

第 47 回 NMR 討論会

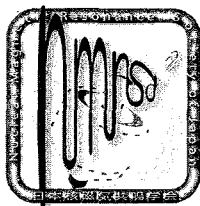
The 47th Annual Meeting of
The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

講演要旨集

Abstracts

会期 2008 年 11 月 12 日(水)～11 月 14 日(金)
November 12(Wed) – 14 (Fri), 2008

会場 筑波大学 大学会館講堂
University of Tsukuba, Auditorium



主 催

日本核磁気共鳴学会

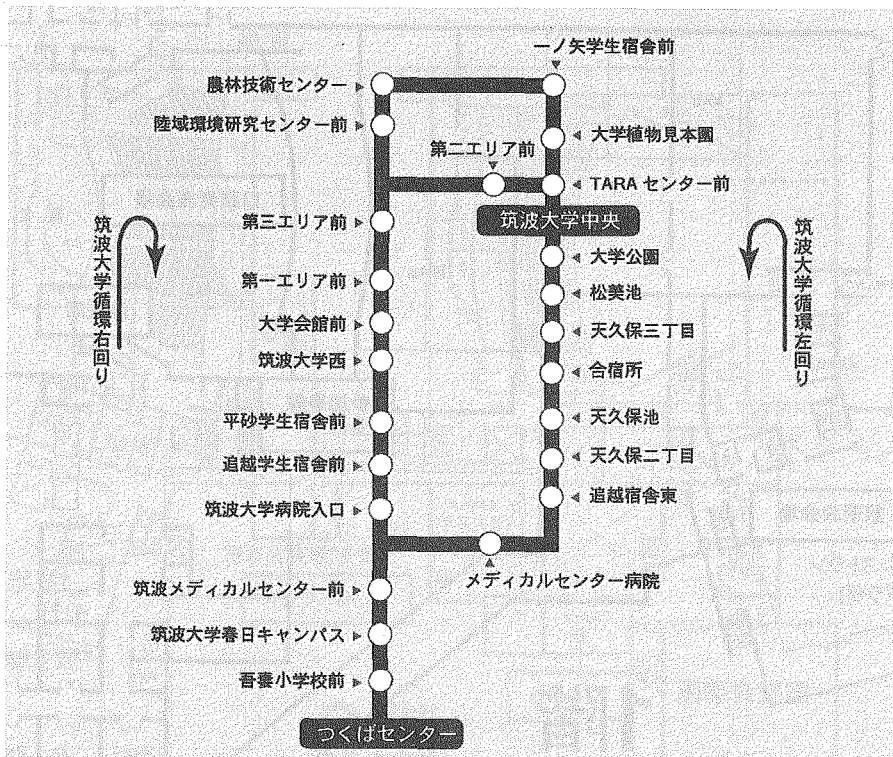
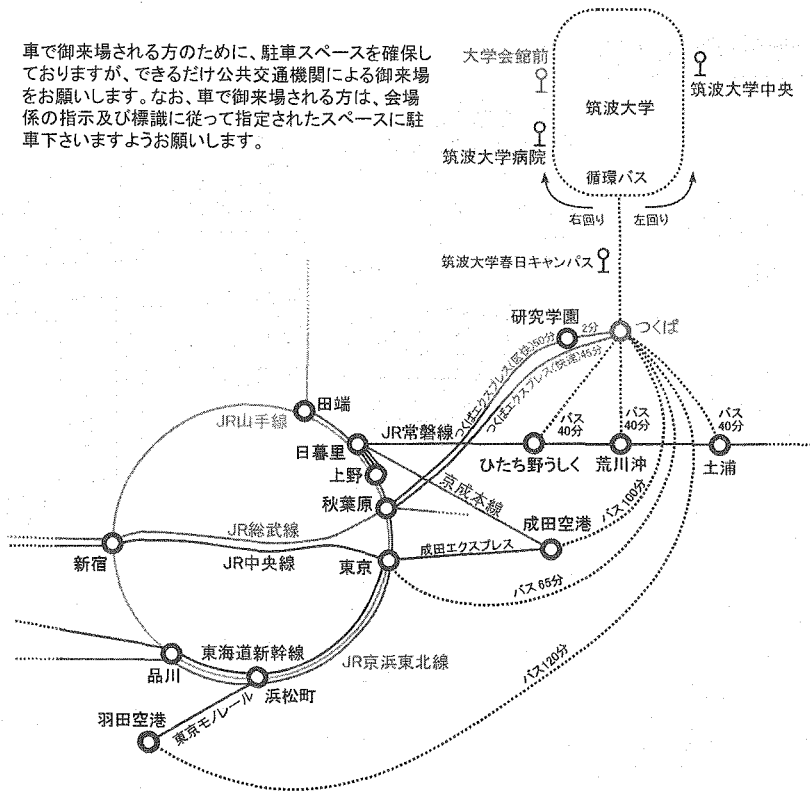
共 催

筑波大学・高分子学会・日本生化学会・日本生物物理学会
日本蛋白質科学会・日本農芸化学会・日本薬学会

協 賛

日本磁気共鳴医学会・日本物理学会・日本分析化学会

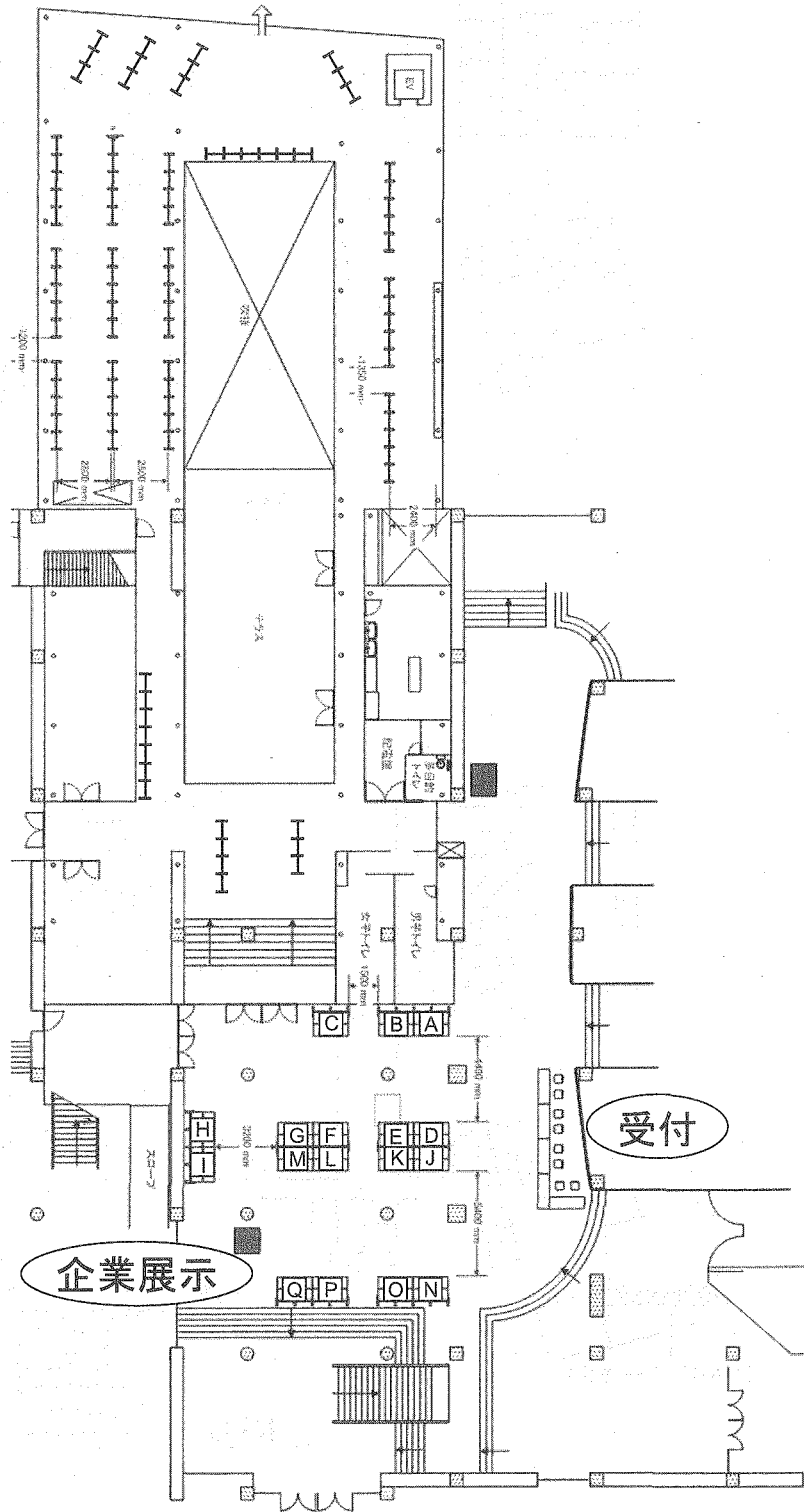
車で御来場される方のために、駐車スペースを確保しておりますが、できるだけ公共交通機関による御来場をお願いします。なお、車で御来場される方は、会場係の指示及び標識に従って指定されたスペースに駐車下さいますようお願いいたします。



ポスター発表会場案内図(総合交流会館)

展示企業リスト

A	大塚製薬株式会社
B	株式会社セルフリーサイエンス
C	昭光通商株式会社
D	日本電子株式会社
E	
F	ブルカー・バイオスピン株式会社
G	
H	インフォコム株式会社
I	株式会社エムアールテクノロジー
J	バリアンテクノロジーズ ジャパン リミテッド
K	
L	セティ株式会社
M	株式会社フレックス
N	オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社
O	大陽日酸株式会社
P	株式会社シゲミ
Q	株式会社エルエイシステムズ



第47回 NMR 討論会

The 47th Annual Meeting of The NMR Society of Japan

会期 11月12日(水) ~ 11月14日(金)

Period November 12-14, 2008

会場 筑波大学 大学会館講堂

Venue University of Tsukuba (Auditorium)

第一日 11月12日(水)

Day 1: November 12 (Wednesday)

9:25 - 9:30

開会の挨拶 Opening Remarks

9:30 - 10:10

座長 阿久津秀雄

1L1 T_2^+ 緩和速度を用いるヒト脳フェリチン鉄の定量 2
○三森文行, 渡邊英宏, 高屋展宏 (国立環境研)

1L2 遺伝的アルゴリズムを用いた選択励起 RF パルスの最適化 4
○待井豊, 石川亮洋, 半田晋也, 巨瀬勝美 (筑波大院数物)

10:10 - 10:50

座長 三好利一

1L3 MAS 用ローターの気密性テスト方法 8
○林繁信 (産総研)

1L4 H^+ -ATP 合成酵素サブユニット c-リングと脂質膜の相互作用 10
小林将俊¹, 戸所泰人¹, A. V. Struts², 藤原敏道¹, M. F. Brown², ○阿久津秀雄¹
(阪大蛋白研¹, アリゾナ大²)

10:50 - 11:05 — Coffee Break —

11:05 - 12:05

座長 稲垣冬彦

1L5 ZZ exchange 法による“見えない”分子間相互作用のダイナミクス解析 12
○菅瀬謙治 ((財) サントリー生物有機科学研)

1L6 超高感度タンパク質立体構造解析技術の開発 16
Jee JunGoo^{1,2}, 西ヶ谷有輝¹, 田中利好³, 河野俊之³, ○児嶋長次郎¹
(奈良先端大バイオサイエンス研¹, 首都大東京戦略研², 三菱化学生命科学研³)

1L7 蛋白質 NMR の感度向上——もう一つの視点と方法 18
○赤坂一之 (近畿大学先端技術総合研究所・高圧力蛋白質研究センター)

12:05 – 12:30

日本核磁気共鳴学会総会 Meeting of The NMR Society of Japan

13:30 – 15:00

ポスターセッション (奇数番号) Poster Presentations (Odd Poster Number)
若手ポスター賞ポスター発表審査 Poster Presentations for Young Scientists Poster Awards

15:00 – 16:10

座長 加藤晃一, 神田大輔

若手ポスター賞口頭発表審査 (7件) Oral Presentations for Young Scientists Poster Awards (Solution NMR : YP01~YP07)

- YP01 NMR 立体構造解析のためのタグを用いた常磁性ランタノイドプローブ 98
○齊尾智英, 小椋賢治, 横地政志, 稲垣冬彦 (北海道大学大学院生命科学院)
- YP02 大環状ジピリンオリゴマーの構造解析およびそのホウ素錯体の認識能評価 100
○坂本直也, 池田忠作, 鍋島達弥 (筑波大学大学院数理物質科学研究科)
- YP03 腫瘍抑制因子 APC-SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ドメインの相互作用解析 102
○海江田修至¹, 松井千幸², 清末優子², 池上貴久¹
(大阪大学蛋白質研究所¹, 株式会社カン研究所²)
- YP04 NMR 解析に基づくらせん型擬クリプタンドの多重イオン認識能の評価 104
○古川裕理, 秋根茂久, 鍋島達弥 (筑波大学大学院数理物質科学研究科)
- YP05 H/D 交換法による $\beta 2$ ミクログロブリンのアミロイド線維形成中間体の検出 108
○小沼剛¹, 茶谷絵里², 八木正典³, 大西玲奈¹, 櫻井一正¹, 内木宏延⁴,
後藤祐児¹ (大阪大学蛋白質研究所¹, 立命館大学薬学部²,
大阪大学微生物病研究所³, 福井大学医学部⁴)
- YP06 アルキル架橋ウリジン二量体を含む DNA オリゴマーの NMR 構造解析 110
○古板恭子¹, 村田俊平², Jee, JunGoo^{1,3}, 市川聡², 松田彰², 児嶋長次郎¹
(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科¹,
北海道大学大学院薬学研究院², 首都大学東京戦略研究センター³)
- YP07 Brome mosaic virus ゲノム RNA 3'-UTR 由来のステムループの
立体構造解析 112
○篠阿弥宇¹, 三浦謹一郎², 河合剛太¹
(千葉工業大学工学部生命環境科学科¹, 東京大学大学院新領域創成科学研究科²)

16:10 – 16:25 — Coffee Break —

16:25 – 17:35

座長 朝倉哲郎, 出村誠

若手ポスター賞口頭発表審査 (7件) Oral Presentations for Young Scientists Poster Awards (Solid NMR : YP08~YP14)

- YP08 Utilization of Discarded Coherences in a 2D Experiment Using the States
Method: COCODARR & Double-acquisition 116
○福地将志¹, 犬飼宗弘², 武田和行¹, 竹腰清乃理¹
(京都大学大学院理学研究科化学専攻¹,
大阪大学大学院基礎工学研究科システム創成専攻²)
- YP09 平行および逆平行 β -シート構造ならびにその混在系に関する固体 NMR
構造解析 120
○堀口紅実子, 亀谷俊輔, 山内一夫, 朝倉哲郎
(東京農工大学大学院共生科学技術研究院)
- YP10 固体 NMR を用いた ¹³C 標識レチナールのタンパク質中での光照射および
圧力印加による異性化メカニズムの解析 124
○田島可奈¹, 川村出¹, 和田昭盛², 西川大英¹, 辻暁³, 内藤晶¹
(横浜国立大学¹, 神戸薬科大学², 兵庫県立大学³)
- YP11 固体 NMR 法によるイオン液体の新しい基幹物質、デカメチルフェロセン・
アセナフテンキノン錯体の研究 128
○中村英章¹, 桑原大介¹, 持田智行²
(電気通信大学大学院電気通信学研究科量子物質・工学専攻¹,
神戸大学大学院理学研究科化学専攻²)
- YP12 構成原子数の揃った(CdSe)_n ナノ粒子の CP/MAS NMR による構造解析 130
○野田泰斗¹, 山同精一郎¹, 粕谷厚生², 前川英己¹
(東北大学大学院工学研究科¹, 東北大学国際高等融合領域研究所²)
- YP13 四極子核に対する高分解能固体 NMR の高感度化
—STMAS 用新規プローブ開発と微量元素の化学構造解析の実現— 132
○高橋貴文¹, 金橋康二¹, 下池田勇一², 根本貴宏², 齋藤公児³
(新日本製鐵(株)先端技術研究所¹, 日本電子²,
新日本製鐵(株)環境・プロセス研究開発センター³)
- YP14 多次元マジック角回転固体 NMR 法による膜タンパク質ハロロドプシンの
構造解析 136
○樋口真理花¹, 江川文子², 神谷昌克¹, 相沢智康¹, 河野敬一^{1,3},
藤原敏道², 出村誠¹ (北海道大学大学院先端生命科学研究所¹,
大阪大学蛋白質研究所², 北海道大学大学院理学研究院³)

17:35 – 17:50 — Coffee Break —

17:50 – 18:40

座長 楯真一, 藤原敏道

若手ポスター賞口頭発表審査 (5件) Oral Presentations for Young Scientists Poster Awards (NMR 技術: YP15~YP19)

- YP15 **Active compensation of RF pulse transients 能動制御によるラジオ波パルス過渡現象の補正** 140
○田淵豊¹, 根来誠¹, 岸田拓郎¹, 北川勝浩¹, 武田和行²
(大阪大学大学院基礎工学研究科¹, 京都大学大学院理学研究科²)
- YP16 **電源励磁による高温超電導磁石を使った固体 NMR 用外部ロックの開発** 144
○高橋雅人^{1,2}, 斎藤雄太³, 柳澤吉紀⁴, 保母史郎², 高尾智明³, 中込秀樹⁴, 細野政美⁵, 濱田衛⁶, 木吉司⁷, 山崎俊夫¹, 前田秀明^{1,2}
(理化学研究所 SSBC¹, 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科², 上智大学理工学研究科³, 千葉大学大学院工学研究科⁴, 日本電子⁵, 神戸製鋼⁶, 物質材料研究機構⁷)
- YP17 **CPMG 法を利用した踵骨骨密度計測手法の開発** 148
○谷口和也¹, 半田晋也², 巨瀬勝美¹
(筑波大学大学院数理物質科学研究科¹, 日本学術振興会特別研究員 PD²)
- YP18 **部分構造検索を用いた HSQC シグナルからの構造予測法の開発** 152
○春名英明¹, 近山英輔², 菊地淳^{1,2,3}
(横浜市立大学大学院国際総合科学研究科¹, 理化学研究所植物科学研究センター², 名古屋大学大学院生命農学研究科³)
- YP19 **²H NMR による, ナノ層状シリケート Na-RUB-18 内部に閉じ込められた水分子の微視的構造とダイナミクスの研究** 156
○渡辺啓介^{1,2}, Klaus Müller², 小國正晴¹,
(東京工業大学大学院理工学研究科¹, Universität Stuttgart Institut für Physikalische Chemie²)

18:40 – 20:00

日本核磁気共鳴学会評議員会 Meeting of the Council of The NMR Society of Japan

第二日 11月13日(木)

Day 2: November 13 (Thursday)

9:30 – 10:15

Chairperson Masatsune Kainosho

2L1 Invited Lecture

Understanding the Molecular Level Events in the Non-Classical Pathway of Acidic Fibroblast Growth Factor 22
OChin Yu (National Tsing Hua University (Taiwan))

10:15 – 10:55

Chairperson Ichio Shimada

2L2 **The Molecular Morphology Analysis of Proteins Using the Orientation Induced TROSY Shift Changes** 24
OShin-ichi Tate^{1,2} (Hiroshima University¹, PRESTO/JST²)

2L3 **Investigating Protein Three-dimensional Structures Inside Living Cells by In-cell NMR Spectroscopy** 26
OYutaka Ito^{1,2,3}, Daisuke Sakakibara^{1,2}, Atsuko Sasaki^{1,2}, Teppei Ikeya^{1,4}, Junpei Hamatsu¹, Masaki Mishima^{1,2}, Tsutomu Mikawa³, Markus Wälchli⁵, Brian O. Smith⁶, Masahiro Shirakawa^{2,7}, Peter Güntert^{1,4}
(Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University¹, CREST/JST², Research Group for Bio-supramolecular Structure-Function, RIKEN³, Institute of Biophysical Chemistry, J. W. Goethe-University Frankfurt (Germany)⁴, Bruker BioSpin⁵, Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of Glasgow (UK)⁶, Department of Molecular Engineering, Kyoto University⁷).

10:55 – 11:10 — Coffee Break —

11:10 – 12:15

Chairperson Kiyonori Takegoshi

2L4 **Structures of Silks and Silk-like Materials studied with Solid-state NMR, and Application to Biomaterials** 28
OKazuo Yamauchi¹, Yumi Tanioka¹, Toshiki Tamura², Yasumoto Nakazawa³, Tetsuo Asakura^{1,3} (Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology¹, National Institute of Agrobiological Sciences², Nature and Science Museum, Tokyo University of Agriculture and Technology³)

2L5 Invited Lecture

NMR Powder Crystallography 30
OLyndon Emsley (University of Lyon (France))

12:15 – 13:30

日本核磁気共鳴学会新評議員会 Meeting of the Council of The NMR Society of Japan
日本核磁気共鳴学会新理事会 Meeting of the Directors of The NMR Society of Japan

13:40 – 14:25

Chairperson Fumiyuki Mitsumori

2L6 Invited Lecture

**Detecting Fleeting MRI Signals Using Frequency-Modulated (FM)
Radio Waves**

32

OMichael Garwood (University of Minnesota (USA))

14:25 – 15:10

Chairperson Yoji Arata

2L7 Honorary Lecture

My Research with ESR, NMR and MRI

34

OTokuko Watanabe (Aoyama Gakuin Women's Junior College)

15:10 – 15:30 — Coffee Break —

15:30 – 16:35

Chairperson Takehiko Terao

2L8 Invited Lecture

**Hyperpolarized Singlet State NMR and Intermolecular
Multiple-Quantum Coherence Imaging with Anisotropic
Contrast Agents**

36

OWarren S. Warren (Duke University (USA))

2L9 **Solid-state NMR Analysis of Membrane Protein and High-field DNP** 40

OToshimichi Fujiwara¹, Hiroki Takahashi¹, Ayako Egawa¹, Miwako Saeki¹,
Hideo Akutsu¹, Kokoro Hayashi², Chojiro Kojima², Toshitaka Idehara³,
Isamu Ogawa³, Mitsuru Toda⁴ (Osaka University¹, Nara Institute of
Science and Technology², University of Fukui³, JEOL Ltd.⁴)

16:35 – 17:40

Chairperson Isao Ando

2L10 **Probing DNP Enhancements for Biological Applications** 42

OUlrich L. Günther (University of Birmingham (UK))

2L11 Invited Lecture

**Dipole Recoupling and Dynamic Nuclear Polarization
at High Magnetic Fields**

44

ORobert G. Griffin (MIT (USA))

18:00 Banquet (On-Campus Restaurant "Plaza")

第三日 11月14日(金)

Day 3: November 14 (Friday)

9:30 – 10:10

座長 河合剛太

3L1 NMRによるイオン液体の拡散移動と分子運動の研究 48
○早水紀久子¹, 都築誠二¹, 関志朗² (産総研¹,
財団法人電力中央研究所材料科学研究所²)

3L2 NMRによるヘパリン不純物問題への対応 52
○山口秀幸, 品川麻衣, 榛葉信久, 鈴木榮一郎 (味の素株式会社)

10:10 – 10:50

座長 田中俊之

3L3 Sortase Aを用いた Protein Ligation 法の溶液 NMR への応用 :
INSET (isotopically INvisible Solubility/Stability Enhancement
Tag)の開発 54
○小橋川敬博, 久米田博之, 小椋賢治, 稲垣冬彦 (北大院薬)

3L4 高温での溶液 NMR 測定における蛋白質の NDSB による安定化 58
○若松馨¹, 石井毅¹, 向瓏¹, 細田和男¹, 神谷歩¹, 金子敬輔¹,
榎本舞弓¹, 井上裕介¹, 窪田健二¹, 行木信一¹, 河野俊之²
(群馬大学大学院工学研究科¹, 三菱化学生命科学研究所²)

10:50 – 11:05 — Coffee Break —

11:05 – 11:45

座長 内藤 晶

3L5 固体 NMR による医薬品とシクロデキストリン混合粉碎物中の
医薬品分子状態の検討 60
○高木美菜子, 吉橋泰生, 米持悦生, 寺田勝英 (東邦大院薬)

3L6 微生物産生高分子ポリ(ε-L-リジン) およびそのポリマーブレンドの
固体 NMR 64
○前田史郎¹, 加藤久美子¹, 国本浩喜² (福井大院工¹, 金沢大院自然²)

11:45 – 12:25

座長 林 繁信

3L7 多孔質シリカゲルの表面および内部水酸基密度 68
○関庚薫¹, 宮原浩嘉² (旭硝子(株)中央研究所¹, 旭硝子エスアイテック(株)²)

- 3L8 多孔質 BCN 系における ^{11}B - ^{14}N の交差分極法および HETCOR の応用 72
 ○村上美和¹, 清水禎¹, 丹所正孝¹, Vinu Ajayan¹, 有賀克彦¹, 森利之¹,
 竹腰清乃理² (物質・材料研究機構¹, 京大院理²)

13:30 – 15:00

ポスターセッション (偶数番号) Poster Presentations (Even Poster Number)

15:00 – 16:00

座長 山崎俊正

- 3L9 ^1H -NMR メタボロミクスの医療応用—CKD (慢性腎臓病) 患者血漿の解析 74
 ○藤原正子^{1,3}, 小林武志¹, 城守隆宏², 丸山穰³, 竹内和久^{1,4}, 今井潤^{1,3}
 (東北大院薬¹, 東北大薬², 東北大学 21 世紀 COE "CRESCENDO"³,
 宏人会中央クリニック⁴)

- 3L10 生命の環境調和システムへの異種相関解析の試み 76
 ○菊地淳^{1,2,3}, 近山英輔¹, 須藤倫崇², 古田拓², 持田恵一¹
 (理化学研究所植物科学研究センター¹, 横浜市大院国際総合科学²,
 名大院生命農学³)

- 3L11 光励起三重項電子スピンを用いた DNP のための部分的重水素化による
 プロトン密度の最適化 80
 ○香川晃徳^{1,3}, 室川遊¹, 北川勝浩¹, 武田和行²
 (阪大院基礎工¹, 京大院理², CREST, Japan Science and Technology Agency³)

16:00 – 16:20 — Coffee Break —

16:20 – 17:00

座長 西村善文

- 3L12 AR 過程に基づくピーク推定による FID の変換：周波数と減衰率の同時推定 84
 ○村田恵介¹, 河合剛太², 久保田一¹ (千葉工業大工電気電子情報工学¹,
 千葉工業大工生命環境科学²)

- 3L13 Multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in living human cells 88
 ○朽尾豪人¹, 猪俣晃介¹, 大野綾子¹, 磯貝信¹, 天野剛志³, 伊藤隆⁴,
 廣明秀一³, 二木史郎², 白川昌宏¹
 (京大院工¹, 京大化学研², 神戸大医³, 首都大東京⁴)

17:00 – 17:40

座長 伊藤 隆

3L14 ペプチドモチーフを認識するタンパク質機能ドメイン群の複合体構造解析 90

小柴生造^{1,2} 葛西卓磨¹, 李華¹, 元田容子¹, 枳尾尚哉¹, 田仲昭子¹,
林崎良英³, 菅野純夫⁴, 山本雅⁵, 横山茂之^{1,6}, 〇木川隆則^{1,7}

(理化学研究所生命分子システム基盤研究領域¹,
横浜市立大院国際総合科学², 理化学研究所オミックス基盤研究領域³,
東大院新領域創成科学⁴, 東大医科学研⁵, 東大院理⁶, 東工大院総合理工⁷)

3L15 RDC、PRE 及び PCS に基づいた Musashi-RNA 複合体と
プリオンタンパク質に対する RNA アプタマーの構造とダイナミクス 94

大山貴子^{1,2}, 松上明正¹, 古川亜矢子¹, 真嶋司¹, 杉山孝司¹, 今井貴雄³,
岡野栄之³, 西川富美子⁴, 西川諭⁴, 山崎俊夫², 永田崇¹, 〇片平正人^{1,5}

(横浜市大院国際総合科学¹, 理研・SSBC², 慶應大医³,
産総研年齢軸生命工学研究センター⁴, JST/PRESTO⁵)

17:40 – 17:45

閉会の挨拶 Closing Remarks

若手ポスター賞候補者発表

Candidates for Young Scientist Poster Awards

- YP01 **NMR 立体構造解析のためのタグを用いた常磁性ランタノイドプローブ**
○齊尾智英, 小椋賢治, 横地政志, 稲垣冬彦
(北海道大学大学院生命科学院)
- YP02 **大環状ジピリンオリゴマーの構造解析およびそのホウ素錯体の認識能評価**
○坂本直也, 池田忠作, 鍋島達弥
(筑波大学大学院数理物質科学研究科)
- YP03 **腫瘍抑制因子 APC-SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ドメインの相互作用の解析**
○海江田修至¹, 松井千幸², 清末優子², 池上貴久¹
(大阪大学蛋白質研究所¹, 株式会社カン研究所²)
- YP04 **NMR 解析に基づくらせん型擬クリプタンドの多重イオン認識能の評価**
○古川裕理, 秋根茂久, 鍋島達弥
(筑波大学大学院数理物質科学研究科)
- YP05 **H/D 交換法による β_2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成中間体の検出**
○小沼剛¹, 茶谷絵里², 八木正典³, 大西玲奈¹, 櫻井一正¹, 内木宏延⁴, 後藤祐児¹
(大阪大学蛋白質研究所¹, 立命館大学薬学部², 大阪大学微生物病研究所³, 福井大学医学部⁴)
- YP06 **アルキル架橋ウリジン二量体を含む DNA オリゴマーの NMR 構造解析**
○古板恭子¹, 村田俊平², JunGoo Jee^{1,3}, 市川聡², 松田彰², 児嶋長次郎¹
(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科¹, 北海道大学大学院薬学研究院², 首都大学東京戦略研究センター³)
- YP07 **Brome mosaic virus ゲノム RNA 3'-UTR 由来のステムループの立体構造解析**
○篠阿弥宇¹, 三浦謹一郎², 河合剛太¹
(千葉工業大学工学部生命環境科学科¹, 東京大学大学院新領域創成科学研究科²)
- YP08 **Utilization of Discarded Coherences in a 2D Experiment Using the States Method; COCODARR & Double-acquisition**
○福地将志¹, 犬飼宗弘², 武田和行¹, 竹腰清乃理¹
(京都大学大学院理学研究科化学専攻¹, 大阪大学大学院基礎工学研究科システム創成専攻²)
- YP09 **平行および逆平行 β シート構造ならびにその混在系に関する固体 NMR 構造解析**
○堀口紅実子, 龜谷俊輔, 山内一夫, 朝倉哲郎
(東京農工大学大学院共生科学技術研究院)
- YP10 **固体 NMR を用いた ¹³C 標識レチナールのタンパク質中での光照射および圧力印加による異性化メカニズムの解析**
○田島可奈¹, 川村出¹, 和田昭盛², 西川大英¹, 辻暁³, 内藤晶¹
(横浜国立大学¹, 神戸薬科大学², 兵庫県立大学³)

- YP11 固体 NMR 法によるイオン液体の新しい基幹物質、デカメチルフェロセン・アセナフテンキノン錯体の研究
 ○中村英章¹, 桑原大介¹, 持田智行²
 (電気通信大学大学院電気通信学研究科量子物質・工学専攻¹, 神戸大学大学院理学研究科化学専攻²)
- YP12 構成原子数の揃った(CdSe)_n ナノ粒子の CP/MAS NMR による構造解析
 ○野田泰斗¹, 山同精一郎¹, 粕谷厚生², 前川英己¹
 (東北大学大学院工学研究科¹, 東北大学国際高等融合領域研究所²)
- YP13 四極子核に対する高分解能固体 NMR の高感度化—STMAS 用新規プローブ開発と微量元素の化学構造解析の実現—
 ○高橋貴文¹, 金橋康二¹, 根本貴宏², 下池田勇一², 齋藤公児³
 (新日本製鐵(株)先端技術研究所¹, 日本電子², 新日本製鐵(株)環境・プロセス研究開発センター³)
- YP14 多次元マジック角回転固体 NMR 法による膜タンパク質ハロロドプシンの構造解析
 ○樋口真理花¹, 江川文子², 神谷昌克¹, 相沢智康¹, 河野敬一^{1,3}, 藤原敏道², 出村誠¹
 (北海道大学大学院先端生命科学研究所¹, 大阪大学蛋白質研究所², 北海道大学大学院理学研究院³)
- YP15 Active compensation of RF pulse transients 能動制御によるラジオ波パルス過渡現象の補正
 ○田淵豊¹, 根来誠¹, 岸田拓郎¹, 北川勝浩¹, 武田和行²
 (大阪大学大学院基礎工学研究科¹, 京都大学大学院理学研究科²)
- YP16 電源励磁による高温超電導磁石を使った固体 NMR 用外部ロックの開発
 ○高橋雅人^{1,2}, 齋藤雄太³, 柳澤吉紀⁴, 保母史郎², 高尾智明³, 中込秀樹⁴, 細野政美⁵, 濱田衛⁶, 木吉司⁷, 山崎俊夫¹, 前田秀明^{1,2}
 (理化学研究所 SSBC¹, 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科², 上智大学理工学研究科³, 千葉大学大学院工学研究科⁴, 日本電子⁵, 神戸製鋼⁶, 物質材料研究機構⁷)
- YP17 CPMG 法を利用した踵骨骨密度計測手法の開発
 ○谷口和也¹, 半田晋也², 巨瀬勝美¹
 (筑波大学大学院数理物質科学研究科¹, 日本学術振興会特別研究員 PD²)
- YP18 部分構造検索を用いた HSQC シグナルからの構造予測法の開発
 ○春名英明^{1,2}, 近山英輔¹, 菊地淳^{1,2,3}
 (理化学研究所植物科学研究センター¹, 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科², 名古屋大学大学院生命農学研究科³)
- YP19 ²H NMR による, ナノ層状シリケート Na-RUB-18 内部に閉じ込められた水分子の微視的構造とダイナミクスの研究
 ○渡辺啓介^{1,2}, 小國正晴¹, Klaus Müller²
 (東京工業大学大学院理工学研究科¹, Universität Stuttgart Institut für Physikalische Chemie²)

一般ポスター発表

Poster Presentation

- P001 巨大タンパク質複合体のモデル構築を目的とした残基選択的交差飽和法の開発
○小澤新一郎¹, 五十嵐俊介¹, 大澤匡範¹, 鈴木勉², 甲斐荘正恒^{3,4,5}, 嶋田一夫^{1,6}
(東京大学大学院薬学系研究科¹, 東京大学大学院工学系研究科²,
名古屋大学大学院理学研究科³, 首都大学東京戦略研究センター⁴,
フランクフルト大学⁵, 産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター⁶)
- P002 Water 選択励起 pulse の開発—新 Water-LOGSY 法について
○降旗一夫¹, 田代(下高原) 櫻子², 田代充³
(東京大学大学院農学生命科学研究科¹, 東京薬科大学薬学部², 明星大学理工学部³)
- P003 DIORITE 法による mRNA Capping Enzyme のドメイン配向解析
○岸本浩一¹, 田中利好², 河野俊之², 楯真一^{1,3}
(広島大院理・数理分子¹, 三菱化学生命研², PRESTO/JST³)
- P004 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
○豊永翔¹, 大澤匡範¹, 横川真梨子¹, 嶋田一夫^{1,2}
(東京大学大学院薬学系研究科¹, 産業技術総合研究所
バイオメディシナル情報研究センター²)
- P005 Investigations of Protein Dynamics by the SAIL Method
○武田光広¹, 小野明², 寺内勉², 甲斐荘正恒^{1,3}
(名古屋大学大学院理学研究科¹, 首都大学東京戦略研究センター²,
フランクフルト大学³)
- P006 可変圧力 ¹³C/¹H HSQC NMR による分子内 Cavity の水和と構造揺らぎ-T4 リゾチーム
○前野寛大^{1,2}, 北原亮², Frederick W. Dahlquist³, 横山茂之^{4,5}, Frans A. A. Mulder⁶,
赤坂一之^{1,2,7}
(近畿大学大学院生物理工学研究科¹, 理研播磨², Dept. Chem., Univ. of Oregon³,
理研 GSC⁴, 東京大学大学院理学系研究科⁵, Dept. Biophys. Chem., Univ. of Groningen⁶,
近畿大学高圧力蛋白質研究センター⁷)
- P007 非線形サンプリング法を用いた迅速な異種核 4 次元 NMR 測定法の有用性の検証
○重光佳基^{1,2}, 土江祐介^{1,2}, 三島正規^{1,2}, Daniel Nietlispach³, Markus Wächli⁴,
伊藤隆^{1,2}
(首都大学東京 大学院 理工学研究科¹, CREST/JST², Department of chemistry,
University of Cambridge³, ブルカーバイオスピ⁴)
- P008 *Brevibacillus choshinensis* 分泌発現系を用いた ¹⁵N 安定同位体標識試料作成
○谷生道一, 田中利好, 田中剛史, 河野俊之
(株)三菱化学生命科学研究所)
- P009 新規酵母発現系を用いた安定同位体標識試料の調製法
○杉木俊彦^{1,2}, 高橋栄夫², 嶋田一夫^{2,3}
(社)バイオ産業情報化コンソーシアム¹, 産業技術総合研究所
バイオメディシナル情報研究センター², 東京大学 大学院 薬学系研究科³)
- P010 植物培養細胞と誘導可能なウィルスベクターを利用したタンパク質試料の調製
○竹内誠¹, 玉井淳史², 土肥浩二², 森正之², 大木進野¹
(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¹,
石川県立大学生物資源工学研究所²)

- P011 共発現を利用した不溶性顆粒発現法の抗菌ペプチド立体構造解析への応用
 ○相沢智康^{1,2}, 北條江里¹, 梅津喜崇¹, 神谷昌克², 熊木康裕³, 出村誠², 河野敬一^{2,3}
 (北海道大学大学院理学院¹, 北海道大学大学院先端生命科学研究院², 北海道大学大学院理学研究院³)
- P012 大腸菌無細胞タンパク質合成系による安定同位体標識技術の改良
 ○横山順^{1,2,3}, 松田貴意², 関英子^{2,3}, 松田夏子², 小柴生造^{2,4}, 木川隆則^{2,3}
 (大陽日酸(株) つくば研究所¹, 理化学研究所 SSBC NMR パイプライン², 東京工業大学大学院総合理工学研究所³, 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科⁴)
- P013 コールドショックベクター、pCold-GST の構築と NMR への応用
 ○林こころ, 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)
- P014 NMR によるミミズ由来 R 型レクチン C 末端ドメインの特異的な糖結合活性に関する研究
 ○逸見光¹, 久野敦², 海野幸子², 平林淳²
 (農研機構食総研¹, 産総研糖鎖医工学研究センター²)
- P015 高い細胞接着活性を有する絹様材料の NMR 構造解析
 ○吉田愛¹, 田中千香子^{1,2}, 神谷昌克³, 出村誠³, 朝倉哲郎¹
 (東京農工大学大学院共生科学技術研究院¹, 防衛大学校応用化学科², 北海道大学先端生命科学研究院³)
- P016 ループ変異により誘導される励起構造の変化による酵素反応変調機構の解明
 ○堀内裕司¹, 大前英司¹, 月向邦彦¹, 楯真一^{1,2}
 (広島大学大学院理学研究科¹, PRESTO/JST²)
- P017 好熱性緑色光合成細菌由来 Cytochrome c_2 の大量発現と NMR による構造機能評価
 ○樋口誠¹, 逸見光², 平野優¹, 大岡宏造³, 大友征宇¹
 (茨城大学理学部¹, 農研機構・食総研², 大阪大学理学研究科生物科学専攻³)
- P018 微小管制御因子 EB1 の構造解析
 ○金場哲平¹, 森智行², 前崎綾子¹, 伊藤隆¹, 箱嶋敏雄², 三島正規¹
 (首都大学東京理工¹, 奈良先端大学情報²)
- P019 RLR タンパク質、MDA5 および LGP2 C 末端ドメインの構造解析
 ○久米田博之¹, 高橋清大¹, 都築奈津子², 小椋賢治¹, 堀内正隆¹, 米山光俊³, 成田亮³, 平井玲子³, 藤田尚志³, 稲垣冬彦^{1,2}
 (北海道大学薬学部構造生物学研究室¹, 北海道大学大学院生命科学院², 京都大学 ウイルス研究所 遺伝子動態調節研究部門³)
- P020 大腸菌リボソームの休眠促進因子 HPF の立体構造解析
 ○佐藤明子¹, 永井義崇¹, 渡辺拓実¹, 上田雅美^{2,3}, 牧泰史², 伊藤隆¹, 和田明^{2,3}, 三島正規¹
 (首都大学東京大学院・理工学研究科¹, 大阪医科大学・物理², 吉田生物研究所³)
- P021 分子回転異方性の強い蛋白質のドメイン配向解析
 ○上脇隼一¹, 楯真一^{1,2}
 (広島大院理・数理分子¹, PRESTO/JST²)
- P022 転写コアクチベーター-MBF1 が形成する複合体の溶液構造の解析
 ○永井義崇¹, 広瀬進², 白川昌宏³, 伊藤隆¹, 三島正規¹
 (首都大院理工¹, 国立遺伝学研究所², 京大工学研³)

- P023 **マウス由来ペプチド性フェロモン ESP1 の構造活性相関**
 ○吉永壮佐¹, はが紗智子², 佐藤徹², 木本裕子², 嶋田一夫³, 東原和成², 寺沢宏明¹
 (熊本大学大学院医学薬学研究部¹, 東京大学大学院新領域創成科学研究科², 東京大学大学院薬学系研究科³)
- P024 **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^{1,2}, 上田寛³, 吉澤良隆³, 加藤こずえ³, 赤澤大輔³, 谷村隆次³, 高橋栄夫², 嶋田一夫^{2,4}
 (JBIC¹, 産総研バイオメディシナル情報研究センター², JBIC・東レ分室³, 東京大学大学院薬学系⁴)
- P025 **タバコ ADP-ribosylation factor-like protein ARLA1d の NMR 解析**
 ○岡村英保, 錦織雅樹, 石川雅之, 加藤悦子
 (農業生物資源研究所植物微生物相互作用ユニット)
- P026 **好熱性紅色光合成細菌の電子伝達タンパク質 HiPIP と Cyt c' の機能と構造解析**
 ○村岡義之¹, 逸見光², 吉田充², 高崎将充³, 大友征宇³
 (山形県工業技術センター¹, 農研機構・食総研², 茨城大学理学部³)
- P027 **LysM domain のキチンオリゴ糖認識機構の解明**
 岡村英保¹, 大沼貴之¹, 翁長章子², 平良東記², ○加藤悦子¹
 (農業生物資源研究所植物・微生物間相互作用ユニット¹, 琉球大学農学部²)
- P028 **タキプレシン I とリポ多糖の相互作用解析**
 ○神谷昌克¹, 杉田圭太郎², 相沢智康², 水口峰之³, 川畑俊一郎⁴, 出村誠¹, 河野敬一²
 (北海道大学大学院生命科学院¹, 北海道大学大学院理学院², 富山大学 大学院 医学薬学研究部³, 九州大学 大学院 理学研究院⁴)
- P029 **異種核多次元 NMR 法による高度好熱菌 RecO 蛋白質の高次構造解析**
 ○永江峰幸¹, 井上仁², 美川務², 三島正規¹, 柴田武彦², 伊藤隆¹
 (首都大学東京大学院・理工学研究科¹, 理化学研究所・生体超分子構造・機能研究協力グループ²)
- P030 **Trim5α B-box 2 ドメインの構造・機能研究**
 ○秦旭栄¹, 長島敏雄¹, 梅原崇史¹, 林文晶¹, 渡部暁¹, 原田拓志¹, 矢吹孝¹, 青木雅昭¹, 関英子¹, 松田貴意¹, 好田真由美¹, 廣田洋¹, 木川隆則^{1,2}, 横山茂之^{1,3}
 (理研横浜・生命分子システム領域¹, 東工大・院総理工・知能システム², 東大・院理・生化³)
- P031 **呼吸鎖末端酸化酵素における電子伝達複合体の動的構造解析**
 ○坂本光一¹, 神谷昌克², 伊藤(新澤)恭子³, 内田毅¹, 相沢智康², 出村誠², 河野敬一¹, 吉川信也³, 石森浩一郎²
 (北海道大学大学院理学院¹, 北海道大学大学院先端生命科学研究院², 兵庫県立大学大学院生命理学研究科³)
- P032 **異種核多次元 NMR による細胞内大量発現蛋白質の解析**
 ○浜津順平¹, 岩崎亜衣¹, 花島知美¹, 榊原大介¹, 佐々木敦子¹, 林宣宏², 三島正規¹, 伊藤隆¹
 (首都大学東京大学院理工学研究科¹, 藤田保健衛生大学総合医科学研究所²)

- P033 **GM1 ミセルの親水性/疎水性境界面におけるアミロイド β ペプチドのトポロジーの NMR 解析**
 ○内海真穂^{1,2}, 山口芳樹^{1,3}, 笹川拓明², 山本直樹⁴, 柳澤勝彦⁵, 加藤晃一^{1,2,6,7}
 (名古屋市立大学大学院薬学研究科¹, 分子科学研究所², 理化学研究所³, 立命館大学薬学部⁴, 長寿医療センター研究所⁵, 岡崎統合バイオサイエンスセンター⁶, お茶の水女子大学糖鎖科学教育研究センター⁷)
- P034 **溶液 NMR によるフィトクロム ATP 結合ドメインの構造・機能解析**
 ○西ヶ谷有輝¹, Jee, JunGoo^{1,2}, 田中利好³, 河野俊之³, 加藤悦子^{4,5}, 高野誠⁴, 山崎俊正⁴, 児嶋長次郎¹
 (奈良先端大・バイオ¹, 首都大・戦略研究センター², 三菱化学生命研³, 農業生物資源研⁴, 名大院・生命農学研究科⁵)
- P035 **巻き戻し条件下におけるタグ蛋白質の構造及び動的性質**
 ○熊木康裕¹, 梅津喜崇², 相沢智康², 神谷昌克², 出村誠², 河野敬一^{1,2}
 (北海道大学大学院理学研究院¹, 北海道大学大学院先端生命科学研究院²)
- P036 **酵母 Ire1p によって部位特異的な切断を受ける RNA の NMR 構造解析**
 ○河原都美¹, Jee JunGoo^{1,2}, 箱嶋敏雄³, 今川佑介¹, 河野憲二¹, 児嶋長次郎¹
 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科¹, 首都大学東京戦略研究センター², 奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科³)
- P037 **ヘム近傍の静電的環境の変化がシトクロム c の機能と構造に与える影響**
 ○三上真一, 入江清史, 太虎林, 長友重紀, 山本泰彦
 (筑波大院数物)
- P038 **好熱性水素細菌由来シトクロム c₅₅₂ の機能調節に関わるダイナミクス解析**
 ○入江清史¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 逸見光², 北原亮³, 横山茂之⁴, 赤阪一之⁵
 (筑波大院数物¹, 農研機構 食総研², 立命館大薬³, 東大院理⁴, 近大生物理工⁵)
- P039 **ヒト成人および胎児ヘモグロビン四量体と単離鎖との構造比較を通じたサブユニット間相互作用の解析**
 ○柴田友和, 太虎林, 長友重紀, 山本泰彦
 (筑波大院数物)
- P040 **フッ素化ヘム再構成ヘモグロビン(Hb)の ¹⁹F NMR による機能解析**
 ○水関和哉¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 鈴木秋弘²
 (筑波大院数物¹, 長岡高専物質²)
- P041 **フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質の ¹⁹F NMR シグナルの磁場依存性の解析**
 ○宮崎泰斗¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 鈴木秋弘²
 (筑波大院数物¹, 長岡高専物質²)
- P042 **各サブユニットを区別したヒト成人ヘモグロビン(Hb A)の機能解析**
 ○佐藤惇志, 太虎林, 長友重紀, 山本泰彦
 (筑波大院数物)
- P043 **C₂ 対称フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質の活性部位構造の ¹⁹F NMR による解析**
 ○古市英資¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 鈴木秋弘²
 (筑波大院数物¹, 長岡高専物質²)

- P044 **Structural Studies on Immunotherapeutic Peptides for Autoimmune Disease Myasthenia Gravis**
 ○Hyun Ho Jung, Hwa Jung Yi, Chan Hyung Bae, Sin-Hyeog Im, Jae Il Kim
 (Gwangju Institute of Science and Technology)
- P045 **Characterisation of Salt Bridges to Lysines in Protein G**
 Jennifer H. Wolstencroft¹, Saif Ullah², Poul Erik Hansen², ○Michael P. Williamson^{1,3}
 (Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield¹,
 Department of Science, Systems and Models, Roskilde University²,
 Institute of Protein Research, Osaka University³)
- P046 **NMR を用いた p62 UBA ドメインの二量体形成モデルの検証**
 ○磯貝信¹, 森本大智¹, 阿部翔吾¹, 有田恭平¹, 雲財悟², 天野剛志³, 有吉真理子¹,
 朽尾豪人¹, 小松雅明⁴, 白川昌宏¹, 田中啓二⁴
 (京都大学大学院工学研究科¹, 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科²,
 神戸大学大学院医学研究科³, 東京都臨床医学総合研究所⁴)
- P047 **クロマチン凝集メカニズムの解明を目指したヒト Polycomb クロモドメインの NMR 構造解析**
 ○福井陽子, 大木出, 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)
- P048 **磁気共鳴法を用いたアフリカツメガエル卵母細胞内におけるタンパク質の立体構造情報の収集**
 ○五十嵐龍治¹, 酒井智美², 原英之³, 天野剛志⁴, Markus Walchli⁵, 伊藤隆⁵,
 朽尾豪人¹, 白川昌宏¹
 (京都大院・工¹, 横浜市大院・国際総合², ブルカー・バイオスピン³,
 神戸大院・医⁴, 首都大院・理工⁵)
- P049 **フィトステロール型界面活性剤とポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンジメチルエーテルを用いた難溶性紫外線吸収剤の可溶化メカニズムの解明**
 ○福原忠雄, 勅使河原喬史, 宮原令二, 岡隆司
 (資生堂リサーチセンター)
- P050 **溶液 DNP-NMR の代謝研究への応用**
 ○阿部孝政¹, 久保均², 原田雅史²
 (オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社 MRI/Biotools 事業本部¹
 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部画像情報医学分野²)
- P051 **DOSY 法によるスチレンブタジエン共重合ポリマーの組成/分子量相関解析**
 ○名雪三依, 橋本康博, 吉田和之
 (旭化成株式会社基盤技術研究所)
- P052 **LC-NMR における ¹H-¹H ロングレンジカップリングを利用した微量試料の構造解析例**
 ○中野隆行, 木村一雄, 川口謙
 (東レリサーチセンター生物科学研究部)
- P053 **NMR 滴定法による大環状オリゴキシム金属錯体の構造解析**
 ○田所利雄, 秋根茂久, 鍋島達弥
 (筑波大学大学院数理物質科学研究科)
- P054 **シフト項がある場合の spin-1 核の QCPMG NMR**
 ○飯島隆広, 西村勝之
 (分子科学研究所)

- P055 内部相互作用増幅型 2次元相関 NMR スペクトルの開発
○西村勝之
(分子科学研究所)
- P056 高速試料回転における強/弱 RF パルスの利用
○芦田淳
(パリアン テクノロジーズ ジャパン リミテッド)
- P057 多重パルスと待ち時間を用いたリンギングの抑制
○大橋竜太郎¹, 中井利仁², 清水禎¹
(独立行政法人物質材料研究機構¹, 日本電子²)
- P058 固体 NMR によるバクテリオロドプシンのレチナール異性化に依存した Tyr 残基の動的構造変化の解析
○川村出¹, 田辺純子¹, 西尾拓道¹, 辻暁², 内藤晶¹
(横浜国立大学大学院工学研究院¹, 兵庫県立大学²)
- P059 固体 NMR による阻害剤および脂質膜存在下でのアミロイド線維形成阻害機構の解明
○内藤晶¹, 伊藤ひかり¹, 山根衣寿美¹, 阿部友樹¹, 川村出¹, 上平美弥²
(横浜国立大学大学院工学研究院¹, 東北大学多元物質科学研究所²)
- P060 アンフォテリシン B-ステロール複合体の固体 NMR 解析
松森信明, 梅川雄一, 松下直広, 多原主哲, 土川博史, 山本寛子, 大石徹, ○村田道雄
(大阪大学大学院理学研究科)
- P061 脂質膜上における局所構造の特徴に基づく pleckstrin homology domain-脂質膜間相互作用の解析
○徳田尚美¹, 八木澤仁¹, 福井泰久², 辻暁¹
(兵庫県立大学大学院生命理学研究科¹, 星薬科大学創薬科学研究センター²)
- P062 ポリアニリンおよびその誘導体の¹H MAS NMR
辻重幸¹, 川原晃², ○本多尚^{1,2}
(横浜市立大学国際総合科学部¹, 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科²)
- P063 溶液及び熔融状態から調製した超高分子量ポリエチレンフィルムの延伸/圧縮による単斜晶の生成
○森田翔¹, 攪上将規², 上原宏樹¹, 山延健¹
(群馬大学大学院工学研究科¹, 東京工業大学大学院理工学研究科²)
- P064 ¹²⁹Xe NMR によるゼオライトの吸着特性評価
○佐治修吾, 田中克業, 安達裕子, 河田陽子, 木村敦臣, 藤原英明
(大阪大学大学院医学系研究科)
- P065 生体吸収縫合糸ポリグリコール酸の延伸にともなう構造変化に関する固体 NMR 研究
○関根素馨^{1,2}, 咲山航², 山内一夫², 朝倉哲郎²
(三井化学分析センター材料物性研究部¹, 東京農工大学大学院共生科学技術研究院²)
- P066 ポリ(γ-グルタミン酸)およびそのポリマーブレンドの固体 NMR
前田史郎, ○清水裕太
(福井大院工)
- P067 緩和時間を利用した電解質膜中の水の同定
○大窪貴洋, 貴傳名甲, 大平明博
(産業技術総合研究所固体高分子型燃料電池基盤研究センター)

- P068 高分子結晶中における高分子鎖の領域の軌跡
○三好利一, AL Mamun
(産業技術総合研究所ナノテクノロジー研究部門)
- P069 **Structural Investigation on Amorphous and Crystal Alq3 by Solid-state ²⁷Al MQMAS NMR Spectroscopy**
○西山裕介^{1,3}, 福島達也², 高見浩介², 日下康成², 山崎俊夫³, 梶弘典²
(日本電子¹, 京都大学化学研究所², 理化学研究所ゲノムサイエンスセンター³)
- P070 ¹³C 標識ニトレンジピン光学異性体の分子運動性に及ぼす高分子添加剤の影響
○阿曾幸男, 宮崎玉樹, 川西徹
(国立医薬品食品衛生研究所)
- P071 **SBR の高速 MAS 固体 ¹H NMR**
○堀俊祐, 田中千香子, 浅野敦志, 黒津卓三
(防衛大学校応用化学科)
- P072 ³¹P CP MAS NMR によるナノ粒子表面の修飾有機分子の結合状態
○千葉亮, 林繁信
(産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門)
- P073 高磁場を利用した Sc-45 NMR 測定によるペロブスカイト型プロトン伝導体の構造解析
○安東真理子¹, 及川格¹, 野田泰斗¹, 前川英己¹, 雨澤浩史¹, 清野肇², 丹所正孝³, 清水禎³
(東北大学大学院工学研究科¹, 北海道大学大学院工学研究科², 物質・材料研究機構³)
- P074 ¹H-²⁷Al FSLG HETCOR を用いた Al-MCM-41、シリカアルミナ系触媒の活性点近傍の局所構造解析
○高橋利和, 岩浪克之, 坂倉俊康, 安田弘之
(産業技術総合研究所環境化学技術研究部門)
- P075 超高磁場 21.8 T NMR システムを用いた Ti-Mg 触媒の構造解明
○中井利仁¹, 齋藤雅由², 内海博明¹, 藤田孝², 出口健三³, 大橋竜太郎³, 清水禎³
(日本電子(株)¹, 東邦チタニウム(株)², (独)物質材料研究機構³)
- P076 各種カーボンナノファイバーの分子吸着特性の解析
松尾賢典², ○出田圭子¹, 宮脇仁¹, 齋藤公児³, 持田勲⁴, 尹聖昊¹
(九州大学先導物質化学研究所¹, 九州大学総合理工学府量子プロセス理工学専攻², 新日本製鐵(株)³, 九州大学産学連携センター⁴)
- P077 多核固体 NMR を用いた電気二重層キャパシタにおける電解質イオン挙動の解析
○齋藤正規¹, 金泰坤¹, 張相敏¹, 出田圭子¹, 宮脇仁¹, 齋藤公児², 尹聖昊¹, 持田勲¹
(九州大学先導物質化学研究所¹, 新日本製鐵(株)²)
- P078 固体 NMR を用いた木質材料と各種溶液の相互作用の検討
○杉元宏行¹, 三木恒久¹, 金山公三¹, 西田雅一²
(独立行政法人産業技術総合研究所サステナブルマテリアル研究部門¹, 独立行政法人産業技術総合研究所計測フロンティア研究部門²)
- P079 固体 NMR によるフェリチン結晶の水和水のダイナミクスの研究
○新屋隆士, 宮東達也, 水野元博
(金沢大学大学院自然科学研究科)

- P080 超高温 *in-situ* NMR プロブの開発とガラス材料への応用
 ○金橋康二¹, 山腰良晃², 氣田佳喜²
 (新日本製鐵(株)先端技術研究所¹, 日本電子(株)²)
- P081 固体 NMR によるカテキン類とリン脂質膜との相互作用解析
 ○植草義徳¹, 上平美弥¹, 杉本収¹, 丹治健一¹, 中村浩蔵², 石井剛志¹, 熊澤茂則¹,
 内藤晶³, 中山勉¹
 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科¹, 信州大学農学部²,
 横浜国立大学大学院工学府³)
- P082 固体 NMR によるサーモトロピック液晶 6BA の局所構造解析
 ○鈴木陽^{1,2}, 水野元博¹, 村上美和², 丹所正孝², 清水禎²
 (金沢大学大学院自然科学研究科¹, 物質・材料研究機構²)
- P083 HBAB のネマチック液晶相における固体高分解能 ¹³C NMR
 ○萩原祥子, 藤森裕基
 (日本大学大学院総合基礎科学研究科)
- P084 気体拡散挙動からみた高分子のガラス状態—NMR 法によるデータをもとに
 吉水広明, 神野哲史, ○岡澤誠裕
 (名古屋工業大学大学院工学研究科)
- P085 ポリ 4-メチル-1-ペンテンの結晶相の気体輸送特性と NMR
 吉水広明, 藤原弘文, ○奥村佑生
 (名古屋工業大学大学院工学研究科)
- P086 有機保護基を有する白金ナノ粒子の固体 ¹⁹⁵Pt NMR 測定
 ○小林広和¹, 武田和行¹, 米澤徹²
 (京都大学大学院理学研究科¹, 東京大学大学院理学系研究科²)
- P087 地盤液化モデル系を用いたレイリーテイラー不安定性のMRIによる可視化
 ○石川堯洋¹, 待井豊¹, 安達聖¹, 半田晋也¹, 巨瀬勝美¹, 納口恭明²
 (筑波大学大学院数理物質科学研究科¹, 独立行政法人防災科学技術研究所²)
- P088 MR 画像歪み定量化手法による静磁場分布および勾配磁場分布の評価
 ○半田晋也, 繁木良介, 巨瀬勝美
 (筑波大学大学院数理物質科学研究科)
- P089 分画法を援用したヒト脳組織 T₁ 分布の自動抽出法の検討
 ○高屋展宏, 渡邊英宏, 三森文行
 (国立環境研究所)
- P090 マジックエコー DANTE 法によるスライス選択における横緩和効果
 ○増本秀史¹, 橋本雄幸², 松井茂¹
 (筑波大学大学院数理物質科学研究科¹, 横浜創英短期大学情報学科²)
- P091 NMR マイクロイメージングによるマウスてんかん脳の灌流画像取得
 ○太田千香子, 山本めぐみ, 木村敦臣, 藤原英明
 (大阪大学大学院医学系研究科)
- P092 2D CT-PRESS によるヒト脳内高感度・高分解 *in vivo* ¹H スペクトロスコピー
 ○渡邊英宏, 高屋展宏, 三森文行
 (国立環境研究所)

- P093 唾液成分の個体内/個体間変動による濃度分布
 ○高橋征三¹, 荻野孝史², 山口行治³
 (日本女子大学理学部物質生物科学科¹, 国立精神・神経センター神経研究所², 実行データサイエンス(株)³)
- P094 DNP-NMR を用いた多核 NMR メタボロミクスに関する基礎的研究
 ○平川慶子¹, 阿部孝政², 小池薫³, 佐藤格夫⁴, 増野智彦⁴, 大野曜吉¹
 (日本医科大学 NMR 研究施設¹, オックスフォード・インストゥルメンツ(株)², 京都大学初期診療・救急医学講座³, 日本医科大学救急医学講座⁴)
- P095 In-Cell NMR 法による真核細胞内におけるタンパク質-タンパク質およびタンパク質-低分子薬剤間相互作用の観察への試み
 ○猪股晃介^{1,2}, 大野綾子¹, 朽尾豪人^{1,2}, 磯貝信¹, 天野剛志^{2,3}, 中瀬生彦⁴, 武内敏秀⁴, 二本史朗^{4,5}, 伊藤隆^{2,6}, 廣明秀一^{2,3}, 白川昌宏^{1,2,7}
 (京都大学大学院工学研究科¹, CREST/JST², 神戸大学大学院医学研究科³, 京都大学化学研究所⁴, SORST/JST⁵, 首都大学東京理工学研究科⁶, 理化学研究所横浜研究所⁷)
- P096 ¹⁹F 標識したタンパク質性・低分子化合物プローブを使った In-cell NMR の開発
 ○真板(大野)綾子¹, 朽尾豪人¹, 猪俣晃介¹, 杉原文徳², 菊地和也³, 白川昌宏¹
 (京都大学大学院工学研究科¹, 横浜市立大学大学院総合理学研究科², 大阪大学大学院工学研究科³)
- P097 代謝物同定システム SpinAssign を用いた網羅的メタボローム計測へ向けた戦略
 ○近山英輔¹, 春名英明², 菊地淳^{1,2,3}
 (理化学研究所植物科学研究センター¹, 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科², 名古屋大学大学院生命農学研究科³)
- P098 マウス新生仔尿の NMR-メタボリック・プロファイリング解析
 ○清水悠介^{1,2}, 高橋滋², 須永絵理¹, 青柳俊², 金澤健治¹, 高橋勇二², 根本直¹
 (産総研バイオメディシナル情報解析研究センター¹, 東京薬科大学²)
- P099 ガドリニウム造影剤投与後の持続的スピンラベル法による脳血流計測値の変化
 ○中村和浩¹, 近藤靖¹, 陳国躍², 木下俊文¹
 (秋田県立脳血管研究センター¹, 秋田県立大学システム科学技術学部²)
- P100 機能的食品摂取による腸内環境変動の評価法のための技術開発
 ○中西裕美子¹, 縫島裕美¹, 伊達康博², 加藤完¹, 福田真嗣^{1,3}, 近山英輔⁴, 大野博司^{1,3}, 菊地淳^{1,4,5}
 (横浜市立大学大学院国際総合科学研究科¹, 早稲田大学大学院先進理工学部², 理化学研究所免疫アレルギー研究センター³, 理化学研究所植物科学研究センター⁴, 名古屋大学大学院生命農学研究科⁵)
- P101 シミュレーションによるプローブコイルの性能予測
 ○朴ミンソク¹, 岡田道哉¹, 北口仁²
 (日立製作所日立研究所¹, 物質・材料研究機構²)
- P102 クライオコイル MAS プローブによる固体高分解能 NMR の高感度化
 ○水野敬^{1,4}, 樋岡克哉^{1,4}, 藤岡耕治², 竹腰清乃理^{3,4}
 (日本電子株式会社¹, 株式会社クライオウェア², 京都大学大学院理学研究科³, CREST/JST⁴)

- P103 **新方式 NMR におけるプローブ由来の不整磁場**
 ○田中秀樹¹, 長谷川学¹, 岡田道哉¹, 北口仁²
 (日立製作所日立研究所¹, 物質・材料研究機構²)
- P104 **水素貯蔵材料評価用高温・雰囲気制御 NMR システムの開発**
 ○橋本真一¹, 野田泰斗², 前川英己², 高村仁^{1,2}, 藤戸輝昭³, 池田武義⁴
 (東北大学特定領域研究推進センター¹, 東北大学大学院工学研究科², プローブ工房³, 日本電子⁴)
- P105 **新方式 NMR 用低温プローブの開発 (2)**
 ○一木洋太¹, 川崎健司¹, 福田祐三¹, 山本浩之², 岡田道哉¹, 北口仁³
 (株式会社日立製作所日立研究所¹, 株式会社日立製作所基礎研究所², 独立行政法人物質・材料研究機構³)
- P106 **超 1GHz NMR にむけて; 電源通電モードにおける磁場安定化と 3D NMR 計測**
 柳澤吉紀^{1,2}, 中込秀樹², 細野政美³, 濱田衛⁴, 木吉司⁵, 保母史郎⁶, 山崎俊夫¹, 高橋雅人^{1,6}, ○前田秀明^{1,6}
 (理化学研究所 SSBC¹, 千葉大学大学院工学研究科², 日本電子³, 神戸製鋼⁴, 物質材料研究機構⁵, 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科⁶)
- P107 **改良したハイブリッド磁石を用いた強磁場 NMR の開発**
 ○端健二郎, 清水禎, 藤戸輝昭, 後藤敦, 大木忍
 ((独) 物質・材料研究機構ナノ計測センター)
- P108 **溶液 ³³S NMR 極低温プローブの開発**
 ○保母史郎², 高橋雅人^{1,2}, 斎藤雄太³, 高尾智明³, 前田秀明^{1,2}
 (理化学研究所生命分子システム基盤研究領域¹, 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科², 上智大学大学院理工学研究科³)
- P109 **超偏極 Xe ガス連続生成装置の小型化と ¹²⁹Xe NMR による多孔質材料への Xe ガス吸着解析**
 ○服部峰之, 平賀隆, 早水紀久子, 山本典孝, 浅沼達哉
 (産業技術総合研究所光技術研究部門)
- P110 **半導体における動的核偏極技術の開発**
 ○後藤敦^{1,2}, 清水禎¹, 端健二郎¹, 大木忍¹, 瀧澤智恵子¹
 (独立行政法人物質・材料研究機構ナノ計測センター¹, 独立行政法人科学技術振興機構さきがけ²)
- P111 **A magnetic-field cycling triplet-DNP NMR system**
 ○根来誠¹, 香川晃徳¹, 武田和行², 北川勝浩¹
 (大阪大学大学院基礎工学研究科¹, 京都大学大学院理学研究科²)
- P112 **生体高分子 NMR データバンク BMRB と蛋白質構造データバンク PDB への登録サポートサイト; PDBj-BMRB Website**
 ○原野陽子¹, 中谷英一^{1,2}, 中村春木¹, 阿久津秀雄¹, 藤原敏道¹
 (大阪大学蛋白質研究所¹, 科学技術振興機構-BIRD²)
- P113 **磁気アルキメデス浮上物体における核磁化の力学的寄与**
 ○武田和行
 (京都大学大学院理学研究科化学専攻)

- P114 加硫天然ゴムの FG-MAS を用いたインパース測定による解析手法の検討
○櫻井智司¹, 内海博明¹, 河原成元²
(日本電子株式会社分析機器本部応用研究グループ¹,
長岡技術科学大学工学部物質・材料系²)
- P115 NQR による TNT の非接触検知
○東馬真矢, 糸崎秀夫, 安田大輔
(大阪大学大学院基礎工学研究科)
- P116 SDBS-NMR ~信頼性の高いデータ構築への取り組み~
○鍋島真美, 山路俊樹, 衣笠晋一, 齋藤剛
(産業技術総合研究所計測標準研究部門)
- P117 アルカロイド系分子の NQR 周波数同定
○稲垣大介, 宋宇光, 東馬真矢, 安田大輔, 糸崎秀夫
(大阪大学大学院基礎工学研究科)

口頭発表要旨

Lecture Abstracts



第一日

11月12日(水)

日本語セッション

Day 1 : 12 November, Wednesday

(Japanese session)

(国立環境研¹⁾) ○三森文行, 渡邊英宏, 高屋展宏,

Quantification of ferritin iron in human brain using apparent transverse relaxation rate of the tissue water at 4.7T

(National Institute for Environmental Studies)

F.Mitsumori, H.Watanabe, N.Takaya

We propose a quantification method of ferritin iron ([Fe]) in human brain in vivo using a high linear correlation between [Fe] and the apparent transverse relaxation rate ($R_2^\dagger = 1/T_2^\dagger$) of the tissue water at 4.7T. The estimated [Fe] based on the linear relationship in the 5 grey matter (GM) regions in 54 human subjects revealed a good interregional distribution of [Fe] as well as its age-dependent change as reported previously. Taking into account the contribution of the regional macromolecular fraction (f_M) to R_2^\dagger in addition to that of [Fe], the quantification of [Fe] in GM was significantly improved, and [Fe] in the white matter region was inclusively quantified.

【はじめに】鉄は生体にとって必須の金属元素であり、その欠乏、過剰はさまざまな疾病を引き起こすことが知られている。無セルロプラスミン血症や neuroferritinopathy など脳における鉄代謝異常症が鉄の過剰蓄積から神経変性を引き起こすことは明らかである[1]。パーキンソン病の発症にも鉄の存在が関わる疑いが持たれ[2]、最近の研究ではアルツハイマー病の老人斑を形成するアミロイドβの沈着に酸化還元能を有する鉄や銅イオンが大きく関わるということが明らかになりつつある[3]。フェリチン鉄は生体内最大の鉄の貯蔵形態であり、この鉄量を in vivo で定量することは上述の神経変性疾患の診断や治療にも重要である。我々は平成18年度の本討論会においてヒト脳組織水の見かけの横緩和速度 R_2^\dagger が非ヘム鉄の濃度 [Fe] と高い直線相関 ($R = 0.97$) を示すことを示した[4]。今回は新たに54名の被験者の測定を行い、横緩和速度を用いて脳内のフェリチン鉄濃度をどこまで正確に定量できるか検証する。

【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¹H 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54名(男性26名, 21-71歳、女性28名, 20-64歳)の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、T₁、T₂分布画像等の測定を行った。T₂[†]の測定にはMASE (multi-echo adiabatic spin echo)法を用いた[4]。MASE測定の際には180°パルスには7msのhyperbolic secant型パルスを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名の男女被験者で得られた脳組織水の R_2^\dagger と[Fe]の間の相関関係、

$$R_2^\dagger (s^{-1}) = 0.551 [\text{Fe}] (\text{mg}/100 \text{ g fresh wt.}) + 14.1 (s^{-1}) \quad (1)$$

を新たに測定した54名に適用し、淡蒼球(g.pallidus)、尾状核(caudate)、前頭皮質(fr.cortex)で推定された[Fe]を年齢に対してプロットした結果をFig.1(a)に示す。各部位の[Fe]値はHallgrenらの実測値[5]とよく一致するのみならず、彼らの報告する[Fe]の指数関数的な年齢依存性をも再現した。また、唯一指数関数的上昇を示さず、30歳以降で年齢とともに減少するとされる視床(thalamus)部位での年齢依存性も再現した(Fig.1(b))。この結果は、 R_2^\dagger を用いる脳組織[Fe]推定の高い信頼性を示す。しかし、視床での推定値が実測値を~40%過大評

キーワード：鉄、フェリチン、ヒト脳、T₂[†]緩和速度、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

価する、直線相関からずれる白質には適用できない等の問題点が残る。そこで、新たに測定した54名の内、30歳以上の38名の脳内各部位の横緩和速度の平均値を[Fe]に対して再プロットを行った(Fig.2(a))。この結果を前回の12名の結果(insert)と比べると、(1) R_2^\dagger と[Fe]の間の直線相関の再現性はきわめて高い、(2)各部位の相関直線からのずれは38名群と12名群で完全に一致していることがわかる。(2)は、このずれがランダム誤差ではなく、 R_2^\dagger に影響を与える組織的要因が[Fe]以外にもあることを示唆する。 R_2^\dagger の機構を考えると磁性の大きな[Fe]とともに分子運動の遅い組織内の高分子量分画の寄与が考えられる。そこで、組織内の水(fw)を除く分画を高分子量分画(f_M)と定義し、 $R_2^\dagger = \alpha [Fe] + \beta f_M + \gamma$ (2)

の実験式を用いて、実測 R_2^\dagger の最小2乗フィットを行った。なお、脳組織各部位のfwは文献値を用いた[6, 7]。この結果、 $\alpha = 0.470$, $\beta = 24.9$, $\gamma = 9.54$ を得た。Fig. 2(b)にフィッティング結果を示す。[Fe]だけで説明できなかった白質(fr.WM)も含めて R_2^\dagger はより良い再現が得られている。 R_2^\dagger に占める[Fe]、 f_M 、定数項の寄与を破線で示す。

式(2)と最小2乗で得られたパラメータを用いて実測 R_2^\dagger より[Fe]の再計算を実施した。この結果、各部位で得られた[Fe]の平均値はHallgrenらの実測値と ± 2 mg/100g wet wt以内の良い一致を示し、視床での誤差は0.14 mg/100g f.w.、白質も0.24 mg/100g f.w.の誤差で[Fe]の推定が可能となった。

【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より局所フェリチン鉄濃度をin vivo脳で定量することが可能である。ヒト脳における組織水の横緩和は局所の鉄濃度と高分子量分画の多寡により変化している。

【参考文献】

- [1] Madsen E, Gitlin JD, Annu. Rev. Neurosci. 30, 317, 2007.
- [2] Goetz ME, Double K, Gerlach M, Youdim MBH, Riederer P, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1012, 193, 2004.
- [3] Smith DG, Cappai R, Barnham KJ, Biochim. Biophys. Acta. 1768, 1976-1990, 2007.
- [4] Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Garwood M, Magn. Reson. Med., 58, 1054 (2007).
- [5] Hallgren B, Sourander P, J. Neurochem., 3, 41 (1958).
- [6] Randall LO, J. Biol. Chem., 124, 481 (1938).
- [7] Gelman N, Ewing JR, Corell JM, Spickler EM, Solomon EG, Magn. Reson. Med., 45, 71 (2001).

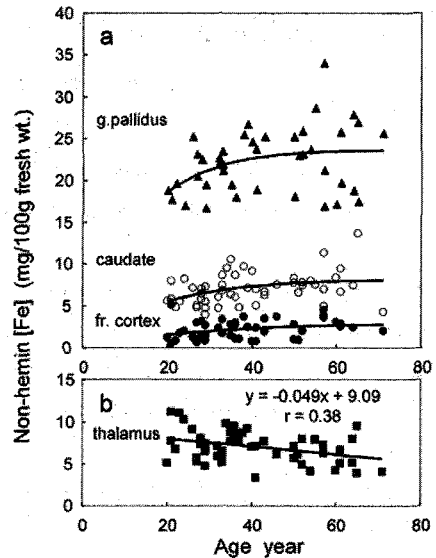


Fig.1. Age-dependent [Fe] changes in four GM regions in 54 human brains estimated from R_2^\dagger of the tissue water using equation 1.

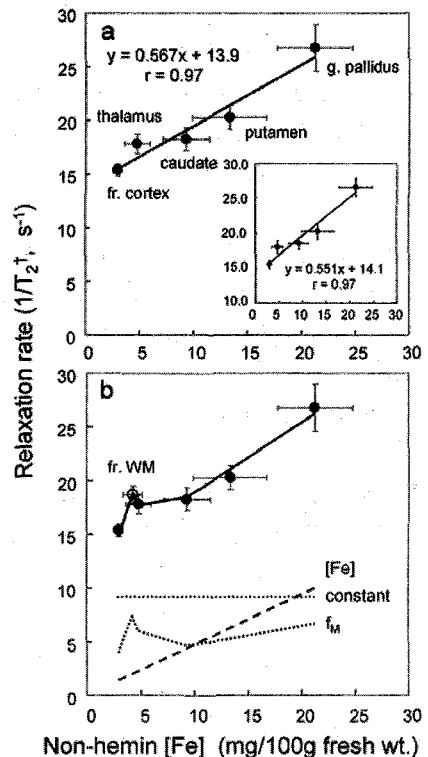


Fig.2. (a) Linear correlation between [Fe] and R_2^\dagger of the tissue water in the brain from 38 subjects over 30 years with that obtained in separate 12 subjects (insert). (b) Least-square fitting results of R_2^\dagger with considering f_M using equation 2.

1L2 遺伝的アルゴリズムを用いた選択励起 RF パルスの最適化

○待井 豊, 石川 堯洋, 半田晋也, 巨瀬 勝美
筑波大学数理物質科学研究科

Selective Excitation RF Pulse Optimization Using the Genetic Algorithm

○Y.Machii, T.Ishikawa, S.Handa, K.Kose Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

Spatially selective inversion property of an RF pulse was optimized using the Genetic Algorithm (GA). Initial amplitude of the RF pulse was expressed as 64 discrete points sampled from the 180° excitation sinc function with $-4\pi \sim +4\pi$ side lobes. The initial RF pulse was evolved according to the GA. The spatially selective inversion property of the RF pulse was evaluated with absolute difference between the profile of the longitudinal magnetization for an ideal (trapezoidal) inversion pulse and that for the designed RF pulse. As a result, an optimized RF pulse with the inversion property better than that obtained from the Shinnar-Le Roux pulse. Therefore, it was concluded that the GA was a useful approach to design of selective excitation pulses.

1. はじめに

MRIでは選択励起パルスとして sinc パルス等が広く用いられているが[1], sinc パルスの 180° 選択励起特性は理想的なものとは言えない. 180° 選択励起特性の優れたパルスとして, デジタルフィルタ設計問題を用いて設計された Shinnar-Le Roux パルス (SLR パルス) が提案されているが [3], 本研究では別のアプローチとして遺伝的アルゴリズム (GA) を用いて 180° 選択励起特性の優れたパルスの設計を試みた.

2. 遺伝的アルゴリズム (Genetic Algorithm:GA) とは

GA とは 1975 年にミシガン大学の John Holland によって提案された最適解を探索するアルゴリズムである. GA では解の候補を遺伝子で表現し, 選択・交叉・突然変異などの操作を繰り返しながら解を探索する. GA は評価関数の可微分性や単峰性などの知識がない場合であっても, 適用可能な非線形最適化手法である.

3. 選択励起 RF パルスの設計方法

選択励起 RF パルスの遺伝子の表現方法として, 32 点の数値 (パルス強度) の並びを一個体とした. 一つの数値は $-5.00 \sim 25.00$ の値で, 精度は小数点第 2 桁までとし, またコード化には Gray コードを用いた. 180° 選択励起特性を評価する際, パルス波形の対称性から 32 点の数値の並びを対称に折り返したものを後に続け 64 点の数値の並びにし, さらに評価値の計算精度を向上させるために 1280 点に補間を行った. MRI 装置に実装する際は 256 点を標準化したパルスを使用した. 180° 選択励起特性の評価には, 核磁化の台形状の反転分布と得られた RF パルスから作られる縦磁化の分布との差の絶対値を各点に関して加えたものを評価値とした. 縦磁化の分布は, Bloch 方

キーワード: 遺伝的アルゴリズム, Shinnar-Le Roux パルス, 180° 選択励起特性

著者: まちい ゆたか, いしかわ たかひろ, はんだ しんや, こせ かつみ

程式をルンゲ・クッタ法により緩和時間を無視して解くことにより求めた。台形状の分布としては SLR パルスとの比較のため、同様のバンド幅 3.75kHz で、立ち上がり特性は SLR パルスと同じものと向上させたものの 2 種類の台形を使用した。初期個体群は 20 個の sinc パルス ($\pm 4\pi$) とし、選択・交叉・突然変異を何度も繰り返すことにより、 180° 選択励起特性の優れた選択励起 RF パルスを得た。

4. 設計結果

Fig.1, Fig.2, Fig.3 に sinc パルスと GA により設計した GA パルス, SLR パルスのそれぞれの波形と計算によって求めたその 180° 選択励起特性のグラフを示す。

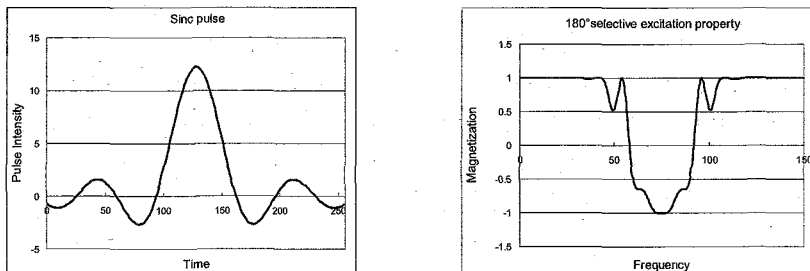


Fig.1 Pulse shape and spatially selective inversion profile of the 180° sinc function

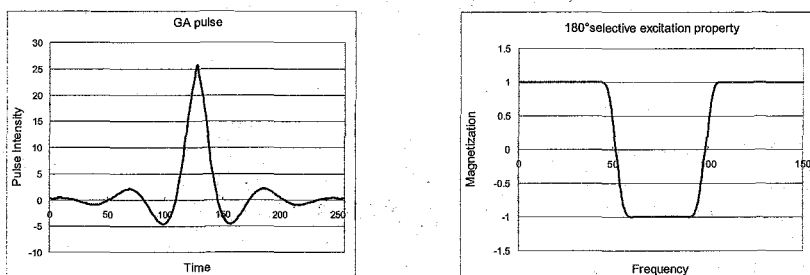


Fig.2 Pulse shape and spatially selective inversion profile of the GA pulse

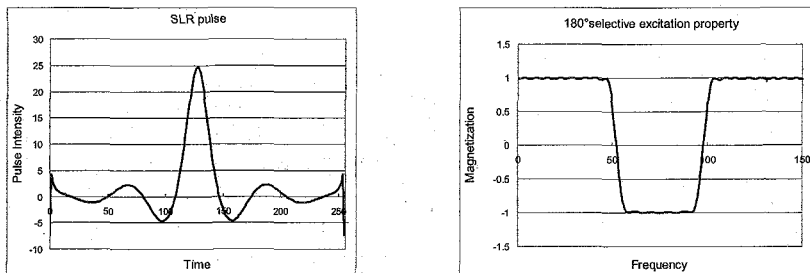


Fig.3 Pulse shape and spatially selective inversion profile of the SLR pulse

Fig.4 に GA パルスにおいて 180° 選択励起特性の立ち上がり特性を向上させたパルス (立ち上がり幅と励起幅の比は Fig.2 の GA パルス : 約 69%, Fig.4 の GA パルス : 約 77%) の波形とその 180° 選択励起特性のグラフを示す。

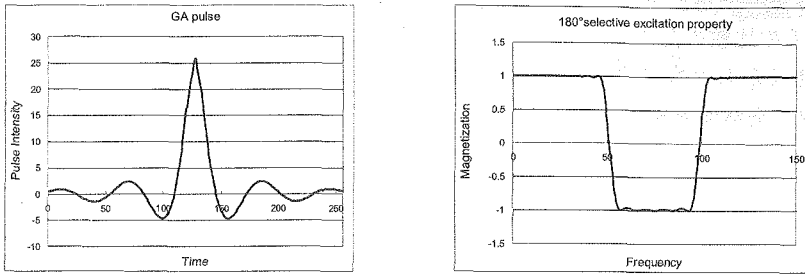


Fig.4 Pulse shape and spatially selective inversion profile of the GA pulse (77%)

Fig.1～3 より, GA により得られたパルス波形は, SLR パルスの波形の両端のローブを無くしたような波形となっており, また, パルス強度は sinc パルスの約 2 倍の強度を必要としていることが分かる. また, 180° 選択励起特性としては, SLR パルスで見られていたリップルが消滅したものが得られた. Fig.4 より, GA パルスにおいて 180° 選択励起特性の立ち上がり特性を向上させると 180° 選択励起特性上にリップルが発生していることが分かる.

5. 実装によるパルスの評価

Fig.5 に Fig.1～4 で示した sinc パルス, GA パルス (立ち上がり特性約 69%と約 70%), SLR パルスを MRI 装置に実装し, 180° 選択励起を行った後の画像と, そのスライス面に垂直な方向のプロファイルを示す.

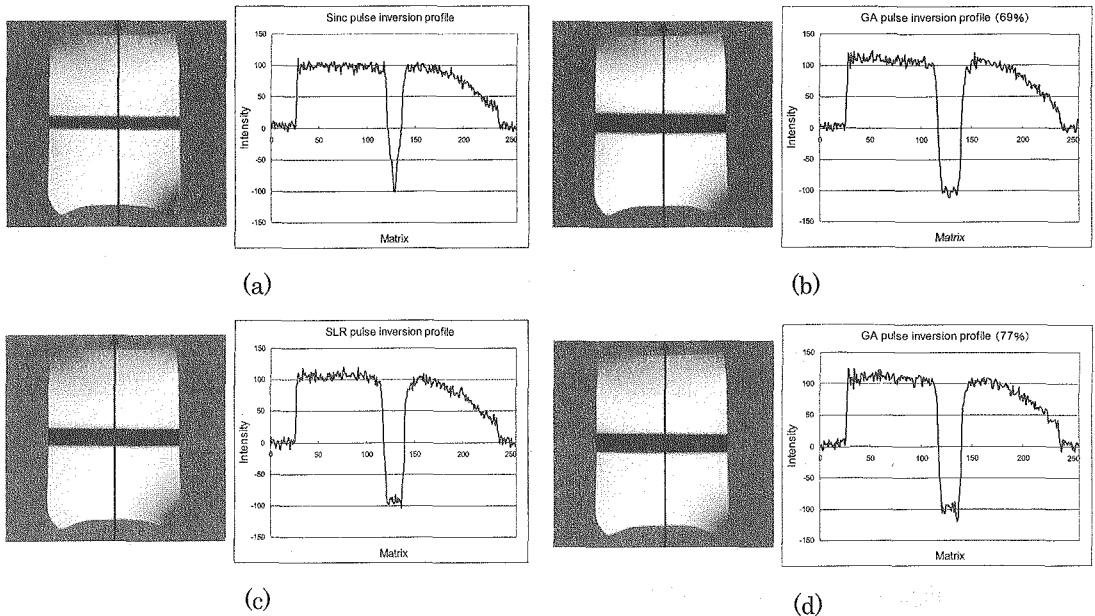


Fig.5 MR images acquired after 180° selective excitation and their profiles
(a) sinc pulse, (b) GA pulse (69%), (c) SLR pulse, (d) GA pulse (77%)

Fig.6には、それぞれの180°パルスをリード勾配をかけながら印加することにより、リフォーカス特性を計測した画像とそのプロファイルを示す。また、Table.1には上記のリフォーカス特性を評価するため、それぞれのパルスを用いて、スピネコー法において90°非選択励起パルスの後に180°パルス印加し、スライス選択を行った画像のSNRを比較した結果を示す。このようにGAで設計したパルスで高いSNRが得られた。

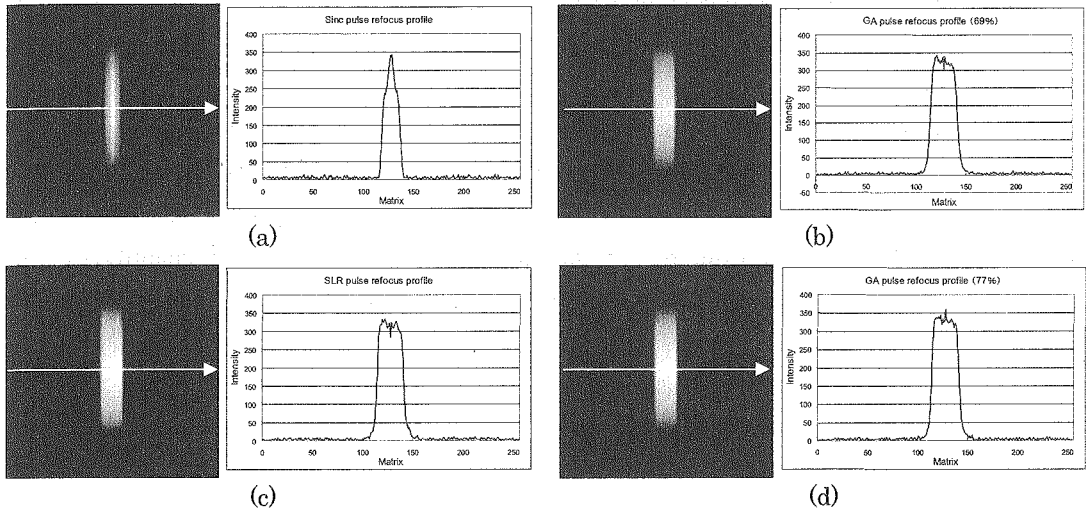


Fig.6 MR images acquired with 180° refocusing pulses and their profiles
(a) sinc pulse, (b) GA pulse (69%), (c) SLR pulse, (d) GA pulse (77%)

Table.1 SNR of MR images acquired with 180° refocusing pulses

	sinc pulse	GA pulse (69%)	SLR pulse	GA pulse (77%)
SNR	31.1	50.7	48.2	53.0

6. 結語

GAを用いることにより、sincパルスよりも180°選択励起特性の優れたパルスを設計することに成功した。得られたパルス波形はSLRパルスの波形と類似したものとなった。このRFパルスをMRI装置に実装し180°選択励起特性とリフォーカス特性を評価すると、計算機シミュレーションとほぼ一致する、sincパルスよりも良好な特性が得られた。今後はGAプログラムの更なる改良と共に、GAの自由度を活かし、様々なパラメータを変えたパルスの作成、また、マルチスライス法、マルチエコー法、高速スピネコー法等への実装を行う予定である。

参考文献

- [1] NMR イメージング, 巨瀬勝美: 共立出版, (2004)
- [2] 坂和正敏, 田中雅博, 遺伝的アルゴリズム, 朝倉書店, 1995
- [3] John Pauly, Parrick Le Roux, Dwight Nishimura, Albert Macovski, "Parameter Relations for the Shinnar-Le Roux Selective Excitation Pulse Design Algorithm" IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING, VOL.10, NO.1, MARCH 1991

Sealing Test of Magic-Angle-Spinning Rotors in Solid-State NMR

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

Shigenobu Hayashi

Several methods are proposed to check the sealing of the magic-angle-spinning (MAS) rotor: Intrusion of moisture into the MAS rotor is checked by moisture-sensitive materials. Trimethylphosphine oxide is highly hygroscopic, and its hydrated form is separately observed in ^{31}P MAS NMR spectra from the crystalline (anhydrous) form. The quantity of the hydrated form can be evaluated from its signal intensity. ^1H MAS NMR can monitor the hydrated form, the crystalline form, and adsorbed water independently. Gas leakage from the MAS rotor is monitored by measuring ^{129}Xe MAS NMR spectra of xenon (Xe) confined in zeolites. The Xe pressure in the gas phase is estimated from the ^{129}Xe chemical shift of Xe in zeolites. Leakage of helium (He) gas is monitored by tracing ^3He MAS NMR spectra of ^3He gas. The signal intensity is monitored as a function of time.

【序】現在多くの分野でマジック角回転法を用いた固体高分解能 NMR 測定が行われている。試料の中には、空気中の湿気や酸素と容易に反応してしまう物質もある。試料を空気中の湿気や酸素と接触しないようにする試みは古くから行われているが、試料を密封して、かつ、MAS ローターを安定に高速回転させるのは手間のかかる作業である。本研究では、MAS ローターがどの程度の気密性を持っているのかを定量的に確認する方法をいくつか提案して、実際の測定に使われている MAS ローターの気密性をテストした。潮解性物質、キセノンガス、ヘリウム-3 ガスなどを用いて、ローター内部の状態を非接触で NMR 観測することにより、気密性をテストした。

【実験】 ^{31}P 、 ^1H 、 ^{129}Xe MAS NMR 測定は、Bruker ASX400 (共鳴周波数 ^{31}P : 161.98 MHz、 ^1H : 400.13 MHz、 ^{129}Xe : 110.68 MHz) を用いて行った。 ^3He MAS NMR 測定には、Bruker ASX200 (152.46 MHz) を用いた。

【結果・考察】MAS ローターへの湿気の侵入のテストには湿気に敏感な物質を用いた。トリメチルホスフィンオキシド (TMPO; $(\text{CH}_3)_3\text{P}=\text{O}$) は潮解性化合物である。空気中で迅速に MAS ローターに充填して測定した ^{31}P MAS NMR スペクトルを Fig. 1A に示した。44.9 ppm と 42.0 ppm にシグナルが観測された。前者は水和物、後者は無

MAS ローター、気密性、潮解性物質、キセノン、ヘリウム

はやし しげのぶ

水結晶に帰属される。空気中では容易に水和することがわかる。真空乾燥すると 44.9 ppm のシグナルが消失した。MAS ローターに充填したまま水和物のシグナル強度の時間変化を測定することによって湿気の侵入を観測できる。Fig. 1B に乾燥試料を充填してから 48 日間後のスペクトルを示した。44.9 ppm にごくわずかのシグナルが認められるが、このシグナルは当初から存在し、水和物の増加は確認されなかった。¹H MAS NMR スペクトルからは、無水結晶、水和物、吸着水分子を区別して観測することができ、48 日後の試料において吸着水分子のわずかな増加を観測した。

ゼオライトの細孔中の Xe の ¹²⁹Xe MAS NMR スペクトルを測定することにより、MAS ローターからの気体の漏れを調べた。Fig. 2A に、Xe ガスを導入した NaY5.3 ゼオライトのスペクトルを示した。101.6 ppm にシグナルが観測された。19 日後には 100.5 ppm にシグナルがシフトした (Fig. 2C)。静止試料を用いて、¹²⁹Xe 化学シフトの気相圧依存性を測定して検量線を作成した。この検量線から、101.6 ppm、100.5 ppm のシフト値は 108.4 kPa、106.0 kPa の気相圧に相当した。19 日間で 2.4 kPa 減少したことになる。さらに、ヘリウムガスを用い MAS ローターからの漏れを調べた。MAS ローターに ³He ガスを導入して ³He MAS NMR スペクトルを測定し、シグナル強度の時間変化を追った。2 日間で約 10% のガスが流出した。

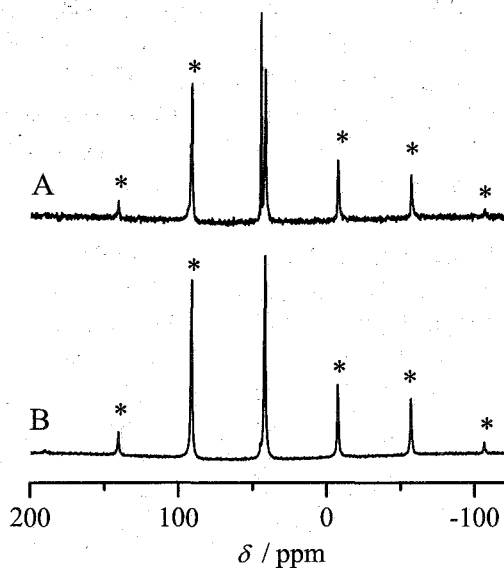


Fig. 1 ³¹P MAS NMR spectra of trimethylphosphine oxide. (A) A partially hydrated sample and (B) a sample kept in a rotor for 48 days after packing a dried sample. The marks * show spinning sidebands.

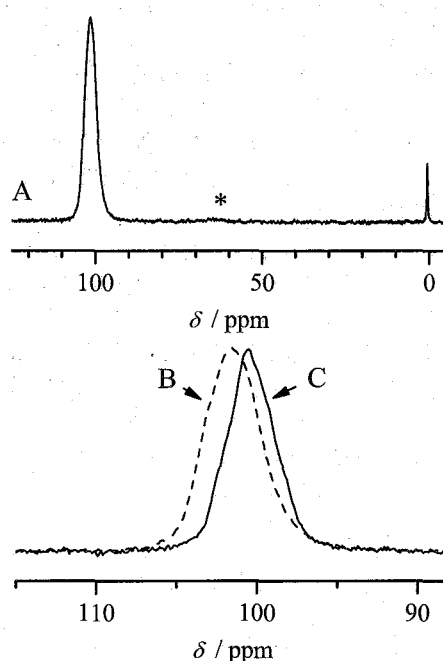


Fig. 2 ¹²⁹Xe MAS NMR spectra of NaY5.3 zeolite loaded with Xe gas; (A, B) immediately after the capping, and (C) after 19 days. The mark * shows a spinning sideband.

1L4 H^+ -ATP 合成酵素サブユニット c -リングと脂質膜の相互作用
(阪大蛋白研¹、アリゾナ大²) 小林将俊¹、戸所泰人¹、A. V. Struts²、
藤原敏道¹、M. F. Brown²、○阿久津秀雄¹

Interaction of H^+ -ATP synthase Subunit c -ring with Lipid Membrane
(IPR, Osaka Univ.¹, Univ. Arizona²) Toshimasa Kobayashi¹, Yasuto Todokoro¹,
A. V. Struts², Toshimichi Fujiwara¹, M. F. Brown² and Hideo Akutsu¹

The F_1F_0 -ATP synthase utilizes the transmembrane H^+ gradient for the synthesis of ATP. F_0 subunit c -ring plays a key role in transporting H^+ through F_0 in the membrane. We investigated the interactions of *E. coli* subunit c with dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC- d_{54}) at lipid/protein ratios of 50:1 and 20:1 by means of 2H solid-state NMR. In the liquid-crystalline state, the 2H NMR moment and the order parameter were little affected by the presence of c -ring, suggesting a matching of the bilayer thickness to the transmembrane hydrophobic surface of c -ring. Moreover, the viscoelasticity was also little influenced by c -ring. These findings may be important for the torque generation in the rotary catalytic mechanism of the F_1F_0 motor.

<はじめに>

H^+ -ATP 合成酵素は生体エネルギー変換系の最後に位置する重要なタンパク質複合体で、約 500 kDa の巨大な膜酵素である。膜に形成されたプロトン濃度勾配を用いて ATP を合成するが、そこでは回転触媒機構が働いている。この酵素は ATP を合成する水溶性の F_1 と膜に埋まった疎水性の F_0 からなる。 F_0 においては c サブユニットからなるリングがプロトン移動に共役して回転する。 F_0 全体の結晶構造はまだ報告されていない。サブユニット c 単体の溶液構造については Girvin およびわれわれのグループが大腸菌、および好熱菌について報告している。われわれは現在、膜に再構成された c -リングに注目して固体 NMR による解析に取り組んでいる。

<実験>

本研究では大腸菌の c サブユニット (EF_0c) を大量発現させて、精製して実験に用いた。 c サブユニットが脂質膜に再構成されたときにリング構造を取るかどうかをまず確認する必要がある。そこで、膜に再構成する直前の界面活性剤オクチルグルコシドミセル中の沈降速度を調べたところ、均一な沈降係数を示すバンドが主成分であった。界面活性剤中で EF_0c はリング構造を取ることが既に電子顕微鏡で確かめられているので、このオリゴマー構造はリング構造を取っていると考えて研究を進めた。 EF_0c /脂質膜の再構成には、脂肪酸部分が重水素化された L -ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC- d_{54}) を用いた。再構成の際のタンパク質と脂質のモル比は 1:50, 1:20 である。これらの膜の超遠心沈殿物を NMR 測定試料とした。測定にはバリアン CMX 500 Infinity plus 固体 NMR 装置を用いた。

<結果と考察>

プロトン移動とリング回転の共役がどのような機構で行われるにしても c -リングは脂質膜の中を回らなければならない。したがって、両者の間にどのようなエネルギー損失が出るかは重要な問題である。そこでわれわれは固体重水素 NMR を用いて c -リ

Key words: F_1F_0 -ATP synthase, subunit c -ring, 2H -NMR, hydrophobic matching

こばやし、とどころ、ストラッツ、ふじわら、ブラウン、あくつ

ングと脂質膜の相互作用を調べた(1)。さまざまな膜試料の液晶状態(30°C)での固体重水素 NMR 粉末スペクトルを Fig. 1a に示す。重水素核はスピン量子数が1であるので四極子相互作用によって、対称的な粉末スペクトルを与える。四極子分裂はC-D結合の秩序パラメータ S_{CD} と関係づけられる。

重水素化ミリスチン酸は12個の CD_2 と一つの CD_3 を持つ。DMPCには2本のミリスチン酸が含まれている。これら由来のシグナルが全て重なって見えるために複雑になっている。中央付近の鋭いシグナルはメチル由来のものである。温度が15°C以下のゲル状態ではスペクトル全体がブロードになる。液晶状態ではメチレン基のシグナルは全て帰属されている。四極子分裂から求めた脂肪酸の各炭素位置での秩序パラメータを三つの試料と比較するとタンパク質の影響はほとんど見られない(Fig. 1b)。ゲル状態では各メチレン基由来のシグナルは線幅が広がるため分離して観測されない。しかし、タンパク質の存在下では純粋な脂質膜に比較して明らかにスペクトル幅が狭くなっていた。これは c -リングの存在が液晶状態では脂質の揺らぎに大きな影響を与えていないが、ゲル状態ではその秩序構造を乱していることを示す。ゲル状態では脂質膜の厚さが大きくなるためにタンパク質の疎水性領域の厚さとの間で

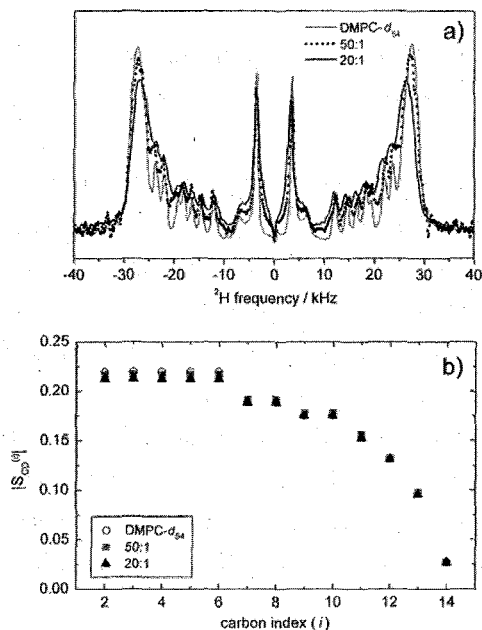


Fig. 1 (a) De-Paked 2H NMR spectra of DMPC- d_{54} and DMPC- d_{54} /subunit at 30°C. (b) The segmental order parameter of C- 2H bond in the fatty acid chains at 30°C.

ミスマッチを起こすものと考えられる。

動的性質への影響を見るために各炭素部位での縦緩和速度の測定も行った。これには若干の違いが見られるがやはりタンパク質の影響は小さい。縦緩和速度を秩序パラメータの二乗に対してプロットするとその傾きは膜の粘弾性(一定の数の脂質分子集団の性質)によって変化する。Fig. 2aにそのプロットを示す。DMPC膜にコレステロールを加えて固くした場合と非イオン性界面活性剤を加えて柔らかくした場合を合わせて示してある。この場合は傾きが大きく変わる。これらと比較すると、 c -リングの存在は膜の弾性的な柔らかさにもほとんど影響を与えないと結論できる。

以上の結果は液晶状態にあるDMPC程度の厚さの膜ではサブユニット c -リングと脂質の関係は非常にマッチングがよく(Fig. 2b)、脂質膜中での c -リングの回転はスムーズであると考えられる。

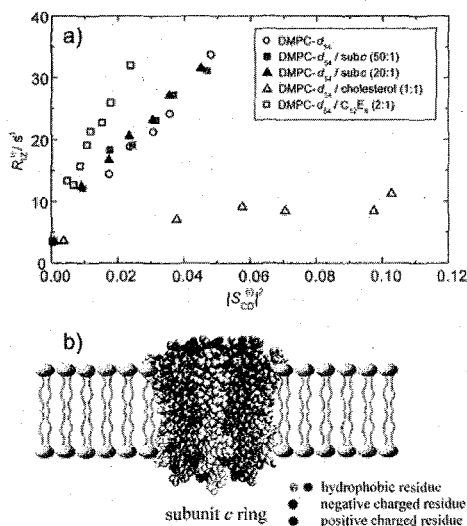


Fig. 2 (a) R_{1z} plots as a function of $|S_{CD}|^2$ for DMPC- d_{54} , DMPC- d_{54} /subunit c (50:1), and DMPC- d_{54} /subunit c (20:1) membranes at 30°C. Reference data are also presented. (b) A schematic model of the c -ring in lipid bilayers in the liquid-crystalline state.

(1) Kobayashi, M., et al. (2008) *Biophys. J.* **94**, 4339

ZZ exchange 法による“見えない”分子間
相互作用のダイナミクス解析
サントリー生有研・第1研究部 ○菅瀬謙治

Probing “invisible” molecular interactions by ZZ-exchange spectroscopy
Div. of Spectrosc. Struct. Res., Suntory Inst. for Bioorg. Res., Kenji Sugase

We have developed a new method to analyze dynamics of molecular interactions utilizing ZZ-exchange spectroscopy and applied it to binding of the B1 domain of protein G (GB1) to immunoglobulin G (IgG). A prerequisite for ZZ-exchange experiments is that both free and bound resonances are observable at the same time, but no NMR signal was observed for the bound state of GB1 due to its high molecular weight in complex with IgG, meaning that GB1-IgG interaction is “invisible” to NMR. However, we could determine the association and dissociation rates by analyzing ZZ-exchange profiles of free GB1 resonances collected with samples containing no IgG or sub-stoichiometric amounts of IgG. This method is potentially applicable to a wide range of biomolecular interactions, especially in the rather common case where bound signals are unobservable due to high molecular weights or intermediate exchange.

緒言

近年、生体分子の機能を詳細に理解するためには、ダイナミクス解析が不可欠と認知されつつある。そして現在のところ、そのための手法として緩和分散法が最もパワフルなダイナミクス解析法として名声を得ている^{1,2)}。しかしながら、緩和分散法は、大きな化学シフト変化(構造変化)を伴う反応を解析するための手法であるため測定対象を限定する。たとえば分子間相互作用の場合、結合に伴う化学シフト変化が非常に小さい球状タンパク質や交換速度が非常に遅い(結合が非常に強い)系を苦手とする。そこで、本研究では、緩和分散法よりも遅い時間領域を扱うことができ、かつ化学シフト変化を必要としない ZZ-exchange 法³⁾を利用して、分子間相互作用のダイナミクスを解析するための新規方法論を開発した。従来の ZZ-exchange 実験では、遊離状態と結合状態の NMR シグナルが同時に観測されることを前提条件とするが、今回開発した手法では、ZZ-exchange カーブの濃度比依存性を解析することにより、結合状態の NMR シグナルなしでも解析を可能とした。この手法を免疫グロブリン G (IgG) に結合するプロテイン G の B1 ドメイン (GB1) に適用し、結合速度定数 k_{on} と解離速度定数 k_{off} の決定に成功した。なお GB1 の結合状態の NMR シグナルは、見かけの分子量が非常に大きいため観測できなかった。さらに緩和分散法では、GB1 の構造変化が小さく、かつ結合-解離速度が遅すぎるため、GB1-IgG 相互作用を解析できなかった。

ZZ-exchange 法、緩和分散法、分子間相互作用、ダイナミクス

すがせけんじ

理論

ZZ-exchange 法は縦緩和速度実験であるため、化学シフトの影響を受けない。さらに生体高分子の場合、縦緩和速度は横緩和速度よりも遅いため、ZZ-exchange 法では、緩和分散法（横緩和速度実験）よりも遅い時間領域のダイナミクスを解析できる。すなわち、ZZ-exchange 法を用いると、緩和分散法が苦手とする球状タンパク質の結合イベントや非常に結合の強い系を解析できる。ただし、従来の ZZ-exchange 実験では、カーブフィッティングにより得られる解を1つに絞るため、遊離状態と結合状態の NMR シグナルに加えて2つの交換シグナル（遊離→結合、結合→遊離）から得られる4つ（少なくとも3つ）の ZZ-exchange プロファイルが必要とする³⁾。ゆえに、分子量の制限などの理由から結合状態のシグナルが観測不可能な場合、交換シグナルも観測不可能なため、ZZ-exchange 法を用いることができない。しかし、遊離シグナルの ZZ-exchange プロファイル $I_F(t)$ は、2状態モデル ($A + B \leftrightarrow A:B$) の場合、以下の式で示すようにタンパク質の濃度 $[A]_0$ と $[B]_0$ に依存する。さらに $[B]_0$ を 0 に設定すると、 $I_F(t)$ は遊離状態の縦緩和速度 R_{1F}^0 だけにより決定される ($I_F(t) = I_F(0)\exp(-R_{1F}^0 t)$)。

$$I_F(t) = \frac{1}{\lambda_+ - \lambda_-} \left[(\lambda_+ - R_{1F}^0 - [B]k_{on}) \exp(-\lambda_+ t) - (\lambda_- - R_{1F}^0 - [B]k_{on}) \exp(-\lambda_- t) \right] I_F(0)$$

$$\lambda_{\pm} = \frac{1}{2} \left[R_{1F}^0 + R_{1B}^0 + [B]k_{on} + k_{off} \pm \sqrt{(R_{1F}^0 - R_{1B}^0 + [B]k_{on} - k_{off})^2 + 4[B]k_{on}k_{off}} \right] \quad (1)$$

$$[B] = \frac{1}{2} \left[-K_D - [A]_0 + [B]_0 + \sqrt{(K_D + [A]_0 - [B]_0)^2 + 4[B]_0 K_D} \right]$$

したがって、ターゲット分子を含まない完全な遊離状態のサンプルと、ターゲット分子をわずかに加えたサンプルを複数調整して ZZ-exchange 実験を行い、得られた遊離シグナルの ZZ-exchange プロファイルを式(1)で解析することによって、結合速度定数 k_{on} と解離速度定数 k_{off} 、延いては解離定数 $K_D (= k_{off}/k_{on})$ を決定することができる。

実験

GB1 (56 残基) は IgG 中に 2 つ存在する Fc 領域それぞれに 1 分子ずつ結合する。遊離状態では、上質な NMR スペクトルを得ることができたが、IgG 結合状態では、見かけの分子量 (~160 kDa) が非常に大きくなることもさることながら、IgG 過剰時に生じる非特異的な相互作用のために粘性が高くなり、結合状態の NMR シグナルはほぼ何も観測されなかった (Fig. 1)。

上述した原理に基づいて、

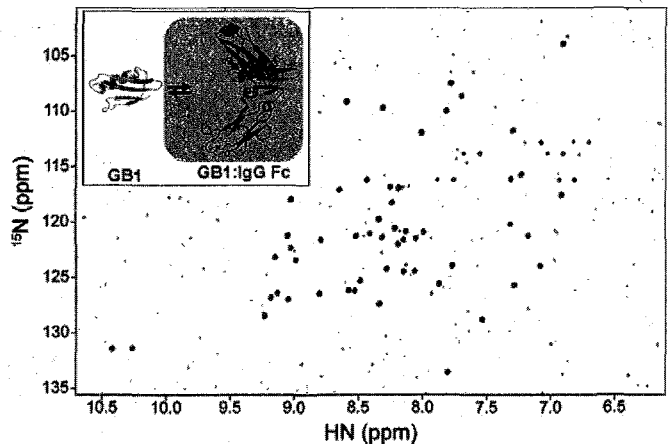


Fig. 1 TROSY spectra of GB1. The free form is shown in black and the bound form in gray. They were collected with Bruker Avance 750 with a cryo-probe at 298 K. The inset represents a schematic model of GB1-IgG interaction, in which only the Fc fragment of IgG is shown. The gray background depicts that this interaction is “invisible” to NMR since GB1 bound resonances are unobservable.

200 μM の $[\text{}^2\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -GB1 に対して、0, 0.1, 0.2, 0.3 等量の非標識 IgG を加えたサンプルを調整し、ZZ-exchange 実験を行った。Fig. 2 に GB1 遊離シグナルの ZZ-exchange プロファイルを示す。開始 Met1 を除く全ての残基に対して、濃度比依存的に変化する ZZ-exchange カーブを得ることができた。一方で、結合状態のシグナルと2つの交換シグナルは、何も観測されなかった。

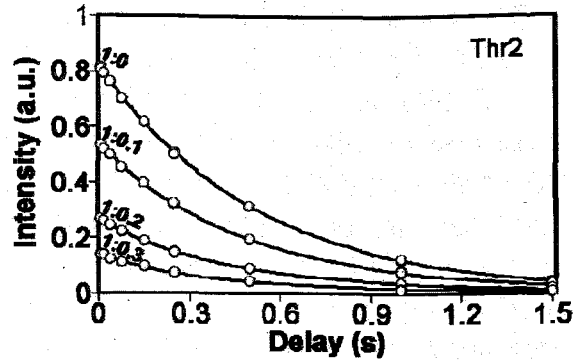


Fig. 2 ZZ-exchange profiles of free GB1 resonances. The annotation for each ZZ-exchange curve represents GB1:IgG concentration ratio.

1:0(=GB1:IgG)のサンプルは、GB1の完全な遊離状態であるため、そのZZ-exchange プロファイルは縦緩和速度 R_{1F}^0 だけにより決定される。それ以外のサンプルでは、 R_{1F}^0 に結合-解離の速度が加わったため、見かけの縦緩和速度が速くなっている。

なお、同じサンプルで緩和分散実験も行ったが、得られた緩和分散カーブは全てフラットな直線で、GB1-IgG 相互作用のダイナミクスを解析するに至らなかった。

結果

Peter E. Wright 教授(The Scripps Research Institute, San Diego)から提供していただいた緩和分散カーブフィッティング用プログラム GLOVE^{1,2)}に式(1)を組み込み、GB1のZZ-exchange カーブの解析を行った。この際に、GB1とIgGの濃度および k_{on} と k_{off} を全ての残基に共通なグローバルパラメータとしてフィッティングを行った。結果、 $k_{on} = 1.55 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 2.20 \text{ s}^{-1}$, $K_D = 142.3 \text{ nM}$ と決定することができた。 K_D は等温滴定カロリメトリーにより決定されたものと良い一致を得た。また、この結果からGB1-IgG相互作用の結合-解離速度は、本実験の条件では、高々 3.2 s^{-1} であることが分かった。ゆえに、この相互作用のダイナミクスは、結合に伴う化学シフト変化が小さいだけでなく、交換速度が遅すぎるため緩和分散法では解析できないことが分かった。

次に比較のために、それぞれのZZ-exchange カーブを個別に R_1 実験の式 $I(t) = I(0)\exp(-R_1 t)$ でフィッティングを行ったが、赤池の情報量基準から、式(1)の方が 5.30×10^{47} 倍もっともらしいと言う結果になった。

考察

NMR で分子間相互作用を解析する際に、結合状態のシグナルが観測できないという状況に頻繁に遭遇する。その原因としては、(1)片方の分子を大量に調整できないため結合状態の存在比を上げられない (2)片方(または両方)の分子を過剰に加えると凝集を起こす (3)結合状態の分子量が大きすぎるためシグナルが広幅化する (4)結合-遊離の化学交換により結合状態のシグナルが広幅化する、と言ったことが挙げられる。このような場合でも、わずかにターゲット分子を加えたサンプルであれば、遊離状態のシグナルを観測で

きる場合がある。このようなサンプルでは、たとえ結合状態のシグナルが観測不可能でも、観測可能な遊離状態のシグナルの緩和には、結合-解離の情報も含むため、緩和実験からその相互作用のダイナミクスを解析することができる。本研究では、この考えに基づき、さらに ZZ-exchange 法の特性を活かして、緩和分散法が苦手とする系でも解析できる新規方法論を開発した。緩和分散法だけであれば、解析できる分子間相互作用はペプチドや天然変性タンパク質などの結合に伴う構造(化学シフト)変化が大きいものだけに限られてしまうが、今回開発した手法が加わることにより、広範な分子間相互作用を解析することが可能になったと言える。

参考文献

1. Sugase, K., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2007) *Nature* **447**, 1021-1025.
2. Sugase, K., Lansing, J. C., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13406-13407.
3. Farrow, N. A., Zhang, O., Forman-Kay, J. D., & Kay, L. E. (1994) *J. Biomol. NMR* **4**, 727-734.

¹奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科, ²首都大学東京戦略研究センター, ³三菱化学生命科学研究所
Jee, JunGoo^{1,2}, 西ヶ谷有輝¹, 田中利好³, 河野俊之³, ○児嶋長次郎¹

Extremely sensitive NMR method for protein structure determination

¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, ²Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, ³Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS).

JunGoo Jee^{1,2}, Yuki Nishigaya¹, Rikou Tanaka³, Toshiyuki Kohno³ and ○Chojiro Kojima¹

NMR is one of the most powerful methods to determine the protein structure. However, for NMR structure determination high concentration sample ~ 1 mM is required. Recently developed non-linear sampling method can reduce the measuring time keeping the spectral resolution. Here we applied this non-linear sampling method to the multidimensional NMR data acquisition to reduce the measurement time, and very nice 3D spectra were obtained for 20 kDa protein at 0.017 mM concentration. With the aid of amino acid selective labeling, the backbone signals of this protein were completely assigned. This information is very useful for NMR structure determination and NMR perturbation experiments. Thus the non-linear sampling method reported here will be useful for most protein samples, especially for triple-resonance experiments for very low concentration samples.

はじめに

NMR法とX線結晶解析法はタンパク質の立体構造を決定する主要な技術として広く認知されている。近年のNMR技術、特に構造解析ソフトウェアの急激な進歩により、ペプチドや比較的小きなタンパク質の立体構造決定ではNMR法がX線結晶解析法より優れていると考えられるようになってきた。実際に構造ゲノムプロジェクトにおいては分子量2万を境にNMR法とX線結晶解析法が使い分けられている。分子量2万以上のタンパク質の立体構造決定においてNMR法が抱える問題は、サンプル濃度と信号の重なりである。

タンパク質のNMR構造解析においては一般に濃厚溶液が必要である。目安として、主鎖帰属で0.1-0.5 mM程度、立体構造決定で1 mM程度のサンプルが必要であり、分子量10万のタンパク質の立体構造決定では100 mg/ml (10%)濃度に達する。生物学的に重要なタンパク質の多くが会合性であることを考えると、1 mg/ml程度のタンパク質濃度が現実的な上限であろう。そこで大きなタンパク質の立体構造決定をNMR法でルーチン的に実施するためには、既存法の100倍高い感度での構造決定技術の開発が必要となる。

キーワード: 非線形サンプリング、MaxEnt、アミノ酸選択標識

ビー じゅんぐー、にしがや ゆうき、たなかりこう、こうの としゆき、こじま ちょうじろう

NMR法では分子量に比例して信号数が増えるため、高分子量タンパク質では信号の重なりは極めて深刻な問題である。信号の重なりを解決する手法としては、安定同位体標識技術が広く知られている。そこで今回我々は、0.017 mM のタンパク質サンプルにアミノ酸選択標識技術と非線形サンプリング法を最適化して適用することで、分子量2万のタンパク質の主鎖帰属を完了することに成功したので報告する。

低濃度サンプルのNMR測定

非線形サンプリング法は3次元NMRの2つの間接測定軸に適用した。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。周波数スペクトルへの変換には Rowland NMR Toolkit を用いた。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 タンパク質を用いた。図1に 0.017 mM タンパク質に非線形サンプリング法を適用した結果を示す(左、HNCO (測定時間 24 時間)、右、HNCA (測定時間 68 時間))。両者とも良好なスペクトルが得られている。他の主鎖帰属のための測定 HN(CO)CA、HN(CA)CB、HN(COCA)CB も同様に比較的短い時間で良好なスペクトルを得ることに成功した。

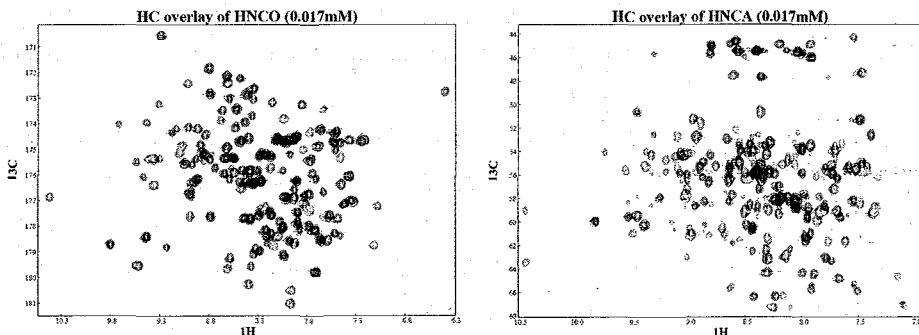


Figure 1. 2D projection spectra of 3D HNCO (left) and HNCA (right) for 0.017 mM protein sample. Total experimental times are 24 and 68 hrs for left and right spectra, respectively.

信号帰属

0.017 mM タンパク質の主鎖帰属には非線形サンプリング法で測定した5つのスペクトルを用いた。さらにアミノ酸選択標識体を小麦胚芽無細胞タンパク質合成系により調製し、HSQC/HNCA/HN(CO)CA の各スペクトルを測定することで、主鎖帰属を完了することに成功した。側鎖についても理研横浜研究所のクライオプローブ付き Bruker Avance 800 NMR 装置などで測定を行い、良好なデータを得ることに成功している。現在、側鎖の帰属と NOESY スペクトルの解析を進めながら立体構造構築のための計算機手法の開発を進めている。発表では我々が開発している、アミノ酸選択標識技術と非線形サンプリング法を組み合わせた超高感度タンパク質解析技術の詳細とその将来展望を報告する。

蛋白質NMRの感度向上——もう一つの視点と方法
Increasing NMR sensitivity of proteins-another aspect and method

近畿大学先端技術総合研究所・高圧力蛋白質研究センター

赤坂一之

蛋白質のNMRによる研究において、NMR検出感度の向上は至上命令である。これまで

- (1) 高磁場化によるポラリゼーションの向上
- (2) クロスポラリゼーションによる観測核ポラリゼーションの向上
- (3) 低温化による熱力学的ポラリゼーションの向上

が行われてきた。これらはメジャースペースズ（主要種）の検出感度向上を図るものである。

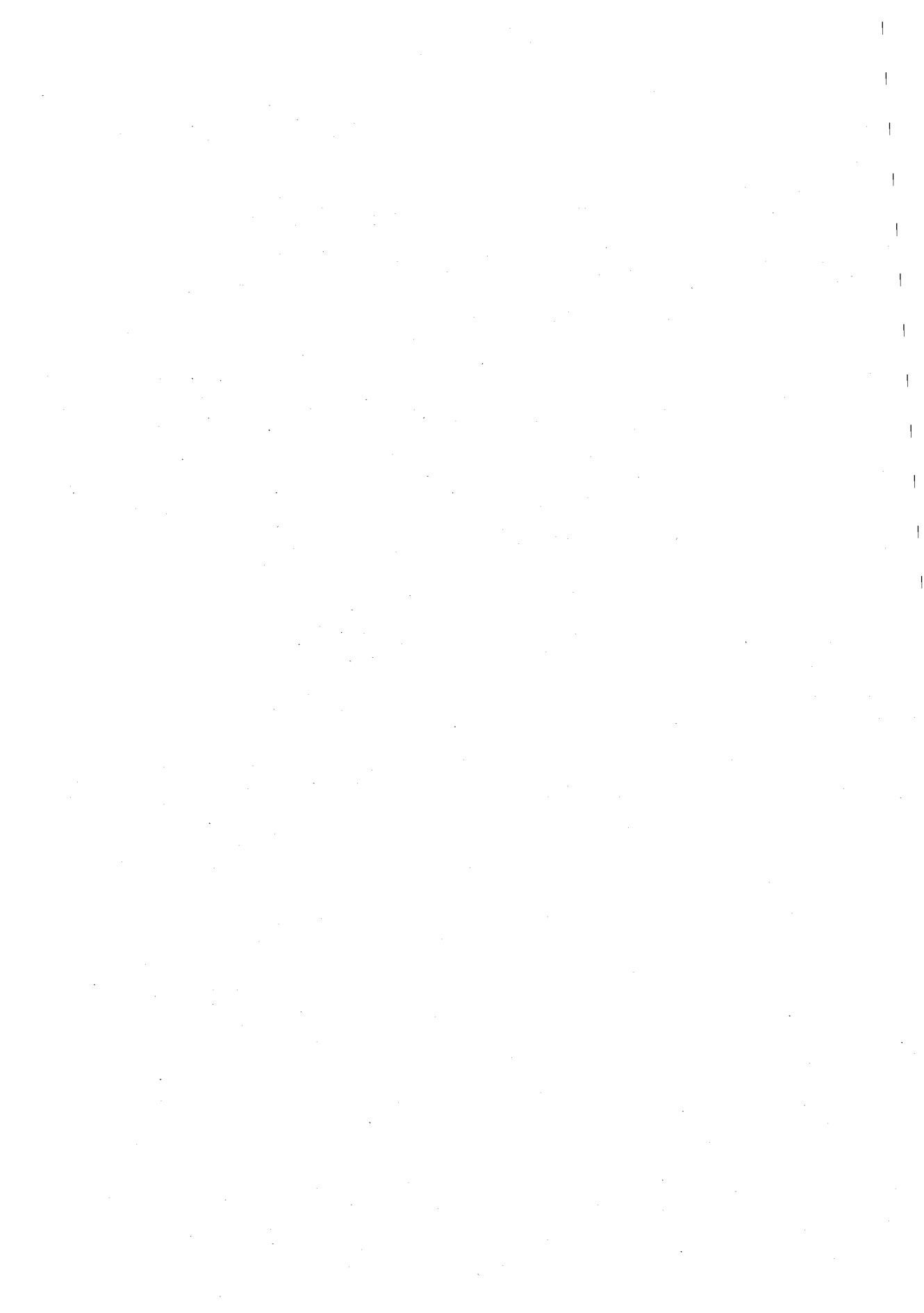
ところで、生物進化を支配する最大のルールの一つは熱力学であり、蛋白質も数十億年の長きにわたって、地球表面の条件に適するように進化してきた。その帰結の一つが、“Anfinsenのドグマ”と呼ばれるものである。それによれば、進化の帰結として現存する蛋白質は、生理条件下で、自ずから、それぞれに特徴的な立体構造を、短時間で作り上げる。その検証として、長くX線結晶解析とNMR構造解析が行われてきた。それらの方法の進展によって、それぞれに特徴的な立体構造が示されてきた。

しかし、近年、蛋白質の機能を考えるとき、蛋白質の動的側面を知ることが必須と考えられるようになった。さらに最近では、より積極的に、結晶化する基底構造とは別に、機能する励起構造が存在するという考えが生まれてきた。もともとこれは、古くはヘモグロビンのTR平衡として知られていることとほぼ同義であるが、現在は、これがより一般的に、蛋白質機能のルールとさえ考えられるようになった。

しかし問題は、そのような励起構造はそのポピュレーションが小さく（通常数%以下）、NMRをはじめとする通常の分光法では検出できない。これに代わる方法として、役割を果たして来たのが重水素交換法である。この方法では、稀にしか起こらない出来事を、時間をかけて積み重ね、見えるまで大きくして観測する、巧妙な方法である。しかしその弱点は、励起種そのものを直接観測していないということで、これまで、何が起っているのか、何が観測されているのか、ということについて、議論が別れてきたところである。

さて、われわれの高圧NMRは、圧力を利用して、その稀な励起構造のポピュレーションを直接増大させ、直接NMR等でそのスペクトルを直接観測しようというものである。その原理は「体積原理」と呼ぶもので、「励起構造の体積（部分モル体積を意味する）は基底構造の体積より小さい」という一般原理を適用することで、加圧下で励起種のポピュレーションを増し、NMRで観測するものである。つまり、体積軸での熱力学原理を用いて、稀な励起種のポピュレーションを、何桁も増大させる。蛋白質の励起種に限るが、NMRの感度を1000倍、1万倍、さらにそれ以上も向上させる一般的な方法である。

講演では、具体的な例と数値を交えて話す予定である。



第二日

11月13日(木)

英語セッション

Day 2 : 13 November, Thursday

(English session)

2L1 Understanding the molecular level events in the non-classical pathway of acidic fibroblast growth factor

Chin Yu

Department of Chemistry, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan.

Soluble secretory proteins characteristically include hydrophobic N-terminal signal peptides that direct them to the translocation apparatus of the endoplasmic reticulum. Following vesicular transport from the ER *via* Golgi to the cell surface, luminal proteins are released into the extracellular space by fusion of Golgi derived secretory vesicles to the plasma membrane. This pathway of protein expression from eukaryotic cells is known as a classical Golgi/ER dependent secretory pathway. However, the proteins such as acidic fibroblast growth factor (FGF-1), Annexin-II, sphingosine kinase 1, interleukin 1 α and 1 β , gelectin-1, and the extra vesicular p40 fragment of Syt1 lack the classical signal sequence could exported from cell in the absence of functional ER/Golgi system.

Fibroblast growth factors (FGFs) are key regulators of cell proliferation, differentiation, tumor-induced angiogenesis and migration. FGFs are essential for early embryonic development, organ formation and angiogenesis. They play important role in tumor formation, inflammation, wound healing and restenosis. FGFs biological effects are mediated through the activation of the four transmembrane phosphotyrosine kinase receptors (FGFRs) in the presence of heparin sulfate proteoglycans (HSPGs) and therefore require the release of these proteins into the extracellular space. Maciag et al. demonstrated that under cellular stress, FGF-1 is exported through a non-classical release pathway involving the formation of a specific copper (Cu^{2+})-dependent multi-protein complex. The protein constituents of this complex include the FGF-1, S100A13 (the Ca^{2+} binding protein), and the p40 form of synaptotagmin 1 (Syt1). As FGF-1 plays an important role in tumor formation, it is clear that to prevent the formation of the multi-protein complex is an effective strategy to inhibit a wide range of cancers. To understand the molecular events in FGF-1 releasing pathway, we have studied the interactions of FGF-1 with C2A and S100A13 by various biophysical experiments. We have characterized the binary complex structures of FGF-1-C2A FGF-1-S100A13 and S100A13-C2A by using variety of multi-dimensional NMR experiments. We further characterized FGF-1-S100A13-C2A ternary complex with the same techniques. Structural studies reveal that S100A13 is acting as template during the formation of the multi-protein complex. The interaction among the proteins is mainly hydrophobic and charge-charge interactions.

Shin-ichi Tate^{1,2}

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

Abstract

Our group has been devising a new approach for determining the alignment tensors for a weakly aligned protein by using the orientation dependent TROSY shift changes, which approach is named as DIORITE. The DIORITE relies on the TROSY spectroscopy and therefore the approach enables the molecular orientation analysis for the proteins in the range of the molecular size to which the conventional RDC experiments were not successfully applied. In this presentation, I am going to report the practical aspects of the DIORITE analysis with showing the results on several types of proteins, which exemplify the DIORITE application to determine the domain orientation of the proteins greater than 30kDa.

Introduction

Proteins exert their functions with significant structural changes in most of the cases. In particular, the proteins with multiple domains or subunits show the large amplitude structural changes, which include domain reorientation and subunit rearrangement. The large structural changes, which can be recognized as *molecular morphological changes*, should have essential roles in their functional regulations. In spite of the possible importance of the protein morphological change, its significance has not been clearly explored. X-ray crystallography does not give us the right answers. The crystal contacts may deform the domain arrangement even though they do not affect the core structure. On the other hand, NMR hardly tackles with the proteins with multiple domains or subunits, because their molecular weight tend to be greater than the range to which the conventional RDC based approach can not be applied. To overcome the present experimental limitations, we have devised an alternative approach for determining the alignment tensor for the protein in weakly aligned states, which approach is named as DIORITE that stands for “Determination of the Induced ORientation by Trosy

Keyword: protein structure, weak alignment, solution NMR method, anisotropic spin interaction, CSA

たて しんいち

Experiments". Because this approach requires only TROSY spectra for the protein in an isotropic and an anisotropic states, therefore the approach can expand the NMR application to the domain orientation analysis of the larger proteins.

The DIORITE analysis requires two prerequisites; protein coordinate for which domain orientation is to be determined and ^{15}N CSA tensor values. These two parameters may contain errors. One comes from the structural difference between the crystal structure and its solution structure in particular the core structural region. Another error source resides in the ^{15}N CSA tensor values used in the DIORITE calculation. In the DIORITE calculation, the ^{15}N CSA tensor values are assumed but the ^{15}N CSA tensor of each peptide bond varies according to the local structure and its accurate value is hard to know *a priori*.

In the present work, we estimated the effects of these noises on the resultant alignment tensors using ^{15}N -labeled ubiquitin in an anisotropically compressed acrylamide gel. In the present experiments, we re-determined the ^{15}N CSA tensors for the ubiquitin for each secondary structural unit. From the DIORITE analysis using the determined secondary structure specific ^{15}N CSA tensors, we obtained the closer Euler angles to the corresponding values from the RDCs; the deviations in the angles are close to the corresponding values caused by the structural noise (Table). It is noted that the alignment magnitude from the DIORITE analysis causes approximately 10% systematic error, which is larger than the value caused by the structural noise. This is ascribed to the lack of accurate principal values of each ^{15}N CSA tensors. From the present analysis, the use of the secondary structure specific ^{15}N CSAs is shown to allow us to determine the more accurate alignment tensor than that from the analysis using a single set of the assumed CSA values. The DIORITE analysis using the secondary structure specific ^{15}N CSA tensors can be the practical way to estimate the domain orientation of the proteins in the molecular size over 30kDa.

In the presentation, I am going to show several examples of the DIORITE application, where the various types of proteins were analyzed. Those examples may emphasize the usefulness of the DIORITE approach.

Table: The comparison of the alignment tensors of the ubiquitin in a weakly aligned state, on a 600MHz spectrometer.

