuya-y@sci.hokudai.ac.jp
山延 健	群馬大学 大学院工学研究科 〒376-8515 桐生市天神町1-5-1	yamanobe@chem.gunma-u.ac.jp
山本 昭彦	ブルカー・バイオジャパン株式会社 技術サービス部 〒305-0051 つくば市二の宮3-21-5	
山本 泰彦	筑波大学 大学院数理物質科学研究科 〒305-8571 つくば市天王台1-1-1	yamamoto@chem.tsukuba.ac.jp
横井 貴子	アステラス製薬株式会社 創薬推進研究所分析研究室 〒305-8585 つくば市御幸が丘21	takako.yokoi@jp.astellas.com
横地 政志	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丁目次世代ポストゲノム棟1F-NMR測定室	yokochi@pharm.hokudai.ac.jp
吉田 慎一郎	東北大学 理学研究科附属巨大分子解析研究センター 〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3	s-yoshida@mail.tains.tohoku.ac.jp

氏名	勤務先 住所	E-Mail
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1-7-22C116	myoshida@gsc.riken.jp
吉田 良輔	北海道大学 生命科学院 〒001-0017 札幌市北区北17条西5丁目20-3-3サンオー403	ry_formal@mail.sci.hokudai.ac.jp
吉永 壮佐	熊本大学 大学院医学薬学研究部 構造機能物理化学分野 〒862-0973 熊本市大江本町5-1	yoshinaga@structbiol.com
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	yoshimizu.hiroaki@nitech.ac.jp
米山 操	放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター 先端生体計測グループ計測システム開発チーム 〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川4-9-1	yone@fml.nirs.go.jp
羅 晴	京都大学 京都大学化学研究所 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄京都大学化学研究所	luoqing@icr.mbox.media.kyoto-u.ac.jp
若松 馨	群馬大学 大学院工学研究科 〒376-8515 桐生市天神町1-5-1	wakamats@chem-bio.gunma-u.ac.jp
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 〒305-1234 つくば市二の宮3-21-5	
渡邊 英宏	国立環境研究所 化学環境研究領域 〒305-8506 つくば市小野川16-2	hidewata@nies.go.jp
渡部 正博	北海道大学 大学院薬学研究院 〒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センター	mnabe@sci.hokudai.ac.jp