CSA tensor type	Euler angles / deg.			Alignment magnitude			Fitting quality	
	α	β	γ	D_a / Hz	D_r / Hz	R	Rmsd / Hz	Q
Uniform values $\Delta\sigma = -162.2$, $\eta=0.16$, $\beta=16.3$	106.95	80.16	57.42	11.93	7.02	0.59	0.86	0.32
Secondary structure variations	106.39	80.35	57.39	12.11	6.96	0.58	0.86	0.32
Conventional IPAP NMR refined coordinate	104.22	81.83	59.00	10.09	4.28	0.42	1.32	0.13
Conventional IPAP X-ray coordinate	105.81	81.50	58.25	10.20	4.65	0.46	1.83	0.19

Investigating protein three-dimensional structures inside living cells by in-cell NMR spectroscopy

Yutaka Ito^{1,2,3}, Daisuke Sakakibara^{1,2}, Atsuko Sasaki^{1,2}, Teppei Ikeya^{1,4}, Junpei Hamatsu¹, Masaki Mishima^{1,2}, Tsutomu Mikawa³, Markus Wälchli⁵, Brian O. Smith⁶, Masahiro Shirakawa^{2,7} and Peter Güntert^{1,4}

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Japan; ²CREST/JST; ³Research Group for Bio-supramolecular Structure-Function, RIKEN; ⁴Institute of Biophysical Chemistry, J. W. Goethe-University Frankfurt, Germany; ⁵Bruker BioSpin, Japan; ⁶Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of Glasgow, UK; ⁷Department of Molecular Engineering, Kyoto University, Japan.

Abstract

Determining protein structures in a living environment at atomic resolution is a major goal of molecular biology. Recent developments in NMR hardware and methodology have enabled the measurement of heteronuclear multi-dimensional NMR spectra of macromolecules in living cells (in-cell NMR). However, the low sensitivity and short life time of the samples have so far prevented the structure determination of proteins by in-cell NMR. Here we show the first 3D protein structure calculated exclusively on the basis of information obtained in living cells. The structure of *Thermus thermophilus* HB8 TTHA1718 overexpressed in *E. coli* cells was solved by in-cell NMR. Rapid collection of the 3D NMR data by nonlinear sampling was employed to overcome problems caused by the instability and the low sensitivity of living *E. coli* samples. Almost all the expected backbone NMR resonances and the majority of side-chain NMR resonances were assigned enabling high resolution structures to be calculated that are very similar to the *in vitro* structure of TTHA1718 determined independently.

Introduction

In vivo observations of three-dimensional structures, structural changes, dynamics or interactions of proteins are essential for the explicit understanding of the structural basis of their functions inside cells. The non-invasive character and its ability to provide data at atomic resolution make NMR spectroscopy ideally suited for the task. Despite the interest in observing heteronuclear multi-dimensional NMR of macromolecules in living cells (in-cell NMR), it has not yet been confirmed whether the existing NMR methods for the structure determination of purified proteins can be applicable to proteins in living cells.

Results and Discussion

We use as a model system the *Thermus thermophilus* HB8 TTHA1718 gene product, a putative heavy metal binding protein consisting of 66 amino acids that was overexpressed in *E. coli* cells to a concentration of 3–4 mM. The stability of the live *E. coli* samples were examined under measurement conditions and confirmed that TTHA1718 in-cell NMR samples are stable for at least 6 hours.

First we performed backbone resonance assignment of TTHA1718 in *E. coli* cells using six 3D triple-resonance NMR spectra. We applied a nonlinear sampling scheme for the indirectly acquired dimensions, which has been shown in combination with maximum entropy

Key words: in-cell NMR, nonlinear sampling, maximum entropy processing, selective methyl protonation, protein structure

processing to provide significant time savings in the measurement of multidimensional NMR experiments. All backbone resonances of the non-N-terminal and non-proline residues in TTHA1718 were assigned except for three residues in the hypothetical metal binding loop predicted from primary sequence analysis. Similarly we assigned the majority of side-chain resonances by analysing three additional 3D triple-resonance NMR spectra.

Next, we performed NMR experiments of TTHA1718 in *E. coli* cells with selectively $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -labelled methyl groups of Ala, Leu and Val, aiming at obtaining unambiguous long-range distance restraints involving methyl groups. Further NOE-derived distance restraints were obtained from 3D ^{15}N -separated NOESY and 3D ^{13}C -separated NOESY spectra measured on uniformly labelled *E. coli* samples.

The structure calculation of TTHA1718 in *E. coli* cells was performed with the program CYANA v3.0 on the basis of NOE-derived distance restraints, TALOS-derived backbone torsion angle restraints, and restraints for hydrogen bonds in α -helices and β -sheets. The resulting structure is well-converged with a backbone RMSD of 0.96 Å to the mean coordinates (Figure 1a), and is very similar to the structure that was determined independently *in vitro* from a purified TTHA1718 sample (Figure 1b). The backbone RMSD between the *in-cell* and *in vitro* structures is 1.16 Å.

This result strongly suggests that high resolution 3D structures of proteins can be determined in solution in the cytoplasm of bacterial cells. Rapid data measurement using nonlinear sampling scheme with maximum entropy reconstruction, which provided spectra of much higher quality than conventional spectra recorded in the same short measurement time, and selective protonation at methyl groups (Figure 1d and 1e) to enable the observation of long-range unambiguous NOEs were key for the success of this study (Figure 1c).

By extending this approach it will become possible to study the conformations of proteins in detail and how they change in response to biological events in living environments. In particular, this approach provides the tools that will permit the effects of molecular crowding in the cytosol and the conformations of intrinsically disordered proteins to be investigated in living cells.

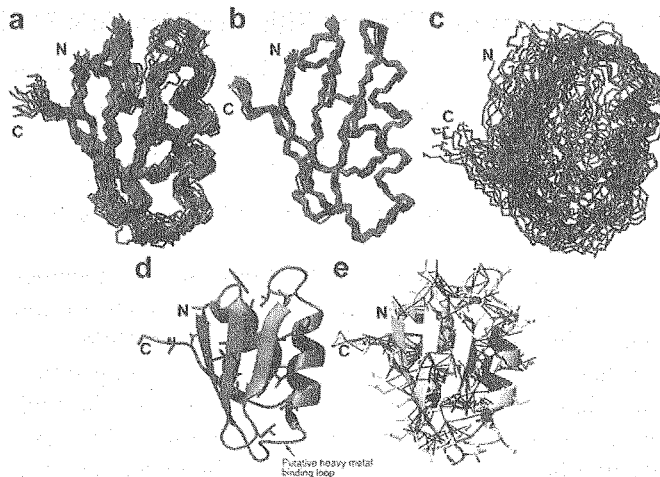


Figure 1 NMR solution structure of TTHA1718 in living *E. coli* cells. **a**, A superposition of the 20 final structures of TTHA1718 in living *E. coli* cells, showing the backbone (N, C $^{\alpha}$, C $^{\beta}$) atoms. **b**, A superposition of the 20 final structures of purified TTHA1718 *in vitro*. **c**, A superposition of the 20 final structures of TTHA1718 in living *E. coli* cells calculated without distance restraints derived from NOEs involving methyl groups obtained in methyl-selectively protonated *in-cell* NMR samples. **d**, Secondary structure of TTHA1718 in living *E. coli* cells. The sidechains of Ala, Leu and Val residues whose methyl groups were labelled with $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ are shown. **e**, Distance restraints derived from methyl group-correlated and other NOEs are represented in the ribbon model with thick and thin lines, respectively.

2L4 Structures of Silks and Silk-like Materials Studied with Solid-state NMR, and Application to Biomaterials

°Kazuo Yamauchi¹, Yumi Tanioka¹, Toshiki Tamura²,

Yasumoto Nakazawa³, and Tetsuo Asakura^{1,3}

(¹Department of Biotechnology, and ³Nature and Science Museum, Tokyo University of Agriculture and Technology and ²National Institute of Agrobiological Sciences)

Today, development of excellent biomaterials becomes very important. For example, rapid development of cell engineering needs excellent biomaterials as scaffold. Silk has been used as excellent textures for long times, but it has been also used as suture because of the high tensile properties and high biocompatibility. Therefore, silk will be a good candidate for such biomaterials. The process for development of silks for biomaterials is summarized in Figure 1 as a flowchart.

There are several kinds of silkworms including spiders to produce silk fibers with different physical properties. This is also suitable for biomaterials because a variety of properties are required depending on the purpose. In addition, development of biotechnology becomes possible to produce new-silk like materials which are suitable for the biomaterials. Thus, it is necessary to accumulate information on structure and property of many silks as much as possible.

Solid-state NMR is suitable to characterize silk fibers because it is difficult to prepare single crystals for structural determination with X-ray diffraction method. In addition, the structure of such silk fiber is basically β -sheet in the solid state and random coil in aqueous solution. Therefore solution NMR is not available for the structural determination.

In this talk, the structural determination of *Bombyx mori* silk fibroin which is a well-known silk fiber will be described. In general, there are many repeated amino acid sequences in the primary structure of silk fibroins and therefore the use of model peptides including stable-isotope labeling of appropriate positions is very useful. Several solid state NMR techniques including ¹³C chemical shift, 2D spin-diffusion NMR, RFDR, REDOR and relaxation could be used for the structural determination. Two

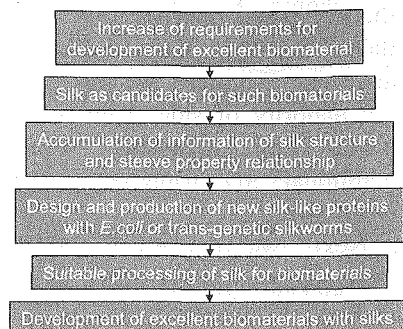


Fig.1 flowchart of development of biomaterials with silk

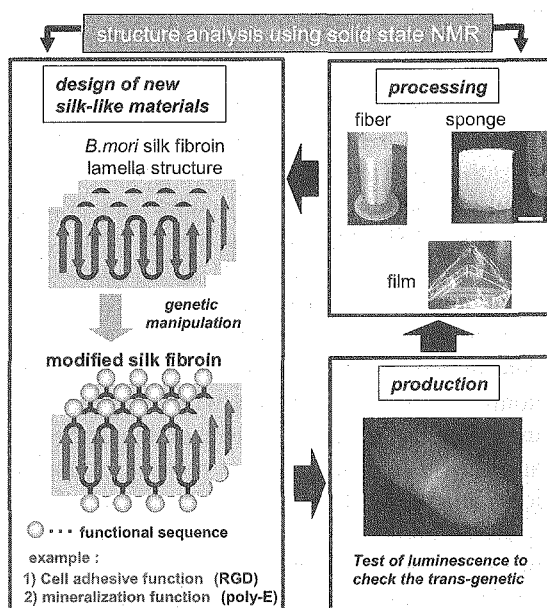


Fig.2 strategy and roadmap of silk and silk-like materials to apply the biomaterials

固体高分解能 NMR, 遺伝子組み換えカイコ, ラメラ構造, 親水性残基, 細胞接着性配列
やまうちかずお、たにおかゆみ、たむらとしぎ、なかざわやすもと、あさくらてつお

distinct structures of *B.mori* silk fibroin in the solid state have been proposed as Silk I (Silk structure before spinning) and Silk II (Silk structure after spinning). Our NMR studies reveal that the conformation of Silk I is a repeated type II β -turn and Silk II is a heterogeneous structure with mainly β -sheet structure.

Then, the structure determination with solid-state NMR will be also described for silk fibroins from wild silkworms such as *Samia cynthia ricini* or *Anaphe* together with silks from spiders. Especially, Alanine oligomers are model peptides of the crystalline regions of *S.c.ricini* or *Nephila clavata* (a spider) and the structural determination for a series of alanine oligomers gives very precise information on the anti-parallel and parallel β -structures.

On the basis of these structural information on silk, we can design new-silk like materials. For example, as shown in Figure 2, it was proposed by us that the model peptide, poly(Ala-Gly) for the crystalline region of *B. mori* silk fibroin with Silk II form, took lamella structure by using ^{13}C site-specific labeling peptide samples and several ^{13}C solid state NMR. The proposed lamella structure is suitable to design silk-like materials with several functional groups. In the lamella structure, the stem part contributes to the stiffness through intermolecular hydrogen bond formation and the turn part is possible to be sites for introduction of functional groups. The production of silk-like proteins with repeated such sequences was possible with *E. coli* and transgenic silkworms using biotechnology.

Silks and silk-like materials can be used in several forms, long fiber, nonwoven-fiber, film and sponge after appropriate processing process as shown in Figure 2. Solid-state NMR can be also used to characterize the structure and to monitor the structural change in order to develop the silk-based scaffold.

The development in the hardware of solid-state NMR was performed in our laboratory to study the structure and structural change of silk and silk-like materials. Namely, we have developed a higher sensitive probehead for mass-limited sample by using small coil and rotor (1mm Φ). Figure 3 shows an example of application to investigate the properties of silk fiber using this probehead. The strength of silk fiber is an important property for suture and the structure of silk fibroin fiber should be uniform. We observed fracture of silk by our 1mm Φ rotor and it is found that the fractured fiber gives wide line with according to the variation of structure. It means in the fracture of fiber is not only with β -sheet and it cause the weakness of fiber. These approaches could not be possible with ordinary solid state NMR. Another example, the structure of biomaterial coated with silk are investigated by 1mm Φ rotor because the coated silk is very small quantities compare with standard sample.

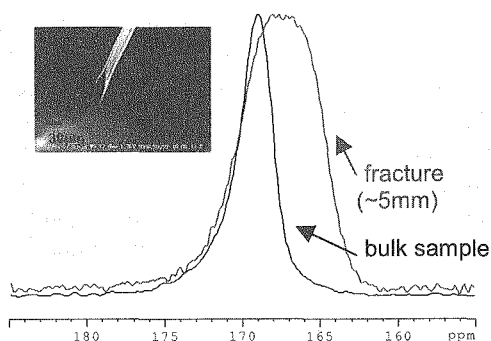


Fig.3 ^{13}C CP/MAS spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}$ s.c. *ricini* fibroin fiber and fracture using 1mm Φ MAS

References

- 1) T. Asakura, et al., *J.Mol.Biol.*, **306**, 291, (2001)
- 2) T. Asakura, et al., *J.Amer.Chem.Soc.*, **124**, 8794, (2002)
- 3) T. Asakura, et al., *J.Amer.Chem.Soc.*, **129**, 5703, (2007)
- 4) T. Asakura, et al., *Macromolecules*, **40**, 8983, (2007)
- 5) K. Yamauchi, et al., *J. Phys.Chem. B*, **109**, 17689, (2005)
- 6) K. Yamauchi, T. Asakura, *Chem. Lett.* **35**, 426, (2006)

Lyndon Emsley

*Université de Lyon, CNRS / ENS Lyon / UCB Lyon1, Centre de RMN à Très Hauts Champs,
5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France.*

We will discuss various aspects of progress towards powder crystallography by NMR. We will explore recent advances with methods for *ab initio* structure determination from powdered samples in both small molecules at natural abundance, notably of interest to the pharmaceutical industry, as well as approaches for studying structure and dynamics in biologically relevant systems.

In particular, using high-resolution proton spectroscopy of powders, we present the refinement of the three-dimensional structure of organic compounds, at natural isotopic abundance, obtained by an approach that in the first step combines molecular modeling (MM) in the Xplor-NIH program with experimental proton spin-diffusion data (PSD) obtained from high-resolution solid-state NMR of protons. This approach enables us to refine the molecular structure of b-Asp-Ala at natural abundance and in powder form to obtain a group of structures with an average rmsd of 0.1Å, and which deviates from the known structure by only ~0.6Å. Additionally, the conformation of thymol in its crystalline arrangement is investigated following the same MM-PSD optimization scheme. Thymol is a monoterpene phenol found in oil of thyme, with strong antiseptic properties. Due to the ease of obtaining large crystals, it was among the first systems studied by crystallographers, even before the advent of X-Ray methods. We then show how the PSD-MM structures can be used as a starting point for further refinement based on plane wave DFT geometry optimization and chemical shift calculations. This procedure results in structures that are identical to the known X-ray structure to within <0.2Å, and its validity is confirmed by comparing the DFT calculated chemical shifts for ¹H and ¹³C with the experimental shifts. We observe a substantial improvement in the agreement between the calculations and experiments after DFT structure optimization. We will also invoke aspects of small molecule crystallography involving paramagnetic metal centers as reference points for determination of structures in organometallic coordination complexes.

We will also present progress in the development of NMR methods for structural and biophysical characterization of microcrystalline proteins, with particular emphasis on paramagnetic systems. Specifically, we will discuss progress towards making the active sites in paramagnetic proteins visible to NMR studies. This has led us to investigate some unusual effects observed as a consequence of the use of MAS at very high speeds (>60 kHz), and these effects will be discussed in detail. Also, in this context, coherence lifetimes are of paramount importance. Different contributions to linewidths in paramagnetic systems will be discussed, and it is shown that in most cases the intrinsic linewidths in paramagnetic solids will be narrower than in the liquid state.

eDUMBO Homonuclear Dipolar Decoupling

Chem. Phys. Lett. 37, 253 (2000)
398, 532 (2004)
4, 423 (2004)

JACS 1279140 (2006) '1' amplification

$$M_{ij}(\tau_{sb}) = [\exp[-k\tau_{sb}]]_{ij} M_{ij}^0$$

Plane Wave DFT

Combined PSD and Plane
Wave DFT

Detecting Fleeting MRI Signals Using Frequency-Modulated (FM) Radio Waves

Michael Garwood, Ph.D.

*Center for Magnetic Resonance Research
University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA*

The temporal sequence of radiofrequency (RF) pulses and magnetic field gradients forms the equivalent of a “musical score” in nuclear magnetic resonance experiments. Like the notes in music, the number, duration, and shapes of RF pulses in the pulse sequence can be altered to create different effects. In MRI, for example, the pulse sequence can be “tuned” to maximize contrast for detecting different microscopic and macroscopic properties of tissue. In this way, MR images can be generated to display not only anatomy, but molecular signatures, physiology, and function. Advances in pulse sequence design are leading to improved data quality and increased sensitivity and specificity to differentiate between normal tissues and pathology with MRI.

Traditionally, only the amplitude, and not the frequency of the RF pulse is modulated when it is transmitted in a pulse sequence. Exceptions to this include the class of frequency-modulated (FM) pulses that function “adiabatically” (for review, see (1)). Currently, adiabatic pulses are exploited mostly to avoid deleterious effects from experimental imperfections, such as RF field non-uniformity. However, recently we have demonstrated that FM pulses operating sub-adiabatically can be used to manipulate nuclear spins in new ways and to create unique images with contrast based on spin relaxation never observed previously. Examples include MRI signals that decay too rapidly to be detected by conventional methods.

In this presentation, I will describe methodologies and applications for this fundamentally different approach to MRI. The main technique to be discussed is known as SWIFT (Sweep Imaging with Fourier Transformation) (2). This and other new FM techniques promise to expand the role of MRI in areas such as materials science, neuroscience, molecular imaging, and clinical medicine.

1. Garwood M, DelaBarre L. The return of the frequency sweep: Designing adiabatic pulses for contemporary NMR. *J Magn Reson* 2001;153:155-177.
2. Idiyatullin D, Corum C, Park J-Y, Garwood M. Fast and quiet MRI using a swept radiofrequency. *J Magn Reson* 2006;181:342-349.

In this talk, I would like to overview my works done together with my colleagues and students, mainly by using NMR methods. Topics are as follows:

- Multiexponential proton relaxation processes of compartmentalized water in gels such as sephadex gels and starch sol and gels.
- Sol/gel transition processes and the network structures of the microbial polysaccharide gellan gum hydrogels, gelatin, and starch gels by ^1H -NMR relaxation measurement, water diffusion phenomena and circular dichroism methods.
- Theoretical analysis of water ^1H - T_2 , based on chemical exchange and polysaccharide mobility during gelation.
- Studies on clay components such as allophone, imogolite, and kaolinite by high-resolution solid-state ^{29}Si - and ^{27}Al -NMR and ESR: ^{29}Si - T_1 relaxation, structural variation with $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$, and thermal transformation.
- Solid state NMR for materials, such as Yttrium compounds, Boron Carbide, by ^{89}Y , ^{27}Al , ^{13}C , ^{11}B nuclei.
- Development of contrast agents for MRI and evaluation as a new experimental models for MRI

2L8 Hyperpolarized Singlet State NMR and Intermolecular Multiple-Quantum Coherence Imaging with Anisotropic Contrast Agents

Warren S. Warren

Department of Chemistry and the Center for Molecular and Biomolecular Imaging, Duke University, Mailstop 90346, Durham, North Carolina 27708 USA

NMR is by far the most powerful form of spectroscopy to the practicing chemist, and MRI has become a very powerful clinical imaging modality, for two fundamental reasons. First, the hardware is mature: modern NMR spectrometers and MRI machines routinely give complex sequences of arbitrarily shaped radiofrequency pulses to create precise excitation, and give magnetic field gradient pulses to suppress magnetization or obtain spatial resolution. More importantly, however, the *theoretical framework* is mature. No other modern spectroscopy has such a strong theoretical basis, which of course is used to understand the structures of molecules as complicated as proteins in solution. This maturity is even more important in MRI: complications associated with imaging *in vivo* can often be reduced or eliminated by clever pulse sequence design.

However, the maturity of that theoretical framework also implies that the known limitations of MRI are rather fundamental. The Boltzmann distribution implies that the net fractional magnetization is small at room temperature, so in most MRI studies, the signal arises mostly from water. Contrast then arises primarily from parameters that can be traced back to the spin physics explorations of the 1940s and 1950s (the local bulk magnetization M_0 , the relaxation parameters T_1 , T_2 and T_2^* , and local values of diffusion, sometimes in different directions), which often only have very indirect clinical relevance or correlation with metabolism and cell biochemistry. Contrast agents have limited specificity, and usually need to be present in high concentration to affect the signal. Magnetic resonance spectroscopy *in vivo* is hampered by low concentrations, by competition with the strong water peak, and (in many organs) by local susceptibility variations that broaden resonances and thus reduce selectivity.

The work discussed in this presentation addresses these fundamental limitations. The principal focus is the use of intermolecular multiple-quantum coherences (iMQCs), both by themselves and with a variety of next-generation contrast agents and long-lived hyperpolarized reagents. Over the last decade, our group and others have shown that intermolecular multiple-quantum coherences-simultaneously flipping multiple spins, separated by a macroscopic distance-can give readily detectable signals that provide different contrast in magnetic resonance imaging. Early observations led (in a long series of papers, including five of ours in *Science*^{1,2,3,4,5}) to entirely new NMR and MRI pulse sequences with a wide range of applications, including enhanced tumor detection and functional imaging. Even a few years ago, the community working on these effects was quite small; over the last four years, that has changed significantly and there are now about twenty research groups publishing in this field.

There will be three primary topics in this presentation. The first topic is an iMQC method which will have a clear clinical application: measurement of fat-water crosspeaks to measure absolute temperature deep in tissue, with far greater accuracy than conventional methods⁶. Temperature, one of the most fundamental intrinsic quantities of matter, is very difficult to measure noninvasively beneath the surface. A general method to image interior temperatures could find a wide range of experimental applications, in fields ranging from bulk catalysis and process chemistry to clinical treatment. For example, temperature distributions in the body have been linked to the critical regulation of metabolism, immune

function, and longevity, and may find several clinical applications.⁷ One pressing need for this technology is in the real-time monitoring of hyperthermic cancer treatments. These adjunctive therapies deliver localized heat to enhance many traditional treatments and have already seen positive Phase III clinical trials. However, delivering a clinically relevant dose requires accurate temperature imaging *in vivo*, and this has proven very challenging.^{8,9,10} The best endogenous approach to traditional MR thermometry^{11,12} uses the change in chemical shift of water protons with temperature (0.01 ppm/°C, or 3Hz/°C in a 7 Tesla magnet) to monitor temperature changes. The frequency of the water peak has been used as a thermometer for decades in traditional NMR¹³ where lineshapes are narrow and shifts are unambiguous, and in that case absolute temperatures can be measured by the frequency difference between water and a reference peak.^{14,15,16} However, lineshapes *in vivo* are broad and shifting, since the topography of the local magnetic field (which generates the inhomogeneous lineshape) changes dramatically with motion, heating, drift, and susceptibility gradients. These macroscopic effects easily overshadow the thermal coefficient and, even with elaborate approximations and correction factors¹⁷ can lead to large inaccuracies. As a result, these methods are commonly used only to image relative temperatures, for example during a heating therapy. Our method, which measures the simultaneous spin flips of fat (which has no temperature dependence) and water, removes these complications and thus permits absolute temperature measurement. We have also shown that these methods can be used to do localized spectroscopy of fatty tissues, resolving resonances that are inaccessible by conventional imaging.

The second topic will be discussion of novel contrast in iMQC imaging. Intermolecular multiple-quantum coherences have an inherent, very high sensitivity to local anisotropy which is missing from conventional magnetic resonance. For example, in an isotropic sample such as a test tube of water, the signal from a double-quantum or zero-quantum CRAZED sequence scales as $(3 \cos^2\theta - 1)$, where θ is the direction between the applied gradient pulses and the z-axis; so using x- or y-gradients multiplies the signal by -1/2, and the sum of the three images obtained by using x-, y- and z-gradient images vanishes. With local anisotropy, either in the magnetization density¹⁸ or in the local resonance frequency¹⁹, this situation changes. In particular, nanoparticles generate a highly anisotropic local field, and they can be detected with very high sensitivity and specificity with multiple quantum methods. We have used this for imaging breast cancer, prostate cancer, and lung cancer in different animal models.

Finally, we discuss a new approach to hyperpolarized agent generation using true singlet states, which surmount the previous limitations from short relaxation times. We present specific molecular systems where it is possible to store nonequilibrium magnetization in the singlet, without moving the spins out of the magnetic field or actively decoupling them. The consequence is that it is possible to envision an entirely new class of hyperpolarized reagents with spin lifetimes extending to many minutes, or even longer, and this holds the potential for transforming hyperpolarized NMR from a laboratory curiosity into a genuine molecular imaging method.

¹ W. S. Warren, W. Richter, A. H. Andreotti and S. Farmer, "Generation of impossible correlation peaks between bulk water and biomolecules in solution NMR," *Science* **262**, 2005-2009 (1993).

² W. Richter, S. Lee, W. S. Warren, and Q. He, "Imaging with Intermolecular Multiple-Quantum Coherences in Solution NMR", *Science* **267**, 654-657 (1995)

-
- ³Warren S. Warren, Sangdoon Ahn, Rahim R. Rizi, Jeff Hopkins, John S. Leigh, Marlene Mescher, Wolfgang Richter, Michael Garwood, and Kamil Ugurbil, "MR Imaging Contrast Based on Intermolecular Zero-Quantum Coherences," *Science* **281**, 247-250 (1998)
- ⁴S. Vathyam, S. Lee and W. S. Warren, "Homogeneous NMR Spectra in Inhomogeneous Fields", *Science* **272**, 92-96 (1996)
- ⁵Yung-Ya Lin, Natalia Lisitza, Sangdoon Ahn, and Warren S. Warren, "Resurrection of Crushed Magnetization and Chaotic Dynamics in Solution NMR Spectroscopy", *Science* **290**, 118-121 (2000)
- ⁶G. Galiana, R. T. Branca, E. Jenista and W. S. Warren, "Absolute temperature measurement using intermolecular coherences in magnetic resonance", *Science* (in press)
- ⁷B. Conti, M. Sanchez-Alavez, R. Winsky-Sommerer, M. C. Morale, J. Lucero, et al, *Science* **314**, 825-828 (2006).
- ⁸M. Dewhirst et al, *Int. J. Hyperthermia* **21**(8), 779-790 (2005).
- ⁹L.R. Prosnitz, M.W. Dewhirst, *Int. J. Rad. Onc. Bio. Phys.* **33**, 963-964 (1995).
- ¹⁰E. L. Jones, J. R. Oleson, L. R. Prosnitz, T. V. Samulski, Z. Vujaskovic, et al, *J. Clin. Oncol.* **23**, 3079-3085 (2005).
- ¹¹B. D. De Senneville, B. Quesson, C. T. W. Moonen, *Int. J. Hyperthermia* **21**(6), 515-531 (2005).
- ¹²J. Gellerman, W. Wlodarczyk, A. Feussner, H. Fa Hling, J. Nadobny, et al, *Int. J. Hyperthermia* **21**(6), 497-513 (2005).
- ¹³J. Hindman, *J. Chem. Phys.* **44**, 4582-4592 (1966).
- ¹⁴N. McDannold, S.L. Fossheim, H. Rasmussen, H. Martin, N. Vykhodtseva, K. Hynynen, *Radiology* **230**(3), 743-752 (2004).
- ¹⁵S. K. Heckmatyar, P. Hopewell, S. K. Pakin, A. Babsky, N. Bansal, *Magn. Reson. Med.* **53**, 294-303 (2005).
- ¹⁶C. Li, X. Pan, Q. Zhang, K. Ying, *Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med.* **15**, 3372 (2007).
- ¹⁷V. Rieke, K.K. Vigen, G. Sommer, B.L. Daniel, J.M. Pauly, K. Butts, *Magn. Reson. Med.* **51**, 1223-1231 (2004).
- ¹⁸L.-S. Bouchard and W.S. Warren, "Multiple-Quantum Vector Field Imaging by Magnetic Resonance," *Journal of Magnetic Resonance* **177**(1), 9-21 (2005)
- ¹⁹R. T. Branca, G. Galiana, E. Jenista and W. S. Warren, "iDQC anisotropy map imaging for tumor tissue characterization in vivo", *Magnetic Resonance in Medicine* (in press)

膜タンパク質固体 NMR 構造解析と高磁場 DNP

(阪大・蛋白研¹, 奈良先端大・バイオサイエンス²,
福井大・遠赤外センタ³, 日本電子(株)・開発本部⁴)

○藤原敏道¹, 高橋大樹¹, 江川文子¹, 佐伯美和子¹, 阿久津秀雄¹,
林こころ², 児島長次郎², 出原敏孝³, 小川勇³, 戸田充⁴

Solid-state NMR analysis of membrane protein and high-field DNP

Osaka Univ.¹, Nara Inst. Sci. Tech.², Univ. Fukui³, JEOL Ltd.⁴,

Toshimichi Fujiwara¹, Hiroki Takahashi¹, Ayako Egawa¹, Miwako Saeki¹, Hideo Akutsu¹, Kokoro Hayashi², Chojiro Kojima², Toshitaka Idehara³, Isamu Ogawa³, Mitsuru Toda⁴

We have applied magic-angle spinning NMR to 159-residue $u\text{-}^{13}\text{C}$, ^{15}N -labeled transducer protein *pHtrII* reconstituted into lipid bilayers. ^1H - ^{13}C correlations of mobile segments were obtained with HC-INEPT and HCC-TOCSY experiments. The chemical shifts indicated that water-soluble loop and C-terminal regions form α -helices to transmit signal from phorbodopsin. The transmembrane region was studied with ^{13}C spin diffusion. The quality and number of structural constraints for the proteins are limited by the sensitivity of multidimensional NMR. We have developed the instruments for high-field dynamic-nuclear polarization to enhance the sensitivity. A newly designed gyrotron generated 394.5-GHz submillimeter wave with 40 W at the second harmonics operation. The DNP at 14.1 T was confirmed by the field dependence of ^{13}C -NMR signal amplitudes of samples at 100 K.

【序】脂質二重膜にある膜タンパク質の構造解析は、代表的な解析手法である溶液NMRやX線結晶解析法で行うことがむずかしい。これは、脂質二重膜系では運動性が低くなり磁気緩和により、溶液NMRでは信号感度が低下し、また、単結晶の作成も難しいからである。そこで私たちは、固体NMR法で二重膜に貫通しているタンパク質の構造を解析するための方法を開発している。タンパク質は ^{13}C , ^{15}N で均一に標識して、多次元NMR法で多数の構造情報を得られるようにする。この方法を二重膜貫通タンパク質*pHtrII*に適用した。また、これら構造解析において得られる構造制約の数や質はNMRの感度に依存している。固体NMRで膜にあるタンパク質のような複雑な生体高分子複合体を構造解析するためには、飛躍的に感度を高める必

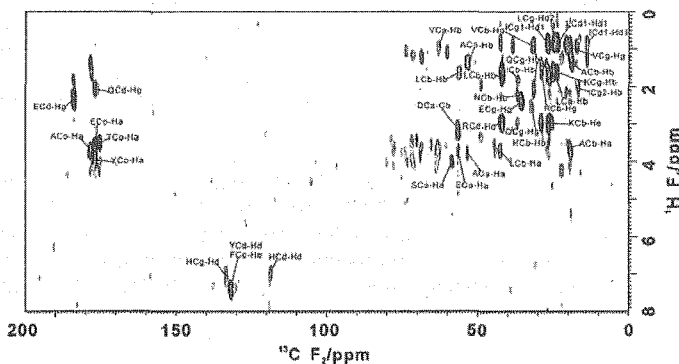
Keywords : 固体核磁気共鳴、膜タンパク質、動的核分極、脂質二重膜、電子スピン

ふじわらとしみち、たかはしひろき、えがわあやこ、さえきみわこ、あくつひでお、はやしこころ、こじまちょうじろう、いではらとしたか、おがわいさむ、とだみつる

要がある。そこで私たちは、室温核スピン分極に比べると約 5000 倍大きな分極を持つ、約 30K の電子スピンの分極を核スピンに移動させる動的核分極法を行う装置を開発している。高磁場で電子スピンを飽和させるためには、強力なサブミリ波光源が必要であるが、これまで利用できなかった。本発表では、新しく開発した高輝度光源ジャイロトロンを用いた DNP の装置と実験結果を発表する。

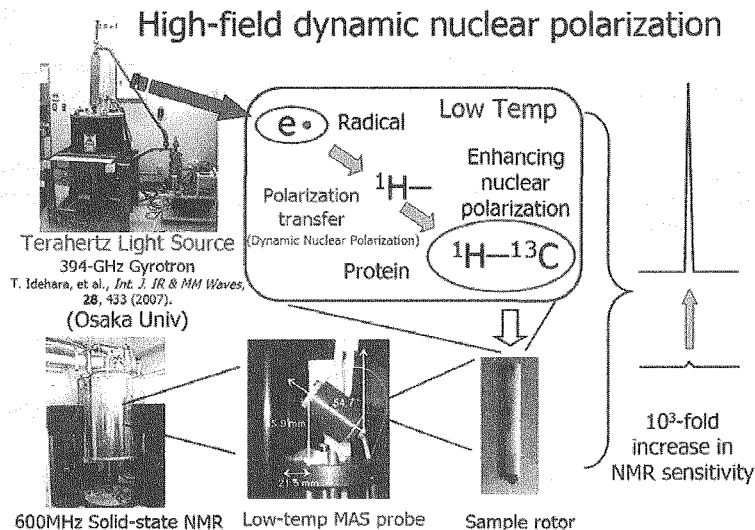
【結果】膜タンパク質についての実験は、pHtrII を重水素化したリン脂質 DMPC で作った脂質二重膜に組み込んで、約 283K の温度、試料回転数約 12kHz で実験を行った。運動性の高い領域について、帰属に用いた H-C 相関スペクトルの例を下に示した。信号帰属から得られた化学シフトを用いて、主鎖構造を解析した。

2D ^1H - ^{13}C correlation spectrum in mobile regions



2D HCC-FLOPSY spectrum of pHtrII at J_{C-C} mixing time of 8.8 ms
Probe temperature 0 °C, $\tau_1, \tau_2 = 1.8$ ms $\tau_3, \tau_4 = 0.6$ ms

以下の図では、高磁場動的核分極を行うために製作したジャイロトロンを示した。それが発生したサブミリ波は、試料内のラジカルスピンの遷移を部分的に飽和し核スピン強度を増大する。



【謝辞】この研究では、文科省ターゲットタンパク及び JST 先端計測機器開発などの事業から支援を受けた。

Ulrich Günther

HWB-NMR, CR UK Institute of Cancer Studies, University of Birmingham, Vincent Drive, Edgbaston, Birmingham B15 2TT

Dynamic Nuclear Polarisation (DNP) is used to transfer the high spin polarization of unpaired electrons to coupled nuclear spins. Stable radicals are added to a solution of the analyte and irradiating with microwaves is applied for 1-3h at the EPR lines of the radical. In such experiments enhancements of >10,000 were achieved [1] after rapidly warming up polarised samples to approx. 300K where spectra are recorded after transfer to a high field magnet. This implementation of DNP requires efficient transfer of polarisation from stable radicals to the analytes which is facilitated by an optimal contact between the radical and the analyte in a glass state formed at low temperature.

We have explored different strategies to optimise polarisation for different substances, including typical metabolites found in body fluids. In this study we found several determinants for good polarisation [2]. The life time of the polarisation after the transfer to an NMR magnet depends primarily on the longitudinal relaxation time T_1 of the polarised molecules. T_1 is usually long for quaternary carbons. However, optimal contact between the radical and the analyte is equally important. For the Ox63 radical we observe higher polarisations for amides compared to carboxylic acids, most likely as a consequence of better contact to the negatively charged Ox63 radical [2]. Another contribution arises from methyl groups which seem to make a direct contribution to the overall polarisation [3].

To improve the polarisability of small molecules we have acetylated compounds using a ^{13}C -labelled acetyl group. This allows polarisation transfer from long-lived ^{13}C -labelled carbonyl groups to carbon atoms with a shorter T_1 relaxation times via a ^{13}C -nuclear Overhauser effect. This principle can be exploited to enhance the life-time of polarisation and to further enhance the observed polarisation at room temperature. This allowed us to record fast two-dimensional HMQC spectra during the life time of labelled carbonyl atom.

Moreover, polarisation transfer in the glass state can be further improved by adding long lived carbonyls to the glass state, e.g by adding $^{13}\text{C}(2)$ -acetone. The use of such substances – here termed co-polarisation agents – improves spin diffusion in the glass state thus allowing for a more efficient polarisation of molecules. This has substantially broadened the applicability of DNP to substances which are otherwise difficult to polarise, including citrate and glucose. This new principle can be employed in many ways for NMR based metabolomics.

Most interestingly the use of co-polarisation agents often showed negative signals for methyl carbons. These signals arise from quantum rotor effects of methyl groups which develop in the absence of radicals and microwave irradiation. Since the methyl signals have opposite sign compared to the DNP signals it is important to polarise at a microwave frequency of $\omega_e + \omega_N$ rather than the commonly used $\omega_e - \omega_N$ where the two interfere constructively rather than destructively [3]. The addition of methyl bearing molecules can also be used to further enhance polarisations and bears a huge potential in allowing radical free polarisation arising from quantum rotors.

In summary, the observed effects had significant impact for the application of DNP in metabolomics. Many molecules which could not be polarised yield a high polarisation in the presence of co-polarisation agents and by using a microwave frequency of $\omega_e + \omega_N$.

References

- [1] JH Ardenkjær-Larsen, B Fridlund, A Gram, G Hansson, L Hansson, MH Lerche, R Servin, M Thaning, and K Golman. *Proc Nat Acad Sci USA*, **100**, 10158-10163 (2003).
- [2] Emwas A-H, Saunders M, Ludwig C, and Günther UL. Determinants for Optimal Enhancement in *ex situ* DNP Experiments, accepted by *Applied Magn Reson*.
- [3] Saunders MG, Ludwig C, and Günther UL. Optimizing the Signal Enhancement In Cryogenic *ex situ* DNP-NMR, accepted in *J Am Chem Soc*.



2L11 Dipole Recoupling and Dynamic Nuclear Polarization at High Magnetic Fields

R. G. Griffin

*Francis Bitter Magnet Laboratory and Department of Chemistry
Massachusetts Institute of Technology,
Cambridge, MA 02139
rgg@mit.edu*

At high MAS frequencies ($\omega_r/2\pi \geq 20$ kHz) currently used at high magnetic fields (700-900 MHz ^1H), the existing repertoire of first order dipole recoupling experiments require application of rf powers that are incompatible with the integrity of the sample and the probe. Accordingly, we have developed new approaches to homonuclear and heteronuclear recoupling that circumvent this problem. For spectral assignments we use the CM_pRR and RFDR sequences that perform recoupling without decoupling. In addition, to measure distances we have developed a second order recoupling method, third spin assisted recoupling (TSAR), that functions well at $\omega_r/2\pi \geq 20$ kHz. Application of the appropriate rf fields leads to zero quantum terms in the Hamiltonian such as $A^\pm B^\mp C_z$, where A and B are the spins to be recoupled and can be either a homo- (i.e. ^{13}C - ^{13}C or ^{15}N - ^{15}N) or heteronuclear (^{13}C - ^{15}N) spin pair. C is an assisting spin and is generally ^1H . We demonstrate the utility of the TSAR sequences with applications to peptides and proteins where we have assigned spectra and determined distance constraints and structures. In an example we have constrained the backbone structure of the model protein Crh to an RMSD ~ 0.6 Å.

Over the last few years we have developed gyrotron microwave sources that operate at frequencies of 140, 250, and 460 GHz that permit DNP enhanced NMR (DNP/NMR) experiments in magnetic fields of 5-16.4 T (^1H NMR frequencies of 211, 380, and 700 MHz, respectively). We review the instrumentation used for these experiments, and discuss two mechanisms that are currently used for DNP experiments in solids at high fields – the solid effect and cross effect – and the polarizing agents appropriate for each. These include biradicals that enable increased enhancements at reduced concentrations of the paramagnetic center. In addition, we discuss applications of DNP/NMR that illustrate its utility in enhancing signal-to-noise in MAS NMR spectra of a variety of biological systems including membrane and amyloid proteins whose structures are of considerable scientific interest. Presently, enhancements ranging from 40-260 are routinely available depending on experimental variables such as temperature, magnetic field, microwave B_1 , polarizing agent, etc. Finally, we describe extensions of these experiments that permit observation of ^{13}C liquid state spectra where we have observed enhancements of 140-400 in 2D spectra of small molecules and a protein.

628

TSA R (Third Spin Assisted Recoupling)

Lewandowski JACS (2002)

De Paep. JCP (2008) $N_1^+ N_2^+ H$
far at $\omega_r / 2\pi = 65$ kHz ~ 16 kHz

Recoupling without decoupling

P Q -CHRR

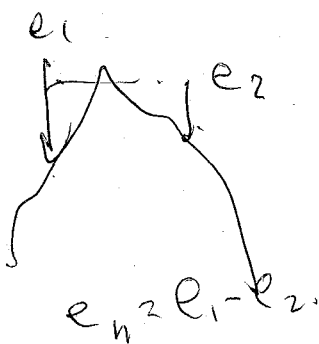
{ JACS (2006)
JCP (2008)

CMRR at 900 MHz

4% e-

0.006% 1H polarization

at 700 MHz / 90K



Cross effect strong e^-e^- 20-30 MHz
Thermal Mixing

第三日

11月14日(金)

日本語セッション

Day 3 : 14 November, Friday

(Japanese session)

(産総研) ○早水紀久子、都築誠二 (電中研) 関 志朗

NMR Studies of Translational and Molecular Motions of Room-Temperature Ionic Liquids (RTIL)

Kikuko Hayamizu and Seiji Tsuzuki (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)) and Shiro Seki (Central Research Institute of Electric Power Industry (CRIEPI))

Room-temperature ionic liquids (RTIL) are consisted of only cations and anions and stable in the wide temperature range. Recently RTILs have been attracted much attention due to their specific properties and possible usages as electrolytes and green solvents. The molecular level review paper pointed out present status of the understanding of these interesting liquids summarized by Weingärtner.¹ We have published diffusion coefficients (D 's) of various ILs measured by the PGSE methods² and also molecular motions obtained from T_1 values.³ In the present study we will present the translational and molecular motions of quaternary triethyl pentyl cation based RTILs of center atoms of N [TEPA][TFSA] and P [TEPP][TFSA], where the anion is bis(trifluoromethanesulfonyl)amide (TFSA).

1. 緒言

室温イオン液体 (RTIL) は有機カチオンとアニオンのみで構成される液体で、熱安定性が高く、非揮発性でイオン伝導度があり、電解質、グリーン溶媒など多目的の利用が実現し、さらに応用範囲を広げている。しかしながら、イオンだけで構成され、分子間力などに関して活発な研究が行われているが未解決の問題が多い。本報告では P^+ と N^+ を中心原子として 3 個のエチル基と 1 個のペンチル鎖を持つ四級カチオンからなる RTIL のイオン拡散と T_1 の温度変化測定からアニオンとカチオンの並進運動と分子回転運動を明らかにした。分子軌道計算から得られたイオン間力を参照しながら分子運動を考察する。

2. 実験

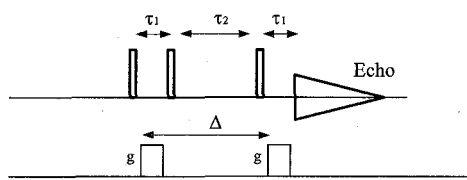


Fig. 1. STE pulse sequence.

NMR 測定は 6.4T のワイドボア SCM に Tecmag の Appolo-NTNMR、JEOL のマルチ核測定用磁場勾配 (PGF) プローブを付属して測定した。温度変化は JEOL のコンソールを用いた。カチオンの測定は 1H と ^{31}P (TEPP のみ)、アニオンの測定は ^{19}F で行った。カチオン (1H NMR) の PGSE 測定では J-カップリングによる効果のために、Hahn パルス系列ではなく STE パルス系列 ($90^\circ-\tau_1-90^\circ-\tau_2-90^\circ-\tau_1$ -Acq) を用い $\tau_1=3ms$ で測定した (Fig.1 参照)。

アニオン (^{19}F NMR) の拡散測定は Hahn パルス系列を用い、 ^{31}P NMR でも線幅はシャープで

はやみず きくこ、つづき せいじ、せき しろう

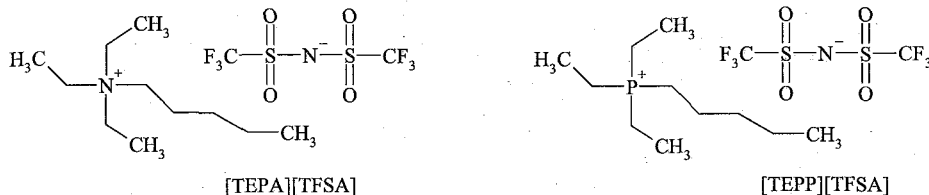
イオン液体、拡散移動、分子運動、イオン性、分子間力

T_2 は長かったのでHahn系列で測定した。 T_1 の測定は通常の $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ\text{-Acq}$ パルス系列である。温度変化は高温から下げる方向で行った。Fig.1で δ の値を変えて観測したエコーシグナルをStejskal-Tanner equation,

$$E = \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 D (\Delta - \delta/3))$$

でプロットし、非線形フィットからイオンの拡散係数 D を求めた。

本研究で用いた2種のRTILの構造を示す。



サンプルは日本化学工業から購入し、真空乾燥してからシゲミ製二重管に高さ5mmで封入してNMR測定に用いた。

3. 結果と考察

^1H NMRのスペクトルパターンをFig.1に示す。

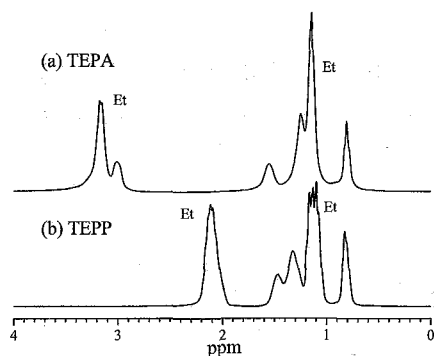


Fig. 2. ^1H NMR spectra of TEPA and TEPP

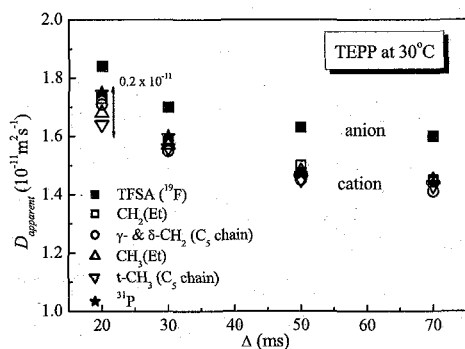


Fig. 3 The Δ dependent apparent self-diffusion coefficients measured for each peak of ^1H and the ^{31}P resonances of [TEPP] and [TFSA] (^{19}F resonance).

RTILは粘性が高いので、NMRスペクトルはブロードになる。Pを中心元素にした四級化合物では高磁場シフトがあるのは一般的であり、またP-Etシグナルに ^{31}P とのJ-couplingがみられる。H-H間のJ-couplingは明確に観測されていないが、Hahnのエコーで観測すると明確なmodulationにより、エコーシグナルは小さくなる。

拡散測定では均一系ではFig.1に示した Δ に依存しない D が求められるが、粘性が大きいRTIL、特に低温では Δ 依存性がみられる。30°Cで測定した[TEPP][TFSA]のみかけの D_{apparent} の Δ 依存性をFig.3に示す。ここでは観測できる全てのシグナルに対して求めた D_{apparent} の値をプロットした。 $\Delta = 20\text{ms}$ の時には各々のシグナルに対してバラツキが大きくなっている。長い Δ の時(平衡時)の D の値を物理定数とした。

また高温では対流効果が D に加算される可能性があり、 Δ が長くなると対流効果は増大されることがわかっているので、少なくとも2つの Δ に対して同じ値になることを確かめて確かな D を求めた。

D の温度依存性を Fig. 4 に示す。同一サンプル内ではアニオンとカチオンの D の差は小さく、[TFPP][TFSA]の方が[TFPA][TFSA]よりも全温度で D が大きくなる。この傾向は粘性の傾向と一致している。Fig.4 のアレニウスプロットは上に凸の曲線となり、電気化学の分野で多用されている VTF の式 $D = D_0 \exp(-B/(T-T_0))$ でフィットしてパラメータを Table 1 に与える。

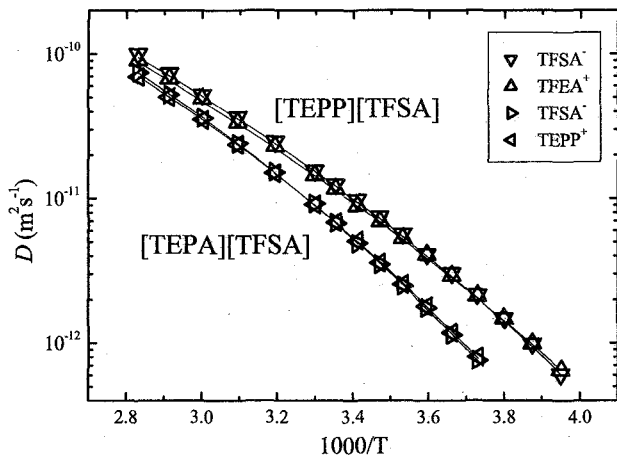


Fig. 4. The temperature dependent diffusion coefficients of [TEPP][TFSA] and [TEPA][TFSA]. The curves were fitted by the VTF-type equation $D = D_0 \exp(-B/(T-T_0))$, and the fitting parameters are given in Table 1.

Table 1 The fitting parameters of VTF-type equation $D = D_0 \exp(-B/(T-T_0))$

	D_0 (m^2s^{-1})	B (K)	T_0 (K)
TFPA ⁺ (¹ H)	$4.18 \pm 0.01 \times 10^{-8}$	1316 ± 52	147 ± 3
TFSA ⁻ (¹⁹ F)	$6.34 \pm 0.01 \times 10^{-8}$	1419 ± 65	143 ± 4
TEPP ⁺ (¹ H)	$8.48 \pm 0.01 \times 10^{-8}$	1651 ± 63	113 ± 3
TFSA ⁻ (¹⁹ F)	$5.85 \pm 0.01 \times 10^{-8}$	1463 ± 53	126 ± 3

一般に溶液の ¹H NMR の T_1 は温度上昇とともに単調に長くなり、分子運動の相関時間 τ_c は T_1 に反比例するがそれ以上の情報は得られないためにほとんど観測されなかった。拡散測定の場合に T_1 の測定は不可欠であることからその温度依存性を観測した。多くの RTIL の場合に T_1 極小値が拡散測定温度内で存在することがわかり、N,2-dimethyl-N-propyl imidazolium カチオンについて詳細に解析して、並進運動の相関時間より 2 桁短い分子運動の相関時間の温度依存性、小さな角度の分子全体の回転運動を明らかにした。³ 本報告では [TEPA] および [TEPP] の ¹H T_1 の温度依存性および [TFSA] の ¹⁹F T_1 について測定した。Fig. 5 に [TEPA] [TFSA] の全ての核の T_1 の温度依存性と極小値から計算した ¹H シグナルの相関時間の温度依存性を示す。小さな τ_c は速い分子運動に対応する。

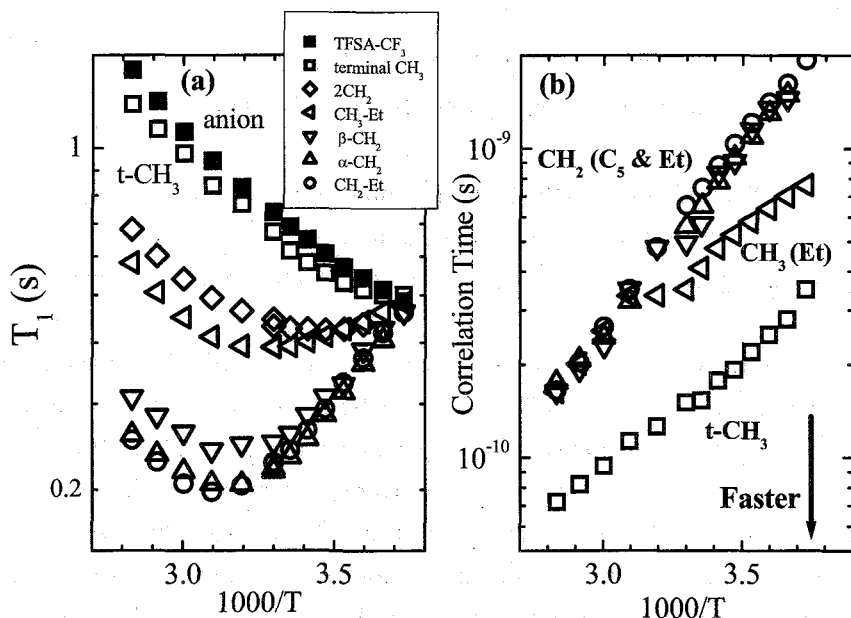


Fig.5. (a) The temperature dependent T_1 of each species of 1H signal and ^{19}F CF_3 of [TEPA] [TFSA] and (b) the corresponding correlation times of 1H signals calculated from the BPP equation at the minimum points, where $\omega_0\tau_c=0.616$.

1H NMRでは[TEPA]のすべてのシグナルに T_1 の極小値が観測され、Et 基の CH_2 並びにペンチル基の CH_2 シグナルの τ_c は温度に対して類似の挙動をとり、活性化エネルギーは 23KJ/mol になる。これは分子の再配向運動の相関時間に対応すると解釈できる。

一方ペンチル鎖の CH_3 は他と比べると低温時に約 2.3 倍、高温時に約 5.5 倍の速い運動が見られる。Et 基の CH_3 は高温時には他の CH_2 と似た相関時間をもつが、温度が下がるにつれて相対的に速い回転相関時間を持つようになる。Terminal- CH_3 の活性化エネルギーは 14KJ/mol で3回軸周りの分子内回転運動が寄与する。一方[TEPP]の 1H T_1 は[TEPA]に比べると長くなり(分子運動が速い)極小値をもつシグナルは Et 基の CH_2 シグナルで計算した τ_c も短くなる。MO の計算から P-C 間距離は P-N 間距離より長くなることからわかっているので、その効果が側鎖運動、即ち 1H T_1 に鋭敏に反映していると考えられる。

参考文献

1. Weingärtner, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 654-670.
2. A. Noda, et al. *JPCB*, **105**, 4603(2001); H. Tokuda, et al, *JPCB*, **108**, 16593(2004); H. Tokuda, et al *JPCB* **109**, 6103(2005); H. Tokuda, et al, *JPCB* **110**, 2833(2006), H. Tokuda, et al, *JPCB* **110**, 19593 (2006), K. Hayamizu, et al, *JCPB*, **108**, 19527(2004), K. Hayamizu, et al, *JPCB*, **112**, 1189(2008).
3. K. Hayamizu, et al, *JPCA* in press.

NMRによるヘパリン不純物問題への対応

(味の素(株)ライフサイエンス研究所)

○山口秀幸、品川麻衣、榛葉信久、鈴木榮一郎

NMR application to the heparin contaminant crisis

(Institute of Life Sciences, Ajinomoto Co.)

○Hideyuki Yamaguchi, Mai Shinagawa, Nobuhisa Shimba, Ei-ichiro Suzuki

Recently, it has been reported that certain lots of heparin are associated with an acute, rapid onset of serious side effects indicative of allergic reaction, and ^1H NMR is one of the convenience but strong analytical methods to identify a contaminant in heparin. However, an NMR signal from the contaminant in some cases is overlapped with a satellite peak from heparin, leading a misunderstanding of the presence of the contaminant. Here, we show the satellite peak observed close to the NMR signal of the contaminant, and recommend the ^{13}C decoupling NMR to discriminate the satellite peak from the contaminant. This is one of the good examples of the NMR contribution in industry.

【序論】

ヘパリンはグリコサミノグリカン重合によって形成された多糖であり、血液透析時の血液凝固の防止や血栓塞栓症の治療等、種々のケースにて抗凝血剤として使用されている。しかしながら、今年初め、米国にて、ヘパリンを静脈内注射数分後に血管性浮腫や血圧低下、もしくはそれらに関連したアナフィラキシー様症状が現れ、患者が死亡する事例が報告された。これらはヘパリンに混入した不純物が原因とされ、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸が原因物質と考えられている¹⁾。日本においても、2008年3月よりヘパリン製剤の一部回収が行われるなど大きな社会問題となっている。

早期に問題の沈静化を図るために、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の検出にはNMR法が提唱された²⁾。簡便な方法であり、当面は、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の検出に適していると考えられている。ヘパリンのアセチル基のプロトンシグナルが2.04ppmに観測される一方、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸のアセチル基のプロトンシグナルは2.15ppmであり、この化学シフト差を使って過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の存在を確認することができる。しかし、天然には ^{13}C が約1.1%存在しており、 ^{13}C に結合したプロトンのサテライトシグナルが ^{13}C - ^1H のカップリング定数に応じて異なる化学シフトに観測される。過硫酸化されたコンドロイチン硫酸が含まれていなくても、ヘパリンのアセチル基由来のサテライトシグナルが2.15ppm

キーワード:ヘパリン、サテライトシグナル、純度試験

やまぐちひでゆき、しながわまい、しんばのぶひさ、すずきえいいちろう

近傍に観測されることがあり、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸とヘパリンのサテライトシグナルを識別する必要がある。本発表では、事件が日本でも社会問題に発展した 2008 年 3 月から、NMR を用いたヘパリンの純度試験法が日本薬局方に盛り込まれるに至る 2008 年 7 月までの経緯について報告する。

【結果・考察】

Fig.1a,b に代表的なヘパリンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。2.04ppm にヘパリンのアセチル基由来シグナルが観測されている。一方、OSCS のアセチル基が観測される 2.15ppm 付近にも、僅かながらピークが観測されている。そこで、 ^{13}C デカップリング (Fig.1c) とサテライトシグナルの磁場依存性 (Fig.2) により、このピークがサテライトシグナルであることを示し、本ヘパリン試料には不純物である OSCS が検出限界以下であることを証明した³⁾。

Fig.1

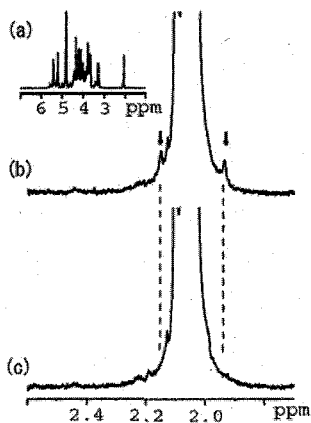


Fig.2

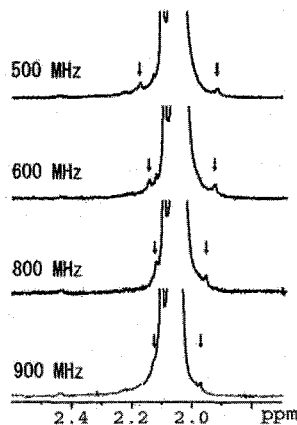


Fig.1. NMR spectra of Heparin (a), and the extended region (b) in which the satellite peaks are clearly observed. One of the satellite peaks shown with the arrow, is overlapped with the signal from the contaminant. (c) NMR spectrum with ^{13}C decoupling, in which the satellite peaks are apparently disappeared.

Fig.2. NMR spectra of Heparin measured with 900 MHz, 800 MHz, 600 MHz and 500 MHz NMR spectrometers. Chemical shifts of the satellite peaks depend on the magnetic fields.

事件が日本でも社会問題に発展した 2008 年 3 月の時点では、不純物である OSCS の混入は化学シフトの情報のみから判断するしかない状況であった。一方、米国にて多数の死亡者が報告されたことからヘパリン製品の自主回収が相次ぎ、供給不足に陥る危険性に直面していた。そのような中、当グループではサテライトシグナルの検出に注意を促し、結果として、それが考慮されて日本薬局方の改正に至っている。

1) Kishimoto T. K, *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, **358**, 2457-2467 (2008).

2) Guerrini M, *et al.*: *Nature Biotechnology*, **26**, 669-675 (2008).

3) Yamaguchi H, *et al.*: *Yakugaku Zasshi* (2008) in press.

**Sortase A を用いた Protein Ligation 法の溶液 NMR への応用 : INSET
(isotopically INvisible Solubility/Stability Enhancement Tag)の開発**

(北海道大学大学院薬学研究院)

○小橋川 敬博、久米田 博之、小椋 賢治、稲垣 冬彦

**Attachment of isotopically invisible solubility/stability enhancement tag for solution
NMR studies using sortase-mediated protein ligation method**

○Yoshihiro Kobashigawa, Hiroyuki Kumeta, Kenji Ogura, Fuyuhiko Inagaki
(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Univ.)

Sample solubility is essential for structural studies of proteins by solution NMR. Attachment of a solubility enhancement tag, such as GB1, MBP and thioredoxin, to a target protein has been used for this purpose. However, signal overlap of the tag with the target protein often made the spectral analysis difficult. We applied here a sortase-mediated protein ligation method to eliminate NMR signals arising from the tag. We expressed the isotopically labeled target proteins fused with a cleavable GB1 tag at its N-terminus, to which non labeled GB1 was ligated to its C-terminus by sortase-mediated reaction. The N-terminal GB1-tag that prevented sample precipitation during ligation reaction was subsequently removed after ligation. Thus, we prepared the isotopically labeled target protein attached with the non-labeled GB1 tag at the C-terminus. We applied this method for NMR structural analysis of Vav C-terminus SH3 and elucidated that the sortase-mediated protein ligation was an efficient and convenient method to prepare the isotopically labeled protein attached to the NMR-invisible solubility enhancement tag (INSET).

溶液 NMR を用いたタンパク質の立体構造解析において、高い溶解性および長期安定性はサンプルに求められる不可欠な条件であり、溶媒条件の検討等、その検討には多大な労力が割かれてきた。一方、Thioredoxin、MBP、GB1、GST などの可溶化タグは目的タンパク質の溶解性および安定性を改善するために利用されてきたが、可溶化タグ由来の信号が NMR スペクトルを複雑にし、構造解析を行う上での妨げとなって

キーワード : **sortase, ligation, intein, solubility, segment label, GB1**

○こばしがわ よしひろ、くめた ひろゆき、おぐら けんじ、いながき ふゆひこ

きた。この問題点を解決する有効な手段として同位体ラベルした目的タンパク質に対して非標識の可溶化タグ (INSET: isotopically INvisible Solubility/Stability Enhancement Tag)を Protein Ligation の手法により付加することが挙げられる。インテインを用いた Protein Ligation はそのための方法の一つである。しかしながら、インテインを用いる手法ではインテインとの融合タンパク質として目的タンパク質を発現させる必要があり、かつ反応効率を上げるためには反応させる断片の濃度を挙げたり、相互作用モジュールを付加するなどの工夫が必要である。そのため、コンストラクトの構築、精製が煩雑になったり、溶解度が低いサンプルへの適用が困難になるなどの問題を有していた。近年、transpeptidase である Sortase A を用いることで、Protein Ligation を行えることが報告されている¹。

Sortase A はグラム陽性菌の細胞表面タンパク質の提示に関するタンパク質である² (Fig. 1)。LPXTG モチーフを認識し、その T と G との間でペプチド鎖を切断し、ペンタグリシンを有する細胞壁の構成成分であるペプチドグ

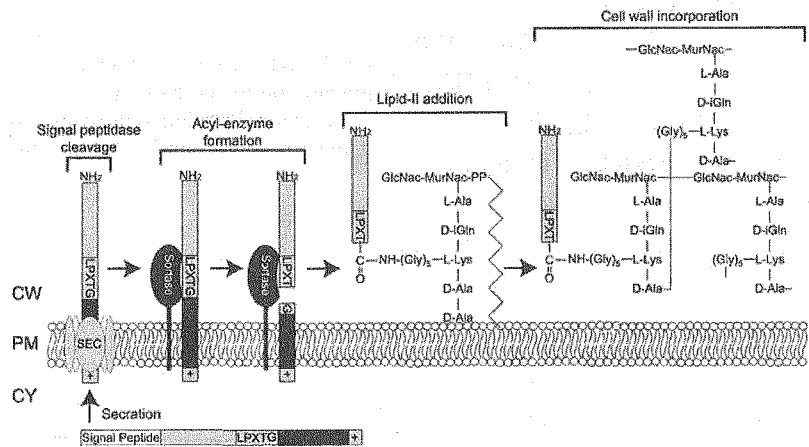


Fig.1. Schematic representation of the physiological role of sortase A.

リカンに標的タンパク質を付加する。in vitro の実験において C 末端断片には少なくとも N 末端に露出した Gly があれば連結反応が進行することが示されている。N 末端の Gly 残基の数に比例して連結効率は高まるが、Gly-Gly-Gly があれば十分な連結効率が得られる。Sortase-mediated protein ligation は有用な反応であるにも関わらず現在までのところ溶液 NMR への応用例は報告されていない。我々は Sortase を用いた Protein Ligation 法を用いることで、同位体標識した目的タンパク質に対して非標識の可溶化タグ(INSET)を連結した試料を効率的かつ簡便に付加する手法を考案した。また、INSET が難溶性タンパク質の構造解析において有効であることを Vav C 末端側 SH3 (VcSH3)で確認した。

INSET 付加のためのコンストラクトとプロトコール

発現レベルの向上、精製および Ligation 反応中の目的タンパク質の沈澱を抑えるために次のコンストラクトを構築した。N 末端 GB1-HRV3C プロテアーゼ切断サイト-目的タンパク質-LPETG-His-tag (Fig. 2)。N 末端に付加した GB1 は HRV3C プロ

テアーゼ消化により目的タンパク質から切り離すことが可能である。一方、INSETとして以下のコンストラクトを構築した。His-tag-TEV プロテアーゼ切断サイト-GB1-His-tag (Fig 2)。TEV プロテアーゼ消化により Gly-Gly-Gly-を N 末端に露出させた後、これらの断片と Sortase A を混合し、室温で 3 日間 Ligation 反応を行った。その後、HRV3C プロテアーゼによる消化により N 末端の GB1 を切り離した。次に、透析、Ni-NTA 精製、ゲルろ過を行うことで INSET が C 末端に付加された同位体標識した目的タンパク質試料を得た。

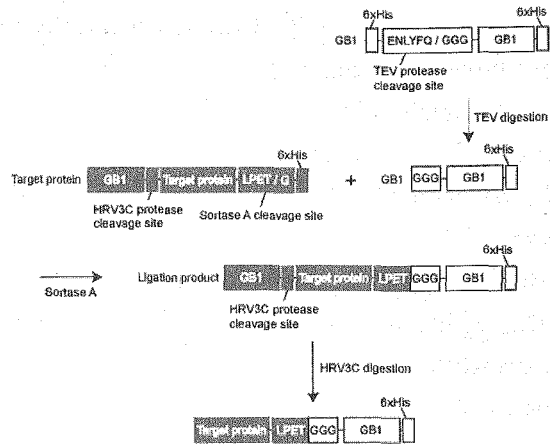


Fig.2. Schematic representation of the protocol for preparation of the target protein attached with the INSET. Gray colored region represents isotopically labeled, and white represents non-labeled region.

VcSH3 の溶解度の改善への試み

VcSH3 をテスト試料として用いた。VcSH3 は中性付近の pH では 50 μ M 以下の溶解度しかなく、多次元 NMR スペクトルの測定は困難であり、構造決定には至っていなかった。Fig. 3-a は VcSH3 の Sortase-mediated protein ligation の結果を示す。レーン 1 は反応前、レーン 2 は反応開始 3 日後、レーン 3 はレーン 2 の産物を透析、HRV3C プロテアーゼ消化、Ni-NTA 精製を行ったもの、レーン 4 はそれを更にゲルろ過精製をしたものである。反応 3 日後において 90%以上の効率で連結反応が起こっていた。また、連結反応中における VcSH3 の沈澱は

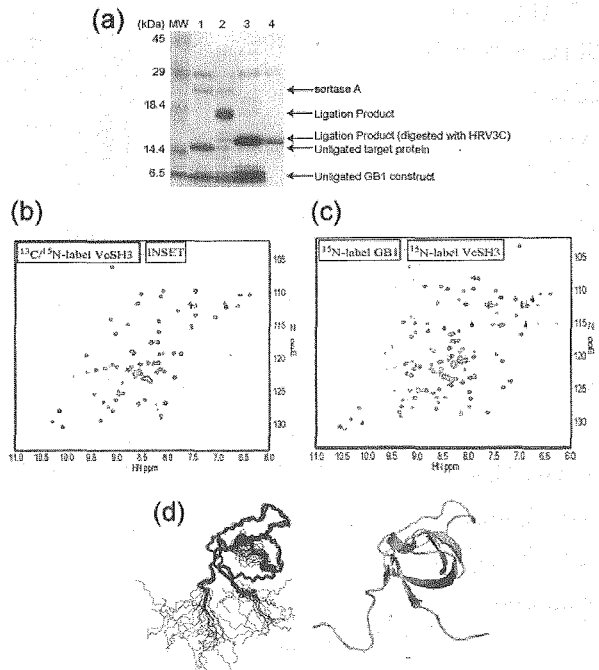


Fig. 3. (a) SDS-PAGE analysis of sortase-mediated protein ligation, and purification of VcSH3 attached with INSET. Lane 1, before sortase reaction; lane 2, reacted for three days; lane 3, after ligation, dialysis and Ni-NTA purification; lane 4, further purification by gel filtration. (b) The ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ VcSH3 attached with INSET. (c) The ^1H - ^{15}N HSQC spectra of uniformly ^{15}N -labeled GB1-VcSH3. (d) Overlay of the twenty NMR structure of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ VcSH3 attached with INSET (left) and ribbon representation.

見られなかった。収量は 16mg の VcSH3 コンストラクトから約 4mg であった。最終産物を 0.6mM まで濃縮し、NMR 測定に用いた。INSET の付加により VcSH3 の溶解度は 10 倍以上に向上していた。Fig. 3-b は INSET を付加した VcSH3 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示す。Fig. 3-c は、比較として ^{15}N ラベルした GB1-VcSH3 融合タンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示す。Fig. 3-b では Fig. 3-c に見られる GB1 のシグナルが観測されていない。次にこのサンプルを用いて VcSH3 の立体構造を決定した (Fig. 3-d)。よく収束した構造が得られ、INSET が NMR スペクトルの重なりを増大させることなくサンプルの溶解性を改善する良好なタグであることを確認した。また、Sortase-mediated protein ligation が区分選択同位体標識タンパク質を調製する上で有用な手法であり、本手法により構造解析を行う上で十分な量および精製度のサンプルを得られることを確認した。

本要旨集においては VcSH3 の溶解度を改善するために INSET を応用した例についてのみ記述した。しかしながら、溶液 NMR によるタンパク質立体構造解析においては溶解性のみではなくサンプルの長期安定性も併せて求められる。本講演では長期安定性向上へ向けた応用例についても紹介する。溶液 NMR の測定に十分な溶解度は得られるものの短時間で沈殿を生じ、2~3 週間の長期測定が行うことができなかったサンプルに対する適用例、C 末端に flexible な領域を有し、発現、精製の際に混入した微量の大腸菌由来プロテアーゼによりその領域が分解されるため、長期測定ができなかったサンプルに対する適用例についても紹介する。また、Mao らの論文¹においても、我々が Sortase-mediated protein ligation の研究を開始した初期の段階においても、タンパク質間の ligation 反応においてはせいぜい 20%~30% 程度の反応効率しか得られていなかった。いくつかの改良を行うことにより反応効率を著しく向上させることに成功し、VcSH3 を含め複数のタンパク質の立体構造解析への適用が可能となった。反応効率を向上させるために行った工夫についても本会では紹介する予定である。

REFERENCES

- (1) Mao, H.; Hart, S. A.; Schink, A.; Pollok, B. A. *J Am Chem Soc.* **2004**, 126, 2670-2671.
- (2) Mazmanian, S. K.; Ton-That, H.; Schneewind, O. *Mol Microbiol.* **2001**, 40, 1049-1057.

J. Ant
4/12/06

高温での溶液NMR測定における蛋白質のNDSBによる安定化

¹群馬大工, ²三菱化学生命研

○若松馨¹, 石井毅¹, 向隴¹, 細田和男¹, 神谷歩¹, 金子敬輔¹, 榎本舞弓¹, 井上裕介¹, 窪田健二¹, 河野俊之², 行木信一¹

Stabilization of protein by NDSB during NMR measurements at high temperatures

(¹Graduate School of Engineering, Gunma University, ²MITILS)

Kaori Wakamatsu¹, Takeshi Ishii¹, Long Xiang¹, Kazuo Hosoda¹, Ayumi Kamiya¹, Keisuke Kaneko¹, Mayu Enomoto¹, Yusuke Inoue¹, Kenji Kubota¹, Toshiyuki Kohno², Nobukazu Nameki¹

In solution NMR, better sensitivity and resolution are obtained by raising sample temperature, but proteins aggregate at too high temperatures 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. We previously found that non-detergent sulfobetaines (NDSBs) are useful for high temperature NMR measurements of proteins. Here we report the interaction (sites and strengths) of NDSB-195 with acidic fibroblast growth factor (aFGF), and the effects of NDSB-195 on the static and dynamic structures of aFGF. We also report the structure determination in the presence of NDSBs.

【緒言】

蛋白質の凝集はNMRやX線による構造解析で大きなボトルネックになっている。創薬のターゲットとなりうる蛋白質ほど凝集しやすい傾向があるので、蛋白質の凝集を防止することは基礎科学的にも実用的にも重要である。Non-Detergent SulfoBetaine (NDSB) は蛋白質を安定化し凝集を防止する試薬として知られていたが、我々はNDSBがNMR測定においても有用である事を示してきた。本発表では凝集しやすい事が知られている酸性線維芽細胞増殖因子 (acidic FGF) とNDSB-195との相互作用について報告する。また、NDSB存在下でのNMR測定や構造決定についても報告する。

【結果】

(1) aFGF上のNDSBの相互作用部位と相互作用の強さ：

種々のNDSB-195濃度でaFGFの¹⁵N-HSQCを測定することにより、NDSBとの相互作用部位を決定した。NDSBと相互作用するアミノ酸残基の化学構造に強い傾向は観測されず、酸性・塩基性・中性・疎水性全ての残基が影響された。一方、影響された残基の2/3以上は二次構造 (β-strand, ₃₁₀-helix) とループとの接合部位に存在した (Fig. 1)。また、相互作用の見かけの解離定数 (K_d) は0.04~3 Mの広い範囲にわた

凝集 安定性 NDSB 運動性 構造決定

わかまつかおり いしいたけし こうりゅう ほそだかずお かみやあゆみ
かねこけいすけ えのもとまゆ いのうえゆうすけ くぼたけんじ
こうのとしゆき なめきのぶかず

っていた。この値は通常の酵素・基質の親和性 (K_m) より2桁弱いので、NDSBは酵素・基質相互作用を妨害しないと予想される。

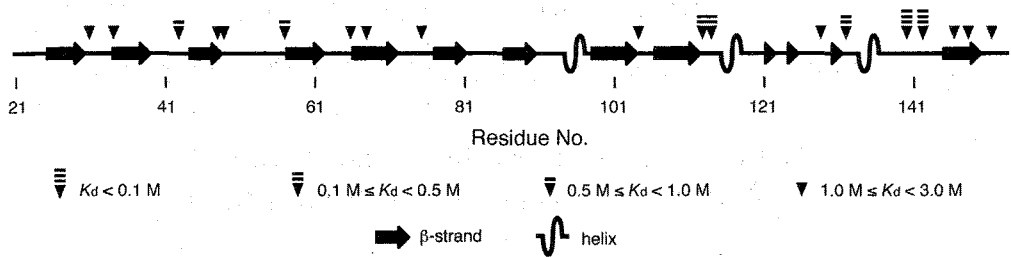


Fig. 1: The residues whose chemical shifts were affected by NDSB-195 with apparent K_d values smaller than 3 M are indicated along the sequence of aFGF. Different affinities of the interaction are indicated by different symbols.

(2) NDSBがaFGFの静的・動的構造に及ぼす効果：

aFGFの遠紫外の円偏光二色性 (CD) スペクトルはNDSB-195を添加しても変化しなかったため、aFGFの二次構造はNDSBにより影響を受けないことがわかった。一方、NDSBの添加により近紫外-CDは絶対値が大きくなり、またトリプトファン蛍光も若干強くなった。このことから、NDSBはaFGFの三次構造を安定化していると考えられる。

ps-nsの運動を反映する ^{15}N - ^1H NOEはNDSB-195を添加しても有意に変化しなかった。そこでNDSBはこのタイムスケールの運動に影響しないことがわかった。 μs - ms の運動を反映する ^{15}N の横緩和速度 (R_2) は溶液の粘度にほぼ比例する。0.5 M NDSB-195の添加により溶液の粘度は1.21倍上昇するので、 R_2 も1.21倍上昇する事が期待されたが、実際には1.03倍という小さい上昇が観測された。このことは、aFGFの三次構造が安定化され、コンパクトになった事を反映していると考えられる。

(3) NDSB-195存在下でのNMR測定と立体構造計算：

0.5 M NDSB-195存在下でも主鎖・側鎖のシグナル帰属に必要なNMRスペクトルは問題なく測定でき、帰属も完了した。また、 ^{15}N -edited NOESYも測定できたが、 ^{13}C -edited NOESYにはNDSB-195由来のノイズが強くなり、多くのNOESYシグナルが観測できなかった。その結果、収束した構造は得られなかった。我々はNDSB-195のアナログ (NDSB-new) とその重水素化物を合成したが、NDSB-newの存在下では ^{13}C -edited NOESYにノイズは現れず、最終的に収束した構造が得られた。そこで、重水素化したNDSB-newは不安定な蛋白質のNMRによる立体構造決定に非常に有用であると期待される。

【参考文献】

L. Xiang, T. Ishii, K. Hosoda, A. Kamiya, M. Enomoto, N. Nameki, Y. Inoue, K. Kubota, T. Kohno, K. Wakamatsu (2008) "Interaction of anti-aggregation agent dimethylethylammonium propane sulfonate with acidic fibroblast growth factor", *J. Magn. Reson.*, 194, 147-151.

混合粉砕物中の医薬品分子状態の検討

東邦大院・薬 ○高木美菜子、吉橋泰生、米持悦生、寺田勝英

Molecular States of Drug in Ground Mixtures
With Cyclodextrin Evaluated by Solid State NMR

Faculty of Pharmaceutical Science, Toho University

○Minako Takagi, Yasuo Yoshihashi, Etsuo Yonemochi, Katsuhide Terada

Molecular states in ground mixtures of aspirin and β -cyclodextrin were investigated by ^{13}C CP/MAS NMR measurement. The NMR signals due to aromatic carbon moiety of aspirin observed in ground mixture were the same positions as that observed in inclusion compound. NMR signals of acetoxyl group and carboxyl group of aspirin were different in both samples. To gain the inclusion mode of aspirin in ground mixtures, we carried out a series of 2D HETCOR NMR experiment. In the HETCOR spectrum of ground mixture, correlation peaks appeared between C8, C9 of aspirin and β -cyclodextrin protons. It was suggested that not only acetoxyl group but carboxyl group of aspirin would be included in the β -cyclodextrin cavity in the ground mixture.

背景

シクロデキストリンと医薬品を混合粉砕することで医薬品が非晶質化し、難溶性医薬品においてはその溶解性が改善されるという事は既に良く知られている。しかし、混合粉砕物中の分子状態についてはこれまでラマン、IR スペクトルにより検討が行われてきたがその包接様式は未だ十分に解明されていない。本研究では、医薬品とシクロデキストリンの包接化合物結晶及び混合粉砕物について固体 NMR スペクトル測定を行い、それらの医薬品の分子状態について検討した。

実験

医薬品には結晶状態で二量体を形成するアスピリン (ASP) を用い、シクロデキストリンは β -シクロデキストリン (β -CD) を用いた。包接化合物は共沈法により調製した。

固体 NMR、包接化合物

たかぎみなこ、よしはしやすお、よねもちえつお、てらだかつひで

混合粉碎には振動ロッドミルを用い、モル比 1:1 で 45 分を行った。包接化合物及び混合粉碎物中における医薬品の分子状態の評価は固体 NMR (Bruker 社 AVANCE 300MHz digital NMR) を用いて行った。

結果、考察

1) 各試料中の β -CD の分子状態

CP/MAS NMR 測定により包接化合物、混合粉碎物中の β -CD 分子の状態を比較した。各試料の β -CD に帰属するシグナル部分を Fig.1 に示した。混合粉碎物の全てのシグナルは、 β -CD 結晶のシグナルの位置に対し高磁場側にシフトしていた。これは ASP の包接化により遮へい度が増し、高磁場側へのシフトが起きたためと考えられる。また、混合粉碎物のシグナルは包接化合物のシグナルに比べブロードなシグナルであった。包接化合物のシグナル位置は β -CD 結晶のシグナルに対し全て高磁場側にシフトしており、混合粉碎物の結果と一致していた。

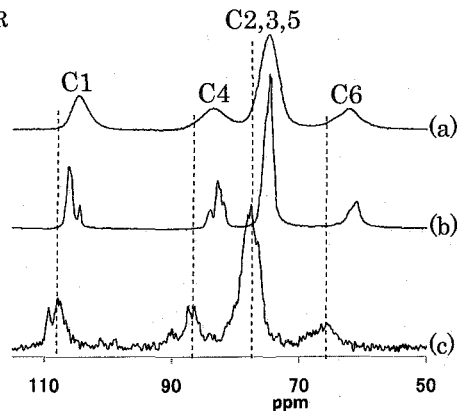
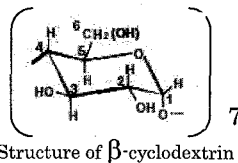
Fig.1 ^{13}C CP/MAS NMR

spectra of β -Cyclodextrin

(a) Ground mixtures

(b) Inclusion compound

(c) β -Cyclodextrin crystal



2) 各試料中の ASP の分子状態

CP/MAS NMR 測定により包接化合物、混合粉碎物中の ASP の分子状態の比較を行った。各試料の ASP のシグナル部分を Fig.2 に示した。混合粉碎物のシグナルは C4~C7 が ASP 結晶のシグナルに対して低磁場側にシフトしていた。さらに、C1~C2 のシグナルはブロードなシグナルであった。また、C9 のシグナルは低磁場側 (○) と高磁場側 (●) の二つのシグナルとして現われていた。

包接化合物は ASP の C4~C9 のケミカルシフトが低磁場側へシフトしていた。C1、C2 は ASP 結晶と一致するシグナル (◎) と高磁場側へシフトしたシグナル (★、☆) が確認された。このことから包接化合物中の C1、C2 には複数の状態が存在していることが示唆された。

これらの結果から、混合粉碎物中においても ASP のベンゼン環は包接されていることが示唆された。また、アセトキシ基にあたる C9 のうち低磁場側のシグナル (○) が包接化合物の C9 のシグナルとよく一致していたため、混合粉碎物では C9 の方向からも包接されていることが示唆された。ただし、C9 の高磁場側のシグナル (●) は包接化合物と一致しないことから、包接されていない C9 も存在することが示唆された。

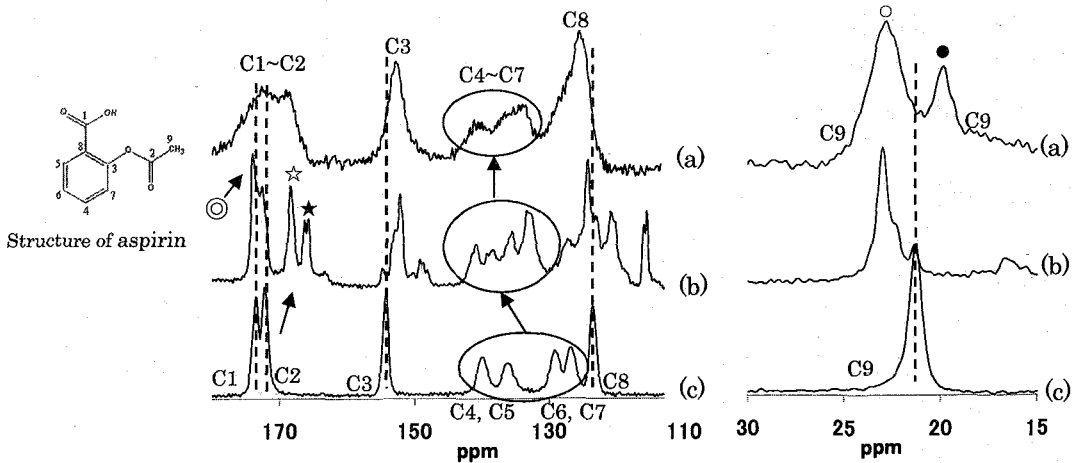


Fig.2 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of Samples

(a) Ground mixtures (b) Inclusion compound (c) Aspirin crystal

3) 混合粉砕物中での ASP 分子の包接様式

混合粉砕物中での ASP 分子の包接様式を検討するため、固体 NMR ^1H - ^{13}C heteronuclear correlation (HETCOR)測定を種々の拡散時間で行った。Fig.3 には包接化合物の拡散時間(a)100 μs 、(b)500 μs での HETCOR スペクトルを示した。拡散時間 100 μs の HETCOR 測定では、ASP、 β -CD それぞれの分子内での ^1H - ^{13}C 相互作用によるシグナルが認められた。拡散時間 500 μs のスペクトルでは ASP の C1~C2 に帰属されるシグナルが β -CD の ^1H と相互作用していることが確認された。C1、C2 に帰属するシグナルのうち ASP 結晶と同じ位置に見られたシグナル (○) はアセトキシ基由来の 3.5~4ppm にシグナルが認められ、このシグナルは、C9 の ^1H に近いアセトキシ基の C2 に帰属されることが示唆された。

Fig.4 には混合粉砕物と包接化合物の拡散時間 500 μs での HETCOR 測定の結果を示した。混合粉砕物のスペクトルで ASP と β -CD 間の ^1H - ^{13}C 相互作用のシグナルが見られたのはアセトキシ基の C9 (○) のシグナルとベンゼン環の C8 シグナルであった。この結果は Fig.2 (a) のアセトキシ基の C9 (○) が包接化され、C9 (●) は包接化されていないことが示唆された。さらに C8 のシグナルも確認されていることから、ASP 分子がカルボキシル基方向から β -CD に包接される様式も存在していると考えられた。また、混合粉砕物の HETCOR スペクトルはノイズが包接化合物に比べ大きく、混合粉砕物中の ASP の分子状態は様々で、不均一な状態であることが確認された。

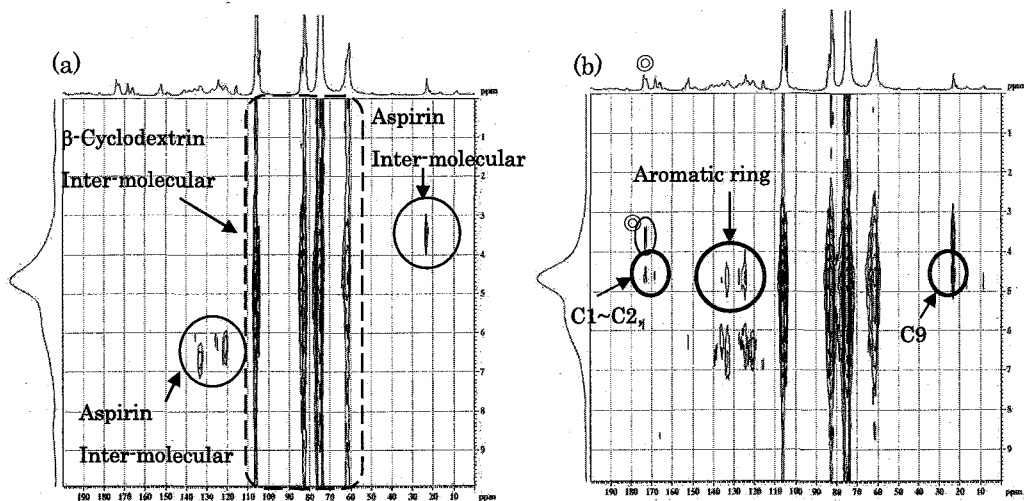


Fig.3 ^1H - ^{13}C HETCOR NMR spectra of Inclusion compound with different spin diffusion time
 (a) 100us (b) 500us

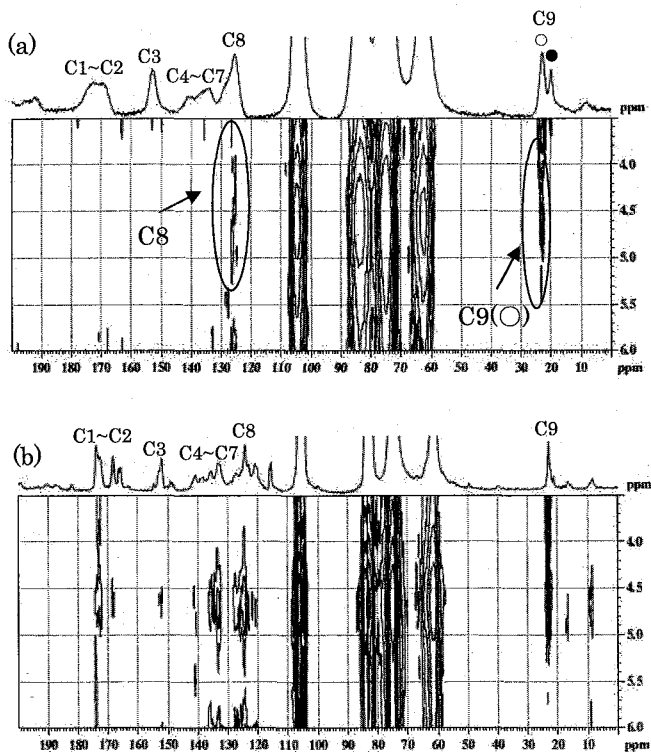


Fig.4 ^1H - ^{13}C HETCOR NMR spectra of inclusion compound and ground mixtures with spin diffusion time of 500us
 (a) Ground mixtures
 (b) Inclusion compound

微生物産生高分子ポリ(ε-L-リジン)
およびそのポリマーブレンドの固体 NMR

福井大院工¹, 金沢大院自然²

○前田史郎¹, 加藤久美子¹, 国本浩喜²

Solid-State NMR of Microbial Poly(ε-L-lysine) and Its Polymer Blends

Shiro Maeda¹, Kumiko Kato¹, and Ko-Ki Kunimoto²

¹Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Japan and ²Division of Applied Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Japan

In recent years, there has been considerable interest in biopolymers because of concern over the environmental impacts arising from the disposal of petroleum based plastics. Poly(amino acid)s provide a class of biopolymers based on natural amino acids linked by amide bonds. The molecular structure of microbial poly(ε-lysine) and its polymer blends with poly(acrylic acid) (PAA), carboxy methyl cellulose (CMC), poly(vinyl alcohol) (PVA), and poly(L-lactic acid) (PLLA) were investigated by using high-resolution solid-state ¹³C and ¹⁵N NMR spectroscopy.

【緒言】ポリ(ε-L-リジン) (ε-PL)は、放線菌の一種 *Streptomyces albus* が産生する微生物由来の生分解生高分子である。ε-PL 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-アミノ基がペプチド結合した直鎖状高分子である (Fig.1)¹⁾。ε-PL は水溶性であり、抗菌性、凝集・吸水性等、多様で有用な特性を持つ。

ε-PL は、側鎖に反応性の高いε-アミノ基(α-NH₂)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 と水溶性を持つポリアクリル酸(PAA)、ポリビニルアルコール(PVA)、カルボキシメチルセルロース(CMC)、ならびにポリ乳酸(PLLA)とのポリマーブレンドを作成し、固体高分解能 NMR, IR を用いて構造解析を試みた²⁾。

【実験】ε-PL は数平均分子量 4,090, 平均重合度 32 の白色粉末でありチッソ(株)から提供されたものをそのまま用いた。ブレンドポリマーの作成条件は次のようである。ε-PL/PAA : ε-PL と PAA をそれぞれメタノールに溶解後、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。沈殿から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製作した。ε-PL/CMC およびε-PL/PVA : ε-PL と CMC-Na または PVA をそれぞれ蒸留水に溶解後、混合した。混合溶液をテフロンシャーレ上にキャストし、室温で風乾させた後に、さらに減圧乾燥させ、無色透明でフレキシブルなブレンドフィルムを得た。

キーワード：微生物産生高分子, ポリ(ε-L-リジン), 固体 NMR, ポリマーブレンド, 生分解性高分子

まえだ しろう, かとう くみこ, くにもと こうき

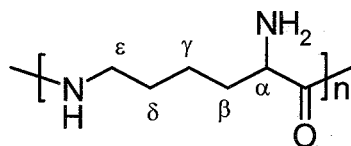


Fig.1 Structure of poly(ε-L-lysine)

ϵ -PL/PLLA: クロロホルム/メタノールの混合溶媒、ヘキサフルオロイソプロパノールの2種類の溶媒を用いて上記と同様な操作で様々な比率のブレンドフィルムを作成した。L-ポリ乳酸(PLLA)は数平均分子量 210,000 であり三井化学(株)から提供されたものをそのまま用いた。固体高分解能 ^{13}C および ^{15}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。 ^{13}C 化学シフトは HMB のメチル炭素を TMS から 17.35ppm, ^{15}N 化学シフトは Glycine を $\text{NH}_3(\text{liq.}, 25^\circ\text{C})$ から 32.5ppm とした。測定は室温で行い、MAS 回転数は 5-7kHz であった。

【結果と考察】

(1) ϵ -PL/PAA: ϵ -PL, ϵ -PL/PAA および PAA の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを Fig.2 に示す。 ϵ -PL と PAA をブレンドすることにより、 ϵ -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。 ϵ -PL と ϵ -PL 塩酸塩(ϵ -PL/HCl)の $\text{C}=\text{O}$ ピークの化学シフト^{3,4)}を比較すると、 ϵ -PL は、 $\text{C}=\text{O}\cdots\text{NH}$ の水素結合のために ϵ -PL/HCl よりも低磁場シフトする。複合体中の ϵ -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 ϵ -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、 ϵ -PL の α -CH および、 γ - CH_2 ピークが高磁場シフトした。これは、 γ -gauche 効果によるもので、 ϵ -PL のコンフォメーション変化を示唆する。

Fig.3 に ϵ -PL, ϵ -PL/HCl, Methyl Orange を化学修飾した ϵ -PL/MO (Scheme1) および ϵ -PL/PAA (1/1) の固体 ^{15}N CP/MAS NMR スペクトルを示す。 ϵ -PL/PAA (1/1) の主鎖 ϵ -NHCO は 121ppm, 側鎖 α - NH_2 は 38ppm に現れた。これらのピークは ϵ -PL と比較すると、 ϵ -PL/HCl, ϵ -PL/MO と同様に低磁場シフトしている。 ϵ -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³⁾。以上の結果は、PAA をブレンドすることにより、 ϵ -PL のコンフォメーション変化、

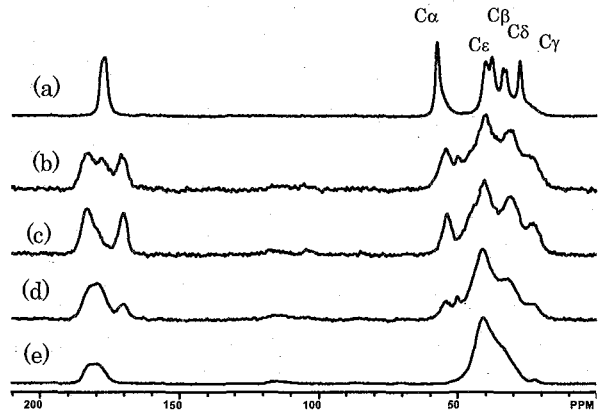
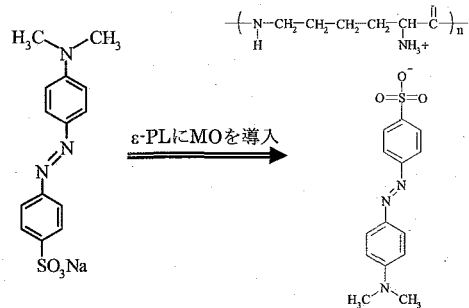


Fig.2 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (a) ϵ -PL powder; (b) ϵ -PL/PAA (3/1), (c) ϵ -PL/PAA (1/1), (d) ϵ -PL/PAA (1/3) and (e) PAA powder.



Scheme1. Structure of ϵ -PL/MO³⁾.

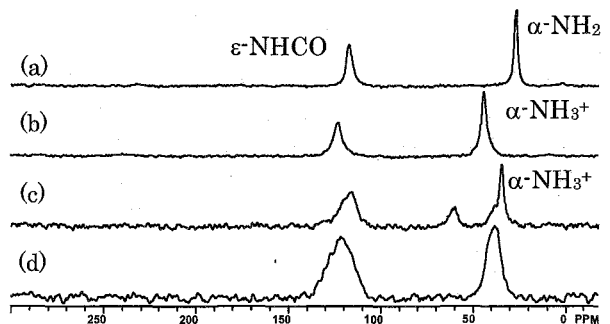


Fig.3 ^{15}N CP/MAS NMR spectra of (a) ϵ -PL powder, (b) ϵ -PL/HCl, (c) ϵ -PL/MO and (d) ϵ -PL/PAA (1/1).

イオンコンプレックスの形成を示唆する。

(2) ϵ -PL/CMC: Fig.4 に水からキャストした CMC フィルム, ϵ -PL/CMC, 水からキャストした ϵ -PL フィルムの ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す. ϵ -PL/CMC は透明で柔軟なフィルムである. Fig. 5 に ϵ -PL および ϵ -PL/CMC の ^{15}N CP/MAS NMR スペクトルを示す. ϵ -PL/CMC の 90ppm 付近に ϵ -PL 粉末にはないピークが現れた. 当初, 化学シフト値からアミド窒素と帰属し, ϵ -PL の α -NH₂ と CMC のカルボキシ基がアミド結合を形成する可能性を検討した. しかし, 水からキャストした ϵ -PL フィルムの ^{15}N NMR スペクトルにも 90ppm にピークが観測された. 同様に Fig.4 (e) の ^{13}C スペクトルにも 127ppm 付近に ϵ -PL 粉末にはないピークが現れる. 水からキャストした ϵ -PL に現れるこれらのピークの帰属および高分子間の相互作用について現在検討中である. 相溶性を評価するために $T_{1\rho}^{\text{H}}$ を測定した. ϵ -PL/CMC = 2/1 ブレンドフィルムの $T_{1\rho}^{\text{H}}$ 値はほぼ均一で, ϵ -PL と CMC のホモポリマーの $T_{1\rho}^{\text{H}}$ 値の間であった. $T_{1\rho}^{\text{H}}$ 測定から, ϵ -PL と CMC は 2-5nm のスケールで相溶していると考えられる.

(3) ϵ -PL/PVA: Fig. 6 に, ϵ -PL, 水溶液からキャストした ϵ -PL, ϵ -PL/PVA, PVA の ^{13}C NMR スペクトルを示す. ϵ -PL/PVA は透明で柔軟なフィルムである. ϵ -PL/PVA の C=O および C α ピークが ϵ -PL に比べて高磁場シフトを示していない. また, ^{15}N スペクトル測定を行ったところ ϵ -PL/CMC と同様のスペクトルを与え, α -NH₂ が低磁場シフトを示していないので, ϵ -PL/PVA はポリイ

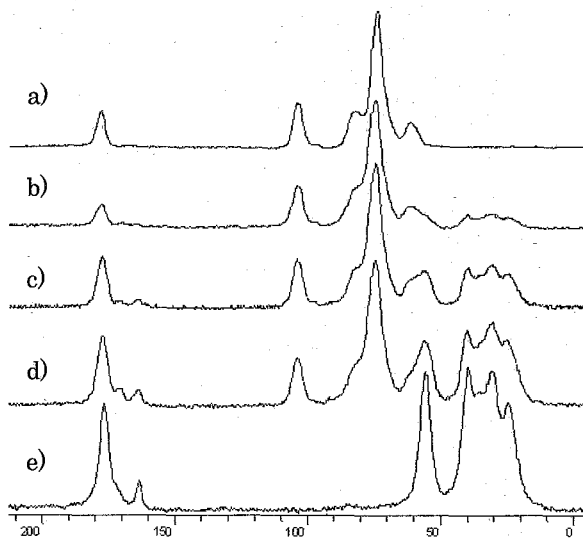


Fig. 4. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (a) CMC cast film from aqueous solution, (b) ϵ -PL/CMC=1/2 blend film, (c) ϵ -PL/CMC=1/1 blend film, (d) ϵ -PL/CMC=2/1 blend film, and (e) ϵ -PL cast film from aqueous solution.

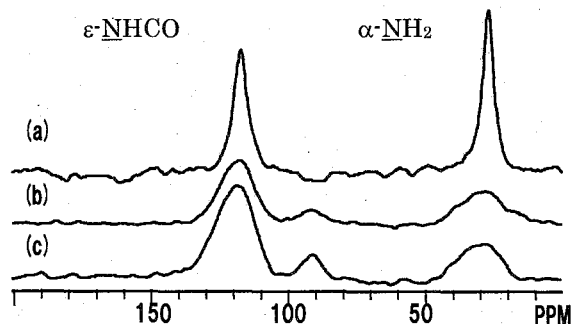


Fig. 5. ^{15}N CP/MAS NMR spectra of (a) ϵ -PL powder, (b) ϵ -PL/CMC=1/1 blend film, and (c) ϵ -PL/CMC=2/1 blend film.

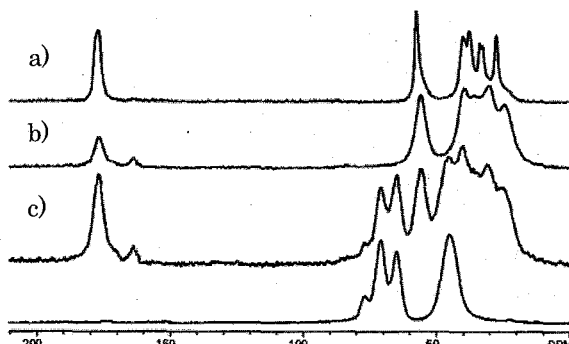


Fig. 6. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (a) ϵ -PL, (b) ϵ -PL cast film from aqueous solution, (c) ϵ -PL/PVA(1/1), and (d) PVA powder.

オンコンプレックスではないと考えることができる。私たちはPVAの ^{13}C NMRスペクトルにおいてCHピークが分裂し、それが分子内水素結合に起因することを見出している⁵⁾。ブレンド比率によって、3本に分裂したCHピークの相対比率が変化することを見出したが、これはブレンド比率によって高分子間の水素結合様式が異なることを示している。 T_1^H 測定により求めた T_1^H 値は、すべてのブレンドにおいて一致した。これは、 ϵ -PL/PVAブレンドが20~50nmのドメインで非常によく混ざり合っていることを示唆している。一方、 $T_{1\rho}^H$ 測定により求めた $T_{1\rho}^H$ 値は、どのブレンドにおいても一致しなかった。しかし、各ポリマーの $T_{1\rho}^H$ 値と比較すると、互いに平均の値に近い値を示している。これは、2~5nmのドメインでは完全に混ざり合っていないが、部分的に相溶していることを示唆する。

(3) ϵ -PL/PLLA : メタノール/クロロホルム溶液からキャストした ϵ -PL、 ϵ -PL/PLLA および PLLA フィルムの ^{13}C NMR スペクトルを Fig. 7 に示す。PLLA の結晶構造には10₃らせんの α 晶3₁らせんの β 晶の2種類があるが、Fig. 7(e)からわずかに α 晶が混ざっているがほぼ非晶であると考えられる。 ϵ -PL/PLLA 複合体のスペクトル Fig. 7 (b)-(d)をみると、 ϵ -PL の比率が増大するにつれて、PLLA のスペクトルが α 晶に特徴的なスペクトルに変化していることが分かる。このことから、PLLA が非晶から α 晶に変化していると考えられる。このことはDSCからも確かめられた。この原因としては、結晶化速度の違いが考えられる。一方、 ϵ -PL のスペクトルには大きな変化は見られないので、 β -シート構造を保っていると考えられる。

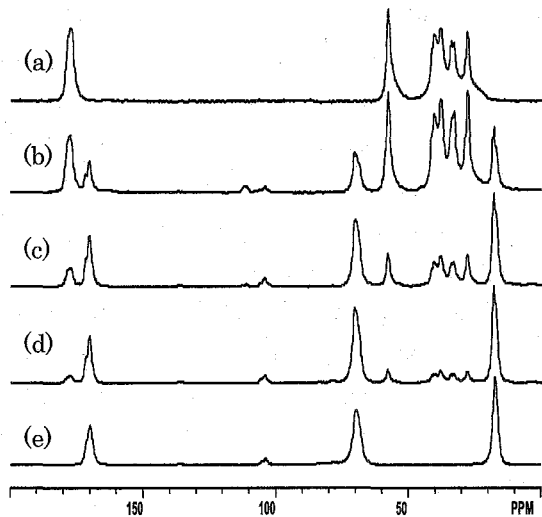


Fig. 7. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of polymer blend films cast from methanol/chloroform solution : (a) ϵ -PL, (b) ϵ -PL/PLLA (3/1), (c) ϵ -PL/PLLA (1/1), (d) ϵ -PL/PLLA (1/3), and (e) PLLA.

【謝辞】大学院生として本研究に協力していただいた森 貴志, 村中淳之介, 木下 理, 藤原康博の諸氏に感謝します。また、ポリ(乳酸)をご提供いただき、貴重な議論をしていただきました福井大学桜井謙資教授に感謝いたします。

【引用文献】

- 1) 前田史郎, 森貴志, 国本浩喜, 佐々木千鶴, 高分子加工, **52**(11), 516-522(2003).
- 2) S. Maeda, Y. Fujiwara, K. Kato, and K. Kunimoto., *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)*, **49**, 730-731(2008).
- 3) S. Maeda, K. Kunimoto, C. Sasaki, A. Kuwae, and K. Hanai, *J. Mol. Struct.*, **655**, 149-155 (2003)
- 4) S. Maeda, T. Mori, C. Sasaki, K. Kunimoto, A. Kuwae, and K. Hanai, *Polym. Bull.*, **53**, 259-267 (2005)
- 5) T. Terao, S. Maeda, and A. Saika, *Macromolecules*, **16**, 1535-1538, (1983)

旭硝子(株) ○関 庚薫
AGC エスアイテック(株) 宮原 浩嘉

Surface and internal hydroxyl group density of porous silica gel
Asahi Glass Co., Ltd. Kyon Hun Min
AGC Si-Tech Co., Ltd. Hiroyoshi Miyahara

Surface hydroxyl group of porous silica gel plays an important role on its chemical and physical properties. Quantification of surface hydroxyl group density possess some difficulties due to its internal hydroxyl group. In this work, we estimated surface and internal hydroxyl group densities using ^{29}Si NMR technique. Signal intensities of ^{29}Si NMR spectra provide ratios of Q4, Q3 and Q2. The correlation between specific surface area of porous silica gels and ratios of Q4, Q3 and Q2 of various porous silica gels provides both surface and internal hydroxyl group densities. We concluded that surface and internal hydroxyl group densities are $6.17\mu\text{mol}/\text{m}^2$ and $1.88\text{mmol}/\text{g}$, respectively. Signal to noise ratio of ^{29}Si NMR spectra have also been improved dramatically using relaxation agent for solid porous material, leading to higher accuracy of the densities.

1. はじめに

多孔質シリカゲルの用途として、医薬品精製用および分析用のカラム充填剤、ペプチド合成用の担体等が挙げられる。何れの用途においても、多孔質シリカゲル表面の有機修飾処理は必須である。有機修飾品の特性、例えば耐アルカリ性は、表面水酸基の残存率に大きく影響される。このため、表面水酸基密度の算出は、多孔質シリカゲルの構造解析において極めて重要である。水酸基の定量法としては、固体 ^{29}Si NMR 法と赤外分光法が挙げられる。何れの分析手法も、表面水酸基と内部水酸基を区別することはできない。このため、表面および内部の水酸基密度を算出することは困難であった。本報では、適切な試料群を揃えることで、この課題の解決を試みる。分析手法には、固体 ^{29}Si NMR 法を用いる。同法の短所であるデータ積算効率の低さを改善する目的で、緩和試薬¹⁾の利用を試みた。固体試料に対して緩和試薬を利用する場合、試

料と緩和試薬とを融解混合することが一般的である²⁻⁴⁾。ここでは、試料が比表面積の大きい多孔質体であることを利用する。緩和試薬を試料表面に吸着させることで、その機能発現を期待する。

2. 実験方法

試料は、工業的に調製された多孔質シリカゲル 9 点。各試料の比表面積は、150-900m²/g の範囲内に収まる。

NMR 測定には、日本電子社製 ECP400 を用いた。共鳴周波数は、²⁹Si 核 : 79.41MHz である。²⁹Si 核パルス幅は、45°(2.75 μs) である。測定には、MAS 法を採用する。データ積算における待ち時間は、未処理試料の場合 200-300s、前処理した試料の場合 1.0-2.5s である。MAS 速度は、約 5kHz とする。ポイント数は 4096。フーリエ変換時の BF 値は 20-50Hz とし、ピーク分離に用いるワイブルグ係数は 2 とする。縦緩和時間 T₁ の測定には、Saturation-Recovery 法を採用した。

緩和試薬の利用法について述べる。緩和試薬であるクロム(III)アセチルアセトナートのアセトン溶液を調製する。この溶液とシリカゲルをバイヤル中で混合し、超音波処理を行う。次いで時計皿に移し、ホットプレート上90°Cで加熱乾固し、測定に供する。アセチルアセトンクロム塩添加量は、クロム元素換算で、シリカゲル総重量に対して1wt%とした。

3. 実験結果と考察

試料の典型的な ²⁹Si NMR スペクトルを Fig. 1 に示す。同スペクトルは、3 本のピークに分離可能である。3 本のピークは、高磁場側から Q4、Q3、Q2 に帰属される。ピーク面積比から、Q4、Q3、Q2 の組成比を算出可能である。全試料について、Q4-Q2 の組成比を算出し、比表面積に対してプロットした (Fig. 2)。比表面積の増大に伴い、水酸基を有する Q2 と Q3 の分率は増大し、水酸基を持たない Q4 の分率は減少する。Q4、

M. U. RAKAMI, Miwa

Q3、Q2 の各成分の比率と比表面積との関係は、直線で近似できる。このことから、各直線の傾きによって、表面水酸基密度を算出できる。また、各直線の y 切片は、比表面積がゼロの状態における Q4-Q2 の組成比を表す。つまり、各直線の y 切片から、内部水酸基密度を算出することができる。これによると、表面水酸基密度は $6.84 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ であり、内部水酸基密度は $2.33\text{mmol}/\text{g}$ である。

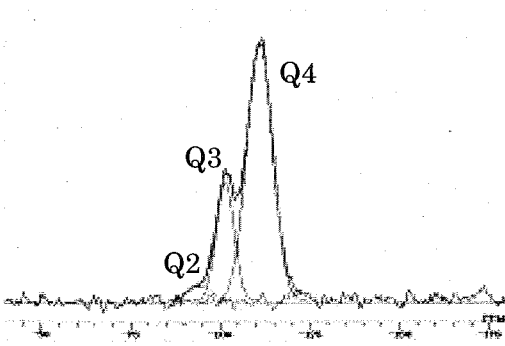


Figure 1 Peak resolved ^{29}Si NMR spectra of porous silica gel

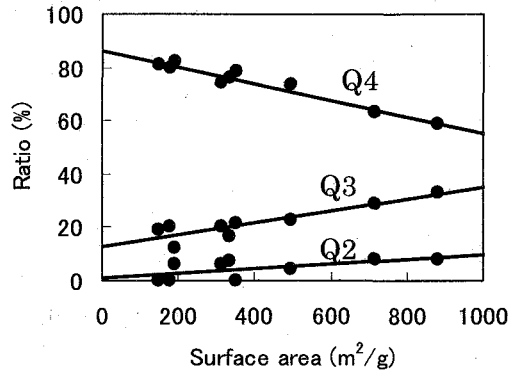


Figure 2 The relationship between surface area and Q4-Q2 ratio of each sample

Fig. 1 に示すスペクトルは、取得に 20hr を要し、S/N 比は 11 である。S/N 比が低い
ため、微量成分である Q2 は、その組成比に大きな実験誤差を含む。この実験誤差を
低減するためには、スペクトルの積算効率向上が有効である。ここでは、その手段と
して、緩和試薬の活用を試みた。緩和試薬処理を行うことで、試料の T_1 を 500 分の 1

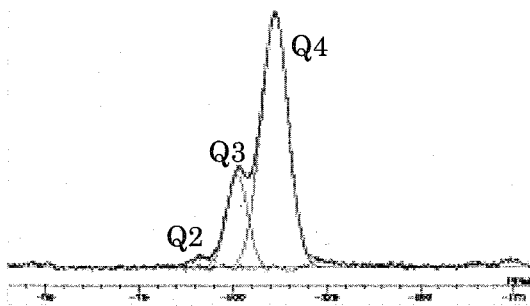


Figure 3 Peak resolved ^{29}Si NMR spectra of porous silica gel treated with relaxation reagent

に短縮可能である。緩和試薬処理した
試料の ^{29}Si NMR スペクトルを Fig. 3 に
示す。測定時間は 2hr であり、S/N 比
は 43 である。Fig. 1 に比べ、Fig. 3 は、
取得時間が 1/10 と短い上に、S/N 比も
4 倍高い。緩和試薬処理した試料を用
いて、改めて水酸基密度の算出を行っ
た。これによると、表面水酸基密度は

6.17 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ であり、内部水酸基密度は 1.88mmol/g である。緩和試薬処理を行うことで、比表面積と Q2、Q3 の成分比との関係における相関係数は、向上していることを確認済みである。

さらには、表面および内部の各水酸基密度について、Q3 と Q2 各成分の寄与率を算出した。興味深いことに、何れの水酸基密度についても、Q3 と Q2 各成分の寄与率は 75 : 25 であり、同じ値を示す。

4. まとめ

多孔質シリカゲルについて、固体 ^{29}Si NMR 法により、内部水酸基量と表面水酸基量を見積もることに成功した。表面水酸基密度は 6.17 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ であり、内部水酸基密度は 1.88mmol/g である。固体 ^{29}Si NMR 法の欠点であるデータ積算効率の低さを改善するために、緩和試薬の活用を試み、これに成功した。これにより、NMR スペクトルの積算効率が改善され、定量性は大幅に向上した。

参考文献

- 1) 宮澤辰雄、荒田洋治、編、NMR-総説と実験ガイド[II] 化学の領域 増刊 142 号 南江堂、東京、(1983) 167
- 2) K. J. D. Mackenzie and M. E. Smith, Multinuclear Solid-State NMR of Inorganic Materials, Pergamon, Amsterdam, (2002) 202
- 3) J. S. Hartman, A. Narayanan and Y-X. Wang, J. Amer. Chem. Soc., 116 (1994) 4019
- 4) R. H. Meinhold and K. J. D. MacKenzie, Solid State Nucl. Mag. Reson., 5 (1995) 151.

キーワード solid state ^{29}Si NMR, hydroxyl group density, silica, relaxation reagent

著者ふりがな みんな きょんぶん、みやはら ひろよし

多孔質 BCN 系における ^{11}B - ^{14}N の交差分極法
および HETCOR の応用

(物質・材料研究機構¹, 京大・理²)

○村上美和¹, 丹所正孝¹, 清水禎¹, Vinu Ajayan¹,
有賀克彦¹, 森利之¹, 竹腰清乃理²

^{11}B - ^{14}N Cross polarization in mesoporous BCN and application of HETCOR
(National Institute for Materials Science¹, Graduate School of Science,
Kyoto University²) M. Murakami¹, M. Tansho¹, T. Shimizu¹, A. Vinu¹, K.
Ariga¹, T. Mori¹, K. Takegoshi²

By analyzing the ^{11}B MAS NMR of mesoporous BCN, we reported it consists of three boron sites. From comparison with similar compounds, these three sites were assigned to (1) boron coordinated to three nitrogens, (2) boron carbon nitride, and (3) boron coordinated to four nitrogens. Recently, to confirm these assignments, we examined ^{14}N MAS NMR and found that the assignment is too naive. To establish more accurate assignment, an application of HETCOR is invoked. In this work, we report our first results of CP among ^{11}B - ^{14}N , which is prerequisite for HETCOR.

【緒言】我々はこれまでに ^{11}B MAS NMR の測定から多孔質 BN(MBN) および BCN(MBCN)には3種類のホウ素サイト(図1の a, b, c)があることを報告した¹⁾。それらは類似の化合物の ^{11}B MAS スペクトルとの比較から、各々、窒素3配位ホウ素(a)、窒素4配位ホウ素(c)、および炭素を含む BN 構造(b)と帰属した(図1)。ところが、 ^{14}N MAS NMR を測定したところ、上記の単純な ^{11}B の帰属に対して疑問が生じた。そこで、この問題を解決するために、 ^{11}B - ^{14}N HETCOR の適用を考え、まず、それに必要な ^{11}B - ^{14}N の CP を検討した。

【実験】MBCN および MBN は既報²⁾の試料を用いた。cubic BN (cBN)は昭和電工より、hexagonal BN (hBN)は信越化学より購入した。 ^{11}B および ^{14}N MAS NMR 測定には、JEOL 社製 ECA930 (21.8 T、共鳴周波数 ^{11}B : 298.377 MHz、 ^{14}N : 67.155 MHz) および ECA500 (11.7T、共鳴周波数 ^{11}B : 160.471 MHz、 ^{14}N : 36.145 MHz) を用いた。

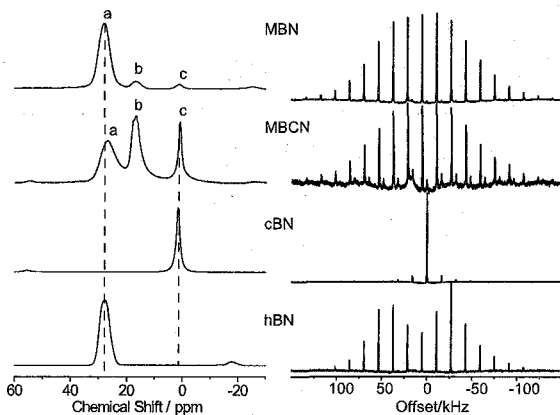


Fig.1 ^{11}B (left) and ^{14}N (right) MAS NMR spectra for BN samples measured at 21.8 T.

キーワード： ^{11}B , ^{14}N , CP, HETCOR, BCN

むらかみみわ・たんしょまさたか・しみずただし・ヴィヌアジャヤン・
ありがかつひこ・もりとしゆき・たけごしきよりのり

【結果と考察】CP時には両方の核にラジオ波照射を行うが、ラジオ波による核スピンの nutation 周波数は四極子相互作用により影響を受けると考えられる。MAS 下で効率良く CP を行うためには、

$$v_{\text{nut } 14\text{N}} = v_{\text{nut } 11\text{B}} \pm n v_R$$
 (v_{nut} は nutation 周波数、 v_R は MAS 周波数) の $n=-1$ か 1 の条件で行う必要がある。そこで、まず四極子の小さい cBN を用いて、11.7 T の磁場で ^{11}B - ^{14}N の CP 実験を行った。図 2 に 10 kHz の MAS 下で ^{14}N のラジオ波強度は約 50 kHz で ^{11}B のラジオ波強度を変えたときに得られた ^{14}N の信号強度を示す。MAS による ^{11}B - ^{14}N の双極子相互作用の変調により CP 条件がサイドバンド化していることが示されている。つまり、四極子が小さければ CP 条件に MAS 回転を考慮に入れてラジオ波強度を適切に設定することで、効率的な分極移動を起こすことが可能であることを確認できた。

次に四極子の大きな MBN を用いて同様の実験を行った結果を図 3 に示す。MBN では主に ^{11}B のラジオ波による nutation 周波数が四極子の影響を受け、nutation 周波数が照射したラジオ波強度 (周波数単位) の約 2 倍になっていることが示された。これは、 ^{11}B の四極子が大きいためである。このような四極子による CP 条件のずれは四極子の大きさが異なるサイトを持つ MBCN のような系で HETCOR を行う際に問題になると考えられる。またこれ以外に四極子が大きい場合の CP の問題として CP による感度向上が小さいことが判った。これは照射しているラジオ波強度が四極子よりも小さいためにスペクトル全体を励起できないためであると考えた。そこで、これらの問題点を克服するために CP の間で照射磁場を掃引する手法 (図 4) を考案した。この手法は ^1H - ^{31}P の系で評価を行い、有効性を確認できている。現在は ^{11}B - ^{14}N の系への適用を検討している。

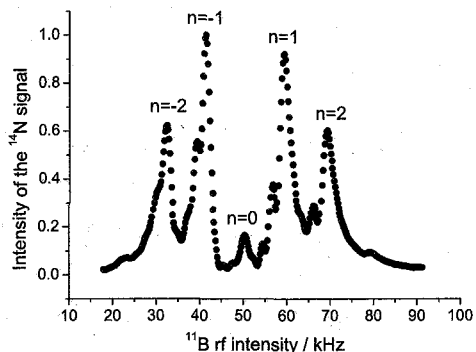


Fig. 2 ^{11}B - ^{14}N CP profile of cBN

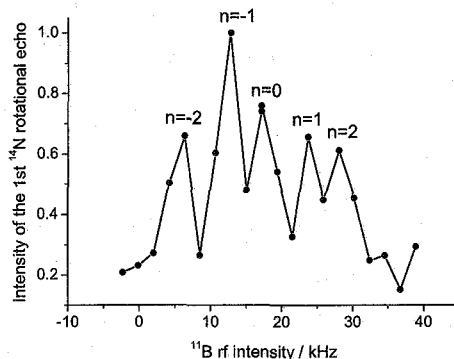


Fig. 3 ^{11}B - ^{14}N CP profile of MBN

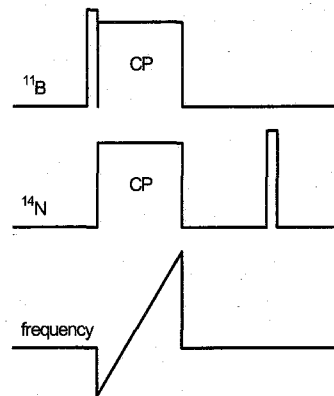


Fig. 4 New frequency-swept CP pulse sequence

1. M. Murakami et al., *Chem. Lett.*, 35, 986-987 (2006).
2. A. Vinu et al., *Chem. Mater.*, 17, 5887-5890 (2005).

MURAKAMI @ NIMS.

東北大院・薬¹、東北大・薬²、東北大 21 世紀 COE プログラム CRESCENDO³

宏人会中央クリニック⁴

○藤原正子^{1,3}、小林武志¹、城守隆宏²、丸山穰³、竹内和久^{1,4}、今井潤^{1,3}

Clinical Application of ¹H-NMR-Metabolomics to Chronic Kidney Disease

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University¹, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Tohoku University², The Tohoku University 21st Century COE
Program "CRESCENDO"³, Koujinkai Chuo Clinic⁴

Masako Fujiwara^{1,3}, Takeshi Kobayashi¹, Takahiro Jomori², Yutaka Maruyama³,
Kazuhisa Takeuchi^{3,4}, Yutaka Imai^{1,3}

¹H NMR spectroscopic and pattern-recognition-based methods were applied to the metabolic profiling studies on the plasma from patients in CKD (Chronic Kidney Disease). Plasma samples from patients of pre- and post- hemodialysis and from in every stage of CKD were collected and measured by 600 MHz NMR spectroscopy. Each spectrum was data-processed and subjected to principal component analysis. Spectral patterns of plasma between pre- and post- dialysis were clearly discriminated together with significant fluctuations in the level of low-molecular-weight metabolites. Spectral quantitation of these metabolites in plasma with high density of proteins was attempted to monitoring dialysis treatment and for classification of CKD stages.

<目的> NMR メタボロミクスの方法として我々は、含まれる代謝物の量比を水素核 NMR スペクトルのパターンとして丸ごと把握するノンターゲット法を用いる。本法は全身に及ぶ代謝変動を把握し連動するマーカー群を抽出するために有用である。また生体サンプルの前処理をほとんど必要としない非破壊法であるため、医療応用としての可能性を持つ。生活習慣病の中でも深刻で複雑な病態を持つ慢性腎臓病 CKD (Chronic Kidney Disease) に適用し新規な病態把握法を確立する。

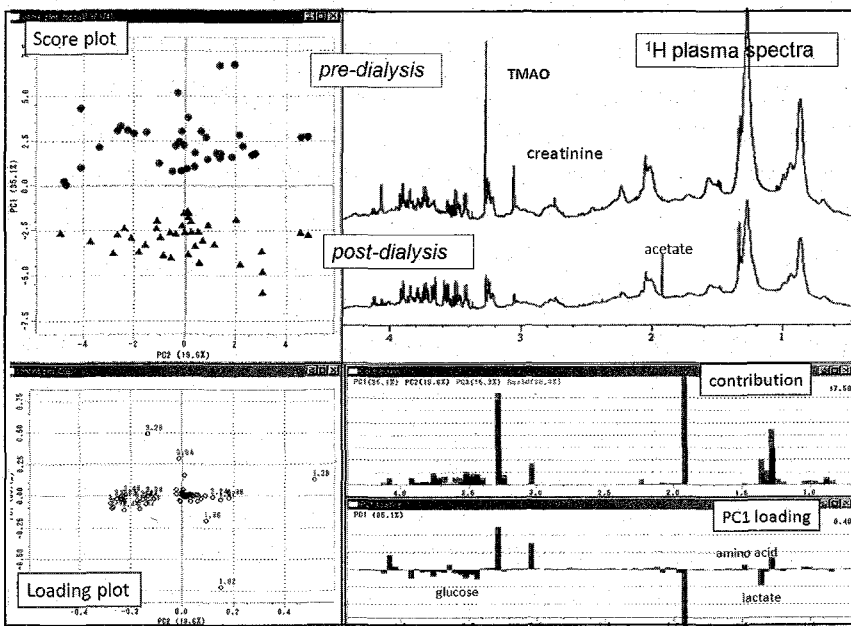
<対象> CKD は一般に腎臓障害の進行度を 5 ステージ (I~V) に評価し、最終ステージ V では血液透析を導入することになる。各ステージおよび透析患者の透析直前と直後の血液を病院から収集した。

キーワード : メタボロミクス、混合物 NMR、代謝物、パターン認識、慢性腎臓病

ふじわらまさこ、こばやしただけし、じょうもりたかひろ、まるやまゆたか、たけうちかずひさ、いまいゆたか

＜方法＞血漿 200 μL に生理食塩水、 D_2O 、 TSP-d_4 （内部標準物質）を加えたものを 1 サンプルとし、これを 600 MHz NMR（JEOL ECA）により ^1H NMR 測定した。水消しは事前照射法を用いた。得られた多検体スペクトルを PCA（主成分分析法）や SIMCA（部分空間法）により解析した。スペクトル処理および解析には ALICE 2 for metabolome（JEOL Ltd.）を用いた。水に由来するピーク付近（5.2 ~ 4.3 ppm）は解析対象から外した。

＜結果・考察＞CKD ステージの進行に伴ってクレアチニンのみならず TMAO（トリメチルアミンオキシド）の蓄積が見られ、特に透析導入前のステージ V のスペクトルは他と顕著な区別を呈した。PCA 解析にて透析前後のスペクトルパターンは明確に区別され、前後に変動する低分子代謝物のプロファイル（クレアチニン、グルコース、アミノ酸、TMAO、ラクテート、および透析液成分など）を得た。これらのプロファイルによって、多様な代謝異常や生活習慣を背景に持つ患者でも透析の効果を表す解析軸を抽出できた。アセテート含有および非含有の 2 種類の透析液を用いた透析においてもプロファイルを検討した。スペクトルパターンの定性解析だけでなく、高分子成分を多く含む血漿スペクトルで、重要な低分子代謝物については定量を行い変化量について考察する。これらの変動プロファイルは透析効果や病状管理などの指標として有用性をもつものとして提案する。



Figure; ^1H NMR spectral and pattern-recognition analysis for plasma from patients of pre and post-dialysis using acetate as the dialysate buffer

菊地淳^{1,2,3}、近山英輔¹、須藤倫崇²、古田拓²、持田恵一¹

¹理研 PSC、²横浜市院国際総合、³名大院生命農

Developments of integrated analytical methods for metabolic balance in living and ecosystem.

Jun Kikuchi^{1,2,3}, Eisuke Chikayama¹, Michitaka Suto², Taku Furuta² and Keiichi Mochida¹

¹RIKEN PSC, Japan; ²Yokohama City Univ., Japan; ³Nagoya Univ., Japan

Living organisms have been survived by response to various environmental changes, resulting its physiological mechanism is retained in genetic information. Furthermore, their homeostasis are maintained by changing metabolic balance. Therefore, we tried to develop integrated analytical methods for metabolic balance in two living systems, genetically diverged world rice core collection and invertebrate model animal, silkworm. Former case enabled predictions of remarkable gene functions by correlation display of genetic and metabolic diversities of rice. In the latter case, we proposed new method for coarse-grained views of metabolic pathways by following ¹³C movement.

<はじめに> アメリカ国防大学より、“石油資源が遺伝資源に代替される時代”の到来が予測されて6年の間に、ゲノム時代を革新した C.ベンター氏は自費でクルーザーを購入し、“海洋メタゲノム解析”と呼ぶ壮大な計画で、環境生物叢からの遺伝子資源収集を始めている。また、DOE もヒトゲノム計画以上の規模で、多年草・樹木の比較ゲノム解析や、土壌微生物叢・腐食連鎖動物の腸内微生物叢のメタゲノム解析を推進している。これらの遺伝子資源には光合成生物によるバイオマス蓄積、あるいは微生物分解に関わる酵素のみならず、刻々と変動する地球環境に対して鋭敏に調和しようとする生物叢の生態学的情報までが満載されているため、情報価値が極めて高い。

まず、生産者である植物は、動けないために環境変動に対して化合物応答する機構が進化している。さらに、栽培化植物の場合、例えばイネでは1万年近くもの歳月をかけて、選抜を繰り返してきた“歴史”が多様な遺伝子資源に秘められている。他方、消費者である動物の場合、大規模な環境変動に弱い肉食動物に対して、4億年の進化史を超えた昆虫には、栄養飢餓に耐えられる代謝調節機構が備わっている。本会では、①世界に散在するイネ遺伝的多型と代謝表現型の相関解析、②代謝物・代謝物相関を応用した昆虫の生理状態評価の2例について、ゲノム等の異種情報とNMR情報を相関解析させ、環境調和システムに迫る試みについて議論したい。

キーワード： データマイニング、遺伝的多型・代謝物相関、代謝物・代謝物相関
きくちじゅん、ちかやまえいすけ、すとうみちたか、ふるたたく、もちだけいいち

<NMR 情報解析システムとしての異種相関法> 次に、本発表で提案する解析手法

について概説する。通常、NMR で多次元相関法と言えば、多次元 NMR の種々のパルス系列を示しているが、ここでは ^1H -NMR や ^{13}C -HSQC のような単純なスペクトルを計測した後の、データマイニング(1)の解析手法を示すこととする。解析具体例の第一の系は、2次元ヒートマップ化されており、 ^1H -NMR 対 RFLP 遺伝的多型の相関解析である(図1-1)。第二の系は動物に対する安定同位体標識(2)の手法で得られた ^{13}C -HSQC スペクトルで同定された代謝物・代謝物間の相関解析法(3,4)である(図1-2)。いずれも、bin 化処理等のメタボローム解析で用いられる、計測情報の最大限活用、スペクトル情報のマトリクス化を利用している点に大きな特徴がある。NMR データがマトリクス化されていると、異種の計測手法、例えば DGGE の微生物叢情報(中西ら、本会発表)等と相関解析をすることも可能となる(図1-3)。

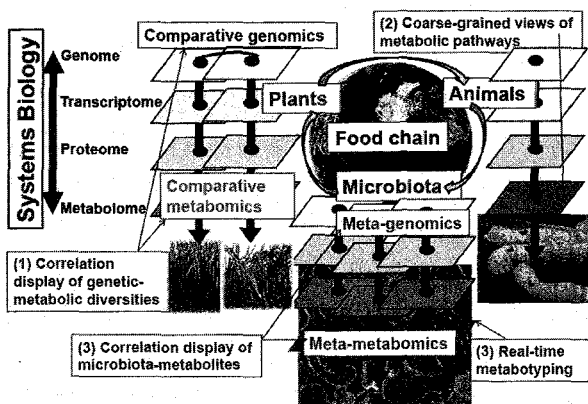


Fig.1 Concept of our integrated analytical methods.

<遺伝的多型・代謝物相関解析> 今世紀に顕在化する食糧問題は、人口急増に対し作物の育種速度が追従できない事が難点である。生物の系統間の代謝物の違いを左右する遺伝子(群)の決定技術は、食糧や環境・エネルギー資源の増産に関わる作物育種に貢献する重要技術とされる。そこで我々は、世界に広く散在する遺伝的背景の多様な穀物コアコレクションが確立されているイネを対象とし、表現型が多様な 18 系統を選出した。遺伝的多型に関しては、各系統の 128 の RFLP マーカーの遺伝的な染色体座乗位置情報から、18 系統間の遺伝的距離行列を算出した。また、代謝表現型に関しては、これらイネ種子の各 ^1H -NMR スペクトルを 250 の bin に区切り、18 系統間のユークリッド距離による距離行列を計算した。これらを基に NMR

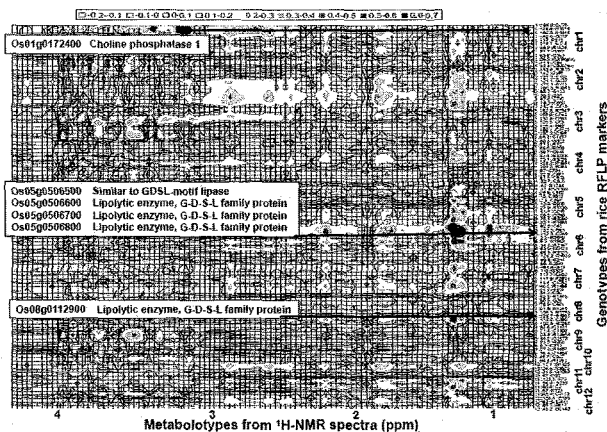


Fig.2 Correlation display of genetic and metabolic diversities of world rice core collection.

化学シフト bin を横軸、イネ染色体に沿った RFLP マーカーを縦軸にした相関係数マトリクスを作成し、代謝表現型と遺伝的多型の相関をヒートマップとして視覚的に表示した(図2)。両者の相関の高い部位に着目すると、例えばコリンのメチル基には1番染色体の176.5cMにコリンフォスファターゼ1が、脂質のメチレン基には5番染色体92.8cMや8番染色体123.7cMに脂質分解酵素群のクラスターが存在することを見出した(5)。

このように世界に散在する生物資源を系統的に比較する事で、環境に調和して選択されてきた遺伝子情報にまで辿り着くことができれば、作物育種が飛躍的に高効率化すると同時に、土地環境に応じた作物生産技術の開発にも繋がると期待できる。一つの鍵技術は高速ゲノム解析である。1995年当時には、世界中のDNAシーケンサーを稼働してもヒトゲノム解析には10年かかると言われていたものの、2010年にはわずか数分で済むと目されている。バイオリファイナーや構成的生物学の先端技術が植物科学に導入されることで、生物生産に技術革新が起こると期待されている(6,7)。

<代謝物・代謝物相関解析> 前述の解析例は¹H-NMRのbin化したデータの距離行列から、遺伝子機能推測にまで絞り込めるという利点があるものの、多様性のある遺伝的多型データが同時に必要であるという点は、ゲノムサイズの巨大な非モデル動植物には、やや難点があるという見方もできる。ヒトでは急速に遺伝子多型解析が進み、いずれは大病院に1台のシーケンサーが導入される時代が到来するかもしれない。しかし、まだ有用とは見なされておらず、ゲノム解析さえ着手されていないヒト以外の非モデル動物でも、重要なものは多い。例えば、環境評価を行う動物として、土壌のミミズ、水圏の貝類といった無脊椎動物の生理状態解析が着目されている。ここでは、無脊椎動物のうちでも我々が手掛けていたカイコの¹³C標識系をパイロット実験として、生理状態変化を記述する新手法の確立を試みた(8)。

実験データとしては4齢初期のカイコから摂食により¹³C標識を始め、5齢変態前まで時系列で体液サンプルを採取し、既法の手法(9,10)により¹³C-HSQC計測で同定した56代謝物のシグナル強度を用いた。図3(a)には、56代謝物の経時的なシグナル強度変化を、代謝物・代謝物相関としてヒートマップで示した。すると、昆虫特有の窒素リサイクルに関わる代謝物のクラスターと、炭素エネルギー代謝に関わる代謝物のクラスターとに大別された。これらは、摂食により入力された¹³Cの動態情報を有しているために、代謝経路上では近接した関係に位置するはずである。しかし、KEGG等の現存する代謝経路図は、あくまで作成者が任意に代謝ネットワークを2次元上に図示しただけのものである。そこで、刻々と変動する生理状態を代謝物のNMRデータで反映できるよう、代謝経路の疎視化(Coarse-grained view)を試みた。

56代謝物の¹³C-HSQC強度/制限情報として、KEGGよりダウンロードした132経路ピクセルに対して、以下のシミュレーテッドアニーリング計算で 3×10^6 Kから 1×10^3 Kまで徐冷し、系のエネルギー E を計算した。

$$E = - \sum_{i=1}^N \frac{8 \times 10^7 I_i}{R_i} + \sum_{i=1}^N \sum_{\substack{j=1 \\ (i \neq j)}}^N \frac{\delta_{ij}^2}{\left(1 - \frac{\delta_{ij}}{A_i}\right)^2 \left(1 - \frac{\delta_{ij}}{A_j}\right)^2} + \sum_{i=1}^N \varepsilon_i$$

ここで、 R_i は中心から i 経路ピクセルまでの距離、 N は経路の数、 δ_{ij} は i, j の重複、 A_i は i 経路ピクセルの面積、 ε_i は界面(図3(b)-(d)の外側の四角枠)外への侵害を示している。すると、4齢初期(図3(b))では56代謝物の属する代謝経路の配置に傾向は見られないものの、脱皮直後(図3(c):絶食後)では炭素エネルギー代謝に関わる代謝経路が、逆に蛹への変態直前(図3(d))では窒素リサイクルに関わる代謝経路が中心にクラスターを形成することを、疎視化することができた。この手法では、従来の要素のみの解析では得られない組織化された情報を、集合化した数値化情報の計算により、浮き彫りにすることができた。

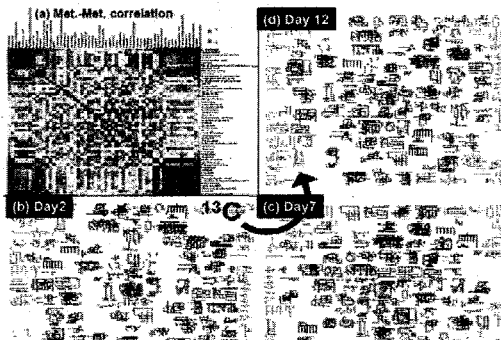


Fig.3 Coarse-grained views of metabolic pathways.

<参考文献>

- 1) 菊地淳, メタボロミクスの解析と応用技術、CMC 出版、86-99 (2007)
- 2) Morita, H. et al., "Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production" *DNA Res.* **15**, 151-161 (2008).
- 3) Tian C.J. et al., "Top-down phenomics of *Arabidopsis thaliana* -One and two-dimensional NMR metabolic profiling and transcriptome analysis of albino mutants" *J. Biol. Chem.* **282**, 18532-18541 (2007).
- 4) Fukuda, S. et al., "Evaluation and characterization of bacterial metabolic dynamics by a novel profiling technique, real-time metabotyping" (submitted).
- 5) Mochida, K. et al., "Correlation display of genetic and metabolic diversities in rice" (in prep.)
- 6) 菊地淳, "統合バイオリファイナリーへの NMR 技術開発" 植物の生長制御 (in press)
- 7) 菊地淳ら, "植物バイオマスへの ^{13}C 代謝・分解過程の追跡" *ブレインテクノニュース*, **124**, 16-21 (2007)
- 8) Chikayama, E. et al., "Systematic NMR analysis of stable isotope labeled metabolite mixtures in plant and animal systems: Coarse grained views of metabolic pathways" (revised).
- 9) Kikuchi, J. & Hirayama, T. "Practical aspects of stable isotope labeling of higher plants for a hetero-nuclear multi-dimensional NMR-based metabolomics" *Method Mol. Biol.* **358**, 273-286 (2007).
- 10) Akiyama, K. et al., "PRIME: a Web site that assembles tools for Metabolomics and Transcriptomics" *In Silico Biology* **8**, 27 (2008).

光励起三重項電子スピンを用いた DNP のための部分的重水素化によるプロトン密度の最適化

阪大院基¹, 京大院理²

CREST, Japan Science and Technology Agency³

○香川 晃徳^{1,3}, 室川 遊¹, 北川 勝浩¹, 武田 和行²

Optimization of ¹H spin density for DNP using photo-excited triplet electron spins

○Akinori Kagawa^{1,3}, Yu Murokawa¹, Masahiro Kitagawa¹, Kazuyuki Takeda²

¹Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Japan

²Graduate School of Science, Kyoto University, Japan

³CREST, Japan Science and Technology Agency

Abstract: In dynamic nuclear polarization (DNP) using photo-excited triplet electron spins, the attainable ¹H polarization is determined by the ratio of the buildup rate and the spin-lattice relaxation rate, in turn depend on the ¹H spin density. It is shown that the final ¹H polarization can be enhanced by diluting the ¹H spins with partial deuteration. The DNP experiments are demonstrated in 0.05 mol% pentacene-doped p-terphenyl for various ¹H abundances. It is also shown that the ¹H spin diffusion coefficient can be determined by examining the initial buildup rate of ¹H polarization for various repetition rates of the DNP sequence.

NMR の感度向上のために電子スピンを用いた動的核偏極 (DNP: Dynamic Nuclear Polarization) が利用されている。DNP では、ホスト分子中に不対電子スピンをもった偏極用分子と観測対象である生体高分子などをドーブした試料を用いる [1]。NMR 信号の大きさは偏極率に比例するため、いかに偏極率を大きくするかが重要である。その1つの手段として本研究ではホスト分子の部分的重水素化を行った。DNP 実験は、p-ターフェニルに光励起三重項電子スピンをもつペンタセンを 0.05 mol% ドーブした単結晶を用いた。その結果、得られる最大の偏極率と偏極のビルドアップレートがホスト分子の重水素化率に大きく依存することが明らかになった。また、偏極率を決定する要因であるスピン-格子緩和時間、スピン拡散定数について考察した。

Henstra らによって Hartmann-Hahn マッチングに基づいた DNP の手法である ICP (Integrated Cross Polarization) 法が提案され、光励起三重項電子スピンを用いた DNP に利用されている [2, 3, 4]。ICP 法では、実験室座標系の核スピンと回転座標系の電子スピンの間で Hartmann-Hahn マッチングを満たすようにマイクロ波の照射強度を最適化し、電子スピンから核スピンへ偏極移動を起こす。また、そのマイクロ波照射と同時に静磁場を掃引し、inhomogeneous に広がった全ての電子スピンパッケージを DNP に参加させることで効率を向上す

Key Words : DNP, photo-excited triplet electron spins, deuteration, spin diffusion

著者ふりがな かがわ あきのり、むろかわ ゆう、きたがわ まさひろ、たけだ かずゆき

ることができる。このICPシーケンスを繰り返し行うことで、ホスト分子全体の偏極がスピンドiffusionによって大きくなっていく。

ペンタセンを用いたICP実験では様々なパラメータが最適化され、ナフタレンをホストとした単結晶の偏極率が 0.7 ± 0.07 まで高偏極化されている[3]。また、同様の実験が99.2%-重水素化されたナフタレンを用いて行われており、その偏極のビルドアップの時定数が全て ^1H のナフタレンに対して20倍程短くなったという実験結果が報告されている[4]。その2つの実験結果からホスト分子の重水素化が偏極率増大メカニズムに大きく関与していると考えられる。

一般的に、偏極率 P の時間変化は下記の式で表される[5]。

$$P(t) = P_{\text{final}} \left[1 - \exp \left\{ - \left(B + \frac{1}{T_1} \right) t \right\} \right] \quad (1)$$

$$P_{\text{final}} = \frac{B}{B + \frac{1}{T_1}} \bar{P}_e \quad (2)$$

ここで、 \bar{P}_e 、 B 、 T_1 は、電子スピンの偏極率、ビルドアップレート、ICP中の ^1H スピンのスピン-格子緩和時間を表す。最終偏極率 P_{final} は、ビルドアップレート B とスピン-格子緩和時間の逆数 $1/T_1$ の比で決定される。重水素化率の異なるサンプルに対してそれぞれの P_{final} と $B + 1/T_1$ を実験から求めた。

ICP実験は、室温、約0.3 Tの磁場中で行った。光励起には、Cynosure製の色素レーザー(LFDL-3)を用いた。レーザー波長、パルス幅、パルスパワーは、それぞれ590 nm、1 μs 、8 mJ/pulseで単結晶中のペンタセンを効率よく励起できる。静磁場掃印は、 ± 5 mTの大きさで15 μs で行った。マイクロ波のパワーは40 Wを使用した。これらの値は、信号強度が最大となるように最適化している。サンプルの重水素化率は、非重水素化p-ターフェニルと98.3%-重水素化p-ターフェニルの混合する割合によって調節した。

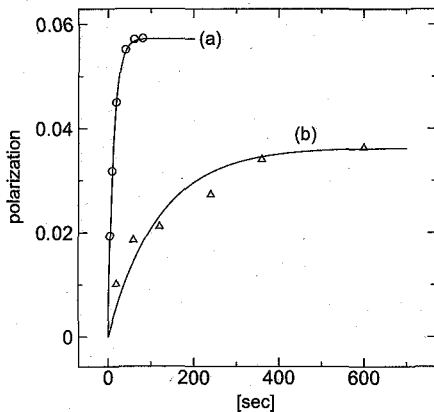


Fig. 1: Buildup curves of the ^1H polarization of (a) 98.3%-deuterated p-terphenyl and (b) undeuterated p-terphenyl doped with 0.05 mol% pentacene.

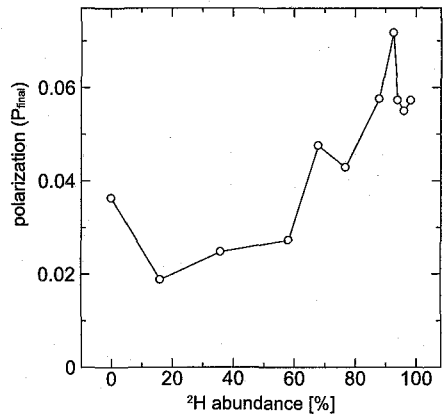


Fig. 2: Finally attained ^1H polarization (P_{final}) as a function of ^2H abundance.

図1に、ICPを繰り返し周波数50Hzで行ったときのビルドアップカーブの例を示す。98.3%-重水素化サンプル(a)の方が、全く重水素化していないサンプル(b)よりビルドアップ

ブが速く、最終的に得られる偏極率も大きくなっていることが分かる。図2、図3に、実験から得られた P_{final} と緩和も含んだ実効的なビルドアップレート $B + 1/T_1$ の重水素化率依存性を示す。その結果、我々の実験系では重水素化率が約92.5%で偏極率が最も高く、非重水素化サンプルに対して約2倍の7.1%であった。 $B + 1/T_1$ は重水素化率を高くするにつれて速くなる傾向を示した。

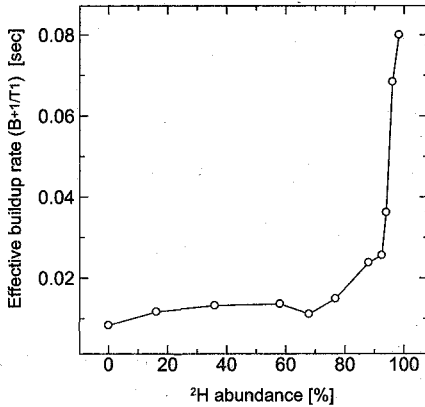


Fig. 3: ^2H concentration dependence of the rate ($B + 1/T_1$) of the buildup obtained by least square fitting.

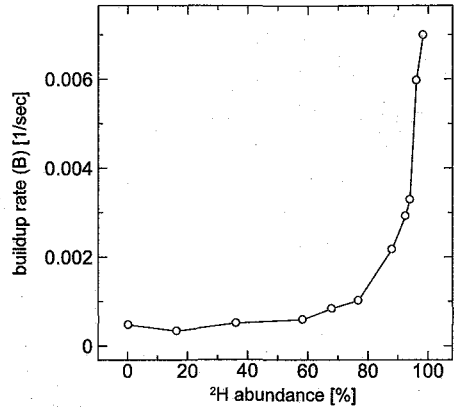


Fig. 4: ^2H concentration dependence of the buildup rate (B) calculated from experimental data in Fig. 2 and Fig. 3 using Eq. (1) and (2). $\bar{P}_e = 0.63$ was used[6].

次に実験結果の考察を行う。 P_{final} と $B + 1/T_1$ の実験結果(図2、図3)を、式(1)、(2)に代入するとビルドアップレート B と ICP 中のスピン-格子緩和時間 T_1 が得られる(図4、図5)。図4より、重水素化率を上げるほどビルドアップが速くなっていることが分かる。この結果、重水素化率が0~98.3%の間では、重水素化率を上げたことによるスピン拡散速度の低下よりも、高偏極化させなければならない ^1H スピンの容量が小さくなる効果の方が偏極のビルドアップに支配的であると考えられる。次に、スピン-格子緩和時間の重水素化率依存性について考察する。図6に、ICPを行っていない場合(光励起による不對電子スピンの存在しない時)の T_1 の測定結果を示す。図5、図6の結果から、光励起によって作り出された不對電子スピンにより T_1 が大幅に短くなっていることが分かる。また、重水素化率が高いサンプルの方がより T_1 の減少が顕著である。これは、 ^1H スピンの量が多い方が、電子スピンの緩和の影響が平均化されるためであると考えられる。 P_{final} は B と $1/T_1$ の比によって決定されるので、ICP中の T_1 の重水素化率依存性が偏極率の最も高くなる最適な濃度が現れる一因となっている。

さらに、初期ビルドアップレートの周波数依存性から98.3%重水素化サンプルのスピンの拡散定数を求めた。初期ビルドアップレートとは、 $t = 0$ s 付近でのビルドアップカーブの傾きで T_1 に依存しない量である。その実験結果とスピン拡散定数を変化させた数値シミュレーション結果からスピンの拡散定数が約 $4.5 \times 10^{-19} \text{ m}^2/\text{s}$ であると推定した。この値は、全て ^1H スピンのサンプルの 10^{-16} オーダーに比べてかなり小さい。この推定値から、重水素化率を変えることでスピンの拡散速度を大きく変化できることを確認した。

偏極率が最も高くなる最適点は、重水素化率だけではなく、偏極用分子のドーピング量、ホスト分子の T_1 、ICPシーケンスの繰り返し周波数など様々なパラメータにより決定される

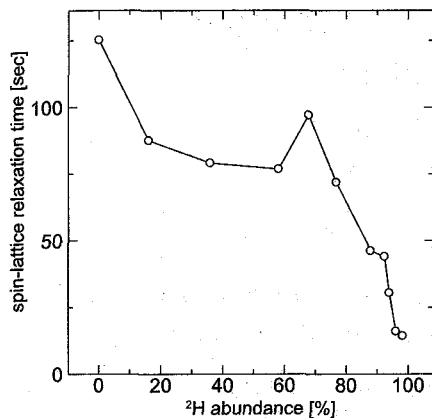


Fig. 5: ^2H concentration dependence of T_1 during the repetition of the ICP sequence at 50 Hz as calculated by substituting experimental data of Fig.1 and Fig. 2 into equation (1) and (2).

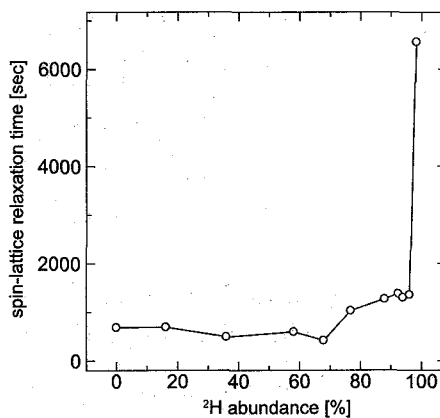


Fig. 6: ^2H concentration dependence of T_1 without ICP sequences.

ため、この実験から得られた約 92.5 % という重水素化率は一般的に適用できるものではない。しかし、この実験結果から単純に ^1H スピンの量を減らして熱浴の容量 (^1H スピンの数) を下げるだけではなく、スピン拡散速度、ICP 中のスピン-格子緩和時間を考慮して重水素化率を決定することにより効率よく偏極を高めることができると考えられる。

本研究は日本科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業の援助を受けて行われた。

References

- [1] T. Maly et al., J. Chem. Phys. **128**, 052211 (2008).
- [2] A. Henstra et al., Chem. Phys. Lett. **165**, 6 (1990).
- [3] K. Takeda et al., J. Phys. Soc. Japan **73**, 2313 (2004).
- [4] K. Takeda et al., J. Phys. Soc. Japan **73**, 2319 (2004).
- [5] M. Iinuma et al., Phys. Rev. Lett. **84**, 171 (2000).
- [6] M. Iinuma et al., J. Phys. Soc. Japan, **74** 2622 (2005).

AR 過程に基づくピーク推定による FID の変換： 周波数と減衰率の同時推定

¹ 千葉工業大学工学部電気電子情報工学科

² 千葉工業大学工学部生命環境科学科

○村田 恵介¹, 河合 剛太², 久保田 一¹

FID transformation by peak estimation based on AR process : simultaneous estimation of fequency and decay factor

¹ Dept. Elecl., Elecs. and Comp. Eng., Fac. Eng., Chiba Inst. Tech.

² Dept. Life Env. Sci., Fac. Eng., Chiba Inst. Tech.

○ Keisuke Murata¹, Gota Kawai², Hajime Kubota¹

Abstract It is possible to transform a one-dimensional FID into a two-dimensional spectrum which consists of frequency domain and decay factor, if the Laplace transform is applied. In this case, a NMR signal is shown as a peak on two dimensions. A method based on the AR process, which is commonly used for this approach, has a problem that large error occurred if applied for a spectrum with many peaks. In the present study, we applied the Multi-Staged Pole Estimation with High-Precise Peak Estimation method to the analysis of one-dimensional FID. It was shown that frequency and decay factor were estimated precisely.

1 序論

通常、FID の解析は、フーリエ変換を用いて周波数領域のスペクトルに変換することによって行っているが、ラプラス変換を用いれば、周波数領域と減衰率の領域からなる二次元のスペクトルに変換することができる。しかし、数値ラプラス変換は一般的に困難であることが知られている [1]。このラプラス変換におけるピークを求める方法としては、Padé-Laplace 法や線形予測を用いる方法をはじめとするさまざまな方法 [2] があるが、いずれの方法も最終的にピークを求めるときに因数分解による求根操作が必要となり、ピークの数が多き場合は、ここで大きな誤差が生じることが問題であった。

今回は、推定系の多段化と帯域分割による AR (自己回帰) 過程に基づく高精度なピーク推定法と NMR への応用について報告する。これらの方法は、ピーク数の増大による誤差の現象に効果がある。

AR 過程とは、線形予測などが適用可能であるための信号の性質である。NMR における FID のモデルとして用いられており、デジタルフィルタではフィードバック要素を含んだ無限インパルス応答長フィルタによって表現される。

また、ランダム初期値、焼きなまし法を用いた局所最適解の問題へのアプローチについても合わせて報告する。また、NMR データに適用した際の結果によってその有用性を示す。

keywords : データ処理, ピーク推定, 減衰率, 自己回帰過程

著者ふりがな : むらた けいすけ, かわい ごうた, くぼた はじめ

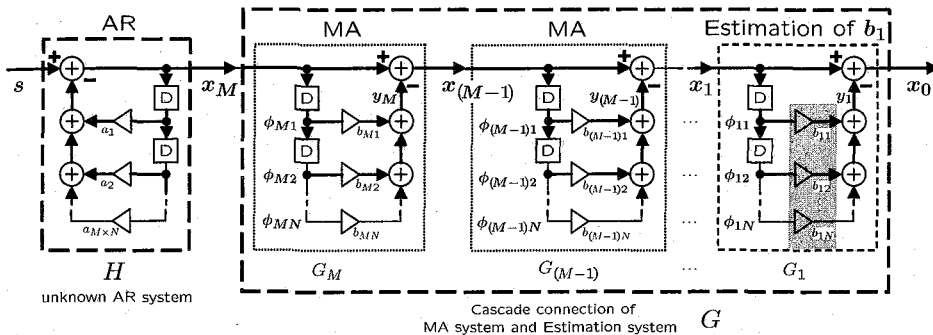


Fig. 1: Block diagram of MSPEAR : Derive NMR peaks as peaks of unknown AR system with digital filter by mean square estimation. Decrease estimation error by multi-staged cascade connected estimation system($G : G_M, \dots, G_1$).

2 提案する推定手法

提案手法は大きく分けて2種類ある。ひとつは求根精度を高めるためのもの(2.1, 2.4参照)で、もうひとつは大域的最適解を求めるためのもの(2.2, 2.3参照)である。

信号処理アルゴリズムの多くは実信号に対するものであることが多い。しかし、NMRによって quadrature 検出された FID 信号は複素信号であるので、処理するには複素 FID 信号を実 FID 信号に変換する前処理が必要となる。FID 信号の中で必要な情報は初期位相補正済みのスペクトルに含まれるから、用いる実 FID 信号はこの情報を含んでいけばよい。そこで、位相補正済みのスペクトルを逆フーリエ変換して得られる実信号(疑似 FID 信号, pFID)を以下の解析に用いた。

2.1 AR 過程に基づく多段極推定法 [3]

AR 過程に基づく多段極推定法: Multi-Staged Pole Estimation based on AR process (以下, MSPEAR) は、推定系をより低次数の MA (移動平均) フィルタの縦続構成とすることによって、高次多項式の求根精度を向上させることができる手法である。単純に高い次数 $M \times N$ 次の線形予測の結果からピーク推定を行う場合、誤差が大きすぎるため、小さな次数 N の推定系を M 段縦続接続してしてピーク推定することによって、誤差を小さくすることが出来る。

MSPEAR のアルゴリズムを Table.1 に示す。ただし、 $L+1$ は FID 信号の長さ、 x_M は入力信号ベクトル、 Ψ_k 、 Φ_k は入力信号行列、 b_k は推定したフィルタ係数ベクトル、 $\tilde{b}_k = [1, -b_k^T]^T$ である。 λ_k^\pm は $\text{Im}[\lambda_k^+ + \lambda_k^-] = 0$ および $\text{Im}[\lambda_k^+ \lambda_k^-] = 0$ を満たす未知 AR システムの極である。また Factorize(c) は、 $c = [c_1 \dots c_N]$ としたとき $1 + c_1 q + c_2 q^2 + \dots + c_N q^N = 0$ の根 $\lambda = [\lambda_1 \dots \lambda_N]$ を求める操作である。なお、以下では得られた多項式から根(ピーク)を求める方法として、Jenkins-Traub 法 [7] を用いることにする。MSPEAR のアルゴリズムをブロック図として表したものを Fig.1 に示す。

Table. 1: Algorithm of MSPEAR

```

INPUT:  $x_M$ ;
OUTPUT:  $\lambda_1, \dots, \lambda_M$ ;
 $b_2, \dots, b_M \leftarrow 0$ ;  $e \leftarrow 0$ ;
Do:
  For  $k = M, \dots, 2$  do:
     $x_{k-1} \leftarrow \Psi_k b_k$ ;
  End
   $b_1 \leftarrow (\Phi_1^T \Phi_1)^{-1} \Phi_1^T x_0$ ;
  For  $k = 2, \dots, (M-1)$  do:
     $b_k \leftarrow b_{(k+1)}$ ;
  End
   $b_M \leftarrow b_1$ ;
  If  $\|x_0\| \approx e$  then break;
   $e \leftarrow \|x_0\|$ ;
End
For  $k = 1, \dots, M$  do:
   $\lambda_k \leftarrow \text{Factorize}(b_k)$ ;
End

```

2.2 ランダム初期値による方法 [4]

MSPEARは初期値によって異なる局所最適解を導く。そこで、初期値をランダムに設定し結果を何回か求め、その結果 pFID と推定したピークから再構成した FID との二乗誤差が最も小さいものを解とするのがランダム初期値を用いる方法 (MSPEAR-RI) である。これによって、大域的最適解を求めることができる。

2.3 焼きなまし法による方法 [5]

MSPEARによって求められた解を、焼きなまし法を用いて再び MSPEAR の初期値として採用する方法 (MSPEAR-SA) である。これによって、大域的最適解を求めることができる。

この手法は、2.2 と同様に局所最適解の問題に対して有効であるが、各種パラメータ調整が経験に依存すること、良質な解を得ようとする計算コストが指数関数的に高まることなどの問題がある。

2.4 帯域分割極推定法 [6]

帯域分割極推定法: Frequency-Division Pole Estimation based on AR process (以下, FDPEAR) は、入力信号を適当な D 個の帯域に分割して、それぞれの帯域においてピークを求めることにより、高次多項式の求根精度を向上させることができる手法である。この手法は帯域ごとに線形予測を用いるため、初期値に依存しない。

MSPEAR では、周波数的に偏っているピークを求めることが難しいことが問題となっているが、FDPEAR は FID によく見られるこのような信号のピークを求める際に特に有効である。なお、FDPEAR は MSPEAR と組み合わせることも可能である。

3 方法

7残基の DNA (GpCpGpTpApGpC) を ^{31}P -NMR で測定した際に得られた FID 信号に対して 2.2 で示した MSPEAR-RI を用いて解析を行った。分光計は Bruker 社製 AMX-500 型、測定周波数は 202.46 MHz (^{31}P -NMR)、測定温度は 298K、試料濃度 0.54mM、積算回数は 200 回であった。

また、観測信号のサンプル数は 4096、MSPEAR-RI の繰り返し回数を 1000 回とし、1000 通りのランダム初期値を用い、各段の次数 $N = 16$ 、段数 $M = 8$ とした。比較対象として各シグナルの半値幅の逆数から緩和時間を求める標準的な方法 (Lorentzian 近似) を用いた。

4 結果と考察

Fig.2 の上側に得られた周波数-減衰率プロットを、下側に FFT によって得られたスペクトルを示す。図にはスペクトルにおける代表的な 7 つのピークに対応するピークのみが

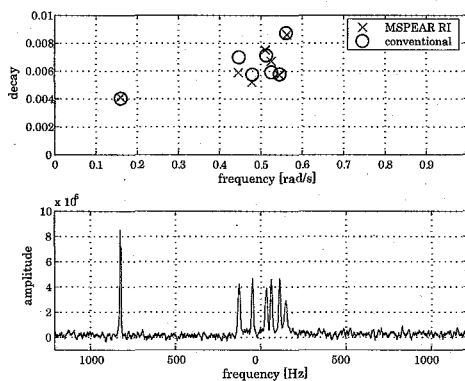


Fig. 2: Result of analysis of the ^{31}P NMR data : [top] \times :estimated peaks, \circ :peaks from Lorentzian approx.; [bottom] FFT spectrum.

示されており、その他のピークは減衰率が大きいため図には示されていない。二乗誤差は MSPEAR-RI が 3.54×10^{-3} 、比較手法が 4.12×10^{-3} となった。MATLAB によって記述し Pentium4 2.4GHz を使用した場合、計算時間は約 48 分であった。

スペクトルとの比較より、求められたピークは妥当であるといえる。また、MSPEAR-RI と従来法によるピークはおおむね一致した。これらのピークの振幅を求めるには、FID とそれぞれのピークとの相関を用いればよい [2]。

最小二乗法によるピーク推定は、出力の二乗誤差を最小にするようにパラメータを推定する方法であり、一般的に二乗誤差が最小となるパラメータが必ずしも好ましいものである保障はない。一度に推定しようとするピークの個数が増えるに従ってこの傾向は顕著になる。このような理由で、推定されたピークが真のピークに近いかどうかを知ることは出来ず、ピークの良否を判断する規範がないことが問題点である。また、本来はピークの個数をあらかじめ知っておく必要がある。ピークの個数を求めるには赤池情報量基準 [8] などを用いる方法が知られているが、実際には困難であるため、ピークの個数は多めにしてピークを推定しておき、その後スペクトルと見比べて具体的にピークを確定する方法が現実的であると考えられる。

今後は、2.4 に示した帯域分割極推定法の NMR に対する結果について検討する予定である。また、DOSY における拡散係数を推定するためにこれらの手法を用い、その結果についても検討する予定である。

参考文献

- [1] 市川哲, “離散フーリエ変換と数値ラプラス変換についての再考”, 信学論 A Vol. J85-A No.5 pp.615-621 2002.
- [2] D. N. Rutledge, Signal treatment and signal analysis in NMR, Elsevier Science Ltd., 1996.
- [3] 村田恵介, 久保田一, “AR 過程に基づく高精度な極推定法と NMR 構造解析への応用”, 信学論 A Vol. J91-A No.8 pp.772-781 2008.
- [4] “Global optimization for pole estimation in NMR”, Proc. of 22nd IEICE SIP Symposium, Nov, 2007.
- [5] K. Murata, H. Kubota, “The automatic pole estimation in the NMR data analysis”, Proc. of 2nd SCME, May, 2008.
- [6] 村田恵介, 久保田一, “帯域分割構成による AR 過程に基づく NMR 極推定の高分解能化”, 電子情報通信学会 2008 総合大会講演論文集, A-4-5, Mar, 2008.
- [7] Saul A. Teukolsky, et al., Numerical Recipes in C++: The Art of Scientific Computing, Cambridge Univ Pr (Sd), 2002.
- [8] 赤池弘次, 赤池情報量基準 AIC, 共立出版, 2007.

生きたヒト細胞内におけるタンパク質の多核多次元 NMR
 (京大院工¹, 京大化研², 神戸大医³, 首都大東京⁴)
 ○朽尾豪人¹, 猪俣晃介¹, 大野(真板)綾子¹, 磯貝信¹,
 天野剛志³, 伊藤隆⁴, 廣明秀一³, 二木史郎², 白川昌宏¹

Multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in living human cells

○Hidehito Tochio¹, Kosuke Inomata¹, Ayako Ohno¹, Shin Isogai¹, Takeshi Tenno³,
 Yutaka Ito⁴, Hidekazu Hiroaki³, Shiro Futaki², Masahiro Shirakawa¹

¹Graduate School of Engineering, ²Institute for Chemical Research, Kyoto University, ³Graduate School of Medicine, University of Kobe, ⁴Graduate School of Sciences and Engineering, Tokyo Metropolitan University

Structure of proteins in live cells is changing dynamically via interactions with other proteins and/or biological molecules. Such structural changes are often closely related to cellular events. Therefore, direct structural analysis of proteins in living cells provides clues to understanding protein functions. Here, we report a new methodology for acquiring multi-dimensional NMR spectra of proteins inside human-derived cultured cells, which enables a direct assessment of protein structure inside the cells.

【序論】

細胞内におけるタンパク質は化学修飾、立体構造変化、タンパク質間相互作用、リガンド結合等をとおして、その「形」を変えつつ機能を発揮している。生体低侵襲的に原子分解能の情報を与える NMR を用いれば、生細胞内でダイナミックに変化するタンパク質の構造情報を得ることが可能である。我々は以前、アフリカツメガエル卵母細胞内におけるタンパク質の状態変化を二次元 ¹H-¹⁵N 相関スペクトルにより検出できることを報告した(参考文献 1)。しかしながら、医学・薬学を含む、より広範な生命科学分野への適用を考えると、マウスやヒトなど高等哺乳動物由来の細胞系での“In-Cell NMR”の実現が不可欠である。本研究では、ヒト由来培養細胞中で特定のタンパク質の多核多次元 NMR スペクトルを測定する方法の開発を行なった。

キーワード

培養細胞、In-Cell NMR、細胞膜透過性ペプチド

著者ふりがな

とちお ひでひと、いのまた こうすけ、おおの あやこ、いそがい しん、てんの たけし、いとう ゆたか、ひろあき ひでかず、ふたき しろう、しらかわ まさひろ

培養細胞中で特定のタンパク質を ^{15}N 等の安定同位体で標識するためには、同位体を栄養源に含む培地中で培養し、目的タンパク質を発現させる方法が考えられる。しかしながら、ヒト由来培養細胞の場合、培地のコストと現状の NMR 装置の感度を勘案すると、この方法は現実的でない。そこで、あらかじめ同位体標識タンパク質を調製し、これを培養中の細胞内に導入するという方法を採用した。タンパク質導入のための手法としては、遺伝子導入の技術を応用するなど、幾つかの方法が考えられるが、本研究では比較的低コストで実現できる、細胞膜透過性ペプチドを用いることにした。

【実験】

細胞膜透過性ペプチドを共有結合させた ^{15}N 標識タンパク質を調製し、これをヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞内に導入した。導入後の細胞をバッファに懸濁させ、生きた状態を保ったまま NMR 管に詰めて、 37°C にて 2D ^1H - ^{15}N 相関スペクトルの測定を行なった。測定後、細胞を取り出し、上澄み液及び細胞破砕液の 1D ^1H -(^{15}N) SOFAST-HMQC を測定し、細胞内から外液への漏れが無いことを確認した。また、測定毎に細胞の生存能をトリパンブルー染色で確認した。細胞内局在については、蛍光試薬 Alexa488 でタンパク質を標識後細胞内導入し、共焦点レーザー顕微鏡で確認した。NMR 測定は Bruker 社製の DRX700 (CryoProbe 付き) を用い、データ処理はソフトウェア NMRPipe (F. Delaglio)、AZARA (W. Boucher) を使用し、解析は Sparky (UCSF) で行なった。

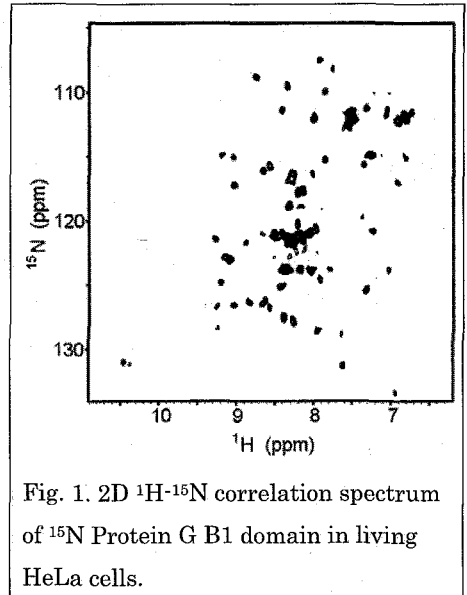


Fig. 1. 2D ^1H - ^{15}N correlation spectrum of ^{15}N Protein G B1 domain in living HeLa cells.

【結果と考察】

Fig. 1に示すように、生きた HeLa 細胞内の ^{15}N 標識タンパク質について、良好な ^1H - ^{15}N 相関スペクトルを得ることに成功した。良好なスペクトルを得るために必要な時間は、タンパク質の種類にもよるが、2~6 時間であった。トリパンブルー染色による判定では、6 時間の測定後でも 95%以上の細胞が生存能を保っていた。以上の結果より、本手法によって、生きたヒト由来培養細胞内でタンパク質の構造解析が可能であることが示された。討論会では、複数種のタンパク質について行なった実験結果をもとに、細胞内タンパク質の相互作用等について議論する。

参考文献 1. Sakai T. et al. *J Biomol NMR.*, 36, 179-88 (2006).

ペプチドモチーフを認識するタンパク質機能ドメイン群の複合体構造解析

(¹理研・SSBC, ²横浜市大・院・国際総合, ³理研・OSC, ⁴東大・院・新領域, ⁵東大・医科研, ⁶東大・院・理, ⁷東工大・院・総理工)
 小柴生造^{1,2}, 葛西卓磨¹, 李華¹, 元田容子¹, 栃尾尚哉¹, 田仲昭子¹, 林崎良英³, 菅野純夫⁴, 山本雅⁵, 横山茂之^{1,6}, ○木川隆則^{1,7}

Complex structures of peptide recognition domains

¹RIKEN SSBC, ²International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City Univ., ³RIKEN OSC, ⁴Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, ⁵Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ⁶Graduate School of Science, The University of Tokyo, and ⁷Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology

Seizo Koshiba^{1,2}, Takuma Kasai¹, Hua Li¹, Yoko Motoda¹, Naoya Tochio¹, Akiko Tanaka¹, Yoshihide Hayashizaki³, Sumio Sugano⁴, Tadashi Yamamoto⁵, Shigeyuki Yokoyama^{1,6}, and Takanori Kigawa^{1,7}

はじめに

細胞内情報伝達系においては、様々なタンパク質が互いに相互作用することにより情報が伝達され、これらの相互作用は、各タンパク質に含まれる多様な機能ドメインによって制御されている。我々は、これら機能ドメイン群の相互作用を高次構造レベルで解明することを目指して研究を進めている。本発表では、比較的短いアミノ酸配列（ペプチド）を特異的に認識する機能ドメインである、SH2 ドメインと PID/PTB ドメイン（以下、PID ドメイン）の複合体の立体構造解析について報告するとともに、これら機能ドメインの複合体立体構造解析を進めるために我々が開発した標識試料調製法や、得られた立体構造を基にした阻害剤探索に関しても報告する。

キーワード：タンパク質機能ドメイン，ペプチド認識，リン酸化，細胞情報伝達，複合体構造解析

こしば せいぞう, かさい たくま, り ふあ, もとだ ようこ, とちお なおや,
 たなか あきこ, はやしぎき よしひで, すがの すみお, やまもと ただし, よ
 こやま しげゆき, きがわ たかのり

本研究で研究対象とした SH2 ドメイン、PID ドメインともに、リン酸化チロシンを含む特定の配列を認識することが報告されているが、PID ドメインに関しては近年、非リン酸化配列に結合する種類があることが報告されている。我々はこれら非リン酸化配列を結合する PID ドメインの基質認識機構を明らかにするため、アミロイド前駆体 (APP) 由来ペプチドを認識する Fe65L1 の C 末側の PID ドメイン、及び未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) 由来ペプチドを認識する SNT-2 の PID ドメインについて、それぞれ複合体の立体構造を決定し、おのおのの基質認識機構を明らかにした。

また、SH2 ドメインに関しては、無細胞タンパク質合成系を用いた網羅的発現系の構築と構造解析を進めている。なかでも NK 細胞の抑制性受容体に結合するチロシンフォスファターゼ SHP-1 など数例に関しては、複合体の立体構造も決定した。

(1) APP 由来ペプチドを認識する Fe65L1 の C 末側 PID ドメインの複合体立体構造

アダプタータンパク質 Fe65L1 は、APP の細胞内領域とリン酸化非依存的に相互作用し、APP の働きを制御していると考えられている。今回我々は、Fe65L1 の C 末側の PID ドメインと APP の細胞内領域由来の 32 残基のペプチドとの複合体の立体構造を決定した。その結果、Fe65L1 の PID ドメインは典型的な PID/PTB フォールドを形成していたが、ペプチド基質の認識機構は、他の PID ドメインでは見られない新規のものであった (Fig. 1)。複合体の状態では、ペプチドの C 端側は、典型的な PID ドメインの結合様式をとっていたのに対し、N 端側が新たにヘリックスを形成して PID ドメインの C 末端のヘリックスと相互作用している。ITC 等の実験結果も、この領域が相互作用に必要不可欠であることを支持しており、今回我々が決めた立体構造が APP の機能の理解に重要な役割を果たすと考えられる。なお、今回我々は、複合体のスペクトルの帰属を容易にするために、Fe65L1 の PID ドメインと APP の細胞内領域由来の 32 残基のペプチドとをリンカーを介して接続したキメラタンパクも作成し、安定同位体標識を行った。その結果、非標識のペプチドを用いた複合体を解析する場合と比較して、シグナル帰属を容易に確実に行うことが可能となった。

(2) ALK 由来ペプチドを認識する SNT-2 の PID ドメインの複合体立体構造

ALK 発癌性融合タンパク質変異体 (NPM-ALK) は、未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL) に関わるタンパク質である。SNT は NPM-ALK に結合するアダプタータンパク質で、NPM-ALK の 3 カ所の領域に結合するが、内 1 ヶ所はリン酸化非依存的に結合する。この NPM-ALK 中の SNT 結合部位 3 ヶ所全てに変異を導入して SNT 結合能を失わせると、トランスフォーム活性が著しく減少することがわかっている。

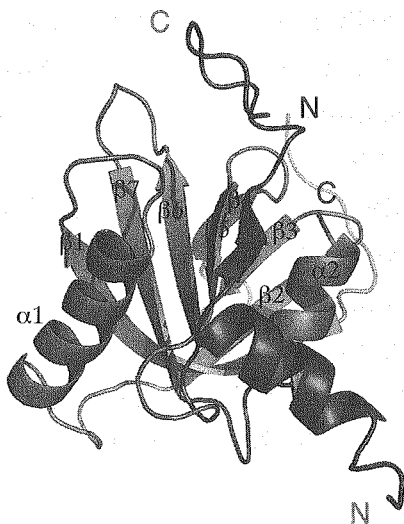


Fig. 1. Ribbon representation of the 2nd PID domain of Fe65L1 and APP-32mer complex.

今回我々は SNT-2 の PID ドメインと、NPM-ALK 由来の非リン酸化ペプチド（19 残基）との複合体の立体構造を決定した（Fig. 2）。その結果、NPM-ALK 由来ペプチドは、典型的な PID ドメインの結合様式とは異なり、SNT-2 の β シート面に存在する疎水性領域に伸びた状態で結合していることが明らかになった。この結合様式は、他の 2ヶ所のリン酸化依存的結合部位が SNT-2 と相互作用する際に使用する領域に比べて非常に広く、SNT-2 が NPM-ALK のリン酸化非依存的結合部位とリン酸化依存的結合部位を、異なる様式で認識していることが明らかになった。

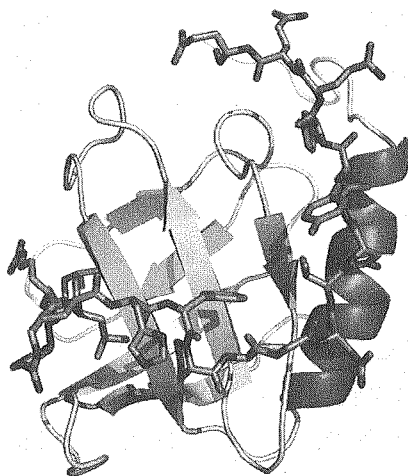


Fig. 2. Schematic representation of a representative structure of the SNT-2 PID domain (ribbon model) in complex with NPM-ALK-19mer (stick model).

(3) SH2 ドメインの網羅的解析

SH2 ドメインは 100 アミノ酸残基程度のドメインであり、リン酸化されたチロシン残基を含むアミノ酸配列を特異的に認識する。SH2 ドメインとチロシンリン酸化ペプチドとの複合体の立体構造解析により、SH2 ドメインによるリガンド認識機構が明らかになり、配列選択性の予測や結合する薬剤候補の設計に役立つことが期待される。我々はこれまでに、SH2 ドメインに対する阻害剤・薬剤開発のための基盤となる発現系や技術の開発をおこなってきた。すなわち、1) 立体構造解析や結合選択性評価のための無細胞タンパク質合成系を用いたヒト（あるいはマウス）SH2 ドメインの網羅的な発現系の構築、2) 複合体立体構造解析を効率的に進めるための安定同位体標識修飾ペプチド調製法の開発、3) 自動 NOE 帰属を利用した複合体立体構造解析法、などである。

本発表では、これら開発された発現系や技術を紹介し、SH2 ドメインの網羅的な発現結果 (Fig. 3a) を示すと共に、SH2 domain-containing phosphatase 1 (SHP1) タンパク質の SH2 ドメインとチロシンリン酸化ペプチドの複合体立体構造を NMR 法で解析し (Fig. 3b)、その立体構造に基づく *in silico* スクリーニングと NMR による結合解析により、SH2 ドメインに結合する化合物を探索した例についても発表する。

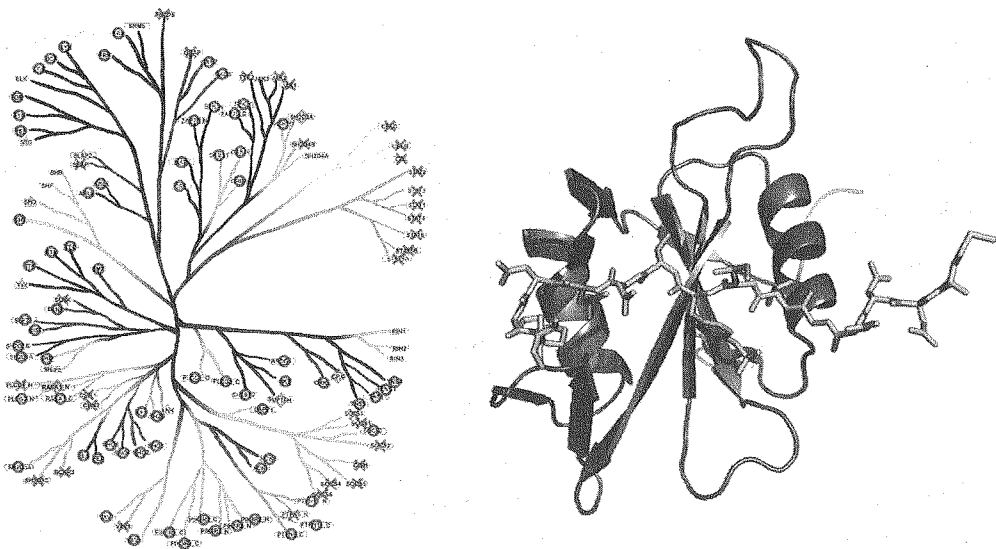


Fig. 3. (a) Comprehensive analysis of solubility and foldness of SH2 domains. (b) Schematic representation of the SHP-1 C-SH2 domain (ribbon model) in complex with the NKG2A-pY8 phosphopeptide (stick model).

RDC、PRE 及び PCS に基づいた Musashi-RNA 複合体と プリオンタンパク質に対する RNA アプタマーの構造とダイ ナミクス

¹横浜市立大学, ²理研, ³慶應大学, ⁴産総研, ⁵JST・PRESTO
大山貴子^{1,2}, 松上明正¹, 古川亜矢子¹, 真嶋司¹,
杉山孝司¹, 今井貴雄³, 岡野栄之³, 西川富美子⁴,
西川諭⁴, 山崎俊夫², 永田崇¹, ○片平正人^{1,4}

Structure and dynamics of Musashi-RNA complex and RNA aptamer for prion protein with RDC, PRE and PCS

Ohyama, T.^{1,2}, Matsugami, A.¹, Furukawa, A.¹, Mashima, T.¹, Sugiyama, T.¹, Imai, T.³, Okano, H.³, Nishikawa, F.⁴, Nishikawa, S.⁴, Yamazaki, T.², Nagata, T.¹ and Katahira, M.^{1,4}

¹Yokohama City Univ., ²RIKEN, ³Keio Univ., ⁴AIST and ⁵JST・PRESTO

Structure of a Musashi protein, composed of two RNA-binding domains, in complex with the target RNA was successfully determined with the combination of short- and long-range structural information derived from NOE, RDC and PRE. The change in the arrangement of two RNA-binding domains upon complex formation with RNA was also sensitively detected with PRE. RNA aptamers for a prion protein obtained with *in vitro* selection turned out to frequently contain an r(GGAGGAGGAGGA) (RNA 12-mer) sequence. The structure of RNA 12-mer was determined. One RNA 12-mer molecule formed a quadruplex with G:G:G:G tetrad and G:A:G:G:A:G hexad planes, and a dimer is formed through hexad-hexad stacking. Comparison of the obtained structure with the previously determined structure of d(GGAGGAGGAGGA) revealed several interesting differences between RNA and DNA.

[NMR 試料管内における APOBEC3G タンパク質によるデアミネーションの実時間モニタリング]

ヒトの APOBEC3G タンパク質は、逆転写で生成されたウィルスのマイナス鎖 DNA のシトシンをデアミネーションしてウラシルに変換する事で、ウィルス遺伝子を不活化する。こうして APOBEC3G タンパク質は、HIV 等のレトロウィルスによる感染に対する防御機構として機能している。今回、APOBEC3G のデアミネースドメインの構造決定、基質 DNA との相互作用様式の解析、及び酵素反応の実時間モニタリングに関して報告する(千葉工大・高久教授等との共同研究)。

今回研究対象とした天然型 APOBEC3G の構造は、溶解度を上げる為に 5 箇所に変異が導入された変異型 APOBEC3G の構造(Chen *et al.*, Nature (2008))と基本的に同一であった。但し天然型には、N 末側に α ヘリックス様のエレメントが余分に 1 つ存在していた。基質 DNA との相互作用様式を、ケミカルシフトパートベーション法によって解析した。天然型と変異型とで同様なパートベーションが見られる部位に加え、天然型でのみパートベーションが見られる部位が存在する事が分かった。さらに、シトシンからウラシルへのデアミネーションを、NMR 試料管内において実時間でモニタリングできる事を見出した。このモニタリングの結果、基質 DNA 中の連続したシトシン残基に関して、まず 3'側のシトシンがデアミネーションされてウラシルに変換され、続いて 5'側のシトシンがデアミネーションされる事が分かった。

常磁性緩和促進, 擬コンタクトシフト, 残余双極子結合, RNA アプタマー,
RNA 結合タンパク質

おおやまたかこ, まつがみあきまさ, ふるかわあやこ, ましまつかさ,
すぎやまたかし, いまいたかお, おかのひでゆき, にしかわふみこ,
にしかわさとし, やまざきとしお, ながたたかし, かたひらまさと

[Musashi タンパク質-RNA 複合体の構造決定]

Musashi タンパク質は、2つの RNA 結合ドメインが協同して標的遺伝子の mRNA に結合することでその遺伝子の翻訳を抑制し、神経幹細胞の分化・未分化を制御している。Musashi-RNA 複合体におけるタンパク質部分の構造決定を行なった。NOE に基づいた短距離情報を用いた場合、2つの RNA 結合ドメイン各々の構造を決定する事はできたが、ドメイン間をまたがる距離情報の欠如の為、2つのドメインの相対配置を決定する事はできなかつた。これに RDC(残余双極子結合)に基づいた配向情報を加味する事で、2つのドメインの相対配向は決定できたが、並進の自由度が依然残ってしまった。さらに PRE(常磁性緩和促進)に基づいた長距離情報を加える事で、2つのドメインの相対配置まで決定する事ができた。

常磁性中心はシステイン残基に MTSL を結合させる事で導入したが、その際システイン残基を1つだけ有する変異体を調製する必要がある。どのような変異体を調製した際に良好な結果が得られたのかについて、報告する。常磁性緩和速度 Γ_2 の取得に際しては、1タイムポイント法と、2タイムポイント法の2つを試したので、両方の長所・短所について報告する。また Γ_2 の値を距離に変換してから構造計算した場合と、 Γ_2 の値を直接用いて構造計算した場合の両方を試したので、それについても報告する。さらに、RNA の結合に伴う2つの RNA 結合ドメインの相対配置の変化を、PRE によって敏感に検出する事ができたので、それについても報告する。

[プリオンタンパク質に対する RNA アプタマーの構造決定]

プリオンタンパク質は哺乳類全般で広く確認されており、狂牛病の原因となるタンパク質である。現在狂牛病に対する有効な治療方法は確立されていない。試験管内分子進化法によって、プリオンタンパク質に高い親和性を示す RNA 分子(RNA アプタマー)が得られた(西川他)。得られた RNA アプタマーの多くには、r(GGAGGAGGAGGA) (以下 RNA 12-mer)配列が含まれていた。そしてこの配列に変異を導入すると、RNA アプタマーのプリオンタンパク質に対する親和性が落ちる事も分かった。即ちプリオンタンパク質との結合に際して、RNA 12-mer が重要な役割を担っている。そこで今回、RNA 12-mer の構造を決定した。我々は以前今回の配列の DNA 版である d(GGAGGAGGAGGA) (以下 DNA 12-mer)の構造決定を行なっているので、それとの比較も行なった。

RNA 12-mer は生理的なイオン条件下で、4重鎖構造を形成する事が分かった。1つの RNA 12-mer 分子は、G:G:G:G テトラッド平面と G:A:G:G:A:G ヘキサッド平面からなる4重鎖を形成し、さらにヘキサッド平面同志のスタッキングによりダイマー構造をとる事がわかった。以前構造を決定した DNA 12-mer では、G:G:G:G テトラッド平面と G:A:G:A:G:A:G ヘプタッド平面からなる4重鎖がダイマーを形成していたが、RNA 版においては、A 残基の参画が1つ少ないヘキサッド平面が形成されている点に違いがあった。またダイマー中の2つのモノマーを関係づける2回軸の位置も、DNA 12-mer と RNA 12-mer とでは 90° ずれている事が分かった。これはモノマー間のインターフェイスがヘプタッド(7角形)からヘキサッド(6角形)に変わった為に、最大のスタッキングを達成する為の配置が変わったとして、合理的に解釈できた。

若手ポスター賞発表要旨

Young Scientists Poster Award Abstracts

Paramagnetic lanthanide tagging for NMR structural analysis

Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan.

○ Tomohide Saio, Kenji Ogura, Masashi Yokochi, Fuyuhiko Inagaki

Paramagnetic lanthanide ions induce several NMR effects on observed nuclei, including PCS and RDC, which provide distance and angular information of the nuclei. The lanthanide binding tags (LBTs) are required to be fixed against the protein frame for obtaining accurate structural information. However, LBTs reported so far are all suffering from the flexibility of the tag against the protein frame. Here, we introduce a novel lanthanide-tagging method that utilizes the lanthanide-binding peptide linked to the target protein *via* two points: a disulfide bridge and a N-terminal fusion. PCS and RDC value, and the tensors from them indicated that our method dramatically improves the rigidity of the tag, thus provides stronger paramagnetic effect than ever reported and almost as strong as metalloprotein.

【序論】

分子量の大きなタンパク質やその複合体を対象としたNMR立体構造解析では、NOE情報の不足により精度の高い立体構造解析が困難となる。このような場合、ランタノイドによる常磁性プローブが有用となる。常磁性ランタノイドを対象タンパク質に結合させることで、ランタノイドを中心として約40Å以内という広範囲におけるタンパク質原子の位置情報を得ることができる。カルシウムなどの金属イオンを結合するタンパク質に対してはランタノイドと内在性イオンを置き換えることでランタノイドプローブが応用可能である。しかし、他の一般的なタンパク質に対してはランタノイドをタンパク質に固定化するタグが必要である。様々なランタノイド結合タグ(LBT)が開発されているが、対象タンパク質に対するタグの運動性が高いために、LBTを用いたランタノイドプローブの構造解析への応用は進んでいない。LBTの運動性が高く、タンパク質に対するランタノイドの位置が固定されていなければ、RDCやPCSなどの常磁性効果は平均化により減弱し、さらにそれらから得られる構造情報の信頼性が低下する。

本研究では、ランタノイド結合ペプチドをタンパク質に2点で固定することによって、より強固なLBTを開発した。PCSやRDCなどの常磁性効果の解析によって、本研究により開発されたランタノイドタグが、従来のLBTよりもランタノイドをより強固に固定し、より強い常磁性効果を与えることを示した。

Key Words: lanthanide ion, pseudo-contact shift, residual dipolar coupling, lanthanide binding tag

著者ふりがな: さいおともひで, おぐらけんじ, よこちまさし, いながきふゆひこ

【実験】

モデルタンパク質としてGB1を用いた。GB1に対してペプチド性LBTを固定し、GB1に対する常磁性効果を検証することにした。ペプチド性LBTをタンパク質の2点で固定する場合、LBTが対象タンパク質に結合する方向をコントロールし、単一の生成物が得られるようにする必要がある。そこで、ジスルフィド架橋とペプチド結合という2種の異なる結合によってLBTを目的タンパク質に付加する、以下の手法を考案した(Fig. 1)。① GB1表面にシステイン変異を導入し、ランタノイド結合ペプチド配列をN末端に融合したコンストラクトを作成する。これを以下L2GBと呼ぶ。② L2GBを発現・精製したのち、TEV proteaseにより消化してLBTのN末端システインを露出させる。③ DTNBを加えて酸化し、LBT N末端とGB1表面のシステインをジスルフィド結合によって架橋する。

【結果・考察】

^{15}N L2GBに対して La^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Dy^{3+} , Tb^{3+} の各ランタノイドを滴下し、 $[\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQCスペクトルを測定したところ、GB1由来のシグナルに大きなPCSが観測された。LBTをジスルフィド結合1点のみで結合させたL1GBを作成し、L2GBと共に常磁性ランタノイド存在下でRDC測定を行なった。その結果、L2GBを用いた場合、L1GBの場合の2-3倍大きなRDCが観測された。また、PCS、RDCのそれぞれから磁化率テンソルおよび配向テンソルを計算したところ、L2GBの配向テンソルはL1GBの場合の2-3倍の強度を示し、磁化率テンソルは金属結合タンパク質であるcalbindinの場合と同等の強度を示した。これより、ペプチド性LBTを対象タンパク質に対して2点で固定することによって、従来の1点固定化タグと比較してランタノイドがより強固に固定され、金属結合タンパク質の場合に匹敵するほどの強い常磁性効果が得られることが示された。今後このタグを用いることで、常磁性ランタノイドプローブが金属結合タンパク質以外の一般的なタンパク質に対しても応用可能になると考えられる。

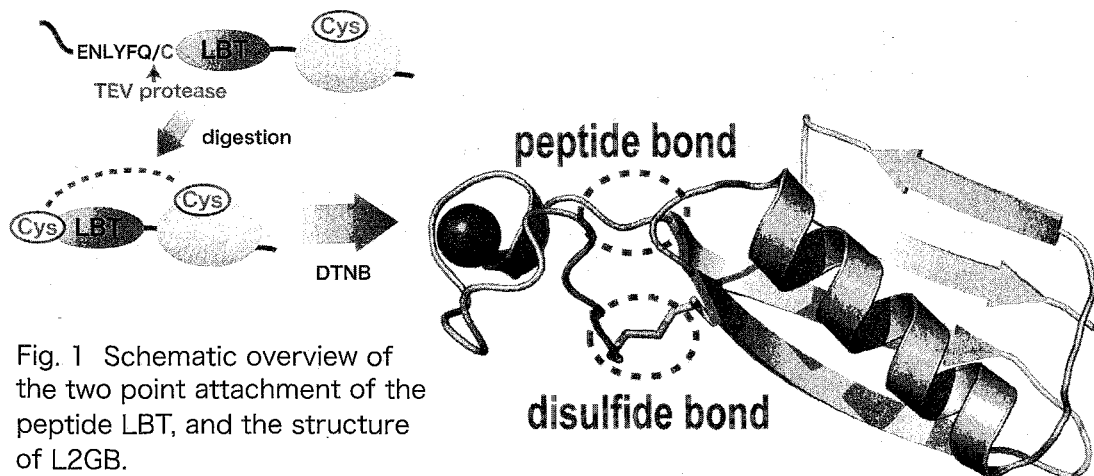


Fig. 1 Schematic overview of the two point attachment of the peptide LBT, and the structure of L2GB.

Structural Analysis of Macrocyclic Dipyrin Oligomers and Evaluation of Recognition Ability of the Boron Complex.

Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

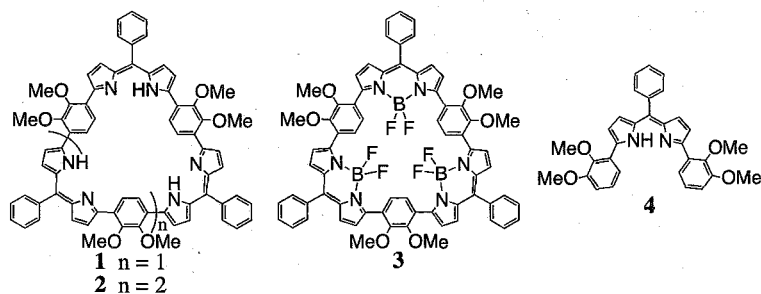
○Naoya Sakamoto, Chusaku Ikeda, Tatsuya Nabeshima

Structural analysis of macrocyclic dipyrin oligomers and evaluation of the guest recognition ability of the boron complex were carried out using ^1H , ^{11}B , ^{19}F NMR spectroscopic techniques. ^1H NMR spectroscopy indicated that **1** has an antiaromatic character due to the planar structure with the $4n\pi$ -electronic system. Novel interaction between BF_2 moieties of the dipyrin complex and cationic guest was suggested by ^1H , ^{11}B , ^{19}F NMR spectral changes in **3** upon addition of the cationic guest.

ジピリン BF_2 錯体は強い蛍光を発するため、様々な蛍光センサーとして応用されているが、 BF_2 部位を利用した超分子会合体は知られていない。本研究では、電気陰性度の大きなフッ素原子が2つ結合した BF_2 部位がカチオン性ゲストと相互作用すると期待されることから、フッ素原子6つが事前組織化した **3** を合成し、カチオン性ゲストとの相互作用を ^1H NMR、 ^{11}B NMR、 ^{19}F NMR の各 NMR を用いて詳細に検討したので報告する。

まず、配位子 **1** の構造について ^1H NMR 測定により **2**、**4** との比較を行なった (Figure 1)。**2** のピークは **4** とほぼ同じ化学シフトで観察されたのに対し、**1** のメトキシプロトン、ピロールβプロトンは **2** に比べてそれぞれ約 0.5 ppm 低磁場側、および約 0.2 ppm 高磁場側に観察された。**1** は平面性の高い三角形の骨格と 36π 系の電子構造を有するため、反芳香族性の性質が含まれた結果、このような化学シフトの差が生じたと考えられる。実際に X 線結晶構造解析から得られた構造では、**1** が **2** より平面性が高いことが明らかになった。

次に、**1** のホウ素錯体 **3** を合成し、 ^1H NMR で **3** にルビジウムイオンを添加したところスペクトル変化が観察された (Figure 2)。この変化を非線形最小二乗法により解析すると、1:1

ジピリン・イオン認識・ ^{11}B NMR・ ^{19}F NMR

○さかもと なおや・いけだ ちゅうさく・なべしま たつや

会合体を生成していることが明らかとなった。フェニレンプロトンやピロールβプロトンのシグナルが大きく変化しているにもかかわらず、メトキシプロトンではほとんど変化が見られなかったことから、メトキシ酸素とルビジウムイオンの間に相互作用がないことがわかった。また、スペクトルの対称性は保たれていることから、**3** が環の中心のフッ素6つに囲まれた空孔でゲストを認識していることが示唆された (Scheme 1)。

続いて、**3** とルビジウムイオンとの相互作用を ^{19}F NMR を用いて検討した。**3** のみの ^{19}F NMR スペクトルは室温ではブロードなピークを与えたが、温度を 220 K に下げて測定を行なったところ 6 つのピークが観察された (Figure 3a)。これはフェニレン環の回転による二種類のアトロプ異性体がそれぞれ観察されたためであると考えられる。さらに、これら6つのピークはルビジウムイオンの添加により化学シフトの変化を示したことから、フッ素原子とカチオンとの相互作用が示唆された。また、 ^{11}B NMR においてもピークが若干高磁場シフトし、フッ素核とのカップリング定数の増大が観察された。これはフッ素がカチオンと相互作用することによってホウ素とフッ素間の結合が変化したことを示している。

本報告では、 ^{19}F NMR、 ^1H NMR、 ^{11}B NMR を用いて大環状トリスジピリンホウ素錯体 **3** のゲスト認識能について総合的に検討した結果、ジピリンホウ素錯体の BF_2 部位がカチオン性ゲスト認識能を有することを初めて明らかにすることができた。

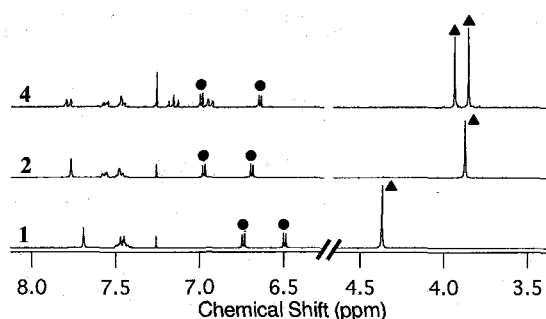


Figure 1. ^1H NMR spectra of (top) **4**, (middle) **2**, and (bottom) **1**. 300 MHz, CDCl_3 , room temperature. Pyrrlic- β protons and methoxy protons are indicated with ● and ▲, respectively.

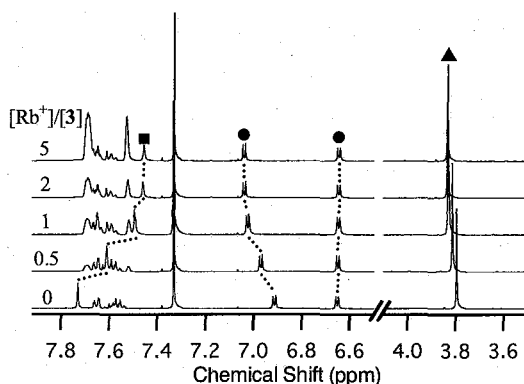
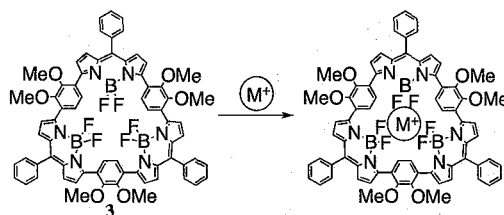


Figure 2. ^1H NMR spectral changes of **3** upon addition of rubidium tetrakis(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)borate (RbTfPB). 400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (10:1), $[\text{3}] = 1.0$ mM, room temperature. Phenylene protons, pyrrlic- β protons and methoxy protons are indicated with ■, ● and ▲, respectively.



Scheme 1

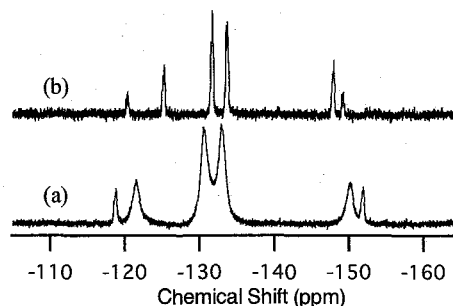


Figure 3. ^{19}F NMR spectra of (a) **3** and (b) **3** + RbTfPB (5 eq.). 470 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (10:1), $[\text{3}] = 1.0$ mM, 220 K.

の相互作用解析

¹大阪大学蛋白質研究所、²株式会社カン研究所
○海江田修至¹、松井千幸²、清末優子²、池上貴久¹

Analysis of interactions between the APC-SAMP motif and the DDEF1-SH3 domain

¹Institute for Protein Research, Osaka University, ²KAN Research Institute, Inc.

○Shuji Kaieda¹, Chiyuki Matsui², Yuko Mimori-Kiyosue², Takahisa Ikegami¹

The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor protein is a multifunctional protein with well-characterized roles in the Wnt signal transduction pathway and in cytoskeletal regulation. The SAMP motifs of APC, Axin-binding sites, are known to be important for tumour suppression and for the developmental function of APC. We identified the SH3 domain of the development and differentiation enhancing factor 1 (DDEF1) as another binding partner of the first SAMP motif-containing region of *Xenopus* APC. The chemical shift perturbation experiments revealed that the SAMP motifs specifically bind to DDEF1-SH3 domain. Moreover, the results indicated that the SAMP motif interacts at the same surface of the DDEF1-SH3 domain as the well-known SH3 binding motif, PxxP. Our new findings will provide further understanding of the functions of APC.

adenomatous polyposis coli (apc) 遺伝子は、遺伝性大腸癌の原因遺伝子の一つであり、遺伝性に限らず多くの大腸癌で変異が見られる。これらの変異の大多数は *apc* 遺伝子の中央付近で起こり、その結果、切断型変異体が発現される。変異によって切断を受ける APC 蛋白質の中央部位には、SAMP モチーフと呼ばれる繰り返し配列が3つ存在する。SAMP モチーフは APC の腫瘍抑制に重要な役割を担っており、APC 蛋白質の腫瘍抑制能には SAMP モチーフが少なくとも1つ必要であることが報告されている。APC の SAMP モチーフは、Axin との相互作用部位であることが既に明らかとなっている。APC と Axin は共に Wnt シグナル伝達経路の負の制御因子として働くため、これまで、APC-SAMP モチーフによる腫瘍抑制は、Axin 及び Wnt シグナル伝達経路とのみ関連付けてられていた。しかしながら、APC は Wnt シグナル伝

キーワード：蛋白質間相互作用、蛋白質複合体、SH3ドメイン、Adenomatous polyposis coli

著者ふりがな：かいてだしゅうじ、まついちゆき、きよすえゆうこ、いけがみたかひさ

達以外にも多くの機能を有しており、APC の腫瘍抑制機能のメカニズムは完全に解明されているわけではない。我々のグループは、APC の SAMP モチーフが development and differentiation enhancing factor 1 (DDEF1) と DDEF2 それぞれの SH3 ドメインと特異的に相互作用することを見出し、APC-SAMP モチーフが Axin 以外の分子とも相互作用することを初めて明らかにした。Chemical shift perturbation の結果から、これらの分子が直接相互作用し、また、その解離定数は数 μM 程度であり、生理的に比較的強い結合であることも明らかとなった。更に、SAMP モチーフと他の SH3 ドメインとの間の相互作用はほとんど認められず、SAMP モチーフが DDEF の SH3 ドメインに高い選択性を示すことがわかった。SH3 ドメインは、PxxP モチーフと呼ばれるプロリンに富んだ配列を認識することがよく知られており、DDEF1-SH3 も focal adhesion kinase (FAK) の PxxP モチーフと相互作用することが報告されている。APC-SAMP モチーフと FAK-PxxP モチーフの DDEF1-SH3 ドメイン上での相互作用部位を調べた結果、驚くべきことに、二つの異なる配列が同じ部位に、同程度の親和性で相互作用することが明らかとなった。このように、SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ドメインは共に蛋白質構造の観点から、非常に特徴的であると言える。APC は、細胞骨格を制御し、細胞運動や細胞接着に関わることも報告されている。DDEF1 も、同様に細胞運動に関わっていることから、APC と協調して細胞骨格の制御を行うと予想される。APC-SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ドメインの相互作用、複合体構造の解析を通し、APC の機能に関する更なる知見を得ることが出来ると考えられる。

Fig1. Overlaid 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectra of [^{15}N]-*Xenopus* DDEF1-SH3 with 0 (blue), 0.5 (yellow), and 1.0 (red) equivalent amounts of the FLAG-SAMP#1 peptide.

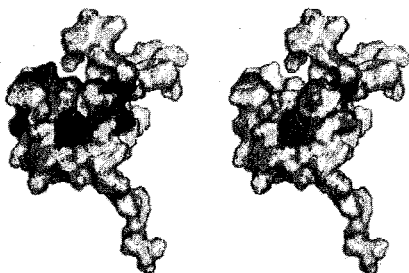
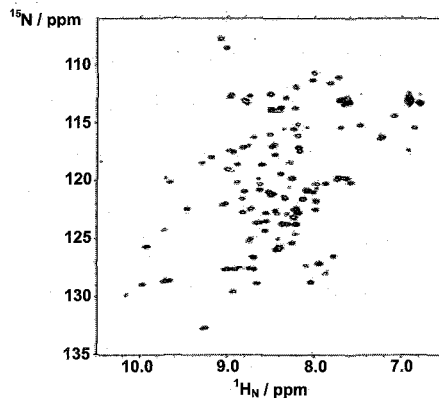


Fig2. Mapping of the residues for which chemical shift changes were observed when FLAG-SAMP#1 (left) or FLAG-FAK-SII (right) was added to the solution of [^{15}N]-DDEF1-SH3 on the 3D structure of human Intersectin2-SH3 (PDB coordinate: 1UDL), which shows the highest sequence similarity to *Xenopus* DDEF1-SH3 in the Protein Data Bank. Residues are colored according to the scale of the chemical shift changes.

NMR 解析に基づくらせん型擬クリプタンドの 多重イオン認識能の評価

筑波大院数理物質 ○古川裕理・秋根茂久・鍋島達弥

Evaluation of Multiple Recognition of Helical Pseudocryptand Based on NMR Analysis

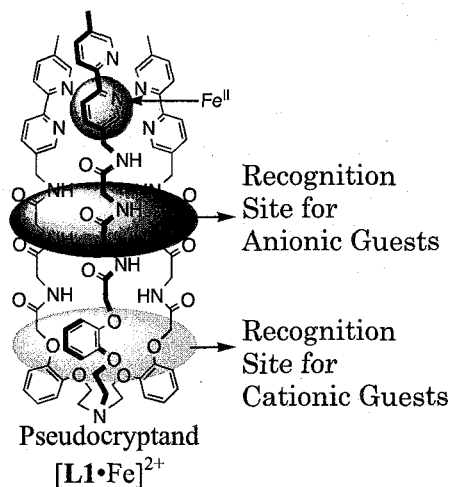
Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

○Yusuke Furukawa, Shigehisa Akine, Tatsuya Nabeshima

We report here synthesis of a novel tripodand bearing nine amide groups to achieve a new binding mode. ^1H NMR, ESI-MS, and UV-vis spectra suggested that the tripodand was converted to the corresponding C_3 symmetric pseudocryptand by the complexation with Fe(II) . We determined association constants with cations in the presence and absence of Cl^- by ^1H NMR spectroscopy. The cation binding affinity was enhanced by the addition of Cl^- . This indicates that the metallohost cooperatively recognizes Cl^- and the cations. These association constants are much larger than those of the tripodand bearing six amide groups, probably due to counter anion effect that supported by ^{19}F NMR spectroscopy.

【序論】

当研究室ではこれまでに末端にピピリジン
を有するトリポダンドと Fe^{II} イオンとの錯形
成によるらせん型擬クリプタンドの合成、お
よびそれを利用したゲスト認識能の制御につ
いて検討を行ってきた。この骨格のそれぞ
れの鎖にアミド基とオリゴエーテル部位を導
入すれば、アミド水素でアニオン認識を、ま
たアミドのカルボニル基とエーテル部位でカ
チオン認識を行うことができると予想される。
すでに、当研究室において各鎖にアミド基を
2 つもつホストを合成し、アニオンとカチ
オンを同時に認識することを見出しており、
このホストのキャビティを大きくすることで、
より大きな分子の認識も期待される。そ
こで、本研究では各鎖にアミド基を3つ導
入



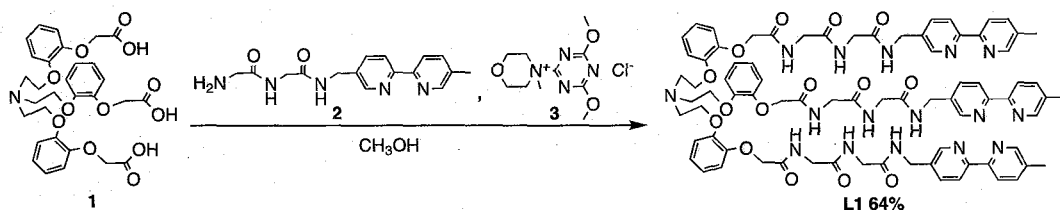
イオン認識・擬クリプタンド・鉄錯体・ ^1H NMR・ ^{19}F NMR

○ふるかわ ゆうすけ・あきね しげひさ・なべしま たつや

した擬クリプタンド[L1•Fe](BF₄)₂の合成とゲスト認識能について検討した。

【オリゴペプチド擬クリプタンドの合成】

2-ベンジルオキシフェノールから4段階で合成したトリカルボン酸**1**と、β-ピコリンから5段階で合成したビピリジン誘導体**2**を縮合剤**3**の存在下で脱水縮合することにより、目的の配位子**L1**を収率64%で得た(Scheme 1)。



Scheme 1. Synthesis of L1

L1のFe^{II}イオンとの錯形成について検討するため、各種滴定実験を行った。¹H NMR 滴定では、L1にテトラフルオロホウ酸鉄(II)を添加していくと、1当量まではL1のピークが消失していき、かわりにL1-鉄(II)錯体由来の新たなピークの強度が増大した(Figure 1)。ESI-MS スペクトルでは、*m/z* 770.26に[L1•Fe]²⁺のピークが観測され、UV-vis スペクトルでもテトラフルオロホウ酸鉄(II)を1当量以上加えても変化が見られなかった。以上の結果から、L1は溶液中でFe^{II}イオンと定量的に1:1錯体を形成することがわかった。

続いて、この錯体のすべてのピークを¹H-¹H COSY、ROESYにより帰属した(Figure 2)。ここでビピリジン由来のピークがどの鎖でも等価に観測されたことから、C3対称の構造をとっていることがわかる。また、錯形成前はシングレットとして観測されたメチレンプロトンHi、Hk、Hmのシグナルが、ジアステレオトピックに観測されたことから、この鉄錯体がらせん構造あるいはそれに類する構造をとっていると考えている。

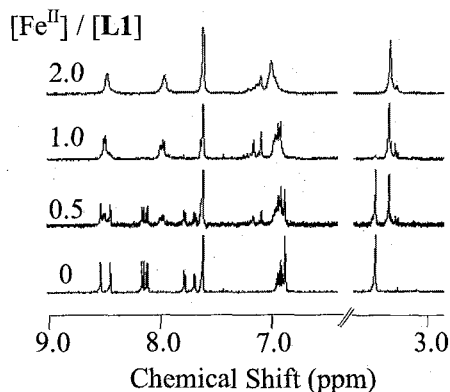


Figure 1. ¹H NMR spectral changes of L1 (0.50 mM) by the addition of Fe(BF₄)·6H₂O in CDCl₃ : CD₃OD = 1 : 1. (600 MHz)

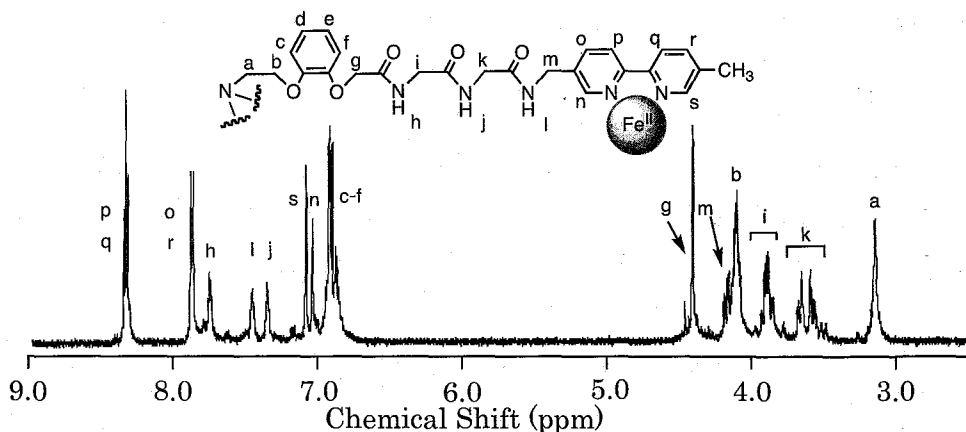


Figure 2 ^1H NMR spectrum of $[\text{L1}\cdot\text{Fe}]^{2+}$ in CD_3CN , 293K, 600 MHz.

【ホスト $[\text{L1}\cdot\text{Fe}](\text{BF}_4)_2$ のゲスト認識能】

$[\text{L1}\cdot\text{Fe}](\text{BF}_4)_2$ のゲスト認識を検討するため、 ^1H NMR による滴定実験を行った。塩化物イオン存在下および非存在下における $[\text{L1}\cdot\text{Fe}](\text{BF}_4)_2$ のアルカリ金属イオンとの会合定数を非線形最小二乗法により算出した (Table 1)。 ^1H NMR スペクトルにおいて、アミドプロトンは $[\text{L1}\cdot\text{Fe}](\text{BF}_4)_2$ と比べて大きく低磁場シフトし、メチレンプロトンの化学シフトも変化した (Figure 3)。これらのことから、ホストはアミド部位とエーテル部位でアニオンとカチオンをそれぞれ認識していることが明らかになった。

各鎖にアミド基を2つもつホストと比較すると、どちらのホストでも塩化物イオンを加えたことで会合定数が大きく増大することが確認された。これは空孔に取り込まれたアニオン-カチオン間の分子内での静電的な相互作用のためだと考えられる。ここで、塩化物イオンを加えたことによる会合定数の増大の割合が、各鎖にアミド基を3つもつホストの方が大きいことがわかった。この理由1つとして、 Fe^{II} イオンの対アニオンである BF_4^- がホストに包接され、アニオンやカチオンの認識に影響を与えていることが考えられる。そこで、 ^{19}F NMR により、その影響を調べた。

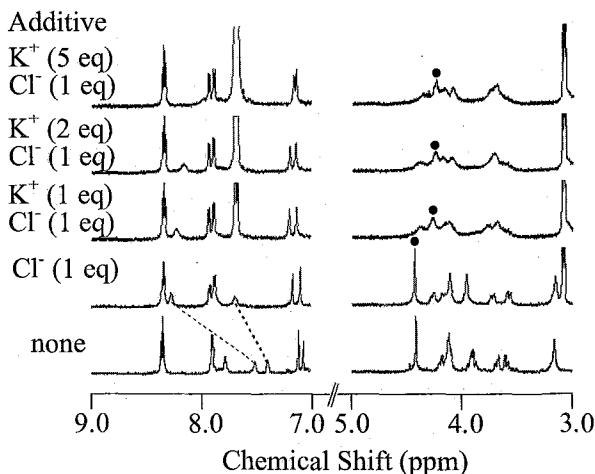
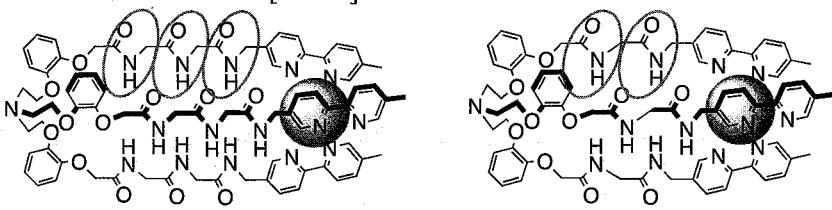


Figure 3. ^1H NMR spectral changes of $[\text{L1}\cdot\text{Fe}](\text{BF}_4)_2$ by the addition of KTFPB in the presence of $n\text{-Bu}_4\text{NCl}$ (1 eq) in CD_3CN , 600 MHz at 293K. $[[\text{L1}\cdot\text{Fe}](\text{BF}_4)_2] = [n\text{-Bu}_4\text{NCl}] = 1 \text{ mM}$.

Table 1 Association constants between $[L1\cdot Fe]^{2+}$ and various cations.



Guest	none	Cl ⁻	none	Cl ⁻
Na ⁺¹⁾	340 ± 20	> 10 ⁴	300 ± 10	6800 ± 1600
K ⁺¹⁾	380 ± 20	> 10 ⁵	460 ± 40	2600 ± 500
Rb ⁺¹⁾	70 ± 10	3300 ± 600	220 ± 30	640 ± 70

Association constants were determined by ¹H NMR spectroscopy (CD₃CN, 600 MHz, $[[L1\cdot Fe](BF_4)_2] = 1.0$ mM). 1) added as TFPB⁻ salts.

TFPB; tetrakis-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)borate

スペクトル (a) - (h) より BF₄⁻のシグナルにおいてはイオン対を形成したためと考えられる若干の変化が見られた。ここで、 $[L1\cdot Fe]^{2+}$ 存在下で顕著に低磁場にシフトが((e) - (h)) 見られたことから BF₄⁻は $[L1\cdot Fe]^{2+}$ に包接されていると考えられる。さらに、各鎖にアミド基を2つもつホストでは、単結晶 X 線結晶構造解析から BF₄⁻がホストに包接されていることが明らかになっていること、および ¹⁹F NMR スペクトルにおいて BF₄⁻のシグナルがホスト存在下で顕著に低磁場にシフトしたことも BF₄⁻の包接を支持している。しかし、(d) と (h) から BF₄⁻の NBu₄⁺塩と $[L1\cdot Fe](BF_4)_2$ の化学シフトの差 0.08 ppm は BF₄⁻の NBu₄⁺塩と各鎖にアミド基を2つ有するホストの化学シフトの差 0.12 ppm より小さいことから、 $[L1\cdot Fe]^{2+}$ では BF₄⁻との錯形成率は低いと考えられる。したがって、 $[L1\cdot Fe]^{2+}$ の方が BF₄⁻によりゲストの認識が阻害されることが少ないため、塩化物イオンを加えた場合のカチオンの会合定数がより大きくなったと考えられる。

このように $[L1\cdot Fe](BF_4)_2$ を用いることで非常に協同効果の高いイオン対認識が実現できることを NMR の詳細な検討により明らかにすることができた。

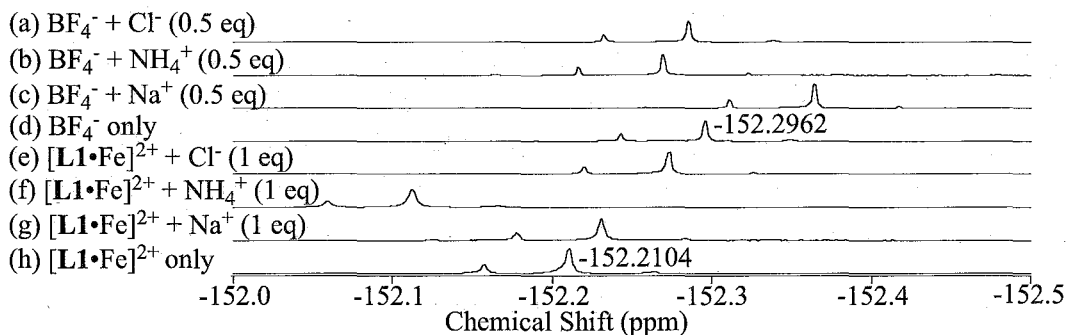


Figure 4. ¹⁹F NMR spectrum of $[L1\cdot Fe]^{2+}$ and BF₄⁻ in CD₃CN. $[[L1\cdot Fe](BF_4)_2] = [[Fe(bpy)_3](BF_4)_2] = 1.0$ mM. $[n-Bu_4NBF_4] = 2$ mM. 293 K. 376 MHz.

成中間体の検出

○小沼 剛¹, 茶谷 絵理², 八木 正典³, 大西 玲奈¹, 櫻井
一正¹, 内木 宏延⁴, 後藤 祐児¹

(大阪大学 蛋白質研究所¹, 立命館大学 薬学部², 大阪大学 微生物病研究所³,
福井大学 医学部⁴)

Detection of the kinetic intermediate on the amyloid fibrillation of $\beta 2$ -microglobulin by NMR combined with H/D exchange

Tsuyoshi Konuma¹, Eri Chatani², Masanori Yagi³, Reina Onishi¹, Kazumasa Sakurai¹,
Hironobu Naiki⁴, and Yuji Goto¹

(¹Institute for Protein Research, Osaka University, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Ritsumeikan University, ³Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University,
⁴Faculty of Medical Sciences, University of Fukui)

We introduce a new NMR method combined with the hydrogen/deuterium (H/D) exchange to characterize the kinetic intermediate in the amyloid fibrillation. We used $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2m$) which is responsible for the dialysis amyloidosis, as a model protein. We observed that an intermediate state accumulates in the early stage of the reaction in the presence of the excessive concentration of the seeds. To obtain structural information of the intermediate, the $\beta 2m$ molecule was labeled with deuterium during the early stage of the fibrillation by quenched-flow H/D exchange, and the proton occupancies of each residue were calculated from the ¹H-¹⁵N HSQC spectrum. The analysis of the proton occupancy data identified the interacting regions of the intermediate to the fibrils. This method would be applicable to the study of the fibril formation of various amyloidogenic proteins, providing detailed structural information of the intermediate in the amyloid fibrillation.

蛋白質の中には間違っって折り畳むことでアミロイド線維として知られる超分子複合体を形成するものがいくらか知られている。このアミロイド線維の沈着はアルツハイマー病、プリオン病そしてパーキンソン病など20種類以上の重篤なアミロイド病と関わっている。近年、アミロイド線維の研究は盛んに行われており、この形成反応は二段階で起こることが提案されている。第一段階は核形成反応であり、蛋白質が凝集して線維の核(シード)を形成する。そして第二段階では、単量体の蛋白質がシードに結合し、それを鋳型をとって構造変化する。この反応が連続的に起こることでア

$\beta 2$ ミクログロブリン アミロイド線維 H/D交換法

こぬま つよし

ミロイド線維伸長が進行する。アミロイド線維形成における伸長反応の分子機構を理解することはアミロイド病の予防と治療法の確立に繋がると考えられる。

本研究では、アミロイド線維形成反応中に形成する中間体を検出するために水素/重水素 (H/D) 交換と NMR を組み合わせた方法を応用した。モデル蛋白質として、透析アミロイドーシスの原因蛋白質である $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) を用いた。 $\beta 2m$ のアミロイド線維形成反応は低濃度のシード存在下では見かけ二状態的に起こる一方で、過剰なシード存在下では中間体を形成することを観測した。この $\beta 2m$ 中間体構造の情報を得るために、クエンチト・フロー装置を用いて H/D 交換反応を行った。そして、このサンプルの 1H - ^{15}N HSQC を測定し、プロトンの占有率を計算した。この結果から、線維形成における $\beta 2m$ 中間体の線維との相互作用部位を同定した。ここで用いた手法は様々な蛋白質のアミロイド線維形成の研究に応用可能であり、線維形成における中間体構造について原子レベルの情報を与える。

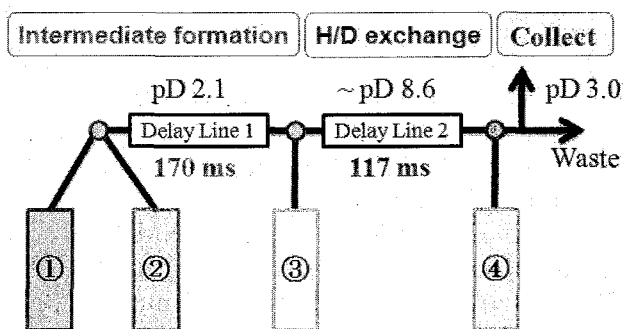


Figure. Sample collection by using the quenched-flow device. In the delay line 1, the fibril extends after monomer protein (solution 1) and seed (solution 2) are mixed. The fibril solution is mixed with alkali buffer (solution 3) to exchange rapidly the hydrogen and deuterium in the delay line 2. Finally the solution is quenched by acid buffer (solution 4).

YP06 アルキル架橋ウリジン二量体を含む DNA オリゴマーの NMR 構造解析

○古板恭子¹ 村田俊平² Jee, JunGoo^{1,3} 市川聡² 松田彰² 児嶋長次郎¹
(¹奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科、²北海道大学 大学院薬学研究院、³首都大学東京 戦略研究センター)

NMR structural analysis of DNA oligomers containing alkylene crosslinked cyclic 2'-deoxyuridylyate dimers

○Kyoko Furuita¹, Shunpei Murata², JunGoo Jee^{1,3}, Satoshi Ichikawa², Akira Matsuda² and Chojiro Kojima¹

(¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, ³Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University)

A 2'-deoxyuridylyate dimer cyclized via cross-linkage by ethylene (U^{etp}U) or propylene (U^{ppp}U) linker was incorporated in DNA oligomer. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiment showed that they bent at a sharp angle of approximately 90 degree. HMGB1 A-box protein, which selectively binds to bent DNA, binds to the U^{etp}U DNA oligomer with high affinity, but not to the U^{ppp}U. In order to explain this difference, we have studied the solution structures of the U^{etp}U and U^{ppp}U DNA oligomers using NMR. In both DNA oligomers, alkylene cross-linked 2'-deoxyuridylyates form Watson-Crick base-pairs, and both the U^{etp}U and U^{ppp}U DNA oligomers have right-handed B-form like structures that are distorted around the cross-linked sites. However, local structures around the cross-linked sites are different.

【はじめに】エチレン架橋ウリジン二量体 (U^{etp}U) を含む DNA オリゴマーとプロピレン架橋ウリジン二量体 (U^{ppp}U) (Figure 1) を含む DNA オリゴマーはともに蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 実験の結果から 90 度近いベント角で曲がった構造を持つと考えられている (Murata, *S. et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007)。HMGB1 A-box タンパク質は、例えばシスプラチン架橋 DNA のような歪んだ構造を持つ DNA を特異的に結合することが知られているが、U^{etp}U を含む DNA オリゴマーは HMGB1 A-box タンパク質と解離定数およそ 2 nM と強く結合するのに対し、U^{ppp}U を含む DNA オリゴマーは結合しない (Murata, *S. et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007)。本研究では U^{etp}U を含む DNA オリゴマーと U^{ppp}U を含む DNA オリゴマーとの間の HMGB1 A-box タンパク質との親和性における違いを説明するために、U^{etp}U 及び U^{ppp}U を含む DNA オリゴマー (Figure 2) の溶液構造を解析した。

キーワード： bent DNA、立体構造

著者ふりがな： ふるいた きょうこ、むらた しゅんぺい、じー じゅんぐー、いちかわ さとし、まつだ あきら、こじま ちょうじろう

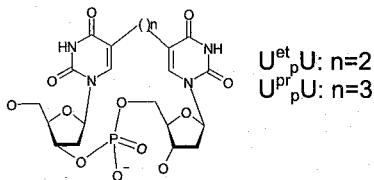


Figure 1 Structure of alkylene cross-linked cyclic 2'-deoxyuridylylate dimmers.

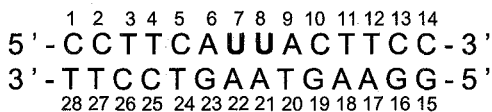


Figure 2 Sequence of DNA oligomers containing U^{et}_pU or U^{pr}_pU . Alkylene cross-linked 2'-deoxyuridylylates are shown in bold type face.

【方法】 90/10% H_2O/D_2O あるいは 100% D_2O 中の U^{et}_pU を含む DNA オリゴマー (0.7 mM) 及び U^{pr}_pU を含む DNA オリゴマー (0.5 mM) のサンプルに対し、 1H - 1H NOESY スペクトル (混合時間: 30、120、及び 200 ms)、DQF-COSY スペクトル、TOCSY スペクトル及び natural abundance 1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定した。これらのスペクトルを用い、両 DNA オリゴマーの化学シフトを帰属した。立体構造計算は、MARDIGRAS を用いて決定した距離制限情報を用い、CNS で行った。

【結果と考察】 U^{et}_pU 及び U^{pr}_pU を含む DNA オリゴマーに関して、 $H4'$ 、 $H5'/H5''$ 及び G の NH_2 を除くプロトン化学シフトの帰属をほぼ完了した。DQF-COSY スペクトルにおける $H1'-H2'$ 及び $H1'-H2''$ 交差ピークの形状から、両 DNA オリゴマーにおいてウリジンダイマーの 5'側のウリジンの糖は N 型のコンフォメーションを持ち、その他は S 型のコンフォメーションを持つことが分かった。決定した両 DNA オリゴマーの立体構造 (Figure 3) において、両 DNA オリゴマーはともに全体的に B 型 DNA 様構造を有し、リンカー周辺において曲がっていた。しかし、屈曲部分の構造は両 DNA オリゴマーで異なっていた。ウリジンダイマー部分における構造のゆがみは U^{pr}_pU を含む DNA オリゴマーよりも U^{et}_pU を含む DNA オリゴマーの方が大きかった。過去に、HMGB1 A-box タンパク質と強く結合するシスプラチン架橋 DNA の溶液構造が決定されているが、 U^{pr}_pU を含む DNA オリゴマーよりも U^{et}_pU を含む DNA オリゴマーの方が屈曲部分の構造がシスプラチン架橋 DNA に近かった。DNA オリゴマーの屈曲部分の構造が HMGB1 A-box タンパク質による DNA 認識に重要であると考えられる。発表では、安定同位体標識核酸を用いた DNA オリゴマーの bent 角の決定についても触れる。

(A) U^{et}_pU

(B) U^{pr}_pU

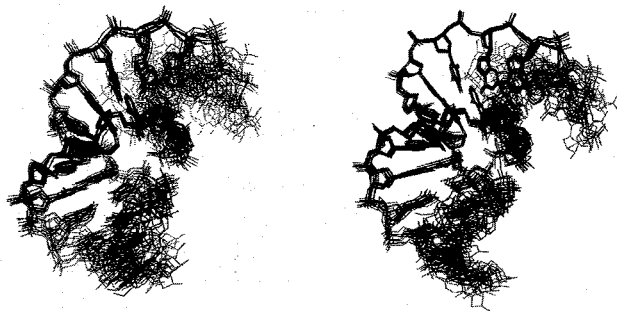


Figure 3 Superimposed pictures of 10 lowest energy structures of the U^{et}_pU (A) and U^{pr}_pU (B) DNA oligomers.

Brome mosaic virus ゲノム RNA 3'-UTR 由来のステムループの立体構造解析

¹千葉工業大学 工学部 生命環境科学科

²東京大学大学院 新領域創成科学研究科

○篠 阿弥宇¹, 三浦 謹一郎², 河合 剛太¹

Structural analysis of a stem loop from 3'-UTR in Brome mosaic virus genomic RNA
(¹Dept. Life Env. Sci., Fac. Eng., Chiba Inst. Tech., ²Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo)

○Amiu Shino¹, Kin-ichiro Miura², Gota Kawai¹

Brome mosaic virus (BMV) genomic RNA carries the tRNA-like structure (TLS) consisting of 155 nucleotide residues in its 3'-untranslated region (3'-UTR). The TLS is thought to be important for the replication of virus RNA. In the present study, we analyzed the tertiary structure of a stem loop of TLS, stem loop C (BMV-SLC), including an internal loop and an AUA trinucleotide loop. By using samples with ¹³C/¹⁵N stable isotopic labeling in nucleotide specific or residue specific manner as well as without labeling, the NMR signals were effectively analyzed. The simulated annealing calculation gave accepted structures with the r.m.s.d. values of 1.98 Å. To improve the convergence of the calculation, RDC values were measured and the structure calculation including RDC is in progress.

序論

RNA ウィルスにおいて、ウィルス RNA の立体構造がウィルスの複製に重要な役割を果たすと考えられている。Brome mosaic virus (BMV) ゲノム RNA の 3'末端には約 160 残基からなる tRNA-like structure (TLS) と呼ばれる構造が存在する (Fig. 1a)。TLS は複製に重要であることが示されているが、機能の詳細とそのメカニズムは明らかとなっていない。TLS の一部分である stem loop C は、内部ループと AUA トリループを持ち、レプリカーゼと相互作用すると考えられている。今回は、この stem loop C から NMR 法による解析を行うために 35 残基のステムループ RNA (BMV-SLC ; Fig. 1b) をデザインし、立体構造の解析を行った。

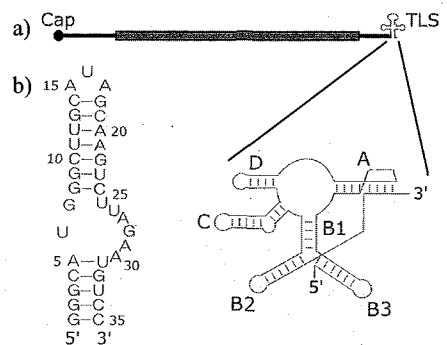


Fig. 1 a) BMV genomic RNA and TLS.

b) Secondary structure of BMV-SLC.

Keywords : RNA, 安定同位体標識, RDC

しの あみう, みうら きんいちろう, かわい ごうた

方法

[標識 RNA による NMR スペクトルの帰属]

塩基特異的標識: AmpliScribe™ T7-Flash Transcription Kit を用いて、試験管内転写合成法により BMV-SLC を調製した。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体標識 NTP (大陽日酸) を用いて、アデノシン (A), ウリジン (U), グアノシン (G), シチジン (C) のそれぞれを標識した塩基特異的標識試料も合わせて調製した。

残基特異的標識: BMV-SLC の内部ループの配列を持つ 28 残基の RNA をデザインし、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体標識アミダイト (大陽日酸) を用いて内部ループの 1 残基だけを標識した残基特異的標識試料を化学合成法により調製した。

NMR スペクトルの測定は、50 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 中で、測定温度 293 K で行った。測定には主に 500 MHz および 600 MHz の NMR 分光計 (Bruker) を用いた。高分解能が必要な測定には 800 MHz の NMR 分光計 (CryoProbe 付, Bruker, 理化学研究所所有) を用いた。

[構造情報の抽出と立体構造計算]

NMR データの処理は XWIN-NMR (Bruker) で行った。構造情報の抽出には Felix97 (Accelrys) を用いた。立体構造の計算は、CNSver.1.1¹⁾を用い、Simulated Annealing (SA) 法で行った。

[RDC を用いた立体構造計算]

重水溶媒中の塩基特異的標識試料それぞれに Pfl phage (ASLA biotech) を 8~10 mg/ml 共存させて、残余双極子相互作用 (RDC) を計測した。RDC の計測には、non-decoupling SQC, TROSY, ^1H -decoupling SQC 等を用いた。また、RDC を用いた立体構造計算は XPLOR-NIH²⁾を用いて行った。

結果および考察

[標識 RNA による NMR スペクトルの帰属]

塩基特異的標識

非標識試料で重水中の NMR スペクトルを測定した結果、NOESY スペクトルでは H2/H6/H8-H5/H1'領域でもシグナルの重なりが多く見られた (Fig. 2)。そこで塩基特異的標識試料を調製し、filtered-NOESY スペクトルや 3D HSQC-NOESY スペクトルによりシグナルの分離を図った。これにより多くのシグナルが帰属できた。しかし依然として、内部ループのいくつかの残基では、シグナルがブロードであったり、重なっていたりするために帰属が困難であった。

残基特異的標識

内部ループ部分の帰属を明確なものとし、かつ、NOE の距離情報を得るために、残基特異的標識試料を調製した。化学合成法の合成効率の問題から、BMV-SLC のステムを切り詰めた 28 残基の短い RNA としたが、イミノプロトンスペクトルの比較から、変異部位の前後以外には化学シフト値の変化がなく内部ループを挟むステムが BMV-SLC と同様に形成されていることが確認できている。さらに、重水中の NOESY

スペクトルの比較からも変異部位以外のシグナルには基本的に変化がないことを確認している。

A29 と A30 は NOE が非常にブロードで、また、A 同士が隣り合っているために塩基特異的標識試料では残基内のシグナルと残基間のシグナルの区別がつけられなかった。また、NOESY スペクトル上で、U25 の H6-H1' と H6-H5 および U31 の H6-H1' の NOE シグナルが重なっていると考えられた。特に U25 は全てのシグナルが塩基特異的標識試料だけでは帰属できなかった。そこで、A29、U25、U26、U31 を一残基ずつ標識した。U 標識については 0.5~1 mM と高濃度試料の調製に成功し、NOESY スペクトルの測定を行うことができた。各試料で filtered-NOESY を測定した結果、U25 のシグナルと U31 の残基内のシグナルは重なっていることがわかった。また、U26 においては H6-H5 と U25 からの残基間のシグナルが重なっていたことがわかった。一方、A 標識については 15 μ M と低濃度ではあったが、高感度 NMR 装置の利用によって、高分解能な SQC スペクトルが測定でき、 ^1H の化学シフトから帰属を行うことができた。A29 の帰属によって、前後の残基の帰属も行うことができた。

さらに、内部ループとステムの境目である U25 と U31 の標識試料のイミノプロトンスペクトルから、U25 は塩基対を形成しないこと、A5 と U31 が弱い塩基対を形成することがわかり、ステムとループを明確に分けることができた。

二種類の標識方法により、H2/H6/H8-H5/H1' 領域では U25 の前後で連鎖帰属することができ、H2/H6/H8/H5/H1' の間に観測されたほぼ全ての NOE シグナルを帰属できた。

NMR 法による RNA の立体構造解析は、帰属の難しさから、大きいものは分割するなどして 30 残基以下の試料を用いることも多いが、今回のように塩基特異的な標識と残基特異的な標識を併用することで、これまでよりも大きい RNA を一度に解析でき、構造解析のスピードアップが図れると考えられた。

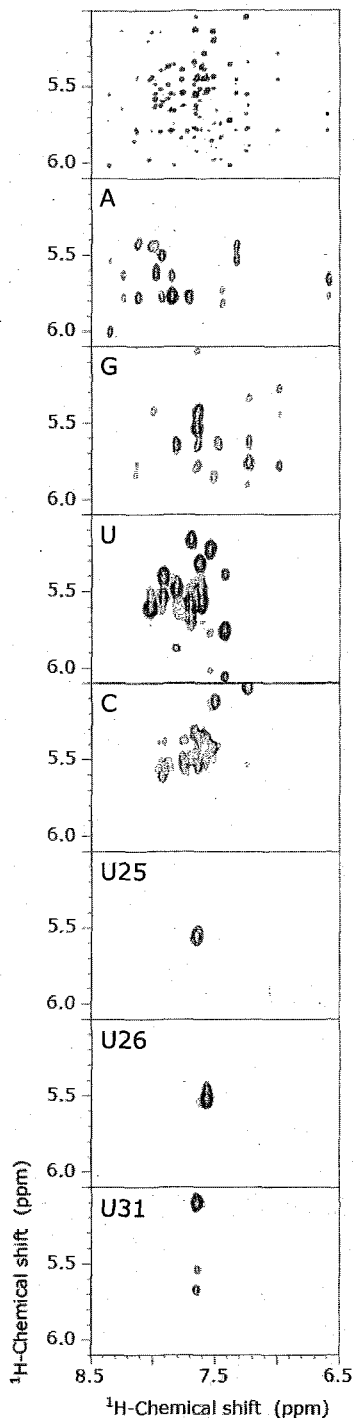


Fig. 2 2D NOESY spectra. H2/H6/H8-H5/H1' region was shown. Stable isotopic labeled nucleotide/residue was indicate each panel.

[構造情報の抽出と立体構造計算]

H2/H6/H8-H5/H1'領域以外の領域についても同様に帰属を行い、NOE から距離情報を抽出した。残基特異的に標識した3つのUについては、NOESY 上では重なっていたが、filtered-NOESY で分離して観測された NOE シグナルについては、距離情報として立体構造計算の拘束に入れることができた。また、HOHAHA スペクトルで H1'-H2'のシグナルが観測されていない残基はリボースのパッカリングを C3'-endo とし、強いシグナルが観測された残基は C2'-endo として、二面角情報を加えた。その他、イミノプロトンスペクトルの帰属結果から A 型らせんであることが推定できる領域については、水素結合や塩基対平面情報を加え、さらにステム部分に A 型らせんとグリコシド結合のまわりのコンホメーションの情報を拘束条件として加えて、立体構造計算を行った。

立体構造計算の結果、現在までに Fig. 3 の暫定構造が得られている。計算に用いた拘束条件を全て満たした構造のうち、エネルギーの低い10個の構造を重ね合わせたときの RMSD は 1.98 Åであった。

AUA トリループの構造は、12 残基のステムループの立体構造としてすでに報告されているが³⁾、今回得られた構造はそれとは異なるものであった。この違いは、A17 と G18 との間の NOE の帰属の違いによるものと考えられる。これは、特異的な標識による帰属と、高分解能な NMR スペクトルの必要性を示す結果であるといえるだろう。

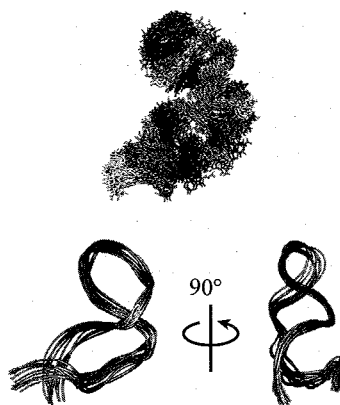


Fig. 3 Superposition of the 10 structures.

[RDC を用いた立体構造計算]

SA 法で得られた構造を片方のステムで重ね合わせると、内部ループの折れ曲がりによって各構造がずれていた。NOE の短距離情報のみでは、これ以上構造を収束させるのは難しいと考えられた。そこで、RDC を用いた計算を行った。RDC は、塩基特異的な標識試料を用い、Pf1 phase による配向を用いて計測した。塩基特異的な標識試料を用いたためシグナルの重なりも少なく、全標識試料を用いる場合よりも多くの RDC を計測できた。現在、RDC を用いた立体構造計算を進めている。

- 1) Brunger, A. T., et al., *Acta Cryst.* **D54**, 905-921 (1998).
- 2) Schwieters, C. D., et al., *J. Magn. Reson.* **160**, 65-73 (2003).
- 3) Kim, C.-H., et al., *Nature Struct. Biol.* **7**, 415-423 (2000).

京都大学大学院 理学研究科¹、大阪大学大学院 基礎工学研究科²
 ○福地 将志¹、犬飼 宗弘²、武田 和行¹、竹腰 清乃理¹

**Utilization of Discarded Coherences in a 2D Experiment Using the States Method:
 COCODARR & Double-acquisition**

¹Graduate School of Science, Kyoto University,

²Graduate School of Engineering Science, Osaka University

○Masashi Fukuchi¹, Munehiro Inukai², Kazuyuki Takeda¹, K. Takegoshi¹

Abstract: In order to save the spectrometer time, we propose a new data-acquisition scheme applicable to the 2D experiments using the States method, in which the so-far discarded longitudinal magnetization in the conventional States method is utilized. This scheme is demonstrated in two new pulse sequences employing two acquisition periods in a single scan, enabling us either to obtain two separate 2D spectra in a single experiment or to halve the acquisition time of a single 2D experiment.

The low sensitivity in NMR often forces us to accumulate signals many times. In multidimensional experiments, the acquisition time can take several weeks, limiting the throughput of research. The long acquisition time is also undesirable considering the stability of current hardware. In order to save the spectrometer time as much as possible, we propose a new data-acquisition scheme applicable to the 2D experiments using the States method [1], which is widely used to obtain pure 2D absorption spectra. In the conventional States method, the unwanted coherence is converted into the zero-quantum coherence, or equivalently, the longitudinal magnetization by apply-

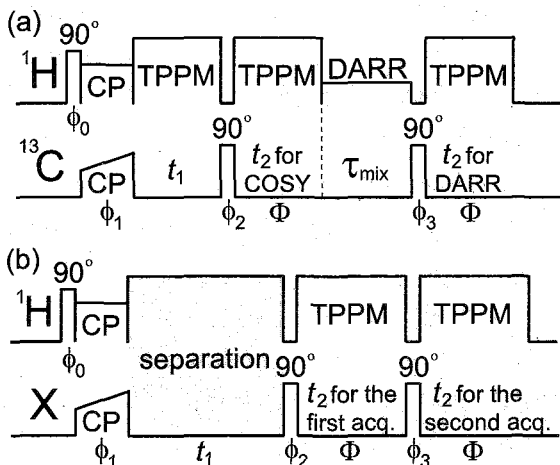


Figure 1. Pulse sequences of COCODARR (a) and double-acquisition (b). The ϕ_0 , ϕ_1 , ϕ_2 , ϕ_3 , and Φ denote the phase of the first ¹H 90° pulse, the CP pulse, the 90° pulse after t_1 , the last 90° pulse, and the receiver phase, respectively.

キーワード : COCODARR, Double-acquisition, FSLG-2 $\bar{4}$ 2, Dipolar recoupling, Chemical-shift anisotropy recoupling

著者ふりがな : ○ふくち まさし、いぬかい むねひろ、たけだ かずゆき、
 たけごし きよのり

ing a 90° pulse after the t_1 period. In the spirit of utilizing this so-far discarded longitudinal magnetization, we present two sequences employing two acquisition periods in a single scan, enabling us either to obtain two separate 2D spectra in a single experiment or to halve the acquisition time of a single 2D experiment.

Figure 1a is a pulse sequence to obtain both 2D through-bond (COSY) and 2D through-space (DARR) [2] ^{13}C correlation spectra in a single experiment. This sequence is analogous to ^1H COCONOSY [3] and combined COSY-NOESY [4] experiments in solution NMR, and is referred to as COCO-DARR [5].

The NMR experiments were carried out using a Chemagnetics CMX Infinity-300 spectrometer operating at a ^{13}C resonance frequency of 75.55 MHz with a double-tuned 5mm CP/MAS probe (Doty Sci. Inc.). The rf-field intensity for both ^1H 90° pulse and CP was 62.5 kHz, and both the nutation and the phase-modulation angles in the TPPM decoupling [6] were optimized for an rf intensity of ≈ 80 kHz to be 180° and $\pm 7.5^\circ$, respectively. Both of the MAS frequency ν_{MAS} and the ^1H rf intensity ν_1 for DARR irradiation were 15 kHz to fulfill the $n = 1$ DARR recoupling condition with the mixing time of 50 ms. The ^{13}C chemical shifts were calibrated in ppm by taking the chemical shift of solid adamantane as an external standard. 16 FIDs were accumulated for each t_1 value with a relaxation delay of 2.5 s. The experiment was carried out at room temperature, and the total experimental time was about 6 hr.

Figure 2 shows ^{13}C COSY (a) and DARR (b) spectra of uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled *L*-threonine (inset) obtained by a single COCODARR experiment. These spectra were found to be identical to the COSY and DARR

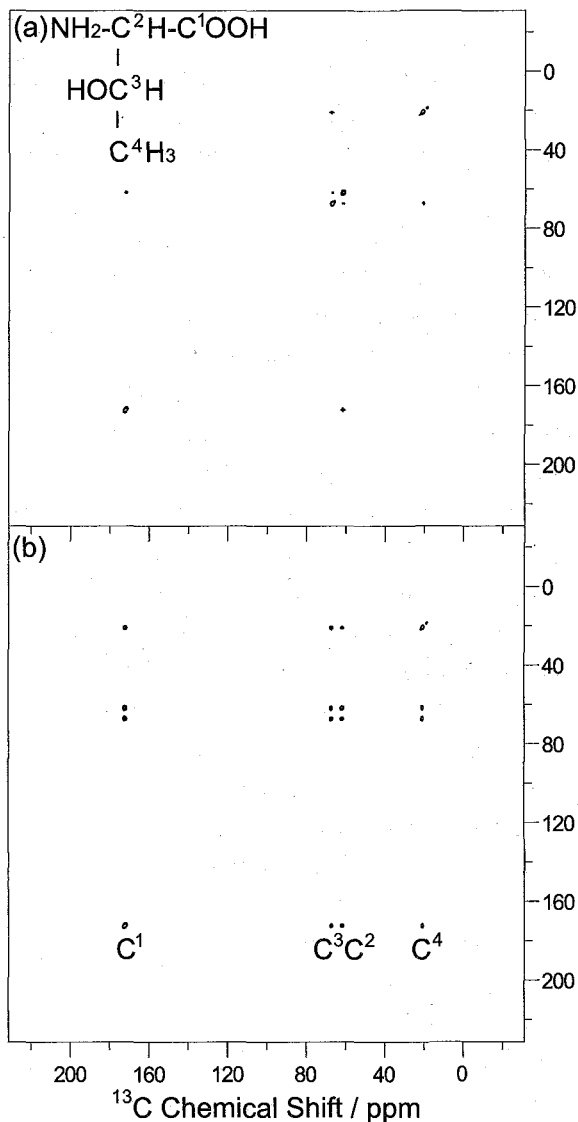


Figure 2. ^{13}C COSY (a) and DARR (b: the mixing time = 50 ms) spectra of uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled *L*-threonine (inset) obtained by a single COCODARR experiment.

spectra obtained separately taking twice the spectrometer time.

Shown in Figure 1b is another pulse sequence, referred to as double-acquisition [7], which is applicable to 2D separation experiments, and halves the spectrometer time compared to the conventional approach. We demonstrate the double-acquisition scheme for a 2D separation experiment of the ^1H - ^{15}N dipolar interaction using the FSLG-2 $\bar{4}2$ [8] dipolar recoupling scheme under MAS, which eliminates the homonuclear dipolar interactions among the abundant ^1H spins while re-introducing the MAS-removed heteronuclear ^1H - ^{15}N dipolar interaction.

The NMR experiments were carried out using a Chemagnetics CMX Infinity-300 spectrometer operating at a ^{15}N resonance frequency of 30.45 MHz with a doubly-tuned 5 mm CP/MAS probe (Doty Sci. Inc.). The rf-field intensity for both ^1H 90° pulse and CP was 62.5 kHz, and both the nutation and the phase-modulation angles in the TPPM decoupling were optimized for an rf intensity of ≈ 80 kHz to be 180° and $\pm 7.5^\circ$, respectively. The MAS frequency ν_{MAS} was 10 kHz. To suppress the spin echo in the second t_2 period, we inserted a z-filter during which ^1H irradiation is suspended between the first t_2 period and the last 90° pulse (not shown in Figure 1b for clarity). The duration of the z-filter was 25.6 μs . For the 2D FSLG-2 $\bar{4}2$ sequence, the rf-field intensity and the corresponding switching frequency were 71.0 kHz and 50.2 kHz, and the corresponding duration time for a 2π LG pulse was 11.5 μs . The intervals for phase and frequency jump were 0.2 and 0.8 μs . These settings are to fulfill the $n = 1$ recoupling condition for the FSLG-2 $\bar{4}2$ sequence for the MAS frequency at 10 kHz. 16 FIDs were accumulated for each t_1 value with a relaxation delay of 2.0 s. The experiment was carried out at room temperature, and the total experimental time was about 72.9 min.

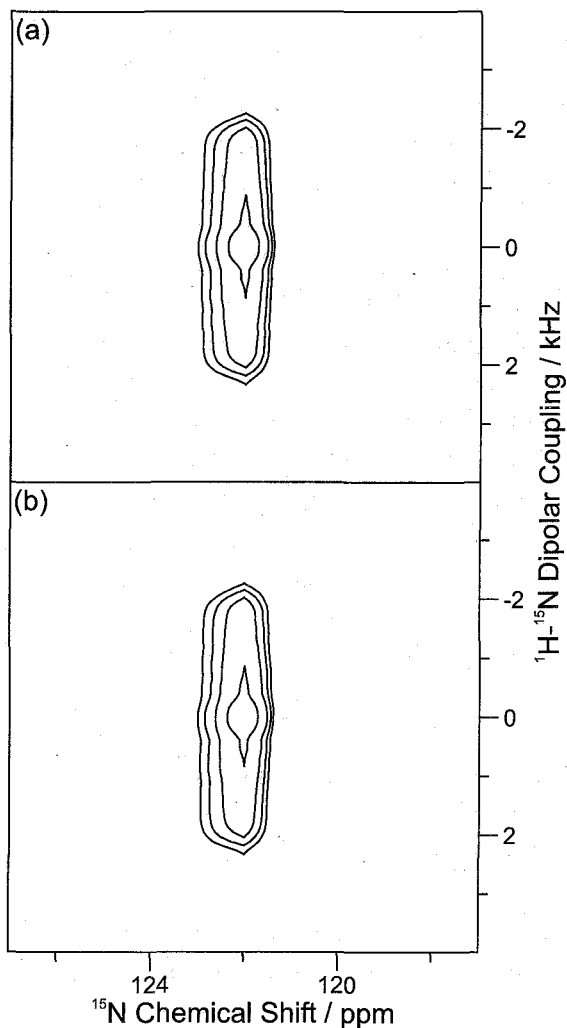


Figure 3. ^{15}N 2D FSLG-2 $\bar{4}2$ spectra of NAV obtained by the double-acquisition scheme (a) and the conventional single-acquisition scheme (b). The experimental times were 72.9 min. for (a) and 70.2 min.

Figure 3 shows ^{15}N 2D FSLG-2 $\bar{4}2$ spectra of N-acetyl [1,2- ^{13}C , ^{15}N] DL-valine (NAV) obtained by the double-acquisition scheme (a) and the conventional single-acquisition scheme (b), and their respective slice spectra along the f_1 dimension are depicted in Figure 4 (a) and (b). No intentional vertical scaling was performed in Figure 4. Note that ca. $\sqrt{2}$ fold enhancement in signal-to-noise ratio was attained in (a) as compared to that in (b) within nearly identical experimental times of 72.9 min for (a) and 70.2 min for (b), while no appreciable spectral distortion was found.

Acknowledgment.

M. Fukuchi was supported by research fellowship of Global COE program, International Center for Integrated Research and Advanced Education in Material Science, Kyoto-University, Japan. This work has been supported by Core Research for Evolutional and Technology (CREST) of the Japan Science and Technology Corporation (JST).

References.

- [1] D. J. States, R. A. Haberkorn, D. J. Ruben, *J. Magn. Reson.* **48**, 286 (1982).
- [2] (a) K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, *Chem. Phys. Lett.* **344**, 631 (2001);
(b) K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, *J. Chem. Phys.* **118**, 2325 (2003).
- [3] C. A. G. Haasnoot, F. J. M. Van de Ven, C. W. Hilbers, *J. Magn. Reson.* **56**, 343 (1984).
- [4] A. Z. Gurevich, I. L. Barsukov, A. S. Arseniev, V. F. Bystrov, *J. Magn. Reson.* **56**, 471 (1984).
- [5] M. Fukuchi, K. Takegoshi, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* in press. doi:10.1016/j.ssnmr.2008.05.001.
- [6] A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **103**, 6951 (1995).
- [7] M. Fukuchi, M. Inukai, K. Takeda, K. Takegoshi, *J. Magn. Reson.* in press. doi:10.1016/j.jmr.2008.07.004.
- [8] K. Takegoshi, T. Terao, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **13**, 203 (1999).

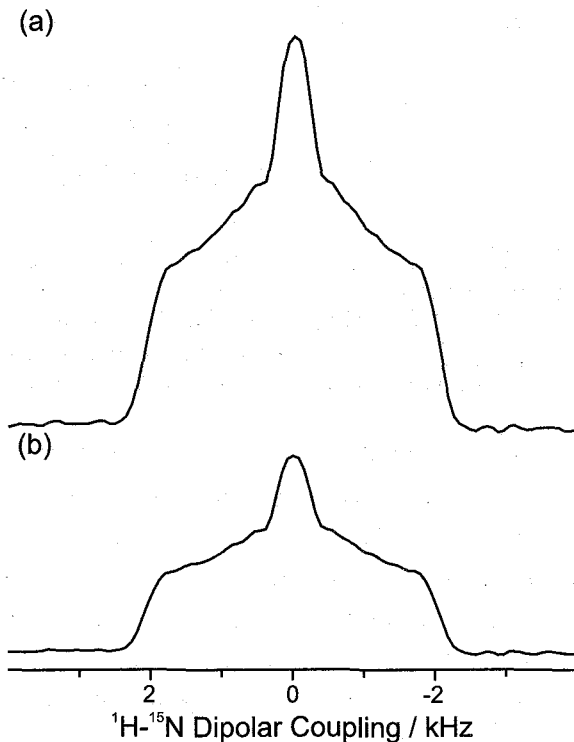


Figure 4. The f_1 slice spectra of the ^{15}N 2D FSLG-2 $\bar{4}2$ spectra of NAV acquired by the double-acquisition scheme (a) and the conventional single-acquisition scheme (b). The spectra are plotted with the same vertical scale for comparison.

YP09 平行および逆平行 β -シート構造ならびにその混在系に関する 固体 NMR 構造解析

(農工大院工・科博)

○堀口紅実子、亀谷俊輔、山内一夫、朝倉哲郎

Solid-state NMR Analyses of Parallel and Anti-parallel β -sheet Structures, and Their Mixing System.

(Department of Biotechnology, Nature and Science Museum,
Tokyo University of Agriculture and Technology,)

○Kumiko Horiguchi, Shunsuke Kametani, Kazuo Yamauchi and Tetsuo Asakura

The β -sheet structures of alanine oligopeptides, *Samia cynthia ricini* silk fibroin and their model peptides were studied with solid-state NMR including ^{13}C spin-lattice relaxation time and X-ray diffraction powder pattern analyses. The appearance of unique structures which consist of mixture of parallel and anti-parallel β -sheet structures was observed for longer alanine peptides than (Ala)₇. The similar structure was also proposed for *Samia cynthia ricini* silk fibroin fibers. Since the structure of the silk fibroin fibers has been considered to be exclusively anti-parallel β -sheet structure, this proposed structure will give new insight on their structure-property relationship.

【緒言】

生体高分子にみられる二次構造の一つである β -sheet 構造は、重大な神経性の病気を引き起こすアミロイド線維の構造と対応することもあって、現在、その構造研究は非常に注目を浴びてきている¹⁾。我々は、これまで、ポリアラニン残基のメチル基の化学シフトは β -sheet 内での平行型 (Parallel, P) と逆平行型 (Anti-Parallel, AP) の違いを反映して異なることを報告してきた²⁾。

本研究は、鎖長を変化させた一連のポリアラニンの詳細な固体 NMR 研究から、アラニンが 7 残基以上で、平行型 β -sheet 構造と逆平行型 β -sheet 構造が一定の割合で混ざった、特有の分子間配置を優先的にとることを見出した。その時のアラニン残基自身の運動性は高く、単結晶 X 線解析等の手法では得られない固体 NMR 独自の知見と考えられる。また、このような特有の分子間配置の発現は、実際に、ポリアラニンを多く含む野蚕の一種であるエリ蚕の絹フィブロインでも確認された。これまでは、絹繊維の構造は、逆平行型 β -sheet 構造と考えられてきたが、平行型 β -sheet 構造も大きく関与した特有の分子間配置をとることが明らかとなった。

平行および逆平行 β -シート構造、固体 NMR 構造解析、安定同位体ラベル、アラニンオリゴマー、X 線構造解析

ほりぐちくみこ、かめたにしゅんすけ、やまうちかずお、あさくらてつお

【実験】

Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて、一連のアラニンオリゴペプチド、(Ala)₃-(Ala)₈、(Ala)₁₂ならびに (Ala)₁₂ の両端に Gly-rich 領域が結合した 34 残基からなるエリ蚕絹のモデルペプチドを合成した。その際、目的に応じて、適宜、残基特異的に ¹³C ラベル化を行った。また、(Ala)₃ と (Ala)₄ については、溶媒処理を変えることによって 100% 平行型と 100% 逆平行型 β-sheet 構造に調整した。

一連の固体 NMR データを取得するために、¹³C CP/MAS NMR、RFDR、2 次元スピンドット NMR、¹³C スピン-格子緩和時間(T₁) 等の測定を、Bruker Avance 400 ならびに CMX Infinity 400 を用いて行った。また、一連のアラニンオリゴペプチドについて、分子間配置の情報を得るために、粉末 X 線測定を行い、面間隔を決定した。さらに、特有の分子間配置を持つ β-sheet 構造に関して、水溶液からの発現を検討するために、Material Studio Discover を用いて、長期間にわたる MD 計算を行った。

【結果】

アラニンオリゴペプチドにおける特有の分子間配置の出現

Fig.1 に、一連のアラニンオリゴペプチド、(Ala)₃-(Ala)₈ について、¹³C CP/MAS NMR スペクトルのメチルピークと粉末 X 線回折の結果を示した。(Ala)₃-(Ala)₆ までは、100% 逆平行型 β-sheet 構造である (ペプチドの両端と内部で AlaCB の化学シフトが異なることを反映してピークが分裂するが、長くなると 20.5ppm 付近に収束する)。一方、(Ala)₇ 以上から、ピークの線形が大きく変化する。(Ala)₈ ならびに (Ala)₁₂、(Ala)₁₂ を含むエリ蚕絹フィブロインさらに 34 残基のモデルペプチドでも、メチルピークは (Ala)₇ と同様の線形である。また、粉末 X 線パターンは、(Ala)₇ 以上で、突然、面間隔が大きく異なり (破線)、特有の分子間配置の出現を示している。この傾向は、固体 NMR データと一致する。

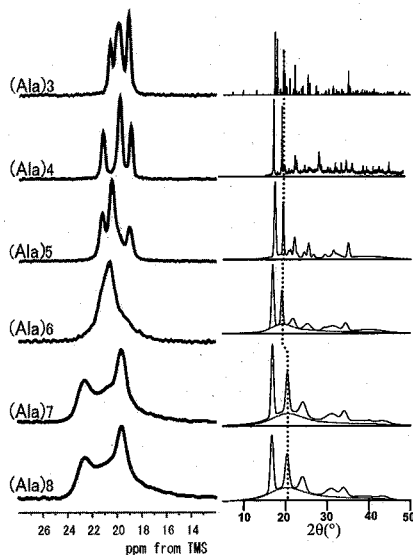


Fig.1 Ala CB region ¹³C CP/MAS NMR spectra and X-ray diffraction powder patterns of (Ala)₃-(Ala)₈ with β-sheet structures.

(Ala)₇ の ¹³C メチルピークについての詳細な解析

そこで、(Ala)₇ について詳細に固体 NMR 解析を進めた。中央部の 4 残基のみを選択的に ¹³C ラベルした A₃[3-¹³C]A⁴A₃ を合成し、そのメチルピークの線形をノンラベル試料 (Ala)₇ と比較した (Fig.2)。高磁場側の 17.5ppm 付近のブロードなピーク (↓印, Fig.2) は、中央部をラベルした

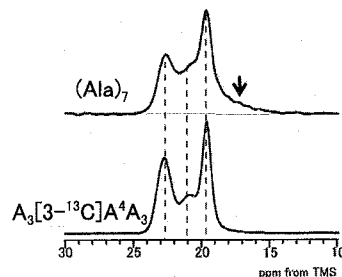


Fig.2 Expanded Ala CB region of ¹³C CP/MAS NMR spectra of non-labeled Ala₇ and A₃[3-¹³C]A⁴A₃.

試料では消失することから、ペプチド鎖末端のピーク (random coil) に帰属される。従って、 ^{13}C ラベル試料で観測された 3 つのピーク (破線部) は、(Ala) $_7$ の中央部に帰属される。次に、この 3 つのピークは、 β -sheet 構造の範囲で内部回転角の違いを反映しているのか、または、分子間配置の違いを反映しているのかを区別する必要がある。

そこで、先ず、当研究室で作成した AlaC8 の化学シフト等高線マップ³⁾ を用い、 β -sheet 構造の範囲内での内部回転角の変化に伴う化学シフトの変化を検討した (Fig.3)。その結果、 β -sheet 構造の範囲内では、内部回転角が異なっても、化学シフトの違いはわずかであり、3 つのピークの出現は、主に分子間配置の違いを反映することが明らかとなった。

次に、 $\text{A}_3[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{A}^4\text{A}_3$ の ^{13}C ラベル部位の $^{13}\text{CT}_1$ の測定を行い、各ピークについて、その部分緩和スペクトルを詳細に検討した (Fig.4)。低磁場ピーク (A) の $\ln(M_0 - M_z)$ vs τ_z のプロットは、直線となるので 1 成分であった。一方、高磁場側の 2 個のピーク (B, C) は、直線からずれて、2 成分から成ることが明らかとなった。Tab.1 に、各ピークの $^{13}\text{CT}_1$ 値とその割合をまとめた。

(Ala) $_7$ のメチル基の $^{13}\text{CT}_1$ の温度変化の実験から、高温では $^{13}\text{CT}_1$ 値は長くなることから、本実験の状況下では、 $^{13}\text{CT}_1$ 値が長いほど運動性が高いと考えられる。Fig.1 の逆平行 β -sheet 構造の (Ala) $_3$ -(Ala) $_6$ までの $^{13}\text{CT}_1$ 値は 90-160ms の範囲であった。一方、(Ala) $_7$ の 3 個の主ピークの $^{13}\text{CT}_1$ 値は 7-10 倍程度長くなっており (Tab.1)、(Ala) $_7$ 以上の鎖長で急激に運動性が上昇したことが分かる。すなわち、分子間の構造が急激に変化し、緻密な逆平行型 β -sheet 構造の分子間配置から、メチル基が回転しやすい平行型 β -sheet 構造の分子間配置に、その構造が変化したこと起因すると考えられる。実際、100%平行型と 100%逆平行型 β -sheet 構造をとる (Ala) $_3$ および (Ala) $_4$ では、平行型のメチル基の T_1 は、逆平行型と比較して 3 倍以上長いことを報告している。²⁾ Tab.1 の B のピーク中には、9%の 170ms の成分があり、これが (Ala) $_3$ -(Ala) $_6$ までの逆平行 β -sheet 構造の成分に相当すると考えら

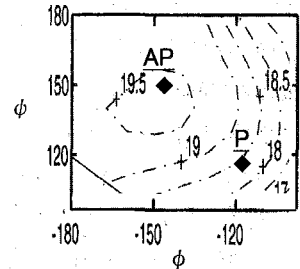


Fig.3 ^{13}C Ala C8 chemical shift contour plot as a function of torsion angles in β -sheet region.

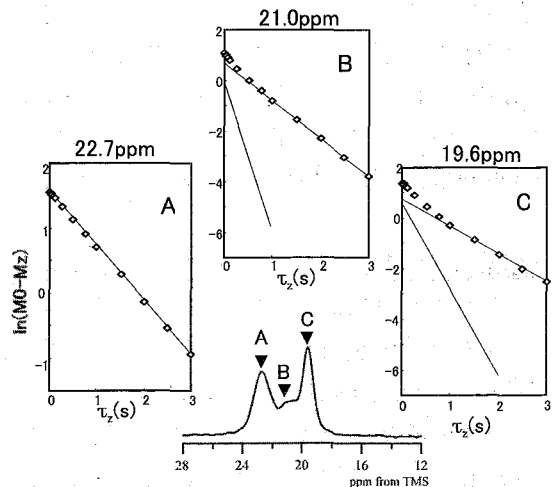


Fig.4 $\ln(M_0 - M_z)$ vs τ_z plots of three Ala ^{13}C 8 peak of $\text{A}_3[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{A}^4\text{A}_3$

Tab.1 $^{13}\text{CT}_1$ and fraction of three Ala ^{13}C 8 peak of $\text{A}_3[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{A}^4\text{A}_3$

peak	$^{13}\text{CT}_1$ (fraction)
A	1160ms(40%)
B	170ms(9%), 670ms(16%)
C	290ms(17%), 910ms(18%)

れる。実際、Bの化学シフトは、 $(Ala)_6$ と一致する。

興味深いことは、 $(Ala)_8$ 、 $(Ala)_{12}$ ならびに $(Ala)_{12}$ を含むエリ蚕絹フィブロインならびに34残基のモデルペプチドのメチル基は、大きく3本に分裂し、基本的に $(Ala)_7$ のメチル基の線形と同じである点、さらに、その緩和挙動も同じである点である。このことは、ポリアラニンの分子鎖が7残基以上で急激に動きやすくなっただけでなく、特有の分子間構造が新たに発現し、それが主構造となったことを意味する。この平行型 β -sheet構造を基本とした、 $(Ala)_7$ 以上で発現する特有の分子間構造を有するモデルの詳細については、現在、検討中である。

ポリアラニンに特有な分子間配置の発現に関する分子動力学 (MD) による検討

水溶液中で、ランダムに平行または逆平行をとらせて配置した伸びた状態のポリアラニン鎖が水分子の減少に伴い、その分子間配置を自由に変えながら、最終的に乾燥状態で凝集した β -sheet構造を形成するシミュレーションを行った。すなわち、100本の $(Ala)_{12}$ をa軸方向に並べ、その周囲に5000の水分子を配置し、溶解状態とした(Fig.5-A)。この初期構造から水分子を14段階(各50Psec)にわたって、徐々に減らすとともに、b、c軸方向の分子間配置は、自由に変えることができるようにして、MDシミュレーションを開始した。

水分子が除かれた最終的な凝集状態(Fig.5-B)では、ポリアラニン鎖で形成される β -sheet構造は、平行型と逆平行型が独立の領域を形成するのではなく、同一シート内に両 β -sheet構造が混在した分子間配置が多く出現するという結果(一例としてB図中の網かけ部分)となった。この結果は、固体NMRの結果に対応する。

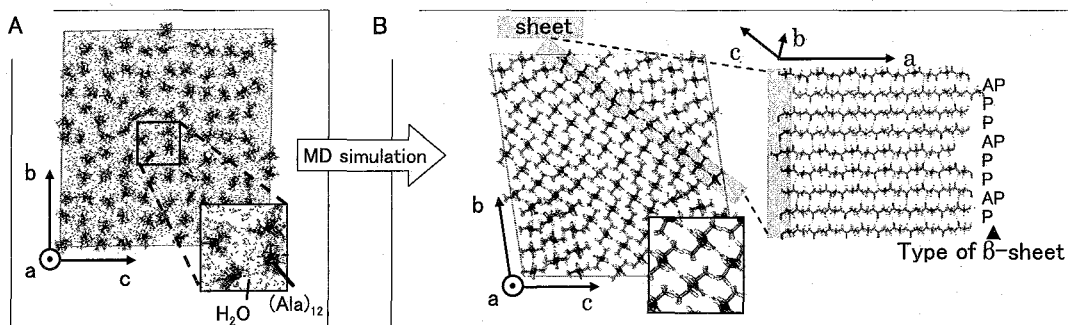


Fig.5 MD simulation concerning aggregation of polyalanine chains. The special structures with parallel and anti-parallel β -sheet chains were generated after removal of water molecules.

参考文献

- 1) A. T. Petkova, G. Buntkowsky, F. Dyda, R. D. Leapman, W. -M. Yau, R. Tycko, *J. Mol. Biol.* 2004, 335, 247.
- 2) T. Asakura, M. Okonogi, Y. Nakazawa, K. Yamauchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 6231.
- 3) T. Asakura, M. Iwadate, M. Demura, M. P. Williamson, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1994, 24, 167.

YP10 固体 NMR を用いた ^{13}C 標識レチナールのタンパク質中での
光照射および圧力印加による異性化メカニズムの解析

(1 横浜国立大、2 神戸薬科大、3 兵庫県立大)

○田島 可奈¹、川村 出¹、和田 昭盛²、西川 大英¹、辻 暁³、内藤 晶¹

**Analysis of the isomerization mechanism of ^{13}C labeled retinal in membrane protein
under photo illumination and pressure conditions by Solid-State NMR**

○ Kana Tajima¹, Izuru Kawamura¹, Akimori Wada², Hirohide Nishikawa¹,
Satoru Tuzi³, Akira Naito¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University,

²Kobe Pharmaceutical University, ³Department of Life Science, University of Hyogo

Bacteriorhodopsin (BR) is a light-driven H^+ pump protein in purple membrane consisting of 7 transmembrane helices and retinal molecule as a chromophore. The populations of retinal with all-*trans* or 13-*cis*, 15-*syn* states can be controlled either by light illumination or pressurization. To analyze the change of dynamic structure of BR corresponding to the retinal isomerization, NMR spectra of [15, 20- ^{13}C]Retinal and [ζ - ^{15}N]Lys-labeled BR were examined by solid-state NMR under *in-situ* photo-illumination MAS and fast MAS conditions. The ^{13}C NMR signals of all-*trans* and 13-*cis* retinal were largely broadening at the MAS frequency of 10 kHz and the ^{15}N NMR signal of 13-*cis* state of [ζ - ^{15}N]Lys-labeled BR was increased by the pressure of about 60 bar induced by fast MAS condition. It turned out that the increase of the ratio of all-*trans* to 13-*cis* retinal and the change of dynamics around retinal was caused by the pressure of about 60 bar.

【序論】

バクテリオロドプシン(BR)は H^+ 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。また圧力を加えると All-*trans*型から 13-*cis*, 15-*syn*型に平衡が移動し、13-*cis*, 15-*syn*型レチナールの割合が増加する(Figure 1)。このときにタンパク質の体積減少を伴っていること(1)から、All-*trans*型と 13-*cis*, 15-*syn*型のレチナールを含むタンパク質の構造が異なっていることが考えられているが、その詳細はわかっていない。本研究では、まず固体 NMR 分光器に設置可能な光照射システムの開発と、高速 MAS を用いた圧力印加システムの構築を行った。このシステムを用いて、BRのレチナールの異性化メカニズムについて解析を行った。

キーワード：レチナール異性化、固体 NMR、光照射、高速 MAS

たじま かな、かわむら いずる、わだ あきもり、にしかわ ひろひで、つじ さとる、ないとう あきら

【実験】

BR から天然存在比のレチナールをブリーチしたバクテリオオプシン(BO)に対して、15, 20 位の炭素を ^{13}C 標識したレチナールを再構成した[15, 20- ^{13}C] Retinal-BR を十分に水和させた状態の試料を用いた。NMR 測定には Chemagnetics CMX Infinity-400 FT-NMR 分光器とジルコニア試料管を使用し、RAMP CP-MAS 測定時の MAS 回転速度を 4, 6, 8, 10 kHz と変化させて圧力を印加し、レチナールの信号の変化を測定した。ここで、高速回転時に生じる温度上昇については、硝酸鉛 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を用いて温度校正実験を行った(2)。また、BR の明順応状態の測定には NMR に外部から導入した光ファイバーとジルコニア NMR 試料管に光ファイバーキャップを装着させて、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開発した。

【結果と考察】

硝酸鉛 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を用いた MAS の温度校正と圧力の見積もり

高速 MAS における試料に対する温度と圧力の効果をわけるために、硝酸鉛 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を用いた MAS 回転速度の温度校正を行った。MAS 10 kHz では表示温度 20°C に対して、試料温度は 32°C まで上昇していることがわかった。また 12 kHz では 40°C に上昇している(Figure 2)。MAS 回転数を上昇させると、遠心力が試料管内の流体に働き静水圧を生じる。半径 r の円筒試料管の側面に印加される圧力 P は $P = \frac{3}{4}\pi^2 v^2 r^2 \varepsilon$

と表される。ここで v は試料管の回転数、 ε は流体の密度を表している。この関係を用いて MAS 12 kHz では最大 63 bar 程度の圧力が試料にかかっていることを計算から見積もった。

[15,20- ^{13}C]Retinal 標識 BR の信号とダイナミクス

^{13}C 標識試料と天然存在比の試料について CP-MAS 測定を行い、その差スペクトルから All-trans と 13-cis, 15-syn 型の信号をそれぞれ 13.1 ppm と 22.1 ppm に帰属した。さらにレチナール 20 番目のメチル炭素の T_1 測定を行ったところ、10.9 s (All-trans) と 19.2 s (13-cis, 15-syn) と観測され、13-cis, 15-syn 型は All-trans 型に比べてフレキシブルな状態であることがわかった。このことからタンパク質とレチナールとの相互作用が異なっていることが示唆される。

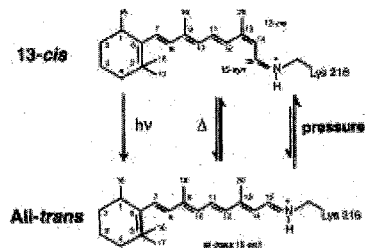


Figure 1. Isomerization pathways between 13-cis, 15-syn and all-trans retinal configurations in BR.

Dark-adapted state; All-trans : 13-cis, 15-syn = 1 : 1

Light-adapted state; All-trans

Pressure adapted state; 13-cis, 15-syn

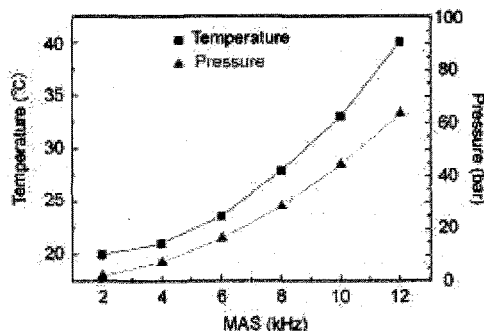


Figure 2. Temperature (■) and pressure (▲) variation for sample versus MAS frequencies.

高速 MAS 下で[15,20-¹³C]Retinal-BR の ¹³C NMR スペクトルを測定した。この結果、MAS 6 kHz まではレチナールの 15 番目の炭素の信号強度は高かったが、MAS 10 kHz では大きくブロードニングした。また 20 番目のメチル炭素も信号強度が減少した (Figure 3)。高速回転後の MAS 4 kHz でのレチナール信号強度は、もとの 4 kHz の信号よりも減少した。一方、回転数を 4 kHz に固定して温度を上昇させた実験においては、MAS 10 kHz に対応すると考えられる温度においても信号の広幅化は見られなかった。これらの結果はレチナール信号の広幅化は温度ではなく圧力印加によることがわかった。さらに、メチルの信号からは圧力効果による[13-*cis*]/[all-*trans*]の増加ははっきりとは見られなかった。

[γ -¹⁵N]Lys-標識 BR の高速 MAS 測定

MAS は磁場に対して 54.7°傾けた軸の周りで試料管を高速回転させ、化学シフト異性を消去する固体 NMR の測定手法であるが、高速回転することで試料に圧力がかかることに注目した。[γ -¹⁵N]Lys-BR の CP-MAS NMR スペクトルについてレチナールの異性化に与える圧力効果を観測した。MAS 4 kHz では All-*trans* (148.0 ppm) と 13-*cis* (155.0 ppm) が 1:1 で観測され、MAS 12 kHz の測定では試料に約 60 bar の圧力がかかり (Figure 2)、レチナールの信号が広幅化した。さらに 4 kHz で再度測定したところ、13-*cis* の信号が All-*trans* よりも増加し、明らかに 12 kHz に対する履歴現象を起こしていることがわかった(3)(Figure 4 (A))。MAS 4 kHz の測定で温度のみを変化させた場合は、レチナールの信号の割合は変化しない。この結果は MAS 12 kHz の圧力により、All-*trans* が 13-*cis* に異性化を起こしたことを示している (Figure 4 (B))。

[15,20-¹³C]Retinal 標識 BR の光照射 NMR 測定

光照射下での MAS NMR 測定を行うため、NMR に外部から導入した光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方法を試みた。[γ -¹⁵N]Lys-BR において、光照射によって 13-*cis* から all-*trans* に信号が移動した (Figure 4(B))。しかし、濃度の高い試料では光が試料表面にしか当たらず、試料全体では光異性化しなかった。また濃度の低い試料では、十分な信号強度が得られなかった。現在、MAS 回転条件下で光を試料に照射し、試料全体を異性化させた状態で NMR 測定を行う方法を検討中である。

【まとめ】

今回の実験から高速 MAS による圧力効果は、特にレチナールとその近傍アミノ酸残基に影響があることがわかった。レチナールタンパク質などの構造変化を観測するために、高速 MAS や光照射システムによりレチナールの配座を制御する実験は重要であると考えられるため、より詳細に条件検討を行っていく必要がある。

【参考文献】

- (1) M. Tsuda & T. Ebrey (1980) *Biophys. J.* **30** 149-158., K. Bryl & K. Yoshihara (2002) *Eur. Biophys. J.* **31** 539-548.
- (2) A. Bielecki & D. P. Burum (1995) *J. Magn. Reson. Ser. A* **116** 215-220.
- (3) I. Kawamura et al. (2007) *Photochem. Photobiol.* **83** 346-350.

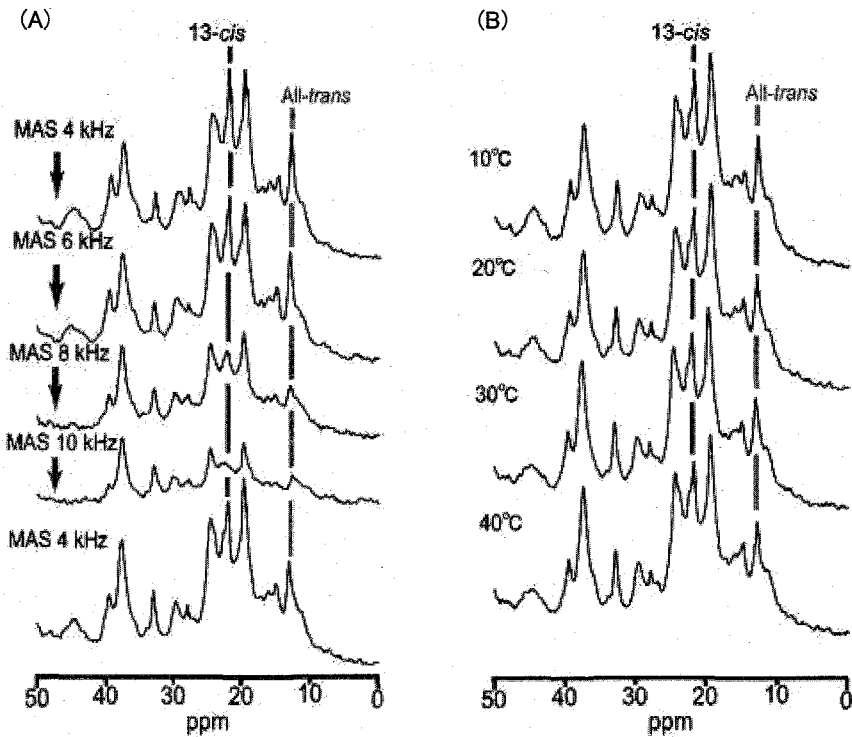


Figure 3.

(A) ^{13}C CP-MAS NMR spectra of $[15, 20\text{-}^{13}\text{C}]$ Retinal-BR at various MAS frequencies up to 10 kHz. After fast spinning sample, ^{13}C CP-MAS NMR was observed at 4 kHz.
 (B) ^{13}C CP-MAS NMR spectra of $[15, 20\text{-}^{13}\text{C}]$ Retinal-BR at various temperatures and MAS 4 kHz.

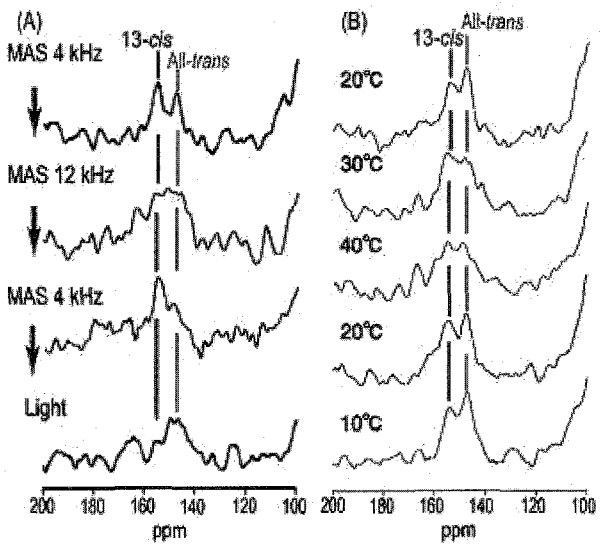


Figure 4.

(A) ^{15}N CP-MAS NMR spectra of $[\zeta\text{-}^{15}\text{N}]$ Lys of Schiff base in bR at MAS frequencies of 4 and 12 kHz, respectively. After spinning sample at 12 kHz, CP-MAS spectrum was observed at 4 kHz.
 (B) ^{15}N CP-MAS NMR spectra of $[\zeta\text{-}^{15}\text{N}]$ Lys of Schiff base in bR at various temperatures and MAS 4 kHz.

YP11 固体 NMR 法によるイオン液体の新しい基幹物質、デカメチルフェロセン・アセナフテンキノン錯体の研究

(電通大院 量子・物質工学専攻¹・神戸大学理学部²)

○中村英章¹・桑原大介¹・持田智行²

Hideaki Nakamura¹, Daisuke Kuwahara¹, and Tomoyuki Mochida²

(The University of Electro-Communications¹, Department of science, Kobe University²)

Research of decamethyl-ferrocene acenaphthenequinone: phase transition of a new component of ionic liquid studied by solid state NMR

Abstract

Decamethyl-ferrocene acenaphthenequinone complex (DA) is a new substance, which was recently synthesized by Mochida et. al., in Kobe University. This complex has electronic function based on organometallic characteristic and a distinctive molecular structure. Therefore, this complex and its derivatives should serve as functional materials in the field of electrochemistry. 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°C. However, little is known about the origin of the phase transition and the molecular behavior around the phase transition. We revealed structural change of DA around the phase transition by high-resolution solid state ¹H NMR. We will present the detailed experimental and analytical results in the conference.

1.緒言

近年、イオン液体の開発と機能性に関する研究が盛んである。イオン液体は、多様な物性・機能性を示すことで注目されており、イオン伝導性を生かした電子材料などへの応用が期待されている。本研究で扱ったデカメチルフェロセン・アセナフテンキノン錯体 (DA錯体) はフェロセンの特徴を生かした電子機能と特徴的な分子骨格を持つ新規物質である。この錯体の物性や構造を明らかに出来れば、フェロセン誘導体の

融点を下げることに繋がる。その結果、磁性体であるフェロセンを用いた電気化学特性に優れる「フェロセン系イオン液体」の実現が期待できる。そのためにDA錯体の数々の物性研究がなされてきたが、低温での相転移の原因はこれまで明らかにされていなかった。我々は特に固体高分解能¹H NMRの手法を用いてDA錯体の相転移前後の構造変化を解明することに成功した。本講演ではその詳細について報告する。

キーワード：イオン液体、固体高分解能¹H NMR、相転移、¹Hスピン拡散、分子間距離

なかむらひであき、くわはらだいすけ、もちだともゆき

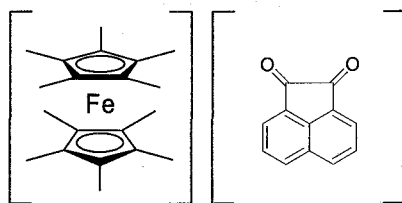


Figure 1. Structure of decamethyl-ferrocene acenaphthenequinone.

2. 実験

最初に、CP/MAS、SP/MAS、dipolar dephasing法を用いた ^{13}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}C CP/MAS測定を行った。最後に、DA錯体の固体高分解能 ^1H スピン拡散の実験を行い、低温 ($20^\circ\text{C}\sim-100^\circ\text{C}$) でのスピン拡散速度の変化を求めた。測定は、7.05Tの超伝導磁石で行った。

3. 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}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°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とアセナフテンキノン分子間に有効な相互作用が働いていることが原因と考えられる。

Figure 3 は、 ^1H スピン拡散の実験から求めた各温度におけるスピン拡散速度の変化である。この結果とスピン拡散次元格子モデルの式、

$$\frac{dM_a(t)}{dt} = 2\Omega[-M_a(t) + M_d(t)] \quad , \quad \Omega = a \frac{1}{r^6} \quad (1)$$

を用いて、各温度におけるデカメチルフェロセン分子とアセナフテンキノン分子間の距離の変化を求めた (Table 1)。ここで拡散速度 Ω は分子間距離、 r^6 に反比例する。我々はDA錯体のような固体状態の擬似 ^1H - ^1H 2スピン系においても、核オーバーハウザー効果と同様に Ω が r^6 に反比例することを見出した。この関係を用いて、相転移時にデカメチルフェロセン分子とアセナフテンキノン分子間の距離が 0.37\AA 縮まっていることが分かった。

以上の結果から DA 錯体の相転移前後における結晶構造をモデル化したものを、Figure 4 に示した。これより DA 錯体は相転移時にアセナフテンキノン分子が傾くことが原因で2つの分子間距離が縮んでいると考えられる。会場では分子動力学計算で求めたアセナフテンキノン分子の傾きの角度及びその変化についても合わせて報告する。

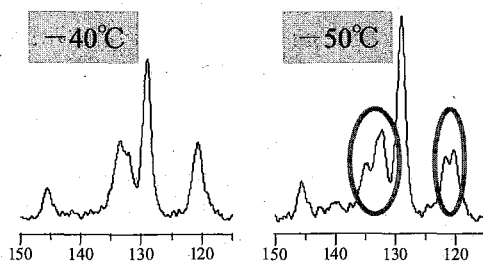


Figure 2. The variation in the spectra of DA with indicated temperature.

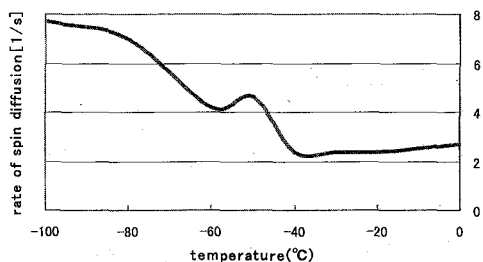


Figure 3. Variation in ^1H spin diffusion rates of DA complex with temperature.

Table 1. Variation in intermolecular distances between decamethyl-ferrocene and acenaphtenequinone with temperature.

temperature (°C)	0	-40	-50	-60	-100
distance (Å)	3.49	3.48	3.12	3.19	3.05

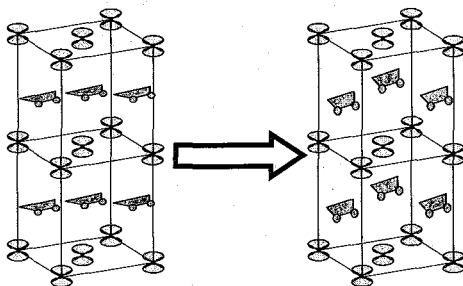


Figure 4. Variation in structure of DA around the phase transition.

構成原子数の揃った(CdSe)_n ナノ粒子の CP/MAS NMR による構造解析

○野田泰斗¹, 山同精一郎¹, 粕谷厚生², 前川英己¹
¹東北大学大学院工学研究科, ²東北大学国際高等融合領域研究所

Structure Analysis of Atomically Precise (CdSe)_n 1nm-particle by CP/MAS NMR

°Yasuto Noda¹, Seiichiro Sando¹, Atsuo Kasuya², Hideki Maekawa¹

¹Department of Metallurgy, Graduate School of Engineering, Tohoku University

²Institute for International Advanced Interdisciplinary Research, Tohoku University

Small 1 nm-particle of CdSe showing a sharp photoabsorption peak at 350 nm has been selectively synthesized as a single species in solution. Solid CP/MAS NMR spectra of ¹¹³Cd and ⁷⁷Se exhibited a single narrow peak with much larger chemical shift anisotropy and finite asymmetry compared with the essentially isotropic bulk CdSe. The result is interpreted that this extremely small nanoparticle has most of atoms on the surface deforming from the bulk fragment of sp³ configuration into an assembly consisting of all apex of equivalent symmetry on the surface to be particularly stable and grown preferentially.

【背景と目的】

ナノ粒子はバルク結晶とは大きく異なる原子配置をとり、特に表面原子の配置は発光や光触媒反応といった物理的・化学的な物質機能に重要な役割を果たす。ナノ粒子に特有の物質機能の研究は、測定に耐える十分な量の原子レベルで整った構造のナノ粒子を作製し構造と機能の関係を理解することが必要である。化合物半導体ナノ粒子、中でも CdSe のナノ粒子は、量子閉じ込め効果により粒径だけで発光波長を可視光全領域に渡って制御できる。2nm より大きな粒子の構造はウルツ鉱型バルク結晶に近いことが透過型電子顕微鏡などにより観測されている。1nm 台の粒子は作製と評価が困難になりその詳細は明らかにされていない。これまでに我々は Fig. 1 に示すような鋭い吸収ピークを波長 415nm に現す大きさ 1.5nm の (CdSe)₃₄ ナノ粒子が選択的に溶液中に生成することを報告してきた[1]。本研究では界面活性剤を (CdSe)₃₄ トルエン溶液に添加することで Fig.1 に示すように波長 350nm に吸収スペクトルを現す原子数と化学量論比が定まった大きさ 1nm の (CdSe)_n ナノ粒子を選択的に作製し、表面に存在する界面活性剤の ¹H による CP/MAS NMR を用いてその構造を明らかにすることを目的とした。

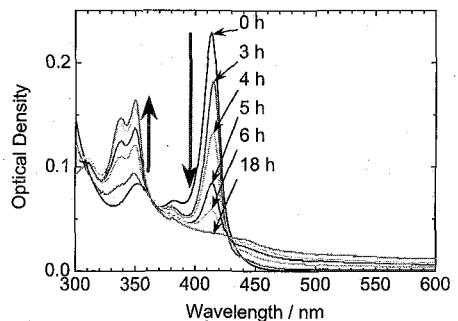


Fig.1 Time-resolved photoabsorption spectra of (CdSe)_n nanoparticles growing after addition of a surfactant to (CdSe)₃₄ toluene solution.

キーワード: 半導体ナノ粒子, 固体 NMR, CP/MAS, 構造解析, 表面

著者ふりがな: のだ やすと, さんどう せいいちろう, かすや あつお, まえかわ ひでき

【実験方法】

溶液法により作製した(CdSe)_nトルエン溶液にメタノールを添加して(CdSe)_n ナノ粒子を沈殿させ、遠心分離で不純物から分離して回収したのち自然乾燥させて黄緑色の(CdSe)_n 粉末固体を得た。この粉末試料を4mmローターに詰め¹¹³Cdと⁷⁷Se CP/MASをMASの回転数と接触時間を変えて測定した。分光器はBruker DRX 400を用いた。

【結果と考察】

Fig. 2にMASの回転数を変えて測定した(CdSe)_n ナノ粒子の¹¹³Cd(左)と⁷⁷Se(右)のCP/MASスペクトルを示す(灰色はバルクCdSeのシングルパルス)。矢印で示した(CdSe)_n ナノ粒子の等方化学シフト(δ_{iso})の信号は¹¹³Cdと⁷⁷Seの両方とも鋭い1本のピークのみである。ピーク位置と半値幅の値はそれぞれ¹¹³Cdでは576 ppmと6.6 ppm,⁷⁷Seでは-671 ppmと12.5 ppmである。また化学シフトテンソルの主値(δ_{11} , δ_{22} , δ_{33})を¹¹³Cdと⁷⁷Seのそれぞれのスペクトルのスピニングサイドバンドを解析することで決定し、化学シフト異方性の大きさ($\Delta\delta = \delta_{33} - (\delta_{11} + \delta_{22})/2$)と非対称性因子($\eta = (\delta_{22} - \delta_{11})/(\delta_{33} - \delta_{iso})$)をCdSeナノ粒子で初めて求めた(Table 1)。さらに交差分極の接触時間 τ を変えて信号強度 $M(\tau)$ を測定し、 $M(\tau) = M_0 (\exp(-\tau/T_{1\rho}) - \exp(-\tau/T_{IS})) / (1 - T_{IS}/T_{1\rho})$ でフィッティングし交差緩和時間 T_{IS} を求めたところ、¹¹³Cdでは3.10 ms,⁷⁷Seでは2.22 msを得た。

これまでに報告された大きさ2nm以上のCdSeナノ粒子の⁷⁷Se NMRでは、ファセットと稜、頂点のサイトで化学シフトの値はそれぞれ-635 ppm, -592 ppm, -550 ppmである[2]。一方で[(SeCd₈(SePh)₁₆)]²⁻錯体の¹¹³Cd溶液NMRでは、内側のサイトの信号は509 ppm, 外側のサイトは549 ppmに現われる[3]。 $\Delta\delta$ はバルクの値に対し数倍以上大きく、バルクのsp³結合とは異なる構造で安定化していることを示唆している。またc軸を持つバルク構造ではCdとSeは結晶学的に同じサイトに属するため両方とも η が0になるのに対し、(CdSe)_nナノ粒子ではCdは1に近いがSeは大きく異なる値になり、CdとSeが違うサイトに属していると考えられる。また T_{IS} は⁷⁷Seの方が短いことからSeがより表面に出ている可能性を示唆している。以上のことから、大きさ1nmの(CdSe)_nナノ粒子の表面は全て等価な頂点からなる構造に変化することで安定化していると結論付けた。

Table 1. ¹¹³Cd and ⁷⁷Se peak profiles of CdSe nanoparticles (NPs) and bulk CdSe.

	δ_{iso} (ppm)	δ_{11} (ppm)	δ_{22} (ppm)	δ_{33} (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	η
¹¹³ Cd _{NPs}	576	464	475	789	320	0.05
⁷⁷ Se _{NPs}	-671	-588	-669	-756	-128	0.95
¹¹³ Cd _{Bulk}	554	534.3	534.3	593.3	59	0
⁷⁷ Se _{Bulk}	-473	-502.3	-458.3	-458.3	-44	0

【参考文献】

- [1] A. Kasuya, Y. Noda, I. Dmitruk, V. Romanyuk, Y. Barnakov, K. Tohji, V. Kumar, R. Belosludov, Y. Kawazoe, and N. Ohuchi, Eur. Phys. J. D **34**, 39 (2005).
- [2] M. G. Berrettini, G. Braun, J. G. Hu, and G. F. Strouse, J. Am. Chem. Soc. **126**, 7063 (2004).
- [3] P. A. W. Dean, J. J. Vittal and N. C. Payne, Inorg. Chem. **26**, 1683 (1987).

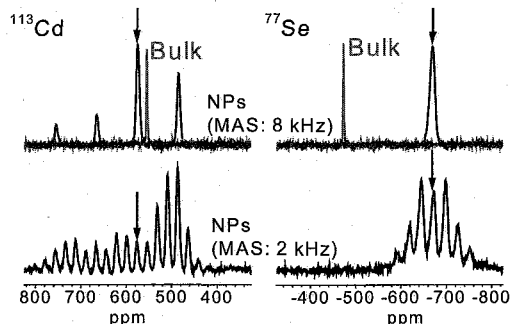


Fig.2 ¹¹³Cd (left) and ⁷⁷Se (right) CP/MAS spectra of (CdSe)_n nanoparticles (NPs) and single pulse NMR spectra of bulk CdSe. Arrows denote the isotropic shift.

四極子核に対する高分解能固体 NMR の高感度化 —STMAS 用新規プローブ開発と微量元素の化学構造解析の実現—

(¹新日鐵 (株)・先端研、²日本電子 (株)、³新日鐵 (株)・EPC)

○高橋 貴文¹、金橋 康二¹、下池田 勇一²、根本 貴宏²、齋藤 公児³

Increasing sensitivity of high-resolution solid state NMR for quadrupolar nuclei

-Development of a novel STMAS probe and achievement of chemical structure analysis of trace elements-

(¹Advanced Technology Research Lab., Nippon Steel Corporation, ²JEOL Ltd., ³EPC, Nippon Steel Corporation)
Takafumi Takahashi¹, Koji Kanehashi¹, Yuichi Shimoikeda², Takahiro Nemoto², Koji Saito³

Structural analysis of trace elements with half-integer quadrupolar spins has been achieved by STMAS (Satellite-transition magic-angle-spinning). First, we have developed a novel narrow-bore probe for STMAS that is capable of the precise magic-angle setting ($< 0.002^\circ$) and the long-term stable spinning. To evaluate usability of STMAS, practical comparison between STMAS and MQMAS in sensitivity and resolution has been examined. Strong r. f. field is desirable to obtain higher sensitivity in both STMAS and MQMAS. The degree of sensitivity enhancement in STMAS depends on crystallinity of the samples. Resolution of STMAS spectra is affected by the magnitude of quadrupolar interaction. Consequently, we have demonstrated effectiveness of STMAS to structural analysis of the trace element, boron in coal fly ash, by first observation of high-resolution ^{11}B NMR spectra which have not been obtained by MQMAS.

【緒言】

半整数スピンの四極子核に対する高分解能固体 NMR は、MQMAS の開発によって飛躍的に進歩した。しかしながら、多量子遷移を利用する MQMAS は感度に乏しいため、測定の長期化が避けられず、現在までのところ、その適用範囲も一部の核種に限られている。一方、エネルギーおよび環境の分野においては、近年の土壌・水質汚染物質に対する規制強化等を背景として、環境負荷物質となる四極子核を中心とした微量元素の化学存在状態が注目され始めており、より高感度に 2 次の核四極子相互作用を平均化できる手法が求められている。従来、パルスシーケンスの操作による MQMAS 高感度化への試みは、多くのグループによってなされているが、パルス調整が煩雑であるのと同時に、最大 1.5~2 倍程度の感度向上効果しか得られず、一般的な手法とは成り得ていない。そこで、我々は、多量子遷移の利用自体を抜本的に見直し、単量子のサテライト遷移を利用する Satellite transition MAS (STMAS) [1]に着目した。STMAS は飛躍的な感度向上効果が期待できるものの、厳密なマジック角の調整とその長期保持、さらに安定した回転周波数が必要とされるため、プローブに対する制約が MQMAS より格段に大きい。また、これまでの理論的研究[2]によって、STMAS による感度向上効果は MQMAS の 3~5 倍とされているが、その実験的検証は未だに不足しており、実用材料系へ STMAS を展開した例もほとんどない。そこで、今回、新たにナローボア型 STMAS 用プローブを開発するとともに、実用無機材料を用いて STMAS と MQMAS の感度および分解能を比較し、STMAS の有効性を定量的に明らかにした。さらに、実用材料中の微量元素として、石炭灰中の微量ボロン(B)に着目し、 ^{11}B 高分解能 NMR スペクトルの取得を試みた。その結果、 ^{11}B MQMAS では感度不足のため達成しえなかったが、 ^{11}B STMAS により、初めて良好なスペクトルが観測され、石炭灰中 B の詳細な化学構造を特定することに成功したので報告する。

Key words: STMAS、四極子核、微量元素、高感度化

著者: たかはし たかふみ、かねはし こうじ、しもいけだ ゆういち、ねもと たかひろ、
さいとう こうじ

【実験】

NMR スペクトル測定は、JEOL ECA-700(16.4T)、自作の 3.2mm 用 STMAS プローブを用いて行った。測定中の回転周波数は、MAS コントローラーによって 20 ± 0.003 kHz に制御した。STMAS スペクトル測定では、試料管の底部に少量の硫酸ナトリウム(Na_2SO_4)、中心部に測定用試料をつめることで、 ^{23}Na STMAS スペクトルにより正確にマジック角 ($54.736 \pm 0.002^\circ$) を調整した後、角度のずれの原因となるプローブの脱着作業を挿まずに、実サンプル測定に移行できるようにした。

① 実用無機材料を用いた STMAS と MQMAS の感度および分解能比較

四極子相互作用の大きさおよび結晶性の異なる実用無機材料として、カオリン ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$)、ガラス ($43.1\text{CaO}-12.5\text{Al}_2\text{O}_3-44.4\text{SiO}_2$) を準備し、これらを用いて ^{27}Al ($I=5/2$) STMAS と MQMAS の感度および分解能を比較した。STMAS プローブの ^{27}Al に対する最大 r.f.強度は、 AlCl_3 水溶液に対して 96 kHz である。STMAS では、パルスシーケンスとして double-quantum filter(DQF)、double quantum (DQ)、DQF-soft pulse added mixing(DQF-SPAM)を用い、MQMAS では、3Q-z-filter(3Qz)、5Q-z-filter(5Qz) および 3Q-SPAM を用いた(Fig. 1)。

② 石炭灰の ^{11}B MAS、STMAS および 3QMAS スペクトル測定

B 濃度がおおよそ 500 ppm である 2 種類の石炭灰試料を入手し、それぞれ α 灰、 β 灰とラベルした。 ^{11}B MAS スペクトル測定は、 18° パルス ($0.63 \mu\text{s}$) にて行い、 ^{11}B STMAS および 3QMAS スペクトル測定には、DQF-SPAM(Fig. 1c)、3Q-SPAM(Fig. 1f) シーケンスをそれぞれ用いた。パルス条件は、DQF-SPAM シーケンスに対し $\text{HP1}=1.4 \mu\text{s}$, $\text{HP2}=1.2 \mu\text{s}$, $\text{SP1}=20 \mu\text{s}$, $\text{SP2}=10 \mu\text{s}$ とし、3Q-SPAM シーケンスに対し $\text{HP1}=3.8 \mu\text{s}$, $\text{HP2}=1 \mu\text{s}$, $\text{SP1}=10 \mu\text{s}$ とした。また、r.f.強度は、 H_3BO_3 水溶液に対して、ハードパルス(HP)を 147 kHz, ソフトパルス(SP)を 10.3 kHz とした。

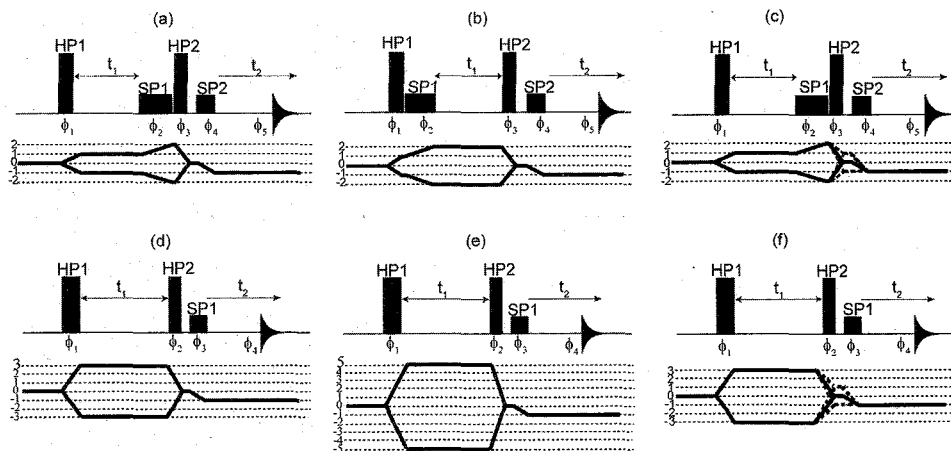


Fig. 1. Pulse sequences used for the STMAS (a)-(c) and MQMAS (d)-(f). (a)DQF, (b)DQ, (c)DQF-SPAM, (d)3Qz, (e)5Qz, and (f)3Q-SPAM. Phase cycles, ϕ , are described in a literature [3].

【結果および考察】

1. STMAS と MQMAS の感度および分解能比較

カオリンおよびガラスの代表的な ^{27}Al STMAS および 3QMAS スペクトルを Fig. 2 に示す。カオリンの 6 配位構造 (^{6}Al) とガラスの 4 配位構造 (^{4}Al) について、STMAS および MQMAS スペクトルより等方化学シフト(δ_{iso})および四極子結合定数(C_Q)をそれぞれ評価した。その結果、MQMAS と STMAS とで良く一致した値が得られ、これらの平均値としてカオリンの ^{6}Al は、 $\delta_{\text{iso}}=8.9 \pm 0.3$ ppm, $C_Q=3.5 \pm 0.4$ MHz、ガラスの ^{4}Al は、 $\delta_{\text{iso}}=71.5 \pm 0.5$ ppm, $C_Q=6.8 \pm 0.6$ MHz と見積もられた。

次に、感度の比較を行うため、F2 軸への投影スペクトルより S/N 比を算出した。各パルスシーケンスで得られる S/N の r.f.強度依存性を Fig. 2 に示す。STMAS および MQMAS において良い S/N を得るには、できる限り強い r.f.磁場が必要であることが分かる。ただし、r.f.強度の増加に伴う S/N の増大効果も、90 kHz 以上になると弱まってくる。また、ガラスに対して STMAS が示す感度向上効果は、カオリンに対するものより小さい。例えば、最大 r.f.強度において、カオリンでは、3Qz に比べ最大 4.5 倍の感度向上効果が得られるのに対し、ガラスでは、最大 3 倍の効果しか得られない。こうした感度向上効果の違いは、四極子相互作用の大きさの違いより、むしろ試料の結晶性に起因すると考えられる。すなわち、ガラスのようなアモルファス試料では、サイドバンド形式のサテライト (ST) シグナルが、より結晶性の高いカオリンに比べ出現しにくいと、観測される ST シグナルの強度が減少し、STMAS で得られる感度向上効果に減衰が生じると推定される。

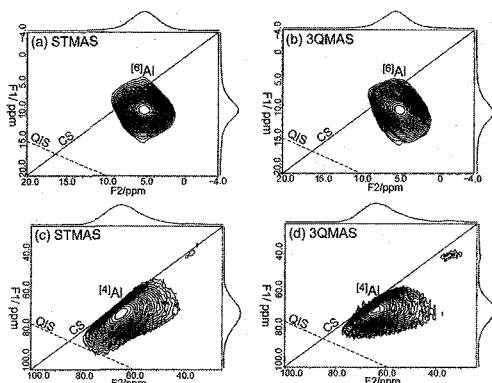


Fig. 2 Typical ^{27}Al STMAS and 3QMAS spectra for a kaolin and a glass. STMAS spectra for the kaolin (a) and the glass (c) were obtained using DQF-pulse sequence, while 3QMAS spectra for the kaolin (b) and the glass (d) were obtained using 3Qz one.

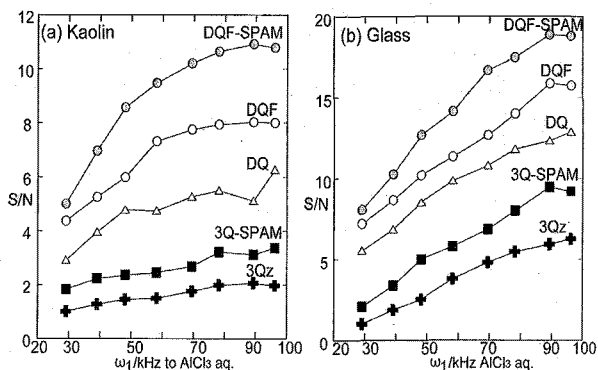


Fig. 3. Dependence of S/N ratios on the r. f. field power for the kaolin (a) and the glass (b). Note that all S/N ratios were normalized by the lowest value obtained by the 3Qz pulse sequence.

さらに、各パルスシーケンスの分解能を評価するため、F1 軸への投影スペクトルより半値幅を算出した。半値幅の r.f.強度依存性は見出せなかったため、最大 r. f.強度で得られた値を各パルスシーケンスの半値幅とした。カオリン、ガラスそれぞれの測定で得られた半値幅と既報の homogeneous broadening factor [4]との比較を Table 1 に示す。比較を容易にするため、測定値、文献値ともに 3Qz の示す値で規格化してある。カオリンで得られる半値幅の傾向は、文献値とほぼ一致するのに対し、ガラスでは文献値と異なり、STMAS の半値幅が MQMAS より一貫して広いことが分かる。これは、ガラスの ^{41}Al サイトの核四極子相互作用が大きいことを考えると、対称遷移に対しては影響を及ぼさない高次の相互作用 (3 次の核四極子相互作用、化学シフトの異方性と 2 次の核四極子相互作用との交差項) の影響により、STMAS スペクトルが広幅化したためと考えられる。

Table 1 Comparison of resolution between STMAS and MQMAS based on estimation of full width at half maximum (FWHM) for spectra projected along the F1 axis.

	DQF-SPAM	DQF	DQ	3Q-SPAM	3Qz	5Qz
Kaolin ^{*1}	0.96	0.96	1.31	0.87	1.00	0.45
Glass ^{*2}	1.26	1.26	1.36	1.08	1.00	0.79
Ref. ^{*3}	1.00	1.00	1.77	1.00	1.00	0.24

^{*1,2}The FWHM of each pulse sequence is normalized by that of the z-filter 3QMAS sequence (3Qz).

^{*3}Homogeneous broadening factors reported by Trebosc *et al.* (2006) [4].

2. 石炭灰中微量ボロン (B) の化学構造解析

α 灰および β 灰の ^{11}B MAS スペクトルより、両試料において主要な 3 配位型 (^{31}B) および若干の 4 配位型 (^{41}B) の存在を確認した。今回、主要な化学種であった ^{31}B の詳細な化学構造を明らかにするために、 ^{11}B 高分解能 NMR スペクトルの取得を試みた。良好な S/N の STMAS および MQMAS スペクトルを得るため、前述の実験に基づき、①最大 r.f.強度を適用するとともに、②DQF-SPAM および 3Q-SPAM パルスシーケンスを用いた。その結果、 ^{11}B 3QMAS では、感度不足により B の 2 次元ピークを観測できなかったが、STMAS では、 α 灰に 1 種類の ^{31}B 、 β 灰に化学シフトに分布を持つ ^{31}B を観測することができた。また、 α 灰に含まれる ^{31}B サイトの δ_{iso} および C_Q 値より、この ^{31}B はリング状の骨格を持つことが示唆された。そこで、さらに α 灰中 ^{31}B の詳細な帰属を行うため、幾つかの B 化合物の STMAS スペクトルを取得し、Fig. 4 (a) と重ね合わせた結果、 $\text{Ca}_2\text{B}_2\text{O}_5$ と $\text{Ca}_3\text{B}_2\text{O}_6$ の中間的化学組成を持った状態で存在していることが明らかとなった。このような B の化学存在状態は、高感度元素マッピングの結果とも整合的であったことから、STMAS による高感度化が、実用材料中の微量元素の構造解析に対して非常に有効であることが実証された。

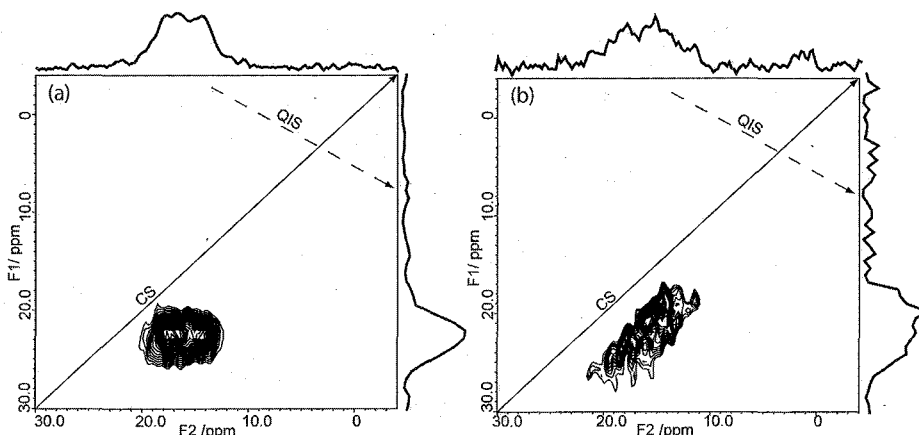


Fig. 4. ^{11}B STMAS NMR spectra for α -coal fly ash (a) and β -coal fly ash (b). (a): 16 t_1 increments of 50 μs , 4800 transients, and recycle delay of 0.5 s, (b): 16 t_1 increments of 50 μs , 18000 transients, and recycle delay of 1 s.

【結言】

1. 四極子核に対する高分解能固体 NMR の高感度化を達成するため、STMAS に着目し、STMAS 用新規プローブを開発した。さらに、その実際の効果を、実用材料を用いて定量的に明らかにした。STMAS の分解能は、試料によって 3QMAS よりわずかに低下することがあるものの、感度向上の恩恵は大きく、MQMAS では感度が不足し、測定対象とならないような材料系に対して極めて有効である。
2. 開発したプローブを用いて、 ^{11}B STMAS による石炭灰中 B の化学構造の特定に成功し、STMAS が微量元素の化学構造解析に有効な手法であることを実証した。この他にも、様々な実用材料中の微量元素や、低天然存在比の核種に対して、STMAS 適用範囲の拡大が期待できる。

References

- [1] Z. Gan, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 3242
- [2] S.E. Ashbrook, S. Wimperis, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.* **45** (2004) 53
- [3] T. Takahashi, K. Kanehashi, Y. Shimoikeda, T. Nemoto, K. Saito, *J. Magn. Reson.* to be submitted
- [4] J. Trebosc, J.P. Amoureux, Z. Gan, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **31** (2007) 1

多次元マジック角回転固体 NMR 法による膜タンパク質 ハロロドプシンの構造解析

(¹ 北大院・先端生命、² 阪大・蛋白研、³ 北大院・理)

○樋口真理花¹、江川文子²、神谷昌克¹、相沢智康¹、河野敬一³、藤原敏道²、出村誠¹

Structural Analysis of Membrane Protein Halorhodopsin by Solid State NMR under MAS

¹Faculty of Life Sci., Hokkaido Univ., ²Institute for Protein Research, Osaka Univ.,

³Faculty of Sci., Hokkaido Univ.

Marika Higuchi¹, Ayako Egawa², Masakatsu Kamiya¹, Tomoyasu Aizawa¹, Keiichi Kawano³,
Toshimichi Fujiwara², and Makoto Demura¹

Rhodopsin is a membrane protein having a typical seven-transmembrane-helical structure. Archaeal rhodopsin, the structural family of rhodopsin, functions as light-driven ion pump or sensor. Halorhodopsin (HR), one of archaeal rhodopsin, is an inward-directed light-driven chloride pump. In the photo-excited state or chloride-bound state, HR would undergo dynamic structural changes such as helix moving, opening of uptake channel, and re-orientation of the specific side-chain. However, there is no direct evidence for these structural changes of HR. The purpose of this study is structural characterization of HR by using solid-state NMR, so we performed optimization of sample preparation and various 2D solid-state NMR experiments of HR for signal assignments and structural analysis.

【序論】

NMR で膜タンパク質の構造・機能解析を行なうためには、安定同位体標識された大量かつ良質なサンプルが必要であるが、一般に膜タンパク質はこのような研究対象としては難解析性タンパク質として扱われる。そのため、大腸菌による大量発現系などのサンプル調製法の確立は、NMR による膜タンパク質研究の重要課題である。今回は膜タンパク質の固体 NMR 構造解析に向けたサンプル調製法の最適化と測定結果について報告する。

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーの中の 7 回膜貫通型ヘリックス構造をもつ代表例がロドプシン (rhodopsin) である。この構造ファミリーである古細菌型ロドプシンの一種にハロロドプシン (halorhodopsin) という Cl⁻ を輸送する膜タンパク質がある。この Cl⁻ の光駆動ポンプ機能は構造変化を伴っていると予想されているが、その原子レベルのメカニズムは詳しく解明されていない。そこで本研究では Cl⁻ の存在がハロロドプシンの構造変化にどのように寄与するかを固体 NMR で解明することを目的とした。本発表では、安定同位体標識サンプル調製の最適化と各種固体 NMR 測定結果について述べる。

膜タンパク質、光駆動型アニオンポンプ、脂質再構成、多次元マジック角回転固体 NMR 法

ひぐちまりか、えがわあやこ、かみやまさかつ、あいざわともやす、かわのけいいち、ふじわらとしみち、
でむらまこと

【実験】

(1) サンプル調製

古細菌 *Natronomonas pharaonis* 由来のハロロドプシン (以下 *NpHR*) を大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換し、M9 最少培地で ^{13}C , ^{15}N の均一二重ラベル化培養を行った。菌体破碎後に得られた *NpHR* 膜画分は、界面活性剤 n-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) で可溶化し、Ni-NTA カラムで活性型 *NpHR* を精製した。更に、重水素化 L- α -phosphatidyl choline, dimyristoyl (DMPC- d_{67}) と *NpHR* で脂質再構成 (DDM-DMPC 置換) を行った。その際に、脂質とタンパク質の再構成比、DDM-DMPC 置換度について詳細に検討を行ない、最終的に、AFM により *NpHR* の脂質二重膜への組み込み状況を確認した。

また ^{13}C , ^{15}N の二重ラベルサンプル調製では、均一ラベルの他、特定のアミノ酸のラベル率を下げるリバーラベルサンプルも作製した。脂質再構成サンプルは、 Cl^- 結合型と Cl^- 非結合型サンプル調製も行なった。

(2) 固体 NMR 測定

脂質再構成サンプル約 50mg (湿重量) を固体 NMR 試料管(4mm ϕ)に詰めて密閉した。固体 NMR 測定は、2次元 ^{13}C スピン拡散測定では Chemagnetic Infinity-plus 600 分光計 (^{13}C 共鳴周波数は 150MHz) を用い、マジック角試料回転速度 12kHz、プローブ温度 -40°C で行なった。2次元 ^1H - ^{13}C FLOPSY 測定 (Fig. 1) では、Chemagnetic Infinity-plus 700 分光計 (^{13}C 共鳴周波数は 175MHz) を用い、マジック角試料回転速度 12kHz、プローブ温度 15°C で行なった。FID は NMRPipe で処理し、スペクトルの解析には SPARKY を使用した。

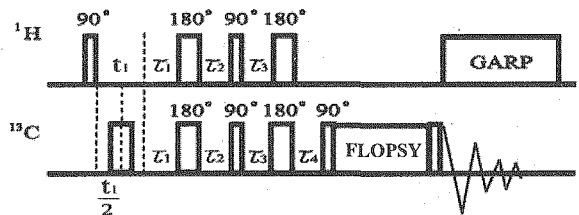


Fig.1 HCC-FLOPSY pulse sequence

【結果と考察】

(1) サンプル調製

本研究で作製した ^{13}C , ^{15}N 均一二重ラベル *NpHR* 試料は大腸菌発現系で約 10mg/L の収率で“活性型”として得られ、固体 NMR 試料として十分な発現量であった。また、界面活性剤可溶化系から脂質膜への再構成では、脂質相転移温度以下の条件で調製する方法が組み込み効率がよいことがわかった。更に脂質再構成比と得られる試料の性質を詳細に検討した結果、モル比で *NpHR* : DMPC = 1 : 30 が最適であり、AFM により *NpHR* が脂質二重膜中に均一に組み込まれた二次元結晶が確認で

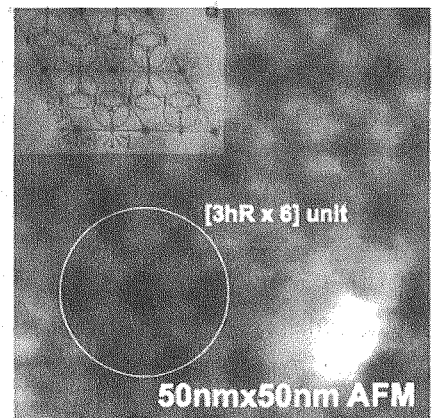


Fig.2 AFM Image of *NpHR* showing [6 x trimer] units. Protein : Lipid = 1 : 30 (30mM NaCl, 10mM MOPS, pH7.0)

きた(Fig. 2)。従来の古細菌ロドプシンの固体 NMR 測定用の脂質再構成では、Protein : Lipid = 1 : 50 再構成モル比が用いられることが多かったが、二次元固体 NMR 等の測定には、試料管への Filling factor の向上は S/N 向上にメリットもあり、今回、NpHR と DMPC の再構成比を NMR 測定用に最適化できたことは貴重な成果である。

なお、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 均一三重ラベル NpHR 試料の大腸菌発現系の構築も進めており、約 8mg/L の収率で固体 NMR 試料として十分な発現量を得ることに成功している。

以上より、膜タンパク質の NMR 試料調製は一般的に難しいにも関わらず、本研究では NMR の測定・解析を行なうために大量かつ良質な安定同位体サンプルの大腸菌発現系を構築できた。更に脂質再構成比を検討することで二次元結晶化に成功し、固体 NMR 構造解析に向けたサンプル調製法を最適化できた。

(2) 固体 NMR 測定

一般に脂質二重膜を貫通する膜タンパク質の運動性は、膜貫通領域と膜表面領域で異なると考えられる。本研究ではそれらの運動性の違いを利用した二次元 NMR 信号の検出を行い、帰属作業の簡略化に適用できるかをまず検討した。

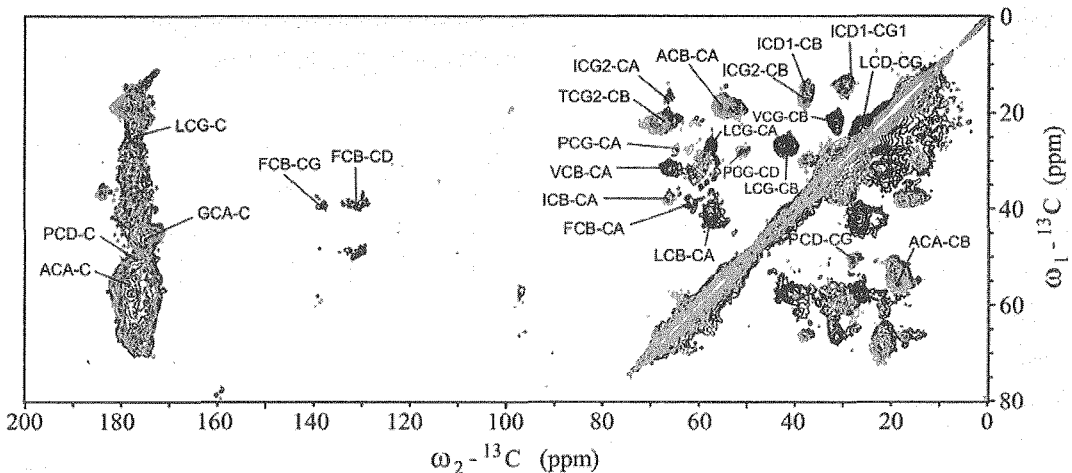


Fig.3 2D ^{13}C - ^{13}C spin diffusion spectrum for immobile region of labeled NpHR. (black) $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -labeled NpHR with Cl $^-$, (gray) $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N} \setminus (\text{V,L,F,Y})]$ -labeled NpHR with Cl $^-$. The MAS frequency was 12 kHz. The probe temperature was set at -40°C .

immobile region な膜貫通領域をターゲットとして ^{13}C , ^{15}N の均一二重ラベルサンプルで 2次元 ^{13}C スピン拡散測定を行った (Fig.3 black)。その結果 ^{13}C ピーク強度から全ての炭素が均一ラベルされている良質なサンプルであることがわかり、更に 180ppm 付近の C' ピークは NpHR モデル立体構造から計算される C' の二次化学シフトとよく一致した。この測定は -40°C の低温で行っているため、NpHR (299a.a.) のほぼ全領域について観測されている。この帰属の簡略化を目的とし、NpHR の 1 次配列中の約 32% を占め、大多数が膜貫通領域に存在する Val, Leu, Phe, Tyr をノンラベルにしたリバースラベルサンプルについて同様の測定を行った (Fig.3 gray)。その結果、特定領域の相関ピークの減少を観測できる

ことがわかり、重なるの多い Val, Leu, Ile など疎水性残基の帰属を効率化できた。

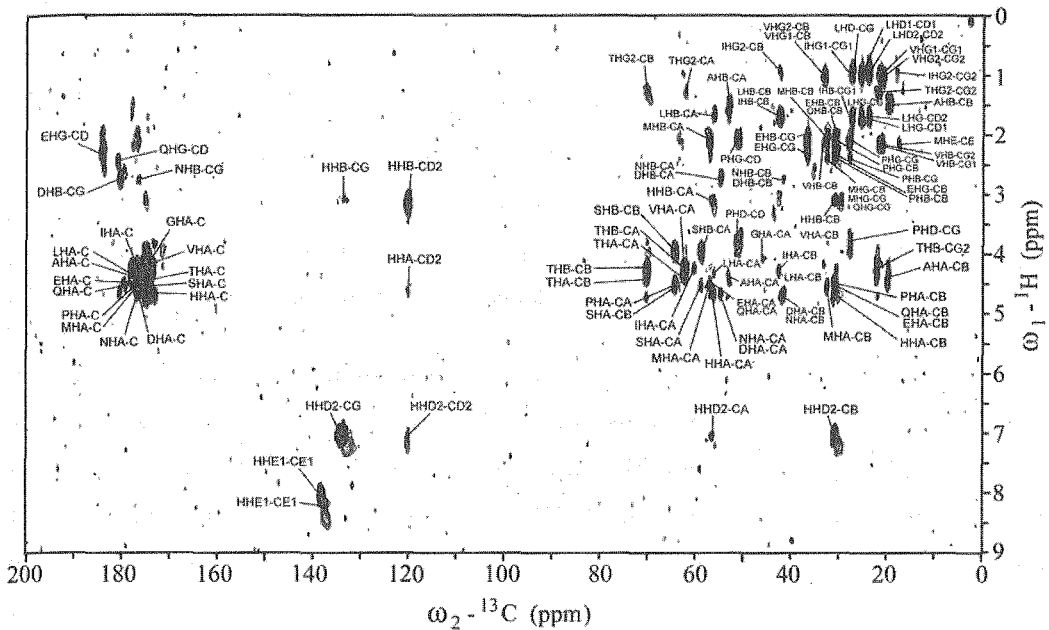


Fig.4 2D ^1H - ^{13}C FLOPSY spectrum for mobile region of labeled *NpHR*. (black) U^{13}C , ^{15}N -labeled *NpHR* with Cl^- , (gray) U^{13}C , ^{15}N -labeled *NpHR* without Cl^- . The MAS frequency was 12 kHz. The probe temperature was set at 15°C .

膜表面領域のループ構造は Cl^- の輸送に重要な働きをしていることが予想されている。そこで mobile region をターゲットとして Cl^- 結合に伴う構造変化の解析を行なうために、 Cl^- 結合型と Cl^- 非結合型の2種類のサンプルについて各々2次元 ^1H - ^{13}C FLOPSY 測定を行った (Fig. 4)。アミノ酸レベルでの帰属結果から主鎖構造の指標である CSI (化学シフトインデックス) 計算を行なったところ、mobile region の ^{13}C 化学シフトは Cl^- 非結合型より Cl^- 結合型の *NpHR* の方がよりヘリシティが高い傾向であった。これは *NpHR* の mobile region のコンフォメーション変化に Cl^- 依存性があることを示唆する。

【まとめ】

NpHR の固体 NMR 測定のための安定同位体試料調製を最適化し、多次元固体 NMR 測定と帰属を行った。*NpHR* は Cl^- 依存性の化学シフト変化を示すことがわかった。今後、ダイナミクスやインターフェイスを考慮した詳細測定、連鎖帰属から局所的な立体構造情報の収集と解析を進める予定である。

【謝辞】

AFM 測定では金沢大学の安藤敏夫教授、内橋貴之准教授、山下隼人氏に感謝いたします。

○ 田淵豊¹, 根来誠¹, 岸田拓郎¹, 北川勝浩¹, 武田和行²(¹大阪大学大学院基礎工学研究科, ²京都大学大学院理学研究科)**Active compensation of RF pulse transients**Yutaka Tabuchi¹, Makoto Negoro¹, Takuro Kishida¹, Masahiro Kitagawa¹,
and Kazuyuki Takeda²¹Graduate School of Engineering Science, Osaka University,²Graduate School of Science, Kyoto University

In the conventional NMR experiments using a tuned resonant circuit, the sensitivity increases with the Q factor of the tank circuit. As increasing the Q factor, on the other hand, the amplitude profile of an RF pulse created inside the NMR coil deviates from that of the voltage programmed in the NMR spectrometer. In this work, we propose an approach to actively compensate the deviation, so that the nuclear spins ‘feel’ the RF pulse exactly as intended. This work enables to generate accurate pulse shapes without reducing the Q-factor, and would be essential in demanding experiments, including multiple pulse experiments using a high-Q, cryo-coil solid-state NMR probes. This approach can also be used to reduce the receiver dead time, because the transient tail of the rf pulse can effectively be suppressed.

NMR測定 of 感度向上のためにはプローブの共振回路のQ値は高い方が望ましい反面, 回路の時定数が長くなるために意図するパルスの形状が得られなくなってしまう (Fig. 1(a)). そのため感度を犠牲にしてまでQ値を下げて対処することもある. 我々は, コイル内で実際に発生させたい任意のパルス波形を生成するための励起パルス波形を逆算するアプローチを提案する (Fig. 1(b)).

一般的な共振系が従う微分方程式は

$$\frac{d^2x(t)}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dx(t)}{dt} + \omega_0^2 x(t) = \omega_0^2 y(t) \quad (1)$$

と表される. ここで $x(t)$ は共振している物理量, ここでは共振器回路のコイル内に発生するラジオ波磁場に相当する. ω_0 は共振周波数, Q はQ値, $y(t)$ は入力信号, すなわちNMR送信機から発するラジオ波パルス信号の電圧である. ここで $Q \gg 1$ と仮定し, 初期条件

キーワード: 能動制御, ラジオ波パルス, Q値, 過渡現象, インパルス応答

○ たぶちゆたか, ねごろまこと, きしだたくろう, きたがわまさひろ, たけだかずゆき

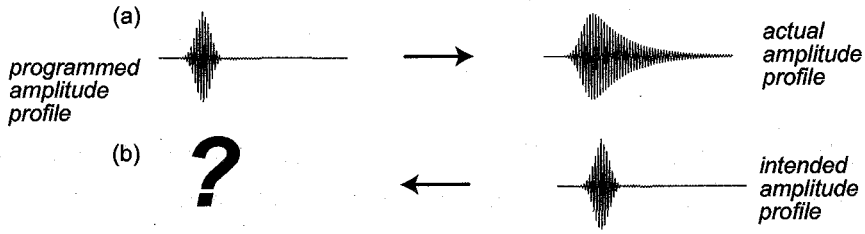


Fig. 1: (a) The rf pulse shape that the nuclear spins in a tuned coil ‘feel’ differs from that programmed in the transmitter. The central issue of this work is to provide a procedure for programming the amplitude profile that gives an arbitrary pulse shape of the rf field inside the coil, as depicted in (b).

$x(0) = 0$, $\left. \frac{dx}{dt} \right|_{t=0} = \frac{\omega_0}{2}$ の下で, 階段入力 $y(t) = \begin{cases} \sin \omega_0 t & (t \geq 0) \\ 0 & (t < 0) \end{cases}$ に対する解を求めると,

$$x(t) = \left[1 - \exp\left(-\frac{\omega_0}{2Q}t\right) \right] \cos \omega_0 t \quad (2)$$

を得る. ここで振動の振幅 $1 - \exp\{-\omega_0/2Q)t\}$ に注目すると, 階段入力に対して波形が時定数 $T = 2Q/\omega_0$ を持って鈍っていることがわかる. 制御工学で確立されている伝達関数の概念を用いると, 階段入力に対する指数関数的な波形鈍りは, 共振回路が振幅に関して $T/(1 + Ts)$ の伝達関数を持つことを意味する. ここで s はラプラス演算子であり, この伝達関数は $T = 2Q/\omega_0$ の時定数をもって指数関数的に減衰するインパルス応答 $g(t) = \exp(-t/T)$ を与える.

送信機から発するパルスの振幅 $f(t)$ とコイル内で実際に発生するパルスの振幅 $u(t)$ には

$$u(t) = g(t) * f(t) = \int_{-\infty}^{\infty} dt' g(t') f(t-t') \quad (3)$$

の関係がある. ここで $*$ は合成積を表す. これを $f(t)$ について解いて, 任意のパルス振幅 $u(t)$ に対して補償パルス $f(t)$ 振幅を得るために, (3) 式の両辺をラプラス変換し, 合成積のラプラス変換がそれぞれのラプラス変換の積に等しいことを用いると,

$$U(s) = G(s)F(s) \quad (4)$$

となる. また,

$$G(s) = \int_0^{\infty} dt e^{-t/T} e^{-st} = \frac{T}{1 + sT} \quad (5)$$

であるから,

$$F(s) = \frac{1 + Ts}{T} U(s) \quad (6)$$

を得る. 逆ラプラス変換によって $f(t)$ を求めると

$$f(t) = u(t) + T \frac{du(t)}{dt} \quad (7)$$

を得る. これはパルス波形 $u(t)$ を実際に核スピン系に照射するためには, 送信機から発するパルス波形 $f(t)$ を, $u(t)$ に重み T をかけた $u(t)$ の時間微分を加えた形にする必要があることを意味する. Q 値が低い極限では $T \ll 1$ であり (7) 式右辺の第2項は無視できて, コイル内に発生するパルス磁場波形は送信パルス波形に一致する. 一方 Q 値が高くなるにつれて第2項の寄与が大きくなり, 両者は一致しなくなる. この場合は (7) 式を満たすようなパルス波形を送信することにより, Q 値を下げることなく核スピン系に望みどおりのパルス波形を照射することが可能となる.

ここで我々が導出した (7) 式は, 制御工学で確立されている能動制御による信号波形の補償法を NMR プローブに用いられる共振回路に適用した結果得られたものである. 以後我々は, (7) 式を満たすようにデザインされたラジオ波パルスを補償パルスと呼ぶ.

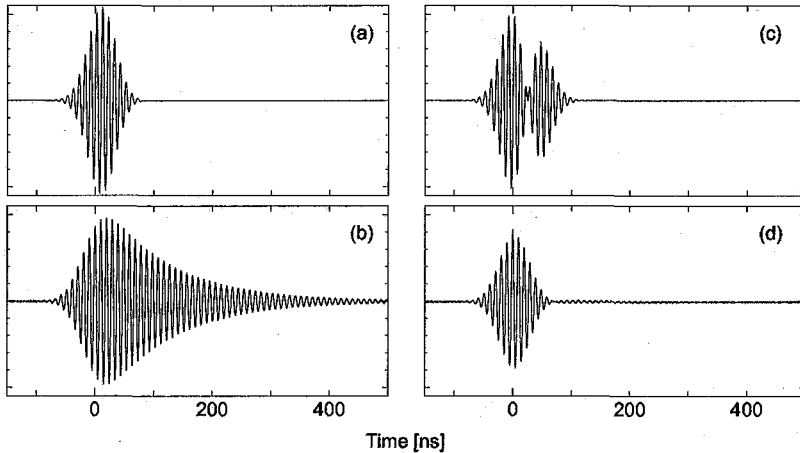


Fig. 2: (a) A Gaussian pulse created by an arbitrary waveform generator, and (b) the resultant rf-field profile monitored with a pickup coil placed beside the NMR coil tuned at 102 MHz. The Q factor was measured to be ~ 40 . (c) The compensated Gaussian pulse created by an arbitrary waveform generator according to Eq. (7) using $T = 2Q/\omega_0 = 125$ ns, and (d) the monitored rf-field profile.

デモンストレーションとして, 微分操作を解析的に行うことができるガウスパルスを用いて補償パルスの効果の検証を行った. Fig.2 (a), (c) に任意波形発生器 (Tektronix, AWG7102) を用いて生成したガウスパルスおよび補償パルスの入射, Fig.2 (b), (d) に共振回路のコイル近傍でピックアップしたラジオ波パルスの波形を示す. 補償パルスを用いない場合には, パルスを切った後に数百ナノ秒程度継続する過渡現象が見られる. 一方補償パルスを用いた場合には, 過渡現象が観測されなくなり, 共振器内に意図した通りのパルスが生じていることがわかる.

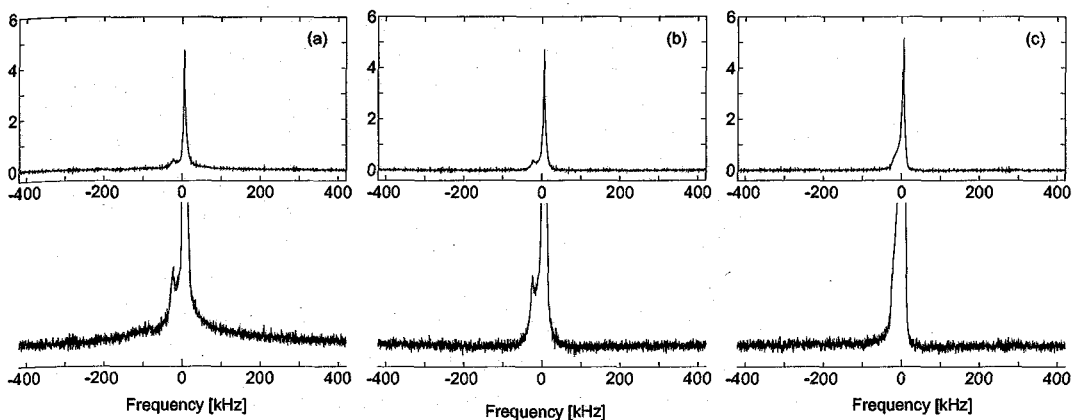


Fig. 3: ^1H NMR spectra of silicon rubber obtained using (a) a gauss $\pi/2$ pulse, (b) a compensated gauss $\pi/2$ pulse, and (c) the spin-echo sequence. The bottom row shows the vertically magnified spectra. The experiments were carried out at room temperature in a magnetic field of 298 mT using a home-built probe tuned at the ^1H resonance frequency of 12.70 MHz.

シリコンゴムの ^1H NMR スペクトルにおける補償パルスの効果を Fig.3 に示す. (a) はガウスパルスで測定したもの, (b) は補償ガウスパルスで測定したものである. (a) の信号の裾にある 500 kHz 程に広がっているパルスの過渡現象に起因するベースラインの歪みが (b) では消えている.

共振器回路の過渡現象は, 磁場すなわち周波数が低くなればなるほど, また Q 値が高くなればなるほど長い時定数を持つ. ここで我々が提案した補償パルスのアプローチを用いれば, Q 値を下げることなく効果的に過渡現象を抑制することができるだけでなく, 意図する通りの正確なパルス波形を核スピン系に照射することが可能となる. したがって補償パルスは例えば クライオコイルプローブ [1] のような Q 値の高い共振回路を用いて短いパルスを照射したり, T_2 の短い試料の測定を行うときには不可欠である.

謝辞

この研究は科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業 (CREST) の援助を受けて行われた.

参考文献

- [1] Takashi Mizuno, Katsuya Hioka, Koji Fujioka, and K. Takegoshi, Rev. Sci. Instrum. 79, 044706 (2008).

電源励磁による高温超電導磁石を使った 固体 NMR 用外部ロックの開発

¹理化学研究所 SSBC, ²横浜市立大学, ³上智大学, ⁴千葉大学,
⁵日本電子, ⁶神戸製鋼, ⁷物質・材料研究機構

○高橋 雅人^{1,2}, 斎藤 雄太³, 柳澤 吉紀⁴, 保母 史郎²,
高尾 智明³, 中込 秀樹⁴, 細野 政美⁵, 濱田 衛⁶, 木吉 司⁷,
山崎 俊夫¹, 前田 秀明^{1,2}

Development of external lock system of solid state NMR for a current supplied HTS magnet

¹RIKEN, ²Yokohama City Univ., ³Sophia Univ., ⁴Chiba Univ.,

⁵JEOL Ltd., ⁶Kobe Steel, Ltd., ⁷NIMS

○Masato Takahashi^{1,2}, Yuta Saito³, Yoshinori Yanagisawa⁴, Fumio Hobo²,
Tomoaki Takao³, Hideki Nakagome⁴, Masami Hosono⁵, Mamoru Hamada⁶,
Tsukasa Kiyoshi⁷, Toshio Yamazaki¹ and Hideaki Maeda^{1,2}

A novel method to stabilize a magnetic field and a new generation NMR magnet using High Temperature Superconductor (HTS) are 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 1 GHz (23.5 T). We started a project which the innermost insert coil of the 920 MHz NMR (21.6 T) is replaced from Nb₃Sn to Bi-HTS for beyond 1 GHz operation (supported by Sentan, JST)⁽¹⁾. Unfortunately HTS has small residual resistance and connection resistance, which prevents operation in persistent mode. Thus an outer power supply is needed, causing electric current fluctuations.

The stabilizing method in this study uses signals of microcoil NMR and a frequency counter. This external lock system for solid state NMR can acquire the frequency of NMR FID signal and compensation coil current to stabilize the magnetic field is calculated from the frequency counter and other results.

500 MHz NMR using the HTS as an innermost insert coil is also developed. The HTS tape conductor generates undesirable magnetization due to its shape and it causes magnetic field inhomogeneity, fluctuation and bad adjustability. However, we recently acquired acceptable solution NMR spectrum using internal lock with improved parameters. These are great steps for 1.05 GHz NMR (24.6 T).

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、高磁場化はさらに有効である。しかし超 1GHz の NMR を実現するには、これまで使われてきた金属系超電導線ではなく高温超電導線を用いる必要がある。これは、20T を超える高磁場中では、金属系超電導線の臨界電流密度が小さくなり十分な磁場を発生できないためである。一方、高温超電導線は

キーワード：高磁場 NMR、高温超電導、磁場安定化、固体 NMR、外部ロック

たかはしまさと、さいとうゆうた、やなぎさわよしのり、ほぼふみお、
たかおともあき、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

高磁場中でも高い臨界電流が得られるため、1GHz(23.5T)以上を実現できる。この観点から我々は、高温超電導線を用いた超 1GHzNMR システムの開発⁽¹⁾を開始した。

高温超電導線は、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。また、線同士の超電導接続は実現していない。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、この抵抗により電流が急速に減衰してしまうため、NMR で必要な磁場安定度を実現できない。

そこで、超 1GHz NMR では永久電流モードではなく、外部電源から電流を常に供給する方法（通電モード）を採用した。これにより、磁場減衰を抑えることができるが、外部電源の電流変動の影響を受けてしまう。この電流変動は 1ppm から 10ppm あり永久電流に比べて数桁大きく NMR 計測に適用できない。我々は、すでに通電モードの溶液 NMR 計測について、一定の条件下で ²H 内部ロックが有効であることを報告した⁽²⁾。ここでは、固体 NMR 用の外部ロックを開発したので報告する。

本開発では物質・材料研究機構に設置してある 920MHzNMR(21.6T)の最内層コイルを、外部電源通電モードの高温超電導コイルに置き換えることで 1.05GHz(24.6 T)で運転する計画である。その第一段階として、高温超電導線を最内層コイルに用いた 500MHz NMR 磁石を製作し、高温超電導 NMR として世界で初めて実用的な溶液 NMR 信号を得ることに成功した。この結果についても報告する。

(1) 通電モードにおける固体 NMR 用外部ロック（金属系 NMR 磁石）

Fig. 1 に本開発で考案した手法を示す。固体 NMR プロブ内に ⁷Li 溶液マイクロコイルを設置し、この FID 信号を周波数カウンタで測定した。この磁場測定値を用いて、プローブ内に設置した磁場補正コイルの電流を制御し、中心磁場が時間的に一定になるようにフィードバック制御を行った（外部ロック）。マイクロコイルは内径 0.8mm、外径 1.2mm のチューブに飽和塩化リチウム水溶液を封入し、まわりに 0.1mm の銅線を 6 ターン巻いたものを用いた。マッチング回路を含めたマイクロコイル NMR プロブの直径は 4.5mm である。

溶液 NMR で広く使われている内部ロックは、NMR 信号の位相を用いて磁場が一定になるように制御している。固体 NMR では ²H 溶媒などを用いた内部ロックが使用できないため、外部ロックを行う必要がある。本開発で用いた周波数カウンタを用いる方式は、計測周波数が磁場ロックの目標周波数からどれだけずれているか絶対値を知ることができる。一方、位相を用いる方式では目標周波数に対する相対的なずれの方向がわかるのみである。

また、外部ロックでは磁場計測点と NMR 測定試料の場所が異なるために、両者の磁場強度や変動が異なる場合がある。このため、磁場計測点の磁場を一定にするだけでは、NMR 測定試料の場所の磁場を一定にできない。このため、磁場強度の絶対値を測定できる周波数カウンタを用いる方式は外部ロックの方法として優れている。た

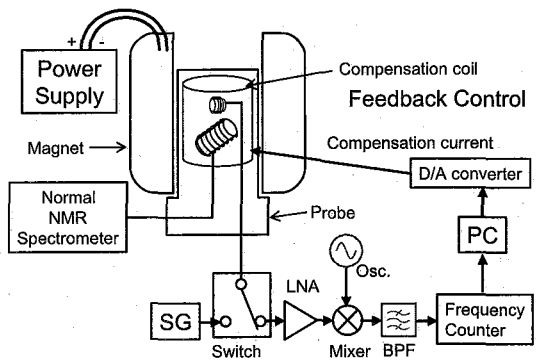


Fig. 1. A magnetic field stabilization system using a microcoil NMR and a frequency counter. This system is worked as an external lock system for solid state NMR using an external power supplied magnet.

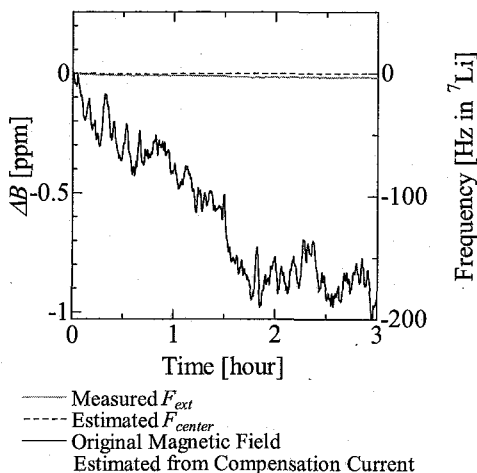


Fig. 2. The magnetic field stabilization result of external current mode. The external lock system using a frequency counter estimates the center magnetic field. The magnetic field fluctuation is also shown as the fluctuation of a compensation coil current.

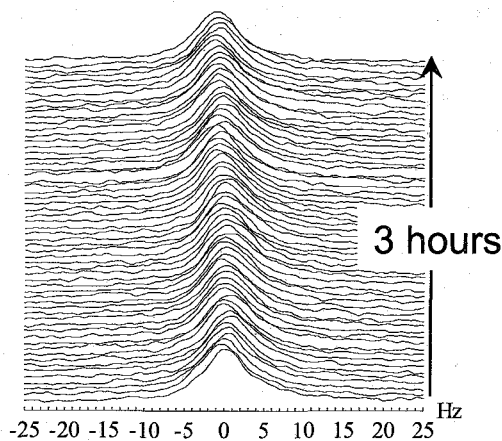


Fig. 3. A stacked plot of solid-state ^{13}C NMR for adamantane measured every 3 minutes in the external current mode, while the external lock system continuously stabilize the magnetic field for 3 hours shown in Fig. 2.

たとえば、磁場計測後に様々な補正計算を行い、その結果から磁場補正コイルの電流を決定することが可能である。その例を以下に示す。

本開発では、 Z^0 と Z^2 コイルの磁場補正コイルを用いたが、外部ロック用マイクロコイルを設置した場所（磁場中心から12mm上方）では1.8%の発生磁場強度の差（磁場エラー）があった。電源通電モード磁石では、磁場変動が数桁大きいので、大きな磁場補正能力が必要で、磁場エラーも大きくなるので問題である。本開発では、磁場測定値と磁場補正コイルの電流値から中心磁場が一定になるように制御を行った。このときの結果がFig. 2である。ここでは、周波数カウンタの測定値 F_{ext} を使って F_{center} が一定になるように磁場補正コイルの電流を制御した。この電流値を補正した磁場の大きさに換算したものを図に示した（つまり磁場変動に等しい）。同時に行った ^{13}C アダマンタンの固体NMRスペクトルがFig. 3である。超電導磁石の磁場が約1ppm変動(Fig. 2)したにもかかわらず、外部ロックにより磁場は一定に保たれており変動幅は0.02ppm以下であった。今後、以下で述べる高温超電導磁石、さらには1.05GHz磁石にもこの外部ロック方式を適用し固体NMR測定を行う予定である。

(2) 高温超電導線を用いた500MHz用NMR磁石

NMR磁石の最内層磁石のみを、高温超電導線を用いたコイル（発生磁場：1.8T）に交換し500MHz（11.74T）で励磁した。磁石をDanfysik社の直流電源（水冷式）で通電モード運転し、磁場安定度計測、磁場調整、NMR計測などを実施した。本電源は世界最高レベルの安定度を持ち、電流変動は1ppm以下である。

磁石のクライオスタットには、熱侵入の小さい高温超電導バルクを使った電流リードを用い、さらに磁石容器に小型GM冷凍機を取り付けた。この結果、液体ヘリウム蒸発がなく冷媒補充が不要になった。これまで通電モードでのNMR計測は、液体ヘリウムの蒸発が激しく実験時間が10時間程度に限られていたが、本磁石は1年以上にわたりヘリウム蒸発が無く安定なNMR計測を実施できる特性を持つ。

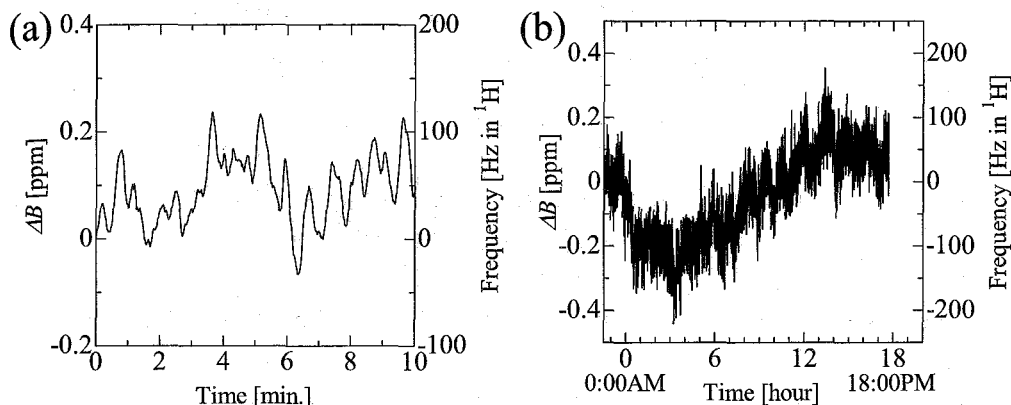


Fig. 4. (a) The short term and (b) the long term magnetic field fluctuation of the 500 MHz HTS magnet in the external current mode. This result is acquired by the frequency counter shown in Fig. 1. Fig. 4(b) shows the electric current of external power supply depends on ambient temperature.

磁場変動を Fig. 1 の周波数カウンタで測定した結果を Fig. 4 に示す。磁場は、短期的には約 0.3ppm の幅(Fig. 4(a))で変動した。一方、長期的には、外気温と連動して一日単位で約 0.7ppm 変動した(Fig. 4(b))。日単位の変動は冷却水の温度変動または環境の温度変動などが影響しているものと推測している。

上記の様に、溶液 NMR の磁場を安定に保持するには、 ^2H 内部ロックの適用が必要である。しかし、 ^2H ロックは、磁場ドリフトが数 ppm 以下でなければ動作しない。ここでは、通電モードにおけるロックの動作の長期試験を実施した(Fig. 5)。ここではクロロホルムの溶液 NMR 計測を行った。内部ロックについてはパラメータを調整し⁽²⁾、 z^1 と z^2 の autoshim (自動シム調整) を併用して測定した。60 時間にわたりロックが保持され、磁場変動は 2ppb 以下である。その間に主に z^1 が変動したものの、安定して NMR 測定が可能であった。現在までに超電導シム磁場の時間変動、小型冷凍機の振動、高温超電導テープ線材に生じる渦電流磁場の影響など特有な現象があった。これらを解決しながら、高分解能 NMR にむけた改良を進めていく予定である。そして、1.05GHz NMR を用いて溶液 NMR での TROSY 効果の実証や固体 NMR での ^{17}O 測定などに活用したいと考えている。

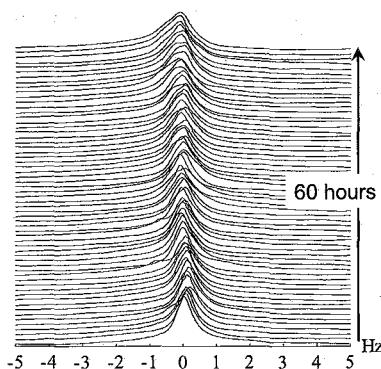


Fig. 5. A stacked plot of solution ^1H NMR for 1% CHCl_3 in Acetone- d_6 measured every 1 hour in the external current mode of the 500MHz HTS magnet, while the internal lock and autoshim continuously adjust the magnetic field for 60 hours.

参考文献

- (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) Y. Yanagisawa, H. Nakagome, M. Hoshino, M. Hamada, T. Kiyoshi, F. Hobo, M. Takahashi, T. Yamazaki, and H. Maeda, Towards beyond-1GHz solution NMR: internal ^2H lock operation in an external current mode, J. Mag. Res. 192, 2008, 329-337.

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。

(筑波大学数理物質科学研究科¹, 日本学術振興会特別研究員 PD²)

○谷口和也¹, 半田晋也², 巨瀬勝美¹

Development of a Compact MRI for Assessments of Trabecular Bone Density in the Calcaneus

K.Taniguchi¹, S.Handa², K.Kose¹

1. Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 2. JSPS Research Fellow

A compact MRI system for assessments of trabecular bone (TB) density at the calcaneus was developed using a 0.21 T permanent magnet. Compared to the compact MRI system previously reported, the installation space was drastically reduced using a local RF shield. The measurement time for the TB density was also reduced using a multiple spin-echo technique and an RF coil with a large homogeneous volume of the RF magnetic field. Reproducibility of the measurements was evaluated using seven male volunteers. The obtained CV (coefficient of variance: standard deviation divided by the mean) averaged over the subjects was 0.069. Therefore, it is concluded that although further improvements are required, the compact MRI system could be a useful tool for TB density measurements of the calcaneus.

1. 研究の背景・目的

骨粗鬆症は、主として加齢に伴う骨量減少により骨強度が減少し、骨折が起こりやすくなった状態であり、高齢者および閉経後の女性に多い疾患である。骨粗鬆症が進行すると治療は困難とされ、早期発見・早期治療が望まれている。そこで、本研究室では、骨粗鬆症診断を目的とした、骨密度計測用コンパクト MRI の開発を 2001 年より行ってきた。計測対象には、骨代謝が活発であり、骨量の変化を捉えやすい海綿骨を多く含む、踵骨を選んだ (Fig.1)。しかし、従来のシステムは、骨密度の計測に 5 分弱を要し、ルーチン計測を行うには時間がやや長いという課題があった。

そこで本研究では、踵骨骨密度計測用コンパクト MRI において、計測時間短縮のためのマルチエコー法である CPMG 法を導入し、被験者計測によって、従来のシングルスピネコー (SSE) 法と比較することにより、その有用性を検証することを目的とした。

コンパクト MRI, 踵骨骨密度計測, 海綿骨体積率 (TBVF)

たにぐちかずや, はんだしんや, こせかつみ

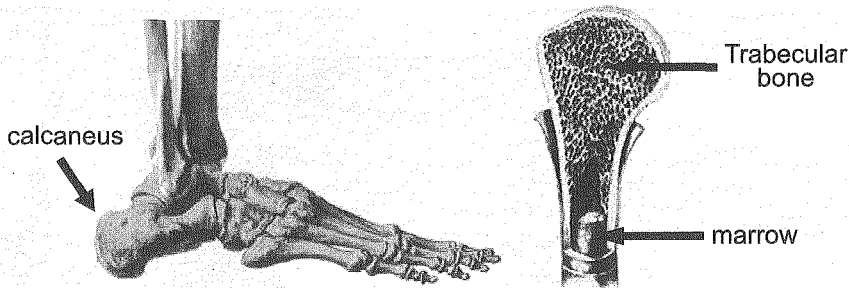


Fig.1 Calcaneus image and bony architecture

2. 骨密度計測法

SSE 法によって、踵骨の 2D 画像を、画素内に海綿骨領域と骨髄領域が混在するよう低い分解能にて取得する。その画素強度 I から定数 k , $T1$ および $T2$ 緩和による信号減衰の項を補正することにより、骨髄の密度 ρ を求めることができる。画素内には海綿骨と骨髄の 2 種類しか存在しないため、海綿骨体積率 (TBVF) は相補的に次のように計算できる。

$$I(x, y) = k \rho(x, y) \{1 - \exp(-TR / T1(x, y))\} \exp(-TE / T2(x, y))$$

$$TBVF = 1 - \rho(x, y)$$

TBVF を求めるためには、 k , $T1$, $T2$ の項を補正しなければならないが、 k は外部標準ファントムにより、 $T1$ の項は、 $5T1 < TR$ となる TR の使用により、 $T2$ の項は、 TE を変えた 2 枚の画像より補正することができる。ここで、 $T2$ 緩和補正には、従来は SSE 法による撮像を 2 回行う必要があったが、新たに CPMG 法を用いることで、1 回の撮像で TE の異なる 2 枚の画像を取得することができ、計測時間を半減することができる。

3. 実験装置

今回の計測に用いた永久磁石、RF コイルおよび局所シールドを Fig.2 に示す。永久磁石の磁場強度は 0.21T (共鳴周波数 8.9MHz) である。

RF コイルは CPMG 法における計測の安定性を向上するため、遺伝的アルゴリズムを用いて、磁場の均一性を高めたコイルの巻き線パターンを設計・作製した。

局所シールドとは、薄い銅製のシートを被験者の膝下に筒状に巻いたもので、生体を介して侵入する外来雑音を抑制することができる。局所シールドの外来雑音除去特性を調べたものを Fig.3 に示す。局所シールドを使用することで、およそ 40dB の雑音除去効果が得られていることがわかる。これにより、従来使用していた金属製のシールドルームを不要とすることが可能になった。

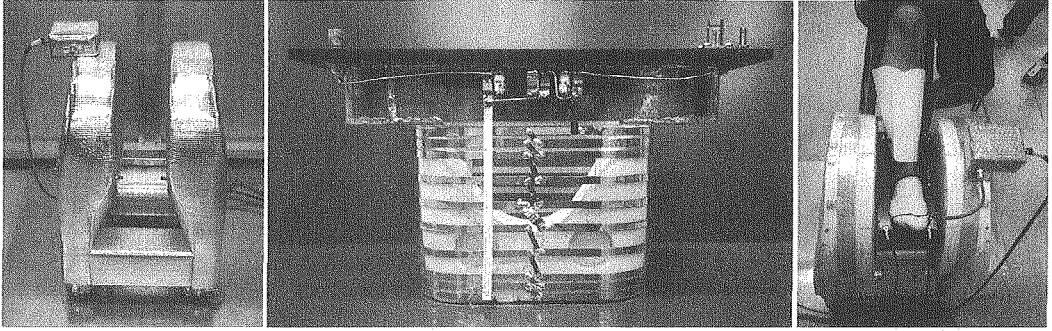


Fig.2 Permanent magnet, RF coil, Local shield

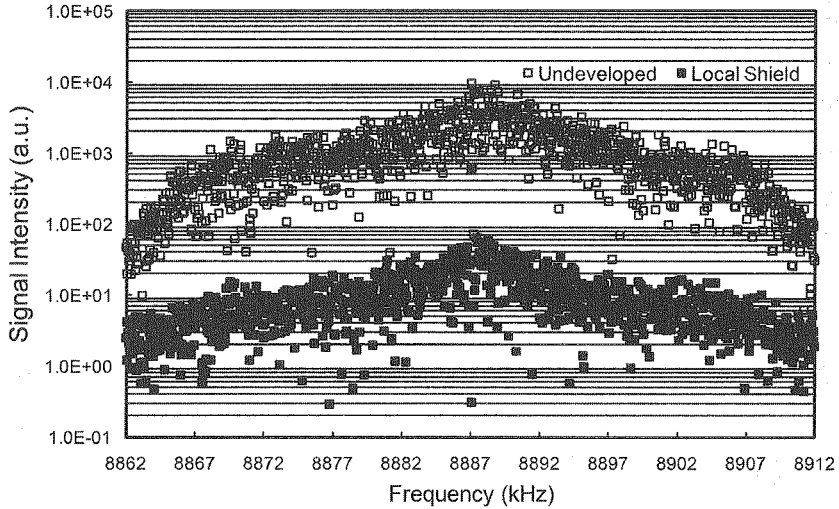


Fig.3 Frequency characteristics of exogenous noise

4. 実験方法

7名の健常男性被験者 (age : 23-24) に対し, SSE 法と CPMG 法で各々10回計測を行い, TBVF とその CV 値 ($=\sigma / \text{average}$) を算出した. 撮像パラメータは, TE (SSE) = 16 ms, 96 ms, TE (CPMG) = 32 ms, 96 ms, TR = 1400 ms, matrix size = 128 × 64, voxel size = 0.8 mm × 1.6 mm, slice thickness = 12 mm, acquisition time = 200 sec (SSE), 100 sec (CPMG)である. Fig.3 に示すように, 踵骨スライス位置および解析領域を設定した.

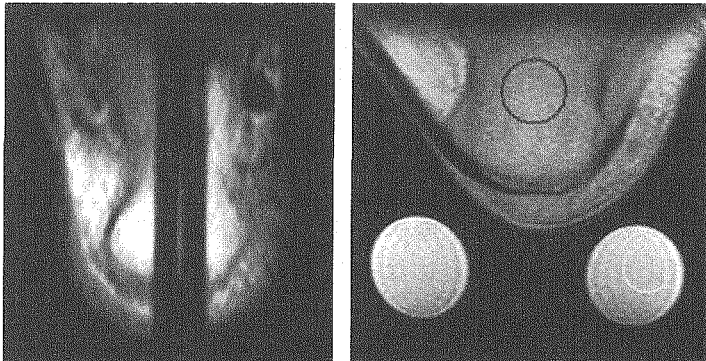


Fig.4 Slice position and analytic area of calcaneus

5. 結果・考察

SSE 法および CPMG 法による被験者計測によって算出した TBVF の結果を Fig.4 に示す。SSE 法は CPMG 法に比べ 2 倍の撮像時間を要するため、被験者の動きに対する計測の誤差を生じているところが見られる。

7名の被験者それぞれの計測の再現性を評価したものを Table.1 に示す。CPMG 法は SSE 法に比べ、若干再現性が劣る結果となった。

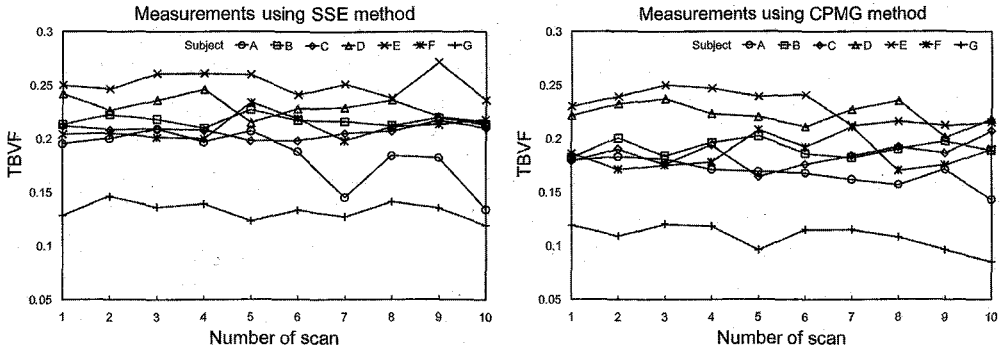


Fig.4 Result of measurements by SSE and CPMG

Table.1 Reproducibility of measurements of 7 male subjects

	A	B	C	D	E	F	G	AVE
CV_SSE(%)	14	2.4	2.8	4.7	4.6	5.3	6.3	5.0
CV_CPMG(%)	7.2	4.0	6.5	5.0	6.5	7.9	11	6.9

踵骨の海綿骨構造は三次元的に非常に不均一であり、踵骨の位置の変動が TBVF の誤差の要因になると考えられ、これは、解析領域を大きく設定することで改善されると考えられる。また、CPMG 法は RF パルスを連続して複数発生させるため、RF パルス強度の変動が計測の誤差を生じていると考えられる。

6. 結語

被験者計測による再現性評価において、従来法(SSE法)の CV = 5.0%に対し、CPMG 法は CV = 6.9%を達成し、従来法に近い計測精度を得ることができた。これにより、計測時間短縮を目的とした CPMG 法が SSE 法に代わる計測手法として利用可能であることが示唆された。

References

- [1] Kose K, et al. Magn Reson Med 52, 440-444 (2004)
- [2] Tomiha S, et al. Magn Reson Imaging 23, 1011-1015 (2005).
- [3] Tomiha S, et al. Magn Reson Med in press.
- [4] Handa S, et al. 16th ISMRM, Toronto, 2008, p1146.

部分構造検索を用いた HSQC シグナルからの構造予測法の開発

¹横市院国際総合、²理研PSC、³名大院生命農○春名英明¹、近山英輔²、菊地淳^{1,2,3}

A Method for Predicting Chemical Structures Based on HSQC Signals Using Sub-graph Isomorphism Search

¹International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University,²RIKEN Plant Science Center, ³Graduate School of Bioagri. Sci., Nagoya University○Hideaki Haruna¹, Eisuke Chikayama², Jun Kikuchi^{2,3}

Methods for identification of metabolites by a combination of stable isotope labeling and multidimensional NMR spectra have been developed [1-3] in which chemical shift database of metabolites collected at the same physicochemical condition is important [4]. However, unidentified peaks in experimental HSQC spectra of biological crude extracts are still remaining in many cases, therefore, a new method to identify the remaining peaks is expected. We report a new method for effectively predicting candidate metabolites for the unidentified peaks from KEGG compounds based on structural similarity in which dissected substructures of compounds are evaluated. The algorithm was implemented into HalMol system and the performance was examined.

1. はじめに

NMRによるメタボローム解析のアプローチには、高い再現性や非侵襲性、代謝フラックス解析のような原子レベルでの計測能といった長所がある。我々は、安定同位体標識と多次元NMRスペクトルを用いた、代謝産物の網羅的同定および原子レベルでの代謝動態解析を目指している[1-4]。そこでは物理化学条件を一定にしたNMR計測による代謝物化学シフトデータベースが構築され、それを実装した代謝物一斉同定システムSpinAssignによる生体抽出物サンプル由来の¹³C-HSQCスペクトル解析が可能となっている。代謝物に対する網羅的な化学シフトデータベースの構築は多くのNMRマシンタイムと労力を必要とするため、効率的なデータベース構築法が期待される。さらに現状では生体サンプル内にデータベースと照合されない未同定ピークが半分以上存在しており、残りの未同定ピークに対する代謝物候補を決定する方法が望まれる。そこで我々は未同定ピークに対しKEGGの全代謝物の部分構造を比較し、類似性を評価することで効率的に代謝物候補を予測する方法を開発した (Fig. 1、点線内)。抽出物サンプルであることから未同定ピークには複数の代謝物由来のピークが

キーワード：メタボローム、ケモインフォマティクス、部分構造検索、化学シフト予測、構造予測

はるな ひであき、ちかやま えいすけ、きくち じゅん

混在しているため、我々の方法は HSQC-TOCSY などの測定から原子の結合情報を得た上で1分子内のピークを入力とする。この予測法と予測結果の実験的検証により、効率的なデータベース構築が達成され、さらなる網羅的な代謝物一斉同定が可能となると期待される。

2. 方法

我々の予測法は次のステップより成る：(1)KEGG 全代謝物について MDL 社の SDfile の結合情報から炭素原子を中心とする仮想球体で原子周囲を記述する HOSE コード [5][Hierarchically Ordered Spherical Description of Environment、例えば第一層は、中心原子から1結合離れたすべての原子により定義される(Fig. 2a)]を作成し、HOSE コードから化学シフトを予測した。この KEGG 化合物の化学シフト予測値を未同定ピークと照合し候補化合物を200個に絞り込んだ。照合は KEGG 化学シフト予測値と未同定ピークの類似性を次の類似性スコア S で評価した。 S は小さいほど類似する。

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - y_{min})^2 + \sum_{j=1}^M (y_j - x_{min})^2} \quad (1)$$

ここで N は KEGG 予測化学シフト数、 M は未同定ピークの化学シフト数、 x_i は KEGG 予測化学シフト、 y_j は未同定ピークの化学シフト、 x_{min} は y_j と差が最小な KEGG 予測化学シフト、 y_{min} は x_i と差が最小な未同定ピークの化学シフトである。(2)未同定ピークを我々の ^{13}C -HSQC ベースの化学シフトデータベースと照合し複数の類似化合物を得た。さらに、それらを部分構造に分解し最も頻度の高い部分構造を抽出し、これらの部分構造の集合を G1 と定義した。部分構造を炭素から2結合離れた全ての原子と定義し、SDfile から結合情報を得た。部分構造が共通であるかは、部分構造の原子を頂点、結合を辺とするグラフとし、グラフ同型問題としてバックトラッキング・アルゴリズムで解いた(Fig. 2b)。このアルゴリズムは、比較する2つの部分グラフの一方の1原子と他方の1原子の比較から始め、そのすべての隣接原子を再帰的に順次比較してゆく方法である。全原子と全結合種が一致するとグラフの同型性が証明される。(3)同様の部分構造抽出を KEGG の各化合物1つ1つにつき行ないこれを G2 とした。そして、

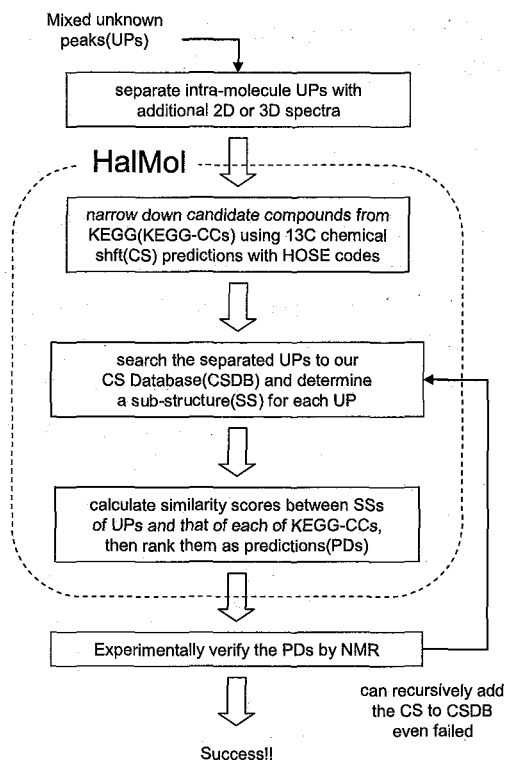


Fig. 1 Schematic representations of prediction of chemical structure from mixed unknown peaks using HalMol.

G1 と G2 から Jaccard 係数 (JC) を算出した。 JC 値は 0 から 1 の間を取る値で以下の式で定義され、全部分構造に対する共通な部分構造の割合であり 2 つの化合物の類似性を評価できる。

$$JC(G_1, G_2) = \frac{G_1 \cap G_2}{G_1 \cup G_2} \quad (2)$$

ある未同定ピークについて JC 値が最も高くランクされる KEGG 化合物を予測代謝物とした。一般にグラフ同型判定は NP 完全であり大きな実行時間を要するため(1)の化学シフト予測で候補化合物を 200 個に絞ることでこの問題を回避した。

以上のアルゴリズムは対話的ユーザーインターフェースを備えたオリジナル Java ソフトウェア HalMol に実装された。化学シフト予測値を計算するために Java の化学情報ライブラリー CDK (Chemical Development Kit) を用いた。

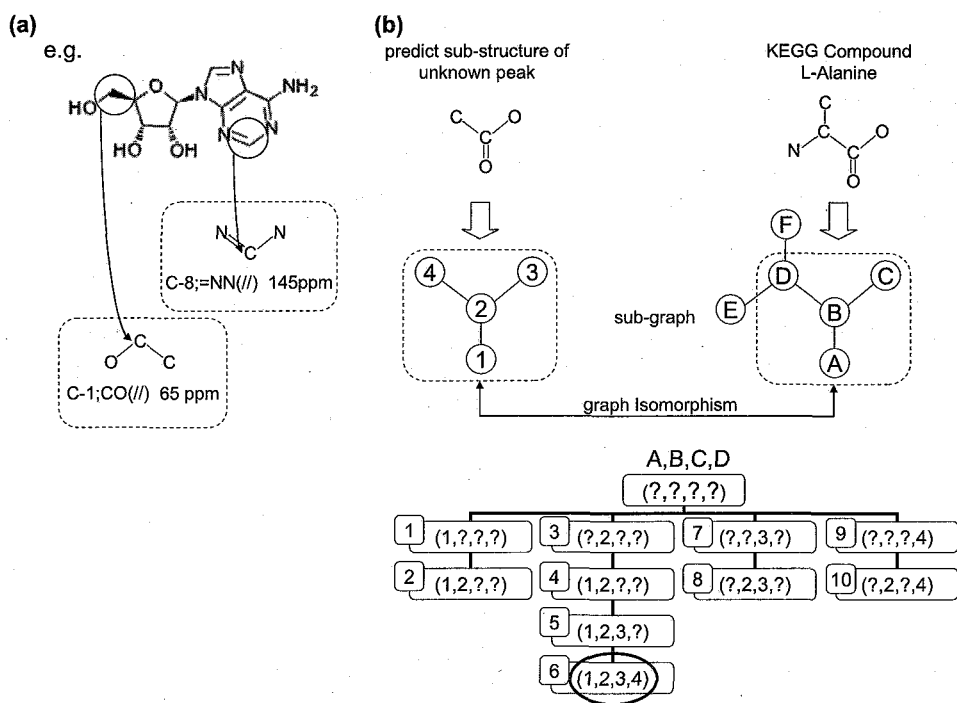


Fig. 2 (a) Examples of one sphere HOSE codes for substructures in adenosine. Predicted ^{13}C chemical shifts are also shown. (b) Backtracking algorithm for detecting equivalent substructures. Substructures in both predicted and KEGG candidate compounds are transformed into so-called sub-graphs, and then graph isomorphism, or equivalence, between them is determined by backtracking and comparing nodes within the graphs. Each node of sub-graph (A, B, C, D) within a KEGG compound is backtracked and matched to that of predicted whether atoms are same or not sequentially (numbered in a box). Sixth box (1,2,3,4) is matched and graph isomorphism is determined.

3. 結果および考察

我々の方法を検証するために、12579 個の KEGG 代謝物と我々の構築している代謝物化学シフトデータベースを用いて、シグナル既知である 4 種の化合物 adenosine、

isoleucine、glucose、CoAについて予測順位を求めた。その結果、それぞれにつき予測順位が2、3、1、15位となり、実際にこのアルゴリズムが有効であることがわかった(**Table 1**)。これは、正しい化学シフトの組み合わせをクエリーにすれば正しい構造を予測できると示唆される。このアルゴリズムを HalMol に実装した結果、Windows PC 上にて 30 秒程度で全ての KEGG 代謝物との比較を終了することができた(**Fig. 3**)。

本研究では、入力未同定ピークを単一の化合物由来に分離する問題と実験的検証の問題が残っている。生体抽出物は代謝物が混在するため、我々は HSQC-TOCSY や他の 3D スペクトルを用いた未同定ピークの分離作業を進めている。また予測結果の化合物の HSQC を測定しピークが一致する

かの実験的検証も進めているが、予測結果が得られたとしても、膨大な代謝物が存在するため、その化合物が入手できるとは限らず、検証することができない場合もあり、さらに検証結果が必ず当たるとは限らない。しかしながら予測した代謝物についての検証の結果得られた新しい化学シフトデータをさらに HalMol の化学シフトデータベースに繰り返し追加することで予測精度が向上してゆくと考えられる。

今回我々が開発した方法により、化学シフト予測で候補代謝物を絞り込み、グラフ同型判定により JC 値を求めることで未同定ピークがどの KEGG 化合物である確率が高いか評価することができた。さらに4種の既知化合物について検証した結果、実用可能な水準に達していることがわかり、現在我々は植物抽出物の未同定ピークに対して HalMol で得た予測結果の実験的検証を進めている。この方法はさらなる網羅的な代謝物一斉同定法の構築に貢献すると期待される。

参考文献

- [1] J. Kikuchi, and T. Hirayama, *Method Mol. Biol.* **358**, 273-286 (2007).
- [2] C. J. Tian, E. Chikayama, Y. Tsuboi, K. Shinozaki, J. Kikuchi and T. Hirayama, *J. Biol. Chem.* **282**, 18532-18541 (2007).
- [3] Y. Sekiyama and J. Kikuchi, *Phytochemistry* **68**, 2320-2329 (2007).
- [4] K. Akiyama, E. Chikayama, H. Yuasa, Y. Shimada, T. Tohge, K. Shinozaki, M.-Y. Hirai, T. Sakurai, J. Kikuchi and K. Saito, *In Silico Biology* **8**, 1-7 (2008).
- [5] *Anal. Chim. Acta.* **103**, 355-365 (1978).

Table 1. Ranks of correct compound by means of Jaccard coefficients in 12579 KEGG compounds.

compounds	ranks
Adenosine	2
Ile	3
Glucose	1
CoA	15

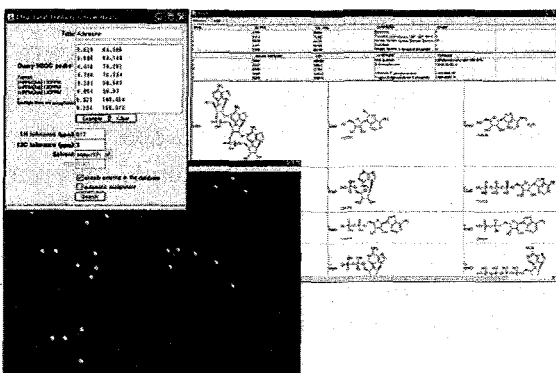


Fig. 3 Interface of Java software HalMol. Predicted chemical structures are visualized on 2D(right), and sub-structure of unknown peaks in 3D(left).

水分子の微視的構造とダイナミクスの研究

東京工業大学大学院理工学研究科, Universität Stuttgart Institut für Physikalisch Chemie

○渡辺 啓介, Klaus Müller, 小國 正晴

The nano layer silicate, Na-RUB-18, $\text{Na}_8\text{Si}_{32}\text{O}_{64}(\text{OH})_8 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$, accommodates Na-ions and water molecules. Na-RUB-18 has a high proton conductivity with water molecules. We carried out ^2H NMR of the deuterated Na-RUB-18 for the line shape study and the T_1 relaxation analysis to investigate the dynamics of the water molecules confined between the nano layers. The results indicate that the water molecules are highly mobile and jump each site. Then, we suggest a model that proton conducts via the water molecular translation. The model explains the anomaly of the proton conductivity at the high temperature because the high mobility of the water molecules can interfere a process of the proton conduction via 1-D hydrogen-bond network partially and temporarily.

[序] 制限細孔内の水の性質は, バルクの水に比べ一見特殊であり, 生命活動と地球輪廻に重要でないと思われるかもしれない。しかし, そうではない。物質輸送, 化学反応場, たんぱく質の3次構造形成などにおいて重要な役割を果たしている。

水の役割はプロトン輸送機構においても重要である。多くのプロトン伝導性の固体電解質膜やプロトン伝導体ガラスにおいて, 水は欠かせない存在であるが, これらの物質に共通する問題点として, 高温でプロトン伝導度が安定しないことが挙げられる。この理由としては, 一般に伝導体界面の水が高温での脱離が原因であると説明がなされているが, その詳細は明らかではない。そこで本研究では, 高いプロトン伝導性を持つ層状シリケート Na-RUB-18 結晶を取り上げた。Na-RUB-18 の構造は, 層間 1.1 nm の隙間に層状薄膜水を有しており, これがプロトン輸送の役割を担っている。(Fig. 1 参照) Na-RUB-18 は, ヒドロキシオンが層間を伝導することにより, 見かけ上プロトンが伝導しているようにみえると強く示唆されており, 大変ユニークな伝導体である。界面の構造がよくわかっている結晶性の Na-RUB-18 を対象とすることで, 水分子のダイナミクスをより深く議論し, かつ高温における層状薄膜水分子ダイナミクスとプロトン伝導機構に関する統一した, 詳細な説明が期待される。

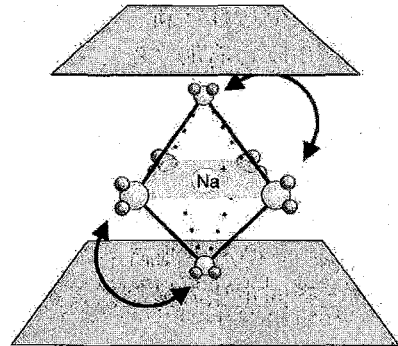


Fig. 1 the structure of the hydrated sodium ion between the layers of Na-RUB-18

キーワード 層状シリケート, 層状薄膜水, 水分子ダイナミクス

著者ふりがな わたなべけいすけ, くらうす・みゅらー, おぐにまさはる

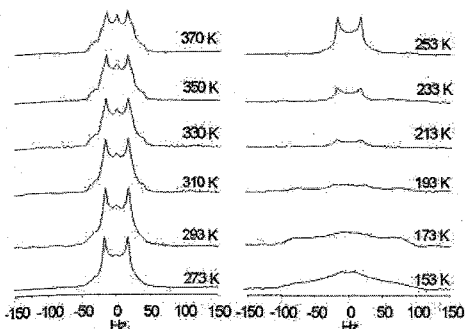


Fig.2 Variable temperature ^2H NMR of Na-RUB-18 spectra

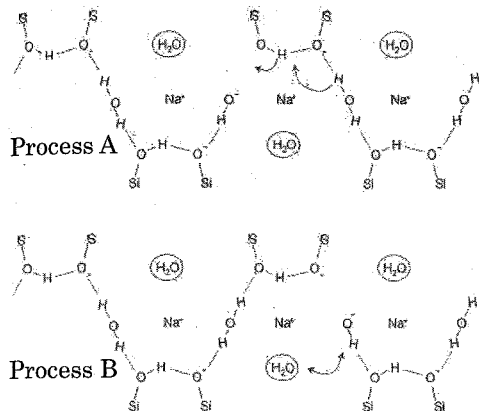


Fig. 3 Two models on the mechanism of the proton conduction ; a, the process via a one-dimensional hydrogen bond network; b, the process via a water molecular translation

以上における ^2H NMR スペクトルの積分強度の変化は小さい。仮に、層間水の脱離が進行するとすれば、センターピークはよりシャープで強度の大きいものになるはずであるが、シグナルとして観測されたセンターピークは、全体の数%である。したがって、290 K 以上での、プロトン伝導の異常性は、水の脱離によるものではなく、水の運動性による配置交換運動が大きく寄与していると結論づけた。

これまで考えられてきたプロトン伝導機構は、Fig. 3 に示すような、層間水分子と界面シラノール基で形成される一次元水素結合ネットワークを介してヒドロキシイオンが移動することにより、見かけ上、プロトンが伝導する（プロセス A）と考えられてきた。しかし、290 K 以上での水分子の高い配置交換運動は、当然プロセス A を担う一次元水素結合ネットワークを瞬間的に断ち切り、プロトン伝導の異常性に寄与することが考えられる。そこで、高温域では、プロトン伝導水分子そのものがキャリアとなってプロトンが伝導する（プロセス B）というモデルを提唱するにいたった。プロセス B の水分子がジャンプする配置間の距離は、Na-RUB-18 内部の水分子の並進拡散定数より見積もった平均自由行程 ($\langle(\Delta x)^2\rangle = 6Dt$) とよく一致する。したがって、高温域にプロトン伝導度の異常性は、水分子ダイナミクスが、競合するプロセス A と B の間のクロスオーバーによるものであると考えられる。

[実験・結果] 重水置換した Na-RUB-18 層間の ^2H NMR 測定を行い、 ^2H NMR スペクトルの温度依存性と線形解析を行い、さらに T_1 緩和時間を反転回復方により測定した。

Fig. 2 に、 ^2H NMR スペクトルの 370 K から 153 K における温度依存性を示す。すべての温度域において、層間水の重水素によるシグナルが観測された。

高温域（370 K から 293 K）において、センターピークと 1 成分のペークダブルット（分裂幅 34 kHz）が観測された。層間水分子の一部が、早い等方的な回転運動をしていることが示唆され、ペークダブルットの線形解析より、層間水は、Na イオンの周りで、配置交換を行っていることがわかった。

中温域（293 K から 213 K）において、1 成分のペークダブルットが観測され、その積分強度は温度の低下とともに減少していった。

低温域（213 K から 153 K）においては、ブロードなペークダブルット（分裂幅 150 kHz）が観測された。

中温域へと温度を下降させていくと、その運動の相関時間が長くなっていき、低温域ではついに、運動の凍結現象がブロードなペークダブルット（分裂幅 150 kHz）として観測された。

Na-RUB-18 のプロトン伝導度は、290 K 以上で異常性を示すことがわかっているが、290 K

ポスター賞発表要旨

Poster Award Abstracts

残基選択的交差飽和法の開発

(¹東大・院薬系、²東大・院工系、³名大・院理、⁴首都大東京・戦略研究センター、
⁵フランクフルト大学、⁶産総研・バイオメディシナル情報研究センター)

○小澤新一郎¹、五十嵐俊介¹、大澤匡範¹、鈴木勉²、甲斐荘正恒^{3,4,5}、嶋田一夫^{1,6}

**Development of residue selective cross-saturation method
 for modeling a large protein-protein complex**

¹Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, ²Grad. Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, ³Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., ⁴Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan Univ., ⁵Institute of Biophys. Chem., JW Goethe Univ. of Frankfurt, ⁶BIRC, AIST

○Shin-ichiro Ozawa¹, Shunsuke Igarashi¹, Masanori Osawa¹, Tsutomu Suzuki², Masatsune Kainosho^{3,4,5}, and Ichio Shimada^{1,6}

Structural analyses of protein-protein interactions are important in order to reveal their structural mechanism of the functions, since the initial step is the specific recognition of the target proteins. We previously developed NMR techniques, cross-saturation (CS) and amino acid selective CS (ASCS) methods. The ASCS method provides the candidates of the proximal residue pairs between two protein molecules, which enables to build a structural model of the complex with reference to the structural complementarity of the individual structures. In order to identify the proximal residue pairs unambiguously, we propose here a residue selective CS (RSCS) method, which uses a residue selective ¹H-labeled protein as a CS-donor. In this presentation, selectivity and efficiency of the residue selective ¹H-labeling as well as the application to a complex of ubiquitin and ubiquitin hydrolase will be discussed.

【背景・目的】 タンパク質の機能を解明するためには、タンパク質単体の立体構造に加え、標的分子との特異的な認識機構を解明する必要がある。

これまでに当研究室では、タンパク質-タンパク質複合体の分子認識様式を解明する NMR 手法として、結合界面残基を同定する交差飽和法 (CS 法、Takahashi et al., *Nat. Struct. Biol.* (2000)) および分子間の近接残基対を同定するアミノ酸選択的 CS 法

タンパク質間相互作用、交差飽和法、無細胞タンパク質合成、
 一残基選択的安定同位体標識、重水素標識

おざわ しんいちろう、いがらし しゅんすけ、おおさわ まさのり、
 すずき つとむ、かいのしょう まさつね、しまだ いちお

(ASCS 法、Igarashi et al., *JACS* (2008)) を開発してきた。ASCS 法は CS ドナー分子をアミノ酸選択的に ^1H 標識し、交差飽和源を一種類のアミノ酸に限定する手法である。複合体中の個々のタンパク質の立体構造が既知の場合、CS ドナー分子表面の ^1H 標識アミノ酸の分布と交差飽和を受けたアクセプター分子上のアミドプロトンの位置関係から、分子間の近接残基対を同定でき、複合体モデルが構築可能となる。

しかしながら、高分子量複合体においては分子表面積の増大とともにドナー分子表面に類似したアミノ酸分布パターンが複数出現し、近接残基対の一義的な決定が困難となることが問題であった。また、近接残基対同定にはタンパク質表面への出現頻度の低い芳香族アミノ酸などを CS ドナーとした ASCS 実験結果が重要となるが、そのようなアミノ酸が結合界面に存在しない場合にも、近接残基対の候補が複数挙がってしまう。

そこで本研究では、ドナー分子上の特定の一残基を ^1H 、他を ^2H 標識して交差飽和源を一残基のみに限定する「残基選択的 CS 法 (RSCS 法)」の開発を目的とした。RSCS 法においては交差飽和源となるアミノ酸残基があらかじめ分かっているため、近接残基対を一義的に同定することができる。したがって、CS 法、ASCS 法と組み合わせることにより、巨大タンパク質複合体においても複合体モデルの構築が可能となる。

【方法】 複合体の立体構造が既知である酵母ユビキチン (Ub ; 8.6kDa)-酵母ユビキチン加水分解酵素 C90S 変異体 (YUH ; 26kDa) 複合体に RSCS 法を適用することとし、CS ドナーである YUH 上の複数のアミノ酸残基に一残基選択 ^1H 標識を試みた。

まず、均一 ^2H 標識タンパク質調製を可能とする無細胞発現系 (Torizawa et al., *J. Biomol. NMR*. (2004), Etezady-Esfarjani et al., *J. Biomol. NMR* (2007)) を構築した。次に、amber 変異を導入した YUH 鋳型プラスミド、amber コドンを認識するサプレッサー-tRNA (stRNA) および stRNA に ^1H アミノ酸を付加するアミノアシル tRNA 合成酵素を調製した。stRNA は、CCA 付加酵素を添加した転写反応により高純度に調製し、目的の ^1H アミノ酸でアミノアシル化したものを用いた。これらを用いた均一 ^2H 標識無細胞発現系にて、一残基選択 ^1H 標識 YUH の発現を行った。

【結果】 構築した無細胞発現系において合成した標準タンパク質 Thioredoxin の NMR 測定の結果、90%程度の標識率にて均一 ^2H 標識タンパク質が調製可能であることが判明した。また、タンパク質の一残基選択 ^1H 標識に必要なアミノアシル stRNA を 80-90%という高い収率にて調製することに成功した。現在、これらを用いて、YUH の一残基選択 ^1H 標識および Ub-YUH 複合体に対する RSCS 実験の検討を進めている。

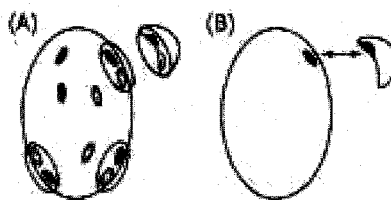


Fig.1 Schematic representation of ASCS (A) and RSCS (B) methods.

(A) Multiple candidates are postulated by ASCS results.

(B) A proximal residue pair can be unambiguously identified by RSCS results.

P002 Water 選択励起 pulse の開発—新 Water-LOGSY 法について。

東大院農・応生化¹, 東薬大・薬², 明星大・理工³

降旗一夫¹, 田代(下高原) 櫻子², 田代 充³

An efficient use of the WATERGATE-W5 sequence for observing a ligand binding with a protein receptor

a. Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo,

b. School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,

c. Department of Chemistry, College of Science and Technology, Meisei University,

Kazuo Furihata^a, Sakurako Shimotakahara^b and Mitsuru Tashiro^c

An efficient pulse sequence for observing a ligand binding with a receptor has been developed by incorporating the WATERGATE W5 sequence. In the conventional water ligand observed via gradient spectroscopy (WaterLOGSY) techniques, the water resonance is selectively excited using, e.g. the double-pulsed field gradient spin-echo (DPFGSE) sequence at the initial portion of pulse sequence. In the current version, the modified WATERGATE W5 sequence is incorporated at the initial portion of the pulse sequence, and the resonance at the water frequency can be selectively reserved by the modified WATERGATE W5 sequence. The efficiency of ligand-observed NMR screening techniques has been demonstrated using the human serum albumin (HSA)-tryptophan complex.

はじめに

レセプターと結合するリガンドを観察する方法として、Water LOGSY 法が知られている⁽¹⁾⁽²⁾。この方法は water を励起し、この磁化をレセプターに移動させ、レセプターと結合しているリガンドを検出する。通常は、water 励起パルスは選択的 soft pulse を使用することが一般的であった。一方、軽水溶液では、観測段階で如何に water を消去するかが問題であった。この方法の一つとして、soft pulse による WATERGATE 法が有効であるが、最近では、hard pulse による WATERGATE 法に取って代わるようになってきた⁽³⁾。そこで、励起段階においても、soft pulse による water 励起法と同じく、hard pulse による water の選択励起法が適用可能か検討した結果、WATERGATE W5 (0/180) pulse が選択励起 pulse として有効であることが判明した。この pulse を WaterLOGSY 法に応用し、良好な結果を得ることが判明したので報告する⁽⁴⁾。

パルス系列

Fig.1 に Water-LOGSY のパルス系列を示す。WATERGATE W5 (0/180) を用いた選択励起法による W5-WaterLOGSY パルスである。シグナルの観測段階では軽水シグナルを消去するために、DPFGSE 法による WATERGATE 法を採用している。

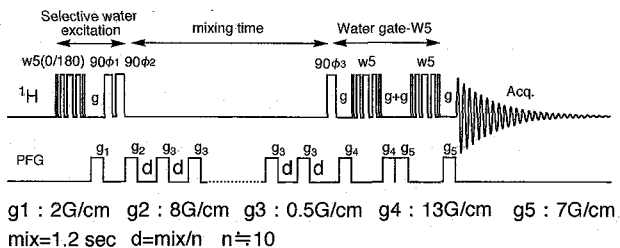


Fig.1. Pulse sequence of WATERGATE W5(0/180) LOGSY.

WATER-GATE-W5, WATER-LOGSY

ふりはたかずお、しもたかはら (たしろ) さくらこ、たしろみつる

WATERGATE 法は軽水サンプルを測定する際、不要な水シグナルを消去するために用いられてきたものである。WATERGATE pulse は励起 profile が示すように (Fig. 2)、観測中心が null points である。この null points を軽水の消去領域として設定した場合、水のシグ

ナルは観測されない。W5-WaterLOGSY 法はこの WATERGATE W5 pulse の null points を利用して軽水のシグナルのみを選択励起に応用したものである。方法としては、WATERGATE pulse がある場合と WATERGATE pulse がない場合の差スペクトルを測定することにより、水シグナルのみを観測する。

Fig. 3 において WATERGATE-w5(0/180) の pulse 系列を示す。WATERGATE W5 の flip angle は、 7.8° 、 18.5° 、 37.2° 、 70.4° 、 134.2° の長いパルストレインである。W5-WaterLOGSY 法で使用した WATERGATE W5 (0/180) pulse は図に示したように、WATERGATE W5 の各 flip angle を二等分にし、その位相を ϕ_1 、 ϕ_2 として積算をする。例えば、WATERGATE W5 (0°) は 7.8° (x) パルスを 3.9° (x) 3.9° (-x)、WATERGATE W5 (180°) は 7.8° (x) パルスを 3.9° (x) 3.9° (x) とし、WATERGATE W5 (0) と WATERGATE W5 (180) の積算により選択測定を可能にした。

Fig. 4a は WATERGATE W5 (180x)-90-ACQ. で観測したスペクトルであり、Fig. 4b は WATERGATE W5 (0x)-90-ACQ. で観測したスペクトルである。Fig. 4c は 4a と 4b のス

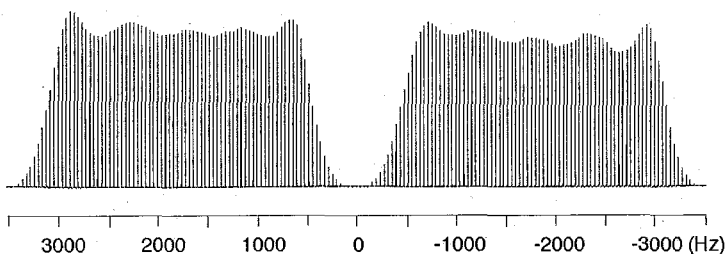


Fig. 2. Profiles of the water gate W5 acquired using the pulse sequence (90-w5-w5-acq). Resonance offsets were recorded at 40 Hz increments.

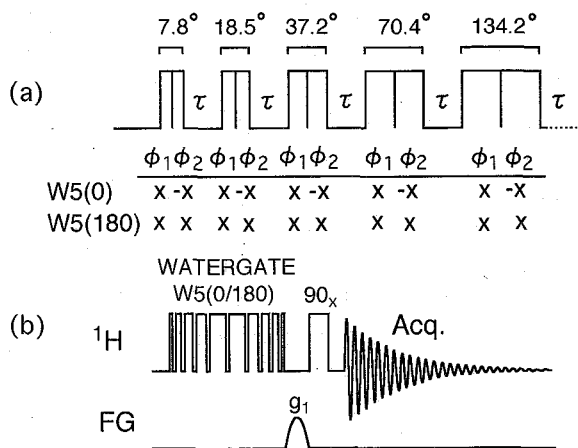


Fig. 3. (a) WATERGATE W5(0/180) sequence (b) Water selective excitation pulse using the WATERGATE W5(0/180) sequence.

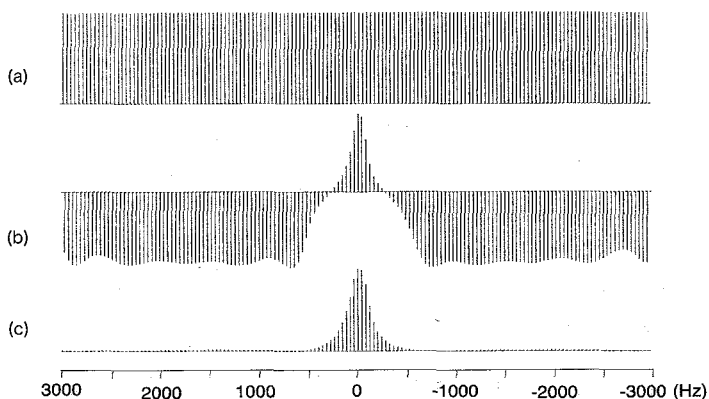


Fig. 4. Profiles of the water signal acquired using the pulse sequence of Fig. 1(b). Resonance offsets were recorded at 40 Hz increments. (a). WATERGATE-W5(0) (b). WATERGATE-W5(180) (c). WATERGATE-W5(0/180)

ペクトルを加算することにより、水シグナル以外は差し引きされ、水シグナルのみが選択に観測されている。実際は 2 scan を基本にした連続した積算によりスペクトルを得る。WATERGATE W5 LOGSY のパルスは NOESY の最初の 90 パルスをこの WATERGATE W5 (0/180)-90 のパルスに置き換えたものである。なお、WATERGATE W5 を使用するのとは他の WATERGATE pulse に比べ、シグナルの選択性が高いために使用した。

Radiation damping について

軽水シグナルの観測においては radiation damping の問題が深刻である。この radiation damping が生じた場合は水磁化の緩和を非常に早くし、シグナルの線幅を広くし、磁化の移動が生じない。この問題の解決は既にいくつかの方法が提案されている。

本方法では、軽水サンプルでの NOESY 測定に応用された方法を採用する。この方法は、NOESY の mixing time の間、長い弱いグラジエントを連続的に加えることにより、radiation damping を抑さえるものである。本法では、Fig. 1c に示されるように、最初に短い強いグラジエント (g2) を加える。このグラジエントにより、x-y 平面の磁化は消去され、相当の radiation damping 効果を抑えることは可能であったが、それでも磁場が漏洩し radiation damping を抑え切るには不十分であった。そのため更に、非常に弱いグラジエント (g3) を断続的に加える方法を採用した。このグラジエントの設定に関して、長いグラジエントを連続的に加える方法を採用することは可能であるが、条件設定のミス等により probe にダメージを与える恐れがあるため、実際には断続的なグラジエントを使用した (Fig. 1)。Fig. 5 に断続的なグラジエントを入れた場合と入れない場合の WaterLOGSY のシグナルの感度の違いを示す。断続的なグラジエントの効果により、radiation damping を抑え、感度が上がっていることがわかる。

Water LOGSY スペクトル

モデル化合物として、human serum albumin (HSA) 0.1mM と tryptophan 2mM の complex、(10% D₂O, pH 7.2) を使用した。Fig. 6a は tryptophan と albumin (HAS) の mixture の pre-saturation の 1D スペクトルである。このスペクトルからは tryptophan が albumin (HAS) に結合しているか判明しない。

Fig. 6b は WATERGATE W5 (0/180)-LOGSY のスペクトルである。飽和され

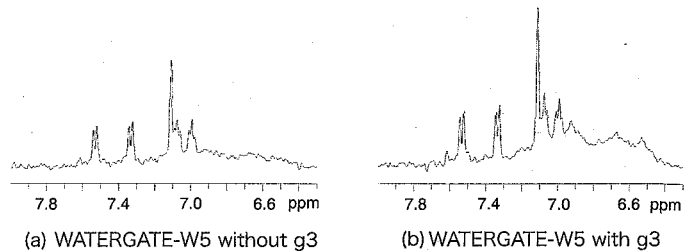


Fig. 5. Radiation Damping suppression in mixing period of WATERGATE-W5

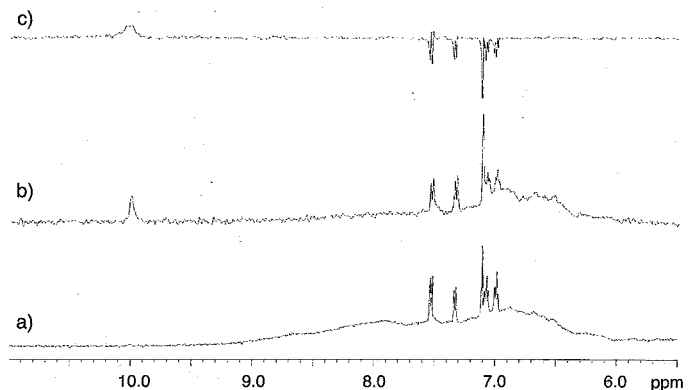


Fig. 6. WATERGATE-W5-LOGSY expand spectra
 (a). Presaturation 1D spectrum (mixture)
 (b). WATERGATE-W5 LOGSY spectrum (complex)
 (c). WATERGATE-W5 LOGSY spectrum (Tryptophan)
 0.1mM Human Serum Albumin (HSA) solution in the presence of 2.0 mM L-Tr

た水の磁化が albumin(HAS)に移動し更に albumin(HAS)に結合した tryptophan をも飽和させていることが示される。Tryptophan のシグナルがタンパク質 albumin(HAS)と同じ方向で観測されることにより、tryptophan が albumin(HAS)と結合することが示された。Fig. 6c は tryptophan のみの WaterLOGSY スペ

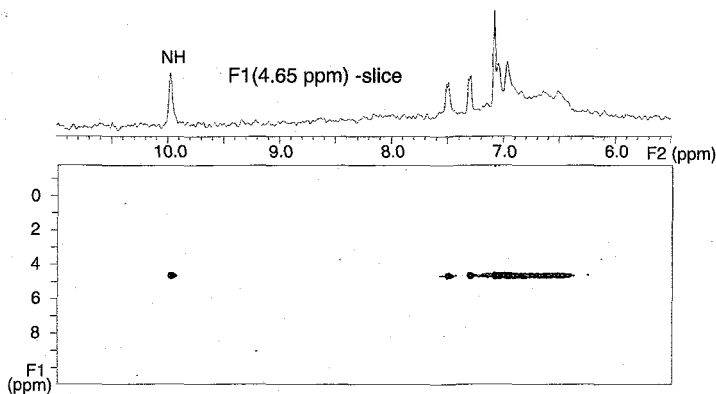


Fig. 7. 2D spectrum of the WATERGATE W5(0/180) LOGSY. f1 x f2=64 x 2048 , 16scans

クトルである。Tryptophan 単独のスペクトルでは LOGSY シグナルはタンパク質 (大きな分子は負の NOE) とは逆方向のシグナルを与える (小さな分子は正の NOE)。この tryptophan のシグナルの向きにより、タンパク質との結合の有無を判断できる。尚、LOGSY 効果を定量する場合は、complex シグナル強度 (Fig. 6b) と単独シグナル強度 (Fig. 6c) との差を取る必要がある。

Fig. 7 に WATERGATE W5 (0/180) LOGSY の 2D スペクトルを示す。このスペクトルは 1D-スペクトルにおいて、WATERGATE W5 (0/180) pulse による軽水の選択励起により、LOGSY スペクトルが確実に観測されるか示すために測定したものである。2D 測定の結果、F₁ 軸の水の化学シフトの位置にのみ LOGSY シグナルを与えていること、また、対角軸には tryptophan 及び albumin のシグナルは観測されず、軽水の選択励起実験として、WATERGATE W5 (0/180) pulse は十分有効であることが示された。

まとめ

レセプターと結合するリガンドを観察する方法として、STD (saturation transfer difference) 法が知られている⁽⁵⁾。この STD 法の一つの変法として Water LOGSY 法がある。STD 法はタンパク質のある部分を照射してタンパク質の全体へ saturation を及ぼす。それに対して、Water-LOGSY 法は水溶性のタンパク質という制限があるものの、Water を照射することにより、タンパク質全体に容易に saturation を及ぼすことができる点の特徴である。この saturation の度合いがスペクトル感度に影響する。W5(0/180)-WaterLOGSY 法は hard pulse による選択励起法を用いた WaterLOGSY 法である。この方法は soft pulse を用いないために、それだけ測定条件の設定は容易である。重水素置換することなく、軽水サンプルで薬剤スクリーニング、およびレセプターとリガンドの相互作用解析に使用でき、条件設定が容易であることは本法の大きな利点である。

- 1). C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tato, M. Veronesi, A. Vulpetti, M. Sundstrom, J. Biomol. NMR 2000, 18, 65.
- 2). C. Dalvit, G. P. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, B. J. Stockman, J. Biomol. NMR 2001, 21, 349.
- 3). M. Liu, X. Mao, C. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, J. Magn. Reson. 1998, 132, 125.
- 4). K. Furihata, S. Simotakahara and M. Tashiro, Magn. Reson. Chem. 2008, 46, 799-802
- 5). M. Mayer, B. Meyer, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 6108.

DIORITE 法による
mRNA capping enzyme のドメイン配向解析

(¹広島大院・理・数理分子、²三菱化学生命研、³PRESTO/JST)
○岸本浩一¹、田中利好²、河野俊之²、楯真一^{1,3}

Domain orientation analysis of the mRNA capping enzyme by DIORITE

¹Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima Univ.,

²Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences,

³PRESTO/JST

○Hirokazu Kishimoto¹, Rikou Tanaka², Toshiyuki Kohno², Shin-ichi Tate^{1,3}

Abstract

We have been developing a new approach for determining the alignment tensor for a weakly aligned protein solely based on the orientation dependent TROSY shift changes, which is named as DIORITE. This approach can expand the domain orientation analysis of proteins to higher molecular weight. In this presentation, we report the domain orientation analysis of the mRNA capping enzyme (38kDa) by using DIORITE. Because of the low solubility and the thermal instability of the protein, the conventional RDC approaches were not useful for the analysis. Two crystal structures are reported for the protein, they are open and close forms and both of them are crystallized as the GTP bound form, but no apo-form structure is available. The present DIORITE analysis has shown that the apo-form of the protein is different from the open-form crystal structure; the OB domain is rotated by 78 deg. from the corresponding X-ray structure. This observed structural difference can be explained by the crystal packing effect for the crystal structures, which will be discussed in detail in relation to its biological function.

【緒言】

私たちは大きな振幅の分子構造変化（分子形態変化）を原子分解能で定量的に解析することを目的として、独自の NMR 構造解析技術である DIORITE 法の開発を進めている。本研究で対象とする mRNA capping enzyme（以下 CE）は、GTP 共存下で open, close 型と分類される 2 つの異なる構造が結晶構造解析から得られている (Fig.1)。今回は結晶構造が得られていない基質がない状態での CE のドメイン相対配向解析を行った。CE は 38kDa と分子量も大きく、溶解度が低いうえ熱的にも不安定（25°C 以下でしか測定ができない）であるため、RDC を用いた従来の NMR 法ではドメイン配向

Keywords : NMR, deuterium label, CSA, domain orientation, capping enzyme

きしもとひろかず、たなかりこう、こうのとしゆき、たてしんいち

解析を行うことができなかった。 $^2\text{H}^{15}\text{N}$ 標識した CE を用いて分子配向依存的な TROSY 化学シフト変化から DIORITE 法により CE を構成する 2 つのドメインそれぞれの配向テンソルを決定し、それにもとづいてドメイン間の相対配向を決定することに成功した。

【実験・結果】

異方性圧縮アクリルアミドゲルにより CE を磁場に対して弱く配向させることで分子配向依存的な TROSY シフト変化量を明瞭に観測できた(Fig.2)。

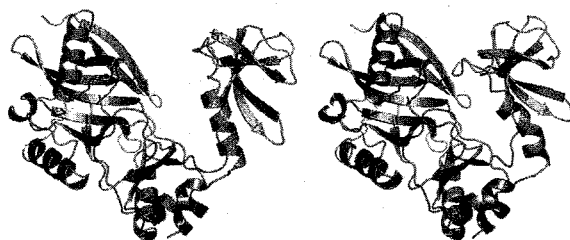


Fig.1 Two crystal structures of CE : open state (left) and close state (right) (PDB : 1CKN)

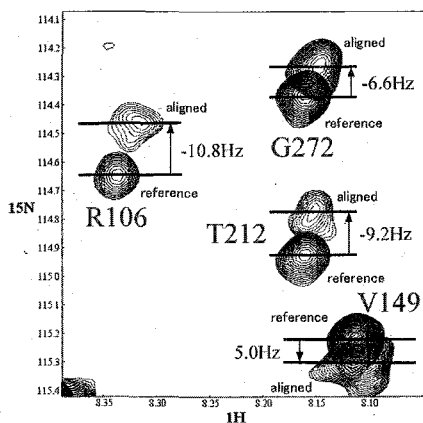


Fig.2 Trosy shift changes for CE in compressed and uncompressed gel.

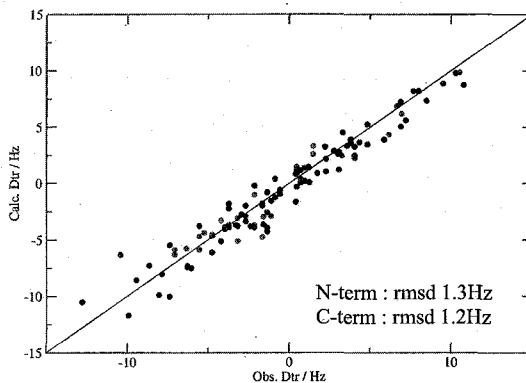


Fig.3 Observed and back calculated Trosy shift changes.

このシグナルの変化量から、対応するアミノ酸残基のペプチド面の磁場に対する配向情報を獲得し、そのデータを N 末端側、C 末端側の各ドメイン単位で集積することで各ドメインの磁場配向テンソルを決定した。Fig.3 はその配向テンソル解析の結果であり、観測された TROSY シフト変化量と計算値(back calculation)の一致度を示している。このことから、各ドメインに対して精度良く配向テンソルが決定できたといえる。

各ドメインで計算された配向テンソル値が一致するようにドメイン構造を回転させ得られた構造を、open 型結晶構造と比較した。基質のない状態では、CE の 2 つのドメインは結晶中の open 型構造よりもさらに開いた構造を持つことが明らかとなった。この違いは、open 型結晶構造に対するクリスタルパッキングの効果により説明できる。発表では、得られたドメイン配向についての生物学的な意味についても議論する予定である。

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

¹東大・院薬系、²産総研 バイオメディシナル情報研究センター
○豊永翔¹、大澤匡範¹、横川真梨子¹、嶋田一夫^{1,2}

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

¹ Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, ² BIRC, AIST

Shou Toyonaga¹, Masanori Osawa¹, Mariko Yokogawa¹ & Ichio Shimada^{1,2}

We previously reported that bead-linked proteoliposomes (BPL) keep the high concentration of the membrane protein in the lipid bilayer. Although NMR signals from bead-containing sample such as BPL exhibit line-broadening due to the heterogeneity of the local magnetic field, we applied HR-MAS to overcome the problem, resulting in the identification of the interface by transferred cross-saturation on ubiquitin (Ub) in solution with yeast ubiquitin hydrolase 1 (YUH) that was immobilized on Zn-NTA silica beads. However, the nonspecific interactions of the Zn-NTA moiety with YUH and Ub reduced the ligand binding activity of the YUH and the spectral sensitivity of Ub, respectively. Here, we introduced new silica beads with carboxymethyl groups, which retain the 85% of the activity of the immobilized YUH and accomplish the 4-fold increase the S/N ratio for the NMR signals of Ub.

【背景・目的】

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ンネル KcsA を再構成した BPL とチャン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) 法により解析することに成功した (Yokogawa M. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005)。また、ビーズなどの不溶性成分の存在による NMR スペクトルの広幅化に対して、溶液中の酵母ユビキチン (Ub: 8.6kDa) と 10xHis タグを介して Zn-NTA silica beads に固定化した酵母ユビキチン加水分解酵素 (YUH: 26kDa) との間の TCS

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

実験に HR-MAS を適用することで高感度・高分解能な NMR スペクトルを取得し、分子間相互作用の構造生物学的解析に成功した。(第 46 回 NMR 討論会 YP01)

一方で、Zn-NTA silica beads に対する Ub の非特異吸着のため、NMR スペクトルの感度が理論値の 25%程度まで低下すること、固定化した YUH の Ub 結合活性が 10%以下まで低下することが問題となっていた。これまでの検討の結果、この非特異吸着は Zn などの 2 価カチオンが NTA に結合すると顕著に起こることが明らかとなった。

そこで今回は、Ub の NMR スペクトルの感度の向上と、固定化 YUH の Ub 結合活性の向上を目的として、固定化担体として新たに carboxymethyl (CM)-silica beads を導入し、その性状解析を行なった。

【方法】

(1) 固定化 YUH の Ub 結合活性の評価

YUH を CM-silica beads (AGC Si-Tech Co., Ltd.) に対して 90-660 μ M 固定化し、buffer (50mM NaPi, 50mM NaCl, pH6.5) にて平衡化後、1.3mM の Ub 溶液を添加した。液相中の Ub を定量することで、固定化 YUH と結合した Ub の量を算出し、YUH の Ub 結合活性を定量した。

(2) Ub の NMR スペクトルの感度の評価

500 μ M 15 N-Ub 溶液と、同溶液を CM-silica beads および YUH 固定化 CM silica beads と懸濁したサンプルに関して HSQC スペクトルの S/N 比を比較することで、Ub の NMR スペクトルの感度を評価した。

(3) MAS 条件下での TCS 法による相互作用界面の同定

2mM 均一 2 H, 15 N 標識 Ub 溶液 (50mM NaCl, 50mM NaPi, pH6.5, 80%D₂O) にて YUH 非固定化ビーズ、260 μ M 非標識 YUH 固定化ビーズをそれぞれ平衡化し、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 $^{\circ}$ Cにおいて、TCS 法の測定を行った。

【結果・考察】

Amine coupling により CM-silica beads に固定化された YUH は、NMR 測定条件下において Ub 結合活性を 85%以上保持していることが判明した。また、Ub の S/N が試料中の液相の体積比から算出される理論値とほぼ一致したことから、従来用いていた Zn-NTA silica beads と比較して 4 倍の S/N の向上に成功した。また、対照実験として行った YUH 非固定化ビーズとの TCS 実験において顕著な交差飽和は観測されなかった。以上のことから、Ub、YUH ともにビーズとの非特異吸着は Zn-NTA silica beads の場合と比較して大幅に抑制されていることがわかった。

今回導入した新規担体を用いることにより、固定化蛋白質との TCS が高感度で観測できるようになった。このことは、本手法の適用範囲を、より低収量・不安定なタンパク質へと拡大することにつながる。

【謝辞】

CM-silica beads をご提供くださいました AGC Si-Tech Co., Ltd. に感謝いたします。

SAIL 法を用いたタンパク質の動態解析

(¹名大院・理、²(株)SAIL テクノロジーズ、³首都大東京)
○武田光広¹、小野明²、寺内勉²、甲斐荘正恒^{1,3}

Investigations of protein dynamics by the SAIL method

Mitsuhiro Takeda¹, Akira Mei Ono², Tsutomu Terauchi², Masatsune Kainosho^{1,3}

¹Graduate School of Science, Nagoya University²SAIL Technologies, ³Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University

Abstract

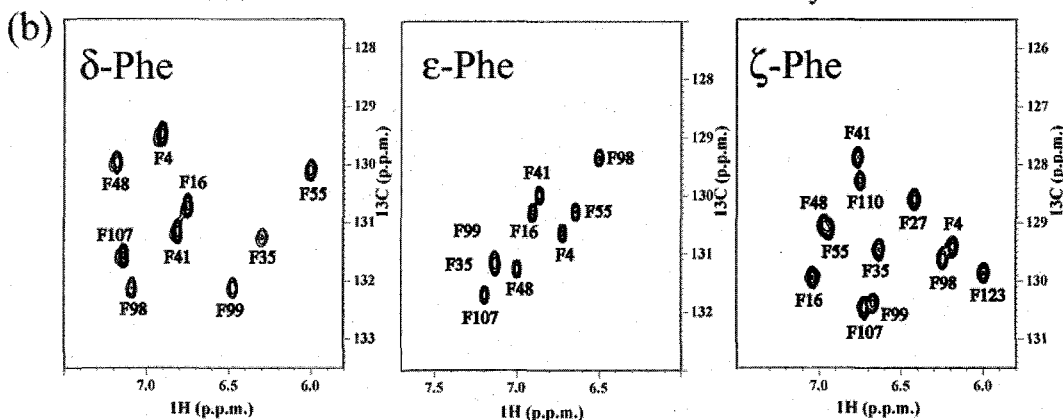
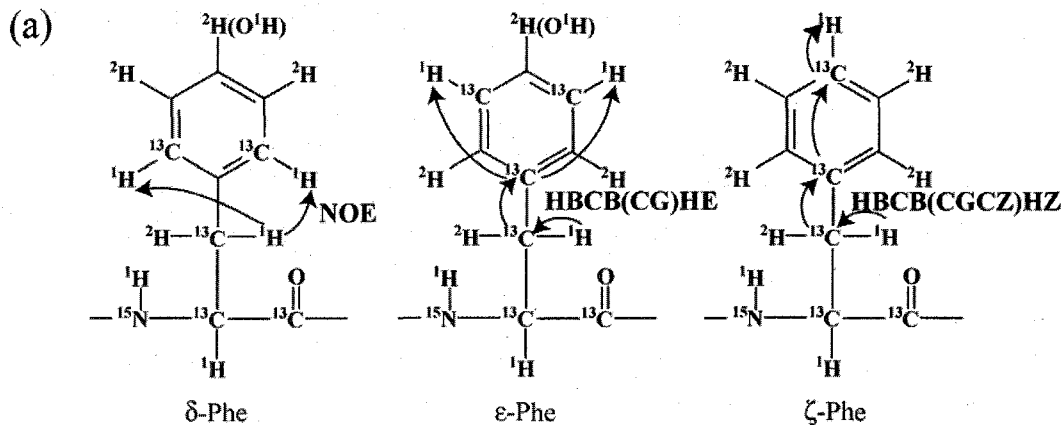
The stereo-array isotope labeling (SAIL) method has been widely recognized as the optimal isotope labeling strategy for the structure determination of proteins by NMR. This new approach is also expected to yield innovative methods for studying protein dynamics. Here, we have explored the possibilities of using the ring flipping behaviors of phenylalanine (Phe) and tyrosine (Tyr), which tend to exist in the hydrophobic core of proteins, to characterize the large amplitude, slow motion. This kind of motion, which is often called “the breathing motion”, occurs on a much slower time-scale than those studied by relaxation measurements, and thus might be closely related to various biological events. Preliminary studies using proteins specifically labeled with various types of SAIL-Phe and -Tyr will demonstrate that the selective SAIL method will open unprecedented opportunities to exploit protein dynamics.

There are growing interests in protein dynamics on the slow time scale, ranging from micro-seconds to seconds, which are likely to be related to their biological functions. However, little is known about the biological relevance of the large amplitude, slow breathing motion of the hydrophobic core of a protein. However, researchers have known for more than 20 years that most of the aromatic rings of Phe and Tyr residues embedded in the tightly packed hydrophobic core regions of proteins can rotate around their C_β-C_γ axes fast enough to average the chemical shifts of the δ- and ε-proton pairs of the rings. This was, in fact, one of the most significant contributions of early biological NMR studies, which completely changed the static views of globular protein structures obtained by X-ray crystallography. The aromatic ring flipping requires cooperative movements of the nearby residues in order to allow the hydrophobic core to render sufficient space for such motions. These phenomena, which can only be studied by NMR spectroscopy, have attracted much attention, and many physical chemistry studies have been performed. However, it has been difficult to correlate such large amplitude breathing motions to the biological functions of proteins, since detailed NMR analyses for aromatic ring resonances are only possible for small proteins, such as BPTI, HPr, and cytochrome *c*. Even for medium-size proteins, such as calmodulin (17kDa) and EPPIb (18 kDa), the NMR signals of the Tyr and Phe rings are very difficult to analyze, especially for the residues whose rings flip at slow or medium rates. Since the residues that show flipping rate-dependent NMR signals are the ones that yield quantitative information for the breathing motion, we have to develop a general NMR method to observe the aromatic ring resonances for Phe and Tyr flipping at any rate.

キーワード SAIL, 芳香環の回転運動、運動性

たけだ みつひろ、おの あきら、てらうち つとむ、かいのしょう まさつね

The aromatic amino acids that we have developed for the SAIL method have alternative ^{13}C , ^2H -labeling patterns, as shown in the figure. The ring signals of these SAIL aromatic amino acids lack one-bond ^{13}C - ^{13}C scalar couplings and strong ^1H - ^1H dipolar couplings within the ring moieties. Therefore, the ring signals become enormously simplified and thus can be observed with extremely high sensitivities. The unambiguous assignments can be achieved either by the straightforward NOE connectivity between H_δ and H_α , or by the through ^{13}C - ^{13}C coupling networks, as shown in the figure.



(a) Chemical structures of various types of SAIL Phe and Tyr, and the assignment pathways. (b) ^1H - ^{13}C HSQC spectra of EPPIb labeled with δ -, ϵ - and ζ -Phe, respectively. For EPPIb labeled with the δ - and ϵ -Phe types, the signals due to 3 of the 12 Phe residues in the protein were broadened beyond detection, due to intermediate ring flipping rates, whereas all 12 peaks were clearly observed, since the ζ -signals are free of the ring flipping rates.

In this presentation, the applications of various SAIL Phe and Tyr to study the aromatic ring flipping motion will be reported for EPPIb (*E. coli* peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase) and calmodulin.

Acknowledgement

This work was supported by Targeted Proteins Research Progress (TPRP) from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan

P006

可変圧力 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC NMR による分子内 Cavity の水と
構造揺らぎ-T4 リゾチーム

(¹ 近大院・生物理工, ² 理研 Spring-8, ³ Inst. Mol. Biol. and Dept. Chem.,
Univ. of Oregon, ⁴ 理研 GSC, ⁵ 東大院・理, ⁶ Dept. Biophys. Chem., Univ. of Groningen, ⁷ 近
大・高圧力蛋白質研究センター)

○ ^{1,2} 前野 寛大, ² 北原 亮, ³ Frederick W. Dahlquist, ^{4,5} 横山 茂之, ⁶ Frans A. A. Mulder,
⁷ 赤坂 一之

Study of fluctuation and hydration of internal cavity by
variable pressure $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC NMR – T4 lysozyme –

¹ Grad. Sch. of Biology-Oriented Sci. and Tec., Kinki Univ., ² RIKEN SPring-8 Center, ³ Inst.
Mol. Biol. and Dept. Chem., Univ. of Oregon, ⁴ RIKEN GSC, ⁵ Grad. Sch. of Sci., Univ. of
Tokyo, ⁶ Dept. Biophys. Chem., Univ. of Groningen, ⁷ High Pressure Protein Research Center,
Kinki Univ.

^{1,2} Akihiro Maeno, ² Ryo Kitahara, ³ Frederick W. Dahlquist, ^{4,5} Shigeyuki Yokoyama, ⁶ Frans A.
A. Mulder and ⁷ Kazuyuki Akasaka

In general, protein in solution fluctuates among multiple conformations, differing in partial molar volume and their population, at atmospheric pressure. Pressure shifts the equilibrium distribution of relative conformers through partial volume differences among them. Thus, variable pressure NMR allows one to explore protein dynamics in a wider conformational space and time scale. In this study, $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC were carried out under high pressure (from 3 MPa to 300 MPa) at pH 6.0, 298 K against T4 lysozyme cavity mutant, increasing in volume of their cavity due to amino acid displacement of Leu99→Ala. With increasing hydrostatic pressure, preferential reductions of cross-peak intensities were observed on the side chain methyl groups surrounding a large cavity. Generally, since partial volume reduction of the protein accompany with the water penetration into the internal cavity, we could reveal directly the correlation between slow conformational fluctuation and selective hydration of internal cavity.

[緒言]

一般に溶液中の蛋白質は、基底構造(いわゆる天然構造)から変性構造に至るまでの広い構造空間において異なる部分モル体積をもつ多重構造の間で熱力学的平衡状態にある。しかし、生理的条件下(常温・常圧)では、自由エネルギー的に最安定な基底構造が“メジャー”な構造となるため、それよりも自由エネルギー的に不安定な“マイナー”な構造を分光学

キーワード : 圧力, 蛋白質ダイナミクス, 遅い構造揺らぎ, キャビティ

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

的に捉える事は困難である。これは、状態間の自由エネルギー差と分布率が指数関数の関係にあるため、僅かな自由エネルギー差が大きな分布率の差を生じるからである(式1)。

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \therefore K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (\text{式1})$$

ここで、 ΔG , R , T , K はそれぞれ状態間のギブズ自由エネルギー差、気体定数、絶対温度及び平衡定数を示す。我々が唱える“体積原理”に従うと、蛋白質の部分モル体積の減少と立体構造形成の程度とは平行な関係にある (R. Kitahara et al., *J. Mol. Biol.* (2002)**320**, 311)。圧力擾動は、各状態間の部分モル体積差を通じて“マイナー”構造の分布率上昇を誘導すると共に、より体積が小さい構造状態が圧力下で安定化される($\Delta G = \Delta G^0 + \Delta Vp$) (K. Akasaka., *Chem. Rev.* (2006)**106**, 1814-1835)。これにより、可変圧力NMR法を用いた広い構造空間・時間域で生じる蛋白質構造揺らぎの原子レベルでの探索が可能となる。今回は、アミノ酸置換によりC末端側の分子内キャビティ体積を人工的に増加させたT4リゾチーム変異体 L99A (164残基)について、遅い時間スケールで生じる構造揺らぎと分子内キャビティの水和に関して $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC の結果を中心に議論する。

【結果と考察】

L99A 変異体に対して1-3000気圧の圧力範囲で二次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ TROSY, $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC 測定(^1H -800.16MHz, 298K, pH6.0)を行った。その結果、加圧に伴に多くの相関信号で強度の減少とそれに伴う線幅の増大が確認された。 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ TROSY スペクトルにおいて加圧に伴う典型的な変性構造由来の相関信号 (^1H : 8.0-8.6 ppm, ^{15}N : 120-128 ppm, ^{13}C : ppm)が確認されなかった事から、L99A 変異体で観測された線幅の増大は、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への構造転移と、その構造転移速度が加圧に伴に遅くなった事を意味する。圧力下で著しいNMR信号の線幅増大が観測されたアミノ酸残基をL99Aのリボンモデル上にプロットしたところ、主に Helix4, 5, 6 からなる特定の領域に集中している事がわかった。ここで Helix4, 5, 6 は体積増加したキャビティの周辺領域と一致する。興味深いことに、側鎖メチル基における圧力下での相関信号のプロードニングは、体積増加したキャビティを直接形成する疎水性アミノ酸のみで観測された (Figure1)。高圧下で安定化される“マイナー”構造は蛋白質の水和による部分モル体積の減少を伴うと考えられる事から、T4リゾチーム L99A が水和の進んだ複数のフォールド構造間で揺らいでいる事が示された。同時に、蛋白質の遅い時間スケールで生じる構造揺らぎが分子内キャビティの選択的な水和と密接に関わっている事が強く示唆された。

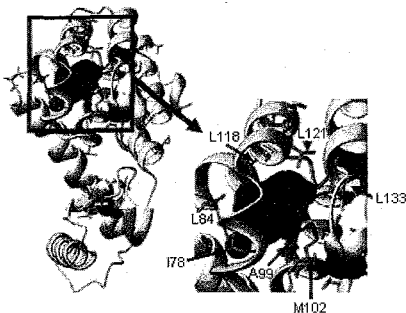


Figure 1. The location of several side chain methyl groups were shown by green sticks, indicating preferential reductions of their cross-peak intensities at 3000 bar. All of residues of side-chain methyl detected on $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC spectra were drawn by sticks, except for green ones. Navy-blue spheres correspond with the internal cavities.

非線形サンプリング法を用いた迅速な異種核 4 次元 NMR 測定法の有用性の検証

(¹ 首都大学東京(東京都立大), ²CREST/JST, ³Cambridge 大,

⁴ブルカーバイオスピ)

○重光 佳基^{1,2}, 土江 祐介^{1,2}, 三島 正規^{1,2}, Daniel Nietlispach³,
Markus Wälchli⁴, 伊藤 隆^{1,2}

Applications of nonlinear sampling scheme to four dimensional triple resonance NMR spectroscopy.

○Yoshiki Shigemitsu^{1,2}, Yuusuke Tsuchie^{1,2}, Masaki Mishima^{1,2}, Daniel Nietlispach³,
Markus Wälchli⁴ and Yutaka Ito^{1,2}

(¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; ²CREST/JST;

³Department of Biochemistry, University of Cambridge; ⁴Bruker 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. Applications of recently proposed new acquisition schemes for speeding up multidimensional NMR experiments are therefore expected to be extremely beneficial for 4D experiments. In this presentation, we demonstrate the benefits of this nonlinear sampling and 3D MaxEnt processing in 4D triple-resonance experiments. We applied this nonlinear sampling and 3D MaxEnt processing to 4D ¹³C/¹⁵N separated NOESY, and then we evaluated the expected artefacts in 4D spectra arising from nonlinear sampling and MaxEnt processing, such as the mis-calibration of intensities and the emergence or disappearance of cross peaks.

[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るが、新しい間接観測軸の導入による感度の低下、間接観測軸のデータポイントの不足に起因するスペクトル分解能の不足、そして測定時間が長時間に及ぶ事、などの問題などから、蛋白質の解析に日常的に用いられる事は多くなかった。今回我々は、近年注目を集め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、3重共鳴4次元 NOESY 測定に適用する事を試み、それぞれについてその有用性について検証を行ったので報告する。

キーワード : 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

著者ふりがな : しげみつ よしき, つちえ ゆうすけ, みしま まさき

だにえる にーとりすぱっは, まるくす づえるひり, いたう ゆたか

[実験]

NMR 測定には、均一に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識された高度好熱菌由来 TTHA1718 遺伝子産物(66 残基)を試料に用い、 37°C で測定を行った。

4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ separated NOESY 測定は、従来法 $512^*(^1\text{H}^{\text{N}}) \times 32^*(^1\text{H}) \times 24^*(^{13}\text{C}) \times 8^*(^{15}\text{N})$ の測定を行い(データ①)、このデータポイントから nonlinear sampling のシミュレーションのデータを作成し解析を行った。作成したシミュレーションのデータは、 $512^*(^1\text{H}^{\text{N}}) \times 3072$ random sampling complex points (データ②)、 $512^*(^1\text{H}^{\text{N}}) \times 1536$ random sampling complex points (データ③)、 $512^*(^1\text{H}^{\text{N}}) \times 768$ random sampling complex points (データ④) の 3 種類である。

[結果・考察]

Figure 1a, 1b, 1c, 1d は上記 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ separated NOESY 測定のうち①, ②, ③, ④のデータについて 3D MaxEnt で処理したのから、 $^1\text{H}^{\text{N}}$: 8.351 ppm, ^{15}N : 129.32 ppm の化学シフトに相当する 2D ^1H - ^{13}C 平面を切り出したものである。このように nonlinear sampling を用いても、高分解能で良好なスペクトルが得ることができた事が分かった。しかしクロスピークによっては、データポイントが少なくなるにつれて感度の低下あるいはピークの消失が観測される事が分かった(図中点線○印)。そこで帰属が完了した従来法及びシミュレーションの結果を用いて、各ピーク強度の比較を行った結果、従来法のピーク強度と比較し、測定データポイントが少なくなるにつれて、従来法でのピーク強度が低いものほど、ピーク強度がより低く見積もられる傾向がある事が判明した。この事は、データポイントを削減する事により、低強度の NOE が観測されにくくなる事を示唆している。

さらにこれら帰属のついたピークのみを用いて構造計算を行った結果、低強度の NOE が見えにくくなるため精密性が低下していくものの、測定時間にして約 15 時間に相当する 1/8 にまでデータポイントを削減しても正確なグローバルフォールドが得られる、という結果が得られた。そのため、この測定を応用する事で、構造未知の蛋白質の立体構造を決定する際に短時間で重要な手掛かりを得られる事が期待できる。

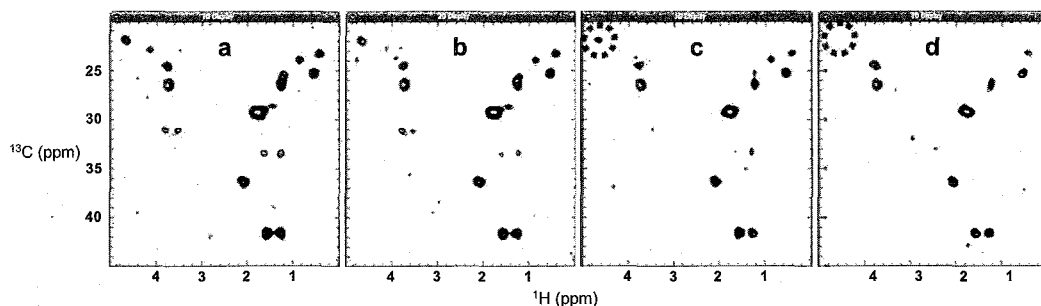


Figure 1a, 1b, 1c, 1d : Contour plots of the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ planes ($^1\text{H}^{\text{N}}$ chemical shift : 8.351 ppm, ^{15}N chemical shift : 129.32 ppm) from 4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ separated NOESY spectra.

Brevibacillus choshinensis 分泌発現系を用いた¹⁵N 安定同位体標識試料作成

三菱化学生命科学研究所 (MITILS)

○谷生道一, 田中利好, 田中剛史, 河野俊之

¹⁵N isotope labeling of a protein secreted by *Brevibacillus choshinensis* for NMR study
Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)

○Michikazu Tanio, Rikou Tanaka, Takeshi Tanaka, and Toshiyuki Kohno

The *Brevibacillus choshinensis* expression system is useful to produce recombinant proteins with disulfide bonds as secreted proteins. To use this expression system for protein NMR studies, we developed a method for the ¹⁵N-isotope labeling of a recombinant protein. We found that the labeled protein can be produced by using the ¹⁵N labeled medium commonly used in the *Escherichia coli* expression system, and that the stable isotope incorporation rate is approximately 91%. ¹H-¹⁵N HSQC spectra revealed that the ¹⁵N-labeled protein is correctly folded and retains its activity. Therefore, the *B. choshinensis* expression system should be useful for protein NMR studies.

【序】NMR によるタンパク質研究において、安定同位体標識は必要不可欠な技術である。最も良く用いられている大腸菌発現系では、比較的低コストによる安定同位体標識試料作成が可能であるが、分泌性タンパク質のようにジスルフィド (SS) 結合を有するタンパク質などの発現では、封入体を形成することが多く適切ではない。酵母 *Pichia pastoris* 分泌発現系では、SS 結合を多く含むタンパク質の大量発現の成功例が多く報告されており、比較的低コストでの安定同位体標識法も確立されているがこの系による発現量は、目的タンパク質に依存することが多い。また昆虫細胞、動物細胞、あるいは無細胞発現系を用いた同位体標識法も確立されているが、一般的に発現量が低く、高コストである。一方、グラム陽性菌の *Brevibacillus choshinensis* 分泌発現系は、遺伝子の由来にかかわらず、SS 結合を有するタンパク質の大量分泌生産に数多く成功しており、扱いやすさと安全性、さらに低コストで培養できることから、優れた発現系と考えられている。そこで本研究では、SS 結合を有するタンパク質の NMR による構造および機能研究支援のため、*B. choshinensis* を用いた安定同位体標識試料作成法の確立を目的とした。

【方法】発現条件検討のためのモデルタンパク質として、細胞質タンパク質である 12-kDa ヒト FK506 結合タンパク質 (FKBP) を採用し、発現ベクターは pNCMO2 (タカラバイオ) を用いた。作成したベクターはエレクトロポレーション法により *B. choshinensis* HPD31-SP3 株 (タカラバイオ) に形質転換した。形質転換体は、¹⁵N 安定同位体標識 C.H.L 培地 (~97% ¹⁵N、クロレラ工業) にて 48~72 時間培養し、培地中に分泌された ¹⁵N 標識 FKBP を、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精製し、質量分析および ¹H-¹⁵N HSQC NMR 測定を行った。

Brevibacillus choshinensis, secretion, isotope labeling, recombinant protein

たにおみちかず、たなかりこう、たなかたけし、こうのとしゆき

【結果と考察】*B. choshinensis* により生産した非標識および ^{15}N 標識 FKBP の質量分析の結果、本方法による ^{15}N 標識率は、約 91% であることが分かった (Fig. 1)。また、この試料の ^1H - ^{15}N HSQC NMR スペクトル (Fig. 2A) は、大腸菌発現系により得られているそれと類似していることから、*B. choshinensis* によって発現した FKBP は正常な folding を保持していることが分かった。一方、M9 培地による発現実験を試みたが、菌の発育は見られるものの、目的タンパク質の発現量は極めて低いことが分かった。以上のことから、*B. choshinensis* 分泌発現系を用いた組み換えタンパク質の安定同位体標識試料作成には、C.H.L. 培地が有用であることが分かった¹⁾。

次に、同様の方法を用いて、SS 結合を 2 ヶ所持つ分泌性タンパク質ヒト M-フィコリン フィブリノーゲン様ドメイン (FD1, 26.8 kDa) の ^{15}N 標識試料作成を試みた。FD1 は、大腸菌発現では封入体を形成することが知られている。FD1 の *B. choshinensis* による発現を試みた結果、正常活性を保持したタンパク質の分泌生産に成功した。さらに、 ^{15}N 標識 C.H.L. 培地を用いることで、 ^{15}N 標識 FD1 の試料調製、および ^1H - ^{15}N HSQC NMR スペクトルの取得に成功した (Fig. 2B)。

これらの結果は、*B. choshinensis* 分泌発現系が、SS 結合を有する分泌性タンパク質の NMR 研究に極めて有用であることを示している。

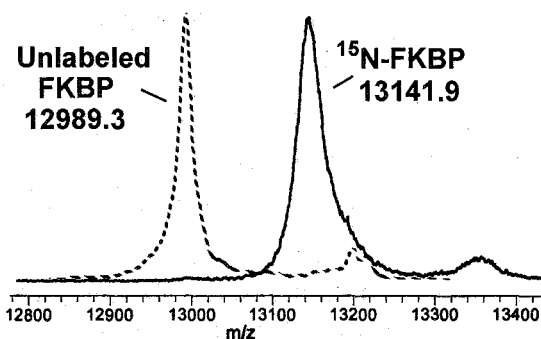


Fig.1. MALDI-TOF mass spectra of unlabeled (.....) and ^{15}N -labeled (—) FKBP, secreted by *B. choshinensis*. The ^{15}N isotope incorporation rate is ca. 91%.

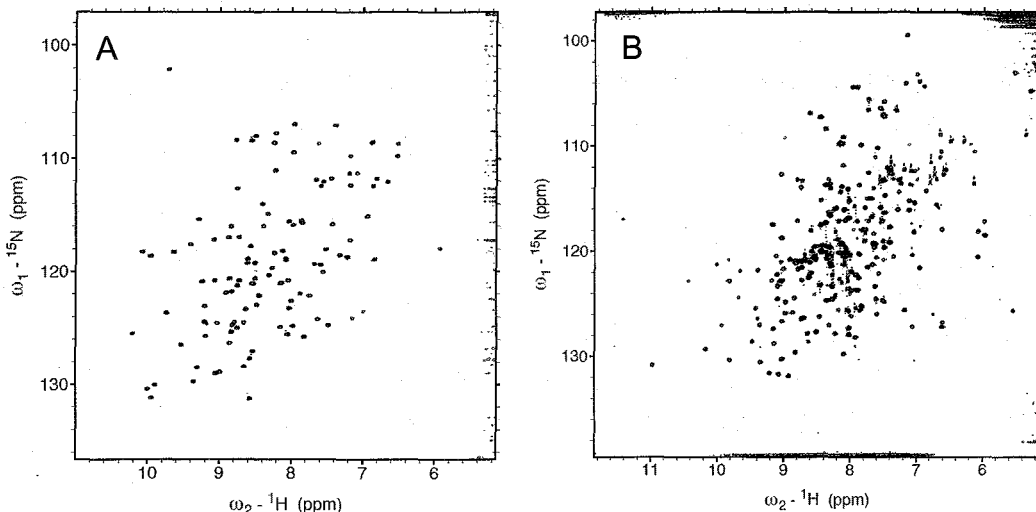


Fig.2. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N labeled FKBP (A) and human M-ficolin fibrinogen-like domain (FD1, B), secreted by *B. choshinensis*. FD1 has two disulfide bonds²⁾.

【参考文献】 1) Tanio et al., (2008) *Anal. Biochem.* **373**, 164-166.

2) Tanio et al., (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 3889-3895.

○杉木俊彦^{1,2}、高橋栄夫²、嶋田一夫^{2,3}

¹ 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、² 産総研・バイオメディシナル情報研究センター、³ 東大・院薬系

A method of stable isotope labeling of proteins by yeast *Kluyveromyces lactis*

○Toshihiko Sugiki^{1,2}, Hideo Takahashi², and Ichio Shimada^{2,3}

¹Japan Biological Infomatics Consortium (JBIC)

²Biomedical Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

³Graduate school of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo

Escherichia coli (*E. coli*) protein expression systems are frequently used for stable isotope labeling, due to the high-level expression and reasonable costs. However, in some cases, *E. coli* or other prokaryotic cells are not necessarily appropriate to express the correctly folded heterologous proteins. In that cases, as a eukaryotic cell, methylotrophic yeast *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) expression system is widely used. However, the costs for isotope-labeling of proteins using *P. pastoris* is approximately 5-10 fold higher than *E. coli* expression systems. In present study, we established a culture method for isotope labeling of target proteins using hemiascomycete yeast *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), which enabled the production of labeled proteins with same costs and same expression level as *E. coli*.

安定同位体標識タンパク質の発現には、容易かつ適切な標識コストにて大量発現が可能な大腸菌発現系が一般的に用いられる。しかし、ヒト由来のタンパク質や、高次構造形成に複雑なジスルフィド結合や翻訳後修飾が必要なタンパク質などの場合、大腸菌を含む原核細胞では発現が困難である場合も多い。そのような場合、真核細胞の中でも比較的少量に安定同位体標識タンパク質を発現できる酵母 *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) 発現系が検討されることが多い。しかし、安定同位体標識コストが大腸菌発現系の約5~10倍かかるなどの難点があった。

我々は、酵母 *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) 発現系を用いて、大腸菌発現系と同等のコストで安定同位体標識タンパク質を大量に発現することに成功した。

酵母、*Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*)、分泌発現、安定同位体標識

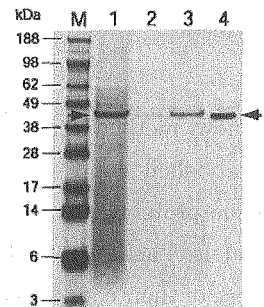
すぎき としひこ、たかはし ひでお、しまだ いちお

【方法および結果】

1. *K. lactis* の炭素源および培養法の検討

K. lactis は、タンパク質発現誘導剤および単一炭素源として、20 g/L のガラクトースを利用する。しかし、 ^{13}C 標識ガラクトースは高価 (^{13}C グルコースの 10 数倍の価格) であるため、 ^{13}C 標識における障壁となりうる。そこで、グルコースでもタンパク質発現誘導は可能であるという報告¹⁾ をもとに、グルコースを用いて *K. lactis* に目的タンパク質を大量発現させる発現条件の検討を行った。モデルタンパク質として maltose binding protein (MBP) を使用し、ファーメンター培養で MBP を培地上清中へと分泌発現させた。しかし、グルコースで十分量のタンパク質発現を達成するには 20 g/L 必要であり (Fig 1, lane 1)、大腸菌発現系と同レベルの 4 g/L のグルコース量では十分な発現誘導は認められなかった (Fig 1, lane 2)。そこで、培養法を詳細に検討した結果、ファーメンター培養中に新鮮な培地をペリスタポンプで供給しつづける Fed-Batch 法により、大腸菌発現系とほぼ同レベルのグルコース量 (5 g/L) でも十分な発現誘導が達成されることを見出した (Fig 1, lane 3)²⁾。

Fig 1. SDS-PAGE of MBP secreted into culture supernatants after batch culture using minimal media containing 20 g/L D-glucose (lane 1) and 4 g/L D-glucose (lane 2), or Fed-Batch cultivation that continuously supplied 5 g/L D-glucose (lane 3). Purified MBP is shown in lane 4.



2. 安定同位体標識効率の確認

発現させた均一 ^{13}C , ^{15}N 標識 MBP の性質と標識効率を、 ^1H - ^{15}N HSQC および 3D HNCA スペクトルの測定と MALDI TOF-mass 測定によって評価した。 ^1H - ^{15}N HSQC シグナルは良好に分散しており、発現した MBP が正しいフォールドを形成していることを確認できた。3D HNCA スペクトルも S/N 比が十分高く、主鎖シグナルの連鎖帰属を進めることができたことから、十分高い効率で ^{13}C , ^{15}N 標識されていることが示された。非標識、均一 ^{15}N 標識、および均一 ^{13}C , ^{15}N 標識 MBP について MALDI TOF-mass スペクトルの測定を行い、標識効率を確認した結果、この培養法による ^{15}N および ^{13}C , ^{15}N の標識効率は、それぞれ約 93%、約 96%であることが確認された。

【まとめ】

酵母 *K. lactis* を使用し、かつ炭素源および培養法を工夫することにより、安定同位体標識のコストを大腸菌発現系と同レベルまで抑えた酵母発現系を構築することができた。本発表では、酵母 *K. lactis* の持つ利点や特長についても紹介する。

【Reference】

- 1) Merico A et al. (2004) *J. Biotechnol.* **109**, 139-146
- 2) Sugiki T, Shimada I, and Takahashi H (2008) *J. Biomol. NMR* (In press)

植物培養細胞と誘導可能なウイルスベクターを 利用したタンパク質試料の調製

○竹内誠¹, 玉井淳史², 土肥浩二², 森正之², 大木進野¹

(北陸先端大学院大¹, 石川県立大²)

A protein sample preparation using suspension-cultured plant cells and an inducible virus vectors

M. Takeuchi¹, A. Tamai², K. Dohi², M. Mori², S. Ohki¹

(JAIST¹, and Ishikawa Pref. Univ.²)

A new method for preparing uniformly stable isotope-labeled proteins was successfully established using suspension-cultured plant cells infected with an inducible virus vector. Some proteins, which were confirmed to express in the *Escherichia coli*, were employed as models. These ¹H-¹⁵N HSQC spectra clearly indicated that their structures were identical to those of their counterparts reported previously. In addition, we examined the growth of BY-2 in several different culture medium conditions to check the possibility of ¹³C-labeling. The results indicate the possibility of uniform ¹³C-labeling using this system.

<序論>

タンパク質の NMR 研究では、一般的に大腸菌や酵母を利用した試料作製が行われている。それらが採用されている主な理由は ¹⁵N や ¹³C を含む安定同位体標識試薬を利用しやすく、取り扱いが比較的簡便なためである。近年では、生きた細胞では発現が困難な毒性のあるタンパク質でさえ無細胞タンパク質合成系による作製が可能になってきている。各タンパク質発現系が異なる特徴を有するため、発現系の多様化は多くのチャンスを研究者に与えるようになったが、未だどの発現系を使用しても調製できないタンパク質や封入体として得られるため巻き戻し困難なタンパク質も多い。これら諸問題を解決する可能性の高い方法のひとつは、今日まで利用されていなかった生物種を採用した新規なタンパク質発現系を確立することである。

我々はウイルスベクターと植物細胞を用いたタンパク質発現系を NMR 試料調製に最適化しようとして試みている。今回は、この系を利用して数種の安定同位体標識タンパク質試料の調製ができたこと、ならびに、培地の条件を検討した結果を報告したい。

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

発表者指名：たけうちまこと, たまいあつし, どひこうじ, もりまさし, おおきしんや

<実験>

目的タンパク質の遺伝子を組み込んだトマトモザイクウイルス由来のウイルスベクターを、植物細胞(タバコ培養細胞 BY-2)に取り込ませた(参考文献 1)。目的タンパク質として、DHFR (dihydrofolate reductase)、CaM (calmodulin)、および CPI-17(22-120) (functional domain of a 17kDa PP1 inhibitor) を用いた。この細胞を前培養し、発現誘導物質であるエストラジオールを添加してから 72 時間後に細胞を回収した。培地の炭素・窒素源は、スクロース (3%(w/v))、1.9 g/L KNO₃、および 1.65 g/L NH₄NO₃ である。¹⁵N 標識のためには市販の標識 KNO₃ と NH₄NO₃ を利用した。また、スクロースを他の試薬に置き換えた培地で BY-2 を培養し、¹³C 標識の可能性を検討した。

¹⁵N 標識タンパク質の精製は、大腸菌で目的タンパク質を発現した際と同様に行った。調製した試料の NMR スペクトルを Varian INOVA750 (750MHz) で測定し、得られたデータを NMRPipe/NMRDraw を用いて処理/表示した。

<結果と考察>

上記 3 種類のタンパク質の NMR 用 ¹⁵N 標識試料の調製と測定ができた。培地 50mL あたり数 mg 回収できるタンパク質もあり、NMR 測定に十分な量を得ることができた。これらの ¹⁵N 標識タンパク質の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルは、これまでに研究された結果と同一のスペクトルが得られた。

また、各種炭素源の利用可能性について調べたところ、スクロースの他にも幾つかの異なる物質 (フルクトースやグルコース、あるいはそれらの混合物) でも BY-2 細胞を増殖できるという結果が得られた。以上より、NMR 用試料作製に対するこの系の利用可能性がさらに高まったといえる。

<参考文献>

- 1) Dohi, K., Nishikori, M. Tamai, A. Ishiwaka, M., Meshi, T., and Mori, M. (2006) *Archives of Virology* 151, 1075-1084.

P011

共発現を利用した不溶性顆粒発現法の
抗菌ペプチド立体構造解析への応用

(北海道大学・大学院理学院¹、
北海道大学・大学院先端生命科学研究所²、
北海道大学・大学院理学研究所³)
○相沢智康^{1,2}、北條江里¹、梅津喜崇¹、
神谷昌克²、熊木康裕³、出村誠²、河野敬一^{1,3}

NMR structural analysis of antimicrobial peptides produced by aggregation-prone protein coexpression method

¹Grad. Sch. of Sci., Hokkaido Univ., ²Fac. of Advanced Life Sci., Hokkaido Univ., ³Fac. of Sci., Hokkaido Univ.

Tomoyasu Aizawa^{1,2}, Eri Hojo¹, Yoshitaka Umetsu¹, Masakatsu Kamiya², Yasuhiro Kumaki³, Makoto Demura², Keiichi Kawano^{1,3}

We demonstrated that coexpression of the aggregation-prone protein remarkably enhanced the target peptide's expression level. It seems that overexpression of the partner protein protects the target peptide from proteolytic degradation by forming insoluble inclusion bodies, thus accounting for the higher observed yields. Antimicrobial factor (ABF), one of our targets, is a small antimicrobial peptide consisting of 67 residues stabilized with four intramolecular disulfide bridges derived from the nematode *C. elegans*. In the case of overexpression in *E. coli* by using vector without partner protein, ABF was hard to synthesize even in insoluble form, probably because of proteolysis. In the case of coexpression of ABF and a positively charged partner protein, the amount of expressed ABF was significantly reduced although the partner protein was clearly overexpressed as an inclusion body.

【序論】

抗菌ペプチドは一般には比較的残基数が少ないため、化学合成を用いた試料調整が一般的である。しかしながら、NMR法を用いた立体構造解析や相互作用解析に有用である安定同位体ラベル化などのために、微生物を用いた調整が望まれる場合も少なくない。この場合、抗菌ペプチドの毒性や分解の回避のために、不溶性顆粒としての発現がしばしば選択され、自発的な不溶性顆粒形成が期待出来ないケースでは、不溶性の高い蛋白質との融合蛋白質として発現する方法などが用いられている。我々は目

<キーワード> 大腸菌、共発現、不溶性顆粒、抗菌ペプチド

あいざわ ともやす、ほうじょう えり、うめつ よしたか、かみや まさかつ、
くまき やすひろ、でむら まこと、かわの けいいち

的蛋白質を不溶性顆粒として安定かつ大量に発現させる新しい方法として、不溶性顆粒形成能の高い蛋白質との共発現系が有用であることを見出し、検討を重ねている。この手法の改良と、安定同位体ラベル化試料の効率的な調整に成功し立体構造解析を進めている抗菌ペプチドの研究例について報告する。

【実験】

単独では不溶性顆粒形成が困難で、発現量が極めて少ない線虫 *C. elegans* 由来抗菌ペプチド ABF-2 (antibacterial factor-2, Mw. = 6999) と不溶性顆粒形成能が極めて高いことが知られる数種のリゾチームスーパーファミリーに属する蛋白質との共発現系を構築し、大腸菌内での発現の検討を行った。回収した不溶性顆粒は変性剤による可溶化の後、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、透析法による巻き戻しを行った。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 ABF-2 を得た。安定同位体を含む培地を用いることで、 ^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 ABF-2 の調製をおこない、NMR 法による帰属及び立体構造解析を進めた。

【結果・考察】

ABF-2 は単独の発現系ではわずかにしか発現が認められなかったが、不溶性顆粒形成能を有する蛋白質との共発現を行うことで、不溶性顆粒化に成功し大量の発現が確認された。興味深いことに、高い不溶性顆粒形成能を有するリゾチームスーパーファミリー内の蛋白質間においても、共発現による ABF-2 の不溶性顆粒化促進の度合いに違いが見られた。特に不溶性顆粒を形成する蛋白質の等電点が、目的ペプチドの不溶性顆粒化に大きく関係すると考えられ、高い塩基性の ABF-2 の不溶性顆粒化には、低い等電点を持つ共発現蛋白質が極めて有効であった。

NMR 法による解析の結果、ABF-2 は他の線虫由来抗菌ペプチドと同様に、N 末端はジスルフィド結合により安定化された CS α β モチーフを有していたが、C 末端側には構造の収束しない領域があることが明らかになった。活性の調節に関与すると予想されるこの領域は、特にプロテアーゼの分解を受けやすいことが予想されるため、共発現系を用いた試料調整法は極めて有効であると考えられる。

【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。

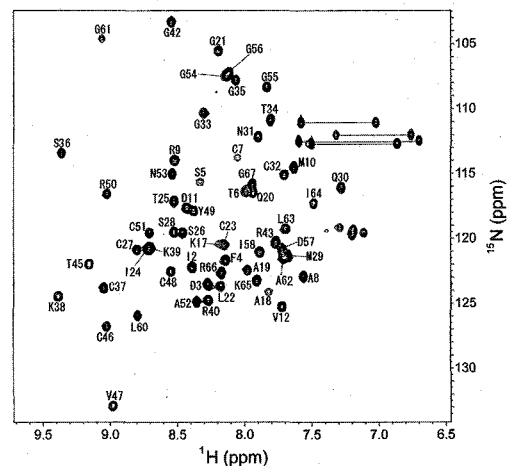


Fig. 1 ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of ABF-2.

P012 大腸菌無細胞タンパク質合成系による安定同位体標識技術の改良

¹大陽日酸(株) つくば研究所, ²理化学研究所 SSBC NMR パイプライン,

³東京工業大学大学院 総合理工学研究科, ⁴横浜市立大学大学院 国際総合科学研究科
○横山順^{1,2,3}, 松田貴意², 関英子^{2,3}, 松田夏子², 小柴生造^{2,4}, 木川隆則^{2,3}

Improvement of *E. coli* cell-free protein synthesis system for stable isotope labeling

¹Tsukuba lab. SI., Taiyo Nippon Sanso corp, ²NMR Pipeline., RIKEN SSBC, ³Grad. Sch. Integ. Sci. Eng., Tokyo Inst. of Tech., ⁴Int. Grad. Sch. Art. Sci., Yokohama City Univ.,
○Jun Yokoyama^{1,2,3}, Takayoshi Matsuda², Eiko Seki^{2,3}, Natsuko Matsuda², Seizo Koshiba^{2,4},
and Takanori Kigawa^{2,3}

Advances in cell-free protein synthesis system (cell-free system) made it possible to produce wide variety of eukaryotic and prokaryotic proteins in large quantity. With respect to stable-isotope (¹³C, ¹⁵N, ²H) labeling for NMR analysis, highly enriched labeling was achieved by many kinds of improvements. In recent years, we determined large numbers of structures of functional protein domains by using high-throughput robotic cell-free system and high performance NMR spectroscopy. However, an expensiveness of stable isotope-labeled amino acid prevents the cell-free system from becoming popular in NMR application. In this study, we developed a simple and inexpensive method for stable isotope-labeled protein production using *E. coli* cell-free system by taking advantage of endogenous amino acids metabolic conversion.

〈緒言〉

無細胞タンパク質合成系は、様々なタンパク質の性質に適した反応系の改良が容易であり、PCR で増幅した直鎖状鋳型を利用した多検体発現が可能など、生細胞による発現系と比較して優位な特徴を持つ。近年では種々の改良により質及び量の両面において飛躍的な改善がなされ、高等真核生物のタンパク質発現においても構造解析に十分な生産性を達成している。

キーワード: 無細胞タンパク質合成、安定同位体

著者ふりがな: よこやま じゅん, まつだ たかよし, せき えいこ, まつだ なつこ, こしば せいぞう, きがわ たかのり

我々は大腸菌の無細胞タンパク質合成系を基盤技術としたタンパク質合成と NMR 法による立体構造解析パイプラインを構築し、その産業利用を積極的に推進している。今後は無細胞タンパク質合成系が汎用的な NMR 測定サンプル合成法として広く一般に普及することが期待されるが、安定同位体標識アミノ酸のコストが高いなどの課題も残されている。そこで大腸菌の無細胞タンパク質合成系を用いて経済的かつ効率的に安定同位体標識タンパク質を合成する方法の開発を行ったのでこれを報告する。

〈方法〉

比較的安価に入手可能な藻類分解物由来の安定同位体標識アミノ酸ミクスチャー（16 種類のアミノ酸混合物）と、これに含まれない 4 種類のアミノ酸（Asn, Gln, Trp および Cys）を、無細胞タンパク質合成系に内在するアミノ酸合成酵素を利用して、系内で合成するために必要な基質を添加することにより、効率的に安定同位体標識タンパク質を合成可能か試みた。

〈結果と考察〉

無細胞タンパク質合成系内で高価なアミノ酸を補完的に合成することで、経済的かつ効率的に安定同位体標識タンパク質を合成することが可能であった。また、20 種類のアミノ酸を添加して合成した場合と比較しても合成量、 ^{15}N -HSQC スペクトルの結果において同等であった。今後は無細胞タンパク質合成系において翻訳以外の代謝反応を抑えるだけでなく、積極的に利用することで、新たな共役系への展開も期待される。

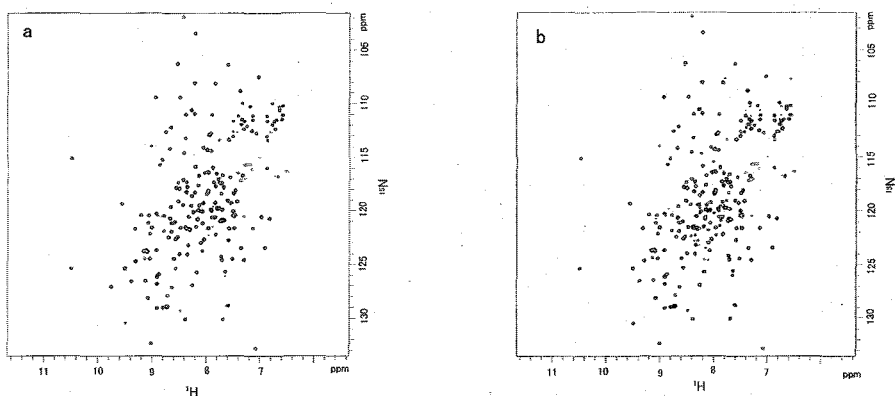
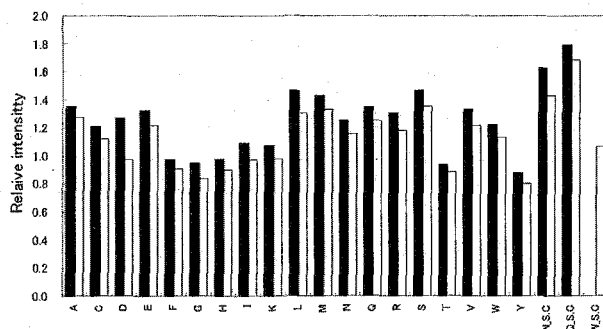


Fig. 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the ^{15}N -labeled Ras(Y32W) synthesized with 20 kinds of ^{15}N -labeled amino acids (a) and ^{15}N -algal amino acids mixture, Na_2S and indole (b), respectively. The side chain amide of Trp could not be detected because of adding non-labeled indole at this case.

Fig. 2. Comparison of cross peak intensities in the ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of UBA proteins synthesized with 20 kinds of ^{15}N -labeled amino acids (white bars) and ^{15}N -algal amino acids mixture, Na_2S and indole (black bars), respectively.



奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

○林 ころこ、児嶋 長次郎

A cold-shock vector, pCold-GST and its Application for NMR

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

○Kokoro Hayashi and Chojiro Kojima

The production of recombinant protein in *Escherichia coli* affords many advantages for preparing NMR sample. But it is often hampered by low expression levels and low solubility. There are many techniques to improve the protein expression, for example, the use of expression tags, and pCold expression system (Qing *et al.*, *Nature Biotech*, 2004). Here, we improved the pCold expression system combined with the expression tag technique and applied it to about 60 proteins. In our system, 90% proteins were successfully expressed in soluble fraction. 2 small proteins that tend to be degraded were successfully purified. These purified proteins were stable enough to measure NMR spectra for 1 week. Thus, pCold-GST vector 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。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り、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)などの可溶性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(Qing *et al.*, *Nature Biotech*, 2004)などが開発されてきた。しかし、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数多く存在する。昨年度の NMR 討論会において、我々は pCold I ベクターと GST タグを組み合わせた新規発現ベクター、pCold-GST (Fig. 1)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した結果から、その有効性を示した (Hayashi and Kojima, *Protein Expr. Purif.*, 2008)。今回、pCold-GST をさらに多数のタンパク質に適用し、そのうちのいく

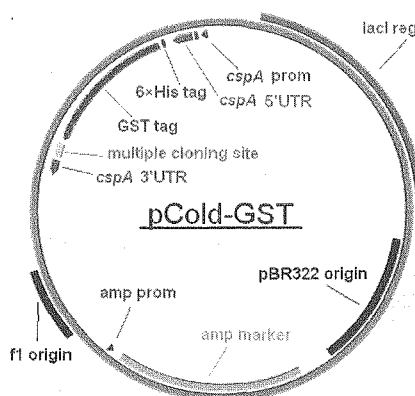


Fig. 1 Structure of pCold-GST vector.

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 ころこ、こじま ちょうじろう

つかについて同位体標識サンプルの調製と NMR による解析を行ったので、合わせて報告する。

pCold-GST ベクター

pCold I ベクターは目的タンパク質の N 末端に His タグを融合発現するよう設計されたコールドショックベクターである。pCold-GST は pCold I の His タグ配列とマルチクロニングサイトの間 GST を導入しているため、N 末端に His タグと GST が付加した融合タンパク質として目的物を得ることができる。また、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 HRV3C protease の切断サイトを導入した。

タンパク質の発現精製と NMR 実験

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を含む、61 種類のタンパク質に上記の発現系を適用したところ、53 種類のタンパク質を可溶性画分に発現

Table 1 Results of protein expression by pCold-GST.

a.a.	number of protein expressed in soluble fraction		
	mammalian protein	plant protein	other protein
~50	7/7	2/3	1/1
51-150	8/8	2/2	3/5
151-300	3/5	11/11	3/3
301~	5/7	8/9	0/0

させることに成功した (table 1)。分解を受けやすいタンパク質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。C 末端にも His タグを付加した Tsr(214-269)と NHE1(503-545)について発現精製したところ、発現精製過程では分解を受けるものの、最終精製物は安定で、約 1 週間の NMR 測定を経て主鎖の帰属を行うことができた(Fig.2)。

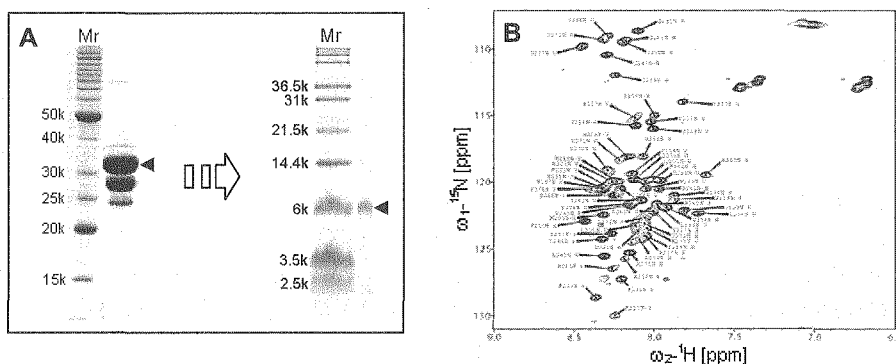


Fig. 2 NMR sample preparation of Tsr(214-269). (A) Purification by glutathione sepharose resin (left), and Final sample (right). (B) ^1H - ^{15}N HSQC spectra of Tsr(214-269) with assignments.

まとめ

本研究で構築した発現ベクター、pCold-GST は、幅広い種、分子量のタンパク質を含む、約 9 割のタンパク質を可溶性画分に発現させることが可能である。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。発表では、GST 以外のタグとコールドショックベクターを組み合わせた発現系などについても合わせて議論する。

P014 NMR によるミミズ由来 R 型レクチン C 末端ドメインの特異的な糖結合活性に関する研究

¹ 農研機構・食品総合研究所、² 産総研・糖鎖医工学研究センタ

○ 逸見 光¹、久野 敦²、海野 幸子²、平林 淳²

NMR studies on the interaction of C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm with some sugars

¹National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), ²Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

○ Hikaru Hemmi¹, Atsushi Kuno², Sachiko Unno², Jun Hirabayashi²

An R-type 29-kDa lectin (EW29) isolated from the earthworm *Lumbricus terrestris* consists of two homologous domains (14,500 Da). Recently, the crystal structures of the complex between the C-terminal domain of EW29 (EW29Ch) and ligand sugars were reported, but the tertiary structure of EW29Ch in the sugar-free state has not been determined yet. We have determined the high-resolution NMR structure of EW29Ch in the sugar-free state. The slight differences are shown between the tertiary structure of EW29Ch in the sugar-free state and that of the lactose-bound EW29Ch. The differences were observed at some loop regions and some residues related with sugar-binding.

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¹。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が、遊離状態でのEW29Chの構造は未だ解析されていない。また、その生理的機能は依然不明である。今回、EW29Chと糖との相互作用解析の一環として、多核多次元NMR法及び残余双極子結合定数を用いて、溶液中におけるEW29Chの遊離状態での立体構造を解析したので、その結果について報告する。

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、うんのさちこ、ひらばやしじゅん

2. 方法

NMR 測定サンプルとして、遊離状態での約 0.8mM ^{15}N 標識及び ^{13}C , ^{15}N 標識の EW29Ch を用いた。NMR 測定は、Bruker 社製 Avance 600MHz を用いて 25°C にて行った。さらに、タンパク質濃度を一定にし、糖/タンパク質比を変化させたサンプルに対して、約 1 時間室温で静置後、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの測定を行い、糖結合定数を算出した。

3. 結果と考察

1) EW29Ch と各種糖（単糖及び二糖）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、 α と γ の 2 つのサブドメインでのみ糖結合部位が確認され、 α 結合部位における結合定数が $K_D \sim 10^{-1} - 10^{-2}$ mM に対して、 γ の結合部位においては、 $K_D \sim 3 - 8$ mM であった。従って、 α 結合部位の方が γ 結合部位に比べ遙かに強い結合定数を持つことが分かった。

2) 遊離状態における EW29Ch の立体構造を決定した (Figure 1)。その結果、糖との複合体である結晶構造と同様に、 β -trefoil 構造を形成しており、結晶構造と大変類似していたが、一部ループ領域や糖結合に関係する残基において構造の違いが観測された。以上の結果より、糖との結合による構造変化が重要であることが分かったが、今後、その構造変化と α 及び γ 結合部位の結合定数の違いとの関係をより詳細に調べる必要がある。

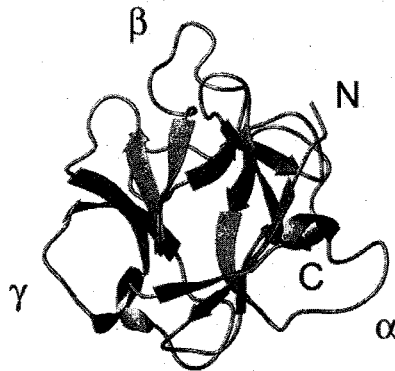


Figure 1. Ribbon diagram of EW29Ch in the sugar-free state using CNS version 1.1 with residual $^1\text{D}_{\text{NH}}$ couplings.

References

1. Hirabayashi, J., Dutta, S. K. and Kasai, K. (1998) J. Biol. Chem. 273, 14450-14460.

高い細胞接着活性を有する絹様材料の NMR 構造解析

(¹農工大院・工,²防衛大・応化,³北大・先端生命科学院)

○¹吉田 愛, ^{1,2}田中 千香子, ³神谷 昌克, ³出村 誠, ¹朝倉 哲郎

NMR analysis of silk-like materials containing the cell adhesive sequence

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology

²Department of Applied Chemistry, National Defense Academy

³Graduate School of Advanced Life Science, Hokkaido University

○ ¹Ai Yoshida, ^{1,2}Chikako Tanaka, ³Masakatsu Kamiya, ³Makoto Demura, ¹Tetsuo Asakura

Silk-like proteins which consist of alternative sequences of main sequences from *Bombyx mori* silk fibroin and the sequence TGRGDSPA in fibronectin with high cell adhesion ability were produced by *E. coli*. The cell adhesive ability of this protein was higher than those of only silk fibroin or fibroin plus RGD mixture. In order to clarify the origin, both the solid state NMR analysis of the ¹³C selectively labeled model peptides containing both silk fibroin sequences and TGRGDSPA, and solution NMR analyses of ¹³C,¹⁵N-uniform labeled silk-like proteins and only ¹³C,¹⁵N-uniform labeled (TGRGDSPA)₈ were performed.

[緒言]

絹フィブロインは機械的強度や生体適合性に優れ、高い形状加工性を持つため、骨や歯等の硬組織の再生医療材料として有力である。

我々は、このように優れた絹フィブロインの細胞接着性を一層向上させるために、フィブロネクチンの細胞接着配列である RGD を含む連鎖 TGRGDSPA を絹の一次構造中に含む絹様タンパク質と、比較用に TGRGDSPA の繰り返し配列のみから成る組換えタンパク質を作成した。

骨芽細胞および歯髄細胞を用いた細胞接着活性の評価を行ったところ、絹様タンパク質が格段に高い細胞活性を示した (Figure.1)。絹様タンパク質のこのような高機能発現の原因を解明するために、絹の連鎖と RGD を含む ¹³C ラベルモデルペプチドを合成し、¹³C CP/MAS 測定による固体構造解析を行うとともに、安定同位体標識された絹様タンパク質を作成し、溶液 NMR 測定による構造とダイナミクス解析を行った。

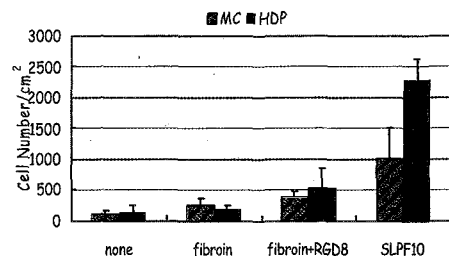


Figure 1. Adhesive experiments of MC3T3-E1 cells and HDP cells on three kinds of silk-based films by 2 hours cultivation.

NMR structure analysis/ RGD sequence/ cell adhesion ability/ silk-like materials

よしだ あい / たなか ちかこ / かみや まさかつ / でむら まこと / あさくら てつお

[実験]

1. モデルペプチドの合成と固体 ^{13}C CP/MAS NMR 測定

Table.1 のペプチド(b)~(f)を F-moc 固相法にて合成を行った。

Table 1. Several model peptides synthesized by solid-phase method for ^{13}C CP/MAS NMR experiments.

samples	
(a) (AG) ₁₅	<i>B.mori</i> silk fibroin
(b) (AG) ₃ [3- ^{13}C]AG(AG) ₃ AST[2- ^{13}C]GR[1- ^{13}C]GDSPAAS(AG) ₇	<i>Anaphe</i> silk fibroin + RGD
(c) (AAG) ₂ A[3- ^{13}C]AG(AAG)2AST[2- ^{13}C]GR[1- ^{13}C]GDSPAAS(AAG) ₅	<i>Anaphe</i> silk fibroin + RGD
(d) (A) ₆ [3- ^{13}C]A (A) ₅ GGAASTGRGDSPAASDGG(A) ₁₂	<i>S.c. ricini</i> silk fibroin+ RGD
(e) AGSGAG[3- ^{13}C]AGSGAGAGSGGT[2- ^{13}C]GR[1- ^{13}C]GDSPAGG(GAGAGS) ₂ GAG	<i>B.mori</i> silk fibroin + RGD
(f) TSTGRGDSPASTST[2- ^{13}C]GR[1- ^{13}C]GDSPASTSTGRGDSPAS	(RGD) ₃

測定は CMX-400 および Bruker AVANCE-400 を用い、室温にて行った。

2. 安定同位体標識タンパク質の作成と溶液 NMR 測定

以下の ^{15}N または $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体標識タンパク質を大腸菌にて発現させ、精製後、Bruker DRX500 を用いて 30°C、10% D_2O を含む 50mM リン酸バッファー中で測定した。

I : RGD8, His tag-($^1\text{T}^2\text{S}^3\text{T}^4\text{G}^5\text{R}^6\text{G}^7\text{D}^8\text{S}^9\text{P}^{10}\text{A}^{11}\text{S}$)₈-His tag

II : SLPF10, His tag-[TGRGDSPAGG(GAGAGS)₃]₁₀-His tag

[結果と考察]

一連のモデルペプチドの ^{13}C CP/MAS スペクトルを Figure 2 に示した。(b)~(f)の各ピークは ^{13}C ラベル部位の局所構造の情報を反映する。(b)では Ala C β ピークは、16.7ppm にシャープな主ピークを持つことから、絹連鎖部位は Type II 型 β -turn 構造が主であることがわかる。(c)-(e)では、Ala C β の主ピークはブロードであり、かつ、その化学シフト位置を考慮すると、絹連鎖部位は概ね distorted β -sheet 構造であると言える。一方 RGD 部位の局所構造を反映する Gly C α および Gly C=O ピークはブロードであることに加え、その化学シフトから、(b)~(f)のいずれも random な構造をとると言える。

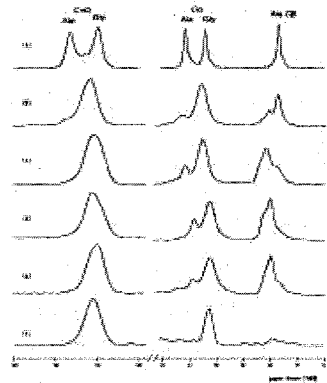


Figure 2. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of model peptides (Tab 1).

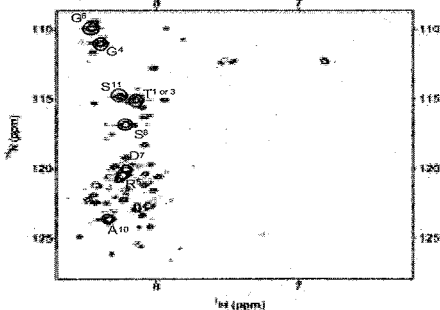


Figure 3. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of RGD8.

今後、細胞評価時の環境を再現するため、含水状態で ^{13}C CP/MAS スペクトル測定を行い、RGD 部位の運動性について比較する予定である。また、RGD が絹連鎖中に導入された場合と単独の場合での、水溶液状態での RGD 部位の構造とダイナミクスを検討することを試みている。

Figure.3 は、一例として、安定同位体標識を行った RGD8 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示した。

P016 ループ変異により誘導される励起構造の変化による酵素反応
変調機構の解明

(¹広島大学・院理・数理分子, ²PRESTO/JST)
○堀内裕司¹、大前英司¹、月向邦彦¹、楯 真一^{1,2}

Yuji Horiuchi¹, Eiji Ohmae¹, Kunihiko Gekko¹ and Shin-ichi Tate^{1,2}

¹Department of Mathematical and Life Sciences,
Graduate School of Science, Hiroshima University,

²PRESTO/JST

Abstract

Protein structure has intrinsic structural fluctuations and their functional significance has become focused. In this presentation, we are going to show that the intrinsic fluctuation of dihydrofolate reductase (DHFR) has a significant role in its enzymatic reaction. One loop mutant we found shows the reduced enzymatic reaction. It is intriguing that the mutation site is far from the active site of the DHFR by approximately 30Å. The T₂ relaxation dispersion experiments for the wild type and the two loop mutants, G67A and G67V, have shown the G67V mutant with reduced activity has different low population structure but is it not the case for the G67A mutant that maintains the activity. This suggests that the low population structure caused in the intrinsic structural fluctuation is related to the enzymatic reaction of DHFR.

Introduction

The internal structural fluctuation of protein may have essential roles in its function. Recently, T₂ spin relaxation dispersion analyses on the proteins have focused the functional significance of the protein intrinsic fluctuation. Some proteins are shown to have low population structures in solution through the analysis, which are in the slightly higher energetic state. In the case of dihydrofolate reductase (DHFR), the DHFR in the ternary complex DHFR/NADP⁺/folate, which mimics to the ES complex, has shown to form the structure in the complex of the reaction end products as a low population structure. This observation may demonstrate the structural fluctuation can cause a higher energetic structure to accelerate the reaction, which appears as a low population structure in the fluctuation.

Keyword: relaxation dispersion, protein dynamics, collective motion, DHFR

ほりうち ゆうじ、おおまえ えいじ、げっこう くにひこ、たて しんいち

Our group found that the single amino acid replacement to the residue in the flexible loop of DHFR, G67V, has resulted in the significant reduction in its enzymatic activity. It is intriguing that G67 is far from the active site by approximately 30Å. We are interested in how this mutation can affect the activity through the long distance and how the effect is related to the enzymatic reaction. To explore the mutation effect on the enzymatic reaction, we have carried out the T_2 relaxation dispersion experiments on the wild type and two loop mutants; G67A and G67V. G67V mutant shows the significant reduction in the enzymatic activity. On the other hand, G67A mutant retains the activity, which mutant can be used as a reference to estimate the G67 mutation effect on the activity.

Results

The representative T_2 relaxation dispersion curves, collected at 600MHz magnetic field, are shown on the residues in the wild type, G67A and G67V mutant DHFR (Fig.1). The comparison of the data shows that the relaxation profiles between the wild-type and the G67A mutant are close to each other, but the profiles of the G67V mutant are significantly different from those for the wild-type. This observation, thus, demonstrates that the G67V has different internal dynamics from those in the wild-type and the G67A mutants and the G67V mutation causes the perturbation on the internal dynamics of the residues surrounding the active site. This long-range perturbation on the dynamics can be mediated by the disturbance on the collective motions containing the G67 loop and the residues around the active site. The further characterization combined with the relaxation dispersion data on a 900MHz spectrometer has revealed that the G67V has different low population structure that is represented by the $\Delta\omega^{15N}$ values between the ground state and the excited state structures. The present result shows that the low population structure caused by the internal fluctuation is essential for the DHFR enzymatic reaction and the reduced G67V mutant activity is explained by the deformation of the excited state structure, although its ground state structure is maintained close to that of the wild-type.

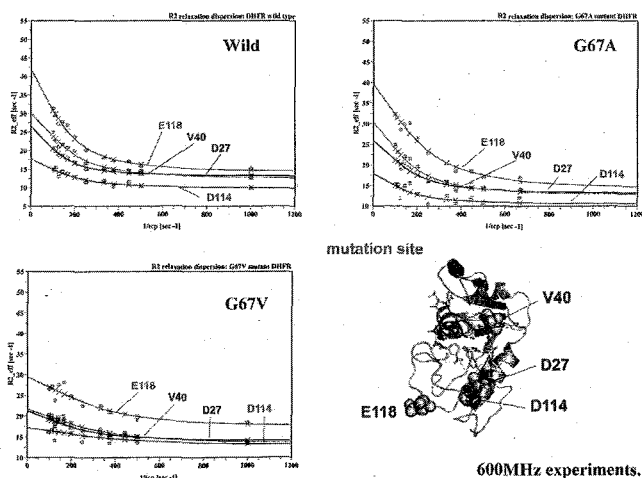


Fig.1: The relaxation dispersion profiles for the DHFR wild-type, G67A, and G67V mutants, whose data were collected on a 600MHz spectrometer.

Acknowledgement

We appreciate the RIKEN NMR facility for providing the instrument time for collecting the data used in this work.

好熱性緑色光合成細菌由来 Cytochrome c_z の大量発現と NMR による構造機能評価

(¹茨城大学理学部、²農研機構・食総研、³大阪大学理学研究科生物科学専攻)
○樋口誠¹、逸見光²、平野優¹、大岡宏造³、大友征宇¹

Over-expression and NMR Analysis of Cytochrome c_z from Thermophilic Green Photosynthetic Bacterium

(¹Faculty of Science, Ibaraki University, ²National Food Research Institute,
³Department of Biological Sciences, Graduate school of Science, Osaka University)
○Makoto Higuchi¹, Hikaru Hemmi², Yu Hirano¹, Hirozo Oh-oka³, Seiu Otomo¹

Green sulfur bacteria have the type 1 reaction center similar to photosystem I and consists of four subunits, PscA, PscB, PscC and PscD. The PscC subunit, which is membrane-bound monoheme cytochrome (cyt) c_z , serves as a direct electron donor to the special pair of bacteriochlorophyll (BChl) a , P840, in the homodimeric core PscA. The cyt c_z is anchored to membranes with its N-terminal hydrophobic helices and holds a heme c in its C-terminal hydrophilic domain.

The C-terminal heme-containing portion (C-cyt c_z) was over-expressed in *Escherichia coli* in order to study its reaction characteristics in detail. The ¹H-NMR spectrum of the expressed oxidized C-cyt c_z revealed larger paramagnetic shifts in low-field region. This suggests that the configuration around the heme pocket is different from that of other c -type cytochromes.

【摘要】

光合成は、生物が進化の過程で獲得した光から化学エネルギーへの変換を高効率に行う機能である。近年、この反応の中心を担うタンパク質色素の超分子複合体の構造が次々に明らかにされてきており、反応機構の原子レベルでの解明が人工光合成系への応用につながる事が期待される。しかしながら、高等植物の光化学系 I の祖先と考えられている緑色光合成細菌の光合成反応中心は、その不安定さから安定な標品を得る事が難しく、未だその構造は明らかにされていない。この緑色細菌の一種である緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* の反応中心複合体は、PscA, PscB, PscC, PscD という 4 つのサブユニットから構成されている。この内、PscC (cytochrome c_z ; cyt c_z) は、ホモダイマー型のコアタンパク質 PscA 内に含まれるスペシャルペア P840 への電子ドナーとして機能し、空間的に大きく‘揺らぎ’ながら電子伝達を行っていると考えられている。また、この cyt c_z は、N 末端側に膜 3 回貫通のアンカー部分を持ち、C 末端側に 1 つの heme c を持つ水溶性機能部分から構成されていると考えられている。本研究では、cyt c_z の C 末端側の水溶性機能部分(C-terminal functional domain of cytochrome c_z ; C-cyt c_z)のみを大腸菌に発現させ、その立体構造と機能解明を目指す。

ヘムタンパク質、光合成、電子伝達、常磁性シフト

ひぐちまこと、へんみひかる、ひらのゆう、おおおかひろぞう、おおともせいり

【実験】

618 bp から成る *cyt c₂* 遺伝子の内、349 ~ 618 bp の部分をプラスミドに挿入し、大腸菌で発現させた。得られた C-*cyt c₂* は、浸透圧衝撃法により回収し、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製を行った。精製した C-*cyt c₂* は、電子吸収スペクトル、円偏光二色性 (CD), 磁気円偏光二色性 (MCD), NMR を用いて特性評価を行った。

また、結晶構造解析の為、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いての結晶化及び回折実験、溶液構造解析の為、¹⁵N, ¹³C で均一に標識した試料を用いて 2D HSQC, 3D HNCACB, CBCA(CO)NH, ¹⁵N-edited NOESY, ¹⁵N-edited TOCSY の測定を行った。

【結果・考察】

電子吸収スペクトル, CD・MCD スペクトルの結果から、C-*cyt c₂* は、典型的な low spin 状態の heme *c* を保有する事が分かった。しかしながら、酸化型 C-*cyt c₂* の 400 MHz ¹H-NMR スペクトルでは、極端に低磁場側に heme *c* の ring methyl 由来のシグナルが観測された (Fig.1)。通常、酸化型 *cyt c* の ¹H-NMR スペクトルで観測される heme *c* ring methyl の低磁場シフトは、heme *c* の中心鉄が酸化型の時に 1/2 の不対電子スピンを持つ事に由来する。すなわち、酸化型 C-*cyt c₂* で観測された極端な低磁場シフトは、heme *c* 周辺の環境が、他の *cyt c* の環境とは異なる事を示唆している。

シッティングドロップ蒸気拡散法により得られた長さ約 0.3 mm の酸化型 C-*cyt c₂* の正八面体形の結晶に X 線を照射したところ、1.3 Å の回折データが得られ、heme 鉄の異常分散効果を用いた短波長異常分散法により構造決定を行った。得られた結晶構造から、酸化型 C-*cyt c₂* の heme *c* は、他の *cyt c* に比べて大きく溶媒に露出されている事が分かった。さらに、この構造的制約から、heme *c* の axial ligand である Met と His の配位形式も特徴的であり (Fig.2)、これが ¹H-NMR スペクトルで観測された極端に大きな低磁場シフトの原因であると考えられる。

現在、溶液構造決定の為に 3 次元 NMR の解析途中であり、電子伝達の際の‘揺らぎ’を特徴づけるシグナルの同定を行っていきたいと考えている。

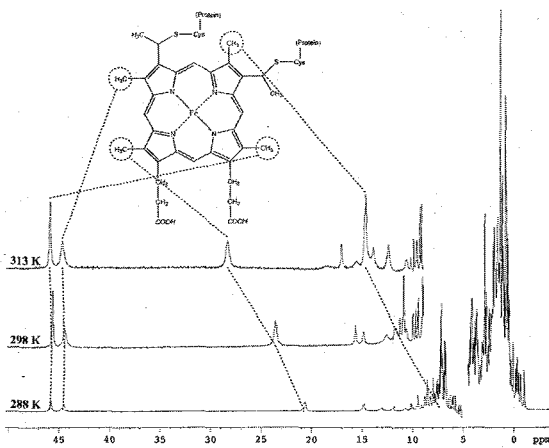


Fig.1 The molecular structure of the heme *c* and 400 MHz ¹H-NMR spectra of the oxidized C-*cyt c₂* measured at various temperatures.

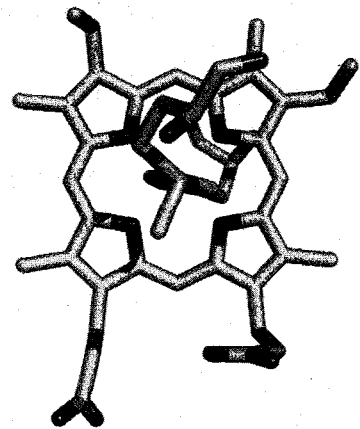


Fig.2 The orientation of the axial Met and His, with respect to the heme *c*, in the oxidized C-*cyt c₂*.

微小管制御因子 EB1 の構造解析

首都大学東京・理工¹、奈良先端大学・情報²○ 金場哲平¹、森智行²、前崎綾子¹、伊藤隆¹、箱嶋敏雄²、
三島正規¹

Structural analysis of microtubule plus-end tracking protein EB1

○ Tepei Kanaba¹, Tomoyuki Mori², Ryoko Maesaki¹, Yutaka Ito¹,
Toshio Hakoshima², and Masaki Mishima¹¹Graduate School of Science and Technology, Tokyo Metropolitan University²Structural Biology Laboratory, Nara Institute of Science and Technology

End binding 1 (EB1) protein is a member of highly conserved +TIPs (plus-end tracking proteins) that bind to microtubule (MT) plus-ends and regulate MT dynamics. In addition, EB1 leads MT plus-ends to cell peripherals by interactions between its C-terminal domain and other cytoskeletal proteins. However, the molecular mechanisms of these processes are poorly understood. Our purpose is the structure determination of EB1 complex and elucidation of the regulation mechanisms of MT. In this study, we will discuss solution structure of the C-terminal region of EB1 and interaction with its target protein.

【序論】

微小管は主にそのプラス端で伸長と収縮を繰り返すというダイナミックな性質を持ち、それにより細胞内のあらゆる局面において重要な役割を果たしている。近年このダイナミクスを制御する因子として微小管プラス端集積因子(+TIPs)が同定され、注目を集めている。EB1は最も研究が行われている+TIPsのひとつであり、伸長期の微小管プラス端に集積する。またEB1はC末端ドメインにより細胞表層に存在する細胞骨格蛋白質群と相互作用することで、微小管の先端を細胞の抹消部にアンカリングする役割を果たす。しかしEB1複合体による微小管アンカリングの詳細な分子機構はいまだに明らかになっていない。本研究ではEB1と、そのターゲットとなる蛋白質の複合体の立体構造解析を目的とし、それによりEB1複合体による微小管制御メカニズムの解明を行う。

キーワード：微小管、+TIPs、EB1、蛋白質の構造解析

かなば てっぺい、もり ともゆき、まえさき りょうこ、いとう ゆたか、はこしま としお、みしま まさき

【概要】

まず EB1 C 末端ドメイン(189-268)の ^1H - ^{15}N HSQC を測定した。次に主鎖シグナルの帰属のための各種三次元測定 (HNCACB、CBCA(CO)NH、HNCO、HN(CA)CO) を行い、EB1 の主鎖シグナルの帰属を完成させた。プロセスには NMR Pipe、解析には Sparky を用いた。またターゲットとなるペプチドとの滴定実験を行い、シグナルに変化が見られた事から両者の相互作用を確認することが出来た (Fig 1)。さらに EB1 単体でのスペクトルのシグナル強度と、滴定実験の結果得られたスペクトルのシグナル強度を比較し (Fig 2)、EB1 の結合領域を特定した。逆にペプチド側から見た EB1 との滴定実験を行い、ペプチド側からも両者の相互作用を確認した (Fig 3)。さらに主鎖シグナルの帰属を行い、結合領域を特定した。

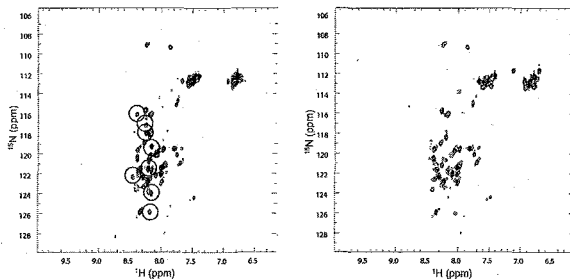


Figure 3. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N -labeled target peptide (0.1 mM) in the absence (left) or presence of an equivalent amount of EB1 (right). Significantly perturbed signals are circled.

本実験により判明した結合領域を、EB1 C 末端ドメインの結晶構造に対してマッピングを行った (Fig 4)。この領域は軸策輸送を行う複合体ダイナクチンのサブユニットである p150^{glued} との結合領域と良く一致している。これより、この +TIPs と p150^{glued} は競合的に EB1 と結合している可能性があるといえる。これら相互作用については今後明らかにする必要があるが、本実験の結果は EB1 複合体による微小管の制御機構の解明における大きな知見となるであろう。今後は複合体の構造解析を行う予定である。

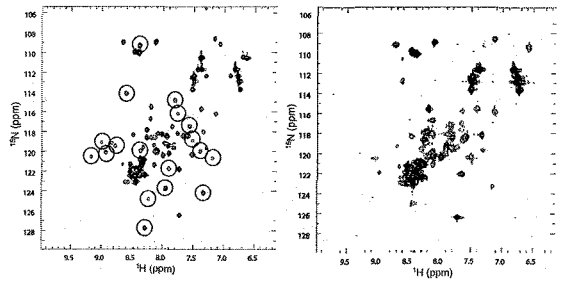


Figure 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N -labeled EB1 (0.2 mM) in the absence (left) or presence of an equivalent amount of target peptide (right). Significantly perturbed signals are circled.

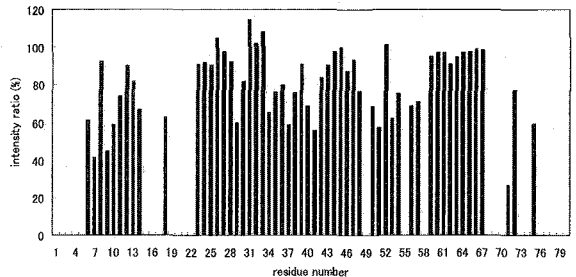


Figure 2. The intensity ratio calculated from the following formula: $(I_{\text{Free}} - I_{\text{Complex}}) / I_{\text{Free}}$

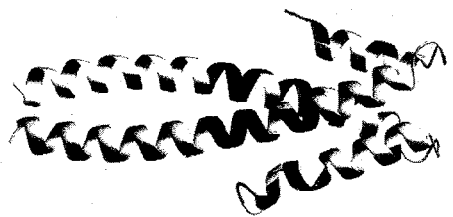


Figure 4. Crystal structure of EB1 C terminal domain (Slep, K.C. et al: J. Cell Biology, 168). The binding regions are dark.

構造解析

(¹北大・院薬・構造生物, ²北大・生命科学・構造生物, ³京大・ウイルス研・遺伝子動態調節)

○久米田 博之¹, 高橋 清大¹, 都築 奈津子², 小椋 賢治¹, 堀内 正隆¹, 米山 光俊³, 成田 亮³, 平井 玲子³, 藤田 尚志³, 稲垣 冬彦^{1,2}

NMR structure analyses of C-terminal domain of RLR proteins, MDA5 and LGP2. (¹Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, ²Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Life Science, Hokkaido University, ³Laboratory of Molecular Genetics, Institute for Virus Research, and Laboratory of Molecular Cell Biology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

Hiroyuki Kumeta¹, Kiyohiro Takahashi¹, Natsuko Tsuduki², Kenji Ogura¹, Masataka Horiuchi¹, Mitsutoshi Yoneyama³, Ryo Narita³, Reiko Hirai³, Takashi Fujita³, Fuyuhiko Inagaki^{1,2}

The innate immune system initially recognizes RNA virus infection and evokes antiviral responses by producing type I interferons. Viral RNA is recognized by specific Toll-like receptors or by cytoplasmic retioic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs), RIG-I and MDA5. RIG-I and MDA5 are comprised of two N-terminal caspase-recruitment domains (CARDs), helicase domain, and C-terminal domain (CTD). LGP2, a related receptor that lacks CARDs, recognizes viral RNA. Recently, we elucidated that RIG-I CTD specifically recognized viral RNA. Here, we report the solution structures of MDA5 and LGP2 CTDs and discuss their target recognition.

[はじめに] I型 interferon 産生を含む生体のウイルス応答は, ウィルスによって複製された非自己 RNA の認識によって開始される. 細胞内に侵入したウィルス RNA は retioic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor (RLR) である RIG-I や MDA5 によって認識される. RLR の caspase recruitment domain (CARD) と IPS-1/MAVS/Cardif/VISA の CARD との相互作用によって下流へとシグナルが伝達される. RIG-I および MDA5 は両者ともに N 末端より二つの CARD, helicase domain, C 末端ドメイン (以下, CTD) から構成され, 応答するウィルス種が異なる. 一方, LGP2 は CARD を欠き, helicase domain と CTD から構成されており,

キーワード: 自然免疫, RLR, MDA5, LGP2

著者名ふりがな: くめた ひろゆき, たかはし きよひろ, つづき なつこ, おぐら けんじ, ほりうち まさたか, よねやま みつとし, なりた りょう, ひらい れいこ, ふじた たかし, いながき ふゆひこ

RIG-IおよびMDA5のRNA認識におけるnegative regulatorとして機能すると言われている。また、ウイルス由来の特徴であるdouble strand RNAの認識にはhelicase domainとCTDの両方が必須であり、近年、RIG-I CTDが全長RIG-Iと同様のRNA結合特性を示すことから、CTDが標的の特異性を決定する領域であることが示唆されている。

昨年のNMR討論会においてRIG-I CTDの立体構造、ならびにRNA結合面の決定について報告した。今回の発表では、MDA5およびLGP2のCTDについて、立体構造決定を行い、RLRの標的認識機構について考察を行う。

[方法・結果] 配列アライメントおよびバイオインフォマティクスを用いてMDA5、LGP2のCTD領域を決定した。大腸菌による発現系、精製系を確立し、NMR法により立体構造解析を行った。

得られたMDA5、LGP2 CTD立体構造の骨格は既に解かれているRIG-I CTDと同様であった (Fig)。また、RIG-Iにおいて決定されたRNA結合領域は、MDA5、LGP2ともにRIG-I同様に広く塩基性を呈しており、塩基性面を構成する残基はRLR間で保存されていた。このことからMDA5およびLGP2も同様にこの塩基性面によってRNA認識を行うと示唆された。構造比較および配列アライメントからRIG-Iにおいて二本鎖RNAとの結合に必須であったK858、K861がMDA5ではそれぞれI956、E959であり、RNA結合能の減弱が示唆された。BIACOREを用いた各種RNAに対するSPR解析により、RIG-I、LGP2 CTDはdouble strand RNAに対して特異的に結合するがMDA5 CTDは結合しないことが示された。

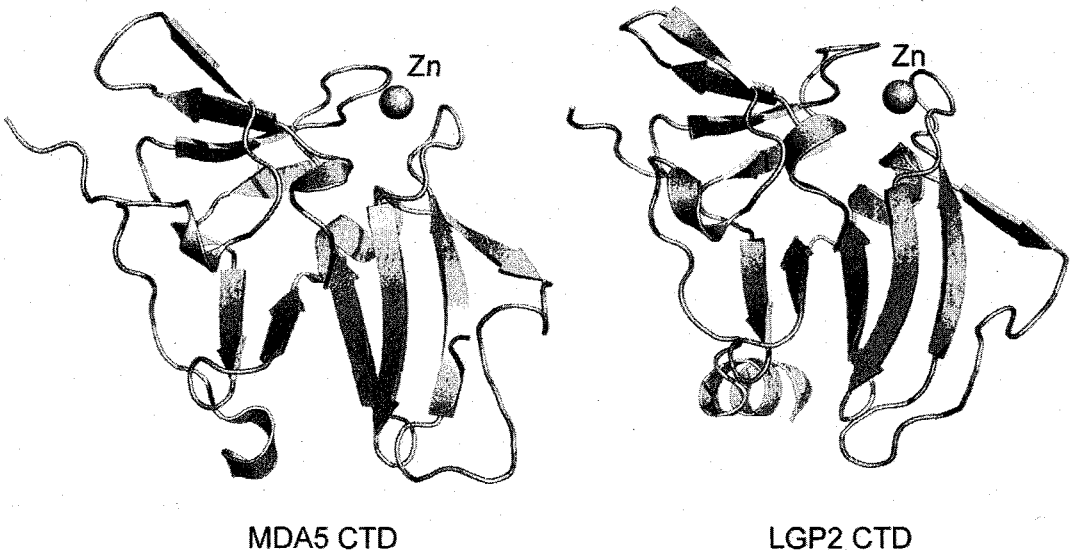


Fig. Ribbon diagram of MDA5 and LGP2 CTD.

大腸菌リボソームの休眠促進因子 HPF の立体構造解析

首都大学東京・理工学研究科¹、大阪医科大・物理²、吉田生物
研究所³

○佐藤 明子¹、永井 義崇¹、渡辺 拓実¹、上田 雅美^{2,3}、牧 泰史²、
伊藤 隆¹、和田 明^{2,3}、三島 正規¹

3D structure of the ribosomal hibernation promoting factor HPF

Akiko Sato¹, Yoshitaka Ngai¹, Takumi Watanabe¹, Masami Ueta^{2,3},

Yasushi Maki², Yutaka Ito¹, Akira Wada^{2,3}, and Masaki Mishima¹

¹Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University,

²Department of Physics, Osaka Medical College, ³Yoshida Biological Laboratory

Ribosomes in *Escherichia coli* change their composition and conformation in the stationary phase. RMF, HPF, YfiA, and SRA interact with stationary phase ribosomes. RMF association with 70S ribosome causes the loss of translational activity and its dimerization, which is called 100S ribosomes. HPF (hibernation promoting factor) and YfiA share 40% sequence homology, suggesting that their binding sites overlap. Previous genetic studies using HPF and YfiA null mutants showed that HPF and YfiA had antagonistic function in 100S ribosome formation : YfiA functions to inhibit 100S ribosome formation, whereas HPF functions to promote it. Here, we report the solution structure of HPF and structural comparison with YfiA.

【序論】大腸菌の70Sリボソームは、定常期に入るとRMF、HPF、YfiA、SRAなどの定常期特異的蛋白質が結合する。このうちRMFとHPFの結合により70Sリボソームが二量体化して活性を持たない100Sリボソームとなり、休眠段階(hibernation stage)に入ることが知られている。HPFとYfiAは40%という高いアミノ酸配列相同性を持っており、リボソーム上の同じ部位に結合することが予想され、実際に遺伝子欠失株を用いた研究から、HPFとYfiAはリボソーム上に重複する結合部位を持ち拮抗して作用し、HPFは100Sリボソーム形成を促進し、YfiAはこれを阻害していることが明らかになっている。なぜHPFとYfiAは高い相同性を持つにもかかわらず、リボソームに異なる構造変化をもたらし、反対の働きをするのか、本研究ではその機構解明を目的とし、まずHPFがリボソームの構造変化を促進する分子機構を詳細に検討するため、HPFの立体構造を決定した。

キーワード：リボソーム、HPF、YfiA、立体構造

著者ふりがな：さとう あきこ、ながい よしたか、わたなべ たくみ、うえた まさみ、まき やすし、
いとう ゆたか、わだ あきら、みしま まさき

【実験】大腸菌発現系を用いて $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識および ^{15}N 標識の HPF 蛋白質を調製した。蛋白質主鎖の NMR 信号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 次元測定を行い、側鎖の信号は 4D HC(CO)NH と定法により帰属を行った。水素原子間距離は定法の 3D-NOESY より収集した。NMR 測定は、CRYOPROBE を装着した Bruker AVANCE 600 分光計を用い、測定温度 303 K で行った。データ処理およびスペクトルの解析は Azara、NMRPipe、Sparky を用いて行った。pf1 フェージを用いて試料を配向させ、HNCO を用いて NH の RDC を測定した。これら NOE による距離情報や RDC に加え、TALOS から得られた主鎖の二面角情報、HNHB と HN(CO)HB から得られた χ_1 角度情報から CYANA ver. 3.0 を用いて構造計算を行った。最終的には CNS ver. 1.2 を用いて構造を決定した。

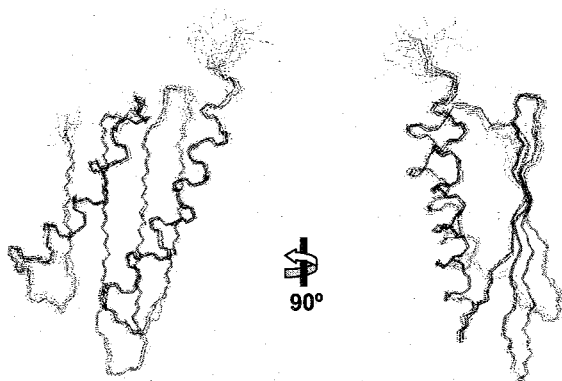


Fig. 1 Solution structure of HPF

A best-fit superimposition of the final 20 simulated annealing structures. Average backbone RMSD to mean: $0.26 \pm 0.05 \text{ \AA}$. Average all heavy atom RMSD to mean: $0.62 \pm 0.05 \text{ \AA}$.

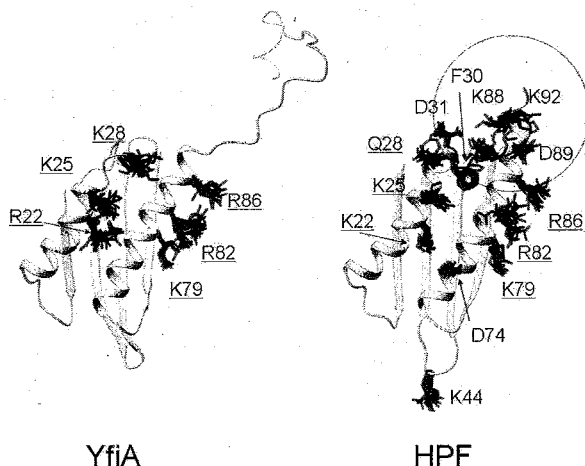


Fig. 2 Comparison of YfiA and HPF

【結果と考察】構造解析の結果 HPF は4本のストランドからなる β シートと2本のヘリックスからなり、高いホモロジーから予想されたように YfiA とよく似た構造をしていた(Fig.1)。70S リボソームと YfiA が結合した状態の立体構造は分解能が極めて低い(11Å)ながらもすでに報告されており、YfiA の R22、K25、K28、K79、R82、R86 がリボソームとの相互作用をしている残基とされている(NSMB, 2004, 1054-1059)(Fig2, 下線の残基)。これらの残基は HPF でも K28 を除きよく保存され、立体構造上も同等の位置に存在することから YfiA と HPF がリボソーム上の同一のサイトに結合するという予想を裏付けるものと考えている。さらに配列上 HPF でのみ高度に保存される残基 F30、D31、K44、D74、K88、D89、K92 を構造上に示すと、その多くが2本のヘリックスから形成されるエッジ領域(Fig. 2、実線円囲み)に集中する。また F30 の側鎖は蛋白質内部に入り、D31 は K88 と塩橋を形成しており、YfiA には見られないリジットなエッジ領域が形成されていた。今回明らかになったこれら構造的特徴と HPF 特異的な機能と関係調べていきたい。

○上脇 隼一¹、 楯 真一^{1,2}
(¹広島大院理・数理分子, ²PRESTO/JST)

Domain orientation analysis of the protein in a strongly
anisotropic rotational state

Jun-ichi Uewaki¹ and Shin-ichi Tate^{1,2}

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

Abstract

In this presentation, we show the domain orientation analysis of the proteins showing strong rotational anisotropy, whose NMR signals have rapid transverse relaxation. Because of the short T_2 , the conventional RDC based approach was not useful on the anisotropically tumbling molecule, even its molecular size is less than the 20kDa. Our devising TROSY-based alignment tensor analysis method, DIORITE, was found essential for the domain orientation analysis on the protein. In this work, we analyzed the HMGB2 protein having two HMG-boxes that show a characteristic L-shape structure. The usefulness of the DIORITE will be emphasized even for the middle-size proteins, when they show strong rotational anisotropy.

私たちは、蛋白質の機能を発現する際に生じるドメイン再配向など、振幅の大きな構造変化と機能の相関の研究を進めている。本研究では、強い分子回転異方性を示すL字型の立体構造を持つHMGドメイン2つからなるDNA結合蛋白質HMGB2の溶液中におけるドメイン間相対配向解析を行った結果を報告する。HMGB2蛋白質は全長で18kDaの分子量であるが、構成する各ドメインが示す強い分子回転異方性のために¹⁵N核の横緩和時間が短くなり、分子配向条件下で観測されたIPAP-HSQCスペクトル上の各ダブレットシグナルのうち高磁場成分のS/Nが極端に低下するために十分な数のRDCデータを集積することができなかった。一方、私たちが開発を進めているTROSYを用いた分子配向解析法(DIORITE)を用いて解析を行ったところ、全てのシグナルから分子配向依存的なTROSYシグナル変化量を高精度に観測することができ、溶液中でのHMGB2の2つのドメイン相対配向情報を得ることに成功した。

Keyword : NMR, anisotropic rotation, CSA, domain orientation, HMG

うえわき じゅんいち、 たて しんいち

HMGB2 蛋白質は、2つの HMGBbox が約 10 残基のリンカーでつながれた構造を持つ。興味深いことに、HMGB2 全長の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上で観測される各ドメイン由来のシグナルをみると、C 末端部の HMGBbox のシグナルはドメイン単独の時のシグナルと重なるのに対して、N 末端部 HMGBbox のシグナルは単離されたドメインの場合とは大きく異なっている。これは、HMGB2 全長構造中では、N 末端部ドメインがリンカーと相互作用していることを示していると考えられる。このため、HMGB2 は DNA が存在しない状態でも N 末端ドメインとリンカーとの相互作用を介して特定のドメイン配向を優位に持つものとする。そこで、DIORITE 解析の結果得られた各ドメインの配向テンソルを基にして2つのドメインの相対配向を解析したので、その結果を報告する。

DIORITE による分子配向解析の結果を Fig. 1 に示す。分子配向依存的な TROSY シフト変化量 ($\Delta\delta_{\text{trozy}}$) の観測値を計算値 (back calculation) が良く一致しており HMGB2 全長中での各ドメインの配向テンソル量が精度良く決定できたことを示す。ドメイン単独で立体構造解析した各ドメインの NMR 構造を用いて配向テンソル解析を行ったがいくつかの残基では計算値との食い違いがみられた。これは、立体構造決定を行った場合と

今回の配向解析実験での実験条件の違いや、特に N 末端ドメインに関しては、リンカーとの相互作用によりペプチド面の配向が変化したことによると考えられる。

異方性圧縮アクリルアミドゲルを用いた解析で得られた各ドメインの配向テンソルからは、4つの相対配向が可能となるが、N 末ドメインとリンカーとの選択的な相互作用を考え Fig. 2 に示す相対配向が妥当と考えられる。現在は、このモデル構造を検証し精密化するために、今回とは異なる磁場配向条件による配向テンソル解析を合わせてドメイン相対配向関係の精密化を進める一方で、PRE を用いた距離情報の取得を試みており、その結果についても合わせて報告する。

obs. vs back calc. $\Delta\delta_{\text{trozy}}$

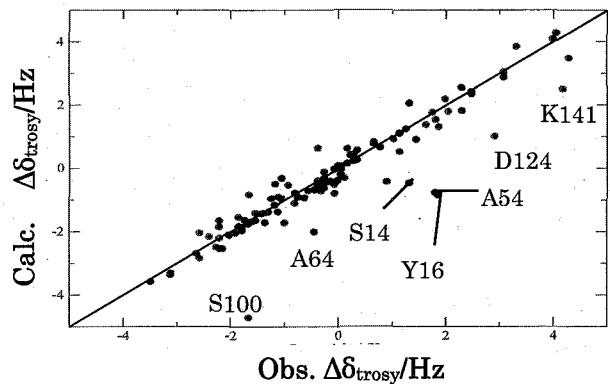


Fig.1 Correlation plot between the observed and back calculated $\Delta\delta_{\text{trozy}}$. Black: N-terminal domain, Red: C-terminal domain.

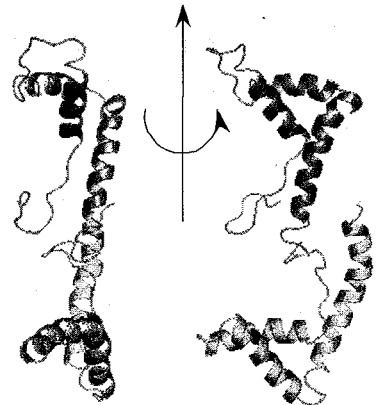


Fig.2: Possible relative orientation of the domains in HMGB2.

転写コアクチベーター-MBF1 が形成する複合体の溶液
構造の解析

首都大学東京大学院理工学研究科¹、国立遺伝学研究所²、京都大学
工学研究科³

○永井 義崇¹、広瀬 進²、白川 昌宏³、伊藤 隆¹、三島 正規¹

**Solution structure analysis of a protein-DNA complex including transcriptional
coactivator MBF1**

¹Graduate School of Science and Technology, Tokyo Metropolitan University,

²National Institute of Genetics, ³Graduate School of Engineering, Kyoto University

Yoshitaka Nagai¹, Susumu Hirose², Masahiro Shirakawa³, Yutaka Ito¹,

Masaki Mishima¹

Transcriptional coactivator MBF1 is conserved among various eukaryotes, and it regulates activity of the heterodimer transcription factor AP-1, which consists of the bZIP proteins Jun and Fos. Oxidation of cysteine 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. We have studied the structure of MBF1 and an interaction between Jun/Fos and AP-1 site using hetero nuclear NMR.

<序論>

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 Cys229 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、どのように MBF1 が Jun/Fos/DNA の AP-1 site と相互作用し、Jun のシステイン残基の酸化を防ぐかは明らかになっていない。本研究では、ショウジョウバエ由来の Jun/Fos/AP-1 site/MBF1 複合体の溶液中での立体構造を解析することによって Jun の酸化防御による転写制御の詳細を明らかにすることを目的とし、まず、多次元 NMR 測定によって MBF1 の立体構造

キーワード: 転写、MBF1、コアクチベーター、AP-1

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

を解析、次に Jun/Fos/AP-1 site/MBF1 の 4 者複合体の溶液中での再構成と立体構造解析を目指して Jun/Fos と AP-1 サイトとの結合実験を行った。

<実験>

大腸菌内で $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識、 ^{15}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、同じ試料を用いて非線形サンプリング法により、CBCANH、CBCA(CO)NH、HN(CA)CO、HNCO を測定した。また、側鎖の帰属のため、H(CCO)NH、C(CO)NH、HCCH-TOCSY、4D H(CCO)NH の各種測定を行った。

4 者複合体の溶液中での再構成にあたり、まず、 ^{15}N Jun、ノンラベル Fos、ノンラベル DNA および ^{15}N Fos、ノンラベル Jun、ノンラベル DNA を用いて $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC を測定することで Jun/Fos と AP-1 サイトとの結合実験を行った。非線形な測定データは AZARA を用いて MEM 法によりプロセスし、その他データ処理には NMRPipe を用いた。スペクトルの解析は Sparky を用いて行った。

<結果・考察>

MBF1 の単体に関しては、各種 3 次元測定によって得られたスペクトルから解析を行い、主鎖の帰属を完了した。現在、側鎖の帰属を行っている。

次に、 ^{15}N Fos、ノンラベル Jun、ノンラベル DNA を用いた再構成実験を行った。 ^{15}N Fos とノンラベル Jun の混合溶液に AP-1 site DNA を添加すると、右図のようにスペクトルに変化が見られている。

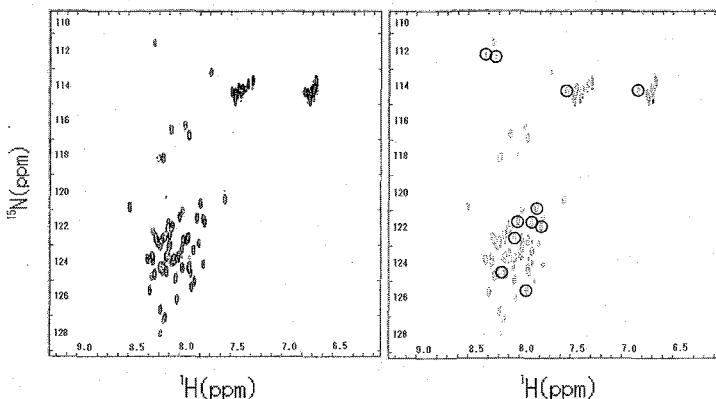


Fig.1. $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC spectra of 0.2 mM ^{15}N -labeled Fos/Jun (left) or ^{15}N -labeled Fos/Jun/AP-1 site (right). Significantly perturbed signals are circled. 50 mM K-Phos(pH6.9), 100 mM KCl at 303K. AVANCE600

DNA の添加によって明らかにスペクトルの変化が見られたことから、複合体の溶液中での再構成に成功したと考えている。しかしながら、Jun 単体での性質が十分でなく、精製時に凝集を起こし収量が少ないため、現在、発現系や精製法の改良に取り組んでいる。

今後は、まず MBF1 の立体構造の解析を進めるとともに、Jun、Fos、DNA との結合を確認し、最終的に 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。

(¹熊本大学 大学院 医学薬学研究部, ²東京大学 大学院
新領域創成科学研究科, ³東京大学 大学院 薬学系研究科)

○吉永 壮佐¹, はが 紗智子², 佐藤 徹², 木本 裕子²,
嶋田 一夫³, 東原 和成², 寺沢 宏明¹

Structure-Activity relationship of a murine peptidic pheromone ESP1.

(¹Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,

²Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo,

³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo)

○Sosuke Yoshinaga¹, Sachiko Haga², Toru Sato², Hiroko Kimoto²,
Ichio Shimada³, Kazushige Touhara², Hiroaki Terasawa¹

Pheromones are species-specific chemical signals that regulate a wide range of social and sexual behaviours in many animals. The vomeronasal organ (VNO) mediates the pheromonal information via vomeronasal sensory neurons (VSNs) in mice. We identified a male-specific peptide ESP1 (exocrine-gland-secreting peptide 1) secreted into tear fluids that stimulates female's VSNs (1). The aim of this study is to elucidate mechanisms underlying the pheromone-reception system. We report here the solution NMR analyses of ESP1. ESP1 is elucidated to be composed mainly of an α -helix and random-coil regions by the analyses of NOESY and $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE spectra and chemical shifts. We discuss about structure-activity relationship of ESP1 based on the structural data and mutational effects on the VSNs-stimulating activity.

【背景・目的】

フェロモンは、ある個体が発し、同種の個体に特定の行動の誘発や生理的な変化を引き起こす物質である。多くの哺乳動物において、フェロモンは鋤鼻器官・鋤鼻神経系を介して受容・感知されることが知られている。複数の揮発性低分子がフェロモンとして同定されていたが、東原らは、メスマウスの鋤鼻神経系を刺激する不揮発性のペプチド ESP1 (exocrine-gland-secreting peptide 1) を、オスマウスの涙腺から同定した (1)。また、ESP1 と相同性のある遺伝子を、マウスから 38 個、ラットから 10 個見出し、性・系統の違いに応じて発現パターンが異なることを明らかにした (2)。これらは、ESP ファミリーが、齧歯類において、性・系統・種の情報を伝達する分子群であることを示唆する。

(キーワード) フェロモン, ペプチド, ファミリー, GPCR

(著者ふりがな) ○よしながそうすけ, はがさちこ, さとうとおる, きもとひろこ,
しまだいちお, とうはらかずしげ, てらさわひろあき

本研究は、ESP1 の立体構造を決定し、受容体認識機構を明らかにすることにより、ペプチド性フェロモンファミリーが媒介する個体間コミュニケーションの構造学的基盤を確立することを目的とする。ここでは、ESP1 の NMR 解析について報告する。

【方法】

溶液 NMR 法による立体構造解析に必要な安定同位体標識タンパク質は、大腸菌を用いた大量発現系において M9 培地を用いることで得た。発現させたタンパク質からヒスチジンタグを分離するため、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにて粗精製後、トロンビン処理を行った。陰イオン交換、ゲル濾過、逆相の各クロマトグラフィーを行い、精製タンパク質を得た。立体構造解析に用いる NMR スペクトルは、各種の多核多次元相関分光法にて取得した。スペクトルの解析には Olivia、立体構造計算には CYANA を用いた。

【結果・考察】

ジスルフィド結合の架け違いで生じる ESP1 分子種のうち、分子内ジスルフィド結合をもつ単量体のみにもスマウスの鋤鼻神経系を刺激する活性があることを確認した。この単量体について ^{15}N および $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 標識タンパク質を調製し、多核多次元相関 NMR スペクトルを用いて、各原子核由来の NMR 信号の帰属を行った。

NOESY スペクトル、 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE スペクトル、化学シフトの解析より、ESP1 は α -ヘリックスを主とする特定の立体構造、およびランダムコイル領域から構成されることが分かった。N 末端のランダムコイル領域を欠失させた変異体を調製し、鋤鼻神経系刺激活性を調べたところ、活性を保持しており、C 末端側に活性をもつ部位があることが明らかになった。

また、金属イオン結合能を有することを、 ^1H - ^{15}N HSQC 測定を用いた滴定実験にて明らかにした。オスマウス由来の ESP1 は、N 末端 13 残基を欠失している (1)。欠失部位は、金属イオン結合部位の N 末端側に隣接していることから、金属イオンの結合が、C 末端側の鋤鼻神経系刺激活性をもつ部位のプロテアーゼ分解を防いでいることが示唆される。

NMR 解析ならびに変異体解析の結果に基づき、ESP1 の構造活性相関について議論する。

【展望】

ESP1 受容体タンパク質の調製を行い、転移交差飽和法 (3, 4) などを用いて、受容体認識を担う立体構造部位を特定する。活性 ESP ファミリー各構成分子の受容体認識機構を解明することで相違点・類似点を抽出し、個体間コミュニケーションの構造学的基盤を明らかにする。

【参考文献】

- (1) Kimoto H. et al., *Nature*, **437**, 898-901 (2005)
- (2) Kimoto H. et al., *Current Biology*, **17**, 1879-1884 (2007)
- (3) Nakanishi T. et al., *Journal of Molecular Biology*, **318**, 245-249 (2002)
- (4) Shimada I., *Methods in Enzymology*, **394**, 483-506 (2005)

○小野克輝^{1,2}、上田寛³、吉澤良隆³、加藤こずえ³、赤澤大輔³、
谷村隆次³、高橋栄夫²、嶋田一夫^{2,4}

¹JBiC、²産総研・バイオメディシナル情報研究センター、
³JBiC・東レ分室、⁴東大・院薬系

Interaction Analysis of GPVI with Collagen and its Binding Ligands

○Katsuki Ono^{1,2}, Hiroshi Ueda³, Yoshitaka Yoshizawa³, Kozue Kato³,
Daisuke Akazawa³, Ryuji Tanimura³, Hideo Takahashi², and Ichio Shimada^{2,4}

¹JBiC, ²Biomedical Information Research Center, AIST, ³JBiC, Toray Branch,
⁴Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Glycoprotein (GP) VI is a key receptor for collagen-induced platelet adhesion and aggregation. 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, collagen binding site in GPVI was identified by interaction analysis using NMR and mutagenesis studies. Moreover, we indicated that losartan which inhibits the activity of platelet aggregation directly interacts with a specific region of GPVI, and determined its reliable complex structure by using combination of NMR data and in silico tool. A collagen binding inhibition mechanism against GPVI of losartan will be discussed.

《序論》

Glycoprotein (GP) VI 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、フィブリン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。しかし、その認識機構の詳細について

キーワード：GPVI、コラーゲン、血小板凝集、losartan

おのかつき、うえだひろし、よしざわよしたか、かとうこずえ、あかざわだいすけ、
たにむらりゅうじ、たかはしひでお、しまだいちお

では明らかになっていない。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創出の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。

一方、AT₁ 受容体拮抗薬として知られている losartan にはコラーゲン惹起による血小板凝集の阻害活性があり、直接的な結合は示されていないが GPVI に作用していることを示唆する報告がある。そこで我々は、losartan が GPVI に対し直接結合することを明らかにし、更に GPVI と losartan のより信頼性の高い複合体構造の決定を NMR と計算科学の併用により試みた。

《結果と考察》

GPVI に対する losartan の化学シフト摂動実験(CSP)の結果は、losartan が GPVI の strand C 及び E からなる疎水ポケット領域に結合していることを示していた。更に GPVI 表面に docking soft (Glide 及び sievgen)を用いて CSP より得られた losartan 結合領域に対する結合ポーズを複数発生させ、得られたポーズを RMSD 解析により 4 つのグループに分類した。そして、GPVI と losartan との分子間 NOE 解析により、候補となっている複合体構造の中から絞り込みを行った。(Figure)

得られた GPVI と losartan 複合体構造に対して球形に水を付加した MD シミュレーションを行うことで、複合体構造の安定性を調べた。その結果、losartan はシミュレーションを行っている間、GPVI から解離することなく安定した状態を維持していることが明らかとなった。また、このシミュレーション結果を詳細に解析することで、losartan が GPVI と結合する上でピフェニル基のテトラゾール基が修飾されているがフェニル基が重要であることを特定した。

我々は NMR と点変異体を用いた実験の結果から、GPVI のコラーゲン結合部位がこれまで想定されていた疎水ポケット領域とは異なった strand C, C', 及び F からなる β -sheet 領域であることを明らかにした。更に同定された領域は losartan 結合領域とも異なっているため、losartan によるコラーゲン結合阻害は競合的なものではないと考えた。本発表では、得られた結果を基に losartan が如何に GPVI とコラーゲンの結合を阻害しているのかを考察する。

《謝辞》

本研究は NEDO の支援を受けました。

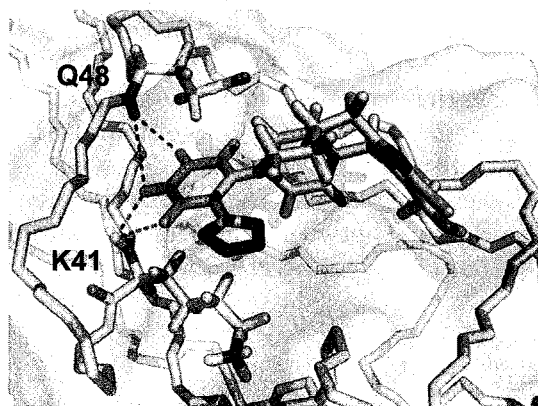


Figure. Representative docking structure of GPVI and losartan. Observed intermolecular NOEs between GPVI and losartan are represented by a dotted line.

P025 タバコ ADP-ribosylation factor-like protein ARLA1d の NMR 解析

((独)農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用ユニット)

○岡村英保、錦織雅樹、石川雅之、加藤悦子

NMR study of *Nicotiana tabacum* ADP-ribosylation factor-like protein ARLA1d

National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS),

Plant-Microbe Interactions Research Unit

○Hideyasu Okamura, Masaki Nishikiori, Masayuki Ishikawa, Etsuko Katoh

The replication of eukaryotic positive strand RNA virus genomes occurs in membrane-bound replication complexes which consist of virus-coded replication proteins and host proteins. Knowledge about the molecular mechanisms of replication complex formation would help to develop inhibitors of viral RNA replication. Recently, we found that *Nicotiana tabacum* ADP-ribosylation factor-like protein A1d (*Nt*ARLA1d) is a host protein that associates with the tobacco mosaic virus replication complex. For structural elucidation of interactions between virus replication proteins and host proteins, we are studying *Nt*ARLA1d by using NMR.

真核生物に感染するプラス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製は、ウイルスにコードされた複製タンパク質と宿主タンパク質からなる膜結合性の複製複合体で起こることが知られている。複製複合体の形成機構を明らかにすれば、それを阻害する薬剤の開発に大きく貢献できるであろう。近年、錦織らにより、タバコモザイクウイルスの RNA 複製に関与する宿主因子の一つとしてタバコ ADP-ribosylation factor-like protein A1d (*Nt*ARLA1d)が同定された。本研究では、原子レベルでのウイルス側-宿主側因子間相互作用の解明と、その相互作用を特異的に阻害する薬剤の開発に向けて、NMR による溶液の *Nt*ARLA1d の立体構造解析及びウイルス増殖関連因子との相互作用解析を進行中である。

*Nt*ARLA1d は 20.5kDa の低分子量 GTP 結合タンパク質群の ARF ファミリーに属するタンパク質であり、GTP 結合型と GDP 結合型の立体構造変化により分子スイッチとして機能すると考えられている。また、N 末には両親媒性ヘリックスを形成すると考えられている ARF ファミリーに特徴的なモチーフが存在している。今回、我々は溶解性の問題からこのモチーフを含む N 末の 16 残基を欠損した Δ N-*Nt*ARLA1d (17-184)について、溶液 NMR により GTP および GDP 結合型の立体構造解析を試みた。 Δ N-*Nt*ARLA1d は His-tag 融合タンパク質として大腸菌大量発現系により産生した。条件検討の結果、 Δ N-*Nt*ARLA1d は GTP への結合能が GDP に比べてはるかに強く、また GTP の加水分解活性も 4°C 条件化では非常に弱いことがわかった。これらのことをふまえて GTP 存在下で精製することによりほぼ単一の GTP 結合型 Δ N-*Nt*ARLA1d を得た。構造解析用のサンプルとして 0.3 mM の Δ N-*Nt*ARLA1d に対して過剰量(終濃度 5.0 mM)の GTP を加えることにより、2 週間程度の NMR 測定を可

キーワード 立体構造解析, ウイルス増殖関連因子, 低分子量 G タンパク質, ARL

○おかむらひでやす, にしきおりまさき, いしかわまさゆき, かとうえつこ

能にした(Fig. 1(left)). また、得られたGTP結合型 Δ N-*Nt*ARLA1dは27°Cで約5日放置することで自身のGTPase活性によりほぼ完全にGDP型に変換するので、これによりGDP結合型 Δ N-*Nt*ARLA1dを得た。GDP結合型に関してはTris-HCl緩衝液と終濃度20 mMのMgCl₂を用いることにより安定なNMRスペクトルを得た(Fig. 1(right)). NMR測定にはBruker社製Avance500 およびAvance600 を用いた。NMRスペクトルの処理、解析にはNMRPipe/NMRWishを用いた。現在、GTP及びGDP結合型についてCyana及びCNSを用いて、立体構造計算を行っている。Fig. 2 にはGTP型 Δ N-*Nt*ARLA1dの溶液構造の結果を示した。当日は詳細なGTP,GDP型の立体構造とともに、ウイルス増殖関連因子との相互作用解析の状況についても報告する予定である。

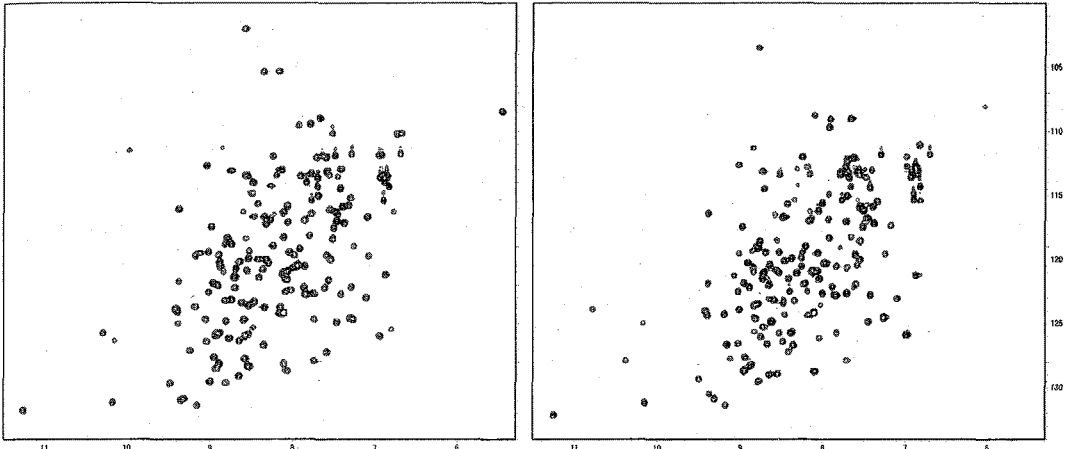


Figure 1. ¹H-¹⁵N HSQC spectra of Δ N-*Nt*ARLA1d-GTP in 20 mM NaPB, pH7.0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (left) and Δ N-*Nt*ARLA1d-GDP in 20 mM Tris-HCl, pH7.0, 100 mM NaCl, 20 mM MgCl₂ (right)



Figure 2. The solution structure of the GTP form of Δ N-*Nt*ARLA1d

HiPIP と Cyt *c'* の機能と構造解析(山形県工業技術センター¹, 農研機構・食総研², 茨城大学理学部³)○村岡義之¹, 逸見光², 吉田充², 高崎将充³, 大友征宇³**NMR Analysis of HiPIP and Cytochrome *c'* from a Thermophilic Sulfur Photosynthetic Bacterium *Thermochromatium tepidum****(¹Yamagata Research Institute of Technology, ²National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, ³Faculty of Science, Ibaraki University)*○Yoshiyuki Muraoka¹, Hikaru Hemmi², Mitsuru Yoshida², Masamitsu Takasaki³, Seiu Otomo³

Thermophilic sulfur photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum* possesses one high potential iron-sulfur protein (HiPIP), one cytochrome *c'* and two low potential cytochrome *c*-552's. In this work, we established the large-scale stable isotope-labeling and purification procedures for these proteins and conducted solution NMR measurements for the HiPIP and cytochrome *c'*. Temperature-dependent paramagnetic chemical shifts have been investigated and the amino acids around the active sites have been characterized.

【緒言】

好熱性紅色硫黄光合成細菌 *Thermochromatium (Tch.) tepidum* に含まれる水溶性電子伝達タンパク質には、高電位鉄-硫黄タンパク質 (HiPIP: High-Potential Iron-Sulfur Protein), Cyt *c'* 及び2つの低電位 Cyt *c*₅₅₂ の4種類のタンパク質を保有していると考えられている。通常 HiPIP と呼ばれるタンパク質は 4Fe-4S 型の鉄-硫黄クラスターを含んだタンパク質であり、現時点において X 線結晶構造解析で決定されたタンパク質の立体構造の中で最高の分解能をもつ。また、Cyt *c'* は循環的な電子伝達経路においてペリプラズム側にて酸化還元電位のバランスを保つ redox buffer としての役割があると考えられているヘムタンパク質であるが、その機能は不明なところが多い。そこで本研究ではこれら電子伝達タンパク質について精製方法を確立し、NMR による機能と構造の解析を行うことを目的とした。

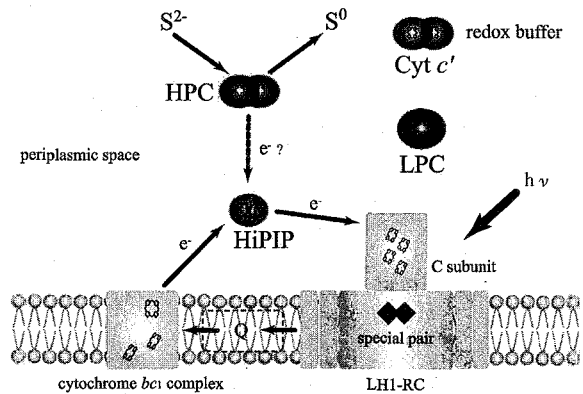


Fig.1 Photosynthetic reaction center and electron transfer components of *Thermochromatium tepidum*.

光合成, 電子伝達タンパク質, 常磁性シフト

むらおかよしゆき, へんみひかる, よしだみつる, たかさきまさみつ, おおともせい

【実験方法】

実験に用いた光合成細菌を安定同位体である $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$, $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COONa}$, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を含む培地で標識し、タンパク質をラベル化した。集菌した菌体を超音波破碎した後、超遠心分離により菌体に含まれる可溶性タンパク質の抽出を行った。抽出したタンパク質は DEAE 陰イオン交換カラムを用いた定圧クロマトグラフィシステム及び硫酸分画法により4種類の水溶性電子伝達タンパク質を精製した。これらのタンパク質のうち、HiPIP 及び Cyt *d* については核磁気共鳴法により解析を行った。

【結果・考察】

精製した HiPIP 及び Cyt *d* はバッファ交換、濃縮を行い、NMR 測定用としてタンパク質濃度 1mM 以上の試料を得ることが出来た。構造解析には HNCACB, TOCSY-HSQC 等の三次元 NMR による解析を行うことで、*Tch. tepidum* に特有な領域について連鎖帰属を行った。また、活性中心にある鉄-硫黄クラスターにあるシステインのアミノ酸残基はシグナルを得ることが出来なかったことから、HiPIP の活性中心は強固な結合であることが考えられる。また、Cyt *d* については現在アミノ酸配列を解析中である。

HiPIP は鉄-硫黄クラスターに含まれる Fe(II)と Fe(III)で構成されるペアのスピ状態を変えることで酸化還元電位を変化させ、電子伝達が行われる。*Tch. tepidum* に含まれる酸化型の HiPIP に含まれる鉄-硫黄クラスターの全スピンは $S=1/2$ であることから、この部位近傍に結合したシステインのアミノ酸残基由来の ^1H -NMR シグナルは -40ppm から 110ppm の範囲で常磁性シフトとして観測される。そこで、この常磁性シフトの温度依存性について解析を行った。Fig.2 にその結果を示す。鉄-硫黄クラスターには4つのシステインが結合しているが、各々の残基によりシフトする値が異なっていることがわかる。一般に常磁性シフトでは Fe(II)と Fe(III)がペアを形成する混合原子価状態では低磁場側に、Fe(III)同士がペアを形成する状態では交換結合定数の値によって高磁場側か低磁場側にシフトすることが決まる。今回得られた結果は *Allochromatium vinosum* に含まれる HiPIP と同様な傾向を示したことから、*Tch. tepidum* では Cys63, Cys77 が混合原子価状態に結合し、Cys43, Cys46 が Fe(III)同士のペアに結合していることが示唆された。

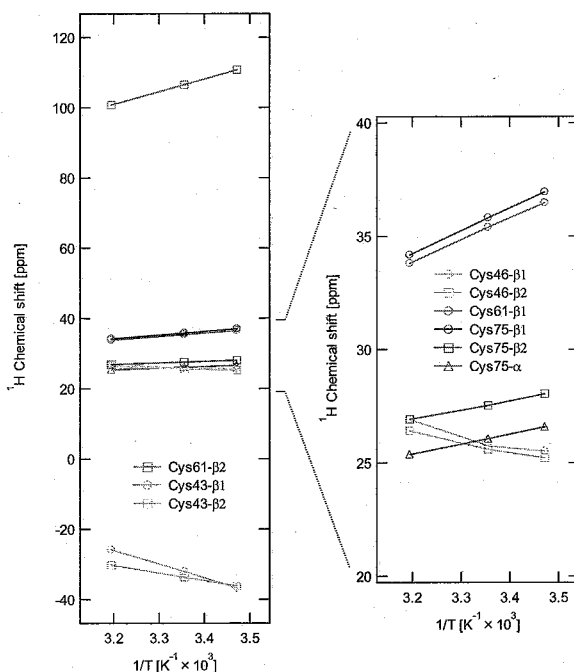


Fig.2 Temperature dependence of the paramagnetic shifts on oxidized-HiPIP from *Thermochromatium tepidum*.

一般に常磁性シフトでは Fe(II)と Fe(III)がペアを形成する混合原子価状態では低磁場側に、Fe(III)同士がペアを形成する状態では交換結合定数の値によって高磁場側か低磁場側にシフトすることが決まる。今回得られた結果は *Allochromatium vinosum* に含まれる HiPIP と同様な傾向を示したことから、*Tch. tepidum* では Cys63, Cys77 が混合原子価状態に結合し、Cys43, Cys46 が Fe(III)同士のペアに結合していることが示唆された。

((独) 生物研・植微ユニット、琉球大学・農学部)

岡村英保、大沼貴之、翁長章子、平良東紀、○加藤悦子

NMR analysis of chitooligosaccharide binding to LysM domain of *Pteris ryukyuensis* chitinase

National Institute of Agrobiological Sciences¹, Ryukyu University²

Hideyasu Okamura¹, Takayuki Ohnuma¹, Shoko Onaga², Toki Taira², and Etsuko Katoh¹

The LysM domain probably binds peptidoglycans, but how it does so has yet to be described. For this report, we measured the thermal stabilities of recombinant LysM domains derived from *Pteris ryukyuensis* chitinase-A (PrChi-A) and monitored their binding to *N*-acetylglucosamine oligomers ((GlcNAc)_n) using isothermal titration calorimetry, and NMR spectroscopy. We thereby characterized certain of the domains' functional and structural features. We determined solution structure of LysM domain and monitored by NMR spectroscopy, allowed us to identify the domain residues that are critical for (GlcNAc)₅ binding. The binding site is a shallow groove formed by the N-terminal part of helix 1, the loop between strand 1 and helix 1, the C-terminal part of helix 2, and the loop between helix 2 and strand 2. Furthermore, mutagenesis experiments reiterate the critical involvement of Tyr72 in (GlcNAc)_n/LysM domain binding. Ours is the first report describing the physical structure of a LysM oligosaccharide-binding site based on experimental data.

[序論]LysM domain は約 40 アミノ酸残基からなる比較的小さなドメインである。これまで原核および真核生物由来のペプチドグリカン分解酵素やキチナーゼ、植物における根粒菌形成に関与する Nod Factor や植物病原菌に対する防御応答を引き起こすキチンオリゴ糖エリシターのレセプター細胞外ドメインとして機能していることが報告されている。しかし、LysM domain の立体構造の報告例は少なく、そのリガンド認識機構は不明である。本研究では琉球シダ植物由来キチナーゼ(PrChi-A)の LysM domain の溶液構造を決定し、キチンオリゴ糖との相互作用について解析を行った。

Key words : NMR, LysM, *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), 等温滴定型カロリメトリー(ITC)

おかむらひでやす、おおぬまたかゆき、おながしょうこ、たいらとうき、かとうえつこ

[方法]

NMR測定サンプルは 0.8 mM $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体を用いた。NMR測定は、Bruker社製 AV600 およびAV500 を用い 300 Kにて測定を行った。構造計算はCYANAを用いた。

[結果と考察]

1. 立体構造解析

NOE から 782 個の距離情報、TALOS から 56 個の ϕ 、 ψ 、13組の水素結合情報、3組の s-s 結合情報を収集し、CYANA を用いて構造計算を行った。その結果、2本の β ストランドからなる逆平行ベータシートを2本の α ヘリックスが裏打ちする $\beta\alpha\alpha\beta$ fold を形成していることが明らかとなった。この構造は、すでに報告されている大腸菌由来の MltD LysM domain と類似していた (Fig.1 a)。

2. LysM domain と(GlcNAc)₅の相互作用

NMR滴定実験により、LysM domain と(GlcNAc)₅の相互作用解析を行った。その結果、(GlcNAc)₅の結合部位は、N末の helix 1 と、 β strand 1 と helix 1 をつなぐループ、およびC末の helix 2 と、helix 2 と strand 2 をつなぐループにより形成された溝であることが分かった(Fig.1 b)。またこの部分に存在する、Tyr72 が(GlcNAc)_n/LysM 複合体形成に重要であることが予測された。その結果を元にY72F変異体を作成し、ITC実験により結合活性を測定した結果、明らかにTyr72 が(GlcNAc)_n の認識に重要であることがわかった。また、LysM domainは多くの場合重複して存在することが知られている。そこで、LysM domainがタンデムに存在する蛋白質を作成し、NMR滴定実験を行った。しかし、現在のところ、LysM domainがタンデムに存在することによる糖鎖認識機構に明確な差は得られていない。

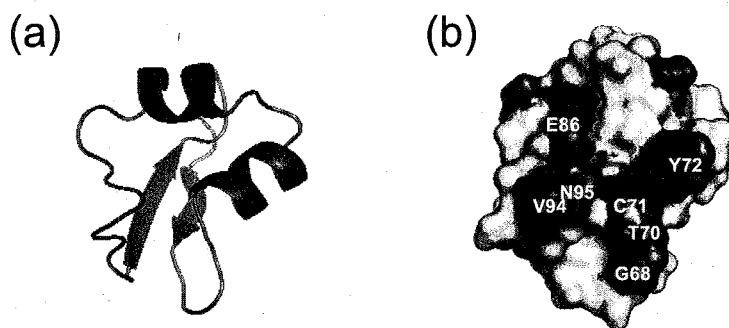


Fig. 1 The solution structure (a) and surface structure (b) of LysM domain. Residues whose amide backbone resonances were significantly perturbed owing to the presence of bound (GlcNAc)₅, are colored black.

¹北大院・生命科学、²北大院・理、³富山大・薬、⁴九大院・理

○神谷昌克¹、杉田圭太郎²、相沢智康²、水口峰之³、川畑俊一郎⁴、出村誠¹、河野敬一²

NMR analysis of Tachypleisin I with LPS

¹Grad. Sch. of Life Sci., Hokkaido Univ., ²Grad. Sch. of Sci., Hokkaido Univ., ³Fac. of Pharmaceut. Sci., Toyama Univ., ⁴Dept. of Biol., Grad. Sch. of Sci., Kyushu Univ.

○Masakatsu Kamiya¹, Keitaro Sugita², Tomoyasu Aizawa², Mineyuki Mizuguchi³, Shun-ichiro Kawabata⁴, Makoto Demura¹, Keiichi Kawano²

Antimicrobial peptides are a key component of the innate immune systems of most multi-cellular organisms. An antimicrobial peptide, Tachypleisin I, was found in hemocytes of the Japanese horseshoe crab. Tachypleisin I is a 17-residue cyclic peptide which is active against fungi and Gram-positive and Gram-negative bacteria. In aqueous solution, Tachypleisin I adopts a β -hairpin fold by two disulfide bridges.

Despite broad divergences in sequence and taxonomy, most antimicrobial peptides share a common mechanism, i.e., membrane permeabilization of the pathogen. The action mechanism of tachypleisin I is also believed to disrupt or permeabilize bacterial membranes. Previous studies have shown that Tachypleisin I is capable of interacting with lipopolysaccharide (LPS). LPS is the major constituent of the outer membrane of Gram-negative bacteria. However, the molecular mechanism has yet to be elucidated. To better understand the action mechanism of Tachypleisin I, we performed a structural analysis of tachypleisin I in the presence of LPS. In this presentation, we would like to discuss the action mechanism of antimicrobial activity based on the structures of Tachypleisin I with LPS..

キーワード： 抗菌ペプチド、リポ多糖、trNOE

著者ふりがな： かみや まさかつ、すぎた けいたろう、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

[序論]

タキプレシン I (TP)はカプトガニの血球から発見された抗菌ペプチドであり、グラム陰性菌・陽性菌の両方に活性をもつ (Fig. 1)。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。本研究では、グラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖 (LPS)との相互作用解析を行うことにより、その一端を明らかにすることを目的とする。本発表では、タキプレシン I・リポ多糖複合体のモデル構造を提示し、その活性機構について議論する予定である。

[方法]

固相合成法によりタキプレシン I ペプチドを合成した。空気酸化により、システイン間のジスルフィド結合を形成させたのち、逆相HPLCにより精製し、凍結乾燥させたものを測定試料として用いた。LPSは、*E. coli* O111:B4由来のものをSIGMAから購入した。測定試料の条件は1mM TP, 10 % D₂O, pH 4.2である。全ての測定はBruker DRX 500 MHzまたは 600 MHz(クライオプローブ付)の装置で行われた。

[結果]

一次元¹H NMRによるLPS滴定実験からTP/LPS複合体試料のLPSの量を0.8 mgとした(data not shown)。Fig.2はTP単体およびLPSとの複合体試料の¹H TOCSYスペクトルである。LPSの添加により、Cys3, Arg15, Arg17およびC末アミド基に相当するピークの化学シフトに有意な変化が見られた。このことは、LPSがFig.1における左側に位置するアミノ酸残基すなわちN末、C末の両末端部分でタキプレシンIと相互作用することが明らかになった。また、¹H NOESYスペクトルにおいて、TP単体に比べてTP/LPS複合体では両末端部分に位置する原子間のNOE関連ピークが多く観測された。TP単体では末端部分はNOE距離制限の不足により、構造の収束があまり良くない。したがって、複合体でのNOE関連ピークの増加はこの部分がよりリジットな構造に変化したことを示唆する。現在、複合体の構造計算を行っている。また、STD (Saturation Transfer Difference)法により、LPS側の相互作用部位を同定することによって、構造計算の結果と合わせて合理的なTP/LPS複合体を提示する予定である。

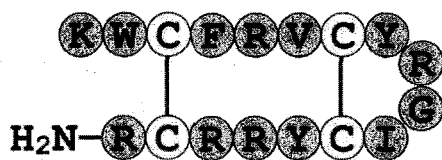


Fig.1 Schematic diagram of Tachyplesin I

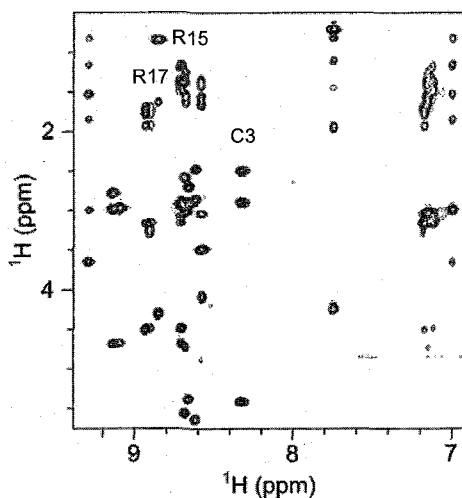


Fig.2 ¹H TOCSY spectra of TP/LPS complex

異種核多次元 NMR 法による
高度好熱菌 RecO 蛋白質の高次構造解析

(1 首都大学東京大学院・理工学研究科, 2 理化学研究所・生体超分子構造・機能研究協力グループ)

○永江峰幸¹, 井上 仁², 美川 務², 三島正規¹, 柴田武彦²,
伊藤 隆¹

Structural analysis of *Thermus thermophilus* RecO by heteronuclear
multidimensional NMR spectroscopy

○Takayuki Nagae¹, Jin Inoue², Tsutomu Mikawa², Masaki Mishima¹, Takehiko Shibata² and
Yutaka Ito¹

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; ²Research Group for
Bio-supramolecular Structure-Function, RIKEN

RecO protein is one of the key components of the RecFOR dependent DNA recombinational repair pathway, which is widely conserved in eubacteria.

RecO is supposed to play the central role in the pathway, since RecO on its own has an activity to exchange homologous regions of single-stranded and double-stranded DNA molecules. In order to understand the structural bases of RecO-DNA interactions and the strand-exchange activity, we have initiated NMR studies of *Thermus thermophilus* HB8 RecO (ttRecO). Almost complete backbone NMR resonance assignment has been achieved by analysing 3D triple-resonance NMR spectra measured on ¹³C/¹⁵N-labelled ttRecO. Side-chain resonance assignment and structure calculations are in progress.

【序】 「DNA 相同組換え」は、DNA 間ではほぼ同じ塩基配列を持つ領域を交換または置き換えるという、生命に普遍的に起こる遺伝現象である。「DNA 相同組換え」を行う蛋白質として、大腸菌などの原核生物では RecA 蛋白質が、真核生物では Rad51 蛋白質などが知られている。一方で DNA 相同組換えのメカニズムは、「組換え修復」として遺伝子の修復にも重要な役割を果たしており、真正細菌では RecFOR 経路という組換え修復メカニズムが存在する。

Keyword : DNA 組換え修復 異種核多次元 NMR 立体構造解析

ながえ たかゆき, いのうえ じん, みかわ つとむ, みしま まさき,
しばた たけひこ, いたう ゆたか

RecFOR 経路に関わる主な蛋白質である RecF, RecO, RecR の中で, RecO 蛋白質は単独で一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の相同領域の組換え反応活性を持つことが報告されており, RecFOR 経路の中心的役割を担っていると考えられている. そこで我々はこの RecO 蛋白質と DNA の相互作用と鎖交換反応についての構造的知見を得るため, 異種核多次元 NMR 法による解析を進めている.

【実験および結果】 試料として高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の RecO 蛋白質 (ttRecO 蛋白質) を選択し, 大腸菌内の大量発現系を用いて, NMR 測定に用いる $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した ttRecO 蛋白質を調製した. 蛋白質主鎖 NMR シグナルの帰属のために, 2 次元 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルに加えて, 4 種の 3 次元 triple-resonance NMR スペクトル (CBCA(CO)NH, CBCANH, HNC(O), HN(CA)CO) の測定を行った. 解析の結果, ttRecO 蛋白質の全 229 残基のうち N 末端とプロリン残基を除いた観測可能な 211 残基の内 199 残基 (約 94%) のシグナルを帰属することができた (Figure 1). さらに 2 次元 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC スペクトルに加えて, 5 種の 3 次元 triple-resonance NMR スペクトル (CBCA(CO)NH, CC(CO)NH, HBHA(CO)NH, H(CCCO)NH, HCCH-TOCSY) を解析することで, 蛋白質側鎖 NMR シグナルの帰属を行った. ttRecO 蛋白質にはアラニンが 28 残基, ロイシンが 43 残基, バリンが 13 残基, イソロイシンが 5 残基存在しているが, シグナルのオーバーラップによりこれらの蛋白質側鎖 NMR シグナルの帰属が困難であった. そこでシグナルのオーバーラップを解消し蛋白質側鎖 NMR シグナルの帰属をさらに進めるため, また疎水性アミノ酸残基が形成する蛋白質コア部分の高次構造情報を得るため, ttRecO 蛋白質の疎水性アミノ酸の側鎖のうちバリンの γ 位, ロイシンの δ 位, イソロイシンの δ 位のメチル基を選択的に $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 標識 (残りは重水素化) し, これらの試料を用いて側鎖メチル基シグナルの誤りのない帰属と, NOE シグナルの解析を進めている. また, NOE 由来の高次構造情報を基にした ttRecO 蛋白質の高次構造計算も現在試みている.

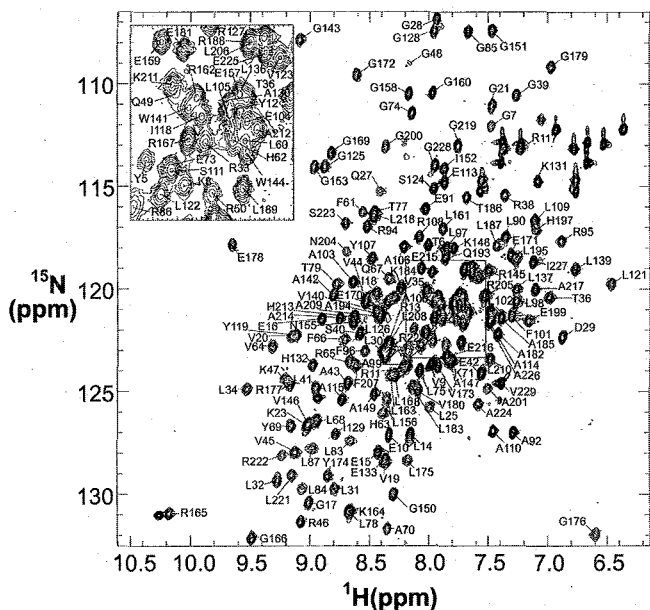


Figure : $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC spectrum of ttRecO in presence of Mg^{2+}

(理研横浜・生命分子システム研究領域¹, 東工大・院総理工², 東大・院理³)

○秦旭栄¹、長島敏雄¹、梅原崇史¹、林文晶¹、渡部暁¹、原田拓志¹、矢吹孝¹、青木雅昭¹、関英子¹、松田貴意¹、好田真由美¹、廣田洋¹、木川隆則^{1,2}、横山茂之^{1,3}

Studies on the structure and function of Trim5 α B-box domain

(RIKEN BBSC¹, Tokyo Institute of Technology², University of Tokyo³)

○Xu-rong Qin¹, Toshio Nagashima¹, Takashi Umehara¹, Fumiaki Hayashi¹, Satoru Watanabe¹, Takushi Harada¹, Takashi Yabuki¹, Masaaki Aoki¹, Eiko Seki¹, Takayoshi Matsuda¹, Mayumi Yoshida¹, Hiroshi Hirota¹, Takanori Kigawa^{1,2} and Shigeyuki Yokoyama^{1,3}

Introduction

It has been identified that Trim5 α protein restricts retroviruses such as HIV-1 and murine leukemia virus. Previous studies demonstrated that Trim5 α proteins specifically recognize the viral cores and accelerate the uncoating process, thus potentially interfering with the orderly disassembly of the viral capsid.

Trim5 α proteins are composed of four domains, a RING, B-box 2, coiled-coil and B30.2/SPRY. The RING domain plays an important role in the rapid degradation pathway of Trim5 α ; the B-box 2 domain, which provides an effector function to restriction, is essential to block viral replication; the coiled-coil domain, which allows oligomerization of Trim5 α , is critical for interaction of the B30.2(SPRY) domain with the HIV-1 capsid; and finally, the B30.2(SPRY) domain, which provides the capsid recognition motif, dictates the specificity of restriction.

Some residues in B-box 2 domain are reported to play very important role in retroviral restriction. To gain insights into structure-function relationships, we have solved the monomer structure of the B-box 2 domain (86-131) from human Trim5 α using multidimensional NMR spectroscopy (PDB entry 2YRG).

Keywords: Retroviral restriction, Trim5 α protein, B-box 2 domain.

しんきょくえい、ながしまとしお、うめはらたかし、はやしふみあき、わたなべさとる、はらだたくし、やぶきたかし、あおきまさあき、せきえいこ、まつだたかよし、よしだまゆみ、ひろたひろし、きがわたかのり、よこやましげゆき

Materials and Methods

The ^{13}C - and ^{15}N -labeled protein was produced by the *E. coli* cell-free synthesis system. All NMR measurements were performed at 293K under ambient pressure on Varian INOVA 600 or, in the case of the NOESY experiments, Varian INOVA 800 and 900 spectrometers.

The sequence-specific backbone resonance assignment was achieved through a combination of standard triple resonance techniques using 2D ^1H , ^{15}N -HSQC and 3D HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB and CBCA(CO)NH spectra. Side-chain assignment was obtained using 2D ^1H , ^{13}C -HSQC and 3D C(CO)NH, (H)CCH-TOCSY and HCCH-TOCSY spectra. 3D ^{15}N -edited (^1H , ^1H)-NOESY and ^{13}C -edited (^1H , ^1H)-NOESY spectra were used to determine the distance restraints.

The programs NMRPipe, NMRView and Kujira were used for spectral processing and data analysis. Structure calculation were performed with the program CYANA 2.0.17.

Result and Discussion

The B-box 2 domain from Trim5 α adopted a $\beta\beta\alpha$ RING-like fold which is maintained by two zinc ions and CHCDC2H2-type zinc coordination (Fig.1). The majority of hydrophobic residues are solvent-exposed and clustered, forming two hydrophobic patches on the surfaces of the domain. One located on the outer surface of the helix and the first β -sheet and was formed by residues L103, L104, W115 and L116 and the other located on the region formed by F105, V112 and F129. The former patch is surrounded by negatively charged residue E118 and positively charged residue R119, which have been proved to be very important for the function.

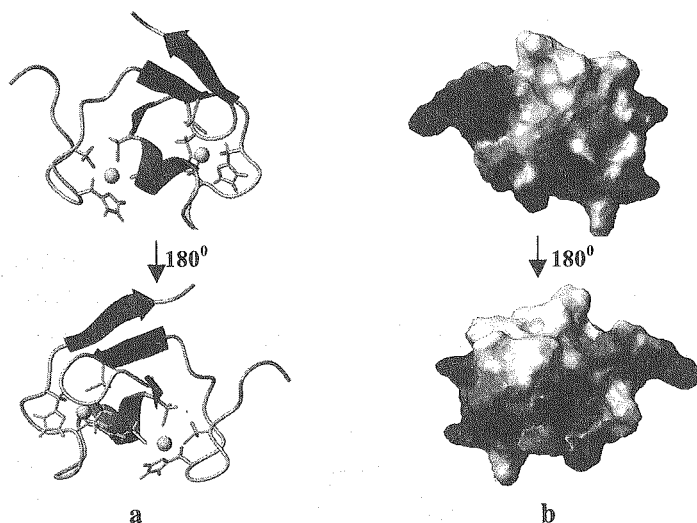


Fig.1 Ribbon diagram (a) and electrostatic potential map (b) of the Trim5 α B-box 2

P031 呼吸鎖末端酸化酵素における電子伝達複合体の動的構造解析

○坂本光一¹, 神谷昌克², 伊藤(新澤)恭子³, 内田毅¹,
相沢智康², 出村誠², 河野敬一⁴, 吉川信也³, 石森浩一郎¹
¹北大院・理・化学, ²北大院・生命科学・生命科学,
³兵庫県大院・生命理・生命科学, ⁴北大院・理・生命理

Dynamic Structural Analysis of the Electron Transfer Complex

between Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Oxidase in the Respiratory Chain

Koichi Sakamoto¹, Masakatsu Kamiya², Shinzawa-Itoh Kyoko³, Takeshi Uchida¹, Tomoyasu Aizawa⁴, Makoto Demura², Keiichi Kawano⁴, Shinya Yoshikawa³, Koichiro Ishimori¹
(¹*Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University*, ²*Division of Molecular Life Science, Graduate School of Life Science, Hokkaido University*, ³*Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo*, ⁴*Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University*)

To understand the structural basis for the specific electron transfer reaction from Cyt *c* to CcO, we performed relaxation measurements and Model-free analysis of ferrous Cyt *c* in the absence and presence of CcO. Our analysis revealed that the binding site for CcO on Cyt *c* shows the highly restricted motion and the motion of the binding site is further suppressed upon the binding to CcO. These results suggest that formation of the Cyt *c*-CcO complex would be mediated by the restricted backbone fluctuation, which characterizes the electron transfer reaction from Cyt *c* to CcO.

【緒言】シトクロム*c*(Cyt *c*)は、呼吸鎖のシトクロム*bc*₁複合体(Cyt *bc*₁)とシトクロム*c*酸化酵素(CcO)間の電子伝達を担うヘムタンパク質である。Cyt *c*とCcOは、複合体を形成することにより、電子がCyt *c*のヘムからCcOのCu_Aに伝達され、その後 heme *a*を経由し、最終的に酸素還元中心であるheme *a*₃-Cu_Bにおいてプロトンおよび分子状酸素と反応して水へと還元される。この酸素還元反応には4電子が必要であるにもかかわらず、Cyt *c*は複合体形成時に1個の電子しかCcOに供与できないため、Cyt *c*とCcOはその酸化還元状態に応じて会合・解離を繰り返しながら電子を授受することになると考えられる。したがって、このようなCyt *c*-CcO間電子伝達反応には、両者の酸化還元状態に応じてその会合・解離を制御する機構が存在すると想定されるが、その構造化学的知見は十分得られてはいない。そこで我々は、このような酸化還元状態に応じたCyt *c*とCcO間の会合・解離の分子機構を構造化学的に解明するため、chemical shift perturbation測定を行い、ヘム近傍のLysやGluなどの極性残基だけでな

Keywords : 電子伝達, 蛋白質-蛋白質間相互作用, 緩和解析, モデルフリー解析

著者ふりがな : さかもとこういち, かみやまさかつ, いたう(しんざわ)きょうこ, うちだたけし, あいざわともやす, でむらまこと, かわのけいいち, よしかわしんや, いしもりこういちろう

く、Ileなどの非極性のアミノ酸残基がCcOとの相互作用に関与し、その相互作用がCyt *c*の酸化還元状態に応じて変化することを明らかにしてきた。しかし、タンパク質複合体の結合・解離にはタンパク質構造の「静的」な構造だけでなく、構造上の「揺らぎ」、すなわち運動性が重要な役割を果たしており、また、タンパク質構造の「揺らぎ」による電子伝達反応の制御も指摘されている。そこで本研究では、構造の動的特性の変化を検討可能なNMR緩和測定を用いてCyt *c*の立体構造の「揺らぎ」を検討することにより、Cyt *c*-CcO間電子伝達反応についての構造化学的知見を得ることを目的とした。

【実験】還元型¹⁵N Cyt *c*および還元型¹⁵N Cyt *c*にCcOを添加した試料を調製し、T₁、T₂およびNOEの緩和測定を行った。各残基のT₁、T₂の緩和速度およびNOE比を用いてモデルフリー解析を行うことにより、タンパク質構造の「揺らぎ」を反映するオーダーパラメータS²および平衡状態にあるアミノ酸残基の交換速度定数R_{ex}を求めた。

【結果と考察】オーダーパラメータS²はN-H結合が等方的でランダムな運動をしている状態では0であり、完全に主鎖の運動性が制限された状態では1を示す。今回の解析の結果から、Cyt *c*の分子全体のS²平均は0.884と見積もることができ、Cyt *c*は分子全体にかなり運動性が制限された構造をしていることが示された。特に、Cyt *c*のCcO結合部位のS²平均は0.902であり、その運動性は、局所的にさらに制限されていることが明らかとなった。さらに、S²とともに構造の「揺らぎ」を反映する化学交換パラメータR_{ex}についても検討したところ、CcO結合部位のほとんどのアミノ酸残基では化学交換が観測されなかった。以上の結果から、CcOはCyt *c*において構造的揺らぎの小さな領域と相互作用をすることで複合体の形成を行うと考えられ、このような機構は、DNA結合タンパク質にみられるような比較的構造的揺らぎの大きな領域が複合体の形成部位となる会合機構とは大きく異なっていた。DNA結合タンパク質では、構造的揺らぎの大きな領域がDNAと相互作用することで非特異的な遭遇複合体が最初に形成され、その後、特定の認識部位を探索することで、最終的な特異的複合体が形成されると考えられている。このような準安定な遭遇複合体がCyt *c*とCcO間にも生成すると、Cyt *c*からCcOのCu_A以外の部位への電子伝達が起こる可能性があり、その結果、CcOにおいて酸素還元反応が効率的に行なわれなくなる。したがって、相互作用部位の特異性を高め、部位特異的な電子伝達複合体を選択的に形成するため、Cyt *c*のCcO結合部位の構造的揺らぎは小さく抑えられていると考えることができる。さらに、電子伝達反応が起こるCyt *c*-CcO複合体の構造的揺らぎを検討するため、還元型Cyt *c*にCcOを添加した場合においても同様に緩和解析を行ったところ、CcO結合部位に存在するアミノ酸残基のS²平均は0.981と求められ、複合体形成前に比べてさらに内部運動が制限されていることが明らかとなった。このような複合体における緩和解析にはさらに詳細な検討が必要なものの、Cyt *c*からCcOへの電子移動は構造的揺らぎが非常に小さな状態で進行することを示唆しており、この運動性の制限がCyt *c*のヘムからCcOのCu_Aへの部位特異的で効率的な電子伝達を行う上で重要な役割を担っているものと考えられる。

異種核多次元 NMR を用いた細胞内大量発現蛋白質の解析

(¹ 首都大学東京, ⁴ 藤田保健衛生大学)○ 浜津順平¹, 岩崎亜衣¹, 花島知美¹, 榊原大介¹, 佐々木敦子¹,
林 宣宏², 三島正規¹, 伊藤 隆¹**Heteronuclear multi-dimensional NMR of proteins overexpressed in cells**Junpei hamatsu¹, Ai Iwasaki¹, Tomomi Hanashima¹, Daisuke Sakakibara¹, Atsuko Sasaki¹,
Nobuhiro Hayashi², Masaki Mishima¹ and Yutaka Ito¹¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; ²Fujita 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 and sidechain 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 long-range distance restraints from In-Cell NMR samples.

【序】近年, NMR のハードウェアの性能の向上や, 新規測定法の研究・開発により, 生細胞内における蛋白質の高分解能異種核多次元 NMR スペクトルの観測が可能となった (In-Cell NMR). この手法の発展により, 細胞内での蛋白質の動態, 構造変化, 結合現象といった様々な細胞内での生命現象の研究がなされてきた. しかしながら, “生きた” 細胞がサンプルであるため, シグナルが低感度であることやサンプル寿命が短いことから, 細胞内の蛋白質の高次構造決定を行うのに十分な構造情報を得ることは困難とされてきた.

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, 側鎖 NMR シグナルの帰属や, NOE による高次構造情報の取得を試みた. 測定においては, サンプルの寿命が短いことから, 長時間の測定を必要とする各種 3 次元測定では non-linear sampling 法を適用することにより測定時間の短縮を図った.

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, EF-hand

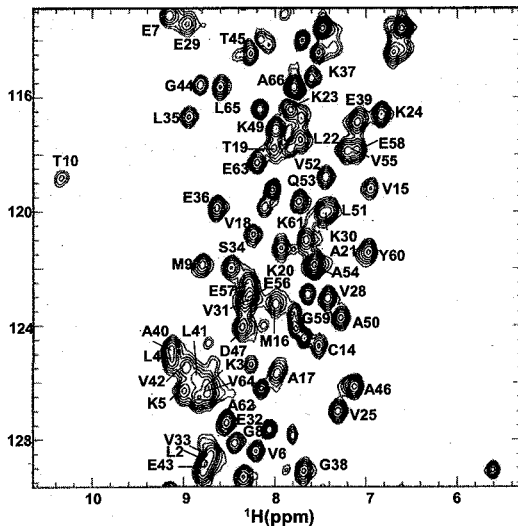
はまつ じゅんぺい, いわさき あい, はなしま ともみ, さかきばら だいすけ, ささき あつこ,
はやし のぶひろ, みしま まさき, いたう ゆたか

【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) の全長および、N 末端ドメイン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 TTHA1718 蛋白質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 Ca^{2+} 結合領域に近接しており、当該領域が 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。TTHA1718 については、主鎖シグナルの約 94% の帰属に成功したため、さらに 3 種の 3D NMR (HBHA(CBCACO)NH, H(CCCO)NH, (H)CC(CO)NH) の測定を行い、側鎖シグナルの帰属を行った。

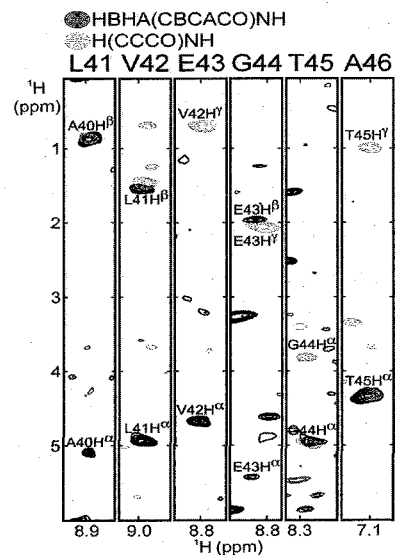
また、TTHA1718 についてはさらに NOE 由来の高次構造情報の取得を試みた。同様に非線形サンプリング法を適用することによって、短時間で良好な 3D ^{15}N -separated NOESY-HSQC の測定に成功した。さらにメチル基選択的プロトン標識試料を調製し、3D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ separated HMQC-NOESY-HMQC を測定することにより、メチル基間の NOE を選択的に観測することにも成功した。これらの NOE 情報を基に TTHA1718 の大腸菌細胞内での高次構造決定にも成功している。現在はさらに、 ^{15}N 核の緩和解析を行い、生細胞内における蛋白質の動態の解明を試みている。

Figure (a)



(a) ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labelled TTHA1718

(b)



(b) Overlaid ^1H - ^1H cross-sections of the 3D HBHA(CBCACO)NH (Black) and H(CCCO)NH (gray)

spectra

GM1 ミセルの親水性/疎水性境界面における

アミロイドβペプチドのトポロジーの NMR 解析

○内海真穂^{1,2}、山口芳樹^{1,3}、笹川拓明²、山本直樹⁴、柳澤勝彦⁵、加藤晃一^{1,2,6,7}

(¹名古屋大学 大学院薬学研究科、²分子科学研究所、³理化学研究所、⁴立命館大学 薬学部、⁵長寿医療センター研究所、⁶岡崎統合バイオサイエンスセンター、⁷お茶の水女子大学 糖鎖科学教育研究センター)

NMR analyses of amyloid β-peptide lying on hydrophilic/hydrophobic interface of GM1 micelles

○Maho Utsumi^{1,2}, Yoshiki Yamaguchi^{1,3}, Hiroaki Sasakawa², Naoki Yamamoto⁴, Katsuhiko Yanagisawa⁵, and Koichi Kato^{1,2,6,7}

(¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, ²Institute for Molecular Science, ³RIKEN, Advanced Science Institute, Systems Glycobiology Research Group, ⁴Ritsumeikan University, ⁵National Institute for Longevity Sciences, National Center for Geriatrics and Gerontology, ⁶Okazaki Institute for Integrative Bioscience, ⁷Glycoscience Institute, Ochanomizu University)

Growing evidence has indicated that GM1 ganglioside specifically interacts with Amyloid β-peptide (Aβ) and thereby promotes Alzheimer's disease-associated Aβ assembly. To characterize the conformation of Aβ bound to the ganglioside, we performed NMR analyses using isotopically labeled Aβ(1-40) in association with GM1 and lyso-GM1 micelles. Our NMR data revealed that Aβ(1-40) lies on hydrophobic/hydrophilic interface of the ganglioside cluster exhibiting an up-and-down topological mode in which the two discontinuous α-helices and the C-terminal dipeptide segment are in contact with the hydrophobic interior, whereas the remaining disordered regions are exposed to the aqueous environment. These findings suggest that the ganglioside clusters serve as a unique platform for binding coupled with conformational transition of Aβ molecules, rendering their spatial rearrangements restricted to promote specific intermolecular interactions.

【目的】アルツハイマー病の発症にはアミロイドβペプチド(Aβ)の神経細胞膜への凝集・沈着が深く関わっている。神経細胞膜に豊富に存在する糖脂質である GM1 ガングリオシドは、Aβの重合を促進する環境因子の一つとして注目されており、Aβと GM1 の複合体が核となって Aβの凝集が促進される可能性が報告されている。本研究では、

キーワード:アミロイドβ、GM1 ガングリオシド、糖脂質-タンパク質相互作用、アルツハイマー病

○うつみ まほ、やまぐち よしき、ささかわ ひろあき、やまもと なおき、やなぎさわ かつひこ、かとう こういち

GM1 ガングリオシドとの相互作用が引き金となって開始する A β の重合メカニズムを解明するために、超高磁場 NMR 計測を行い、A β と GM1 の相互作用の構造的基盤を明らかにすることを試みた。

【結果および考察】 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H で三重標識した A β (1-40) を用いて 920 MHz 超高磁場 NMR 装置を利用した計測を行うことにより、これまでは観測が困難だった糖脂質ミセルに結合した状態の A β (1-40) の NMR シグナルを観測することに成功した。NMR 解析の結果から、A β (1-40) は中央部分に 2 つの α -ヘリックス構造を形成してガングリオシドミセルに結合しており、他の領域は特定の二次構造を形成していないことが判明した。また、飽和移動差スペクトル測定の結果から、A β (1-40) はガングリオシドクラスターの疎水性部分(脂質)と親水性部分(糖鎖)の境界面において、2 つの α -ヘリックスと C 末端のジペプチド部分(Val39-Val40) は疎水的環境に位置し、残りの領域(N 末端領域および α -ヘリックスのリンカー領域) は親水的環境に露出していることが明らかとなった。

以上の結果より、ガングリオシドクラスターは A β 分子の構造遷移を誘起するとともにその空間配置を規定するような環境場を形成していることが明らかとなった。これにより A β 同士の特異的な分子間相互作用が促され、アミロイド形成に至るものと考察される。

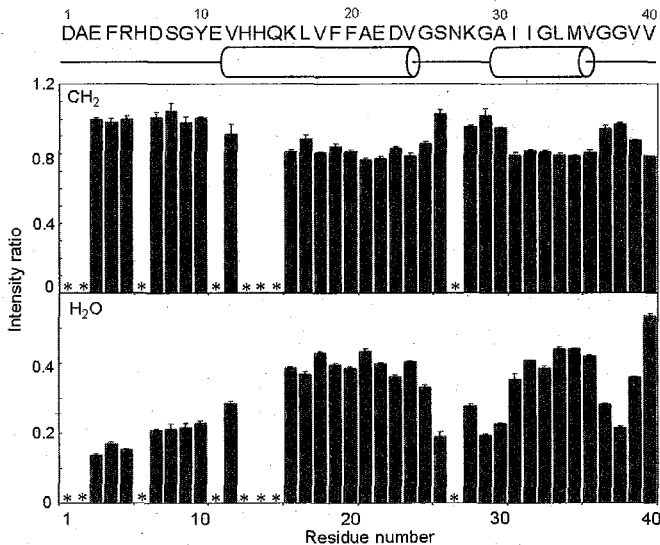


Fig.1 Plots of the intensity ratios of the backbone amide peaks with on-resonance and off-resonance irradiation of the acyl (CH₂) groups of lyso-GM1 (upper) and H₂O (lower). The location of α -helices are represented by cylinders along with the primary structure of A β (1-40) peptide. Asterisk indicates the amino acid residue that did not exhibit observable peak in the spectrum due to severe broadening. Intensity ratios are the mean \pm S.D. of three independent experiments.

【謝辞】 本研究は CREST/JST の支援により行われたものです。ここに謝意を表します。

(¹奈良先端大・バイオ、²首都大・戦略研究センター、
³三菱化学生命研、⁴農業生物資源研、⁵名大院・生命農学研究科)
 ○西ヶ谷有輝¹、Jee, JunGoo^{1,2}、田中利好³、河野俊之³、
 加藤悦子^{4,5}、高野誠⁴、山崎俊正⁴、児嶋長次郎¹

Yuki Nishigaya¹, JunGoo Jee^{1,2}, Rikou Tanaka³, Toshiyuki Kohno³, Etsuko Katoh^{4,5}, Makoto Takano⁴, Toshimasa Yamazaki⁴ and Chojiro Kojima¹

(¹Grad. School of Biol. Sci., NAIST, ²Center for Priority Areas, Tokyo Metro. Univ.,
³Mitsubishi Kagaku Inst. Life., ⁴Nat. Inst. Agrobiol. Sci., ⁵Grad. School of Bioagricultural Sci.,
 Nagoya Univ.)

Phytochrome, a red/far-red photoreceptor, regulates many aspects of the life cycle in higher plants. Phytochrome is a dimeric and soluble protein, which consists N-terminal photosensory domain, PAS repeat domain and histidine kinase like domain (HKLD). HKLD shows sequence homology to histidine kinase, however, higher plant phytochromes are lacking histidine kinase activity. So far, the function of HKLD is not clear. In order to investigate the HKLD, the over expression and purification system of HKLD was established for *Arabidopsis thaliana* phyA and rice phyB. NMR titration experiments revealed that rice phyB HKLD directly interacted with ADP and ATP analog. Weak but significant ATPase activity was detected in phyA and phyB HKLD.

[序論]

植物の赤色/遠赤色光受容体であるフィトクロムは安定な二量体を形成する可溶性タンパク質である。フィトクロムの N 末端ドメインは発色団を共有結合し光受容能を有しており、C 末端ドメインは安定な二量体を構成している。C 末端ドメインはさらに PAS (Per-ARNT-Sim) リピートドメインおよび、HKLD (Histidine Kinase Like Domain) から成る。高等植物フィトクロムの HKLD はヒスチジンキナーゼと弱い相同性を持つものの、ヒスチジンキナーゼ活性は無いとされている。一方、フィトクロム全長ではセリン/スレオニンキナーゼ活性が報告されているが、このキナーゼ活性を担っている部位は明らかにされていない。そこで生化学実験および溶液 NMR 実験により、フィトクロム HKLD の立体構造とキナーゼ活性の有無など分子機能の解明を目指した。

キーワード 光受容体 フィトクロム ヒスチジンキナーゼ様ドメイン ATP アーゼ

にしがや ゆうき、じー じゅんぐー、たなかりこう、こうの としゆき
 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]

シロイヌナズナ *phyA* HKLD およびイネ *phyB* HKLD は大腸菌を用いた大量発現系により調製した。HKLD はヒスチジinkinナーゼとの相同性から2つのサブドメイン(2量体化ドメイン、kinナーゼドメイン)からなると考えられるが、本研究ではkinナーゼドメインに相当する領域のみをHKLDと呼んでいる。NMR タイトレーション実験は、イネ *phyB* HKLD が濃度依存的に多量体を形成するため、単量体として良好なスペクトルを与える低濃度高温条件下(17 μ M、313 K)で行った。また NMR 測定にはクライオプローブ付き Bruker AVANCE 500 を用いた。

[結果・考察]

イネ *phyB* HKLD は低濃度(17 μ M)では良好な NMR スペクトルを与えるが、それ以上の濃度では分子間会合により広幅化する。そこで非線形サンプリングを用いた多次元 NMR とアミノ酸選択的標識技術を併用し、17 μ M での主鎖帰属に成功した。次に ADP および AMP-PNP が結合するかどうかを検討するため、 ^1H - ^{15}N HSQC を用いたタイトレーション実験を行った。有意な化学シフト差のあった残基をモデル構造にマッピングしたところ、ATP/Mg $^{2+}$ 結合モチーフ(N box、G1 box、F box、G2 box)近傍に複数の残基が同定された。これはHKLDがGHKLスーパーファミリーと同様なATP結合サイトを持つ可能性を示唆する。そこでATP加水分解活性を検討する生化学実験を行い、シロイヌナズナ *phyA* HKLD およびイネ *phyB* HKLD からATP加水分解活性を検出することに成功した。またN boxのD1059およびG2 boxのR1119をアラニンに変えたイネ *phyB* HKLD の変異体を作成したところ、ATP加水分解活性が阻害された。これらの結果から、フィトクロムHKLDはGHKLスーパーファミリーのATP加水分解酵素であると考えられる。次にリン酸化活性を検討した。フィトクロム全長の基質であるHistone H1を用い、シロイヌナズナ *phyA* HKLD、イネ *phyB* HKLD のkinナーゼ活性を測定したが、リン酸化は検出されなかった。発表では、低濃度タンパク質試料の帰属と機能解析の詳細について報告する。

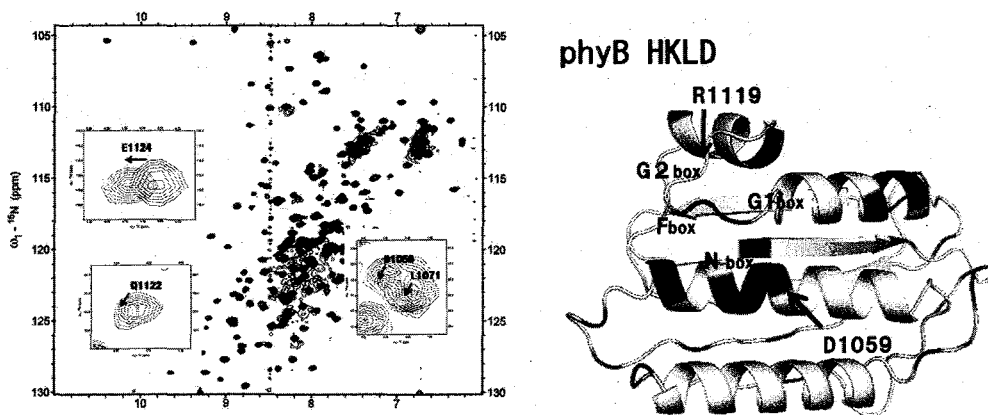


Figure 1. NMR titration experiment of rice *phyB* HKLD with 10 mM ADP (left) and its chemical shift perturbation mapped on the modeled structure (right).

巻き戻し条件下におけるタグ蛋白質の構造及び動的性質

(¹北海道大学大学院理学研究院、²北海道大学大学院先端生命科学研究院)

○¹熊木康裕、²梅津喜崇、²相沢智康、²神谷昌克、²出村誠、
^{1,2}河野敬一

The structure and dynamics of the fusion partner protein under the refolding condition
(¹Graduate School of Science, Hokkaido University, ²Graduate School of Life Science,
Hokkaido University, ³Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science for
Research, Toyama University)

Yasuhiro Kumaki¹, Yoshitaka Umetsu², Tomoyasu Aizawa², Masakatsu Kamiya², Makoto
Demura² and Keiichi Kawano^{1,2}

The expression system using fusion protein with the suitable fusion partner is very useful for the abundant expression of proteins and peptides because the interaction between the target and fusion partner regions protects the degradation by host-derived peptidases and invalidates the toxicity to the host bacteria. The elucidation of the mechanism of this interaction provides the basis for the design and development of a novel fusion partner. The goal of the present study is to elucidate the structure of the fusion protein by NMR. Especially, we focus on the structure under the refolding condition, where the fusion protein expressed as an inclusion body is treated. For the first step, we investigate the structure and dynamics of *E. coli* thioredoxin-based fusion partner protein without target protein.

融合蛋白質発現系は微生物を用いた蛋白質・ペプチドの大量発現に極めて有効であることが知られている。例えば抗菌活性を持つペプチド(抗菌ペプチド)は、宿主である微生物に対し毒性を示すこと、また宿主由来のプロテアーゼによる分解を受けやすいことから、単体での大量発現は困難である。一方このような抗菌ペプチドを適切なタグ分子との融合蛋白質として発現させた場合、抗菌ペプチド領域はタグ分子領域との相互作用によって、プロテアーゼによる分解から保護され、また宿主に対する毒性が抑制される。これによって目的の抗菌ペプチドを効率的に大量生産することが可能となる。

キーワード: タグ蛋白質、チオレドキシン、巻き戻し条件

くまきやすひろ、うめつよしたか、あいざわともやす、かみやまさかつ、でむらまこと、かわのけいいち

融合蛋白質発現系によって目的蛋白質・ペプチド(ターゲット)を効率的に生産するためには、適切なタグ分子の選択が重要である。プロテアーゼによる分解からの保護や宿主に対する毒性の抑制に有効なタグ - ターゲット間の相互作用機構の分子レベルでの解明は、より有効な新規タグ分子のデザイン及び開発のための基礎を与える。

本研究の目標は融合蛋白質の立体構造及び動的性質を NMR で明らかにすることで、タグ - ターゲット間の相互作用に関する知見を得ることである。封入体として発現された融合蛋白質からターゲットを得るためには可溶化や巻き戻しのステップが必要であるが、我々はとりわけこの巻き戻し条件下における融合蛋白質の構造的性質に注目する。その第一段階として、タグ分子として一般的な大腸菌由来のチオレドキシンをベースとしたタグ蛋白質(ヒスタグ - リンカー - チオレドキシ)単体での巻き戻し条件下における立体構造及び動的性質を NMR を用いて明らかにする。

^{13}C , ^{15}N ラベルされたタグ蛋白質について巻き戻し条件下において各種三重共鳴測定を行い、主鎖の帰属を完了した。現在、側鎖の帰属及び立体構造解析を進行中である。

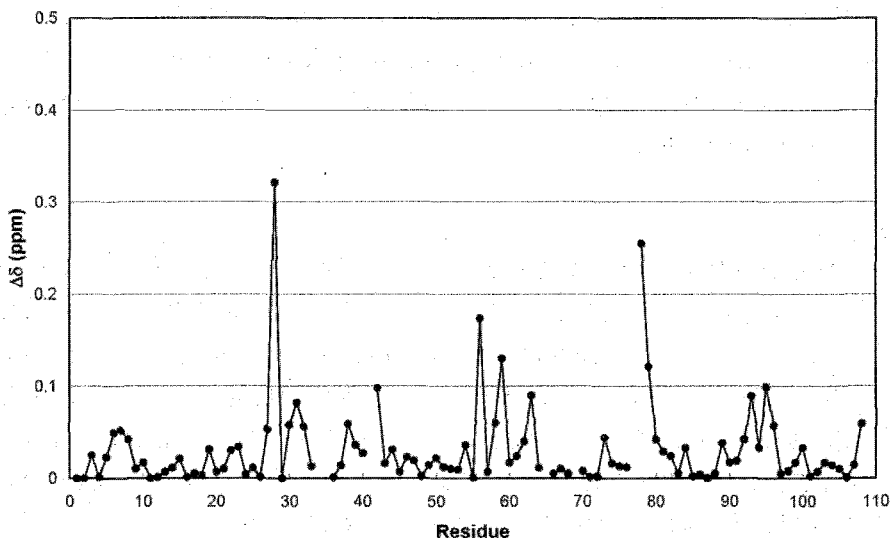


Fig.1 Chemical shift differences of the amide protons and nitrogens between the standard and refolding conditions for thioredoxin region fusion partner protein.

酵母 Ire1p によって部位特異的な切断を受ける RNA の NMR 構造解析

奈良先端大・バイオ¹, 首都大・戦略研究センター²,
奈良先端大・情報³

○河原郁美¹, Jee, JunGoo^{1,2}, 箱嶋敏雄³, 今川佑介¹, 河野憲二¹,
児嶋長次郎¹

NMR structural study of RNA recognized by site specific endoribonuclease Ire1p
Ikumi Kwahara¹, JunGoo Jee^{1,2}, Toshio Hakoshima³, Yusuke Imagawa¹, Kenji Kohno¹ and Chojiro Kojima¹ (¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, ²Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, and ³Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology)

The response to ER stress is known as Unfolded Protein Response (UPR). IRE1 is an ER transmembrane protein conserved on many of eucaryotes and it is a sensor protein of endoplasmic reticulum (ER) stress. Ire1p is an yeast homolog of IRE1. Cytosolic domain of Ire1p is composed of a kinase domain and a site-specific endoribonuclease (RNase) domain. Hac1 is the UPR-specific transcription factor in yeast. *HAC1* mRNA has one intron between the 5' and 3' exons. Ire1p cleaves two intron-exon junctions in *HAC1* mRNA. Both cleavage sites are located on the stem-loop region. In yeast, this splicing is a key step of UPR signaling. Here we report that the stem-loop region of *HAC1* mRNA directly interact with Ire1p RNase domain at both cleavage sites.

【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。この小胞体ストレスに対する応答は、ストレスが異常タンパクの蓄積から引き起こされることにちなんで Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる。Ire1p は出芽酵母の UPR において中心的な役割を果たす小胞体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、この RNase ドメインが *HAC1* mRNA の部位特異的な切断を行なうことによって、下流の転写因子 Hac1 のスプライシングを引き起こすと考えられている。*HAC1* mRNA が Ire1p によって切断を受ける部位は二箇所存在し、それぞれステムループ構造のループ部分に位置している事が予測されている。

キーワード： タンパク質 RNA 小胞体ストレス UPR

著者： かわはら いくみ、じー じゅんぐー、はこしま としお、
いまがわ ゆうすけ、こうの けんじ、こじま ちょうじろう

本研究ではこの切断部位を含むステムループ構造を Ire1p がどのように認識し切断しているのか、ステムループの構造情報から解明することを目指した。

【試料】

Ire1p の RNase ドメインは大腸菌の大量発現系を用いて調製した。HAC1 RNA は、二ヶ所それぞれの切断箇所について切断部位を含むステムループ領域のみ (図 1) を化学合成または RNA ポリメラーゼを用いて調製した。ここでは使用した 2 つの RNA フラグメントのうち、5' 側の切断部位を含むステムループを 5' 側ステムループ、3' 側の切断部位を含む方を 3' 側ステムループとよぶ。

【結果と考察】

HAC1 RNA と Ire1p RNase ドメインとの相互作用を確認するために、Ire1p RNase ドメイン存在下と非存在下でそれぞれの RNA のイミノプロトンを測定した。その結果、5' 側ステムループでは Ire1p 存在下において全体的な線幅の広がりや低磁場シフトしたピークを観測した。また、3' 側ステムループでは Ire1p 存在下において全体的な線幅の広がりや新たなピークを観測した。これにより、実験に用いた mRNA と Ire1p RNase ドメインの間に直接的な相互作用が存在することが示された。そこで、まず 5' 側ステムループについて、 ^1H - ^1H NOESY と ^1H - ^1H TOCSY スペクトルからイミノプロトンの帰属を行なったところ、変化の見られたイミノプロトンのシグナルはループ直下の G 塩基 (G15) に由来するものであった (図 2)。また G15 を除くステム由来の信号には Ire1p の有無で変化が見られなかったことから、Ire1p と HAC1 RNA との相互作用はステムが認識されているのではなく、主に切断部位のあるループ部分で行なわれていると考えられた。そこでより詳細な解析を行うために、現在 RNA の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体標識を進めている。発表ではこれら HAC1 RNA の NMR データを元に、どのようにして Ire1p が特定の RNA 配列を認識し切断するのかについて議論する。

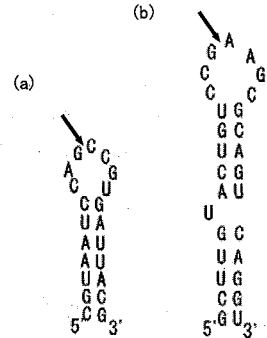


Figure.1
Predicted secondary structure of HAC1 mRNA splicing site. Arrows show Ire1p cleavage site. (a) 5' and (b) 3' stem-loop.

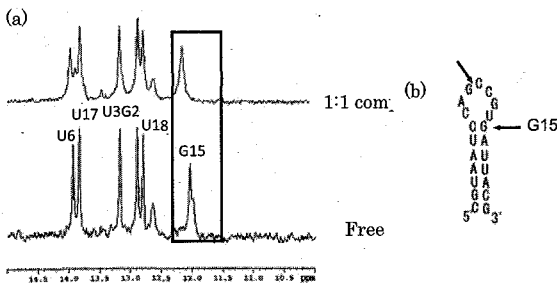


Figure .2
Interaction between HAC1 RNA and Ire1p. (a) Imino-proton spectra of 5' stem-loop with and without Ire1p. (b) G15 position in the predicted secondary structure.

ヘム近傍の静電的環境の変化がシトクロム *c* の機能と構造に与える影響

筑波大院数物

○三上真一、入江清史、太虎林、長友重紀、山本泰彦

Regulation of Redox Potential of *Pseudomonas aeruginosa* Cytochrome *c* through Alteration of Electrostatic Environment around Heme 17-propionic Acid

○Shin-ichi Mikami, Kiyofumi Irie, Hulin Tai, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

Pseudomonas aeruginosa cytochrome *c*₅₅₁ (PA) is a small redox protein that consists of 82 amino acid residues and a heme. In order to elucidate the relationship between the redox potential (E_m) and pKa value of heme 17-propionic acid, we prepared four mutants of PA, i.e. F34Y, E43Y, R47L and W56F. All the residues mutated were located near heme 17-propionic acid, and hence the mutations were expected to alter the electrostatic environment around the heme side chain. The values of < 4.5, 5.0, 6.7, and 7.9 were determined as the pKa values of heme 17-propionic acids, differ from 6.1 for PA. And E_m of the protein changes by ~60 mV near the pKa value of heme 17-propionic acid. Thus both the pKa value of heme 17-propionic acid and pH profile of E_m in the protein can be regulated through protein engineering.

序論 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) シトクロム *c*₅₅₁ (PA, Fig. 1)は、アミノ酸 82 残基と補欠分子族のヘムからなる分子量約 9000 のタンパク質であり、ヘム鉄の酸化と還元を利用して生体内での電子伝達を行っている。通常、シトクロム *c* の機能は標準酸化還元電位 (E_m)により評価される。従来の研究より、PA の E_m はヘム側鎖 17-プロピオン酸基の電離状態に依存することが明らかとなっている。本研究では、ヘム 17-プロピオン酸基近傍のアミノ酸残基を置換した変異体 F34Y、E43Y、R47L、W56F を調製し、アミノ酸置換により誘起されたヘムの構造化学的環境の変化が、PA の E_m や電子伝達の熱力学に与える影響について解析を行った。

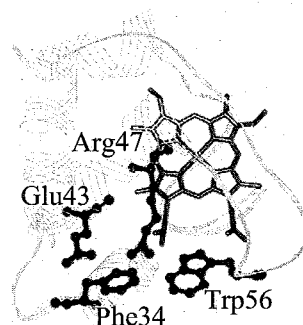


Fig. 1 Structure of PA (PDB:351C). Residues substituted in the study are highlighted.

結果・考察 酸化型のシトクロム *c* ではヘム鉄の未対電子の影響を受け、ヘムメチルプロトンのシグナルは大きく低磁場シフトして観測される。ヘム側鎖 17-プロピオン酸基の pKa は、これらのシグナルの化学シフトの pH 依存性の解析より、PA (pKa = 6.1)、F34Y (<4.5)、E43Y (5.0)、R47L (6.7)、W56F (7.9) と求められた (Fig. 2)。F34Y と E43Y では、アミノ酸置換により、17-プロピオン酸基に対する水素結合ドナーが新たに導入されたため pKa が低下し、一方、R47L、W56F では、水素結合ドナーが除去されたため、pKa が上昇したと考えられる。

Keywords: 常磁性 NMR、シトクロム *c*、酸化還元電位、熱安定性、ヘム

みかみ しんいち、いりえ きよふみ、たい こりん、ながとも しげのり、やまもと やすひこ

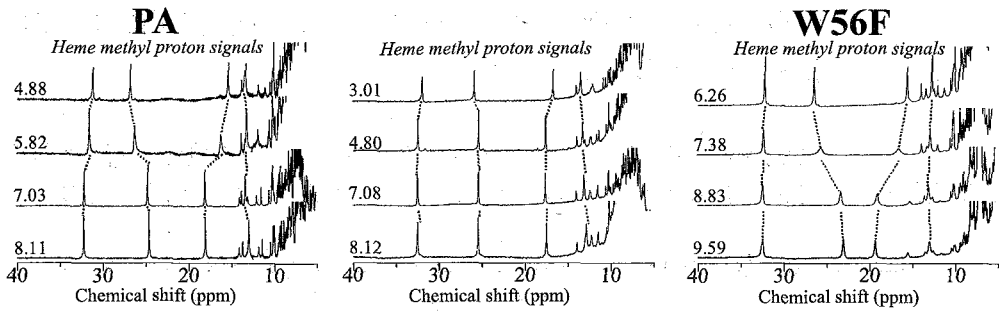


Fig. 2 Downfield-shifted portions of the ^1H NMR spectra of PA and its mutants at the indicated pH. pK_a values of heme 17-propionic acids in the proteins re reflected in the pH-dependent shifts of heme methyl proton signals.

サイクリックボルタンメトリーにより E_m の pH 依存性を測定した結果、ヘム側鎖 17-プロピオン酸基の pK_a に対応する pH 領域で、 E_m が pH の上昇に伴い約 60 mV 低下した。この結果は、正味の電荷として +1 をもっている酸化型ヘムが、pH 上昇に伴う 17-プロピオン酸基の電離により生じた負電荷により部分的に中和され安定化されることを反映している。このように、ヘム側鎖 17-プロピオン酸基の pK_a の調節を通して、 E_m を変えることが可能である。

次に、17-プロピオン酸基の pK_a が還元に伴う熱力学パラメータ、特にエントロピー変化 (ΔS) に与える影響について解析した。 ΔS は温度に対する E_m のプロットの傾きから求められ、酸化/還元に伴うペプチド鎖の運動性の変化や、溶媒の配向様式の変化により影響を受けると考えられている。PA と F34Y、W56F の pH 6 での ΔS (Table 1) の比較から、 ΔS と 17-プロピオン酸基の電離平衡との間に次のような関係が見いだされた。まず、PA の酸化型と還元型の pK_a を考慮すると、pH 6 では酸化型 PA の 17-プロピオン酸基の約 50% が電離しているのに対して、還元型 PA の 17-プロピオン酸基はほとんど電離していないことになる。この酸化/還元に伴う 17-プロピオン酸基の電離状態の変化が ΔS の絶対値を増大させる要因になっていると考えることができる。疎水性ヘムポケットに存在している 17-プロピオン酸基の電離により生じた負電荷はヘムポケット内の疎水性相互作用を弱める効果があると予想されるため、酸化型 PA では、還元型 PA に比べて、ヘムポケットのパッキングが弱いと考えられ、そのことが ΔS の絶対値の大きさに反映されていると考えることができる。一方、pH 6 では、F34Y、W56F 共に、PA の場合のような酸化/還元に伴う 17-プロピオン酸基の電離状態の変化が生じないため、PA に比べて ΔS の絶対値が小さいと考えられる。pH 5 で、PA では ΔS の絶対値が減少したこと、F34Y では逆に増大したことも、本研究で明らかになった ΔS と 17-プロピオン酸基の電離平衡との関係を支持している。

Table 1 pK_a values of heme 17-propionic acids of the proteins (pK_{ox} and pK_{red} for the values of the oxidized and reduced forms, respectively) and ΔS values for the reduction of the proteins.

Protein	pK_{ox}	pK_{red}	ΔS ($\text{kJmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
F34Y	4.5 <	5.5 <	-42
PA	5.9	7.0	-69
W56F	7.9	8.4	-36

結論 17-プロピオン酸基の pK_a はアミノ酸置換により調節可能であり、その pK_a の変化は E_m の pH 依存性だけでなく、還元反応の ΔS にも影響を与えていることが示された。

筑波大院数物¹, 農研機構 食総研², 立命館大薬³, 東大院理⁴, 近大生物理工⁵
 ○入江清史¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 逸見光², 北原亮³, 横山茂之⁴, 赤坂一之⁵

Characterization of Internal Dynamics of Thermophile *Hydrogenobacter thermophilus*
 Cytochrome c_{552}

○Kiyofumi Irie¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹, Hikaru Hemmi², Ryo Kitahara³,
 Shigeyuki Yokoyama⁴, and Kazuyuki Akasaka⁵
 Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba¹, Natl. Food Res. Inst.², Dept. of Pharm., Ritsumeikan Univ.³,
 Dept. of Biophys. and Biochem., Univ. of Tokyo⁴, and Dept. of Biotech. Sci., Kinki Univ.⁵

In order to elucidate molecular mechanisms responsible for an apparent biphasic behavior of the temperature dependence of the redox potential of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c_{552} , its heme active site structure has been characterized through variable-temperature and -pressure NMR techniques. The study revealed a temperature-dependent conformational transition between two different protein structures, which slightly differ in the conformation of the loop bearing the Fe-bound axial Met residue. The heme environment in the protein structure which emerges at lower temperature was found to be more polar, as a result of the altered orientation of the loop with respect to the heme due to its conformational change, than that in the protein structure at higher temperature. The present study demonstrated the importance of the structural and dynamic properties of the polypeptide chain in close proximity to the heme for the redox regulation of the protein.

序 論

好熱性水素細菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)由来のシトクロム c_{552} (HT, Fig. 1)と緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来のシトクロム c_{551} (PA)は、一次構造の相同性が56%であり、お互いに立体構造は類似しているが、機能の指標である酸化還元電位(E_m)の温度依存性は両者で著しく異なる。 E_m の温度に対するプロットは、PAではNernstの式から予想される通り直線になるのに対して、HTでは曲率を示す。また、ヘムの電子状態の変化を敏感に反映するヘム側鎖メチルプロトンに由来するNMRシグナルは、HTの場合、低温で異常なブロードニングを示すが、PAではそのような現象は観測されない。本研究では、HTとPAのこれらの差は、両者のタンパク質のダイナミクスの差に起因するという作業仮説に基づき、高圧NMR、¹³C NMRなどにより解析を行った。

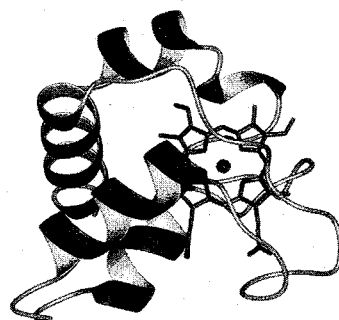


Fig. 1 Tertiary structure of HT.(PDB:1YNR)

Keywords: 常磁性 NMR、シトクロム c 、酸化還元電位、タンパク質のダイナミクス、ヘム

いりえ きよふみ、たい こりん、ながとも しげのり、やまもと やすひこ、へんみ ひかる、
 きたはら りょう、よこやま しげゆき、あかさか かずゆき

結果・考察

酸化型 HT のスペクトルで、常磁性シフトして観測されるヘム側鎖プロトンに由来するシグナルは、低温で異常なブロードニングを示した(**Fig. 2**)。また、HT のシグナルは、室温でも高圧にするとブロードニングした。さらに、高圧下では、温度の低下に伴い、シグナルの連続的な低磁場シフトと共に、0 °C で最大にブロードニングしたシグナルは -20 °C で先鋭化した。一方、酸化型 PA のシグナルでは、温度や圧力の変化に伴うこのような異常なブロードニングは観測されなかった。HT のシグナルは、温度変化に伴って線幅は著しく変化するものの、スピン-格子緩和時間にはあまり大きな変化は観測されないことから、このブロードニングは、HT のヘム近傍のポリペプチド鎖の内部運動の存在を反映していることが考えられる。また、HT のシグナルのブロードニングは、反磁性である還元型でも観測されることから、鉄の磁氣的性質はこのブロードニングには関連しないことが確認されている。

高圧でのシグナルの線幅の増大は、内部運動のタイムスケールが高圧下で遅くなる、すなわち構造変化に伴う運動の活性化体積が正で大きいことを示している。また、0 °C より低温では、シグナルのシフト値と線幅が変化しており、内部運動のタイムスケールが変化すると同時に、低温でタンパク質が新たな構造に変化することが反映されている。低温におけるシフト変化から、相互変換のタイムスケールは ~ 0.1 ms であると見積られた。HT の ^{15}N ラベル体で観測される HSQC シグナルの温度および圧力依存性の解析から、ヘム近傍のループ領域での内部運動の存在が検出された。また、HT の ^1H - ^{13}C HMQC ではヘムメチル基および軸配位子 Met61 の $\text{C}_\epsilon\text{H}_3$ 基の ^1H - ^{13}C 相関ピークは、 ^1H , ^{13}C 軸共に 25 から 15 °C で大きくブロードニングした(**Fig. 3A**)。さらに、Met61 を含むループ領域に近い 7、12 位のヘムメチル基は、分子内部に埋もれている 2、18 位のヘムメチル基と比較してブロードニングの程度が大きいことが示された(**Fig. 3B**)。これらの結果より、HT の E_m の異常な温度依存性は、このループ領域のダイナミクスに起因することが明らかとなった。HT と PA は、ループの構造化学的因子に関しても類似しているが、PA のループのコンフォメーションはアミノ酸 4 残基によるユニークな水素結合ネットワークにより固定されているため、構造変化が起こらないと考えられる。HT のヘムの環境は近傍のループの内部運動により影響を受けることが考えられ、そのことが E_m の異常な温度依存性に反映されていると推測される。

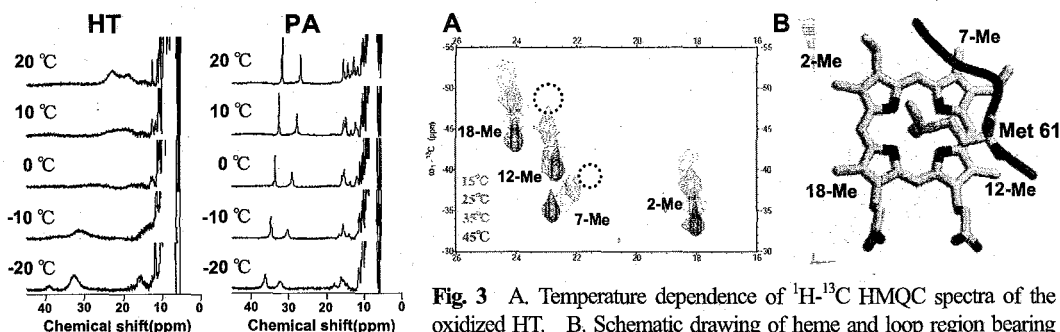


Fig. 3 A. Temperature dependence of ^1H - ^{13}C HMQC spectra of the oxidized HT. B. Schematic drawing of heme and loop region bearing axial Met 61. The region buried in protein interior and the loop region (residues 60-64) are illustrated as gray shadow and black line, respectively. (PDB:1YNR)

References

- [1] Y. Takahashi, H. Sasaki, S. J. Takayama, S. Mikami, S. Kawano, H. Mita, Y. Sambongi, and Y. Yamamoto, *Biochemistry*, **2006**, 45, 11005-11011.
- [2] S. J. Takayama, Y. Takahashi, S. Mikami, K. Irie, S. Kawano, Y. Yamamoto, H. Hemmi, R. Kitahara, S. Yokoyama, and K. Akasaka, *Biochemistry*, **2007**, 46, 9215-9224.

筑波大院数物

○柴田友和, 太虎林, 長友重紀, 山本泰彦

Characterization of Subunit Interaction in Human Adult and Fetal Hemoglobins through Comparative Studies between the Constituent Subunits in Their Tetrameric and Isolated States

○Tomokazu Shibata, Hulin Tai, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto
Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

Subunit interaction in human adult and fetal hemoglobins, i.e., Hb A and Hb F, respectively, which is responsible for the cooperative oxygen binding of the proteins, has been shown to be manifested in the shift differences between heme peripheral side chain proton signals of met-azido adducts of the constituent subunits in their tetrameric and isolated states. Downfield shifts of the signals of β and γ subunits in Hb A and Hb F, respectively, relative to the corresponding signals in the isolated ones could be attributed to an increase in the high spin contents of the subunits in the former than the latter, as a result of an elongation of the coordination bond between heme Fe and axial His imidazole.

序論

酸素運搬タンパク質成人ヘモグロビン(Hb A)は, Fig. 1 に示すように四量体 ($\alpha_2\beta_2$ (分子量64500))として存在している. Hb A の α および β サブユニットは補欠分子族としてヘムをもち, 酸素分子は, ヘム (Fig. 2) に結合して運搬される. Hb A による酸素運搬の効率は, サブユニット間の相互作用により高められている. したがって, 各サブユニットを単離した単離鎖では運搬効率が著しく低下する. 私共はHb A と単離鎖のNMR スペクトルの比較を通して, NMR によるサブユニット間相互作用の検出を試みた. また, β サブユニットのかわりに γ サブユニットをもつ胎児ヘモグロビン(Hb F)についても同様の解析を行った.

結果・考察

Hb A と Hb F の各サブユニットのヘム鉄にアジドイオン(N_3^-)が結合した N_3^- 体の 1H NMR スペクトルで, 低磁場に常磁性シフトして観測されるシグナルを Fig. 3 に比較して示す. Fig. 3 に示す通り, Hb A と Hb F の N_3^- 体のスペクトルでは, 各サブユニットのヘムの側鎖メチルプロトンに由来するシグナルが分離して観測される. Hb A と Hb F のシグナルで, 同じ化学シフトを示すシグナルを両者で共通する α サブユニット由来, 一方, 異なる化学シフトを示すシグナルを β , γ サブユニット由来であると帰属した.

各サブユニットのヘムメチルプロトンシグナルのシフト値は, Table 1 に示す通り, Hb A または Hb F の構成要素として存在する状態と, 単離された状態では異なる. このように, サブユニット間の相互作用は, 各サブユニットのヘム近傍の構造変化に反映される.

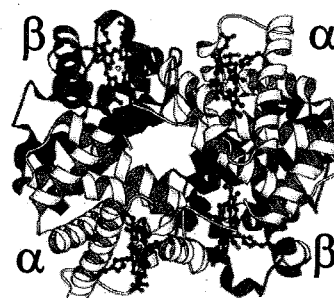


Fig. 1. Structure of oxyHb A. (PDB: 2DN1)

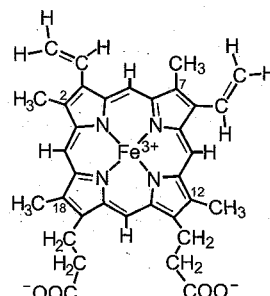


Fig. 2. Molecular structure of heme.

Keywords: 常磁性 NMR, ヘモグロビン, 単離鎖, サブユニット, ヘム
しばたともかず, たいこりん, ながともしげのり, やまもとやすひこ

たとえば、Fig. 4 に示した Hb F のスペクトルでは、 γ サブユニットのヘムメチルプロトンシグナルは、四量体形成により低磁場シフトして観測された。通常 N_3 体のヘム鉄のスピン状態は低スピン ($S = 1/2$) と高スピン ($S = 5/2$) の平衡にあり、観測された低磁場シフトは、四量体形成により平衡が高スピンに偏ったことに起因すると考えることができる。これは、ヘム鉄とその軸配位子であるヒスチジン(His)の結合(Fe-His 結合)が伸長したためであると考えられる。¹H NMR では、Hb A と Hb F の四量体形成で各サブユニットのヘムメチルプロトンのシフト変化が観測されなかった。

ところで、Hb A と Hb F の各サブユニットを単離する際には、*p*-ヒドロキシ水銀安息香酸 (PMB) が用いられる。PMB がシステイン(Cys)の側鎖に結合することにより誘起される構造変化により、四量体構造が崩壊するからである。 β , γ サブユニットではヘム鉄に配位しているHisの隣にあるCys93 を PMB で修飾することで、酸素親和性が著しく低下することが知られている。 β , γ サブユニットの N_3 体のヘムメチルプロトンシグナルは、PMB 修飾により低磁場側にシフトした (Fig. 4 (γ サブユニットのみを示す))。この結果は、結合した PMB とヘムの立体障害で Fe-His 結合が伸長し、スピン平衡が高スピンに偏ったことを示唆していると考えられる (Fig. 5)。PMB 修飾による β , γ サブユニットの Fe-His 結合の伸長と酸素親和性の低下が、四量体形成により両サブユニットに誘起される変化と同様であることを考慮すると、PMB 修飾サブユニットは、四量体におけるそれぞれのサブユニットの良いモデルであると見なすことができる。

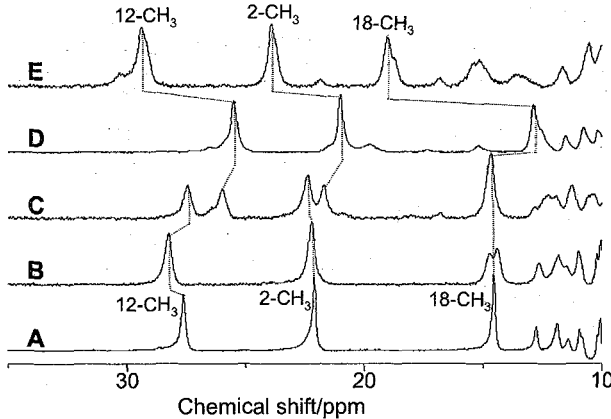


Fig. 4. Downfield-shifted portions of ¹H NMR spectra of met-azido α subunit (A and B), in the presence and absence of PMB, Hb F (C), and γ subunit (E and D) in the presence and absence of PMB, in 20% ²H₂O/80% H₂O, pH 8.1 at 25°C. The assignments of the resolved heme methyl proton signals are given with the spectra.

結論

Hb A や Hb F における四量体形成では、 β , γ サブユニットの Fe-His 結合が共に伸長することが示唆された。また、四量体形成による Fe-His 結合の伸長により誘起されるヘムの電子構造の変化は、PMB の結合によりそれぞれのサブユニットのヘムに誘起される電子構造の変化と類似していることが示された。

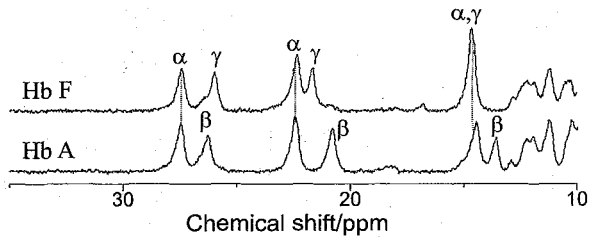


Fig. 3. Downfield-shifted portions of ¹H NMR spectra of met-azido Hb A and Hb F in 20% ²H₂O/80% H₂O, pH 8.1 at 25°C.

Table 1. Resolved heme methyl proton shifts of Hb A, Hb F and isolated subunits

HbA						
	α (ppm)			β (ppm)		
	12-CH ₃	2-CH ₃	18-CH ₃	12-CH ₃	2-CH ₃	18-CH ₃
Tetramer	27.47	22.44	14.47	26.26	20.79	13.59
Isolated subunit	28.25	22.21	14.54	25.67	20.34	11.71
$\Delta\delta$	-0.78	+0.23	-0.07	+0.59	+0.45	+1.88

HbF						
	α (ppm)			γ (ppm)		
	12-CH ₃	2-CH ₃	18-CH ₃	12-CH ₃	2-CH ₃	18-CH ₃
Tetramer	27.47	22.33	14.67	25.97	21.70	14.67
Isolated subunit	28.25	22.21	14.54	25.49	20.96	12.84
$\Delta\delta$	-0.78	+0.12	+0.13	+0.48	+0.74	+1.83

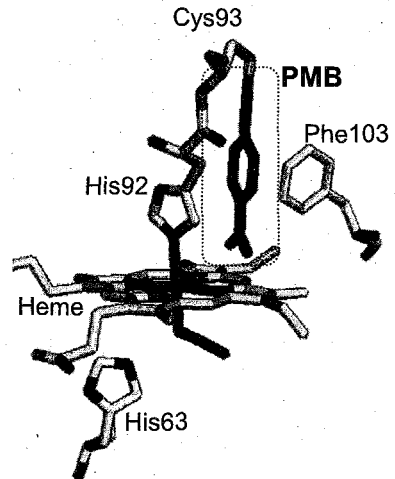


Fig. 5. Schematic drawing of the orientation of PMB with respect to heme in PMB-modified γ subunit.

フッ素化ヘム再構成ヘモグロビンの ^{19}F NMRによる機能解析

筑波大院数物¹, 長岡高専物質²

○水関和哉¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 鈴木秋弘²

Functional Analysis of ^{19}F NMR of Reconstituted Hemoglobin Possessing Fluorinated Heme

○Kazuya Mizuseki¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹,
Yasuhiko Yamamoto¹, and Akihiro Suzuki²

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba¹ and Nagaoka Natl. Coll. of Tech.²

Taking advantages of ^{19}F NMR, we have shown that the introduction of fluorinated hemes into *b*-type hemoproteins provides spectroscopic probes highly sensitive to heme electronic nature which is relevant to functional properties of the proteins. In the present study, we elucidated oxygen binding of the individual subunits of human adult hemoglobin (Hb A). The study demonstrated that the incorporation of a C_2 -symmetrically fluorinated heme into the protein results in a significant non-equivalence between the oxygen binding affinities of the subunits. This finding indicated the significance of the heme-protein interaction in the regulation of the functional properties of Hb A.

【序論】

成人ヘモグロビン (Hb A) は、 $\alpha_2\beta_2$ の四量体として存在する分子量約64500の代表的なヘムタンパク質であり、生体内で酸素運搬の役割を果たしている。Hb Aの機能を解明するためには、補欠分子族として存在するヘム (Fig. 1, $R_2 = R_7 = -\text{CH}_3$, $R_3 = R_8 = -\text{CH}=\text{CH}_2$) の電子構造や、ヘム近傍のタンパク質の立体構造について明らかにすることが重要である。 ^1H NMRによるHb Aの研究では、観測されるシグナルのオーバーラップにより、スペクトルの解析が困難である (Fig. 2)。本研究では、生体内にはほとんど含まれないフッ素をヘム側鎖に導入したフッ素化ヘムを用いて、 ^{19}F NMRによるHb Aの研究の可能性を検証した。

【実験】

天然のHb Aから、Teale (1959)の方法に従って、ヘムを除去し、その後ヘムの側鎖に CF_3 基を導入した C_2 対称2,8-DPFフッ素化ヘム (Fig.1, $R_2 = R_8 = -\text{CF}_3$, $R_3 = R_7 = -\text{CH}_3$) を組み込んで、2,8-DPF再構成Hb A [Hb A(2,8-DPF)]を調製した。Hb A(2,8-DPF)をジチオナイトにより還元して、oxy体とし、機能測定及び ^{19}F NMR測定を行った。なお、Deoxy体はOxy体を脱気して調製した。

Keywords : ^{19}F NMR、ヘモグロビン、酸素親和性、常磁性シフト、フッ素化ヘム
みずせき かずや、たい こりん、ながとも しげのり、やまもと やすひこ、
すずき あきひろ

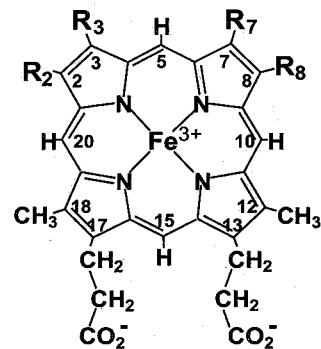


Fig. 1. The structures and numbering system for protoheme ($R_2 = R_7 = -\text{CH}_3$, $R_3 = R_8 = -\text{CH}=\text{CH}_2$) and 2,8-DPF ($R_2 = R_8 = -\text{CF}_3$, $R_3 = R_7 = -\text{CH}_3$).

【結果・考察】

機能解析: Hb A(2,8-DPF)の酸素親和性と協同性の指標である50%酸素化が達成される酸素分圧 (P_{50}) と協同性を反映するHill係数 (n) を、Hb Aでの対応する値と比較してTable 1にまとめて示す。Hb A(2,8-DPF)は、Hb Aより酸素親和性と協同性が共に低下しているが、酸素運搬体としての機能は保持されていることが確認された。

構造解析: Oxy体、Deoxy体、及びOxy-Deoxy中間体のスペクトル測定を行った(Fig. 3)。Oxy-Deoxy中間体のスペクトルでは、Oxy体およびDeoxy体由来のシグナルが共に観測された。また、Deoxy体のヘム8位CF₃基由来のシグナル1つは、Oxy体のシグナルと重なって観測された。Oxy-Deoxy中間体で観測されたそれぞれのシグナル強度の解析から、一方のサブユニットのDeoxy体のシグナル強度が、もう一方のDeoxy体のシグナル強度の約2.5倍であることが明らかとなり、2つのサブユニットで酸素親和性が異なることが示された。一方、天然のHb Aでは、 α , β の酸素親和性には大差無いことが示されている。これは、Hb AとHb A(2,8-DPF)とで、ヘム側鎖置換基の違いにより、ヘム近傍タンパク質との相互作用が異なることに起因すると考えられる。本研究で用いた2,8-DPFは、プロトヘムと比較すると、3,8位のビニル基がそれぞれCH₃基とCF₃基に置換され、また、2,8-DPFの分子構造はC₂対称である(Fig.1)。Hb Aでは、ヘム側鎖ビニル基が機能に与える影響が大きいと考えられているため、Hb A(2,8-DPF)における結果は、そのことを支持している。ヘム側鎖の置換基の変化によりヘムとタンパク質との相互作用が変化し、その変化がHb Aの四次構造変化に影響を与え、結果的に酸素親和性が変化したものと推測される。

【結論】

フッ素化ヘム再構成Hb Aの¹⁹F NMR研究は、Hb Aの機能解析に有用であることが示された。Hb A(2,8-DPF)においては、天然のHb Aとは異なり、各サブユニットの酸素親和性が異なる事が示唆された。

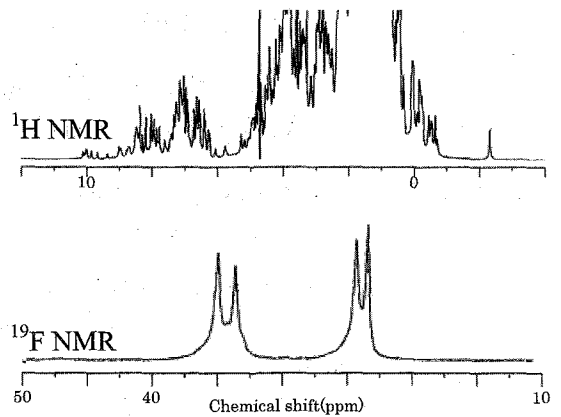


Fig. 2. ¹H NMR spectra and ¹⁹F NMR spectra.

Table 1. Oxygen bindings properties

	P_{50}^a (mmHg)	n^b
2,8-DPF Hb A	8.9	1.64
Native Hb A	5.9	2.99

a : Partial pressure of O₂ at [Deoxy Hb]=[Oxy Hb].
b : Hill coefficient representing the cooperativity.

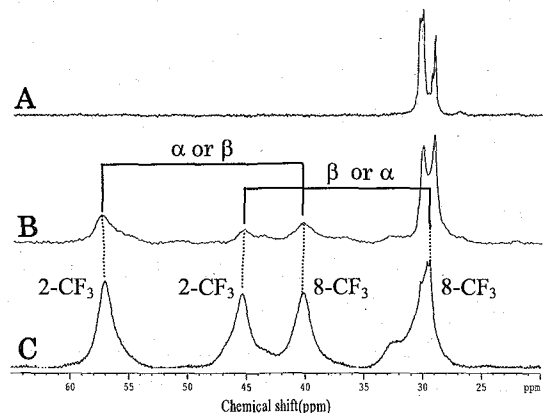


Fig. 3. ¹⁹F NMR spectra of (A)oxy Hb A(2,8-DPF), (B) Hb A(2,8-DPF) intermediate state and (C)deoxy Hb A(2,8-DPF), 25°C and pH 7.0. As shown with the spectra, the assignments of the signals to the individual subunits were not completed at the present.

フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質の ^{19}F NMR シグナルの磁場強度依存性の解析

筑波大院数物¹、長岡高専物質²

○宮崎泰斗¹、太虎林¹、長友重紀¹、山本泰彦¹、鈴木秋弘²

Study of Magnetic Field Dependence of ^{19}F NMR Signals of Hemoproteins Reconstituted with a Ring Fluorinated Hemes

○Taito Miyazaki¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹,
and Akihiro Suzuki²

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba¹ and Nagaoka Natl. Coll. of Tech.²

The analysis of nuclear relaxation has provided a wealth of information about structural and dynamic properties of molecules. Particularly, in the case of metalloproteins carrying unpaired electron(s), dynamic nature of the molecule is sharply manifested in paramagnetic relaxation. In this study, we have shown that the correlation times of the proteins can be estimated through the analysis of field dependence of the paramagnetic Curie spin relaxation.

序論

本研究では、フッ素原子を側鎖にもつフッ素化ヘム(3,7-DF, 13,17-bis(2-carboxylatoethyl)-3,7-difluoro-2,8,12,18-tetramethyl-7,12,18-porphyrinatoiron(III), Fig. 1)をミオグロビン(Mb)、成人ヘモグロビン(Hb A)に組み込み、観測される ^{19}F NMR シグナルの線幅の磁場強度依存性の解析から、タンパク質の回転拡散運動の相関時間を見積もるための解析法の構築を試みた。

結果・考察

3,7-DF を組み込んだ Mb、Hb A の deoxy 体および一連の外部配位子(H_2O , N_3^- , CN^- , O_2 , CO)を結合させた状態の ^{19}F NMR 測定を2つの異なる磁場強度 ($B_0 = 9.4 \text{ T}$ (共鳴周波数 376 MHz)、 $B_0 = 11.7 \text{ T}$ (470 MHz))で行った。Fig. 2 に、Mb の deoxy 体の ^{19}F NMR シグナルの磁場強度依存性を示す。シグナルの線幅が磁場強度の増大に伴い増大することが確認できる (Table 1)。これらのシグナルの線幅 (横緩和速度 (R_{obs})) は、反磁性緩和速度 (R_{dia})、常磁性緩和速度 (R_{para})、双極子-双極子緩和機構 (R^{DD})、化学シフト異方性緩和機構 (R^{CSA})、反磁性緩和機構のその他の寄与 (R^{other})、擬コンタクト相互作用による二種類の緩和機構(中心金属上に局在化した不對電子スピンの機構 (R^{MC})、および配位子に非局在化した不對電子スピンの機構 (R^{LC})、コンタクト相互作用による緩和機構 (R^C)、キュリースピン緩和機構 (R^{Curie})により、

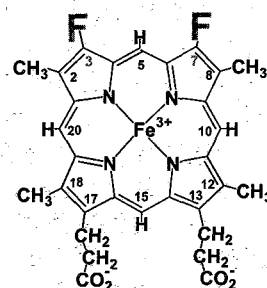


Fig. 1. Molecular structure of 3,7-DF.

Keywords: ^{19}F NMR ヘムタンパク質 常磁性緩和 分子運動 フッ素化ヘム
みやざき たいと、たい こりん、ながとも しげのり、やまもと やすひこ、
すずき あきひろ

$$R_{obs} = R_{dia} + R_{para} \quad (1)$$

$$R_{dia} = R^{DD} + R^{CSA} + R^{other} \quad (2)$$

$$R_{para} = R^{MC} + R^{LC} + R^C + R^{Curie} \quad (3)$$

$$R^{CSA} = \frac{6}{40} \omega_I^2 \Delta_z^2 (3J(\omega_I) + 4J(0)) \quad (4)$$

$$R^{Curie} = \frac{4}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\omega_I^2 g^4 \mu_B^4 S^2 (S+1)^2}{(3kT)^2 r_M^6} \tau_c \quad (5)$$

ω_I : Larmor frequency of ^{19}F , $J(\omega)$: Spectral density function, r_M : Distance between ^{19}F nucleus and heme iron (5.62 Å), τ_c : Correlation time of overall molecular tumbling. Other parameters represent usual meanings.

Eqs. (1) ~ (3)で表わされる。これら緩和機構で R^{CSA} と R^{Curie} のみ、磁場強度依存性を示すので (Eqs. (4) & (5))、 R_{obs} の磁場強度依存性から、 R^{CSA} の磁場強度依存性の寄与を差し引くことにより、 R^{Curie} を分離することができる。反磁性 ($S=0$) の CO 体のシグナルの線幅の磁場強度依存性の解析から R^{CSA} を見積り、常磁性 ($S=2$) の deoxy 体のシグナルの線幅への R^{Curie} の寄与を分離した結果を **Table 1** にまとめて示す。

本研究で用いた 3,7-DF では、フッ素原子はポルフィリン環に固定されており、またこれらのタンパク質に導入されたヘムのポルフィリン環はタンパク質と同一の τ_c をもつことが示されている (La Mar *et al.* (1989)) ことから、3,7-DF のフッ素原子の運動の解析を通して、タンパク質全体の τ_c を見積もることが可能となる。

R^{Curie} を Eq. (5) に基づいて解析することにより、 $\tau_c \sim 30$ ns が得られた。Mb の τ_c としては ~ 10 ns が報告されていることから (Marshall *et al.* (1980))、本研究で提唱した方法で τ_c を高精度で見積るためには、より多くの異なる磁場強度での測定が必要であると思われる。

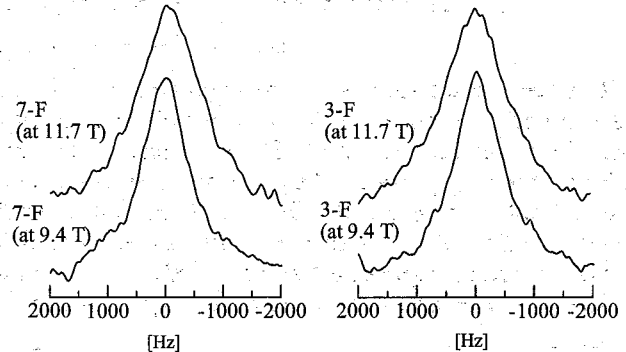


Fig. 2. ^{19}F NMR spectra of deoxy Mb reconstituted with 3,7-DF, at 9.4 T and 11.7 T

Table 1. Line widths of ^{19}F NMR signals, relaxation rates of deoxy Mb, reconstituted with 3,7-DF, in 90% H_2O /10% $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0, at 25°C. R^{CSA} values are estimated through the analysis of the signals of CO form of Mb.

signal	$B_0=9.4\text{T}$		$B_0=11.7\text{T}$			$B_0=9.4\text{T}$			$\tau_c(\text{ns})$
	$\Delta\nu_{obs}(\text{Hz})$	$R_{obs}(\text{s}^{-1})$	$\Delta\nu_{obs}(\text{z})$	$R_2^{obs}(\text{s}^{-1})$	$\Delta R_2^{obs}(\text{s}^{-1})$	$\Delta R^{CSA}(\text{s}^{-1})$	$\Delta R^{Curie}(\text{s}^{-1})$	$R^{Curie}(\text{s}^{-1})$	
3-F	710±71	2230±220	910±91	2890±290	630±290	54±31	580±290	1320±520	27±13
7-F	660±66	2070±210	950±95	2980±300	910±300	69±41	840±300	1490±530	37±14

結論

フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質で観測される ^{19}F NMR シグナルの線幅の磁場強度依存性の解析により、シグナルの線幅への化学シフト異方性、キュリースピン緩和の寄与をそれぞれ分離しヘムタンパク質の相関時間を見積もる手法を提唱した。

各サブユニットを区別したヒト成人ヘモグロビンの機能解析

筑波大院数物

○佐藤惇志、太虎林、長友重紀、山本泰彦

¹H NMR Characterization of Functional Properties of the Individual Subunits of Human Adult Hemoglobin

○Atsushi Sato, Hulin Tai, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

Based on a combined use of the measurements of ¹H NMR and absorption spectra, we have established a technique which enables characterization of oxygen binding properties of the individual subunits of intact Hb A. Characterization of the effects of allosteric effectors, 2,3-bisphosphoglycerate (BPG) and inositolhexaphosphate (IHP), on the oxygen affinities of the individual subunits of Hb A revealed that the affinities of both α and β subunits are deteriorated by the allosteric effectors, and that the deterioration of the affinity in the former subunit is much larger than the latter. Difference in the oxygen affinity between the subunits is likely to be essential to cooperative oxygen binding of Hb A.

[序論] ヒト成人ヘモグロビン(Hb A, $\alpha_2\beta_2$)の機能と構造の関係を解明する研究において、各サブユニットの機能を区別して解析することが重要である。一般的に、Hb Aの酸素運搬機能は、酸素飽和度が50%の時の酸素分圧 P_{50} を指標として評価される。私共は、deoxy Hb A の ¹H NMR スペクトルにおいて、軸配位子の HisF8 N_δH 由来のシグナルが、低磁場に常磁性シフトして観測され、さらに各サブユニットで異なる化学シフト値を示すことに注目し、各サブユニットの P_{50} を ¹H NMR と UV-VIS を組み合わせることにより計測する手法の確立を目指している。本研究では、生体内の環境に近い状態で Hb A の機能と構造の解析を行うために、赤血球自体の ¹H NMR 測定を行った。そこで、通常の方法で精製した Hb A と成人赤血球内の Hb A の構造を ¹H NMR スペクトルの解析を通して比較した。さらに、赤血球内に存在する 2,3-ビスホスホグリセリン酸(2,3-BPG)を除去した Hb A、イノシトールヘキサリン酸(IHP)を加えた Hb A の解析から、これらアロステリックエフェクターが Hb A の α 、 β サブユニットのどちらの機能により大きな影響を及ぼすかについて明らかにした。

[結果・考察]

赤血球内 Hb A の構造

赤血球内 Hb A の構造解析のために、赤血球内 Hb A と精製した Hb A の ¹H NMR スペクトルで機能解析に用いる deoxy 体および oxy 体の指標となるシグナルのシフト値と線幅の比較を行った (Table 1)。その結果、各状態の指標となるシグナルをはじめ、その

Table 1. NMR parameters of selected NMR signals of Hb A in erythrocyte and purified Hb A.

	Chemical shift (ppm)			Linewidth (Hz)		
	Deoxy form (HisF8 N _δ H)	Oxy form (ValE11 γ -CH ₂)		Deoxy form (HisF8 N _δ H)	Oxy form (ValE11 γ -CH ₂)	
	α	β	α, β	α	β	α, β
Purified	63.4	75.7	-2.38	1094	1154	76.12
In cell	63.7	75.7	-2.43	1903	1944	102.5
Difference (In cell - purified)	+ 0.3	0	- 0.05	+ 809	+ 790	+ 26.38

他の常磁性シフトしたシグナルのシフト値がほぼ同一であることから、活性部位であるヘム近傍の電子構造は両者でほぼ等しいことが示された。一方、シグナルの線幅は、赤血球内 Hb A の方が精製した Hb A より広いことが明らかとなり、赤血球内部の Hb A の運動性が抑制されていることが示唆された。

Keywords : 常磁性 NMR, ヘモグロビン, 酸素親和性, 協同性, ヘム

さとう あつし, たい こりん, ながとも しげのり, やまもと やすひこ

赤血球内 Hb A の酸素化過程

赤血球内 Hb A の $^1\text{H NMR}$ スペクトルの酸素分圧依存性を Fig. 1 に示す。酸素分圧が低いときは deoxy 体由来のシグナルのみ ~ 70 ppm に観測され (G. N. La Mar *et al.* (1980))、酸素分圧の上昇に伴い deoxy 体由来のシグナル強度の減少と共に、oxy 体由来のシグナル (~ 3 ppm, C. Dalvit and C. Ho (1985)) 強度の増大が観測された。酸素分圧が高くなると最終的に oxy 体由来のシグナルのみ観測された。このように $^1\text{H NMR}$ により、各サブユニットの酸素化過程を区別して観測することが可能である。Fig. 1 に示した一連の $^1\text{H NMR}$ スペクトルの測定結果と吸収スペクトルの測定結果から得られた赤血球内 Hb A 四量体の酸素平衡曲線 (A. H. M. Mawjood and K. Imai (1999)) を用いて、各サブユニットの酸素平衡曲線および P_{50} の算出を行った。Deoxy 体由来のシグナル強度の解析により求めた各サブユニットそれぞれの酸素飽和度を酸素分圧に対してプロットすることにより、各サブユニットの酸素平衡曲線 Fig. 2 を求めることができる。このようにして得られた酸素平衡曲線から P_{50} は、 α サブユニットが 24.7 ± 1.2 mmHg、 β サブユニットが 28.9 ± 1.6 mmHg と見積もることができ、 P_{50} を区別して決定することが可能であることが示された。

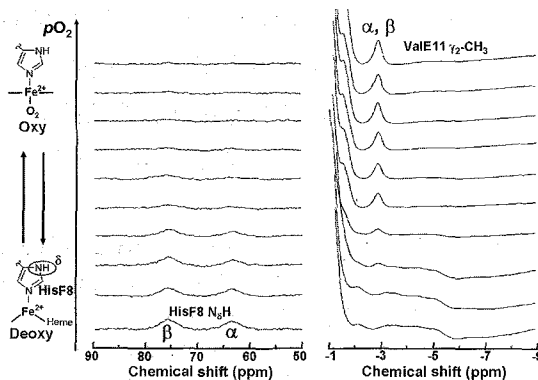


Fig. 1. $^1\text{H NMR}$ Characterization of Hb A oxygenation in erythrocyte at physiological temperature and pH.

アロステリックエフェクターが Hb A の酸素化に与える影響

赤血球内 Hb A と同様に、 $^1\text{H NMR}$ スペクトルの酸素分圧依存性から、各サブユニットの酸素平衡曲線 (Fig. 2) および P_{50} の計測を行った。アロステリックエフェクターとして知られている IHP 存在下での各サブユニットの P_{50} は α サブユニットが 44.3 ± 1.9 mmHg、 β subunit が 53.7 ± 2.7 mmHg と求まり、両者の差と赤血球内つまり血液中に存在するアロステリックエフェクターである 2,3-BPG 存在下での P_{50} の差を比較すると、前者の差の方が大きいことが示された。この結果から 2,3-BPG よりも IHP の方が Hb A の機能、特に β サブユニットの機能により大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。一方、アロステリックエフェクター非存在下での各サブユニットの P_{50} は α サブユニットが 5.28 ± 0.11 mmHg、 β サブユニットが 5.36 ± 0.13 mmHg と求まり、両者の差は IHP または 2,3-BPG 存在下での差よりも小さくなった。これらの結果から、Hb A の機能にアロステリックエフェクターが及ぼす影響は各サブユニットで異なることが初めて実証された。Hb A が協同的な酸素結合性を発現するためには、 α 、 β サブユニットの酸素親和性が著しく異なることが不可欠であると考えられる。

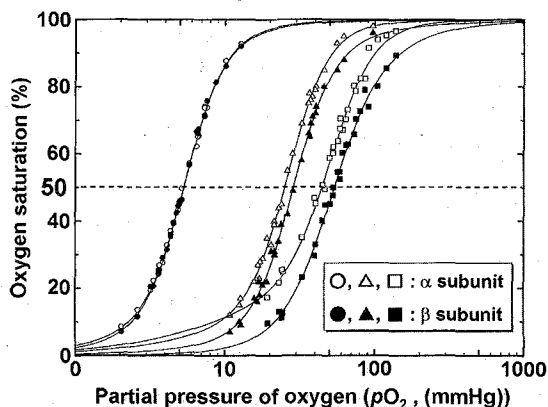


Fig. 2. Oxygen equilibrium curves of the individual subunits of 2,3-BPG-depleted Hb A (circles), Hb A in erythrocyte (triangle) and Hb A in the presence of IHP (square).

[結論] $^1\text{H NMR}$ と UV-VIS を組み合わせることにより、Hb A の各サブユニットの P_{50} の決定が可能であることが示された。IHP 存在下で、Hb A の両サブユニットの P_{50} は共に増大するが、その増大の程度は β サブユニットの方が大きいことが明らかとなった。IHP は、Hb A の $\beta_1\beta_2$ 間に結合する考えられることから、IHP の結合は酸素結合に伴う四次構造変化を抑制し、 β のみならず α サブユニットの P_{50} も増大させることが示唆された。

C₂対称フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質の活性部位構造の¹⁹F NMRによる解析

筑波大院数物¹, 長岡高専物質²

○ 古市英資¹, 水関和哉¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 鈴木秋弘²

¹⁹F NMR Comparative Study between Human Adult and Fetal Hemoglobins Bearing C₂-symmetrically Fluorinated Heme

○Eisuke Furuichi¹, Kazuya Mizuseki¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹, and Akihiro Suzuki²

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba¹ and Nagaoka Natl. Coll. of Tech.²

We report here the results from ¹⁹F NMR studies of human adult hemoglobin (Hb A) and human fetal hemoglobin (Hb F) possessing C₂ fluorinated heme. The orientation of axial His F8 imidazole relative to heme in the subunits of Hb A and Hb F has been estimated through the analysis of paramagnetic ¹⁹F NMR shifts. The study suggested a possible difference in the orientation of HisF8 imidazole relative to heme between the α subunits of the two Hbs, indicating that the His F8 imidazole orientation in the α subunit is affected through the subunit interaction.

序論

ヒト成人ヘモグロビン(Hb A, α₂β₂)、胎児ヘモグロビン(Hb F, α₂γ₂)は、共に四量体構造をもち、各サブユニットにヘムを1つずつ含む。ヘム鉄には、近位ヒスチジン(HisF8)が配位しており(Fig. 1)、このHisF8のヘムに対する配向はHisのイミダゾール窒素のp軌道とヘム鉄のd軌道との相互作用を介して、ヘムの電子構造に影響を及ぼす。Hb A、Hb Fの機能は、ヘムの電子構造やポリペプチドサブユニットの立体構造により調節されている。本研究では、2つのCF₃基を側鎖にもち、分子構造がC₂対称である2,8-DPF(13,17-bis(2-carboxylatoethyl)-(3,7,12,18-tetramethyl-2,8-diperfluoromethyl-porphyrinatoiron(III))をHb AおよびHb Fに組み込み、¹⁹F NMRによりヘムの電子構造やヘムに対するHisF8の配向角(φ(Fig. 1))を解析した。

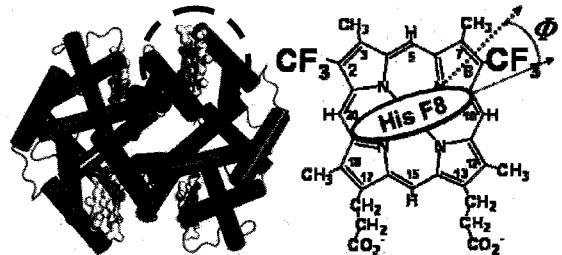


Fig. 1. Structure of hemoglobin and coordination of axial His to heme. The φ angle defines the orientation of axial His imidazole plane with respect to heme.

2つのCF₃基を側鎖にもち、分子構造がC₂対称である2,8-DPF(13,17-bis(2-carboxylatoethyl)-(3,7,12,18-tetramethyl-2,8-diperfluoromethyl-porphyrinatoiron(III))をHb AおよびHb Fに組み込み、¹⁹F NMRによりヘムの電子構造やヘムに対するHisF8の配向角(φ(Fig. 1))を解析した。

結果・考察

2,8-DPF再構成Hb F(2,8-DPF Hb F)の一連の配位状態(CO体(Fe²⁺, S=0)、O₂体(Fe²⁺, S=0)、CN⁻体(Fe³⁺, S=1/2)、N₃⁻体(Fe³⁺, S=1/2)、Deoxy体(Fe²⁺, S=2))における¹⁹F NMRスペクトルでは、不対電子の数の増大に伴い、シグナルのより大きな低磁場シフトが観測された(Fig. 2)。また、2,8-DPFがタンパク質に組み込まれた際には、2つのCF₃基に由来するシグナルの縮退は解けて、分裂する。このシグナルの分裂幅は、主にHisF8の配位に依存すると考えられることから、シフト値の解析より、ヘムに対するHisF8の配向角(φ(Fig. 1))を見積もることができる。常磁性

Keywords: ¹⁹F NMR, ヘムタンパク質, 配位結合, 常磁性シフト, フッ素化ヘム

ふるいち えいすけ, みずせき かずや, たい こりん, ながとも しげのり
やまもと やすひこ, すずき あきひろ

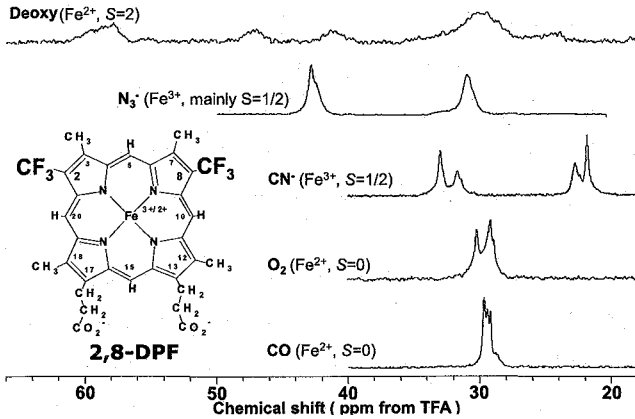


Fig. 2. ^{19}F NMR spectra of 2,8-DPF Hb F in various oxidation, spin, and ligation states of heme iron at 25 °C and pH 7.0.

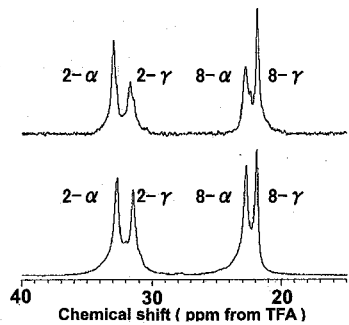


Fig. 3. ^{19}F NMR spectra of CN^- forms of Hb F (2,8-DPF) and Hb A (2,8-DPF) at 25 °C and pH 7.0. The signal assignments are given with the spectra.

シフトしたシグナルのシフト値 (δ_{obs}) は、反磁性シフト (δ_{dia}) と常磁性シフト (δ_{para}) の和として表される。ここで、 CF_3 のシグナルの δ_{para} では、コンタクトシフト (δ_{con}) の寄与が支配的である。したがって、ミオグロビン (Mb)、Hb F の CN 体におけるシグナルの分裂に寄与する δ_{dia} と δ_{con} のうち、 δ_{dia} の寄与が CO 体での値と等しいと仮定すれば、 δ_{con} の寄与は ($\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{dia}}$) で求めることができる。Fig. 3 に示した 2,8-DPF Hb A および Hb F の CN 体の ^{19}F NMR スペクトルの化学シフト (δ_{obs}) からそれぞれのタンパク質での 2- CF_3 と 8- CF_3 由来するシグナルの δ_{con} の差 ($\Delta\delta_{\text{con}}$) を計算し、天然型の Hb A CN 体の X 線結晶構造解析より求めた Φ の値を理論式 ($\Delta\delta_{\text{con}} = A \cos 2\Phi + B$, A, B は定数) でフィッティングすることにより、関係式 $\Delta\delta_{\text{con}} = 7.9 \cos 2\Phi + 3.7$ を得た。なお、解析の際は、天然の Mb、Hb A の CN 配位型の X 線結晶構造解析で示された Φ 値が 2,8-DPF Hb A でも保持されていると仮定した。また、シグナル帰属は、Hb A と Hb F で共通する α サブユニット由来のシグナルのシフト値はお互いに類似しているとの予想に基づいて暫定的に行った。また、2,8-DPF Hb F のシグナルのシフト値と得られた関係式より、2,8-DPF Hb F の CN 体における HisF8 イミダゾール配向角を求めたところ (Fig. 4)、 α サブユニット ($\Phi = 14.9^\circ$)、 γ サブユニット ($\Phi = 17.3^\circ$) が得られ、Hb A CN 体の α サブユニット ($\Phi = 15.5^\circ$)、 β サブユニット ($\Phi = 19.5^\circ$) とは異なることが示唆された。

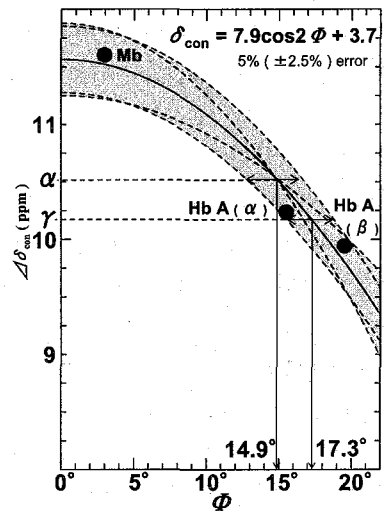


Fig. 4. Plots of $\Delta\delta_{\text{con}}$ against Φ for Mb (2,8-DPF), Hb A (2,8-DPF), and Hb F (2,8-DPF). $\Delta\delta_{\text{con}}$ is the difference in the δ_{con} contribution between 2- CF_3 and 8- CF_3 signals. In the cases of the 2- CF_3 and 8- CF_3 signals, since δ_{con} dominates in δ_{para} , δ_{con} can be calculated by the equation $\delta_{\text{con}} = \delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{dia}}$. The Φ values reported for the X-ray crystal structures of native proteins, i.e., $\Phi = 3.0$ for Mb (PDB:2JHO), and $\Phi = 15.5$ for α subunit and $\Phi = 19.5$ for β one of Hb A (PDB:1O11), have been used for the plots.

結論

Hb A と Hb F で共通する α サブユニットのヘムの電子構造の比較から、ヘムに対する HisF8 の配向がそれぞれの α サブユニットで異なることが示唆された。したがって、Hb A における α サブユニットと β サブユニット、Hb F における α サブユニットと γ サブユニットそれぞれのサブユニット間相互作用は異なると考えられる。

Structural studies on immunotherapeutic peptides for autoimmune disease myasthenia gravis

Hyun Ho Jung, Hwa Jung Yi, Chan Hyung Bae, Sin-Hyeog Im, Jae Il Kim

Gwangju Institute of Science and Technology, Research Center for Biomolecular

Nanotechnology, Department of Life Sciences, 500-712 Gwangju, Korea

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease in which major pathogenic antibodies attack the main immunogenic region (MIR) of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). In previous attempt to prevent the anti-MIR-mediated pathogenicity, the peptide Pep.1 was identified from phage display system, and Cyclic extended Pep.1 (Cyc.ext.Pep.1), which has greater affinity for the anti-MIR antibody mAb198 than Pep.1 and reduces symptoms of MG, was developed by several modifications. In the present study, we investigated the structural characteristics related to different affinity for mAb198 of Pep.1 and Cyc.ext.Pep.1 using NMR spectroscopy and alanine scanning analysis.

Introduction

Myasthenia gravis (MG) and its animal model, experimental MG (EAMG), are T-cell-dependent antibody-mediated autoimmune disease manifested by muscle weakness and fatigue, caused by an autoimmune attack on the nicotinic acetylcholine receptor of the skeletal muscle cell. Anti-AcChoR antibody (mAb198) is directed against the main immunogenic region (MIR) localized on the extracellular surface of the AcChoR α -subunit, resulting in accelerating internalization and degradation of AcChoR [1]. In collaboration with Venkatesh et al., we previously identified a candidate immunotherapeutic peptide (Pep.1, PMTLPENYFSERPYPH) for MG through the screening of phage-epitope libraries. To increase the affinity by mimicking of the conformation of the phage construct, additional residues were incorporated at both ends, yielding Cyc.ext.Pep.1 (CAEPMTLPENYFSERPYPHPPPPC). Cyc.ext.Pep.1 has three orders of magnitude greater affinity for mAb198 than Pep.1 and the ability to competitively inhibit its binding to the nAChR [2]. The structural basis for the increased affinity of Cyc.ext.Pep.1 remained unknown, however.

In the present study, we carried out NMR structural analysis to compare the structures of Pep.1 and Cyc.ext.Pep.1, and alanine-scanning functional analysis of Pep.1 to define the factors underlying the difference in the affinities of Pep.1 and Cyc.ext.Pep.1 for mAb198. In addition, to assess the structure of the antigen epitope within the nAChR, the structure of mAb198-bound Pep.1 was determined using TRNOE.

Methods

Calculation of the structures of mAb198-bound Pep.1 and Cyc.ext.Pep.1. Transferred NOEs in the case of to mAb198-bound Pep.1 and NOE data for Cyc.ext.Pep.1 were classified into four

distance ranges. The backbone NH-CoH coupling constants were measured from the DQF-COSY spectrum and were translated to backbone torsion angle constraints according to the following rules. Calculation of the structures of both peptides was carried out using the X-PLOR 3.851 program. Based on the minimum overall energy and Lennard-Jones van der Waals energy, the final 20 structures were chosen for structural analysis. The structural analysis of both peptides was carried out using the PROCHECK_NMR and PROMOTIF software packages.

Competitive inhibition assays using alanine analogues of Pep.1. Microtiter plates were coated with Ha1-205 in PBS and incubated overnight at 4°C. After blocking with 1% BSA in PBS, mAb198 preincubated in the presence of different concentrations of peptide was added to the wells. Bound mAb198 was detected by incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (1/10,000 dilution), followed by determination of horseradish peroxidase activity.

Results and Discussion

NMR analysis and determination of the structure of Cyc.ext.Pep.1. Complete sequence-specific resonance assignments for Cyc.ext.Pep.1 were determined using a standard protocol based on a set of traditional two-dimensional experiments. To calculate the structure of

Cyc.ext.Pep.1, a total of 230 constraints were identified, including 222 distance constraints obtained from the interproton NOE cross-peaks, 7 dihedral angle constraints from the coupling constraints, and 1 disulfide bond constraint. We executed the simulated annealing calculations beginning with 100 random Cyc.ext.Pep.1 structures, and selected 16 final structures that were in good accordance with the NMR experimental constraints. The average rms deviation from residues 7 to 19 was 2.20 ± 0.84 Å for the backbone atoms and 3.41 ± 1.16 Å for all heavy atoms. The overall structure of Cyc.ext.Pep.1 contains several turn structures. Two type IV β -turn structures appear in the region of residues Pro8-Tyr11 and Pro20-Cys23, and a γ -turn structure is seen between Arg15 and Tyr17. Among these structural regions, the Pro8-Tyr11 and Arg15 Tyr17 regions are conserved in the sequences of Pep.1.

NMR analysis and determination of the structure of mAb198-bound Pep.1. To calculate the structure of mAb198-bound Pep.1, we utilized 129 distance constraints derived from the two-dimensional TRNOE difference spectra [3]. We carried out the same processes with Cyc.ext.Pep.1 to obtain 20 final structures from 100 random structures of mAb198-bound

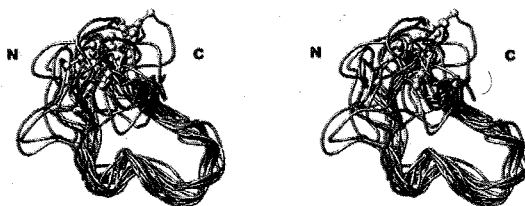


Fig 1. Stereoview of 16 converged structures of Cyc.ext.Pep.1. 1

Pep.1. The average rms deviation in the region extending from residue 4 to 12 was 0.93 ± 0.32 Å for the backbone atoms and 2.05 ± 0.52 Å for all heavy atoms. The molecular structure of mAb198-bound Pep.1 is characterized by tight turn structures. Two γ -turns are formed in the regions of residues Ser10-Arg12 and Arg12-Tyr14. In addition, 1 type IV β -turn structure is seen in the region between Pro5 and Tyr8. In the surface model of Pep.1 bound to mAb198, the region between Pro5 and Arg12 protrudes. Interestingly, Asn7 and Glu11 are in close proximity upon binding to mAb198, causing the residues between Asn7 and Glu11 to be crowded into the functional patch. Within the fixed structural region of mAb198-bound Pep.1, the regions between residue Pro5 and Tyr8 are consistent with the sequences of the structural regions of Cyc.ext.Pep.1. Moreover, residues Asn7 and Tyr8 in this common structural region are included in the protruding region.

Competitive inhibition assays with alanine analogues of

Pep.1. Using an ELISA, we assessed the degree to which a set of Pep.1 analogues, in which an alanine was sequentially substituted for each amino acid, could inhibit mAb198 binding to H α 1-205. Interestingly, the N7A and E11A analogues showed virtually no inhibitory activity. The inhibitory activities of the Y8A and F9A analogues were diminished by about 80% and 72%, respectively, as compared to Pep.1. In addition, the inhibitory activity of the P5A analogue was diminished to about 44% of control, which might be indicative of its role in the induction of tight turn structures. Within the structure of mAb198-bound Pep.1, important residues for the binding of Pep.1 to mAb198 are located in the tight-turn structure and the protruding region, and provide binding motifs for mAb198. Among the residues comprising the binding motifs, Asn7 and Tyr8 overlapped upon structural superimposition of Cyc.ext.Pep.1 and mAb198-bound Pep.1. It thus appears that modification of Pep.1 to Cys.ext.Pep.1 causes structural similarities to develop between key residues of mAb198-bound Pep.1 and Cys.ext.Pep.1, and by satisfying the conformational dependency of mAb198, these structural similarities mediate the increase in binding affinity for mAb198.

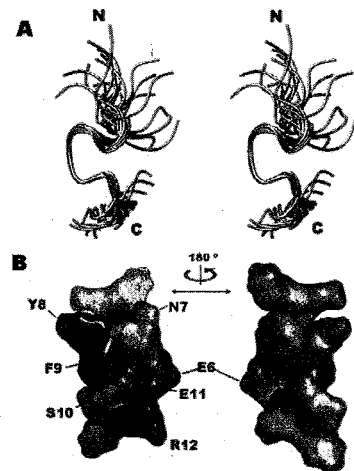
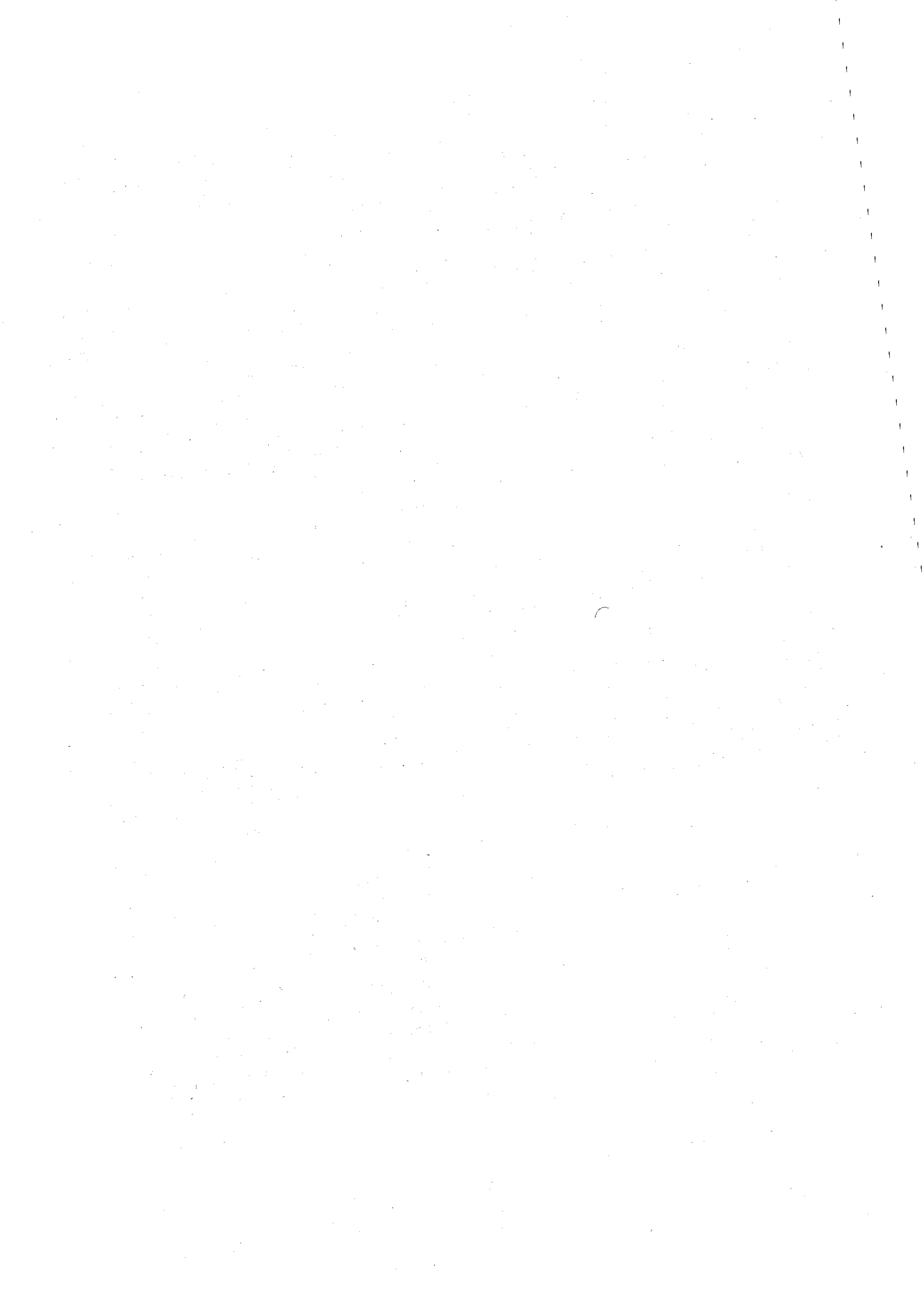


Figure 2. Stereopairs of 20 converged structures (A) and surface model (B) of mAb198-bound Pep.1.

References

1. Tzartos et al., *Autoimmunity* 8, 259-270 (1991)
2. Venkatesh et al., *PNAS* 97, 761-766 (2000)
3. Campbell et al., *J. Magn. Reson.* 93, 77-92 (1991)



Characterisation of salt bridges to lysines in Protein G

Jennifer H. Wolstencroft,[†] Saif Ullah,[‡] Poul Erik Hansen,[‡] and Michael P. Williamson^{†,§}
[†]*Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Firth Court, Western Bank, Sheffield, S10 2TN,* [‡]*Department of Science, Systems and Models, Roskilde University, Denmark* and [§]*Institute of Protein Research, Osaka University*

In crystal structures of proteins, salt bridges are frequently observed between lysine and arginine sidechains and the carboxylates of aspartates and glutamates. There is good evidence that such salt bridges have important functions when they are buried inside the protein. However, it is not clear whether surface exposed salt bridges are functionally important or indeed whether they are even energetically preferred: the entropic penalty of keeping hydrated charged groups adjacent is very large and of a similar magnitude to the enthalpic energy gained from the coulombic interaction. We have therefore used NMR to probe potential salt bridges involving lysines in the B1 domain of protein G. Protein G has six lysine residues, of which three are consistently found to form surface-exposed salt bridges in crystal structures, while the other three are not, and it is therefore a good system to examine this question.

In HSQC spectra at normal temperature and pH, it is not possible to observe lysine sidechain NH_3^+ groups. At pH 5.5 and 5 °C, two signals can be observed at the expected position (a ^{15}N shift of about 32 ppm). Signals are broadened by the rapid exchange of amino protons, which produces relaxation of the nitrogen. By using a recently described experiment called HISQC in which scalar coupling is suppressed,¹ all six lysine signals can be observed. Three signals are sharp and three are broad. The signals were assigned using three-dimensional shift correlation spectra, showing that the three sharp signals correspond to the lysines that are not found in salt bridges in crystals, whereas the three broad signals are hydrogen bonded. The $\text{N}\zeta$ and $\text{H}\zeta$ chemical shifts of all six lysines are similar, with no evidence of chemical shift perturbation by hydrogen bonding, and are not affected significantly by pH titration of the carboxylate groups in the protein, as would be expected if some are involved in salt bridges.

Deuterium isotope effects on nitrogen and proton were measured using spectra acquired in 40% D_2O , where three signals were observed for each lysine (Figure 1). The isotope shifts are of the size expected for a simple hydrated amine (a result supported by density functional theory calculations), and also do not titrate with the carboxylates.

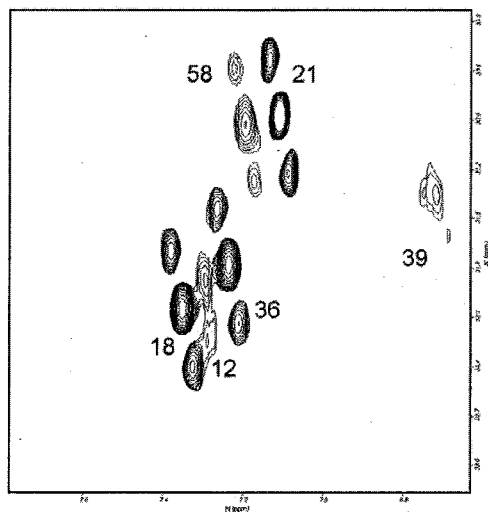


Figure 1. An HISQC spectrum of lysine NH_3 groups of protein G at pH 5.45, 278 K in 40 % D_2O . Three peaks are seen for K18, K21, K36 and K58 corresponding to NH_3 , NH_2D and NHD_2 groups (bottom right to top left, respectively), while K12 only shows two peaks (the NHD_2 signal is lost in the negative wings of larger neighboring signals but is visible using different processing) and K39 has only a single broad signal due to chemical exchange

J-coupled ^{15}N signals are quartets as expected, but their intensities are distorted from the expected 3:1:1:3 by relaxation effects, similar to the ‘methyl TROSY’ effects discussed by Kay.² These relaxation effects are strongly dependent on the correlation time of the lysine sidechain, and therefore the intensities are a sensitive probe of correlation time and any restriction of rotation of the lysine.^{1,3} All the intensity ratios are similar and suggestive of rapid internal reorientation of the NH_3^+ group.

The pK_a s of aspartate and glutamate side chains are expected to be affected by involvement in salt bridges. The pK_a of a carboxylate side chain in a salt bridge is expected to be lower than average as the salt bridge would favor the negatively charged state. Therefore, pK_a values have been measured for all aspartate and glutamate sidechains, from pH dependence of the sidechain carbonyl carbons and protons. As an example, Figure 2 shows the titrations for the glutamates. Glu50 could not be measured because of broad signals and overlap with other residues. The pK_a values are typical of those found in proteins (4.0 for aspartate and 4.4 for glutamate): the pK_a of D30 is low because it is at the N-terminal end of an α -helix.⁴ There is thus no evidence for salt bridge formation from carboxylate pK_a values.

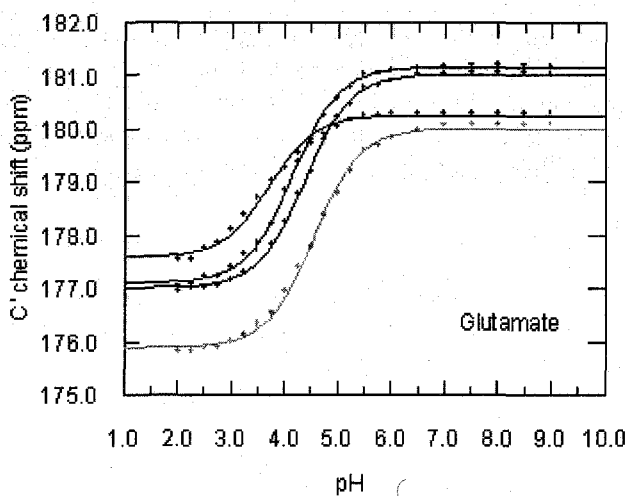


Figure 2. The change in glutamate carbonyl chemical shifts with pH fit to the standard equation.

Residue	pK_a
E23	4.37 ± 0.004
E27	4.16 ± 0.004
D30	2.78 ± 0.011
E35	3.91 ± 0.042 and 4.90 ± 0.023
D44	3.75 ± 0.004
D48	3.67 ± 0.005
D54	3.93 ± 0.006^b
D55	3.24 ± 0.004
E64	3.23 ± 0.030 and 4.51 ± 0.041

The pK_a values for lysine sidechains were also measured, by following the pH dependence of the $\text{N}\zeta$ chemical shifts.⁵ The titration could not be continued past pH 11.0 as the protein unfolded at pH 11.5. As the residues had not reached the end of the titration by pH 11.0, the total chemical shift change with pH was fixed to 8.0 ppm to assist the fitting. Nevertheless, good fits were obtained with reliable pK_a values (Figure 3). The variation in pK_a is small, and again there is no evidence for perturbation of pK_a values by salt bridge formation.

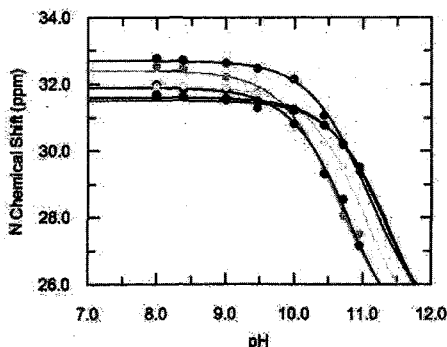


Figure 3. The change in lysine $\text{N}\zeta$ chemical shift with pH for K12 (cyan), K18 (black), K21 (green), K36 (blue), K39 (yellow) and K58 (red). The fitted pK_a values are respectively 10.7 ± 0.04 , 11.1 ± 0.05 , 11.4 ± 0.06 , 10.8 ± 0.04 , 11.1 ± 0.04 and 11.4 ± 0.08 .

In summary, protein G presents no evidence from NMR for the presence of salt bridges. The chemical shifts of lysine sidechains are very similar and do not titrate with pH; deuterium isotope effects are very similar and do not titrate with pH; all sidechains have unrestricted mobility; and there are no effects on pK_a values of glutamate, aspartate, or lysine that can be attributed to hydrogen bonding. There is thus no evidence that the three lysines seen consistently to form salt bridges in crystals do so in solution.

The only differential effect seen is that the lysines that are involved in salt bridges in the crystal display faster exchange of the amine protons with the solvent. For K39, the effect is most noticeable and corresponds to an exchange rate of approximately 25 s^{-1} . Comparison with related data^{6,7} implies an expected intrinsic exchange rate for exposed lysines of around $5\text{-}10\text{ s}^{-1}$ under our conditions. It is therefore likely that K12, K39 and K58 have an accelerated

exchange rate rather than K18, K21 and K36 having a reduced exchange rate. The increased exchange rate most likely arises from general-base catalysed exchange by the neighboring carboxylates (Figure 4). The increase in exchange rate is however not large, implying that in this case the population of 'salt bridge' is very low. In conclusion, the study demonstrates that the six surface-exposed lysines in protein G are not involved in any significant salt bridge interactions, even though such interactions are found consistently in crystal structures.

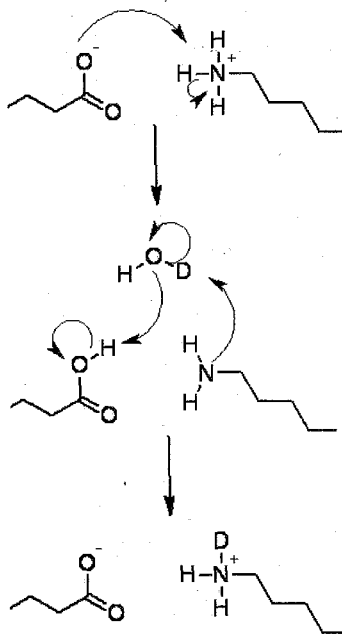


Figure 4. The general base catalysed exchange that increases the proton/deuterium exchange rate for lysine NH_3 groups involved in salt bridges.

References

1. Iwahara, J.; Jung, Y.-S.; Clore, G. M., *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 2971-2980.
2. Tugarinov, V.; Kay, L. E., *J. Biomol. NMR* **2004**, *28*, (2), 165-172
3. Poon, D. K.; Schubert, M.; Au, J.; Okon, M.; Withers, S. G.; McIntosh, L. P., *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 15388-15389.
4. Khare, D.; Alexander, P.; Antosiewicz, J.; Bryan, P.; Gilson, M.; Orban, J., *Biochemistry* **1997**, *36*, (12), 3580-3589.
5. André, I.; Linse, S.; Mulder, F. A. A., *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 15805-15813.
6. Segawa, T.; Kateb, F.; Duma, L.; Groffrey, B.; Pelulessy, P., *ChemBioChem* **2008**, *9*, 537-542.
7. Liepinsh, E.; Otting, G., *Magn. Res. Med.* **1996**, *35*, (1), 30-42

P046 NMR を用いた p62 UBA ドメインの二量体形成モデルの検証

(京大院工¹, 横浜市大院国際総合², 神戸大院医³, 東京都臨床研⁴)

磯貝信¹, 森本大智¹, 阿部翔吾¹, 有田恭平¹, 雲財悟², 天野剛志³, 有吉眞理子¹, 枋尾豪人¹, 小松雅明⁴, 田中啓二⁴, 白川昌宏¹

Shin Isogai¹, Daichi Morimoto¹, Shogo Abe¹, Takeshi Tenno², Satoru Unzai³, Hidehito Tochio¹, Kyouhei Arita¹, Mariko Ariyoshi¹, Keiji Tanaka⁴, and Masahiro Shirakawa¹

1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, JAPAN

2. Graduate School of Medicine, Kobe University, Kobe, JAPAN

3. International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University, Yokohama, JAPAN

4. Tokyo Metropolitan Institute of Medical Sciences, Tokyo, JAPAN

p62 is one of the proteins known to recognize poly-linked ubiquitin chains through its ubiquitin associated (UBA) domain. p62 is known to accumulate in ubiquitin-positive inclusions in neurodegenerative diseases, suggesting the important role of the UBA domain in such diseases.

Upon the interaction between p62 UBA and ubiquitin, several cross peaks of the ¹H-¹⁵N correlation spectrum of ¹⁵N-labeled p62 UBA displayed both 'slow' and 'fast' exchange scheme, while those of ¹⁵N-labeled ubiquitin only did 'fast' exchange scheme. Series of analysis by X-ray crystallography, analytical centrifugation, analytical gel-filtration, and NMR revealed that p62 UBA forms a dimer in the solution and dissociates when it binds to ubiquitin.

【概要】

ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解系において、p62は C 末端の ubiquitin-associated (UBA) ドメインを介してポリユビキチン修飾されたタンパク質を認識し、プロテアソームへと移行するシャトルタンパク質のひとつと考えられている。一方で、p62はオートファゴソーム形成に関与する LC3と相互作用することから、オートファジーを介したタンパク質分解にも関与する。また、神経変性疾患において観察されるユビキチン陽性細胞内凝集体と共局在し、これらの疾患における重要な役割が示唆されている。本実験は p62におけるユビキチン鎖認識部位である UBA ドメインのユビキチン認識機構を明らかにすることを目的として実験を行った。¹⁵N 標識 p62 UBA ドメインとユビキチンとの結合を¹H-¹⁵N HSQC を用いて観察すると、早い交換と遅い交換の化学シフト摂動が同時に見られる。この二つの交換反応が UBA とユビキチンの結合のどのような状態に起因するのか、NMR に加え、X 線結晶構造解析、分析超遠心等を用いて分析を行った。その結果、p62 UBA ドメインは二量体を形成しており、結合時にはその解離が必須であることが解った。

キーワード：ユビキチン、UBA ドメイン、二量体

いそがいしん、もりもとだいち、あべしょうご、ありたきょうへい、うんざいさとる、てんのたけし、ありよしまりこ、とちおひでひと、こまつまさあき、たなかけいじ、しらかわまさひろ

【背景・目的】

ユビキチン-プロテアソーム系において、ポリユビキチン化された基質は26Sプロテアソームに運ばれ、分解される。その際、ポリユビキチン鎖を認識し、基質をプロテアソームまで輸送するシャトルタンパク質の存在が知られている。p62タンパク質はそのシャトルタンパク質のひとつであり、C末端にユビキチン認識を行うUBAドメイン、N末端にプロテアソームサブユニットと結合するPB1ドメインをもつ。また、神経変性疾患における細胞内凝集体では、ポリユビキチンとp62との共局在が観察される。近年におけるオートファジー関連タンパク質LC3との相互作用から、p62を介したユビキチン-プロテアソーム系と、オートファジーによるタンパク質分解系とのクロスオーバーも示唆される。本研究ではp62 UBAドメインがどのようにポリユビキチン鎖を認識するかを解明することを目的とし、実験を行った。

【実験および結果】

p62 UBA の2量体形成

マウス p62 UBA ドメインをコードする遺伝子 (391-438) を pGEX-6P1ベクターに導入し、大腸菌発現系を用いて発現精製した。p62 UBA およびユビキチンの¹⁵Nラベル、ノンラベル体を用いて¹H-¹⁵N HSQC スペクトルでの結合実験の結果、p62 UBA はユビキチンとの結合を示すことがわかった。しかし、¹⁵N 標識ユビキチンをプローブとして滴定を行った場合、p62 UBA との結合の際に「速い」交換が観察され、¹⁵N 標識 p62 UBA をプローブとして滴定を行った場合には「遅い」交換に「速い」交換が混じる形でのピーク移動が観察された。「遅い」交換が見られた残基は UBA ドメインに一般に見られるユビキチン結合部位とは異なった部位に分布していた。また、p62 UBA の¹H-¹⁵N HSQC スペクトルにはピーク強度の低いマイナーピークが多数観察され、このピークが徐々に希釈するとともに濃度依存的に相対強度を増すことがわかった (Fig. 1)。

分析超遠心および分析ゲルろ過クロマトグラフィーにより、溶液中での p62 UBA の分子量測定を行ったところ、p62 UBA は2分子分の見かけの分子量を示した。また、p62 UBA ドメイン単体の結晶構造解析により得られた p62 UBA 結晶構造では、結晶格子中に非対称分子が2分子含まれており、2分子の間には600Å²程度の疎水性相互作用表面が存在していた (Fig.2)。また、結合実験で「遅い」交換が見られた残基はこ

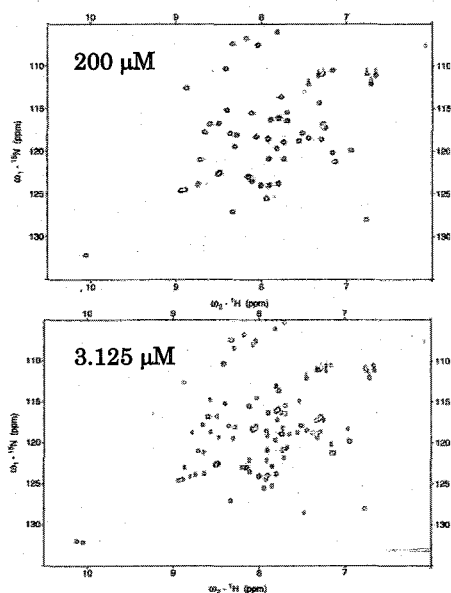


Fig.1 ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of p62 UBA at various concentrations

Number of peaks in the higher concentration at the top (200 μM) is almost doubled in the lower concentration spectra at the bottom (~3 μM).

の2量体分子の相互作用表面にあたることがわかった。

そこで、溶液中での2量体構造が結晶中のものと同様であるか検証するため、2量体相互作用表面に位置する W414、L418、I433に残基特異的な変異を導入し、その2量体形成能を分析ゲルろ過および超遠心分析、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを用いて確認した。2量体相互作用表面に変異を導入した変異体のほぼすべてが単量体の分子量を示し、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルにおいて p62 UBA 単体の低濃度サンプルにみられるスペクトルに部分的に類似のパターンを示した。このことから、p62 UBA は溶液中でも結晶中と同様に2量体を形成していることが確認された。

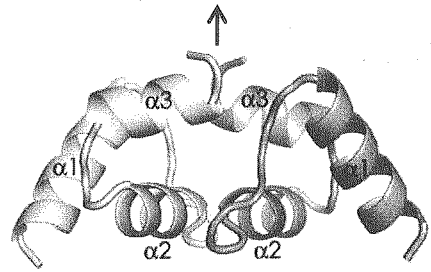


Fig. 2 Crystal structure of p62 UBA
p62 UBA appeared to be a dimer in the crystallographic asymmetric unit. Two molecules are related to each other by C2 rotational symmetry.

2量体 p62 UBA のユビキチン結合機構

^{15}N 標識 p62 UBA に対するユビキチンの滴定実験から、2量体 p62 UBA は単量体化を経てユビキチンに結合することが示唆された。ただし、「遅い」交換と「速い」交換の混じったスペクトルでは「速い」交換にあたるユビキチン結合部位を同定することができなかった。そこで、この2つの交換過程の分離を試みた。2量体 p62 UBA の界面は疎水性相互作用により保持されていることから、界面活性剤 (CHAPS) または疎水性溶媒 (DMSO) を添加し、2量体の解離を誘起した。どちらの添加剤によっても解離が誘起されたが、CHAPS では限界ミセル濃度を越えたため、スペクトルの S/N 比が低下した。また、DMSO は 100 μM p62 UBA サンプルにて完全な解離を観察するのに 20% (v/v) の濃度を要した。

DMSO を添加した条件において、各状態での p62 UBA の ^1H - ^{15}N ピーク帰属を行った。2量体、ユビキチン複合体、DMSO 添加サンプルの3つについて3重共鳴法を利用した連鎖帰属を行い、DMSO 中のユビキチン複合体および単量体の帰属は滴定時の交換ピークの軌跡からピークの帰属を行った。単量体、2量体、ユビキチン複合体ピークの化学シフトを比較すると、単量体-2量体間での振動は2量体界面に起きており、単量体-ユビキチン複合体間での振動は $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ に見られ、従来の UBA-ユビキチン結合表面と一致した。また、それぞれの状態における化学シフトのパターンを主成分分析により分類したところ、DMSO 添加サンプルは単量体スペクトルのそれと類似しており、DMSO 中にて p62 UBA が単量体であることが確認できた。

以上の結果から、p62 UBA は溶液中で2量体を形成しており、ユビキチン結合の際には、その解離が起きると考える Fig. 3 のような平衡状態を引き起こすことが示された。



Fig.3 p62 UBA binding states

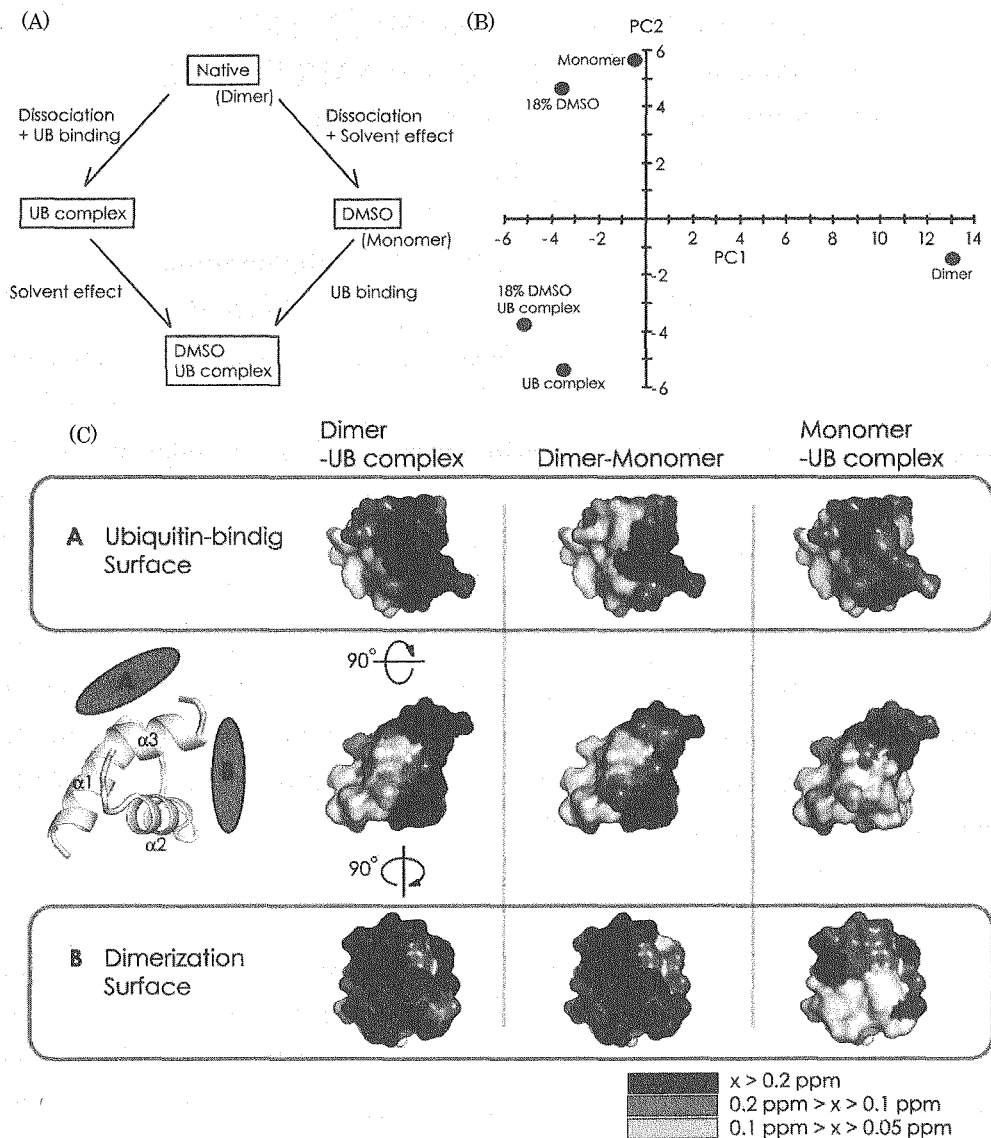


Fig.4 Separation of p62 UBA dissociation and UB binding pathway

(A) Relationship between various p62 UBA spectra. (B) Principle component analysis of p62 UBA peaks in the different states. (C) Dimerization surface and ubiquitin binding surface derived from the DMSO experiments.

【まとめ・今後の展望】

p62 UBA は溶液中で2量体を取り、ユビキチンの結合の際に解離が起こることが種々の実験結果から示唆された。この UBA の2量体-単量体平衡における解離定数 K_d はユビキチン結合における解離定数よりも10倍程度小さいことが予備実験からわかっている。今後は、全長 p62タンパク質での解析を含め、この2量体-単量体平衡がユビキチン結合、さらにはポリユビキチン鎖結合選択性にどのように影響するのかを中心に解析を行っていく予定である。

P047

クロマチン凝集メカニズムの解明を目指した
ヒト Polycomb クロモドメインの NMR 構造解析
(奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科)
○福井陽子、大木出、児嶋長次郎

NMR analysis of the human Polycomb chromodomain

○Yoko Fukui¹, Ohki Izuru¹, Chojiro Kojima¹

¹Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology

Polycomb group complex affects transcription restraint of the homeotypic gene group, and regulates morphosis, cell proliferation and epigenetic silencing through heterochromatin formation. Human Polycomb protein (hPc) is included in polycomb complex and interacts directly methylated histone H3 tail. Recently, it was reported that hPc also interacts with transcriptional repressor MBD1 and cooperates in chromatin condensation. Despite the biological importance of this interaction, the molecular mechanism remains unknown. To reveal the condensation mechanism, we perform the structural analysis of the chromodomain of hPc by solution NMR spectroscopy.

【序論】[□]

ポリコーム群複合体はホメオティック遺伝子群の転写抑制に関わり、発生、形態形成、細胞増殖、エピジェネティックな制御など幅広い生命現象に関わっているといわれている。特に、これに含まれるポリコーム (Pc) のクロモドメインはメチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27me) と結合することでクロマチンの凝集を担っていることが知られている。昨年、Pc のクロモドメインは H3K27me と相互作用するだけでなく、Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) と呼ばれる転写抑制因子と直接相互作用することが報告された (Sakamoto *et. al.*, 2007)。MBD1 ではメチル化 CpG に結合することでヘテロクロマチンを形成して遺伝子の発現を抑制し、ポリコーム群複合体と相乗的に働いていると考えられているが、その詳細は明らかとなっていない。そこで、本研究では Pc 単体での NMR を用いた構造解析を行い、それを基にメチル化ヒストンペプチドや MBD1 等の結合分子間の相互作用様式を調べ

キーワード： Polycomb、構造解析、クロマチン

ふりがな： ふくいようこ、おおきいずる、こじまちょうじろう

ることで、相乗的なクロマチン凝集メカニズムの解明を目指す。

【実験】

大腸菌による大量発現系により ^{15}N 、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベルしたヒト由来 Pc (hPc) を調製し、測定試料とした。NMR 測定は、CRYOPROBE を装着した Bruker AVANCE 500 を用いて 298 K で行った。主鎖の帰属には非線形サンプリング法を用いて HNCACB, HN(CO)CACB, HNCA, HN(CO)CA, HNCO の各種 3 次元測定を行った。これをもとに Chemical shift index 法および TALOS を用いて hPc の二次構造を解析した。また、側鎖の帰属は C(CO)NH, H(CCO)NH, HCCH-TOCSY 測定により行った。測定データの処理は Rowland NMR Toolkit および、NMRpipe を用いて行った。スペクトル解析には Sparky を用いた。

【結果と考察】

^{15}N 標識試料を用いた 2 次元 ^1H - ^{15}N HSQC において、Fig. 1 のような良好なスペクトルを得ることができた。また、hPc は 62 残基からなるタンパク質であり、これまでに Pro を除く全ての主鎖の化学シフトを帰属することができた。帰属した化学シフト値を用いて Chemical Shift Index 法と TALOS による二次構造予測を行ったところ、hPc は N 末端側から順に 3 つの β シー

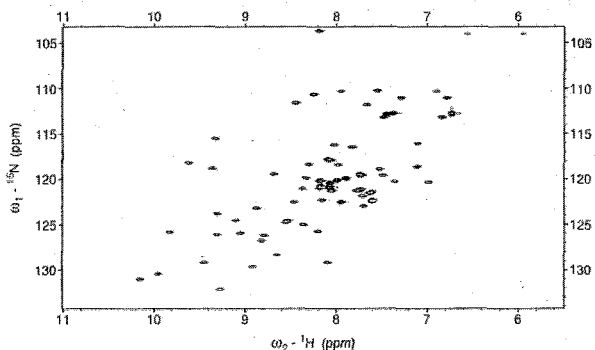


Fig. 1 ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of hPc

トと 1 つの α ヘリックスを持つことが推定され、すでに X 線結晶構造解析により解明されている *Drosophila* Polycomb のクロモドメイン (Min *et.al.*, 2003) の二次構造に類似した構造を持つことがわかった。また、hPc の α ヘリックスは dPc の α ヘリックスよりも一巻き程度長い事が判明した。この領域は結晶構造より H3K27me 結合に関与していないことが明らかとなっており、MBD1 などの分子との相互作用に関与している可能性がある。

現在は、hPc と相互作用分子 MBD1 や H3K27me ペプチドとの NMR タイトレーション実験を進めており、hPc 上のこれらの分子との相互作用部位から結合様式を明らかにし、相乗的なクロマチン凝集メカニズムの解明を目指している。本発表では hPc の立体構造および相互作用分子とのタイトレーション実験の結果について議論する。

P048

磁気共鳴法を用いたアフリカツメガエル卵母細胞内における
タンパク質の立体構造情報の収集

(¹京都大院・工、²横浜市大院・国際総合、³ブルカー・バイオスピン、

⁴神戸大院・医、⁵首都大院・理工)

○五十嵐 龍治¹、酒井 智美²、原 英之³、天野 剛志⁴、Markus Wälchli³、伊藤 隆⁵、朽
尾 豪人¹、白川 昌宏¹

Structural studies of proteins in *Xenopus laevis* oocytes by using magnetic
resonance spectroscopy

○Ryuji Igarashi¹, Tomomi Sakai², Hideyuki Hara³, Takeshi Tenno⁴, Markus
Wälchli³, Yutaka Ito⁵, Hidehito Tochio¹, Masahiro Shirakawa¹

¹Graduate School of Engineering, Kyoto University, ²International Graduate
School of Arts and Sciences, Yokohama City University, ³Bruker Biospin,
⁴Graduate School of Medicine, University of Kobe, ⁵Graduate School of Sciences
and Engineering, Tokyo Metropolitan University

Previously, we showed that two-dimensional (2D) ¹H-¹⁵N correlation spectra can
be used to detect change in state of proteins inside living *Xenopus laevis* oocytes.
However, in order to obtain detailed information on the protein structure,
measurement of three-dimensional (3D) NMR is required. In this study, 3D triple
resonance experiments were performed by making use of several fast
measurement strategies, which are the Band-selective Excitation Short-
Transient (BEST), NonLinear Sampling (NLS), Maximum Entropy Method
(MEM) and MultiDimensional Decomposition (MDD). Moreover, we report here
that *in-cell* pulsed ESR can be another useful approach to obtaining structural
information on proteins in *Xenopus* oocytes.

【序論】我々は以前、アフリカツメガエル卵母細胞内におけるタンパク質の状態変化を二次
元 ¹H-¹⁵N 相関スペクトルにより検出できることを報告したが(参考文献)、詳細なタンパク質
構造情報を得るには三次元 NMR 測定が必要である。本研究では、BEST (Band-selective
Excitation Short-Transient) 三重共鳴、非線形サンプリング (NLS)、最大エントロピー法を組

Xenopus laevis oocyte, BEST (Band-selective Excitation Short-Transient), 非線形
サンプリング, *in-cell* NMR, パルス ESR

いがらし りゅうじ, さかい ともみ, はら ひでゆき, てんの たけし, まるくす うゑるひり, いと
う ゆたか, とちお ひでひと, しらかわ まさひろ

み合わせた高速測定を、生きた卵母細胞内の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識タンパク質に適用し、三次元 NMR スペクトルの取得を試みた。また、卵母細胞内におけるタンパク質の構造情報を得るための別のアプローチとして、細胞内パルス ESR 法を試みた。ニトロキシルラジカルでスピラベルしたタンパク質のスピ間距離を同細胞内において電子スピン二重共鳴法により決定することに成功したので合わせて報告する。

【実験】使用した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識および無標識のヒトユビキチン変異体は大腸菌にて発現させた。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識ユビキチン変異体は 8.3 mM に濃縮した後、アフリカツメガエル卵母細胞 1 個あたり約 22 nL をマイクロインジェクターで注入し、MBS で 3 回洗浄した後、卵母細胞 220 個を用いて NMR 測定を行った。無標識のユビキチン変異体はシステイン残基を 3-Maleimido-PROXYL でスピン標識し、精製後 5.0 mM に濃縮、約 50 nL を注入し洗浄した卵母細胞 50 個を用いて、80 K 凍結下においてパルス DEER (Double Electron-Electron Resonance) 測定を行った。NMR 測定は Bruker Biospin 社製の 700MHz NMR 装置を用いて行った。パルス ESR 測定は Bruker Biospin 社製の X-band パルス ESR 装置を用いて行った。

【結果と考察】 **[in-cell 3D NMR]** BEST 三重共鳴、非線形サンプリングおよび最大エントロピー法を用いることで、生きた卵母細胞内の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識ユビキチン L8A,I44A,V70A の三次元 HNCO を測定したところ、約六時間の測定で観測されるべき交差ピークの 8 割以上を観測できた。(fig. 1)。現在、HNCA、HN(CO)CA の測定を試みている。また、MEM 法と MDD (MultiDimensional Decomposition) 法の比較についても報告する。

【in-cell DEER】卵母細胞内に存在するスピラベル化ユビキチン S20C, G35C について、*in vitro* の測定と同様の変調を受けたパルス DEER スペクトルが得られた(fig. 2)。得られた DEER スペクトルから 2 つのスピラベル間の距離を求めたところ、*in cell* では 2.98 nm と、*in vitro* での結果 3.15 nm とよく一致する値が得られた。またスピラベル化ユビキチンを注入後に 18°C で 2 時間インキュベーションを行ってから測定をした場合には、ラジカルが細胞内において還元を受けたため DEER シグナルは弱いものの、得られた距離は 3.02 nm とやはり *in vitro* とほぼ一致する値が得られた。本手法により、当該細胞内でのタンパク質構造変化を検出できることが示された。

参考文献 Sakai T. et al. *J Biomol NMR.*, **36**, 179-88 (2006).

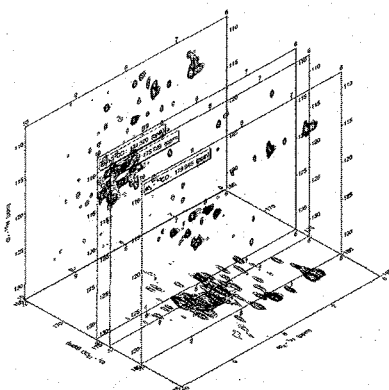


fig.1 Projections of 3D HNCO spectra of a ubiquitin mutant in the cell

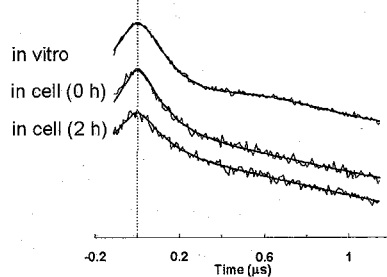


fig.2 In-cell DEER spectra of the spin-labeled (S20C, G35C)-ubiquitin

を用いた難溶性紫外線吸収剤の可溶化メカニズムの解明

(資生堂 リサーチセンター) ○福原 忠雄、勅使河原 喬史、宮原 令二、岡 隆司

Investigation of solubilizing mechanism of sparingly soluble UV absorbers in a Phytosterol surfactant and polyoxyethylene/polyoxypropylene dimethyl ether mixed system

(Shiseido research center) ○ Tadao Fukuhara, Takashi Teshigawara, Reiji Miyahara, Takashi Oka

Phytosterol surfactant containing polyoxyethylene (30 mol) / polyoxypropylene (7 mol) block copolymer (EOPO-PS) is known to solubilize sparingly soluble UV absorbers by forming a micro emulsion. Recently we found that the solubility of UV absorbers and the stability of the micro emulsion were drastically improved by adding polyoxyethylene/polyoxypropylene dimethyl ether (EPDME) to the system. NMR results indicated that EPDME and EOPO-PS formed a complex in the system. Detailed analysis suggested that EPDME was incorporated into the narrow gap between the hydrophobic moieties of the EOPO-PS surfactant and relaxed the tight arrangement for increased solubility of UV absorbers. Excess EPDME was thought to be responsible accounting for improved stability of emulsion by residing around hydrophilic moiety of micelles.

【序】紫外線 (UV) 吸収剤に代表される水難溶性物質は、化粧品製剤では、極性の高い油分に溶解して用いられており、化粧水のように油分が少ない製剤に配合することは困難であった。これらの難溶性物質の多くは、構造内に芳香族環のような平面構造を有しており、極性油中でも結晶化しやすい性質がある。しかし、フィトステロールを疎水基とし、ポリオキシエチレン (30 モル) ポリオキシプロピレン (7 モル) ブロック共重合体を親水基とする界面活性剤 (EOPO-PS) を用いると、活性剤の嵩高い平面構造の疎水基が、難溶性UV吸収剤と良好な親和性を示すため、UV吸収剤を安定に可溶化させることができ、油分の少ない製剤への配合が可能となる。このマイクロエマルションは、疎水基の間に被可溶物を取り込んだ超微細固体が、周囲をポリオキシエチレン鎖に囲まれて凝集が防がれた超微細エマルション様の構造であると推察された。今回、この系に、ポリオキシエチレン (14 モル) ・ポリオキシプロピレン (7 モル) ランダム共重合体ジメチルエーテル (EPDME) を加えると、UV吸収剤の可溶化量が高くなり、その上、超微細エマルションの安定性も高くなる興味深い知見が得られた。そこで、これらのメカニズムを検証するため、NMRにより、自己拡散係数 (D_{sel})、スピン格子緩和時間 (T_1) 測定を行った。

【サンプルおよび実験】難溶性 UV 吸収剤は、2,4-bis-[[4-(2-ethylhexyloxy)-2-hydroxy]-phenyl]-1,3,5-triazine (BEMT) を用いた。NMR 測定用サンプルの組成は Table 1 に示

Table 1. Sample solutions for NMR measurement

Sample	EOPO-PS	EPDME	BEMT	D ₂ O	EOPO-PS / EPDME mol ratio
NM-1	—	0.1g	—	8.4g	—
NM-2	0.4g	—	—	8.1g	1.0 / 0.0
NM-3	0.4g	—	0.1g	8.5g	1.0 / 0.0
NM-4	0.4g	0.1g	0.1g	7.9g	1.0 / 0.5
NM-5	0.4g	0.5g	0.1g	7.5g	1.0 / 2.5
NM-6	0.4g	1.0g	0.1g	7.0g	1.0 / 5.0
NM-7	0.4g	2.0g	0.1g	6.0g	1.0 / 10.0

キーワード：自己拡散係数、緩和時間、可溶化、紫外線吸収剤

ふくはらただお、てしがわらたかし、みやはられいじ、おかたかし

した。 D_{sel} は、JNM ECA-400 を用い、BPP-LED法により、磁場勾配強度を 0.287T/m 、 Δ を 200ms 、 δ を 4ms として測定を行った。 T_1 は、Inversion-recovery法で測定を行った。

【結果と考察】

(1) D_{sel} 測定 Fig.1にNM-1,3,4の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルと帰属を示した。EPDMEの D_{sel} はcの両末端メチル基の信号を用いて算出した。EOPO-PSの D_{sel} は、フィトステリル基由来の信号aがブロードで利用できないため、EPDMEと重なっているbの信号を用い、NMR信号のカーブフィッティングの過程で、EOPO-PSとEPDMEの D_{sel} を別々に見積もることで算出した。EPDME単独のNM-1では、cの D_{sel} が $4.22 \times 10^{-10}\text{m}^2/\text{s}$ であるのに対しbは $4.13 \times 10^{-10}\text{m}^2/\text{s}$ であり、同一分子のため一致していた。

EOPO-PS単独のNM-3では、bは $2.10 \times 10^{-10}\text{m}^2/\text{s}$ であった。EPDMEとEOPO-PSが共存したNM-4では、bの D_{sel} は1成分しか検出されず $2.20 \times 10^{-10}\text{m}^2/\text{s}$ であり、EPDME由来のcの D_{sel} は $2.55 \times 10^{-10}\text{m}^2/\text{s}$ であった。bとcの D_{sel} がほぼ一致し、EOPO-PS単独(NM-3)のbの D_{sel} とも一致したことから、EPDMEとEOPO-PSの運動性は同じである、即ち複合体を形成していることが示唆された。

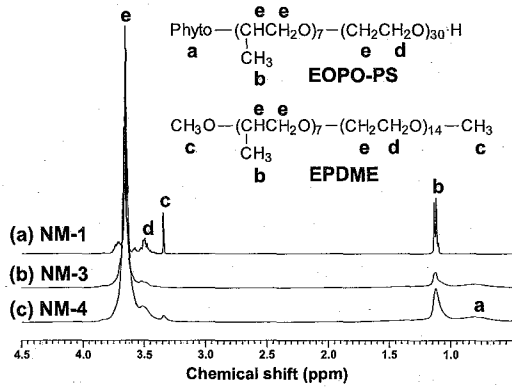


Fig.1 $^1\text{H-NMR}$ spectra of NM-1,3,4

(2) T_1 測定 Fig.2にNM-1~7の T_1 測定結果を示した。ミセル最外部のeの T_1 は、EPDMEの添加量増加に伴いEPDME単独の T_1 に近づいていくだけであり、EPDME添加の効果は認められなかった。ミセルコア部分のaの T_1 は、EPDMEの添加により長くなっていき、2.5倍モル以上の添加(NM-5)でプラトーに達していることから、EPDMEの添加によりコア部分の運動性が高められていき、一定濃度以上でその効果は頭打ちになることが示唆された。ミセルコア直近のbの T_1 についても、EPDMEの添加により長くなっていき、コア部分の運動性を高めている結果が得られたが、5倍モル以上の濃度(NM-6)ではEPDMEが過剰になるため、EPDME単独の T_1 に近づいていく結果となった。

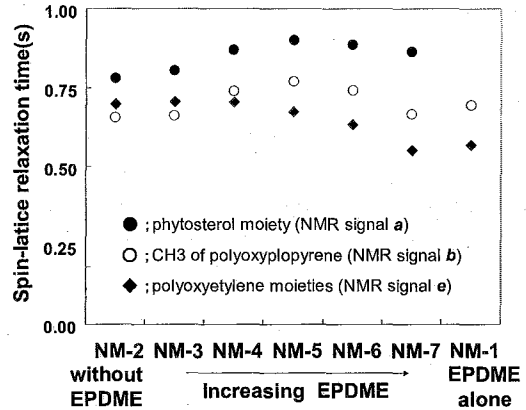


Fig.2 Results of T_1 measurement

(3) EPDME添加効果のメカニズム考察 D_{sel} 測定から、EPDMEはEOPO-PSと複合体を形成していること、 T_1 測定からEPDMEはミセルコアの運動性を高める効果が確認されたことから、EPDMEはEOPO-PSのミセルにコサーファクタントとして作用し、一部がコアおよびその直近に入り込むことにより、EOPO-PS単独では固く閉じられているコア部分の配列を弱め、BEMTの可溶化量を高めていることが示唆された。また、コア部分に作用していない過剰のEPDMEは、ミセルの親水基部分に存在し、超微細エマルションの安定性に寄与しているものと示唆された。

○阿部 孝政¹、久保 均²、原田 雅史²

¹オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社 MRI/Biotoools 事業本部

²徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 画像情報医学分野

Metabolic Study by Solution State DNP-NMR

Takamasa Abe¹, Hitoshi Kubo², Masafumi Harada²

¹MRI/Biotoools Division, Oxford Instruments KK, ²Department of Medical Imaging,
Institute of Health Biosciences Graduate School, The University of Tokushima

Recently, dynamic nuclear polarisation (DNP) has been shown to greatly enhanced signal intensity of NMR nuclei in solution-state NMR spectroscopy. In 2003, Ardenkjaer-Larsen *et al.* developed an automated method to polarise ¹³C nuclei at low temperatures in a strong magnetic field in the presence of a trityl radical then bring the sample to room temperature very quickly to perform solution-state NMR measurements.¹⁾ This method was most practical for long T_1 ¹³C nuclei such as non-protonated carbonyl or carboxyl carbons in rapidly tumbling small molecules, which yielded NMR signal enhancements of 10,000-fold or higher. Therefore, DNP is expected to be useful to metabolic study such as metabolic imaging, metabolic diagnostics and metabonomics. We have been performed to measure some metabolic relevant molecules for these studies. The results will be discussed.

1. はじめに.

NMR および MRI の弱点である感度の問題を、超偏極技術を利用することによって克服する試みが近年活発に行われており、最近では応用研究の報告も増えてきている。超偏極技術には ¹²⁹Xe や ³He などの希ガスをを用いる手法やパラ水素添加法、動的核偏極法 (DNP) などいくつか知られており、それらをシステマティックに行うための装置も開発されてきた。DNP に関しては、2003 年に Ardenkjaer-Larsen らが極低温・強磁場中にて試料と安定なトリチルラジカルを共存させた条件で ¹³C 核を偏極し、その後瞬時にサンプルを室温へ戻して溶液 NMR 測定を行うためのオートメーション化された手法を開発した¹⁾。この手法は、すばやくタンブリングしている低分子化合物におけるカルボニル炭素などのプロトンが結合していない 4 級炭素のように、長い T_1 を持つ ¹³C 核に対しては 1 万倍あるいはそれ以上のシグナル増幅をもたらす。その魅力的なアプリケーションの一つとして、生きた動物で ¹³C 化学シフトイメージングを用いた 1-¹³C ピルビン酸、1-¹³C 乳酸、1-¹³C アラニンのリアルタイム代謝イメージングを Golman らが報告している²⁾。このように DNP の技術を用いることによってこれまで感度不足のために実現が困難であった特定の化合物の代謝をリアルタイムでモニターすることを可能にするだけでなく、微量な成分を数多く含む代謝物の網羅的解析すなわちメタボロミ

Keywords: dynamic nuclear polarization, DNP, DNP-NMR, hyperpolarisation, metabonomics

あべ たかまさ、くぼ ひとし、はらだ まさふみ

クス研究への応用にも役立つものと思われ、代謝研究の発展に大きく貢献していくものと期待される。本研究では生体内の代謝活動をリアルタイムにモニターすることが期待される数種の代謝関連物質を用いて溶液 DNP-NMR 測定を行い、検討を行った。

2. 実験方法

代謝関連物質として、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose, $1\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate, $1\text{-}^{13}\text{C}$ -pyruvate, $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glutamate, $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glycine を選択し、 ^{13}C 核について DNP によるシグナル増強度の評価を行った。それぞれの化合物数百 μg ~数 mg を $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6=1:1$ または $\text{D}_2\text{O}/\text{Glycerol}=3:2$ のガラス化溶媒に溶解し、そこに 15 mM の濃度となるように trityl radical(OX63 または Finland)を添加した。核偏極装置には HyperSense(Oxford Instruments 製)を用い、適量の試料を 1.4 K で 60 分間偏極を行った。偏極した試料を溶解するための溶媒として 4 ml の 0.25 mg/ml EDTA 水溶液を用い、NMR には Bruker DRX600 を用いて 60 度または 90 度パルスにより FID を収集した。また、DNP-NMR スペクトルを取得後、比較のために thermal スペクトルも収集した。

3. 実験結果と考察

シグナル増強が化合物によってどの程度違いがあるのか確かめるため、すべての化合物について ^{13}C DNP-NMR 測定を行った。それぞれについて検討した結果、thermal スペクトルと比較して数 10~数 1000 倍に S/N が増加したスペクトルが得られた。特に $1\text{-}^{13}\text{C}$ -pyruvate は著しいエンハンスが見られたが(Fig.1)、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose に関してはそれほど大きな効果が得られなかった。この差は観測している ^{13}C 核の縦緩和時間 T_1 に強く依存しており、およそ 50 秒と比較的長い緩和時間を持つ pyruvate の 1 位の炭素と比べて glucose の 1 位の炭素は 1~2 秒と非常に短く、測定時には大部分の偏極が失われてしまったためである。

以上の結果から、DNP 後の溶液 NMR 測定におけるシグナル増強は観測核の T_1 値に大きく依存するため、モニターの対象とする化合物にはカルボニル炭素など長い T_1 値を持つ 4 級炭素を持つことが理想であり、今回測定した化合物でグルコースを除くすべての化合物で代謝研究に応用できる可能性が示唆された。現在は代謝のモデル系としてマウスの癌細胞を用い、さらに研究を進めているところである。

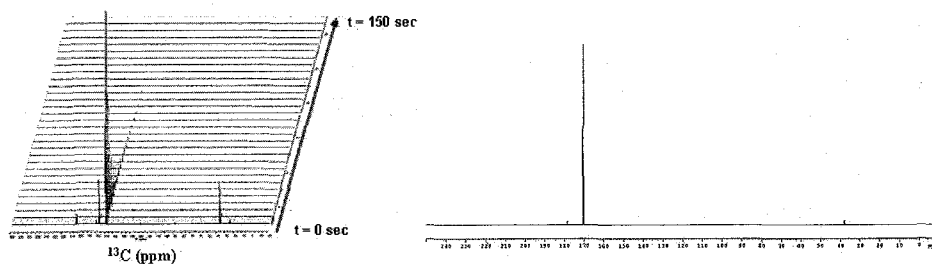


Fig.1 ^{13}C DNP-NMR spectra of $1\text{-}^{13}\text{C}$ -pyruvate

参考文献

- 1) Ardenkjær-Larsen J.H. *et al.*, *PNAS*, 100, 18, 10158-10163 (2003)
- 2) Golman K. *et al.*, *PNAS*, 103, 30, 11270-11275 (2006)

旭化成 (株) 基盤技術研究所 ○名雪三依、橋本康博、吉田和之

**DOSY characterization of Molecular Weight Dependency
of Styrene-Butadiene Copolymer Composition**

ASAHIKASEI CORPORATION, Analysis and Simulation Center

○Mic Nayuki, Yasuhiro Hashimoto, Kazuyuki Yoshida

Molecular weight dependency of the copolymer composition, in spite of its importance for material properties, has not much been characterized because of the redundant procedures of the conventional GPC-NMR or GPC fraction analysis. Alternatively, DOSY method, a more promising and straightforward technique, provides self-diffusion coefficients that should be transformed into the molecular weight distribution. This information, importantly, could be obtained for every species individually. Here, we present a structure characterization of styrene-butadiene synthetic copolymer using a high field gradient unit up to 13 T/m.

【背景・目的】

合成高分子が複数のモノマーの共重合体である場合、そのモノマー組成が高分子の構造を規定するパラメーターとしてよく用いられる。モノマー組成比は一次元の NMR 測定で得られるが、高分子の実際の物性は一次元測定で得られる平均的な組成だけでなく、組成の分子量依存性や分布の違いにより支配される場合が少なくない。

組成の分子量依存性については、従来 GPC-NMR 法などにより解析されてきたが、DOSY (Diffusion-ordered NMR spectroscopy) 法を用い、各成分由来のシグナルごとの自己拡散係数とその分布を求め、それを分子量とその分布に変換して、組成/分子量の相関を評価することも可能である。ただし、合成高分子、特に高分子量体の場合は拡散係数が小さく、通常よく用いられる 1 T/m 以下の磁場勾配ではその評価が難しい。

今回我々は、13 T/m まで印加可能なプローブを用いてスチレン-ブタジエン共重合ポリマーについて拡散係数測定を行い、組成/分子量の解析を行った。この結果について紹介する。

【実験方法】

装置 : JEOL ECA400、核種 : ^1H (400MHz)、温度 : 室温
パルスシーケンス : Stimulated echo 法 (BPP-STE-LED)

【結果と考察】

Figure 1 に分子量の異なる標準ポリスチレンの拡散係数と分子量の相関を示した。両対数プロットにおいてほぼ直線の関係が得られ、この相関を検量線として用いることにより、得られた拡散係数を分子量に換算することができると考えられる。

次に、スチレン-ブタジエン共重合ポリマーについて、DOSY 測定を行った結果を Figure 2 に示した。スチレンユニットの芳香環シグナル (7.0ppm) とブタジエンユニットの二重

DOSY、共重合ポリマー、組成-分子量相関

なゆきみえ、はしもとやすひろ、よしだかずゆき

結合シグナル (5.4ppm) におけるスライスデータを Figure 中に示したが、自己拡散係数とその分布に違いがあることがわかる。

この拡散係数とその分布から、Figure 1 の検量線を用いて分子量換算を行い、GPC 分取した各フラクションの NMR 組成解析 (従来法) の結果と比較した (Figure 3)。

その結果、GPC 分取物の NMR 測定で求めた組成の分子量依存性と DOSY 測定で求めた結果はよく一致しており、DOSY 測定の妥当性が確認できた。

DOSY 測定の結果、今回のスチレン-ブタジエン共重合ポリマーのモノマー組成には分子量依存性があり、高分子成分はスチレンユニットがリッチで、分子量が 100 万程度の成分はスチレンがほぼ 100% あること、一方、数万の低分子量成分はスチレンとブタジエンの比はほぼ同等か、ブタジエンのほうが若干多いことなどが示された。

このように、DOSY 測定を行うことで、高分子の詳細なキャラクター化が可能であることがわかった。DOSY 法では従来法に比べて飛躍的に簡便であるばかりでなく、分取物が濃縮乾固時に変成する心配がないなどの利点がある。

DOSY 法で得られる情報は組成の分子量依存性であり、2 次元 GPC-LC 法で得られるような組成“分布”解析までには至らないものの、GPC-NMR 法のような使い方は可能と考えられ、合成高分子のキャラクター化手法の一つとして有効であると考えられる。

【参考文献】

- 1) C.S.Johnson Jr., *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 34, 203-256 (1999)
- 2) 右手浩一, *高分子*, 51, 824 (2002)
- 3) 右手浩一, *生産と技術*, 59, 26 (2007)

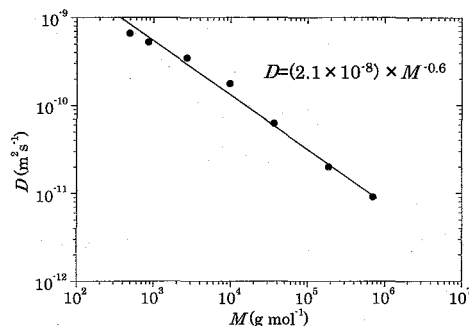


Figure 1 Correlation between molecular weight (M) and self-diffusion coefficient (D) obtained for standard polystyrene.

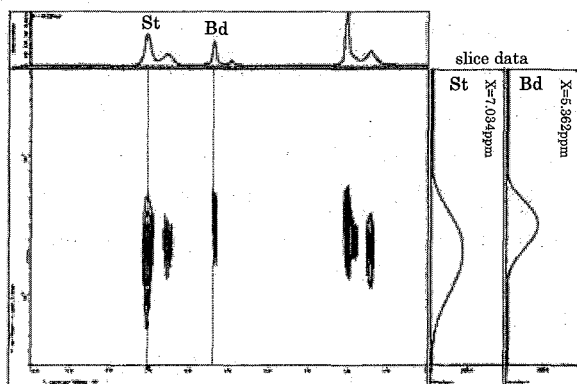


Figure 2 ^1H DOSY spectrum of poly(styrene-co-butadiene). The transformation was performed with CONTIN program. The diffusion measurement parameters were $g=0.2\sim 2.5$ T/m, $\Delta=45$ ms, and $\delta=2.2$ ms.

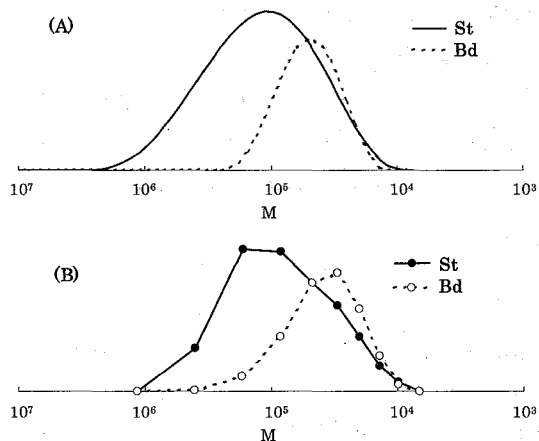


Figure 3 Molecular weight distribution of individual copolymer unit (styrene and butadiene) obtained by (A) DOSY method and (B) GPC fraction analysis with NMR.

LC-NMR における ^1H - ^1H ロングレンジカップリングを利用した微量試料の構造解析例

(株)東レリサーチセンター 生物科学研究部

○中野隆行、木村一雄、川口謙

The application of small amount sample analysis by using ^1H - ^1H long range spin coupling in LC-NMR

Biological Science Laboratories, Toray Research Center, Inc. ○Takayuki Nakano, Kazuo Kimura, Ken Kawaguchi

In the structural analysis by NMR, HMBC is commonly used to connect sub-structures that are bonded through hetero-atom (oxygen, nitrogen). But HMBC measuring is inapplicable for the analysis of very small amount sample (for example, impurities or metabolites of drug substances).

In this research, we tried to detect the long-range correlation through nitrogen atom by using LC-NMR. 15 μg of inosine was analyzed as a model sample. On the long range COSY spectrum, the correlation between proton 8 and 1' was clearly observed.

【序論】

NMR を用いて化合物の分子構造を決定する際、通常、N 原子や O 原子が途中に挟まれた箇所の結合を繋ぐためには HMBC 測定法が用いられる。しかし、医薬品の不純物や代謝物など試料が微量な場合は、感度が悪い HMBC 測定法を用いることが困難になる。

本研究では、LC-NMR を用いて N 原子を含む微量化合物の NMR シグナルを帰属することを試みた。モデル化合物としてイノシンを用い (Fig.1), HMBC 測定法の代わりに ^1H - ^1H ロングレンジカップリングを利用した ^1H - ^1H long range COSY 測定法を用いた。

【実験】

1mg/mL に調製したイノシン重水溶液 15 μL を LC-NMR 付属の HPLC に注入した。HPLC の移動相は重水：重アセトニトリル /9 : 1, 流速 1 mL/min で行った。

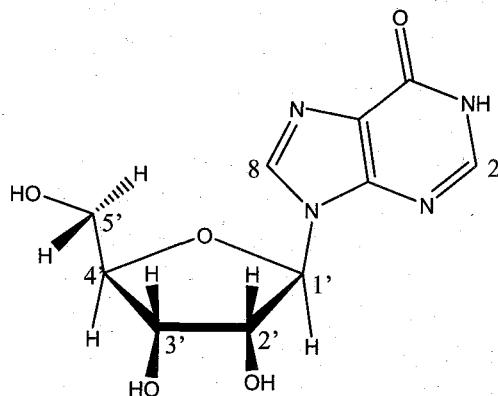


Fig.1 structure of inosine

キーワード：LC-NMR, ^1H - ^1H long range COSY, 微量試料

著者ふりがな：なかのたかゆき, きむらかずお, かわぐちけん

イノシンのクロマトピークが観測されたところで、HPLCの送液を止めて目的成分をNMRプローブ内に閉じ込めた。続いて、 ^1H NMR、 ^1H - ^1H Long range COSY 測定を実施した。溶媒シグナルはWET法により消去した。

【結果】

得られた ^1H NMR スペクトル及び ^1H - ^1H Long range COSY スペクトルを Fig. 2 及び Fig. 3 に示した。帰属を図中に示した。帰属には Fig. 1 に示した炭素番号を用いた。Fig. 3 に示した通り、8位と1'位のプロトン相関が観測された。この様に15 μg の試料量でN原子を介した結合を繋ぐことに成功した。

この方法は、LC-NMR の様な微量成分の構造解析において、 ^1H NMR のみから構造を推定する際に有効な方法であると考えられる。

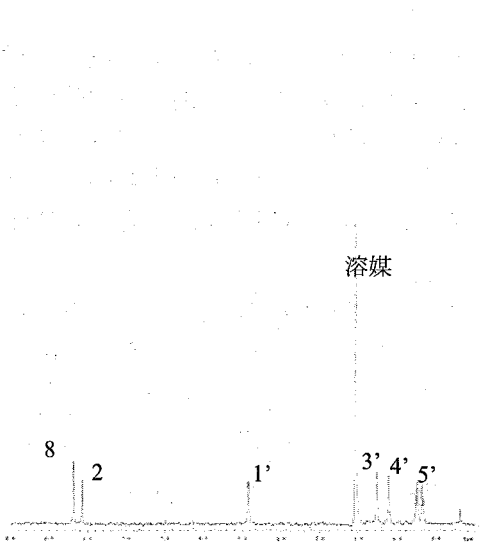


Fig. 2 ^1H NMR spectrum of inosine
(experiment time 1.5 hr, line broadening 5 Hz)

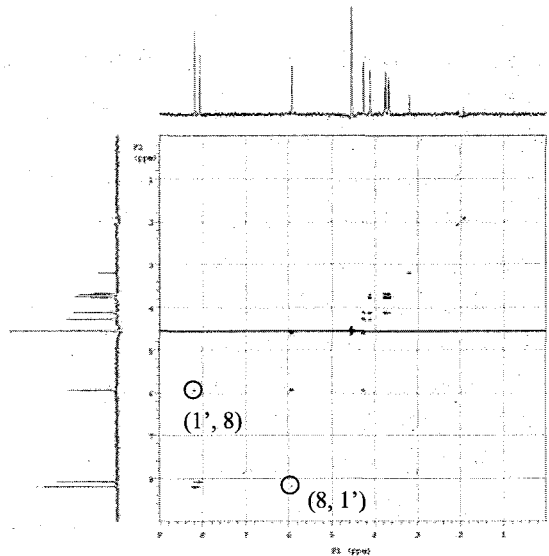


Fig. 3 ^1H - ^1H long range cosy spectrum of inosine
(experiment time 20 hr)

Structural Analysis of Macrocyclic Oligo Oxime Metal Complexes Based on NMR Titration
Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

○Toshio Tadokoro, Shigehisa Akine, Tatsuya Nabeshima

We designed and synthesized acyclic tetraoxime ligand H_4L^1 , which has an allyl group at the 5-position of the terminal benzene rings. Cyclic monomer ligand H_4L^2 and dimer ligand H_8L^3 were prepared by ring-closing metathesis of H_4L^1 and its metal complex, respectively. The 1H NMR titration showed that acyclic ligand H_4L^1 forms homotrimeric complex $[L^1Zn_3]^{2+}$ in a cooperative fashion upon the complexation with zinc(II) acetate. On the other hand, the complexation of cyclic monomer ligand H_4L^2 with zinc(II) acetate gave a mixture of the complexes. Cyclic dimer ligand H_8L^3 forms hexanuclear zinc(II) complex $[L^3Zn_6]^{4+}$ upon the complexation with zinc(II) acetate.

1. 序論

これまでに我々は、2つの N_2O_2 配位サイトを持つ直鎖状テトラオキシム配位子の錯形成能について明らかにしてきた。この配位子は、3当量の酢酸亜鉛(II)と協同的に錯形成してホモ三核錯体を与える。さらに、このホモ三核錯体は、1当量のゲストイオンと 1:1 で錯形成してヘテロ三核錯体となる。本研究では、この骨格の末端ベンゼン環の5位にアリル基を導入した直鎖状テトラオキシム配位子 H_4L^1 及びその金属錯体を合成し、オレフィンメタセシスにより単量体及び二量体の環状配位子(それぞれ H_4L^2 , H_8L^3)へ変換した。これらの直鎖状及び環状配位子の錯形成能を、 1H NMR 滴定法により検討したので報告する。

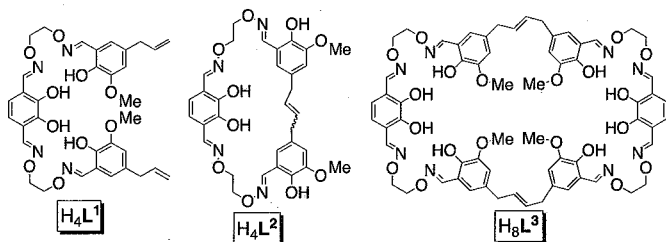


Figure 1. Acyclic, cyclic monomer, and dimer ligands.

2. 実験及び考察

アリル基を導入した直鎖状配位子 H_4L^1 及び環状配位子 H_4L^2 , H_8L^3 の錯形成能を、 1H NMR 滴定により検討した。初めに、直鎖状配位子 H_4L^1 に酢酸亜鉛(II)を添加していくと、新たなシグナルが出現した。3当量で H_4L^1 のシグナル強度は完全に消失し、過剰量の亜鉛(II)を添加してもそれ以上のスペクトル変化がみられないことから、亜鉛(II)ホモ三核錯体 $[L^1Zn_3]^{2+}$ が生成したことがわかった。また、1.5当量の亜鉛(II)存在下で H_4L^1 と $[L^1Zn_3]^{2+}$ のシグナルのみが観測されたことから、この三核錯体の生成が協同的であることがわかる。さらに、この $[L^1Zn_3]^{2+}$ にランタン(III)イオンを添加することで、

閉環メタセシス・オキシム・金属錯体・大環状配位子・NMR 滴定

○たどころ としお・あきね しげひさ・なべしま たつや

ヘテロ三核錯体 $[L^1Zn_2La]^{3+}$ に変換することもできた。

一方、環状の H_4L^2 に酢酸亜鉛(II)を添加していくとブロードニングした複雑なスペクトルとなった。また、ランタン(III)イオンを添加しても、シグナルは複雑なままであった。これは、環状構造に固定したために2つの N_2O_2 キレート部が同時に四座型で配位できなくなり、分子間での錯形成が優先したためだと考えられる。

また、環状二量体 H_8L^3 の場合、6当量の亜鉛(II)を添加すると亜鉛(II)ホモ六核錯体 $[L^3Zn_6]^{4+}$ が生成した。また、3当量の亜鉛(II)存在下では、 H_8L^3 、 $[L^3Zn_6]^{4+}$ とは異なる複数のシグナルが観測されたことから、この六核錯体の生成は協同的ではないことがわかった。この $[L^3Zn_6]^{4+}$ に2当量のランタン(III)イオンを添加することでヘテロ六核錯体に変換できることもわかった。

3. 結論

アリル基を導入した直鎖状オキシム配位子 H_4L^1 および環状の H_4L^2 、 H_8L^3 の錯形成挙動について 1H NMR滴定により明らかにした。直鎖状の H_4L^1 は、協同的にホモ三核錯体 $[L^1Zn_3]^{2+}$ を形成するのに対し、単量体の環状配位子 H_4L^2 は、複数の錯体の混合物となった。一方、二量体の環状配位子 H_8L^3 と亜鉛(II)の錯形成は、協同的ではないことがわかった。

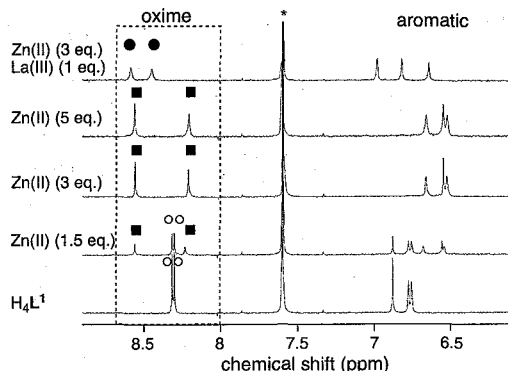


Figure 2. 1H NMR spectroscopic titration for the complexation of $[H_4L^1]$ with $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ and $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ in $CDCl_3/CD_3OD$ (= 1:1). $[H_4L^1] = 1.0 \times 10^{-3}$ M, 400 MHz.

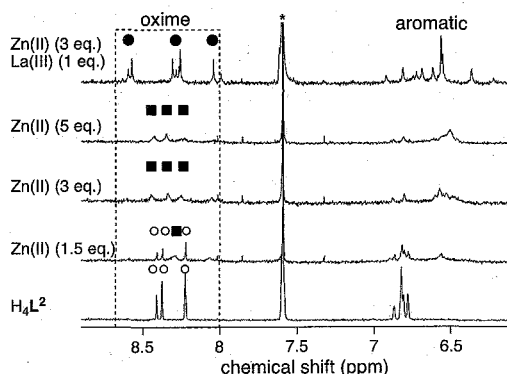


Figure 3. 1H NMR spectroscopic titration for the complexation of $[H_4L^2]$ with $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ and $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ in $CDCl_3/CD_3OD$ (= 1:1). $[H_4L^2] = 1.0 \times 10^{-3}$ M, 400 MHz.

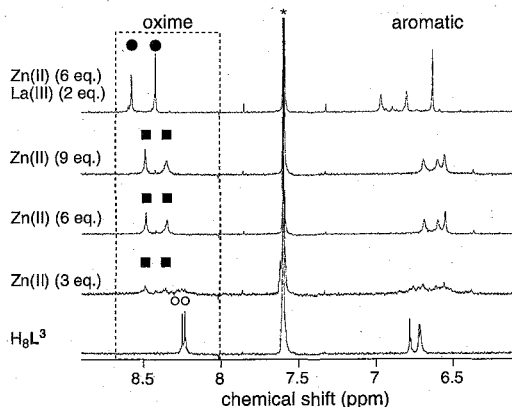


Figure 4. 1H NMR spectroscopic titration for the complexation of $[H_8L^3]$ with $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ and $La(OTf)_3 \cdot H_2O$ in $CDCl_3/CD_3OD$ (= 1:1). $[H_8L^3] = 5.0 \times 10^{-4}$ M, 400 MHz.

QCPMG NMR of spin-1 nuclein in the presence of shift interaction

T. Iijima, K. Nishimura

Institute for Molecular Science

The conventional QCPMG method for spin $I = 1$ nuclei is modified for obtaining a spectrum without distortions in the presence of a shift interaction. Essence of the proposed method is (i) addition of 180° pulses which refocus magnetization dephased by the shift interaction and (ii) irradiation of strong rf field for removing unwanted coherence pathways. The present method is demonstrated with ^2H NMR of paramagnetic $\text{CoSiF}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ where a large paramagnetic shift interaction in addition to a first order quadrupole interaction contribute to the spectrum.

【緒言】

Quadrupole Carr-Purcell-Meiboom-Gill (QCPMG) は、固体の四極子核 NMR において、refocusing pulse を繰り返し照射して逐次エコーを取得することにより、スペクトルの感度を簡便に向上させる方法として、現在広く用いられている。特に半整数スピンの四極子核では、スタティック試料を始め、MAS 下でのスペクトル、MQMAS、更には分子運動がある場合にも有用であることが示されている。また、QCPMG は観測段階で用いる手法であるため、double frequency sweep などと組み合わせ、更なる感度向上も図られている。

一方、整数スピンの $I = 1$ では、四極子エコーを元にした基礎的な QCPMG のパルス列は開発されている。しかしながら、このパルス列は一次の核四極相互作用のみを考慮しているため、その他の大きな相互作用が寄与する場合には有効な手法とはならない。このような問題が生じる例としては、配位高分子の ^2H NMR がある。配位高分子における金属イオンは常磁性であることが多々あり、その場合、 ^2H NMR に対し常磁性シフトの効果を及ぼす。また、別例として ^{14}N では、一般に核四極相互作用が大きい ($\sim \text{MHz}$) ため、その二次のシフトも無視できない大きさになる。

本研究では、このようなシフト項が存在する場合にも $I = 1$ 核で QCPMG により感度向上が行えるようにするための測定法を検討し、実証した。

固体 NMR, QCPMG, 感度向上

いじまたかひろ、にしむらかつゆき

【方法】

$I = 1$ の QCPMG においてシフト項の影響を取り除くための方法としては、(I) コヒーレンス経路を単一に制限する方法、(II) 多量子コヒーレンスを用いる方法、(III) 180° パルスによりシフト補正を行う方法などが考えられるが、このうち (I) 及び (II) の方法は、QCPMG の refocusing パルスの照射の度に感度が減少するため、望ましくない。そのため本研究では (III) のパルス列を採用した。

この (III) のパルス列では 180° パルスが繰り返し照射されるため、特にパルス幅が問題となる。これは、有限のパルス幅は不要なコヒーレンス成分の混入につながるためである。本研究では、サンプル・コイルの小径化により強いラジオ波を照射可能とし、パルス幅の短縮を図った。

【実験】

本法の実証実験を行うため、JEOL 社製 MAS プローブのヘッドを $1\text{ mm}\phi$ コイルのスタティック仕様に改造した。9.4 T の外部磁場の下、Tecmag 社製 APOLLO 分光器を用い、共鳴周波数 61.385 MHz で ^2H の NMR 測定を行った。試料は重水素化した常磁性 $\text{CoSiF}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 結晶を用いた。

【結果と考察】

Fig. 1(a-i) に通常のパルス列で測定した $\text{CoSiF}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の ^2H QCPMG NMR スペクトルを示す。[$\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6$] $^{2+}$ イオンには $\bar{3}$ 対称性が存在し、且つ、室温では H_2O 分子は速い 180° フリップを行っているため、 ^2H のサイトは一つである。また、 ^2H NMR には Co^{2+} イオンの不対電子により生じる Co^{2+} - ^2H の常磁性シフト ($\nu_p = 48\text{ kHz}$) が寄与するためスペクトルは左右対称の線形を示さない。上述した通り、通常 QCPMG のパルス列の設計には一次の核四極相互作用しか考慮されていないため、本試料のような常磁性シフトがある試料には有効とはならず、得られる QCPMG スペクトルは各スパイクの位相が歪んでしまう (Fig. 1(a-i))。Fig. 1(b-i) が本研究で提案した手法で測定した QCPMG スペクトルである。 180° パルスの挿入によりシフト項も refocus され、また、核四極相互作用の大きさ ($C_q = 122\text{ kHz}$) よりも十分に大きな RF 強度 ($\nu_1 = 210\text{ kHz}$) を照射しているため、in-phase の QCPMG スペクトルが得られた。このようなスペクトルは比較的容易にシミュレーションでき (Fig. 1(b-ii))、NMR パラメータを得ることが可能となる。

【謝辞】 本研究は JST CREST 及び科研費補助金の援助のもとに行われたものである。

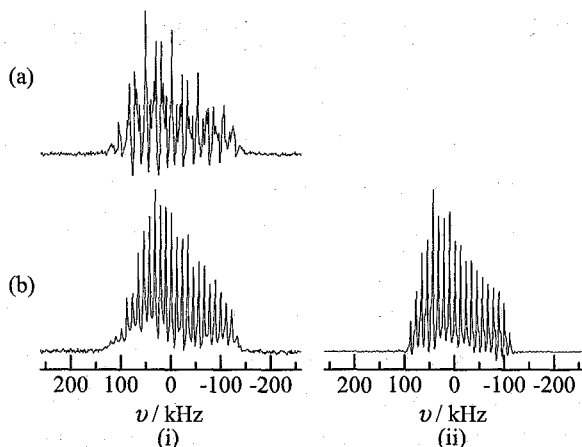


Fig. 1: ^2H QCPMG spectrum of $\text{CoSiF}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ at room temperature. (a) and (b) show the spectra by the conventional and modified pulse sequences, respectively. (i) and (ii) show the measured and simulated spectra, respectively. The rf field used was 210 kHz.

“A simple approach to enhance spectral resolution based 2D constant time correlation spectroscopy in solid.”, Institute for Molecular Science, Katsuyuki Nishimura

In order to enhance a spectral resolution of 2D correlation experiments in solid state NMR spectroscopy, a general scheme enabling doubly magnified evolution of specific internal interaction was developed. The efficacy of this approach was verified by applying it to several conventional techniques. As first example, doubly magnified heteronuclear 2D J-spectroscopy under magic angle spinning (MAS) in solid was developed to enhance separation of multiplet signals due to heteronuclear J-coupling.

<序論> 分子運動により平均化を受けた弱い異方的相互作用、をスペクトルとして正確に測定する方法は少ない。または J-カップリングのような弱い等方的相互作用を固体試料で観測する場合十分な分解能が得られにくい。上記のような問題を解決するには、これらの内部相互作用を擬似的に増幅して観測するアプローチが考えられる。本研究では固定展開時間型の2次元固体相関 NMR の間接軸でこれらの内部相互作用の時間推進を擬似的に2倍に増幅して検出することにより、間接軸の相互作用が示すスペクトルの分解能を2倍に高分解能化する手法を考案した。以下に ^1H - ^{13}C の J 分解スペクトルを MAS 下で観測するための手法を例として示す。

<測定法> Figure 1(a)に MAS 下での一般的な2次元異種核 J 分解分光法のパルスシーケンスを示す。J カップリングの展開期は固定型とする。 ^1H 同種核間磁気双極子相互作用を削除するためにマルチパルス(MP)を試料回転周期に同期して照射する。運動性の高い試料では ^{13}C 化学シフト異方性や ^1H - ^{13}C 異種核間磁気双極子相互作用などの異方的相互作用が十分小さく、MASにより消去することが可能である¹⁾。回転周期毎に異種核双極子デカップリングシーケンスを MP で置き換えていくことにより、 ^1H - ^{13}C J カップリングが時間発展し、この2次元スペクトルは等方化学シフト値を直接軸に、間接軸に ^1H - ^{13}C J カップリングによる多重線を示す2次元異種核 J 分解スペクトルを生じる。一方、Figure 1(b)に示したように、固定展開期に同期したMPを照射し、試料回転周期に同期して、MPを符号が反転したシーケンスで置き換えを行うように時間発展させると、同じ dwell time で2倍の有効時間発展を生じる。

固体 NMR、新規測定法、開発

にしむら かつゆき

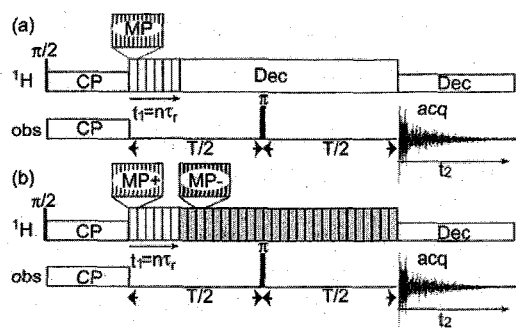


Figure 1 Pulse sequences for (a) conventional constant time ^1H -X heteronuclear J-spectroscopy under MAS, and (b) newly developed 2-fold magnified constant time ^1H -X heteronuclear J-spectroscopy under MAS, respectively.

<実験および結果> 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 プロブを設置して用いた。試料回転速度は 2kHz 程度の低速で行っている。MP には BLEW12^{2,3)}を用いた。Figure 1(a)、(b)の各シーケンスから得られた J 分解スペクトルを Figure 2(a)、(b)に各々示す。2倍増幅時間発展法で測定したスペクトルである。実験では上記のスキーム以外は全て同一の実験変数を用いている。Figure 2(b)のスペクトルに対して、(c)のスペクトルでは、 ^1H - ^{13}C J カップリングによる多重線が2倍になっていることが分かる。また線幅はほぼ同一で変化がないため、スペクトルの分解能は2倍に改善されたことになる。

<結論> 上記のように本研究で開発したアプローチは弱い相互作用をスペクトル線形から解析するような測定で有効である。本アプローチは MAS 下では試料回転速度には依存しないため、高速回転下でも適用可能であり、その場合はより近代的な高効率リカップリングシーケンスを同様に適用できる。同様なアプローチを異種核間磁気双極子相互作用にも適用可能である。発表では、その適用例についても報告する。

<参考文献>

- 1) T. Terao, H. Miura and A. Saika, *J. Chem. Phys.*, **75**, 1573-1574 (1981)
- 2) D. P. Burum M. Linder and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **44** 173-188 (1981).
- 3) T. Fujiwara, T. Shimomura, and H. Akutsu, *J. Magn. Reson.* **124**, 147-153 (1997)

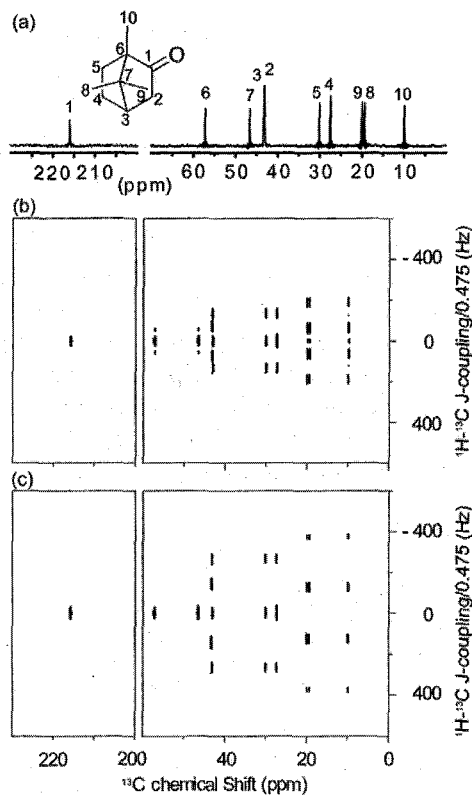


Figure 2 (a) CP-MAS spectrum for Camphor with signal assignments. ^1H - ^{13}C heteronuclear J-spectra for Camphor under MAS obtained from the sequences (b) conventional, and (c) newly developed shown in Figure 1, respectively.

High / Low Power RF with Ultra Fast Sample Spinning.
Jun Ashida (Varian Technologies Japan Ltd.)

Small rotor is very effective for solid state NMR to obtain high resolution spectra because of not only the capability of fast sample spinning at magic angle but also the ability of strong RF pulse irradiation. For crystallized sample, such as pharmaceutical compounds, 200kHz proton CW decoupling is still not enough to completely decouple ^1H - ^{13}C heteronuclear dipolar interaction. However, recently it was investigated that low power decoupling is much more efficient than high power decoupling at >50kHz sample spinning. In this presentation, some applications of strong and weak RF pulse under ultra fast sample spinning using 1.2mm ϕ UltraFast MASTM probe are shown.

【緒言】

固体試料と溶液試料の違いは運動性である。固体 NMR が溶液 NMR と比較して一般的に低分解能なのは、試料の運動性が低いので異方的な相互作用が平均化されずスペクトルにそのまま反映されるためである。従って、固体高分解能 NMR スペクトルを得るためには、双極子相互作用や化学シフト相互作用の異方性成分を小さくすることが要求される。

高出力 ^1H decoupling は、 ^1H -X 異種核間双極子相互作用を平均化するための手法として有機試料において広く使われており、マジック角試料回転(MAS)と併用されることが多い。特に結晶化度の高い薬剤試料などの固体 ^{13}C NMR 測定では、 ^{13}C - ^1H 間双極子相互作用を切るためには、通常 200kHz 以上もの非常に強い ^1H decoupling 強度を必要とする。しかし一般的に普及している 3mm 程度の径のローターを用いると 150kHz 程度が限界であり、まだまだ十分とはいえない。

近年、直径 1~2mm と今までよりも小さな試料管を用いて、さらなる高速回転を行うプローブが開発されている[1-3]。このような微小ローターの利点は、50kHz 以上もの超高速回転が可能だけでなく、サンプルコイルの径が小さいのでより強いパルスをより小さな電力で照射することである。超高速 MAS 下での ^{13}C NMR 測定では逆に、むしろ弱い ^1H decoupling の方が有効な場合もあるという報告もなされている[4,5]。

本発表では、1.2mm ϕ のローターを用いて、さまざまな RF 強度でのスペクトルの振る舞いを調べた。このプローブでは試料の入ったローターを 60kHz で回転させ、 ^1H decoupling は 278kHz を照射することが可能である。

【実験】

実験は Varian NMR System 600MHz と 1.2mm ϕ T3 HXY Ultra Fast MAS プローブを用いた。

固体 NMR 高速試料回転

あしだ じゅん

【結果と考察】

アダマンタンを用いた ^1H と ^{13}C のパルス幅調整の結果を図1に示す。 ^1H 側が100Wの入力で450kHz、 ^{13}C 側が180Wの入力で320kHzのRFパルスを照射することができた。また、わずか38Wの入力でプローブスペックの278kHzもの ^1H decouplingを照射することが可能である。

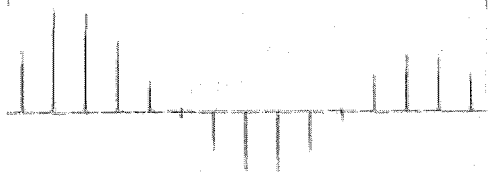


Fig.1(a) ^1H pulse nutation of adamantane from 0.2us to 3.0us (left to right) at 100W.

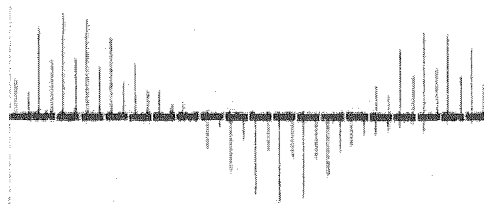


Fig.1(b) ^{13}C pulse nutation of adamantane from 0.2us to 4.0us (left to right) at 180W.

次に、超高速MAS下における ^1H decoupling強度と ^{13}C スペクトルの分解能の相関を調べた。図2に試料回転速度60kHzにおけるCWおよびXiX ^1H decoupling強度とグリシンのメチン炭素のピーク強度の相関図を示す。ピークの積分値は一定なので、ピーク強度が大きいほど線幅が細いことを示している。CW decouplingでは278kHzの非常に強いRFを照射するよりも、むしろ30kHz程度(約500mWの出力)の弱いRFを照射する方が分解能が高いことがわかる。またXiX decouplingでは中程度の強度のRFで、CW decouplingでの最高値よりもさらに高分解能になることがわかる。

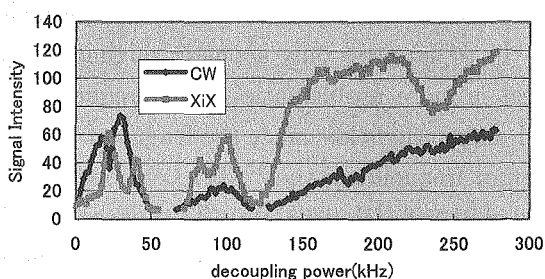


Fig.2 ^1H decoupling field dependence of ^{13}C CPMAS signal Intensity for Glycine CH_2 carbon

当日のポスターでは、運動性の高いエラストマー試料への応用や、TPPM[6]やXiX[7,8]などの変調 decoupling を用いた場合とのより詳細な比較も行う予定である。

【参考文献】

1. A. A. Palmer, M. Cormos, C. E. Bronnimann, and S. Hafner, 47th ENC, Pacific Grove (2006)
2. A. Samoson, T. Tuherm, J. Past, A. Reinhold, T. Anupöld, and I. Heinmaa, *Topics in Current Chemistry*, **246**, 15-31 (2004)
3. K. Yamauchi, and T. Asakura, *Chem. Lett.*, **35**, 426-427 (2006)
4. M. Ernst, A. Samoson, and B. H. Meier, *Chem. Phys. Lett.*, **348**, 293-302 (2001)
5. M. Kotecha, N. P. Wickramasinghe, and Y. Ishii, *Magn. Reson. Chem.*, **45**, S221-230 (2007)
6. A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, and R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.*, **103**, 6951-6958 (1995)
7. A. Detken, E. H. Hardy, M. Ernst, and B. H. Meier, *Chem. Phys. Lett.*, **356**, 298-304 (2002)
8. J. Ashida, and T. Asakura, *J. Magn. Reson.*, **165**, 180-183 (2003)

Suppression of ringing using multiple pulse

○ Ryutaro Ohashi,¹ Toshihito Nakai,² and Tadashi Shimizu¹

1. National Institute for Materials Science, 2. JEOL Ltd.

NMR spectroscopy of quadrupolar nuclear spins is one of useful methods to obtain structural information of molecules. In quadrupolar NMR spectroscopy, however, it may be a serious problem that ringing signals from NMR probes mix and overlap with a large part of NMR signals, usually short because of fast quadrupolar relaxation. Ringing effects are classified into acoustic ringing and piezoelectric ringing, and specifically in this work we try to suppress only acoustic ringing (we will call just "ringing" below). The ringing effect is more problematic in low-frequency NMR, such as ^{47,49}Ti observations even at high magnetic fields, since the length of the ringing signal is inversely proportional to the Larmor frequencies; the ^{47,49}Ti Larmor frequency is 52.4 MHz at an ultra high magnetic field of 21.8 T (¹H: 930MHz). To suppress the ringing effect, several methods are developed [1, 2]. Patt *et al.* [2] proposed that longitudinal magnetizations be stored along +Z or -Z axis before a $\pi/2$ pulse for excitation in RIDE (RING Down Elimination) techniques [1, 3]; the $\pi/2$ pulse along +Y axis, for example, produces magnetizations along -X or +X axis, not changing the phase of ringing, so that the ringing effects can be canceled with alternating receiver phases while the NMR signals are accumulated. However, in the case of quadrupolar nuclei, we cannot set an exact π pulse because of quadrupolar interactions (Figure 1). As a result, the signal in even number of scans using π and $\pi/2$ pulses becomes much weaker than that in odd number of scans using only a $\pi/2$ pulse. To circumvent this inefficiency in the RIDE experiments for quadrupolar nuclei, we set quite short a relaxation delay before even number of scans as Figure 2 (b), giving up collecting NMR signals and obtaining only background signals. The resultant S/N of the bottom spectrum in Figure 2 (a) is larger than that of the center spectrum; the ratio of S/N for bottom/center is about 1.4.

[1] Shanmin Zhang, Xiaoling Wu, and Michael Mehring, Chem. Phys. Lett. **173**, 481 (1990).

[2] Steven L. Patt, J. Magn. Reson. **49**, 161 (1990).

[3] J. P. Kintzinger, NMR-Basic Principles and Progress, **17**, 1 (1981).

Key words: Solid state NMR, Ringing, Quadrupolar nuclear

著者ふりがな： おおはし りゅうたろう、なかい としひと、しみず ただし

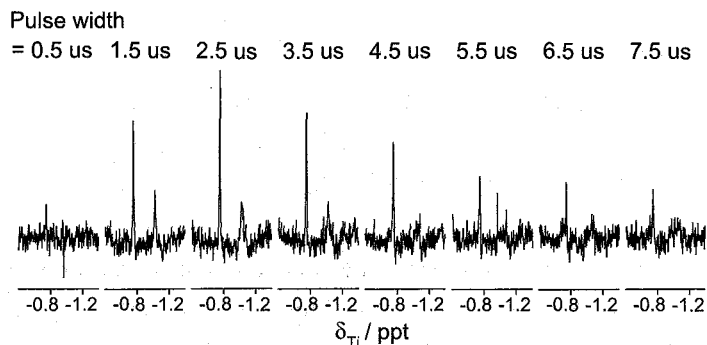


Figure 1: Pulse-width dependence of single pulse experiments for BaTiO₃. We set pulse-width as 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 μ s. As shown in these spectra, we cannot irradiate exact 180 and 270 pulses for ^{47,49}Ti in BaTiO₃.

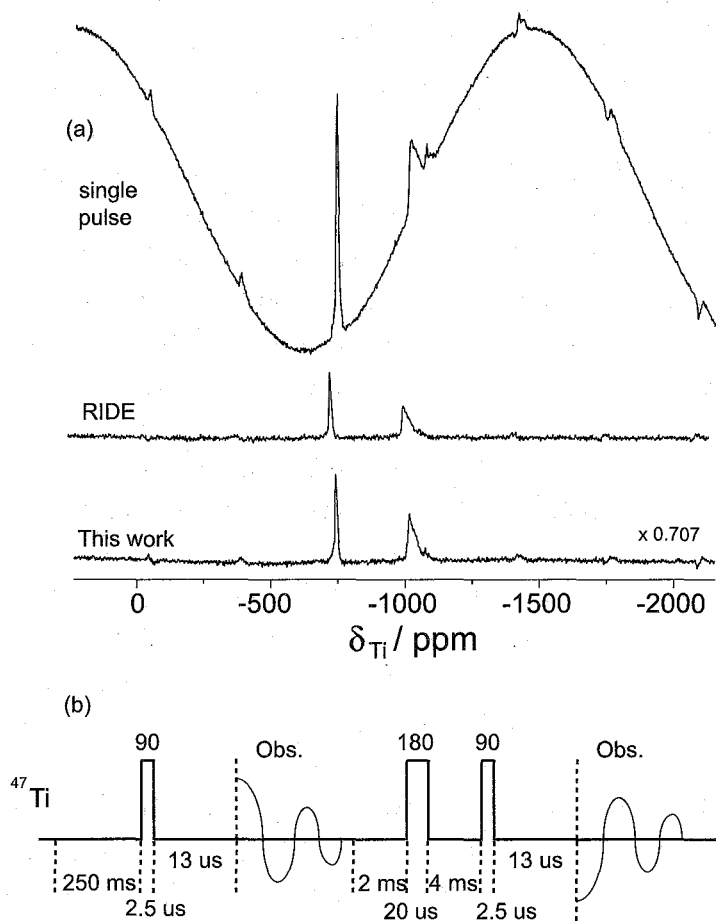


Figure 2: (a) ^{47,49}Ti NMR spectra of BaTiO₃, using single pulse sequence (top), RIDE [1] sequence (center), the pulse sequence in (b) (bottom). All spectra are scaled as amplitudes of noise are almost same. (b) The pulse sequence of this work. Repeating time is changed from conventional RIDE technique. Repeating time before odd number of scans is 250 ms, while repeating time before even number of scans is 2 ms. The S/N ratio of this work is about 1.4 times of that of RIDE experiments.

P058 固体 NMR によるバクテリオロドプシンのレチナール異性化に
依存した Tyr 残基の動的構造変化の解析

(1 横浜国立大、2 兵庫県立大)

○川村 出¹、田辺 純子¹、西尾 拓道¹、辻 暁²、内藤 晶¹

**Dynamic structure of Tyr residues in bacteriorhodopsin corresponding to retinal
configurations as studied by solid-state NMR**

○ Izuru Kawamura¹, Junko Tanabe¹, Takudo Nishio¹,
Satoru Tuzi², Akira Naito¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University,

²Department of Life Science, University of Hyogo

Bacteriorhodopsin (bR) from purple membrane (PM) of *H. salinarum* cells is a retinal-binding membrane protein which functions as a light-driven proton pump. It is important to understand how retinal configurations activate protein in view of retinal-protein interactions. Therefore, we investigate dynamic structure of bacteriorhodopsin (bR) corresponding to retinal configurations. Carbonyl carbon signals of Tyr26, 57, 64, 79, 133, 150 and 185 in bR were uniquely observed by REDOR technique in solid state NMR at 293K. In particular, two ¹³C NMR peaks were observed for REDOR-filtered spectra of Tyr57, 79, 133 and 185 in the dark, respectively. Our results indicate that protein local conformations and dynamics with the change of hydrogen bond network between retinal binding site and extracellular surface are different from the state of two retinal configurations in the dark.

【緒言】バクテリオロドプシン(bR)は高度好塩菌 *H. salinarum* の紫膜中で2次元的に配列した膜タンパク質であり、レチナールの光異性化によって細胞外へプロトンを輸送する。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 の割合で存在し、光や圧力でその割合を変化させることができる。当研究室では bR 中の Tyr をプローブとして、REDOR 法を用い、レチナールの配座に対応する局所構造解析を行ってきた。本研究では、さらに他の Tyr について REDOR を用いた観測を行い、温度変化を行った測定などとあわせて、レチナールの All-trans 型と 13-cis, 15-syn 型に対応したタンパク質の動的な構造について検討した。

【実験】[1-¹³C]Tyr, [¹⁵N]X-bR (X= Leu, Pro, Val, Arg, Phe, Gly or Trp) の二重標識試料をそれぞれ調製した。¹³C-¹⁵N 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回転エコー二重共鳴法 REDOR を適用して、蛋白質内で ¹³C-¹⁵N

固体 NMR、REDOR Filter、レチナール、ダイナミクス、膜タンパク質

かわむら いずる、たなべ じゅんこ、にしお たくど、つじ さとる、ないとう あきら

が直接結合で結ばれることで、強い磁気双極子相互作用を有する Tyr の ^{13}C NMR 信号を選択して観測した (REDOR Filter¹)。測定は Chemagnetics CMX Infinity-400 FT-NMR 分光器、三重共鳴プローブを用いて、MAS 4 kHz、測定温度 20°C、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}C - ^{15}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。またレチナールをブリーチした $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$ 標識バクテリオオプシン(bO)や3-40°Cの温度範囲でbRの ^{13}C CP-MAS測定を行い、レチナールが結合していない状態や温度に対する Tyr の信号変化を観測した。

【結果と考察】 これまでに REDOR Filter によって、Tyr57, 79, 185 に関しては暗順応状態 bR で 2 種類存在するレチナールに対応した 2 つのコンフォメーションをもつことを明らかにしている^{1,2}。今回さらに Tyr133 についても 173.8 ppm(13-*cis*, 15-*syn* 型)と 176.1 ppm (All-*trans* 型)に信号を観測し、レチナール異性化に依存する残基であることが判明した。REDOR を用いた Tyr に関する結果から、Tyr57, 79, 133, 185 の ^{13}C 化学シフト差が大きい 2 つの信号は、レチナールが All-*trans* 型と 13-*cis*, 15-*syn* 型でタンパク質の構造がかなり異なることを示している。これによって CP-MAS で観測される 174.0 (13-*cis*, 15-*syn* 型)と 176.0 ppm(All-*trans* 型)の 2 つの主要な信号は、レチナールの配座に依存した Tyr の信号と考えることができる (Figure 1 (A))。さらにレチナールを除去したオプシン bO の ^{13}C CP-MAS

NMR スペクトル(Figure 1 (B))においては、これらの信号が大きく減少することからも、Tyr の信号はレチナールに強く依存していることがわかった³。また Tyr57, 79, 133, 185 などば BR のレチナール結合部位から細胞外側の間で発達している水素結合ネットワークに関係し、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主鎖のコンフォメーションにまで影響を及ぼしていることが示唆された。

これらの帰属をもとに、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$ -bR の温度変化や緩和時間測定を行ったデータから、レチナールの配座に依存したタンパク質のダイナミクスについて考察を行う予定である。

【参考文献】

1. I. Kawamura et al. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129** 1016-1017.
2. 第 46 回 NMR 討論会講演要旨集、(2007) 札幌、**3L1** 54-57.
3. I. Kawamura et al. (2007) *Biochim. Biophys. Acta.* **1768** 3090-3097.

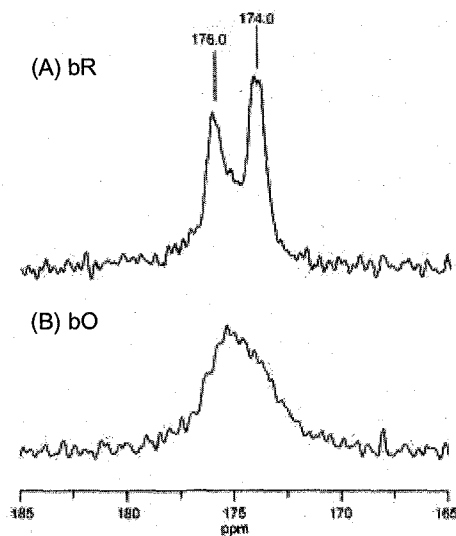


Figure 1. ^{13}C CP-MAS NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$ -bR (A) and $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$ -bO.³

固体 NMR による阻害剤および脂質膜存在下での
アミロイド線維形成阻害機構の解明

(横浜国大院工¹、東北大多元研²)

○内藤 晶¹、伊藤ひかり¹、山根衣寿美¹、阿部友樹¹、川村出¹、上平美弥²

Amyloid fibrillation mechanism in the presence of inhibitor and lipid bilayers as revealed by solid-state NMR spectroscopy

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, ²Institute of Multidisciplinary Research, Tohoku University

Akira Naito¹, Hikari Itoh¹, Izumi Yamane¹, Tomoki Abe¹, Izuru Kawamura¹ and Miya Kamihira²

Human calcitonin(hCT) is known as an amyloid forming peptide by taking two step reaction mechanism such as homogeneous association to form nucleus (k_1) and autocatalytic elongation of the fibrils (k_2). In this study, three types of fibril inhibition mechanisms for hCT were investigated. First, F16L and F19L-hCTs were prepared and the fibrillation kinetics were examined. It turned out that the k_2 was significantly reduced in this mutants.. Second, charged amino acid such as Asp can also inhibit the fibril formation of hCT. In this case, k_1 was significantly reduced, while k_2 was not reduced. Third, polyphenol compound crucmin completely inhibited the fibril formation. We have also examined the inhibition of fibril formation of glucagon in the presence of lipid bilayers. In this case k_2 was decreased, while k_1 was increased, indicating that lipids were affected to form amyloid fibril.

【序論】 ヒトカルシトニン(hCT)はすい臓で分泌され、カルシウムの代謝調節に関わるペプチドホルモンである。hCT は水溶液中で容易にアミロイド線維を形成することが知られており、甲状腺で骨髄腫を誘発することが知られている。hCT の線維形成についてはこれまで固体 NMR を用いてその線維形成機構について研究した結果、hCT は核形成過程と線維成長過程の2段階自己触媒反応機構で線維化することが明らかになった^{1,4}。さらに、hCT の中央部では α -helix 構造が β -sheet 構造に転移することが分かった。グルカゴンはすい臓で分泌されるペプチドホルモンであり、肝臓でグリコーゲンの分解を促進して、血糖値を上昇させる作用をもつ。グルカゴンは酸性水溶液によく溶解し、アミロイド様線維形成をすることが知られている。このグルカゴンの線維も β -sheet 構造を多く含み、細胞毒性をもつことが知られている。

キーワード：固体 NMR、アミロイド線維、アミロイド線維阻害、アミロイド線維形成速度、脂質膜

ないとう あきら、いとう ひかり、やまね いずみ、あべ ともき、かわむら いずる、かみひら みや

本研究では、hCT の線維形成阻害機構を解明する目的で、変異体形成による線維化阻害と添加剤による線維化阻害について反応速度解析から線維化阻害機構の解明を試みた。さらに、生体内での線維形成機構を解明するため、リン脂質二重膜存在下での線維形成機構についても固体 NMR を用いて明らかにする試みを行った。

【実験方法】 ^{13}C 同位体標識したヒトカルシトニンとグルカゴンは固相法によりペプチド合成機を用いて調製した。合成したヒトカルシトニンは脱保護、空気酸化後、逆相 HPLC により精製した。精製したヒトカルシトニンは 20mM リン酸緩衝液 (pH7.4) および 15mM 酢酸水溶液 (pH3.3) に溶解して、線維形成の経時変化を測定した。グルカゴンについてはカルシトニンと同様に合成および精製を行った。精製試料は酢酸水溶液に溶かし、さらに DHPC:DMPC=1:3 モル比で生成したバイセル膜をグルカゴンに対して 5 倍モル量添加してから線維形成の経時変化を測定した。

固体 NMR 測定はモノマーに対しては 90 度励起パルスに引き続いて高出力デカップリングパルス下で信号検出をする DD-MAS 法を用いて測定した。線維に関しては CP-MAS 法を用いて測定した。測定では DD-MAS と CP-MAS の実験を交互に変化させて同じ試料についてモノマーと線維の信号を分離して測定を行った。

【結果と考察】

ヒトカルシトニン変異体の線維形成の経時変化

Fig. 1 にヒトカルシトニン変異体 (F19L-hCT) の線維成長の経時変化を示している。この線維成長の強度変化をプロットしたところ、一定の遅延時間の後に線維が成長していく様子が観測された。この結果、カルシトニン変異体の線維形成機構は 2 段階自己触媒反応として解析できることが判明した。この反応機構で速度定数を解析した結果、核形成速度定数 (k_1) および線維成長 (k_2) 速度定数を決定して

Table 1 にまとめた。この値を WT-hCT と比較したところ、核形成速度 k_1 はあまり変化しなかったのに対して、線維成長速度 k_2 は格段に遅くなることが判明した。以前の研究からヒトカルシトニンは逆平行 β -sheet 構造を形成することを明らかにした³。この結果、F16 と F19 のフェニルアラニンの芳香環が π - π 相互

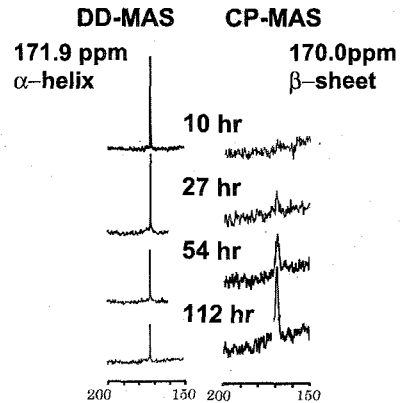


Fig.1. ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{10}\text{-F19L-hCT}$ in the time course of fibril formation.

Table 1. Kinetics parameters for fibril formation of WT-hCT, F19L-hCT and F16L-hCT

	pH 7.4		pH3.3	
	k_1 (s^{-1})	k_2 ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	k_1 (s^{-1})	k_2 ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
WT-hCT	2.79×10^{-6}	2.29	3.28×10^{-6}	2.04×10^{-3}
F19L-hCT	7.41×10^{-9}	2.90×10^{-2}	1.27×10^{-6}	1.58×10^{-3}
F16L-hCT	1.52×10^{-6}	1.03×10^{-2}	1.85×10^{-6}	6.14×10^{-4}

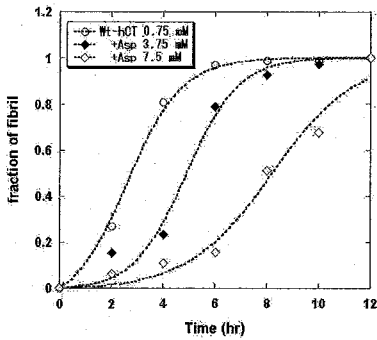


Fig. 2. Time course of fibril formation of hCT in addition of Asp

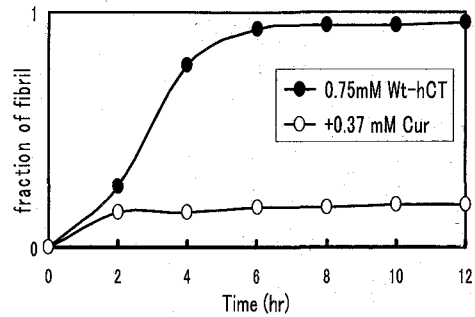


Fig. 4. Time course of fibril formation of hCT in addition of curcumin

作用により線維形成を安定化することを明らかにしたが、線維成長が遅くなったことから芳香環の相互作用の存在を支持する結果となった。

阻害剤によるヒトカルシトニンの線維形成阻害機構

Fig. 2にヒトカルシトニンに電荷をもつアミノ酸Aspを添加したときの線維形成の経時変化を示す。2段階自己触媒反応速度解析から核形成速度定数と線維成長速度定数を決定しTable 2にまとめた。この結果、Aspの濃度を高くすると核形成速度が遅くなり、線維成長速度定数はほぼ一定であることが観測された。この結果は、

Table 2. Kinetics parameters for hCT in the presence of Asp

	k_1 (s^{-1})	k_2 ($s^{-1}M^{-1}$)
Asp 0 mM	$2.33(\pm 0.90) \times 10^{-5}$	$0.300(\pm 0.042)$
Asp 3.75 mM	$2.17(\pm 2.09) \times 10^{-6}$	$0.363(\pm 0.70)$
Asp 7.50 mM	$1.08(\pm 0.99) \times 10^{-6}$	$0.227(\pm 0.041)$

電荷を持つアミノ酸はヒトカルシトニンと溶液中で弱い相互作用をもち、ヒトカルシトニン同士が会合するのを阻害するため、核形成速度が遅くなったと考察した。一方、阻害剤としてポリフェノールのクルクミンを添加した場合、カルシトニンに対して0.5モル量を添加しただけでも、線維形成はほとんど起こらなかった(Fig. 4)。この結果からクルクミンがヒトカルシトニンと強い相互作用で結合してカルシトニン同士の会合が抑制されるため、線維形成が強く阻害されたものと考察した。

脂質膜存在下でのグルカゴンの線維形成機構

Fig. 5にグルカゴンにバイセル膜を添加した場合の線維形成の ^{13}C NMRスペクトルを示している。グルカゴンは水溶液中で線維形成するとN-末端部位とC-末端部は α -helixから β -sheetに転移することが観測された。それに対して、グルカゴン水溶液にバイセル膜を添加すると、C-末端は β -sheetが形成するのに対しN-末端は α -helixのまま β -sheetが形成されないことが判明した(Fig. 6B,C)。さらに線維形成

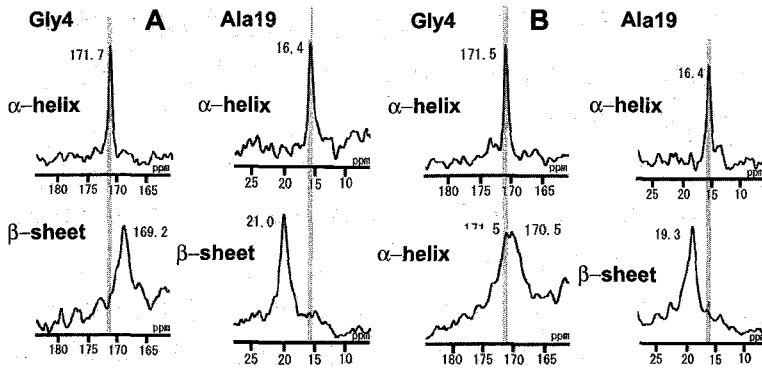


Fig. 5. ^{13}C NMR spectra of monomer(top) and fibril(bottom) of hCT. A: in the absence of lipids. B: in the presence of lipids.

た。グルカゴンは膜に対して親和性の高いことが分かっているので、膜に結合したグルカゴンは膜表面で濃縮される。このため、グルカゴン同士が会合を起こしやすくなるために k_1 は速くなると考察できる。それに対して、線維にモノマーが結合することで、線維成長が起こると考えられるが、グルカゴンの場合、膜存在下の線維は膜がない場合に比べて N-末端が β -sheet になっていないため線維の安定性は膜存在下の線維の方が低いと考えることができる。このため、線維成長の速度は膜存在下の方が遅くなったと考察できる。

の経時変化をプロットしたグラフを Fig. 6A に示す。この結果から、 k_1, k_2 を決定して Table3 にまとめた。膜が存在しない場合と存在する場合を比較すると、 k_1 は膜が存在すると速くなるのに対し、 k_2 は膜が存在すると遅くなるのが判明した。

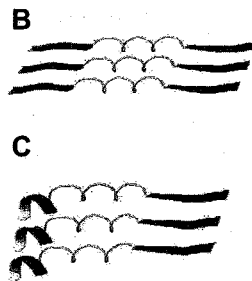
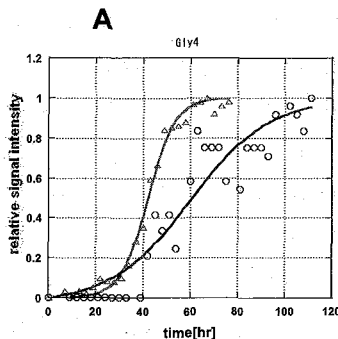


Fig.6. A: Time course of fibril formation of hCT in the presence () and absence (Δ) of bicelles. B: Fibril structure of glucagons. C: Fibril structure of glucagons in the presence of bicelles.

Table 3. Kinetics parameters for glucagons in the absence and presence of lipids

	k_1 (s^{-1})	k_2 ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
Glucagon	3.34×10^{-8}	1.70×10^{-2}
Glucagon + Bicelle	1.24×10^{-5}	3.98×10^{-5}

【文献】

1. M. Kamihira et al. Protein Sci. 9 (2000) 867-877.
2. M. Kamihira et al. J. Biol. Chem. 278, (2003) 2859-2865.
3. A. Naito et al. Magn. Reson. Chem. 42 (2004) 247-257.
4. A. Naito et al. Biochim. Biophys. Acta, 1768 (2007) 3145-3161.

Membrane-bound complex of amphotericin B and sterol examined by
solid-state NMRNobuaki, Matsumori, Yuichi Umekawa, Naohiro Matsushita, Kazuaki
Tahara, Hiroshi Tsuchikawa, Hiroko Yamamoto, Tohru Oishi, Michio Murata
Graduate School of Science, Osaka University

To examine the interaction between AmBs in the presence and absence of ergosterol, REDOR (RDX) experiments were carried out using ^{19}F - and ^{13}C -labeled AmB. The interatomic distance among AmB molecules depended on ergosterol contents in membrane, indicating that ergosterol makes AmB assemblies more flexible, which possibly correspond to ion channels.

ある種の抗生物質は脂質二重膜中で自己組織化してイオン透過性チャネルを形成するが、これらチャネル複合体の構造はほとんど解明されていない。本研究で着目したアンフォテリシンB (AmB) は放線菌が生産する抗生物質で、発見以来 50 年を経た現在でも抗真菌剤としての地位を保っている。その生理活性は真菌類の細胞膜中で特異的に形成されるイオン透過性チャネル会合体に由来する。また、選択毒性はAmBが哺乳類のコレステロールよりも真菌の膜含有エルゴステロールに対して強い親和性を持つことに起因する。このチャネル会合体として、1970年代にAmB分子が円形に並んだ樽板モデルが提唱されて以来¹⁾、スペクトル測定、分子動力学計算をはじめ実に多くの研究がなされてきたが、いまだに自己会合体の詳細な構造は不明である。本研究では、AmBの自己会合体の精密構造解明を目指して、脂質膜系の測定に有効である固体NMRの適用を試みた。このためには、標識体を調製する必要があり、なかでも位置特異的な同位体標識が必要である。まず、ステロールとの分子認識に重要であると考えられる極性部分およびヘプタエン部分を、それぞれ ^{19}F で標識したAmB²⁾誘導体を調製し、REDORの変法であるRDX³⁾の測定を行った。その結果、図1のようにステロールの有無に関わらずAmBの2種のフッ素標識体 (14-F-AmBと28-F-AmB) および炭素-13の標識体の間にシグナルの減衰が観測され、分子親水性側同士、また、疎水性側同士が接近していることが判明した。

キーワード： アンフォテリシンB、脂質膜、REDOR、 ^2H NMR、エルゴステロール
まつりのおあき、うめかわゆういち、まつしたなおひろ、たはらかずあき、つちかわひろし、やまもとひろこ、おおいしとおる、むらたみちお

これらの結果は、樽板モデルを支持する。さらに、ステロールとAmBを連結した分子を調整し、同様の固体NMR測定によって、比較的短寿命のエルゴステロール-AmBが形成する2分子複合体の構造解析を行った⁴⁻⁶。また、ステロールと同様にイオンチャネル形成に重要な役割を担うリン脂質との相互作用も同様の手法を用いて明らかにしているのを併せて報告する⁷。

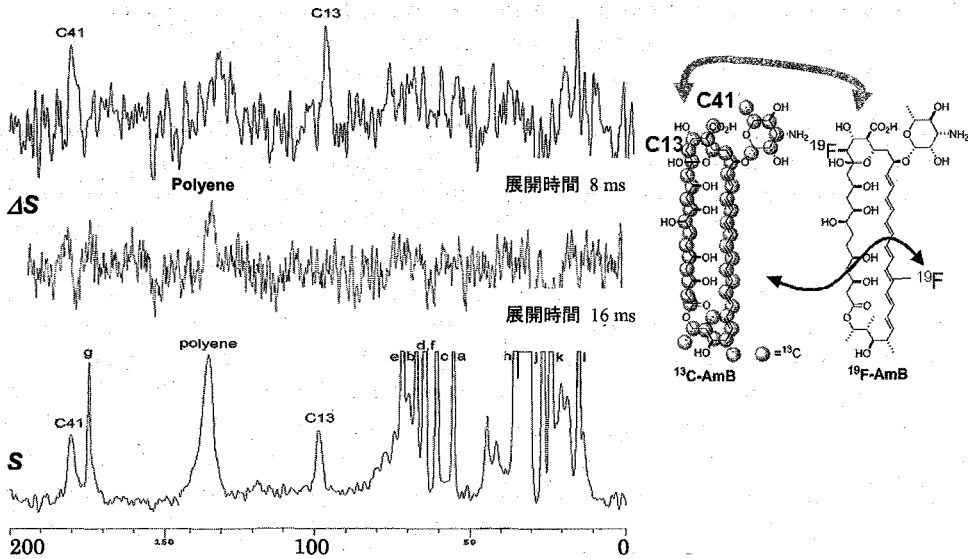


図1. リン脂質膜における標識アンフォテリシンBのRDXスペクトル

フッ素標識アンフォテリシンBと炭素-13全標識体の分子間相互作用をリン脂質(ステロール非含有DMPC)二重膜中で固体NMRを測定。アルファベットはリン脂質由来のシグナル。エルゴステロール存在下でも同様のREDOR減衰がみとめられた。上段と中段のスペクトル ΔS は炭素-13標識体を、それぞれC14(上部)とC28(下部)を特異的にフッ素標識したものと混合し、フッ素を照射して測定した(RDX差スペクトル)。C14フッ化体では極性部分のC13とC41に減衰が認められ、C28フッ化体では疎水的ポリエン部分に減衰が認められた。

参考文献

1. De-Kruiff, B.; Demel, R.A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57-70.
2. Tsuchikawa, H.; Matsushita, N.; Matsumori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6187-6191.
3. a) Gullion, T.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196-200; (b) Mehta, A. K.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 188-191.
4. Matsumori, N.; Eiraku, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M.; Aoki, T.; Ide, T. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 673-679.
5. Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10667-10675.
6. Kasai, Y.; Matsumori, N.; Matsuoka, S.; Umegawa, Y.; Ueno, H.; Ikeuchi, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1178-1185.
7. Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 704-710.

脂質膜上における局所構造の特徴に基づく
pleckstrin homology domain—脂質膜間相互作用の解析

○徳田尚美¹、八木澤 仁¹、福井泰久²、辻 暁¹

(¹兵庫県立大学大学院 生命理学研究科、²星薬科大学 創薬科学研究センター)

**Alterations of local structures of the pleckstrin homology domain
induced by the protein-lipid bilayer interaction at the membrane surface**

○Naomi Tokuda¹, Hitoshi Yagisawa¹, Yasuhisa Fukui², Satoru Tuzi¹

(¹Grad. Schl. Life Sci., Univ. Hyogo, ²Hoshi Univ.)

The PH domain is a rather small lipid-binding domain consists of 100-120 amino acid residues frequently found in the proteins included in the important cellular functions such as cellular signal transduction and cytoskeletal organization. One of the well-known functions of the PH domain is to mediate membrane localization of the proteins by stereospecific recognition and binding to phosphoinositides. Previously, we reported by using solid-state ¹³C NMR spectroscopy that alterations of structure and dynamics of the PLC- δ 1 PH domain are induced by the interaction between the PH domain and the membrane interface at the hydrated lipid bilayer surface. In this study, we investigated the SWAP-70 PH domain that has different characteristics of the primary and the secondary structures of the β 5/ β 6 loop compared with the corresponding membrane-penetrating loop of the PLC- δ 1 PH domain. Solid-state ¹³C NMR spectra revealed that the dynamic structure of the SWAP-70 PH domain bound to PIP₃ embedded in the membrane is affected by electrostatic interaction between the PH domain and the lipid head groups suggesting contribution of the β 1/ β 2 and β 5/ β 6 loops as a non-canonical membrane binding site.

【序論】PH ドメインは、細胞内情報伝達系、細胞骨格系などの重要な細胞機能に関与する蛋白質中に多く見いだされ、主要な機能として脂質頭部との相互作用を介して、膜表面に蛋白質の膜局在を制御することが知られている。本研究室では、固体 ¹³C NMR を用いて脂質膜上に結合した際の PH ドメインの立体構造を直接に観測し、その脂質膜結合機能を脂質膜ベシクル上における構造情報から解析することを目的として研究を行っている。これまでに PLC- δ 1 PH ドメインに関して脂質膜上での構造の解析を行い、脂質膜表面への局在時に β 5/ β 6 ループ間に存在する両親媒性 α ヘリックスが非特異的な膜結合サイトとして膜へ挿入し、構造および配向の変化を生じることを見いだした。ここでは、 β 5/ β 6 ループ部位に、PLC- δ 1 における両親媒性 α ヘリックスに替わり、荷電性側鎖を多く持つ SWAP-70 PH ドメインを対象として、局所構造の違いが脂質膜-ドメイン間相互作用および膜上における立体構造に及ぼす影響を解析した。生体中では SWAP-70 PH ドメインは、脂質膜中の PIP₃ を特異的に認識し、結合することで SWAP-70 の脂質膜への局在を制御し、PI3キナーゼ依存的な細胞骨格系の制御に関与する事が知られている。

【実験】ヒト由来 SWAP-70 PH ドメインを GST 融合蛋白質として大量発現し、[3-¹³C]Ala 安定同位体標識導入を行なった。得られた蛋白質はアフィニティーレジンを用いて精製した後 thrombin 切断により単離し、基質である D-my ϕ -phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) を含む脂質二重膜懸濁液、又は基質と同じ位置にリン酸基を持つイノシトールリン酸 D-my ϕ -inositol 1,3,4,5-tetraphosphate (IP₄) に結合させて測定試料とした。

キーワード: PH domain, SWAP-70, PLC- δ 1, 脂質二重膜

著者ふりがな: とくだ なおみ、やぎさわ ひとし、ふくい やすひさ、つじ さとる

これらの試料は、脂質膜懸濁液及び溶液状態で固体 NMR 測定用試料管中に密封し測定に用いた。固体 ^{13}C NMR 測定は DD-MAS 法、及び CP-MAS 法を用いて Chemagnetics CMX Infinity-400 (^{13}C :100.6 MHz) により 20°C で行なった。

【結果と考察】 Fig. 2A,B に POPC/PIP₃ ベシクル及び IP₄ 共存下における[3- ^{13}C]Ala 標識 SWAP-70 PH ドメインの固体 ^{13}C NMR スペクトルを示す。スペクトル中では、SWAP-70 PHドメインに含まれる4つの Ala 残基に由来する信号が分離観測されている。逆三角形で示したピークは、N 末端のランダムコイル部位に位置する 2 つの Ala 残基由来と考えられる。二次構造と化学シフトの対応より、Fig. 2A の 15.8 ppm 及び 18.4 ppm に見られる信号は、それぞれ溶液状態において報告されている立体構造中 (Fig. 1)において、 α 3ヘリックスおよび β 7ストランドに含まれる Ala 300 及び Ala 288 由来であると帰属できる。POPC/PIP₃ ベシクル中の PIP₃ に結合した状態 (Fig. 2B) においては、16.2 ppm および 18.8 ppm 付近に新たな信号が検出された。これらの信号は、DD-MAS 法により測定された Fig. 2B では強度が低い、CP-MAS 法による測定では相対的に高い強度で検出され、信号が由来する核の交差緩和の効率が低いと考えられる。このことより、脂質膜中の PIP₃ 頭部に結合した際には、IP₄ 共存下の水溶液中で見られる立体構造とともに、より脂質膜と強く結合し、運動性の制限された、コンホメーションの異なる立体構造が共存していることが示唆される。

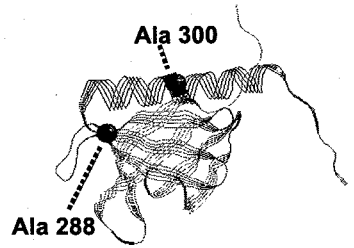


Fig.1 Three-dimensional structure of SWAP-70 PH domain in solution. (Li, H et al. PDB ID: 2DN6)

SWAP-70 PH ドメインでは、PIP₃ に立体特異的に結合するサイト (β 1/ β 2、 β 3/ β 4 および β 6/ β 7 ループ) に隣接する部位 (β 1/ β 2 および β 5/ β 6ループ間) に塩基性アミノ酸残基が多く分布している。また、 β 1/ β 2 ループには、spectrin- β 2、ArhGAP9 等の PHドメインに見いだされる低い基質特異性を持ち、 β 1/ β 2 及び β 5/ β 6ループ間に位置する non-canonical な基質結合部位のアミノ酸配列と類似の配列が見出される。これらのことから、膜結合時に見られる運動性の低い立体構造が、PIP₃ 特異的結合部位に加え、 β 1/ β 2 及び β 5/ β 6ループ周辺部位と脂質頭部との静電相互作用による特異性の低い結合により生じる可能性を考え、酸性脂質である PS を 20%~40% 含む膜上において PIP₃ と結合した PH ドメインの立体構造変化の

解析を行なった (Fig. 2C,D)。脂質二重膜中の PS 含量の増加に伴って、15.8 ppm 及び 18.4 ppm の信号強度の減少と、膜結合時に特徴的な 16.2 ppm の信号の信号強度増加が見出された。このことは、脂質膜上における SWAP-70 PH ドメインの立体構造変化が、PH ドメイン-脂質頭部間の静電的相互作用により誘起されうることを示している。

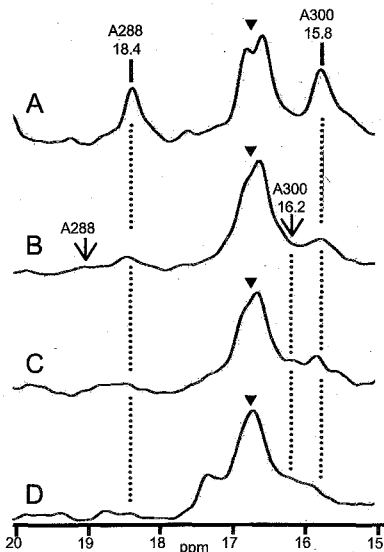


Fig. 2 DD-MAS NMR spectra of the [3- ^{13}C]Ala labeled SWAP-70 PH domain forming complex with IP₄ (A), and with PIP₃ in the vesicles whose lipid compositions are POPC : PIP₃ = 95 : 5 (B), POPC : PIP₃ : PS = 75 : 5 : 20 (C), POPC : PIP₃ : PS = 55 : 5 : 40 (D), at 20°C. Assignments and chemical shifts are indicated at the top of the spectra. Arrows indicate positions of the peaks characteristic for the membrane bound state of the PH domain. The peaks around 16.8 ppm indicated by inverted triangles are ascribed to the Ala residues included in the N-terminal random coil structure.

^1H MAS NMR Studies of Polyaniline and Derivatives*Shigeyuki Tujii¹, ○Akira Kawahara², Hisashi Honda^{1,2}**1. Faculty of Science, Yokohama City University**2. International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University*

In order to reveal some correlations between conductivity and NMR parameters (chemical shift and relaxation times), we carried out solid-state high-resolution ^1H MAS NMR and electric conductivity measurements of polyaniline and its derivatives. ^1H NMR signals showed high-field shift and line broadening with increasing concentration of dope materials. The obtained spectrum could be separated by 4 lines; two of them took short spin-lattice relaxation time (T_1) and the others had long T_1 . From these results we can determine ratios of non-crystal and crystal parts in polyaniline. Above tendencies were recorded in polyaniline derivatives.

[序論]

ポリアニリンは伝導性高分子の代表的なものとしてよく知られている。有機高分子は本来、絶縁体か、半導体であるが、ポリアニリンはドーパントをドーブすることで電気伝導性を示すことがわかっている。ポリアニリンは、原料が安く、空気中で安定であるという利点を持っているが、水や有機溶媒に難溶なので、フィルムなどに加工することが難しい点も持っている。この難点を克服する一つの方法として、コポリマーを作成するという方法がある。溶媒に溶解しやすい官能基を持つモノマーを導入することで、溶解性が上がるが、その反面、伝導性が変化する場合がある。そこで、本研究では、ポリアニリンとそのコポリマーの物性変化をNMR法で調べた。

これまで、固体 ^{13}C CP/MAS NMR 測定が、高分子研究に多用されているが、物性変化に対する ^{13}C 核のケミカルシフト変化が小さいことも多く報告されている。一方、高速 MAS の技術が飛躍的に進歩している今日ではあるが、伝導性高分子に対する ^1H MAS NMR 測定の報告例が少ない。そこで、本研究では、固体高分解 ^1H MAS NMR 測定を行い、伝導性とケミカルシフトの関係を明らかにすることを試みた。

Key words ポリアニリン ^1H MAS NMRName つじ しげゆき¹、かわはら あきら²、ほんだ ひさし^{1,2}

[実験]

本研究では、電気重合法でポリアニリンを合成した。その際、溶液の種類やアニリンの濃度を変え、試料の調整方法と物性の関係を調べた。ポリアニリンの場合、電気重合した状態がドーブ状態である。そのため、合成時の陽極と陰極を変えて、脱ドーブ状態を得た。これらの試料をNMRと電気伝導度測定に用いた。 ^1H MAS NMR測定にはBruker社製Avance600を用い、共鳴周波数600.13 MHz、MAS速度30 kHzでスペクトルを行った。また、ケミカルシフトの内部標準としてシリコンゴム($\delta = 0.12$ ppm)を用いた。また、*o*-, *m*-, *p*-アミノ安息香酸とアニリンのコポリマーも電気重合法で合成し、同様の測定を行った。

[結果と考察]

ポリアニリンの脱ドーブ状態の ^1H MAS NMRスペクトルを図1に示す。得られた線形は少なくとも4種類の信号が重なっていることが、線形解析から明らかになった。一方、ドーブ状態は図2のようになった。図2から、ドーブ量が増加するに従い、ケミカルシフトが高磁場シフトすることが分かった。この変化量は、これまでに報告されている ^{13}C 核のスペクトル変化よりも顕著であった。しかし、ポリアニリンについて報告されている ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルは、ドーブ量に対し低磁場シフトするので、 ^1H 核と ^{13}C 核で見ている現象が異なるおそれがある。そこで、Gaussian03Wを用いて、各原子上の電子密度等を計算した。その結果、ドーブすることにより、炭素上の電子化が、ケミカルシフト値に強く影響していると考えられることができる。よって、 ^{13}C 核よりも ^1H 核の方が伝導性高分子の物性、特に電子状態に関する知見を得るのに適しているといえることができる。

また、線形解析で得られた各信号のスピン-格子緩和時間 T_1 が異なることも、明らかになった。この結果から、高分子中の結晶領域と非晶領域の割合が求められることも明らかになった。

アニリンと*o*-, *m*-, *p*-アミノ安息香酸のコポリマーにおいても同様の傾向が得られたので、伝導性高分子の物性研究には ^{13}C 核よりも ^1H 核の方が感度がよいことが分かった。

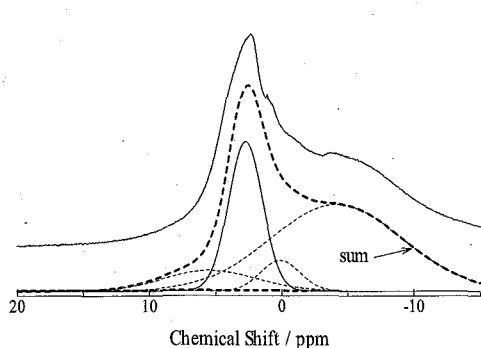


Fig. 1 ^1H MAS NMR spectrum of dedoped polyaniline

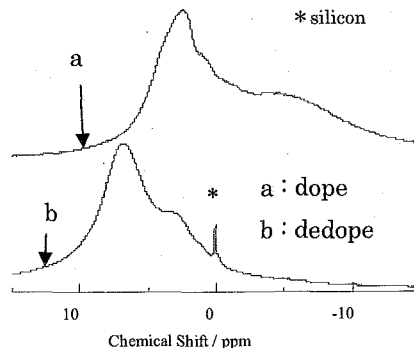


Fig. 2 ^1H MAS NMR spectra of (a) doped and (b) dedoped polyaniline

Monoclinic Crystal Formation Induced by Drawing / Compression for Ultra-High Molecular Weight Polyethylene Films Prepared from Solution and Melt

Sho Morita¹, Masaki Kakiage², Hiroki Uehara¹, and Takeshi Yamanobe¹

(*Department of Chemistry and Chemical Biology, Gunma University,* ²*Tokyo Institute of Technology*)

Ultra-high molecular weight polyethylene films were prepared under different crystallization conditions. Combination of drawing and subsequent compression of these films gave monoclinic formation which was detectable using wide-angle X-ray diffraction measurement and the ¹³C solid-state NMR. A comparison of the monoclinic content for the films drawn up to the similar ratios indicated that monoclinic formation is controlled by initial morphology of the prepared films.

1) 緒言

通常、ポリエチレンは斜方晶の結晶構造をとる。これに対して延伸/圧縮といった応力を加えることで単斜晶が生成されることが知られている。どちらの結晶構造でも、分子鎖コンホメーションはトランスジグザク構造であるが、分子鎖パッキング状態は異なり、斜方晶ではジグザク面が互いにほぼ垂直に配列しているのに対し、単斜晶では平行に配列している。この単斜晶の生成には、延伸倍率、延伸速度、温度などといった成形加工条件が影響することが報告されている。本研究では、超高分子量ポリエチレンフィルムの作製条件の違いや、分子量、延伸方法の違いによる単斜晶生成への影響について検討した。

2) 実験

試料は、三井化学(株)製 Hizex million 145M($M_v=1.0 \times 10^6$)、240M($M_v=2.0 \times 10^6$)、340M($M_v=3.0 \times 10^6$)、630M($M_v=6.0 \times 10^6$)の4種の超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)を用いた。原料パウダーを180℃で熔融、圧縮徐冷して熔融結晶化フィルムを、圧縮急冷してクエンチフィルムを作製した。また、原料パウダーを *p*-xylene に溶解し室温にてキャスト、乾燥しキャストフィルムを作製した。これらのフィルムを10mm×70mmの短冊状試験片に切り出し、延伸速度10mm/min、延伸温度125℃で延伸し延伸試料を、さらに延伸方向に対して垂直に350MPaで圧縮し延伸/圧縮試料を得た。また、ロール延伸は短冊状試験片に切り出したフィルムを延伸速度0.25rpm、延伸温度23.5℃で行ないロール延伸試料を作製した。これらの試料の結晶構造を比較するために広角X線回折(WAXD)及び¹³C固体NMR測定を行った。

3) 結果と考察

図1に各条件で作製された240Mフィルムを延伸/圧縮した試料の固体NMRスペクトルを示す。延伸倍率(DR)は9倍程度にそろえた。単斜晶が34.2ppm、斜方晶が

キーワード：配向度 / モルホロジー / 単斜晶 / 延伸・圧縮 / 超高分子量ポリエチレン

もりた しょう・かきあげ まさき・うへはら ひろき・やまのべ たけし

32.7ppm、非晶が 31.3ppm 付近に観測される。また、ピーク分離の結果 33.2ppm 付近に中間相の存在も確認できた。この結果、単斜晶の生成量は、熔融結晶化フィルムで最も多く、キャストフィルムで最も少ないことがわかる。ここで熔融結晶化フィルムとクエンチフィルムでは結晶化度に差がある。単斜晶は非晶ではなく斜方晶の分子鎖面がすべることで生成することが知られている。クエンチフィルムは結晶量が少ないため単斜晶の生成量が少なかったと考えられる。

キャストフィルムでは、非晶成分が他のフィルムに比べ顕著に少ない。つまり、初期モルホロジーの違いが単斜晶の生成量に影響すると考えられる。ある程度非晶成分の存在が、分子鎖の移動に影響することがわかる。

図 2 に未延伸試料、延伸試料、延伸/圧縮試料、ロール延伸試料の固体 NMR スペクトルを示す。この結果から延伸のみでは単斜晶の生成量はあまり増加せず、延伸後圧縮することにより増加していることがわかる。延伸することで斜方晶の化学シフトは高磁場側にシフトし、非晶は低磁場側にシフトしていた。このことから延伸により結晶成分では非晶成分の一部が入り込むことで不完全な成分が増加し、非晶成分では延伸によりトランスの割合が増加すると考えられる。

また、未延伸フィルムからはロール延伸のみで単斜晶が生成されることがわかった。この結果からロール延伸では延伸・圧縮の過程が一度に行われていると考えることができる。ロール延伸では延伸/圧縮試料に比べ斜方晶は高磁場側に、非晶は低磁場側に観察された。この結果は異なる分子量でも同じ傾向がみられた。以上の結果から調製法の異なる試料では配向度の違いだけではなく非晶成分の量も単斜晶の生成に影響を及ぼす。延伸/圧縮やロール延伸といった応力のかけ方の違いで単斜晶の生成量やコンホメーションの違いがでてくることが明らかになった。

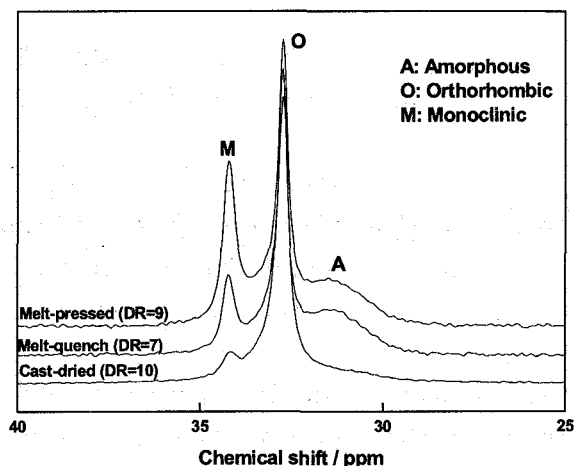


Fig.1 NMR spectra of 240M films prepared under different conditions.

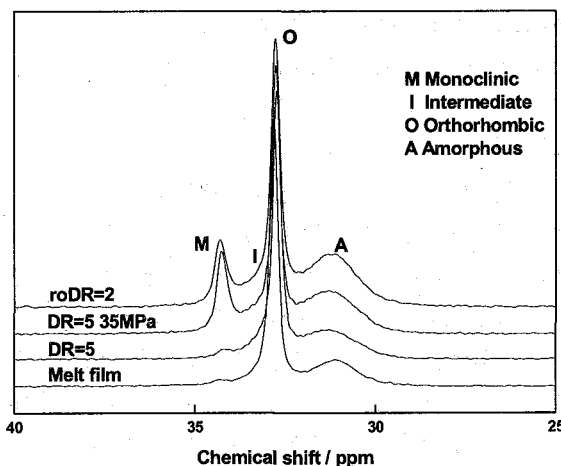


Fig.2 NMR spectra of 240M films were taken different stress

(大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻)

○佐治修吾、田中克業、安達裕子、河田陽子、木村敦臣、藤原英明

Adsorption profile of zeolites studied by ^{129}Xe NMR

(Division of Health Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University)

○Shugo Saji, Katsunari Tanaka, Yuko Adachi, Yoko Kawata,

Atsuomi Kimura, Hideaki Fujiwara

^{129}Xe NMR is known to offer a powerful technique to characterize surface in solids or polymers. The ^{129}Xe NMR data, signal intensity and chemical shift, obtained between 0.05 and 1.5 atm in the adsorbed state on ZSM-5 were analyzed based on Dubinin-Radushkevich equation. The analysis has disclosed partially the profile of adsorption such as energetic aspects, surface area, saturated amount of Xe adsorption and specific parameters of ^{129}Xe chemical shift. Such an analysis of signal intensity and chemical shift data will be useful in performing nano-material analysis on ^{129}Xe NMR without invoking to the traditional methodology of gravimetric or volumetric adsorption experiments.

【緒言】

近年、ゼオライトや高分子材料において、 ^{129}Xe をプローブとする NMR による多孔性微粒子の研究が注目されている。Xe 原子は直径が 4.4 Å と非常に小さいため、多孔性微粒子の内部まで吸着させた測定が可能となることから、細孔構造の解明に非常に有効な手段となっている。Xe NMR から得られるデータは化学シフトと信号強度であり、両者から吸着特性に必要なデータを得ることができる。今回ゼオライトを4種選び、圧力を 1.5 atm 以下で吸着等温線を測定し DR 解析を適用したところ、化学シフトと信号強度から求めた P_{eq} と q_{st} に大きな乖離が見られた。この問題を解消すべく、両者を同時に含めた解析法を開発し適用したところ、問題点の解消に有効なことが確認できた。

【実験】

ゼオライトとして ZSM-5 (Zeolite International 製) を選んだ。前処理としてサンプル

キーワード： ^{129}Xe NMR、ゼオライト、吸着、化学シフト、信号強度

著者ふりがな：さじしゅうご、たなかかつなり、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

ルチューブ(10Φ)に詰め、 10^{-5} torr 以下の高真空化で 10 分間脱気した後、2K/min 程度の速度で 573K までゆっくりと上昇させた。573K に達したところで 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測定を行った⁽¹⁾。測定に用いた NMR 装置は Varian Unity-INOVA (9.4T) である。用いたサンプルの特性は Table.1 に示す。

得られた信号強度と化学シフト双方のデータを Dubinin-Raduskevich(DR)式に基づいて最小二乗解析をした。また、データ解析には Levenberg-Marquardt 法による最小二乗法プログラム Origin ver7.5 (LightStone)を用いた。

Table.1 Parameters of four samples

Zeolite Product	SiO ₂ /Al ₂ O ₃ Mole Ratio	Cation	Na ₂ O (wt/%)
CBV2314	23	Ammonium	425
CBV5514G	50	Ammonium	425
CBV8014	80	Ammonium	425
CBV28014	280	Ammonium	400

【結果】

式(1)は DR 式の基本式で表れる重量比 w_a/w_{a0} をピーク面積比 S_{obs}/S_{∞} で置き換えたものである。ここでは S_{∞} はゼオライト細孔表面全体が被覆された最大吸着量相当のピーク面積、 S_{obs} は圧力 P における ¹²⁹Xe-NMR ピーク面積の実測値、 βE_0 は Xe 吸着ポテンシャルエネルギー、 P_{eq} は見かけの飽和蒸気圧である。

$$[\ln(S_{\infty}/S_{obs})]^{1/2} = (RT/\beta E_0)(\ln P_{eq} - \ln P) \quad (1)$$

また河田らが考案した、DR モデルの重量比を virial 展開して化学シフトに適用する式(2)を示す。

$$\delta_{obs} = \delta_s + G_1(w_a/w_{a0}) + G_2(w_a/w_{a0})^2 + G_3(w_a/w_{a0})^3 + \dots \quad (2)$$

$$q_{st} = \Delta H_v + \beta E_0 \quad (3)$$

ここで δ_{obs} 、 δ_s および ΔH_v はそれぞれ化学シフトの実測値、圧力 0 に外挿した化学シフト値、及び Xe の沸点における蒸発エンタルピー 12.6kJ/mol である。また、 q_{st} は等比体積吸着熱である。

式(1)、(2)より化学シフトを用いた DR 解析は

$$[\ln G_1/(\delta_{obs} - \delta_s)]^{1/2} = (\beta E_0)(\ln P_{eq} - \ln P) \quad (4)$$

と表せられる。 q_{st} は式(3)から導いた。

今回我々は βE_0 、 P_{eq} を共通パラメータとし、式(5)のように化学シフトと信号強度の両者を含む関数 F を最小二乗化する解析を行った⁽²⁾。式(5)の ω は重み係数である。

(Fig.1)

$$F = \omega_s \sum (\delta_{obs} - \delta_{calc})^2 + \omega_g \sum (S_{obs} - S_{calc})^2 \quad (5)$$

式(2)、(4)、(5)から得られた結果を Table.2、3 に示す。

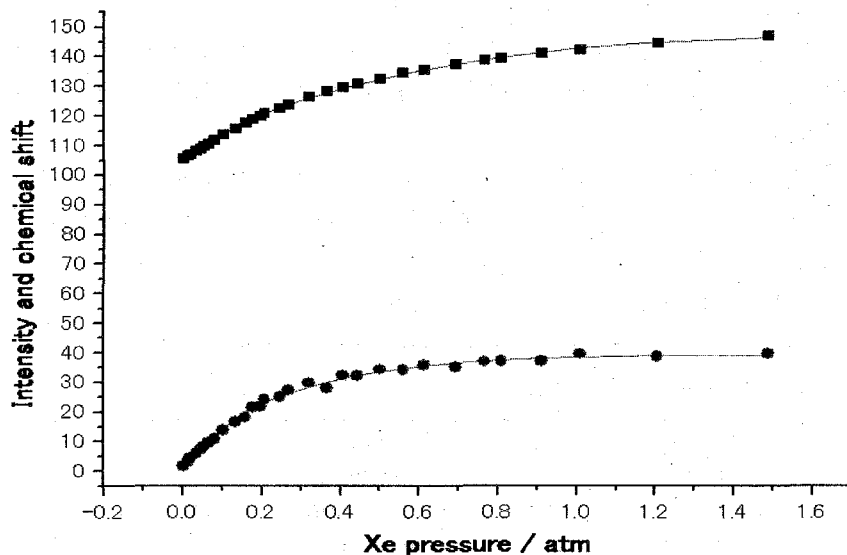


Fig.1 Simulation of the ^{129}Xe intensity and chemical shift data. The obtained at 25°C are simulated using βE_0 and P_{eq} as parameters common to intensity and chemical shift data. ● Intensity (peak area), [arbitrary unit]; ■, chemical shift, [ppm].

Table.2 Analysis of ^{129}Xe adsorption isotherms on the DR equations (CBV28014, $\omega_\delta = \omega_s = 1$)

Data source	Parameter	Temperature (K)		
		298	273	248
信号強度(S)	βE_0 (kJ/mol)	6.52 ± 0.22	8.98 ± 0.58	10.26 ± 0.58
	q_{st} (kJ/mol)	19.12 ± 0.22	21.18 ± 0.58	22.86 ± 0.58
	P_{eq} (atm)	1.45 ± 0.14	1.81 ± 0.49	1.04 ± 0.27
	$S_\infty \times 10^{-6}$	40 ± 0.6	50 ± 1.6	60 ± 1.4
化学シフト(δ)	βE_0 (kJ/mol)	6.59 ± 0.06	6.60 ± 0.14	7.08 ± 0.24
	q_{st} (kJ/mol)	19.19 ± 0.06	19.20 ± 0.14	19.68 ± 0.24
	P_{eq} (atm)	3.47 ± 0.12	1.98 ± 0.13	1.13 ± 0.10
	δ_s (ppm)	105.54 ± 0.08	106.85 ± 0.27	108.70 ± 0.64
	G1 (ppm)	45.63 ± 0.42	50.57 ± 0.63	54.97 ± 0.88
S、 δ の同時解析	βE_0 (kJ/mol)	6.20 ± 0.15	8.15 ± 0.58	9.91 ± 0.95
	q_{st} (kJ/mol)	18.80 ± 0.15	20.75 ± 0.58	22.51 ± 0.95
	P_{eq} (atm)	1.31 ± 0.09	1.32 ± 0.33	0.94 ± 0.30
	$S_\infty \times 10^{-6}$	38.93 ± 0.46	48.06 ± 1.56	64.98 ± 1.81
	δ_s (ppm)	104.36 ± 0.42	102.80 ± 1.40	99.94 ± 2.47
	G1 (ppm)	25.92 ± 1.16	38.28 ± 3.42	51.38 ± 4.60

Table.3 q_{st} and P_{eq} values obtained from the Analysis of ^{129}Xe adsorption isotherms on the DR equations (298K)

q_{st}	Si/Al	S, δ 同時解析	信号強度(S)	化学シフト(δ)
CBV2314	23	22.58 \pm 0.80	23.45 \pm 1.48	19.81 \pm 0.09
CBV5514G	50	20.12 \pm 0.22	21.17 \pm 0.38	19.09 \pm 0.05
CBV8014	80	20.38 \pm 0.48	21.32 \pm 0.60	19.39 \pm 0.05
CBV28014	280	18.80 \pm 0.15	19.12 \pm 0.22	19.19 \pm 0.06
P_{eq}				
CBV2314	23	11.33 \pm 7.24	19.96 \pm 22.10	3.27 \pm 0.14
CBV5514G	50	1.68 \pm 0.25	2.42 \pm 0.45	2.57 \pm 0.06
CBV8014	80	2.31 \pm 0.46	3.47 \pm 1.12	3.39 \pm 0.09
CBV28014	280	1.31 \pm 0.09	1.45 \pm 0.14	3.47 \pm 0.12

q_{st} 、 P_{eq} において信号強度による解析と化学シフトによる解析とではわずかに乖離が見られた。これは圧力が上昇するにつれてピーク面積のシグナルがブロードになる傾向にあるため、信号強度の読み取りの際に誤差が大きくなったためと考えられる。

また、Table.3 より Si/Al 比が大きくなるにつれて q_{st} の値が小さくなる。これは Al に比べて Si のイオン化エネルギーが大きいいため、Xe と壁との相互作用が弱まり、Xe の吸着熱が下がると考えられる。

本研究では低い圧力範囲における ZSM-5 への Xe の吸着の検討において、吸着 NMR 信号強度・化学シフトの温度圧力依存性の検討結果から、等比体積吸着熱などの重要なパラメータの見積もりが可能であることを明らかにした。

【参考文献】

- (1) 安達裕子 “修士論文” (大阪大学、平成 19 年 3 月)
- (2) Y.Kawata, Y.Adachi, S.Haga, J.Fukutomi, H.Imai, A.Kimura, H.Fujiwara, *Anal Sci.*, 2007,23,1397

生体吸収縫合系ポリグリコール酸の延伸にともなう
構造変化に関する固体NMR研究

農工大院・工¹, 三井化学分析センター²
○関根素馨^{1,2}, 咲山 航¹, 山内一夫¹, 朝倉哲郎¹

Structural change of poly(glycolic acid) fiber with elongation
studied using solid-state NMR.

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology

²Mitsui Chemical Analysis & Consulting Service Inc.

Sokei SEKINE^{1,2}, Wataru SAKIYAMA¹, Kazuo YAMAUCHI¹,
Tetsuo ASAKURA¹

Polyglycolic acid (PGA) is one of semi-crystalline biodegradable polyesters which has been known as suture. ¹³C CP/MAS NMR was used to characterize the conformation of PGA fibers. The line-shape of CH₂ carbon of uniaxially stretched PGA fiber is asymmetric and split into two peaks. The lower field peak was assigned to all trans and the higher field one to fast-exchange between trans and gauche conformations. ¹³C spin-lattice relaxation time and ¹H pulse NMR experiments were used to characterize the heterogeneous PGA structures in viewpoint of dynamics. The structural change in the oriented PGA fiber was studied with angle-dependent ¹³C CP NMR spectra.

【緒言】ポリグリコール酸(PGA)繊維は、生体吸収性縫合糸として医療分野に用いられており、熔融紡糸後の延伸過程を経て製品化しているが、延伸条件によって加水分解性能が大きく変化することが知られている。これまで我々はパルス NMR と X 線回折を用いて、延伸倍率を変えた PGA 縫合糸の加水分解速度ならびに強度保持力と構造に関する研究を行ってきた¹⁾。

本研究では、未延伸および延伸倍率を変えた PGA 試料に関して、¹³C CP/MAS NMR、¹³C 緩和時間および ¹³C CPNMR の測定を行い、結晶および非晶部分の構造と分子運動性ならびに配向性に関する研究を行ったので報告する。

【実験】未延伸および 1.5 倍～3.5 倍に延伸した PGA 繊維を実験に用いた。X 線回折は、リガク(株)製の RINT2550 測定装置を用い、イメージングプレートにて測定を行なった。¹³C-CP/MAS および ¹³C スピン-格子緩和時間(¹³CT₁)測定は Chemagnetics 製 CMX300 の装置を用いて行なった。¹³C CPNMR 測定は、Bruker 社製 AVANCE400 を用い、高感度化が図れるように工夫したコイルを用い、PGA の繊維軸と磁場のなす角度を変化させて行なった。

Keywords : ポリグリコール酸、縫合糸、延伸、配向性、固体 NMR

せきね そけい、さきやま わたる、やまうち かずお、あさくら てつお

【結果および考察】延伸倍率を 1.5 倍～3.5 倍に増加させることにより、X 線回折の F(020)における配向度は 0.82～0.95 と高くなった。しかし結晶化度の違いは見られなかった。

次に未延伸と 3 倍延伸の PGA 繊維の ^{13}C -CP/MASNMR を測定した。未延伸サンプルの CH_2 ピークは、ブロードな 1 成分であるが、3 倍延伸のサンプルの線形は非対称であり、2 成分に波形分離された。 γ -gauche 効果を考慮すると、低磁場側の 62.5ppm は all trans、61.6ppm は trans と gauche の速い交換と帰属され、後者は未延伸ピーク位置と一致した。

CH_2 シグナルの ^{13}C - T_1 測定より、未延伸のサンプルの場合、 ^{13}C 緩和挙動は 1 成分であり ^{13}C - $T_1=8.8\text{sec}$ であった。一方、3 倍延伸のサンプルにおいて波形分離された 62.5ppm および 61.6ppm はそれぞれ ^{13}C - T_1 が 2 成分存在し、62.5ppm は 202.6sec と 5.1sec、各成分比は、32% と 15% となった。61.6ppm のシグナルは、64.3sec と 6.2sec で、各成分比は、33% と 20% となった。低磁場側の 62.5ppm において、緩和時間の長い 202.6sec の成分は、結晶成分由来と考えられる。これは X 線回折測定より算出された結晶化度 34% とほぼ近い値となる。それ以外のピークは非晶領域と考えられる。

次に 3 倍延伸繊維を静磁場に対して $0\sim 90^\circ$ に傾けて一連の ^{13}C CPNMR 測定を行った (Fig. 1)。(e)は無配向の未延伸サンプルであり、角度依存性はない。(a)～(d)において、図中の β_F は繊維軸と静磁場の角度であり、 $\beta_F=0^\circ$ の場合、繊維軸の σ_{33} 軸方向と静磁場 B_0 が一致する。この解析結果より、amorphous component の割合は 45%、oriented component 1 で示される延伸軸に配向の割合は 35% となった。また oriented component 2 は σ_{33} 軸が繊維軸から約 17° 傾いた成分であり、その割合は 20% である。延伸軸に配向した成分 (35%) は X 線回折の結晶化度 34% および緩和時間から得られた 33% とほぼ一致した。延伸軸から傾いて配向している成分に関しては今後詳細な検討を行う予定である。

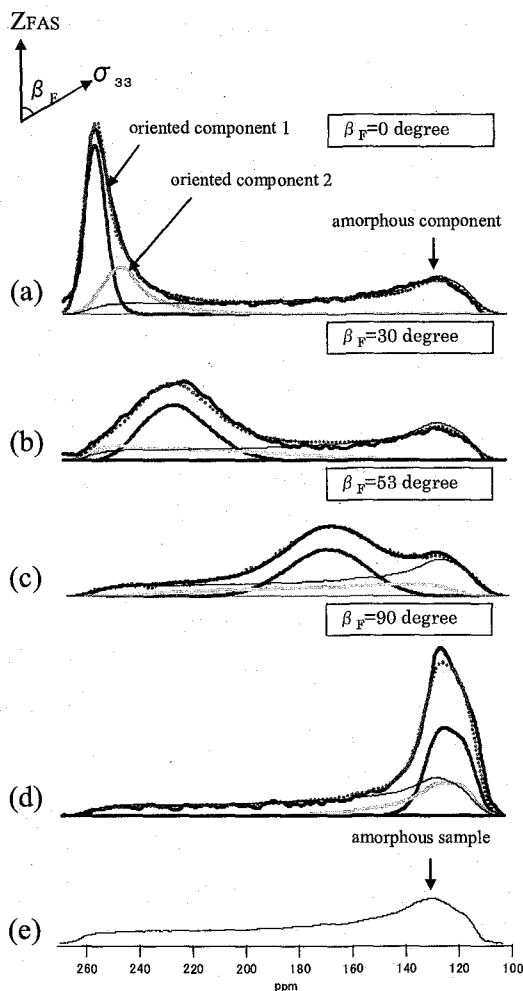


Fig.1 (a)-(d) A series of ^{13}C CP NMR spectra of PGA fiber block with stretching ratio 3.0 and (e) un-stretched fiber block.

(1) S.Sekine, H.Akieda, I.Ando and T.Asakura, Polym.J., 40, 1-7(2008).

ポリ(γ -グルタミン酸) および
そのポリマーブレンドの固体NMR
福井大院工 前田史郎, ○清水裕太

Solid-State NMR of Poly(γ -glutamic acid) and Its Polymer Blends
Shiro Maeda and Yuta Shimizu
Division of Applied Chemistry and Biotechnology,
Graduate School of Engineering, University of Fukui, Japan

In recent years, there has been considerable interest in biopolymers because of concern over the environmental impacts arising from the disposal of petroleum based plastics. Poly(amino acid)s provide a class of biopolymers based on natural amino acids linked by amide bonds. The molecular structure of microbial poly(γ -glutamic acid) and its polymer blends were investigated by using high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy.

【緒言】環境適応型の機能性生分解性高分子の研究が活発に進められている。中でも微生物産生の高分子は主に3種類知られており、ポリ(ϵ -リジン)、ポリ(γ -グルタミン酸) (PGA)、シアノフィチンである。PGA (Fig. 1) は γ 位のカルボキシル基と α 位のアミノ基がペプチド結合で連なったポリマーで、主として納豆菌などの

Bacillus 属菌によって産生される水溶性および生分解性を有するアニオン性ポリマーであり、機能性高分子化合物として化粧品・医用材料等の幅広い分野で用途開発が期待される物質である。PGA とそのナトリウム塩であるポリ(γ -グルタミン酸ナトリウム) (PGA/Na)の固体構造の比較 およびそのポリマーブレンドの溶液および固体NMRを用いた構造解析結果を試みた。

【実験】平均分子量 200,000~500,000 のPGA、PGA/Na (和光純薬) をそのまま使用した。固体NMR測定には Chemagnetics CMX Infinity 300 を使用した。共鳴周波数は ^1H 300MHz、 ^{13}C 75.MHz で、外部基準は Hexamethylbenzene の CH_3 ピークを TMS から 17.35ppm とした。 ^1H 90° パルス幅は 4.0 μs , MAS Speed は 7kHz であった。PGA は DMSO を、PGA/Na は H_2O を、それぞれ溶媒として使い、テフロンシャーレにキャストし凍結乾燥させキャストフィルムとした。固体NMR測定はそれぞれ粉末、キャストフィルムの2種類で行った。IR測定はPGA、PGA/NaともにKBr錠剤法と溶媒キャスト法で測定し、キャスト法に関してそれぞれ試料濃度 1wt%で CaF_2 窓板にPGAはDMSO溶液から、PGA/Naは水溶液からキャストして乾燥させ測定した。溶液NMR測定には日本電子LA-500を使用した。PGAは溶媒にDMSOを、PGA/Naは溶媒に $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ を用いて測定した。

キーワード：微生物産生高分子, ポリ(γ -グルタミン酸), 固体NMR, ポリマーブレンド, 生分解性高分子

まえだ しろう, しみず ゆうた

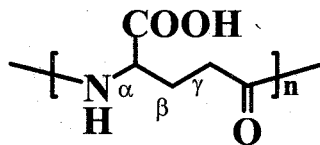


Fig.1 Structure of poly(γ -glutamic acid) (γ -PGA).

【結果と考察】PGA および PGA/Na の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを Fig.2 に示す。PGA/Na のスペクトルおよび帰属は Han と Choi の結果と一致する¹⁾。PGA のカルボニル炭素ピークは少なくとも3成分の重ね合わせと考えられるので波形解析を行った。PGA/Na のカルボニル炭素ピークは主鎖および側鎖 C=O の2成分とした。

波形解析および溶液 NMR 測定結果を Table 1 に示す。脂肪族炭素部分について化学シフト値は固体 NMR と溶液 NMR 測定ではほぼ一致した。PGA の C=O ピークの高磁場側の2本を側鎖 C=O と帰属したが、側鎖カルボキシル基が水素結合によって二量体を形成している場合とフリーな場合に帰属できるのではないかと考えている。PGA および PGA/Na の相構造を調べるために ^{13}C の $T_{1\rho}$ 測定を行った結果を Fig. 3 に示す。PGA の C=O は 86ms, C α は 38ms, PGA/Na はそれぞれ 26ms と 9ms であった。どの場合も1成分でフィットできた。DMSO 溶液および水溶液から、それぞれキャストしたフィルムについても同様の結果が得られた。このことは PGA, PGA/Na とともに1成分であることを示唆している。いずれの場合も PGA に比べて PGA/Na の方が $T_{1\rho}$ が短いのは運動性を反映していると考えられる。ブレンドポリマーについても発表する予定である。

【引用文献】

1) Oc Hee Han and Hyuk Joon Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **20**, 921-924(1999)

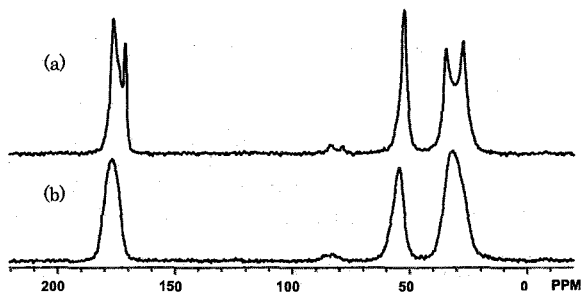


Fig.2 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (a) PGA and (b) PGA/Na powder.

Table 1. Chemical shifts of PGA and PGA/Na in solution and in solids.

		C=O(main)	C=O(side)	C α	C β	C γ
PGA	in solids	177	174 / 171	52	27	35
	in solution	173.5	171.7	51.6	27.1	31.7
PGA/Na	in solids	179	176	55	28	33
	in solution	179.3	176.2	56.3	29.5	33.9

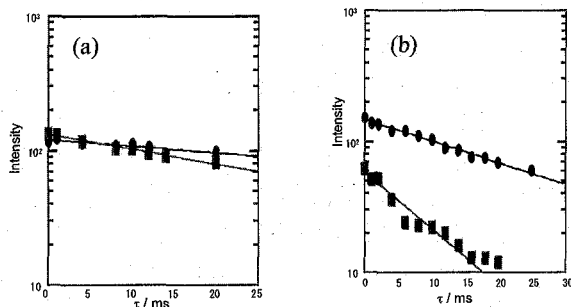


Fig. 3. $T_{1\rho}$ plots of peak area vs. delay time τ for (a) PGA powder and (b) PGA/Na powder.

●C=O (177ppm), ■C α (52ppm).

産総研 FC-Cubic, ○大窪 貴洋, 貴傳名甲, 大平昭博

Analysis of water state in polymer electrolyte membrane
by using ^1H NMR relaxometry

○Takahiro Ohkubo, Koh Kidena, Akihiro Ohira

Polymer Electrolyte Fuel Cell Cutting-Edge Research Center, AIST

^1H NMR relaxation time (T_1 and T_2) of water in polymer electrolyte membranes (PEMs) for fuel cell were evaluated by assuming discrete and continuous distribution relaxation time. The relaxation time of water in N117, which is typical perfluorinated PEM, indicated a single relaxation time for discrete analysis and a single sharp peak for continuous distribution analysis. On the other hand, hydrocarbon PEMs showed multiple relaxation time and broad distribution of relaxation time. It seems that the distinction between perfluorinated and hydrocarbon PEMs reflects structure of water channel regarding proton conductivity.

【緒言】固体高分子形燃料電池の構成要素である電解質膜は、様々な環境下でプロトンを効率良く伝導させる機能が求められる。プロトン伝導は、高分子材料である電解質膜中のスルホン酸基周りに形成されるナノメータオーダーでの水チャンネルを介して起こると考えられ、より高機能な新規電解質膜開発のためには、水チャンネルの構造評価および水の状態解析が必要である。これまでに、NMRによる電解質膜中の水の解析として、緩和時間を利用した水の運動性評価や多重の緩和時間を仮定した解析により複数の水の状態を識別した研究が報告されている[1]。しかしながら、Kimらが指摘しているように、離散化した緩和時間による解析は、電解質膜中のプロトンを識別する手法としては単純化した解析であり、実際の水の状態を理解するためには、連続的に分布した緩和時間を仮定して解析する必要がある。そこで本研究では、電解質膜中の水の評価を行うため、NMR測定から得られる減衰信号に対して、従来の離散化した緩和時間を仮定した解析に加え、ラプラス逆変換に相当する処理を適用することにより連続的な緩和時間分布を仮定した解析を行ったので報告する。

【実験】NMR測定は、日本電子製 ECA-500 を用い、室温($26.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$)で行った。縦緩和時間(T_1)の測定は、Inversion Recovery法により行った。0.001~5sの範囲で指数関数的に変化させた回復時間 τ (50ポイント)に対して、NMR信号を観測した。 $\tau=5\text{s}$ の信号に基づいて位相補正を行った後、FIDの最初の2ポイントを強度としてカウントした。 $\tau=5\text{s}$ の信号強度を $M(\infty)$ として、 $M(\infty)-M(\tau)$ の減衰曲線を求め、各データポイントでランダムノイズを仮定して解析を行い、 T_1 分布を得た。横緩和時間(T_2)の測定は、信号が完全に減衰するエコー時間を50~200 μs の範囲で設定し、4096ポイントのエコートレインを観測した。解析は、位相補正を行った後、バックグラウンド信号の影響を考慮して500 μs 以下の信号をカットした減衰曲線に対して行った。緩和時間の離散(DISCRETE)および連続分布(CONTIN)を仮定した解析は、DISCRETE[2]およびCONTIN[3]を組み込んだ自作プログラムにより行った。

電解質膜は、フッ素系としてナフィオン(N117)および炭化水素系としてイオン交換容量(IEC)の異なる3種類(1.4(PPS14), 1.6(PPS16), 1.8(PPS18) meq/g)の poly (phenylene sulfide)を用いた。電解質膜のプロトン伝導性は、相対湿度(RH)に強く依存することが知られていることから、全ての膜を K_2SO_4 飽和水溶液にて $RH=97\%$ に調湿した後、NMR 測定を行った。

【結果】膜中の水の緩和時間について、DISCRETE および CONTIN により解析した結果を Fig. 1 に示す。図中のパルス状のラインは、2成分を仮定した DISCRETE、連続的な分布曲線は、CONTIN の結果を示す。縦軸は、それぞれの成分の相対頻度を示す。まず DISCRETE の結果は、N117 が T_1 および T_2 で1成分の緩和時間を示すのに対し、IECに関係なく PPS は2成分の緩和時間を示した。電解質膜中のプロトンサイトは、スルホン酸基に結合したプロトンおよび水分子のプロトンが考えられる。これらプロトンは、NMR の時間スケールよりも早く交換していることが知られており、緩和時間は、これらプロトンが持つ緩和時間の平均として決定されることが考えられる。言い換えれば、プロトンが交換可能なバルク水とスルホン酸基のモル比で緩和時間が決定されることから、緩和時間は、水チャンネルのサイズを反映していると考えられる。このような観点から、PPS に対して観測された2つの緩和成分は、異なるサイズの、互いに交換することのできない非交換な水チャンネルのプロトンに相当し、不連続な水チャンネルの存在を示唆している。CONTIN 解析の結果は、N117 の緩和時間分布が単一でシャープな分布を示すのに対し、PPS は、複数のピークを持った幅広な分布を示した。PPS の緩和時間が非常に幅広な分布を示す理由として、水チャンネルのサイズ分布を反映していることが考えられる。

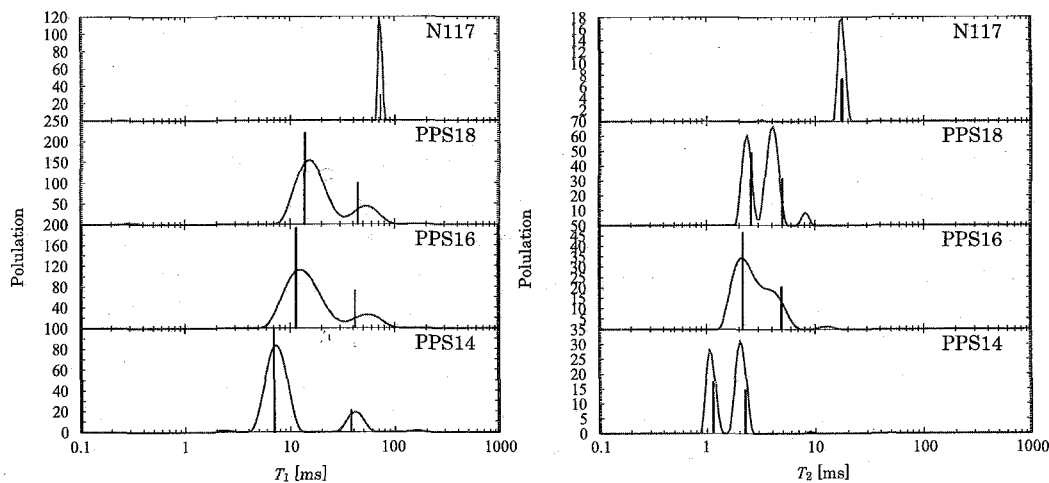


Fig. 1 Comparison of DISCRETE and CONTIN analyses for relaxation time of water in polymer electrolyte membranes. (a) spin-lattice relaxation time (T_1). (b) spin-spin relaxation time (T_2).

謝辞 本研究は経済産業省 資源エネルギー庁ならびに独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構「燃料電池先端科学研究事業」により行われた。

参考文献

- [1] Y. S. Kim et al, *Macromolecules*, 36, 6281-6285 (2003)
- [2] S. W. Provencher, *J. Chem. Phys.*, 64, 2772-2777 (1976)
- [3] S. W. Provencher, *Comput. Phys. Comm.*, 27, 213-227 (1982)

Trajectory of Polymer Chains

Toshikazu Miyoshi, Al Mamun

Research Institute of Nanotechnology, National Institute for Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 5-1 Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan

Tel +81-298-61-9392, Fax +81-298-61-4432 e-mail t-miyoshi@aist.go.jp

Keywords, polymer crystal/topology/ trajectory/ solid-state NMR

Abstract: We will demonstrate newly structural information about polymer chains in the crystalline regions. Our strategy relies on selectively isotope ^{13}C labeling and isolation of labeled polymer chains in the non-labeled polymer matrix. ^1H spin-diffusion experiment reveals that labeled polymers are mixed with non-labeled polymers in a wide temperature range. ^{13}C - ^{13}C double quantum (DQ) NMR allows us to selectively excite inter-stem correlated signals. As a result, it is found that polymer chains show a very complicated trajectory (multi-direction folding). We also show how chain folding directions depends on crystallization temperatures.

緒言 高分子結晶構造は、高分子鎖のコンフォメーションやパッキングが織り成す結晶単位構造にはじまり、折りたたまれたステムが形成するラメラ構造、ラメラが集積した球晶構造とオングストローム～ミクロンレベルへと多岐にわたる階層構造をとることが知られている。このような階層スケールの構造解析には固体NMR、ラマン、IRなどの分光学的な手法、広角、小角エックス線、中性子などの散乱、電子顕微鏡や光学顕微鏡などの分析機器が解析に用いられる。高分子の階層構造は結晶ラメラの厚みより遥かに長い高分子鎖固有のトポロジーと高分子鎖が描く軌跡によって形成される。しかし、従来の分析手法では高分子構造の断片的な情報を供給することができるが、高分子鎖一本の構造を解き明かすことはできない。我々は、昨年度のNMR討論会において ^{13}C ラベルした高分子鎖を未ラベル試料で希釈してステムレベルで共結晶化できることを二次元スピン拡散法から検証した。今回はNMRスペクトルから、高分子鎖が描く軌跡に関する情報を取得したので報告する。

結果と考察

我々の実験の戦略を図1に模式的に示した。●印は結晶ラメラ内部に存在する高分子鎖のステムを意味する。一つのラメラ内に存在する高分子鎖の一部分を示す。(高分子鎖全体の構造

キーワード 高分子結晶 トポロジー 軌跡 固体 NMR

著者 みよし としかず ある まむ一

在する高分子鎖の一部分を示す。(高分子鎖全体の構造ではない。) 在する高分子鎖の一部分を示す。(高分子鎖全体の構造ではない。) 未ラベル試料においてはステム間の相関NMRシグナルを検出することはできない。我々が使用する結晶性高分子(イソタクチック ポリ 3 メチル 1 ブテン) のモノマー内の一つのメチル基を選択的に同位体ラベルした試料を合成した。このような同位体ラベル箇所のデザインは、エックス線構造解析¹⁾により得られた隣接ステム間の最近接¹³C-¹³C原子核間距離(3.54 - 4.04 Å) が同一ステム内における最近接原子核間距離 4.16Åより、短距離となり、¹³C核ペアを作り出すことができる。このような試料調整により、高分子鎖が描く軌跡を反映したステム間の相関スペクトルが計測可能となる。実験としては、ラベル試料を希釈するために、ラベル試料:未ラベル試料=1:9のブレンドの共結晶化試料を使用した。ラベル試料が多量の未ラベル試料と分子鎖レベルで混ぜることにより、ラベル試料をラメラ内部に孤立させ、図 1 (b)のような状態を作り出すことができる。

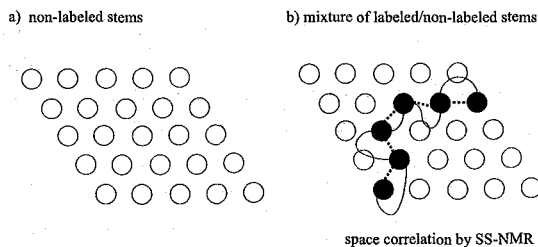


Fig. 1 Our central SS-NMR strategy for analysis of trajectory of polymer chains in the crystalline region. ○ and ● represent non-labeled and ¹³C labeled stems, respectively.

摂氏 320°Cの状態(融点 $T_m = 304^\circ\text{C}$)で融解した試料を氷水中にクエンチして試料を作製した。iP3M1Bのパッキング構造と 10 wt% 含んだラベル試料の固体高分解能¹³C-NMRスペクトルを図 2 に示す。これまでに報告した試料²⁾ (結晶化温度 $T_c = 285^\circ\text{C}$) と比較して、若干線幅は広く、個々のピークの強度が異なる。線幅の違いは結晶化温度の違いにより、原子レベルでの構造の不均一性を反映していることによる。後者は異なる結晶化温度において結晶内部のパッキング構造の分布に変化が生じたことによると考えられる。当日は、2D-DQ NMRスペクトルによる高分子鎖の軌跡が如何に結晶化温度に依存するかを示す。

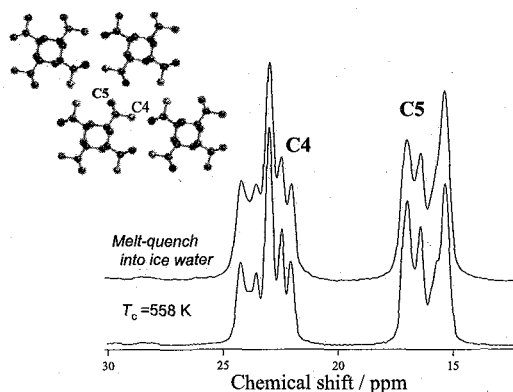


Fig. 2 crystal packing structure of iP3M1B and ¹³C CPMAS NMR spectrum for melt-quench iP3M1B at 273K and crystallized at $T_c=558\text{K}$.

参考文献

- 1) Corradini, P.; Gains, P.; Petraccone, V. *Eur. Polym. J.*, **1970**, *6*, 281-291.
- 2) Miyoshi, T.; Hu, W.; Hagihara, H. *Macromolecules* **2007**, *40*, 6789-6792.

Structural investigation on amorphous and crystal Alq₃ by solid-state ²⁷Al MQMAS NMR spectroscopy

○Yusuke Nishiyama^{1,3}, Tatsuya Fukushima², Kousuke Takami²,

Yasunari Kusaka², Toshio Yamazaki³, and Hironori Kaji²

1)JEOL Ltd., Akishima, Tokyo 196-8558, JAPAN,

2)Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, JAPAN,

3)Genomic Sciences Center, RIKEN Institute, Yokohama, Kanagawa 230-0045, JAPAN

○西山裕介^{1,3}、福島達也²、高見浩介²、日下康成²、山崎俊夫³、梶弘典²

1)日本電子、2)京都大学 化学研究所、3)理化学研究所 ゲノムサイエンスセンター

Introduction

Attention has been paid to the isomeric state of Alq₃, which is widely used in organic light emitting diodes (OLEDs); facial Alq₃ exhibits a strongly blue-shifted fluorescence in contrast to meridional Alq₃ [1]. Alq₃ in δ -crystalline phase (δ -Alq₃) have been found to consist of the uniformly ordered facial isomer and α -Alq₃ is the disordered meridional isomer [2]. γ -Alq₃ and amorphous-Alq₃ (amo-Alq₃) structures are now under debate. It have been reported that the facial isomer has an axially symmetric quadrolupolar tensor ($\eta=0$) and meridional has $\eta=0.72$ by means of DFT calculations [3, 4]. We investigate α -, γ -, δ - and amo-Alq₃ by ²⁷Al MAS NMR experiments under various magnetic fields and ²⁷Al MQMAS NMR experiments. We determined isomers for α -, γ -, δ - and amo-Alq₃, using asymmetry parameter η of the quadrupolar tensor.

Materials and methods

The γ - and δ -Alq₃ samples were prepared by thermal annealing, and amo-Alq₃ were obtained from evaporated thin films on a substrate. The NMR experiments were performed on JEOL ECA400, 500 and 600 spectrometer and Chemagnetics Infinity-plus400 spectrometer. The 1D ²⁷Al spectra under MAS were observed by single pulse excitation. The 2D ²⁷Al MQMAS spectra were obtained by the split-t1 method under the magnetic field of 9.4 T. A MAS frequency of 15.015 kHz was used.

Results and discussion

Figure 1 shows MQMAS spectrum of γ -Alq₃. The experimental spectrum of γ -Alq₃ is well reproduced by $\eta=0$ and $\chi=4.9$ MHz without distribution of quadrupolar parameters; We assigned γ -Alq₃ as uniformly ordered facial Alq₃.

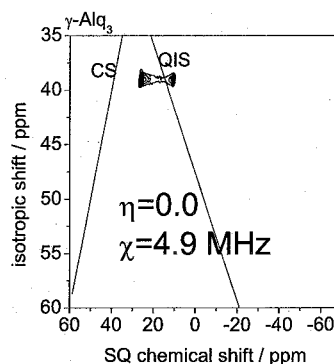


Figure 1.
¹H decoupled ²⁷Al MQMAS spectrum of γ -Alq₃.

Key Words: OLEDs, MQMAS, ²⁷Al

ふりがな: にしやま ゆうすけ、ふくしま たつや、たかみ こうすけ、
くさか やすなり、やまざき としお、かじ ひろのり

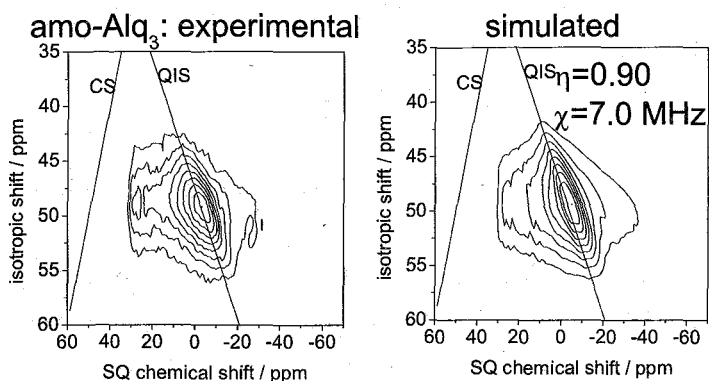


Figure 2. Experimental (left) and simulated (right) ^1H decoupled ^{27}Al MQMAS spectra of amo- Alq_3 . The simulated spectrum is calculated, assuming the distribution of χ .

Figure 2 shows experimental and simulated MQMAS spectrum of amo- Alq_3 . The experimental spectra are well reproduced with large η of 0.90 with distribution of χ ; amo- Alq_3 contains meridional isomers with structural distribution. We calculated the MQMAS spectrum of mixture of amo- Alq_3 and δ - Alq_3 at various ratios (spectra not shown). Then we estimated that the percentage of facial isomer in amo- Alq_3 is less than 3 % at most. The spectrum observed under various B_0 field is shown in Figure 3. The experimental results support the probability function of χ used in simulating the MQMAS experiments.

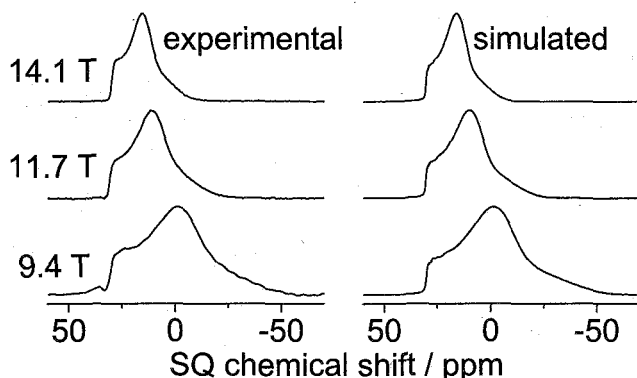


Figure 3. Experimental (left) and simulated (right) ^1H decoupled ^{27}Al MAS spectra of amo- Alq_3 observed at 9.4, 11.7, and 14.1 T. The spectra are observed with single pulse excitation.

While the γ - and δ - Alq_3 (facial) show ordered structure, amo- and α - Alq_3 (meridional) show disordered structure. This may account for difficulty to form uniform crystal in meridional isomer due to steric hindrance. The spectrum of δ - and α - Alq_3 will be shown in the presentation

References

- [1] M. Braun et al., J. Chem. Phys. 114 (2001) 9625.
- [2] Hironori Kaji et al., J. Am. Chem. Phys. (2006) 128, 4292.
- [3] Marcel Utz et al., Appl. Phys. Lett. (2003) 83, 4023.
- [4] Hironori Kaji et al., J. J. Appl. Phys. (2005) 44, 3706.

Effect of polymer excipients on molecular mobility of ^{13}C -labeled nitrendipine enantiomers

(National Institute of Health Sciences) Yukio Aso, Tamaki Miyazaki, Toru Kawanishi

The crystallization rate of (+)-nitrendipine in HPMC solid dispersions was smaller than that of (-)-nitrendipine. ^{13}C -NMR relaxation measurements of ^{13}C -labeled nitrendipine enantiomers suggest that this difference may be explained in terms of differences in the molecular mobility as measured by ^{13}C spin-lattice relaxation time in the rotating frame of dihydropyridine ring carbon.

はじめに

ニトレンジピピンはカルシウムレセプター拮抗薬として用いられる不斉炭素を有する医薬品である。水に難溶解性であるため、非晶質化して用いることが試みられているが、保存中の結晶化は有効性の低下を引き起こすため問題になる。光学分割した非晶質ニトレンジピピンの結晶化速度はヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)やヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどのセルロース誘導体が共存するときにエナンチオマー間に差がみられ、(-)体に比べ(+)-体の結晶化速度は遅く、安定であった。一方、ポリビニルピロリドン(PVP)のように不斉炭素を有しない高分子が共存するときにはエナンチオマー間で差が見られなかった。ニトレンジピピンエナンチオマーの結晶化速度に及ぼす高分子添加剤の影響を、 ^{13}C -標識ニトレンジピピンを用いて測定した ^{13}C -NMR 緩和時間に基づき考察した。

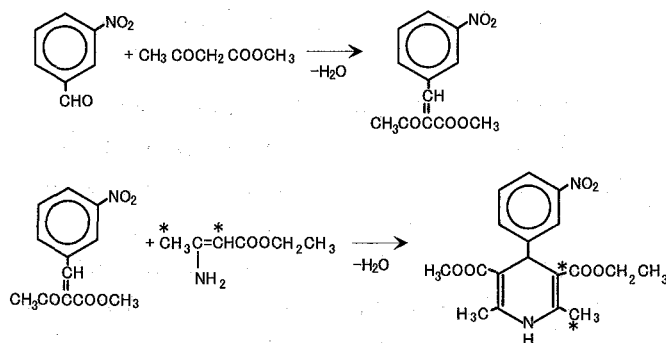
実験

^{13}C 標識ニトレンジピピンは ^{13}C 標識アセト酢酸エチル(Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)を用い、下に示すスキームに従って調製した。得られたニトレンジピピン(純度 97%、HPLC)をキラルカラム(CHIRALCEL OJ-H、ダイセル化学工業)を用いて光学分割し、光学純度がほぼ 100%の ^{13}C 標識ニトレンジピピンエナンチオマーを得た。ニトレンジピピン単独あるいはニトレンジピピンと高分子との混合物を 170°C に加熱し、急冷することによって非晶質ニトレンジピピンあるいは固体分散体を調製した。 ^{13}C -CP/MAS NMR (Varian, 400MHz) を用い、 T_1 および $T_{1\rho}$ の測定を行った。

キーワード (緩和時間、結晶化、非晶質)

著者ふりがな あそゆきお、みやぎきたまき、かわにしとおる

¹³C 標識Nitrendipineの合成



結果および考察

¹³C 標識ニトレンジピンの CP/MAS NMR スペクトルはジヒドロピリジン環およびメチル基の炭素に帰属されるシグナルが非標識体と同様の 100ppm と 20ppm 付近に観測された。溶融法によって得られた非晶質ニトレンジピンについて、27°Cにおいて T₁ 及び T_{1ρ} の測定を行ったところ、非標識ニトレンジピンの 100ppm および 20ppm の炭素の T₁ は 78s および 22s であったのに対し、標識ニトレンジピンにおいては 27s および 25s であった。標識体においてはジヒドロピリジン環炭素とメチル炭素の間でスピン拡散が起こり、両炭素の T₁ に差が見られないものと考えられる。一方、100ppm および 20ppm の炭素の T_{1ρ} は 160ms および 110ms であり、異なる温度依存性を示した。非標識ニトレンジピンの 100ppm および 20ppm の炭素の T_{1ρ} が 370ms および 46ms であることから、スピン拡散の影響は無視できないと考えられるが、以下の検討においては 100ppm に見られるジヒドロピリジン環炭素の T_{1ρ} を運動性の指標として用いた。非晶質ニトレンジピンのジヒドロピリジン環炭素の T_{1ρ} の温度依存性を Fig. 1 に示す。エナンチオマー間に結晶化速度の差が見られなかった薬物単独系や PVP との固体分散体において、T_{1ρ} もエナンチオマー間に差が見られなかった。それに対して、(-)体のニトレンジピンに比べ(+)体が安定であった HPMC との固体分散体においては、差は小さいものの、(+)体の T_{1ρ} が(-)体より大きい傾向がみられた。HPMC との固体分散体においては(+)体の方が運動性が低いため、(-)体より安定であると考えられる。T_{1ρ} の差が小さい理由はスピン拡散の影響と考えられ、¹³C-標識する部位を適切に選択することが重要と考えられる。

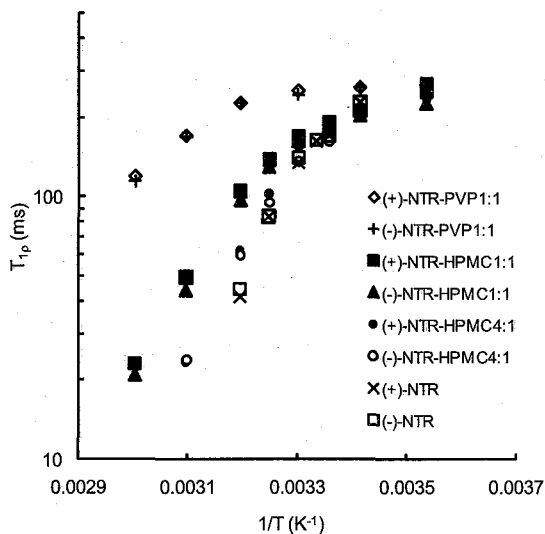


Fig. 1 Temperature dependence of T_{1ρ} of dihydropyridine ring carbon of amorphous nitrendipine (NTR).

(防大応化) ○堀 俊祐、田中千香子、浅野敦志、黒津卓三

Solid-state ¹H NMR of SBR under VFMAS

Shunsuke Hori, Chikako Tanaka, Atsushi Asano, Takuzo Kurotsu

Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Japan

Solid-state ¹H NMR spectrum of SBR (styrene-butadiene rubber) shows a tremendously high resolution under the very-fast magic-angle spinning (VFMAS). This is because VFMAS reduces the relatively weak ¹H-¹H dipolar interaction of SBR effectively. The high-resolution solid-state ¹H NMR spectrum allows us to detect the ¹H spin-lattice relaxation time (T_1^H) of each functional group. In this study, we have revealed the influences of VFMAS and inner pressure of sample tube produced by VFMAS on T_1^H . Furthermore, we have studied the difference between end-chain modified SBR and pristine SBR in SBR/Si composites from a quantitative analysis of the temperature dependence of T_1^H .

【はじめに】 スチレン-ブタジエンゴム (SBR) の固体¹H NMRスペクトルが、高速MAS法に起因する、¹H-¹H双極子相互作用の効果的デカップリングと試料が感じる温度の上昇に基づく分子運動の向上により、劇的に高分解能化することは前回報告した。さらに、ベンゼン環の¹Hスピン-格子緩和時間 (T_1^H) の温度依存性の観測から、MAS速度の上昇に伴い T_1^H の最小値が変化することを見出した。これは、高速MAS法による¹H-¹H双極子相互作用のデカップリング効果、ならびに試料が感じる温度の上昇とMASの遠心力に伴う試料管内部の圧力上昇による分子運動の変化に起因すると考えられた。

本研究は、MAS速度がSBRの分子運動に与える影響をさらに詳細に検討するため、2種類の試料管 (3.2mmφと6.0mmφ) を用いて、2kHzから25kHzへ段階的にMAS速度を変化させながら、25°Cから145°Cと温度を変化させて T_1^H と¹Hスペクトルを観測した。実験に用いたSBRはシリカを充填したコンポジットである。シリカと親和性を高めるためにSBR末端をアルコキシシリル基で変性させた末端変性SBRと未変性SBRを用いて、各官能基の分子運動に与える末端変性の影響についても議論した。

【結果と考察】 Figure 1に6.0mmφの試料管を用いて観測したMAS速度2.13kHzと、3.2mmφの試料管を用いて観測したMAS速度20kHzでの単結合部位 (CH₂基とCH基) の T_1^H の温度依存性を示した。実測データは、誤差を考慮するとMAS速度が2.13kHzと20kHzの場合で T_1^H の温度依存性に大きな違いは存在しないと考えられる。このことは、MAS速度に関係なく T_1^H の温度依存性がSBRの分子運動変化を直接反映していることを示し、主鎖の分子運動に与えるMAS速度の影響は小さいと言える。

Keywords: SBR (Styrene-Butadiene-Rubber), ¹Hスピン-格子緩和時間, 固体¹H NMR, very-fast magic-angle-spinning

著者ふりがな: ほりしゅんすけ、たなかちかこ、あさのあつし、くろつたくぞう

Figure 2 には、ベンゼン環の T_1^H の温度依存性を示した。ベンゼン環の T_1^H は単結合部分の T_1^H と比べて主に側鎖の分子運動状態を反映する。MAS速度が 2.13kHzと 4.26kHzの T_1^H の温度依存性を比較すると、MAS速度の上昇により T_1^H の最小値は長くなった。MAS速度が 4.26kHzから 15kHzでは、各MAS速度ともに試料管の径に関係なく、 T_1^H の温度依存性は図中の実線で表した曲線の範囲内に観測された。これよりMAS速度が 4kHz程度で 1H 双極子相互作用は効果的にデカップリングされ、スピン拡散の影響はほぼ無視できると考えられる。実際、Figure 2 と Figure 1 のMAS速度 2.13kHzにおける T_1^H の値は、ほぼ同様の温度依存性を示しており、MAS速度が低い場合はデカップリング効果が小さく、単結合部分の CH_2 基、 CH 基とベンゼン環の 1H 間にスピン拡散が効果的に働いていることを示している。

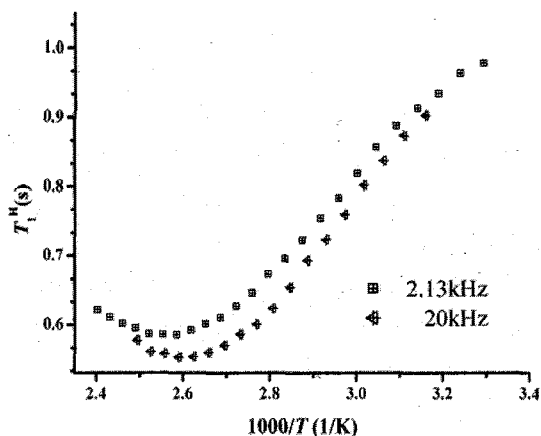


Figure 1. Observed T_1^H of single-bond CH_2 and CH protons against the inverse of temperature.

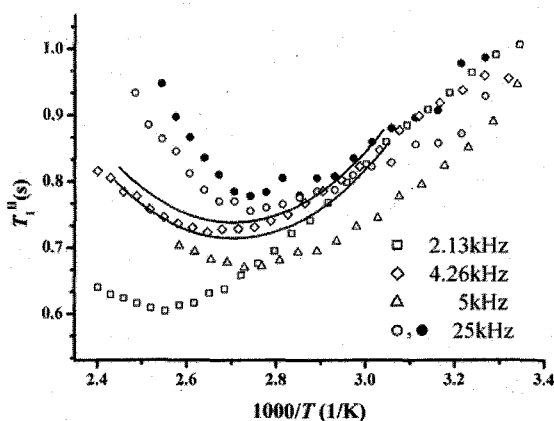


Figure 2. Observed T_1^H of benzene ring protons against the inverse of temperature. The solid lines are simulated T_1^H curves on the assumption of the WLF relation for τ . Open symbols are obtained from the end-chain modified SBR. Solid circles represent T_1^H values of a normal-SBR/Si composite.

一方、3.2mm ϕ の試料管を用いて観測したMAS速度が 5kHzの T_1^H の温度依存性は、6.0mm ϕ の試料管で測定したMAS速度が 4.26kHzのそれとは大きく異なった傾向を示した。 T_1^H がMAS速度のみに依存するのであれば、5kHzの T_1^H も2本の実線で囲まれた範囲内に現れるはずであるが、径の異なる試料管で測定すると、 T_1^H の値がMAS速度に影響されて観測された。MAS速度が同じであっても試料管の径が異なれば内部試料が感じる遠心力（またはそれにより生じる圧力）が異なる。よって、遠心力または圧力が側鎖の分子運動性に影響を与えていると考えられる。実際、MAS速度が 20kHz以上では、約 100°C以上でベンゼン環のスペクトル線幅が温度上昇とともに減少せず、逆に幅広くなることが確認され、高速MAS下でベンゼン環の運動が束縛されていることが示唆された。以上の観測結果は、末端変性SBRと未変性SBRとで大きな差は観測されなかった。

MAS速度を 25kHzまで上げると、未変性SBRの T_1^H の温度依存性の方が、末端変性SBRよりも高温域での T_1^H の上昇が大きくなった。末端変性SBRに比べて、未変性SBRの方が高い歪み領域において弾性率の低下が著しい（ペイン効果）。よって、遠心力または圧力が高い場合は、ペイン効果による物性の差が T_1^H に表れると考えられた。

結合状態

(産総研 計測フロンティア) ○千葉 亮、林 繁信

Bonding states of organic molecules modifying the surface of nano-particles probed by ^{31}P CP MAS NMR

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

Ryo Chiba and Shigenobu Hayashi

It is important that the surface of nano-particles is modified by chemical species having high affinity with the matrix in order to disperse uniformly nano-particles. In the present study, we have studied the bonding states of phosphate group of propylphosphonic acid (PPA) and decylphosphonic acid (DPA) on the surface of TiO_2 and ZrO_2 nano-particles by ^{31}P CP MAS NMR. The observed signals are broad ranging from 40 ppm to 10 ppm. The chemical shift is lower than that of the free acids. We found that the phosphate group binds to the surface of nano-particles by monodentate and bidentate forms. Additional peaks at 9.3 ppm and 7.3 ppm in DPA/TiO_2 are assigned tridentate bonding states of phosphate group.

【序】ナノ粒子をマトリックス中に均一に分散するために、マトリックスと相溶性の高い化学種でナノ粒子表面を修飾することが重要である。そのためには、表面修飾剤は粒子表面に共有結合で強固に結合している必要がある。そこで、金属ナノ粒子と有機分子のハイブリッド試料を調製し、粒子表面の有機分子の結合状態を固体 NMR 法により調べた。

【実験】表面修飾剤としてプロピルホスホン酸(PPA)、デシルホスホン酸(DPA)を用い、二酸化チタンナノ粒子(アナターゼ型) TiO_2 および二酸化ジルコウムナノ粒子 ZrO_2 とのハイブリッド試料を調製した。それぞれの試料中のナノ粒子表面のリン酸基の結合状態を ^{31}P CP MAS NMR 法により調べた。測定には、Bruker ASX400 分光計 (共鳴周波数 161.98 MHz) を用いた。

【結果・考察】Figure 1a にプロピルホスホン酸(PPA)とプロピルホスホン酸で表面修飾した二酸化チタンナノ粒子試料(PPA/TiO_2)と二酸化ジルコニウムナノ粒子(PPA/ZrO_2)の ^{31}P CP MAS NMR スペクトルを示す。PPA では 37.4ppm に一本の鋭いピークが観測された。 PPA/TiO_2 と PPA/ZrO_2 では、40 ppm から 10 ppm 付近まで広がっ

固体 NMR、ナノ粒子、表面修飾、結合状態

ちば りょう、はやし しげのぶ

たシグナルが観測され、複数のピークが確認された。Figure 1b にデシルホスホン酸 (DPA)と DPA で修飾した TiO_2 ナノ粒子と ZrO_2 ナノ粒子のスペクトルを示す。DPA では、31.1 ppm と 31.8 ppm に鋭い二つのピークを観測した。DPA/ TiO_2 では、28.4 ppm の鋭いピークと、40 ppm から 11 ppm に広がるブロードなシグナルが観測された。さらに 9.3 ppm と 7.3 ppm の位置に 2 本のピークが観測された。DPA/ ZrO_2 では、44 ppm から 10 ppm まで広がったシグナルが観測され、25.4 ppm、35.9 ppm の位置にピークが観測された。

ナノ粒子表面へリン酸基が吸着すると ^{31}P NMR シグナルが低周波数側へシフトし、このシフトの変化量はリン酸基の結合状態の違いを反映していることが既に報告されている [1]。PPA/ TiO_2 と PPA/ ZrO_2 ではリン酸基がナノ粒子表面と 1 座配位、2 座配位で結合していることがわかった。同様に、DPA/ TiO_2 と DPA/ ZrO_2 ではリン酸基が 1 座配位と 2 座配位でナノ粒子表面へ結合してことがわかった。また、DPA/ TiO_2 では、9.3 ppm と 7.3 ppm のピークが観測されたことから、3 座配位しているリン酸基も存在していることが明らかになった。PPA/ ZrO_2 では -4.2 ppm にもピークが観測されたが、これは炭素と結合が切れたリン酸であると考えられる。

^{31}P CP MAS NMR により、二酸化チタンナノ粒子と二酸化ジルコニウムナノ粒子の表面に結合している PPA と DPA のリン酸基の状態を明らかにした。

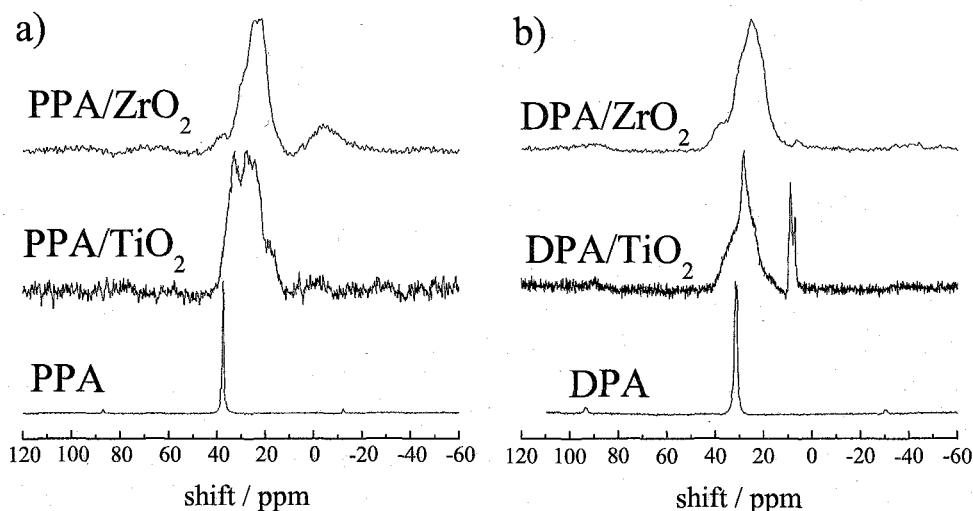


Figure 1: ^{31}P CP MAS NMR spectra of a) PPA, PPA / TiO_2 , and PPA/ ZrO_2 , and b) DPA, DPA/ TiO_2 , and DPA/ ZrO_2 .

本研究は、NEDO 超ハイブリッド部材技術開発プロジェクトの支援を受けて行なわれたものである。

【参考文献】

[1]: W. Gao, L. Dickinson, C. Grozinger, F. G. M., and L. Reven, *Langmuir* **12**, 6429 (1996).

高磁場を利用した Sc-45 NMR 測定による ペロブスカイト型プロトン伝導体の構造解析

(東北大学・工¹、北海道大学・工²、物質・材料研究機構³)

○ 安東真理子¹、及川格¹、野田泰斗¹、雨澤浩史¹、
清野肇²、丹所正孝³、清水禎³、前川英己¹

Structural analysis of perovskite type proton conductors by high magnetic field Sc-45NMR

M. Ando¹, I. Oikawa¹, Y. Noda¹, K. Amezawa¹, H. Kiyono², M. Tansho³, S. Shimizu³, H. Maekawa¹

(¹Graduate School of Engineering Tohoku University, ²Graduate School of Engineering Hokkaido University, ³NIMS)

Perovskite type protonic conductors exhibit high electrical conductivity and chemical stability that makes these oxides as a candidate material for intermediate temperature fuel cells. However, the proton migration mechanism of these materials has not been clarified on the basis of defect chemistry. Solid-state NMR can be a very useful method to study the local structure and dynamics of protons these types of conductors. In the present investigation, the local structure of defects in Sc-doped BaZrO₃ has been investigated by Sc-45 solid state MAS-NMR. Scandium ion commonly forms a trivalent state with its ionic radius and chemical properties similar to Y³⁺. The gyromagnetic ratio of ⁴⁵Sc is comparable to that of ¹³C with 100% natural abundance, thus a relatively high sensitivity can be expected. However ⁴⁵Sc is $I=7/2$ with a large quadrupole moment of $-0.22 \times 10^{28}/\text{m}^2$, a few report concerning Sc-45 solid state MAS-NMR has been reported. In the present investigation, the high magnetic field Sc-45 MAS-NMR was utilized for the local structure analysis of the BaZr_{1-x}Sc_xO_{3-δ} protonic conductor.

問合せ先：E-mail ando@tech.eng.tohoku.ac.jp

[緒言] 結晶性イオン伝導体へ添加された微量イオンの局所構造を明らかにすることは、高イオン伝導機構の解明のため極めて重要である。プロトン伝導体である希土類元素を添加したペロブスカイト型酸化物は、高い電気伝導度を示し、化学的安定性が比較的高いことから中温型燃料電池の電解質への応用が期待されている。このプロトン伝導性酸化物の欠陥構造と伝導度の関係を理解することは、イオン伝導性材料の設計をおこなう上で非常に重要である。本研究では、高磁場固体分解能 NMR 装置により、BaZr_{1-x}Sc_xO_{3-δ} (BSZ) の Sc-45 NMR による測定を行い、Sc 配位数の組成変化を捉え、イオン伝導機構との関係を明らかにすることを目的とした。

[実験方法] BZS サンプルは BaZr_{1-x}Sc_xO_{3-δ} (x=0.05~0.6) の組成で以下の手順で作製した。BaCO₃ および ZrO₂、Sc₂O₃ 粉末を混合し BaZr_{1-x}Sc_xO_{3-δ} (x=0.05~0.2) については 1300℃ で 6h か焼した後、1600℃ で 6h 焼結した。また、BaZr_{1-x}Sc_xO_{3-δ} (x=0.4~0.6) については 1300℃ で 6h か焼した後、1600℃ で 12h 焼結した。XRD 測定により単相 BZS であることを確かめた。NMR 装置に ECA-930 (JEOL)、磁場強度 21.8T を用い、3.2mm φ の試料管を用いて 22kHz まで回転させた。Sc-45 NMR の測定は共鳴周波数 225.78 MHz、Sc(NO₃)₃ を化学シフトの標準として用いた。

[結果と考察] Fig1 に標準物質として用いた $Ba_3Sc_4O_9$ のスペクトルを示す。結晶学的に等価な2つの酸素6配位サイトに対応して2本のピークが観測された。標準試料の測定から、化学シフトと配位数、Sc-O 距離の間に相関が見られた。BZS については Fig2 に示したようなピークが得られた。Sc 高濃度側になるとピークの形態が変化しており、少なくとも2本以上のピークが重なっている。これは Sc 周囲の酸素配位数の変化に対応していると考えられる。発表ではピーク分離結果と焼結温度、雰囲気依存性について報告する。

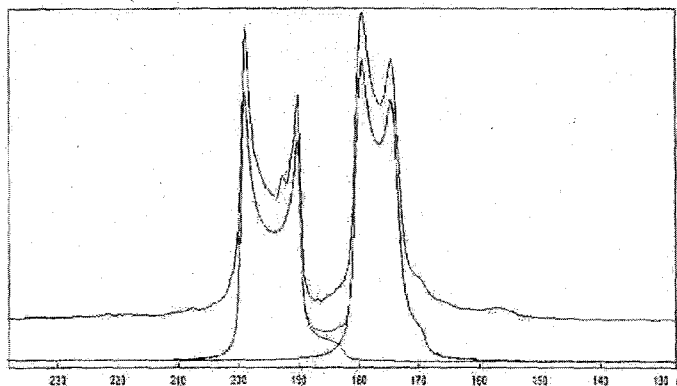


Fig.1 Sc-45 MAS NMR spectra for $Ba_3Sc_4O_9$ and its peak Separation.

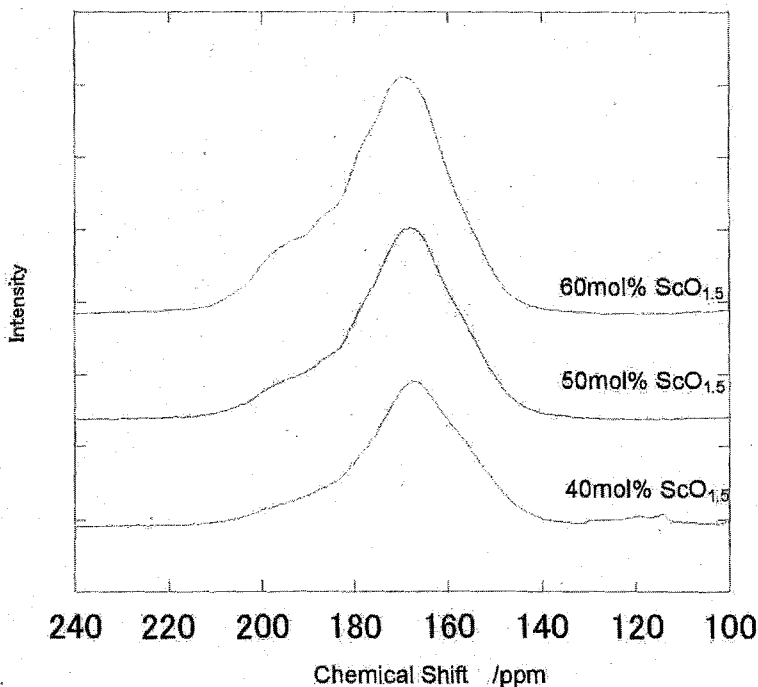


Fig.2 Sc-45 MAS-NMR spectra of $BaZr_{1-x}Sc_xO_{3-\delta}$

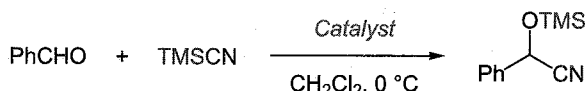
^1H - ^{27}Al FSLG HETCOR を用いた Al-MCM-41、
シリカアルミナ系触媒材料の活性点近傍の局所構造解析
(産総研) ○高橋利和・岩浪克之・坂倉俊康・安田弘之

FSLG HETCOR Study of Al-MCM-41 and Silica-alumina Catalysts Probing the Local Structure of Al(III) Sites

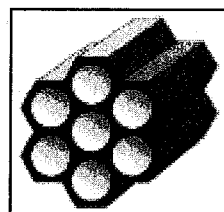
Toshikazu TAKAHASHI, Katsuyuki IWANAMI, Toshiyasu SAKAKURA, Hiroyuki YASUDA, AIST.

We have found that Al-MCM-41(Si/Al=20) is an excellent catalyst for the cyanosilylation of organic carbonyl compounds by TMSCN (2008, ChemComm). The Al, highly acidic proton, and the ordered mesopore are essential for the catalytic activity. To probe the local coordination environment of Al(III) having proton(s) in its close proximity, we have carried out FSLG HETCOR experiments for the detection of ^1H - ^{27}Al dipole-dipole interactions. Several numbers of the peaks those can be assigned to Al^{IV} (tetrahedral)-OH, Al^{IV} -OH₂, Al^{VI} -O(H⁺)-Si, Al^{VI} (octahedral)-OH, Al^{VI} -OH₂, and Al^{VI} -O(H⁺)-Si has been observed. The Al-MCM-41(Si/Al=20) has every type of Al-OH species that can be responsible for the high catalytic activity.

【はじめに】 われわれは Al-MCM-41 が TMSCN 等を用いたアルデヒド、ケトンのシアノシリル化反応の効率



よい触媒となることを見出した (スキーム, 2008, ChemComm)。この触媒系では Al、プロトン、規則的細孔の 3 要素が必須であることがわかっている。固体 NMR はアモルファス材料の局所構造の手掛かりを与えてくれる数少ない手法のひとつである。シリカアルミナ系触媒中では Si-O(H⁺)-Al 型架橋酸素上に結合した水素イオンが強い酸性を示す活性サイトとして働く。ここでは活性点にかかわりの深い ^1H - ^{27}Al 関の双極子相互作用の観測を目指した。



A Model structure of Al-MCM-41

【試料】表に示すように Al-MCM-41 (A)、アモルファスシリカアルミナ ASA20 (Al-MCM-41 とテンプレートを用いないほかまったく同様の方法で作成したアモルファスシリカアルミナ) (B)を用いた。触媒活性の測定と同様、直前に加熱乾燥させた状態か、室内の環境で水和させた状態のサンプルをローターに充填し、適宜測定に用いた。

	Al-MCM-41 (A) (Si/Al = 20)	ASA (B) (Si/Al=20)	MCM-41
Reaction rate constant k / min^{-1}	1.6	1.3×10^{-4}	0.00
BET surface area / $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	965	157	1056
Pore Volume / $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	1.14	1.21	1.06

a. Conditions: PhCHO (1.0 mmol), TMSCN (1.2 mmol), catalyst (5 mg), in dry CH_2Cl_2 (10 mL), 0 °C, under Ar. b Obtained by N₂ adsorption at 77K.

【実験】 実験は ^1H -X MAS プローブを備えた Bruker AVANCE NMR 装置 (ν_{OH} : 400.13 MHz) 上、4 mm ϕ ローター、回転速度 12.5 kHz で測定した。FSLG HETCOR 実験はパルス強度 71kHz の ^1H FSLG シーケンス ($\Delta\nu_{\text{H}} = 83.3$ kHz) 照射直後、 $^1\text{H} \rightarrow ^{27}\text{Al}$ Ramped CP を行い、 ^{27}Al の FID を観測した。FSLG 時間を t_1 、FID の時間を t_2 軸として、96 個の FID を取得し、二次元フーリエ変換を行った (Fig. 1)。F₁ 軸の校正と接触時間策定のために、モノエチルマル酸の ^1H - ^{13}C FSLG HETCOR 実験を別途行い、接触時間を 200 μs に設定することで CH_2 型ジェミナルプロトンのシグナルが分離可能であることと、C-H 間距離 2.5 Å 以内のシグナルを選択的に観測できることを確認し、 ^1H - ^{27}Al 実験の ^1H 側で同一の条件を用いた。

【結果と考察】 A においては四配位 (Al^{IV} ; ~ 50 ppm)、六配位 (Al^{VI} ; ~ 0 ppm) とともに -1 \sim 2、3 \sim 6、6 \sim 8 ppm 付近にそれぞれ交差ピークが見出された (Fig. 1)。われわれはこれらのシグナルをそれぞれ Al-OH (配位水酸基)、Al-OH₂ (配位水)、Al-O(H⁺)-Si (架橋水酸基) とアサインした。四配位の配位水及び架橋水酸基は強い酸性を示し、六配位の水酸基は塩基性をもつサイトとなると推定される (Fig. 2)。なお、配位水のアサインに関しては、(1) これらのピークが ^1H MAS 1D スペクトルの孤立したプロトンに基づくシグナルとは異なるブロードな水の位置にケミカルシフトを持つこと、

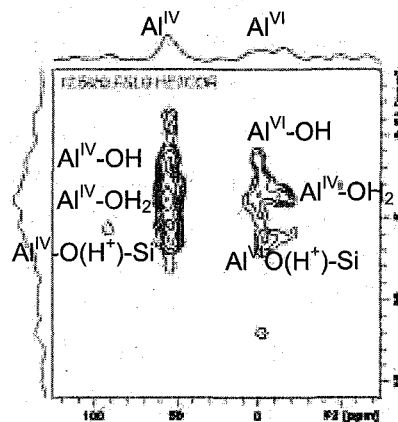


Fig. 1 ^1H - ^{27}Al FSLG HETCOR of A.

(2) FSLG を用いない HETCOR 実験において、ブロードなシグナルとしてのみ見出され、ピークとして現れないこと、の 2 点を根拠とした。結果として A には酸点、塩基点ともに存在することが分かった。一方、B には四

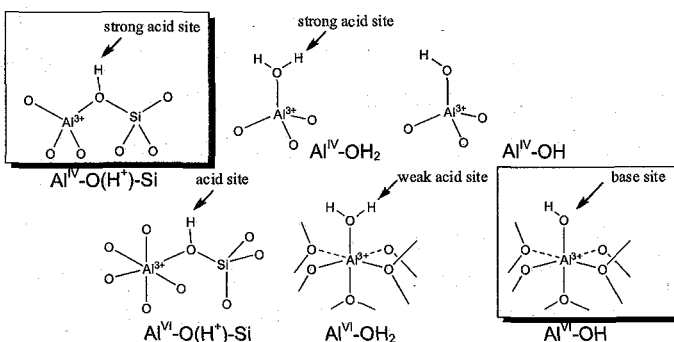


Fig. 2 Plausible Al(III) local coordination environments in silica-alumina.

配位が優勢で六配位がほとんど観測されず、塩基点が見出されなかったことから、高活性発現のためには酸点、塩基点の双方が必要であると考えられる。(本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の支援により行われた)。

キーワード ^1H - ^{27}Al FSLG HETCOR, 固体 NMR, Al-MCM-41 触媒, アモルファスシリカアルミナ触媒, シアノシリル化反応

○たかはしとしかず、いわなみかつゆき、さかくらとしやす、やすだひろゆき

超高磁場 21.8 T NMR システムを用いた Ti-Mg 触媒の構造解明

1 日本電子(株)、2 東邦チタニウム(株)、3(独)物質材料研究機構

○ 中井利仁 1、齋藤雅由 2、内海博明 1、藤田孝 2、出口健三 3、大橋竜太郎 3、
清水禎 3

Under an ultra high magnetic field of 21.8 T, $^{47,49}\text{Ti}$ and ^{25}Mg NMR spectra were, for the first time, observed successfully for materials of practical value. The resonance frequencies of $^{47,49}\text{Ti}$ and ^{25}Mg at 21.8 T are respectively 52.4 MHz and 56.9 MHz, whereas the ^1H resonance frequency is 929.84 MHz; $^{47,49}\text{Ti}$ and ^{25}Mg are, what we call, low- γ nuclei whose NMR signals are difficult to detect under moderate magnetic fields. Specifically in this study, we illustrate the $^{47,49}\text{Ti}$ and ^{25}Mg spectra of co-milling of TiCl_4 and MgCl_2 , one of MgCl_2 -supported Ti-Mg catalysts, promoting polymerization of polyethylene. The $^{47,49}\text{Ti}$ spectra change from sharp lines to quadrupolar powder patterns as co-milling time increases. The microscopic structures are discussed in details.

<序> 通常、 $^{47,49}\text{Ti}$ や ^{25}Mg のように Larmor 周波数の低い、いわゆる低 γ 核に対する NMR 測定は困難であり、もっぱら一部の「好都合な化合物」に対するスペクトルが報告されている。困難の根本的な原因は低い観測周波数に基づく低感度であり、さらに上記のような四極子核に対しては、2次四極子相互作用による共鳴周波数の広がりが一層の感度の低下を招く。この問題を解決し、低 γ 核の NMR 測定を通じて実用的な物質を研究するためには、超高磁場 NMR システムの開発とその利用が必須となる。

我々は、物質材料研究機構に建設された超高磁場 21.8 T NMR システム「ECA930」を用いて、実用的な材料物質に対する $^{47,49}\text{Ti}$ および ^{25}Mg スペクトルの測定に成功した。特に本研究では、特定の Ti-Mg 触媒を題材として、触媒作用機序の発現と微視的構造の関連の解明を目指している。

<NMR 測定> ・分光計： 物質材料研究機構 JNM-ECA930

・プローブ： JEOL SH93X4L 平衡共振一重共鳴 4mm MAS プローブ

・静磁場強度 B_0 ： 21.84 T (^1H Larmor 周波数： 929.84 MHz)

・測定核種と Larmor 周波数： $^{47,49}\text{Ti}$ ： 52.4 MHz、 ^{25}Mg ： 56.9 MHz

キーワード： 超高磁場、低 γ 核、 $^{47,49}\text{Ti}$ 、 ^{25}Mg 、Ti-Mg 触媒
なかい としひと、さいとう まさよし、うつみ ひろあき、ふじた たかし、
でぐち けんぞう、おおはし りゅうたろう、しみず ただし

<測定試料> ・MgCl₂担持型触媒として、MgCl₂（無水和物）とTiCl₄（neat liquid）の混合物を振動ミルにて共粉碎し、粉碎時間を0、2、5、20時間とした4つの異なる試料を用意した。なお、この実試料「Ti-Mg触媒」との比較のため、また^{47,49}Ti化学シフト標準として、TiCl₄（neat liquid）も合わせて測定した。

・Ti-Mg触媒はポリエチレン（PE）重合のための触媒として作用することが知られている。その触媒活性（PEのyield）と粉碎時間の相関は右図の通りである。すなわち、粉碎時間の延長に伴い触媒活性が直線的に向上することが確認された。

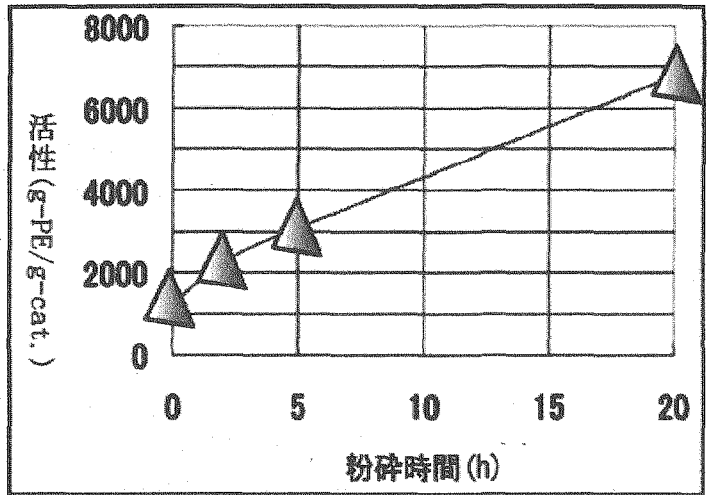


Fig. 1 Yield of PE vs. co-milling time.

<^{47,49}Ti NMR 測定結果> 下図に各粉碎時間をかけて用意した4つのTi-Mg触媒に対する^{47,49}Ti MAS NMRスペクトルを掲げる。比較のため、TiCl₄（neat liquid）に対するスペクトルを最上に示す。図中には、それぞれの共鳴線の位置（化学シフト/ppm）と線幅（半値全幅/Hz）を表示している。

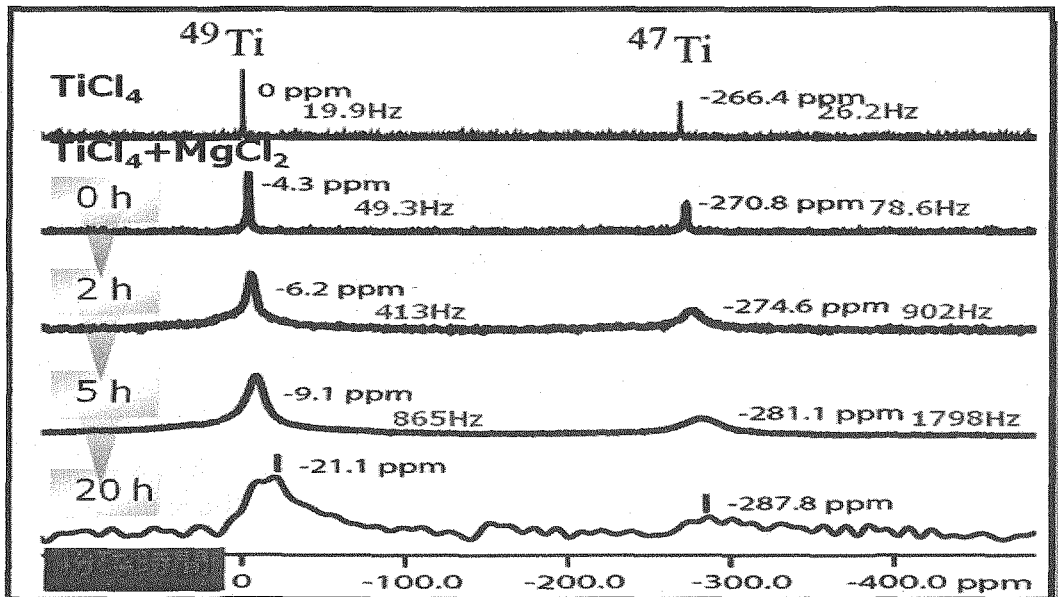


Fig. 2 ^{47,49}Ti spectra of Ti-Mg catalysts having co-milling times of 0 to 20 hours.

<^{47,49}Ti スペクトルが示す物理現象> 図2に示したように、TiCl₄ (neat liquid) あるいは粉碎時間0のTiCl₄・MgCl₂混合物から出発して粉碎時間を延長した場合、^{47,49}Ti 共鳴線の位置および線幅に変化が見られた。粉碎時間0~5時間の試料に対するスペクトルは液体スペクトルに類似しており、粉碎時間20時間の試料に対するスペクトルは2次四極子相互作用を反映した四極子粉末パターンである。すなわち最も自然な解釈として、上記のスペクトル変化は自由なTiCl₄液体分子がMgCl₂微粉末粒子に担持・固定化される過程を示している。

スペクトルの詳細は以下の通りである。粉碎時間20時間の試料に対する粉末パターンは、2次四極子相互作用に由来する共鳴線の広がりA₄および高磁場側への等方的四極子シフトA₀を示している。ここでA₀およびA₄は、2次四極子相互作用と化学シフトに支配された核に対する共鳴周波数、

$$V = [V_{iso} + V_{CSA} \cdot P_2(\cos\theta_m)] + [A_0 + A_2 \cdot P_2(\cos\theta_m) + A_4 \cdot P_4(\cos\theta_m)],$$

の係数である(MASのためにP₂(cosθ_m)の項は除去されている)。また当然ながら、TiCl₄ (neat liquid) の共鳴線位置は等方的化学シフトV_{iso}のみで与えられる。

粉碎時間0~5時間の試料は、TiCl₄液体分子と固体Ti原子に対するスペクトルの「中間的なスペクトル」を示しており、両状態にあるTi原子の速い交換を反映している； 粉碎時間延長に伴う共鳴線位置の変化(高磁場シフト)と線幅の変化(広幅化)は、交換現象の平衡が液体側から固体側へと漸次、移動することを示している。

線幅に関しては次の議論が成り立つ。四極子粉末パターンの広がりΔvは次式で与えられる。

$$\Delta v \propto \frac{Q^2 [I(I+1) - 3/4]}{\gamma [2I(2I-1)]^2}$$

同位体⁴⁷Tiおよび⁴⁹Tiの諸定数

(右表)より、固体生来の⁴⁷Ti共鳴線は⁴⁹Ti共鳴線のおよそ3倍の広がりをもつことが分かる(右の模式図参照)。

$$\frac{\Delta v(^{47}\text{Ti})}{\Delta v(^{49}\text{Ti})} = 3.44.$$

前頁のTi-Mg触媒スペクトルにおいて、粉碎時間延長に伴い線幅の比はおよそ1:1から1:2に増加しており、完全な固体に対する比1:3.44へと漸近する途中であると推察することができる。この推察が正しいければ、上述の「中間的なスペクトル」が液体状態のTiCl₄分子と固体状態のTi原子の交換スペクトルであることを強力に支持するものとなる。

Isotope	Spin I	Natural Abund. %	Receptivity rel. to ¹³ C (rel. to ¹ H)	γ/2π MHz/T	Quad. Moment Q fm ⁻²	Frequency ν _L MHz (21.84 T)
⁴⁷ Ti	5/2	7.44	0.864 (1.52x10 ⁻⁴)	-2.4040	30.20	52.420
⁴⁹ Ti	7/2	5.41	1.176 (2.07x10 ⁻⁴)	-2.4048	24.70	52.434

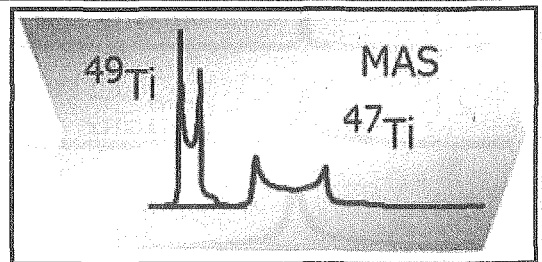


Fig. 3 Schematic spectra of ⁴⁷Ti and ⁴⁹Ti powder patterns.

<線幅の検討～²⁵Mg スペクトル> Ti-Mg 触媒では高い確度でTi原子の交換が起こっているが、同時に、粉碎によって MgCl₂ 粒子径が小さくなることにより、体積磁化率のために局所磁場が乱れて ^{47,49}Ti 共鳴線が広幅化する可能性は排除できない。

この不均一磁場の効果を評価するために、同じ試料に対して ²⁵Mg 測定を行ない、Ti原子の交換がない系として MgCl₂ を単独で粉碎した場合のスペクトルと比較した。

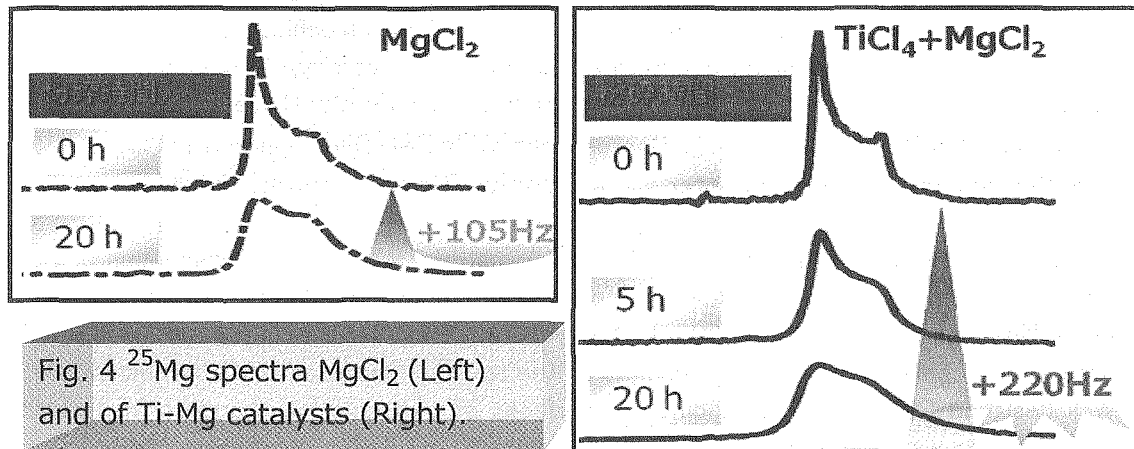
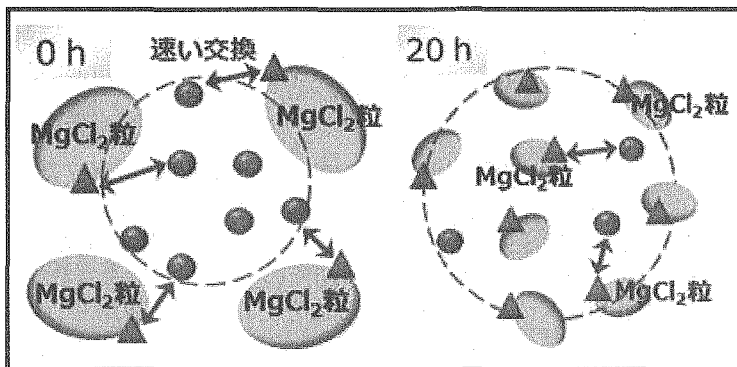


Fig. 4 ²⁵Mg spectra MgCl₂ (Left) and of Ti-Mg catalysts (Right).

MgCl₂ に対する結果は、確かに粉碎による粒子径減少により、Ti 原子の交換と無関係に共鳴線の広幅化が起こることを示している。しかし、Ti-Mg 触媒における広幅化は不均一磁場の寄与を大きく越えるものであり、Ti 原子交換の変化が反映されている。

<共粉碎がもたらす物理現象> 以上のように、MgCl₂・TiCl₄ 混合物の共粉碎はTi 原子の液体・固体間の交換を変化させる。しかし、Ti 原子が MgCl₂ 固体格子に取り込まれることはあっても、MgCl₂ 粒子近傍の TiCl₄ 液体分子全体（または分子中の Ti 原子）が固体格子中に固定化され再び自由な液体分子に戻る速い交換は考えにくい。現在考えられるモデルは、自由な TiCl₄ 液体分子と MgCl₂ 表面に束縛された TiCl₄ 分子の交換の平衡が共粉碎とともに移動するものである。

Fig. 5 Exchange model of TiCl₄ in co-milled Ti-Mg catalysts.
● : Free TiCl₄,
▲ : Bound TiCl₄.



<結語> 低γ核に対して超高磁場 NMR システムを利用することによって初めて、Ti-Mg 触媒の動的構造が明らかになった。しかしその一方で、触媒作用の機序が十分に解明されたわけではない。広大な触媒化学に対して、本研究が NMR を用いた最初の小さな一歩になることを祈念してやまない。

各種カーボンナノファイバーの分子吸着特性の解析

九大先導研¹, 九大総理工², 新日本製鐵(株)³, 九大産学連携セ⁴,
松尾賢典², ○出田圭子¹, 宮脇仁¹, 齋藤公児³, 持田勲⁴, 尹聖昊¹

Analysis of molecular adsorption property in various surfaces of carbon nano-fibers

Yoshinori Matsuo², Keiko Ideta¹, Jin Miyawaki¹, Koji Saito³, Isao Mochida⁴, Seong-ho Yoon¹

¹Institute for Material Chemistry and Engineering, Kyushu University,

²Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University,

³Environment & Process Technology Center, Ironmaking R&D Div., Nippon Steel Corp.

⁴Art, Science and Technology Center for Cooperative Research, Kyushu University

Carbon nano fiber (CNF) is a promising nano-material for the wide applications to the advance energy and environmental devices because of its variety of surfaces, shapes, crystalline properties and dimensions. In this presentation, the authors examined adsorption properties of polar and non-polar solvents to the specified surfaces of carbon nanofibers. Well designed CNFs which have different surfaces of edge and basal ends of molecular arrangements were used for ²H-NMR measurements.

【序論】

カーボンナノファイバー(CNF)はその多様な表面、形態、結晶性、及びサイズによりエネルギーと環境分野への広範な応用が期待されている。CNFは基本的にPlatelet (PCNF), Tubular (TCNF), Herringbone (HCNF)の異なる組織を持ち、その表面は炭素六角網面の配列によって端面と基底面に区別できる。こうしたCNFは2800°Cで熱処理することによって表面がドーム型の基底面になると共に合成触媒金属が完全に除去され、炭素のみで構成される。これらのCNFに対して硝酸表面処理を行い、端面部分の形状や官能基を変化させたものに対して、溶媒を物理吸着させることによりCNFの構造のみの違いによる吸着能の違いを検討することが可能である。今回は、極性の異なるいくつかの重水素化分子を吸着させ、固体²H-NMRを測定することにより、各種CNFにおける吸着状態の解析を行った。

【実験】

各種CNFは、触媒及びガス種の調整により作成した後、2800°Cで熱処理することによって黒鉛化を行うことによって表面の基底面化を行うと共に合成触媒金属を除去した。さらに、これらに対し硝酸処理を行うことで、表面ドーム構造が除去されて端面が露出した (Fig. 1)。つづいて、水素処理を行うと、端面の官能基が除去される。²H-NMR測定は、JEOL ECA-400 (²H; 61.4MHz, ²H₂Oを基準 0ppmとした。)を使用し、6mmφ CP/MASプローブを用いた。各CNFに重水素化液体分子 (²H₂O, C₆²H₆等)と混合したものを8 kHzにてMAS測定し、飽和回復法によりT₁を求めた。

キーワード： 固体²H-NMR 炭素ナノ繊維、吸着、極性、端面、基底面
まつお よしのり、いでた けいこ、みやわき じん、さいとう こうじ、もちだ いさお、ゆん そんほ

【結果と考察】

Fig. 2に示したように、CNFの表面構造の違いによってgraphitized-TCNFは高磁場側、PCNFは低磁場側に吸着のピークが現れており、硝酸によりCNF表面の端面を出すことによっていずれも高磁場シフトした。

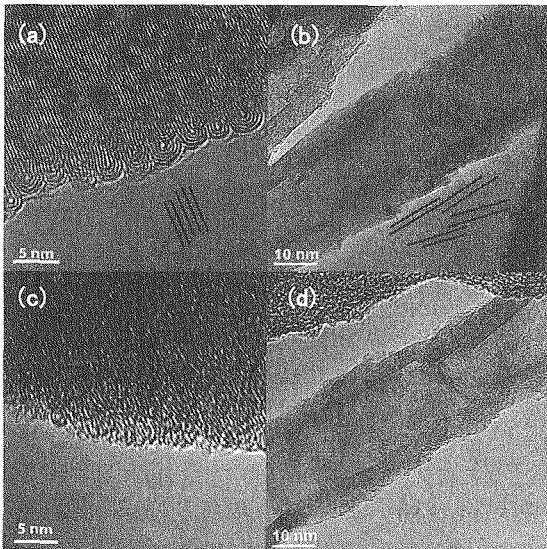


Fig.1 TEM images of (a) graphitized-PCNF, (b) graphitized-TCNF, (c) HNO₃ treated-PCNF, and (d) HNO₃ treated-TCNF

PCNFとTCNFは繊維方向に対するグラファイト面の方向が約90度異なる。

PCNFの端面がドーム構造 (graphitized-PCNF) の場合、吸着状態を表すブロードなピークは吸着していないシャープなピークに対し低磁場側にあるが、硝酸処理を施すことで端面を露出させると高磁場シフトし、シャープなピークとの化学シフト差が無くなっている。

対して、graphitized-TCNFは高磁場側に吸着ピークが出ており、硝酸処理後はさらに高磁場シフトする。これらの現象は吸着分子の極性にかかわらず、類似の傾向にあり、それぞれCNFの構造を反映しているものと考えられる。

さらに、吸着分子が²H₂Oの場合はその変化が顕著に表れており、分子の極性の影響が現れたものと考えている。

今後、端面数とT₁測定による吸着強度の定量的相関を更に検討する予定である。

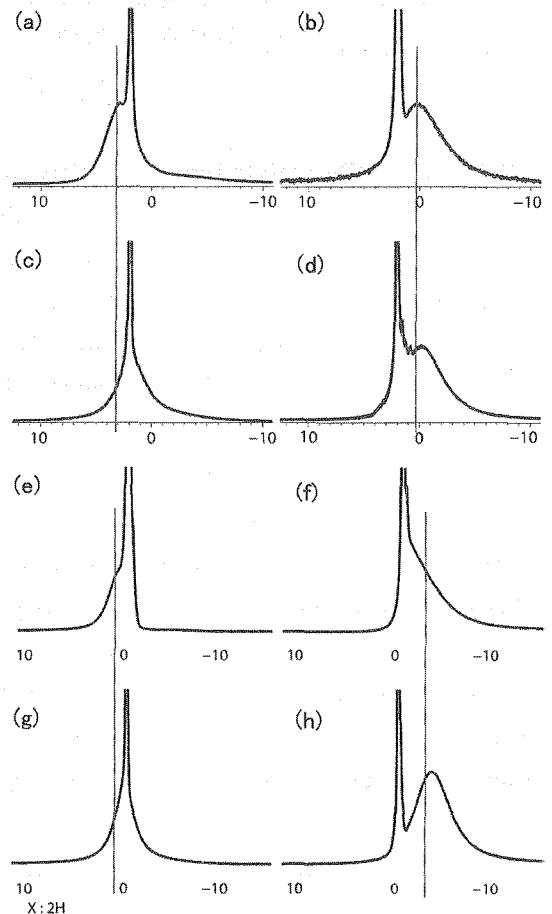


Fig.2 ²H-MAS spectrum of graphitized or HNO₃-treated CNFs. Adsorbed molecule of (a)-(d) and (e)-(h) is C₆H₆, ²H₂O, respectively. (a),(e); graphitized-PCNF, (b),(f); graphitized-TCNF, (c),(g); HNO₃ treated-PCNF, and (d),(h); HNO₃ treated-TCNF.

電解質イオン挙動の解析

¹九州大学先導物質化学研究所、²新日本製鐵（株） 環境・プロセス研究開発センター 製鉄研究開発部○ 齋藤正規¹、金泰坤¹、張相敏¹、出田圭子¹、宮脇仁¹、齋藤公児²、○ 尹聖昊¹、持田勲¹**Behavior of Electrolyte Ions in Electric Double Layer capacitor by Multiple-Quantum Solid State NMR**¹Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, ²Nippon Steel Corporation Environment & Process Technology Center; Ironmaking R&D Div.○ Masanori Saito¹, Tae-Gon Kim¹, Sang-Min Jang¹, Keiko Ideta¹, Jin Miyawaki¹,
Koji Saito², Seong-Ho Yoon¹, Isao Mochida¹

The anion behaviors of EDLC electrolyte were examined using solid NMR method. Chemically activated carbons with various surface areas (500-2000m²/g) and pore size distributions were selected as electrode materials of EDLC. Tetrafluoroborate anion (BF₄⁻) in organic EDLC showed sharp and broad peaks at the impregnated, charged and discharged states, which meant different ionic patterns according to the adsorption states. The authors assigned that the sharp peak is ascribed to free BF₄⁻ and broad peak to the adsorbed BF₄⁻ on the pore wall surfaces, respectively. The longitudinal relaxation time (T₁) of each peaks were also obtained at each impregnated, charged and discharged states. T₁ decreased at the charged state, meaning the constrained state of ions by the formation of electric double layer.

1. はじめに

電気二重層キャパシタ (Electric Double Layer Capacitor: EDLC) はサイクル特性、急速充放電、寿命などの点で優れており、電気貯蔵デバイスとして期待されている。こうした電気二重層キャパシタの容量とレート特性は、電解質を形成するイオンの挙動によって影響されると知られている。しかしながら、電気二重層を形成する活性炭の表面と気孔内におけるイオンの挙動はまだ明らかになっていない。

本研究では、賦活条件を精密に制御し様々な表面積や気孔サイズを持つ活性炭を調製した。これらを電極とし、充放電時、有機系と無機系電解質イオンの挙動を多核固体 NMR で調べ、表面積と気孔のサイズに対するイオンの充放電挙動を精密に検討した。

キーワード：多核固体 NMR、活性炭、電気二重層キャパシタ

著者ふりがな：さいとうまさのり、きむてごん、じゃんさんみん、いでたけいこ、みやわきじん、さいとうこうじ、ゆんそんほ、もちだいさお

2. 実験

高密度粒子状コークス (High Density Particular Cokes : HDPC) をKOHで薬品賦活することで調製した。電気二重層キャパシタ用電極は、調製した活性炭を活物質、ケッチェン・ブラック (Ketjen Black:KB)を導電材、ポリテトラフルオロエチレン (Polytetrafluoroethylene:PTFE) をバインダーとし、それぞれ8 : 1 : 1の割合で混練し作成した。作成した電極を有機系 (Et_4NBF_4) および無機系 (D_2SO_4) の電解質溶液中で2.5Vまで充放電させた。電解質溶液の含浸、充電、及び放電状態の電極についてJEOL ECA400 ^{11}B 固体NMR (^{11}B :128.3MHz)で測定を行い、電解質イオンの状態を調べた。

3. 結果と考察

活性炭はKOH/HDPC比や賦活温度を変化させることにより、表面積を $500\text{m}^2/\text{g}\sim 2000\text{m}^2/\text{g}$ の範囲で調整することができた。KOH/HDPC比や賦活温度が高くなると表面積が増加する傾向を示した。

一例として、表面積 $1200\text{m}^2/\text{g}$ の活性炭 (M1200) を用いた有機系電気二重層キャパシタのキャパシタンスはおよそ $31\text{F}/\text{g}$ ($15\text{F}/\text{ml}$)を示した。Fig. 1にM1200を用いた電極の正極について固体 ^{11}B NMR測定を行った結果を示す。いずれの状態においても幅広いピーク (A) と鋭いピーク (B) が観察された。ここで、(A) は細孔内に吸着している BF_4^- 、

(B) はフリーな BF_4^- によると考えた。これらのピークの緩和時間 (T_1) をTable. 1に示す。充電時の T_1 が他の状態に比べ短くなっている。これは、正極とアニオン (BF_4^-) が強く相互作用していることにより T_1 が短くなったためと考えられる。

発表では、異なる表面積を有する活性炭の測定結果をまじえて、表面積、気孔サイズ、電解質イオンの影響について報告する。

Table.1 Longitudinal relaxation time (T_1) of two peaks at impregnated, charged and discharged states.

	A peak	B peak
Impregnated	1.40 s	4.35 s
Charged (+)	0.23 s	0.40 s
Discharged (+)	1.16 s	5.05 s

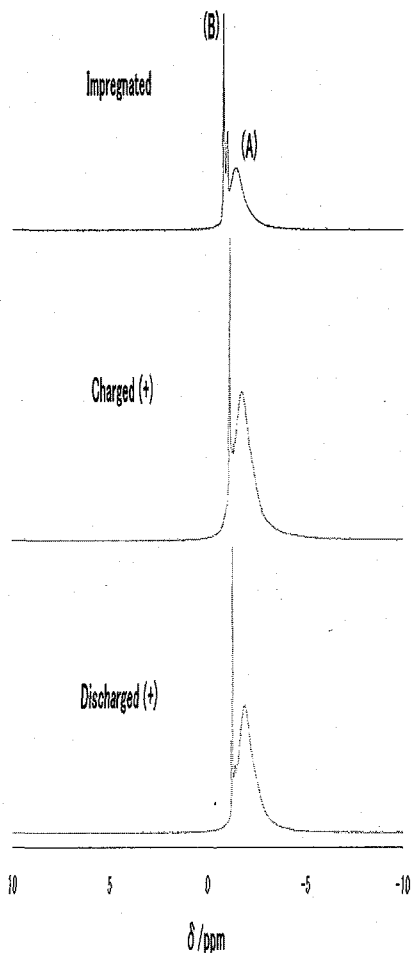


Fig.1 ^{11}B -NMR spectra of BF_4^- in M1200 positive electrode at impregnated charged and discharged states. The (A) and (B) peaks were attributed to absorbed and free BF_4^- , respectively.

独立行政法人 産業技術総合研究所 サステナブルマテリアル研究部門¹, 計測
フロンティア研究部門², ○杉元宏行¹, 三木恒久¹, 金山公三¹, 西田雅一²

Study on the interaction between wood materials and various solvents with the solid state NMR method

Materials Research Institute for Sustainable Development, AIST

Abstract: To clarify the relationship between the fine structure and the properties of wood materials, we performed solid-state NMR analysis on the wood materials and the cellulose pulp(Cel) impregnated with various solvents. Despite being above melting temperature of solvents, ¹³C CP/MAS NMR spectra were observed in the wood materials in accordance to Ethylene Glycol (EG) and Methanol (MeOH). These results suggested that the movement of the solvent molecules in wood was restricted in the micro pore. This assumption is consistent with the dielectric and dynamic mechanical measurements results in our preceding studies. On the other hand, although MeOH peak was observed in Cel above melting temperature, EG peak was not observed. The micro pore which can restrict the movement of EG may not exist in Cel.

【緒言】

近年、石油資源由来プラスチックの代替として、木質材料が注目を集めている。その構造・物性に関する知見の蓄積は、木質材料をベースとした新しい機能性材料とその工業的な製造・加工に必要な不可欠である。木質材料は、結晶・非結晶性セルロースおよびヘミセルロース、リグニンが水素結合により複雑に絡み合った構造を持っていると考えられているため(図1)、微細構造変化と物性との対応については、解明されていない点が多い。特に、水をはじめとした水素結合性の溶媒による吸・脱着は、木質材料の著しい強度と寸法の変化を招くが、それに伴う微細構造の変化についての詳細は不明である。

これまで、発表者らは、様々な含水率の木材に対して誘電緩和測定および動的粘弾性試験を行い、木質材料の微細構造と水との相互作用について調べてきた。その結果、木質材料中の水酸基などの吸着点を有するナノ空間に束縛された水分子は、氷類似の運動性を持っていることを明らかとした。

本研究では、各種溶媒(EG:エチレングリコール、MeOH:メタノール、EtOH:エタノール、Tol:トルエン)を吸着させた木質材料に対して温度可変¹³C CP/MAS測定を行うことにより、上記微細空間中での液体の運動性と木質材料との相互作用について検討した。

Key Word: Wood Materials, Solid-state NMR, Solvent, Variable temperature, Ethylene glycol

すぎもと ひろゆき、みき つねひさ、かなやま こうぞう、にしだ まさかず

【実験】

奈良県産ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)の辺材部をワイレーミルにより粉碎し、細胞構造が保たれる 100mesh オンの粉末を選別した。この粉末とそれに各種溶媒 (EG: エチレングリコール、MeOH: メタノール、EtOH: エタノール、Tol: トルエン) を減圧含浸したものを試料として用いた。

固体 NMR 測定は、乾燥試料については、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 で行い、溶媒含浸試料については、Varian 社製 NMRsystems400 で Varian 社製 4mm リキッドローターを用い、試料回転数: 10k rpm、CP time: 2 msec、測定温度 $-50\sim 100^{\circ}\text{C}$ でスペクトル測定を行った。

【結果・考察】

図 2 に種々の温度で測定を行った EG を含浸したヒノキの ^{13}C 固体 NMR のスペクトルを示す。EG の融点 (-12.6°C) 以上であるにもかかわらず、全ての測定温度で 63ppm 付近に EG に基づくピークが検出された。木質材料単独ではこのピークは観測されないため、これは木質材料中の EG によるものと考えられる。これまでの誘電緩和および動的粘弾性測定によるわれわれの研究において、吸着している溶媒分子の運動に基づく緩和が Arrhenius 型を示すことを明らかにしており、その原因として、細胞壁中のマイクロ孔 (図 1) 内に閉じ込められた吸着分子が局所的な運動性を持つためであると推察してきた¹⁾。また、その運動性は極度に低下しており、例えば水の場合は、氷と類似の運動性を示すことを明らかにしている²⁾。2msec の CP 条件下で EG 由来のスペクトルが得られたことから、木質材料中の EG の運動性が極度に低下していることが推察され、この結果は上記仮説を支持するものであった。

一方、セルロースパルプに EG を含浸させた場合、同様のピークは観測されなかった。次に、MeOH について同様の測定を行ったところ、融点以上であるにもかかわらず、木質材料・セルロースパルプ共に MeOH のピークが見出された。これらのことから、溶媒を閉じ込める微細な空隙がセルロース微結晶間に存在すること、およびその空隙の性質が木質材料とセルロースパルプとで異なることがそれぞれ推定された。今後、極性および分子寸法の異なる溶媒分子についても検討し、それらと木質材料との相互作用についても検討する。

1) H. Sugimoto, T. Miki, K. Kanayama, M. Nishida, IVth International conference on TIMES OF POLYMERS and composites, AIP Conference Proc. 2008
2) H. Sugimoto, T. Miki, K. Kanayama, M. Norimoto, J. Non-Cryst. Solids., 354 (27), 2008

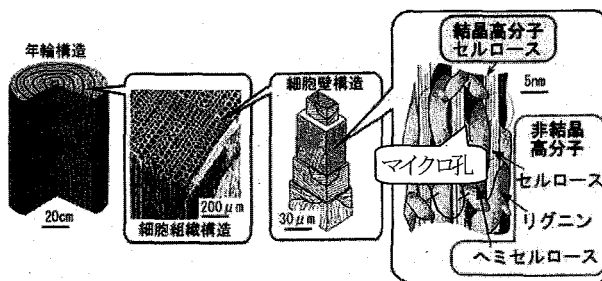


Fig.1. Schematic illustration of the fine structure of wood

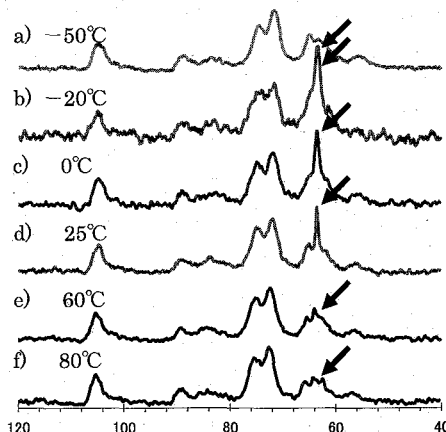


Fig.2. Solid-state ^{13}C NMR spectra of EG-Wood

固体 NMR によるフェリチン結晶の水和水の
ダイナミクスの研究

(金沢大院・自然) ○新屋 隆士, 宮東 達也, 水野 元博

Solid NMR study of hydrated water dynamics in ferritin crystals

T. Araya, T. Miyatou, M. Mizuno

Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

In this study, we prepared ferritin, the protein involving paramagnetic Fe. We measured the temperature dependence of ^2H NMR spectra and spin-lattice relaxation time (T_1) for the powder samples with different amount of hydrated water. Magnetization recovery showed two components. The minimum of T_1 were observed at about 260 K for the short component. The long component could be fitted by single exponential function. The ^2H spectra showed asymmetric line shape due to the effect of paramagnetic metal. The temperature dependence of ^2H NMR spectra and T_1 were simulated by considering the quadrupole interaction and the dipole interaction between the ^2H nucleus and the Fe^{3+} ion. The dynamics of water molecules in the ferritin crystal were analyzed.

<序>

近年、タンパク質結晶は構造解析のために用いられるだけでなく、新規機能性材料としても注目されており、様々な物性研究が行われている。フェリチンは、直径約 13 nm の球状タンパク質で、中心に空洞を持ち、空洞内に鉄(III)イオンを取り込んでいることが知られている。金属イオンを有するタンパク質結晶は、新規の半導体加工技術としての応用が期待されている。また、タンパク質結晶は水和量による構造や機能の変化が示されてきた。このようにタンパク質結晶の構造や機能は、水和水の影響を大きく受けるため、水和水の局所的な構造やダイナミクスの解析はタンパク質結晶の物性の研究において極めて重要である。本研究では、常磁性金属の鉄(III)イオンを含んだ異なる水和量のフェリチン結晶について、固体重水素 NMR スペクトル、および T_1 を室温から -100 °C 以下の温度領域について測定を行った。フェリチン結晶中の水分子の様々な運動と常磁性金属の影響を考慮した、スペクトルおよび T_1 のシミュレーション解析によって、異なる水和量のリゾチーム結晶についてそれぞれ水和水の挙動を詳細に調べた。

<実験>

ウマ脾臓由来のフェリチンを重水で3回再結晶することによって水分子を重水素化しこれを試料とした。水和量は、重水蒸気を吸着させる時間と乾燥時間によって調節した。 ^2H NMR の測定は Chemagnetics CMX-300 を用い、共鳴周波数 45.818 MHz で行った。 ^2H NMR スペクトルの測定は四極子エコー法と exocycle 四極子エコー法[1]、 T_1 の測定には反転回復法を用いた。

重水素 NMR、タンパク質結晶、常磁性

あらやたかし、みやとうたつや、みずのもとひろ

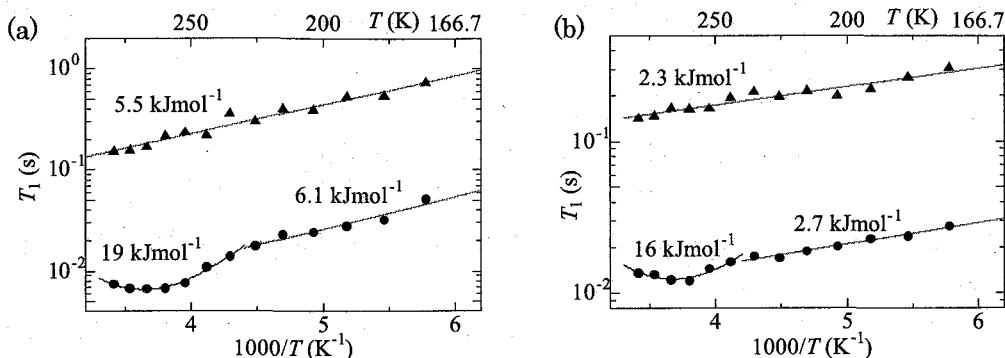


Fig. 1 Temperature dependence of ^2H NMR T_1 for (a) wet sample and (b) dry sample.

<結果>

Fig. 1 に水和量の異なる 2 種類の重水素化フェリチンの T_1 の温度変化を示す。どちらの試料においても short 成分は 260 K 付近に水分子の等方回転運動に伴う極小が観測された。水和量の多い試料が、より等方回転運動による極小の影響が顕著に現れた。 T_1 の極小付近で BPP の理論式を用いてフィッティングを行うと水分子の運動の活性化エネルギーが、水和量の多い試料は 19 kJmol^{-1} 、水和量の少ない試料は 16 kJmol^{-1} と見積もられた。また、short 成分は 240 K 以下で、高温側の T_1 の曲線からずれ、単一の指数関数によってフィッティングができた。long 成分は、両方の試料ともすべての温度領域で単一の指数関数によってフィッティングができた。

Fig. 2 に ^2H NMR スペクトルの温度変化を示す。水和量の多い試料は、室温領域で水分子の速い等方回転運動による中心付近のシャープな成分が観測された。温度の低下とともに等方回転運動が徐々に遅くなり、ブロードな成分が現れた。ブロードな成分は非対称な線形となっているが、これは常磁性金属の影響による歪みであると考えられる。水和量の少ない試料は室温からブロードな成分が観測された。

^2H NMR スペクトルの中心付近のシャープな成分は、ブロードな成分よりも早い磁化の回復が観測された。short 成分は中心付近の成分、long 成分はブロードな成分で、このことから、260 K 付近に見られる T_1 の short 成分の極小は水分子の等方回転運動に伴うものであると予想される。

常磁性金属の効果を考慮したシミュレーションを用い、 ^2H NMR スペクトルの変化についても解析を行う。

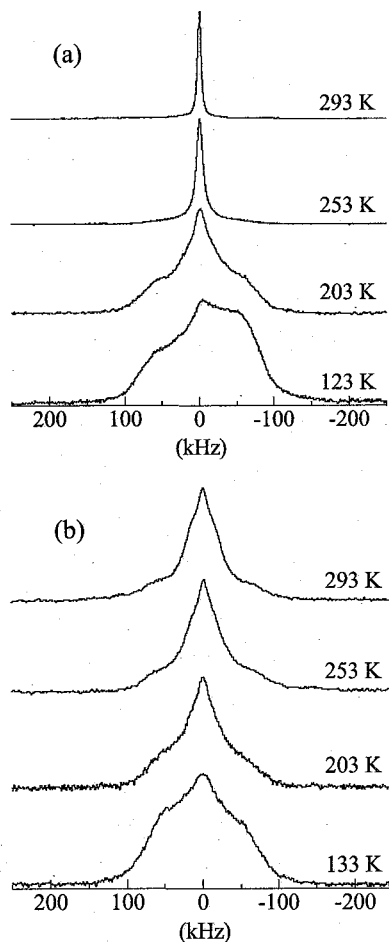


Fig. 2 Temperature dependence of ^2H NMR spectra for ferritin. (a) wet sample and (b) dry sample.

[1] S. Antonijevic, S. Wimperis, J. Magn. Reson. 164 (2003) 343.

超高温in-situ NMRプローブの開発とガラス材料への応用

新日鐵先端研[1]、日本電子[2]

○金橋康二[1]、山腰良晃[2]、氣田佳喜[2]

Development of in-situ high temperature NMR probe and its application to a glass material

Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation[1], JEOL Ltd.[2]

Koji Kanehashi[1], Yoshiaki Yamakoshi[2] and Yoshiki Kida[2]

A new in-situ high temperature NMR probe has been developed for 9.4 T (^1H : 400 MHz). The probe stably works up to 1500 degrees C. Tuning covers a very wide frequency range, 400 – 61.1 MHz, and major inorganic nuclei composed of glass, ceramics, catalyst etc. such as ^{31}P (161.83 MHz), ^{11}B (128.27 MHz), ^{27}Al (104.17 MHz), ^{29}Si (79.43 MHz) are within this range. Irradiation of RF fields is very effective: 208 and 43 kHz at 25 and 1500 degrees C for ^{27}Al , respectively. We have obtained preliminary results of the temperature dependence (25 – 1500 degrees C) of ^{27}Al and ^{29}Si NMR spectra for a calcium aluminosilicate glass.

無機材料の高温溶融状態(1000°C以上)の構造を直接捉えることは、地質・地球科学の学術分野ばかりでなく、産業分野に対しても重要な知見を与える。製鉄業においても、複合無機溶融酸化物は鉄の純度を高めるための重要な役割を果たしている。それらの融体の解析法としては、これまで高温X線やラマン分光が中心であったが、詳細な解析を行う上では未だ十分な情報が得られているとは言い難い。NMRは核種別の局所構造情報のみならず、ダイナミクスに関する情報を得られる点で非常に魅力的な手法であるが、最高測定温度に限界があった。

そこで今回、室温から1500°Cまでの温度域でのin-situでのNMR測定が可能なプローブを新たに開発した。さらに、その有効性を示すために、無機ガラスの代表的成分系であるカルシウムアルミノシリケート(CAS)ガラスが、温度上昇に伴って融体へと変化する際のin-situ NMRスペクトルを取得したので報告する。

超高温in-situプローブ, 1500°C, ガラス, 溶融状態

かねはしこうじ, やまこしよしあき, きだよしき

<In-situ staticプローブ概要>

測定温度: 室温~1500°C+ α
コイルおよびヒーター線: Mo線
測定雰囲気: 高温では不活性雰囲気
に限定(常温では特に問わず)
試料管: BNあるいはAl₂O₃製
観測周波数範囲: 400 MHz~61.1
MHz

主な測定対象核(9.4 T): ¹H, ¹⁹F,
³¹P, ⁷Li, ¹¹B, ²³Na, ²⁷Al, ²⁰⁷Pb, ²⁹Si

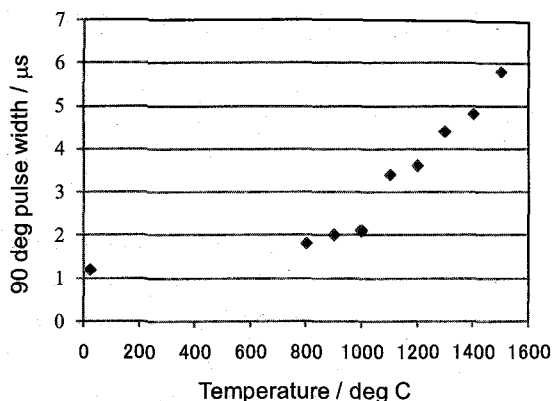


Fig. 1 Temperature dependence of 90 deg pulse widths for ²⁷Al from 25 to 1500 ° C.

<NMR測定>

Fig. 1に²⁷Alの90° パルス幅の温度依存性を示す。温度上昇に伴い、パルス幅は長くなっていくものの、1500°Cに達しても比較的強いRFを照射することが可能である。

Fig. 2には、当該プローブを用いて測定した43.1 CaO-12.5 Al₂O₃-44.4 SiO₂ガラス(T_g: 810°C, T_m: 1265°C)の一連の²⁷Al NMRスペクトルを示した。T_gを超えたあたりから分子運動が急激に高まり、motional narrowingが観測された後、1000°Cを超えたあたりから四極子核特有の motional broadeningが観測された。T_mを超えると四極子相互作用は完全に平均化され、融体の粘性の低下と共にシグナルがシャープになっていく様子が観測されるのと同時に、Al平均配位数の上昇が示唆された。

また、²⁹Siにおいても、温度上昇に伴い、化学シフト異方性が減少してシグナルがシャープになっていく様子が観測された。

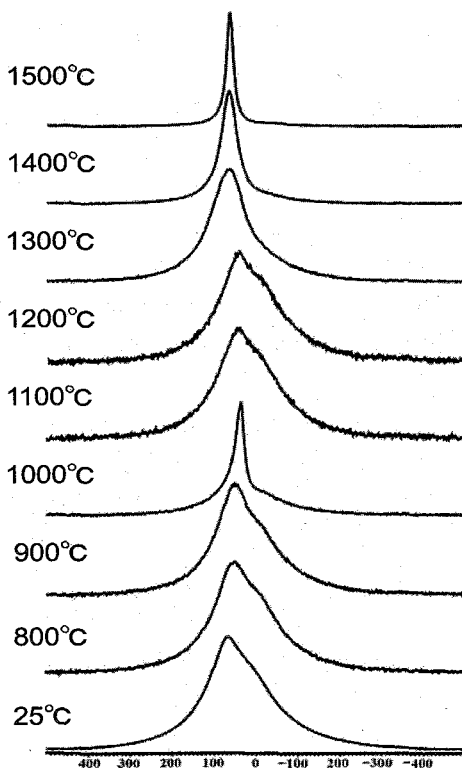


Fig. 2 ²⁷Al static spectra for the CAS glass and melt from 25 to 1500 ° C.

以上のように、当該プローブを用いることによって、任意の温度でのスペクトル測定(および緩和時間測定)が可能となる。今後、いくつかの無機ガラス系に関して、多核種のデータの蓄積を行い、高温溶融状態の解析を実施していく予定である。

P081 固体 NMR によるカテキン類とリン脂質膜との相互作用解析

(静岡県大院生活健¹, 信州大農², 横浜国大院工³)

○植草 義徳¹, 上平 美弥¹, 杉本 収¹, 丹治 健一¹, 中村 浩蔵², 石井 剛志¹,
熊澤 茂則¹, 内藤 晶³, 中山 勉¹

Interaction of tea catechins with phospholipid bilayers as revealed by solid-state NMR spectroscopy

¹Department of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

²Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University

³Graduate School of Engineering, Yokohama National University

Yoshinori Uekusa¹, Miya Kamihira¹, Osamu Sugimoto¹, Ken-ichi Tanji¹, Kozo Nakamura²,
Takeshi Ishii¹, Shigenori Kumazawa¹, Akira Naito³, and Tsutomu Nakayama¹

Epicatechin gallate (ECg) is one of catechins found in green tea, and has various physiological effects. We have reported that ECg strongly interacts with the surface of phospholipid bilayers of bicelles by NOESY experiments in the solution state. In this study, we investigated the dynamics and orientation of ECg in DMPC liposomes by solid-state ¹³C and ³¹P NMR spectroscopy using ¹³C labeled ECg (¹³C]-ECg). Results of these experiments indicate that [¹³C]-ECg molecules rotate about the bilayers normal with the constant tilt angle to the axis because they provide a axially symmetric powder pattern in the solid-state ¹³C NMR measurements. Furthermore, we obtained the ¹³C-³¹P intermolecular distance between [¹³C]-ECg and phosphate group in DMPC with 5.8 ± 0.2 Å by using ¹³C-³¹P REDOR method.

【序論】 Epicatechin gallate (ECg) (Fig. 1) は緑茶中に含まれるカテキン類の一種であり、抗菌作用や抗酸化作用などの様々な生理機能を有している。カテキン類の生理機能メカニズムは詳細には解明されていないが、我々はこれらの生理機能を発現するためには、第一段階として脂質二重層への相互作用が重要であると考えている。モデル生体膜である小型のバイセル (isotropic bicelle) にカテキン類を作用させ溶液 NMR (¹H NMR, T₁緩和時間測定, NOESY) を測定したところ、カテキン類は脂質二重層の表面付近と相互作用し、カテキン類の B 環と galloyl 基が重要であることを明らかにした^{1,2)}。しかし、脂質二重層中におけるカテキン類の動的挙動についての情報はあまり得られていなかった。そこで本研究では、固体 ³¹P, ¹³C NMR や REDOR 法を用い ¹³C-³¹P 距離測定、多重膜リポソーム (MLV) 中における動的構造や配向性の情報を取得し、カテキン類と脂質二重層との相互作用メカニズムを解明することを目的とした。

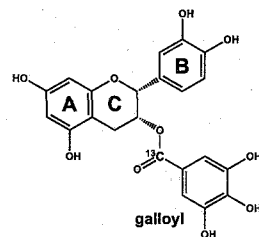


Fig. 1. Structure of [¹³C]-ECg.

キーワード: カテキン, 脂質二重層, 固体 NMR, 相互作用, REDOR

うえくさ よしのり, かみひら みや, すぎもと おさむ, たんじ けんいち, なかむら こうぞう,
いしい たけし, くまざわ しげのり, ないとう あきら, なかやま つとむ

【実験方法】 化学合成した ^{13}C -ECg (Fig. 1) と DMPC を、モル比が 1:20 になるように量り取り、トリス緩衝液 (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.0) を加えて水和した。その後、凍結・融解操作を繰り返して MLV 試料溶液を作製した。固体 NMR スペクトルは Chemagnetics CMX infinity-400 NMR 分光器を用いて測定した。水和試料に対して DD-MAS 法と DD-static 法を用いて ^{31}P 及び ^{13}C NMR 測定を行った。さらに急速凍結・凍結乾燥させた粉末試料を用いて、CP-MAS 法による低速 MAS 測定を行った。また、 ^{13}C -ECg と DMPC のモル比が 1:10 になるように量り取り、同様に粉末試料を作製して ^{13}C - ^{31}P REDOR 測定を行い、 ^{13}C -ECg のカルボニル炭素とリン脂質のリンとの分子間原子間距離測定を試みた。

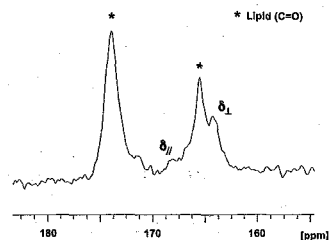


Fig. 2. Solid-state ^{13}C NMR (DD-static) of ^{13}C -ECg (C=O) in DMPC liposomes.

【結果と考察】 固体 ^{31}P NMR 測定において、ECg が作用した MLV のスペクトルは非存在下³⁾と比較して、化学シフト異方性及び δ_{iso} の値に変化が見られた。さらに温度を変化させると、それらの値にも変化が観測された。この結果より、ECg は脂質二重層と相互作用することで、膜の流動性、特にリン脂質のリン酸基の運動性に影響を与えていることが示唆された。一方、固体 ^{13}C NMR (DD-static) では、 $\delta_{\text{||}}$ と $\delta_{\text{\perp}}$ の 2 軸で表される軸対称粉末線形 (Fig. 2) を示した。この結果、ECg は脂質二重層中で 1 軸対称回転運動を行っていることが明らかとなった。また、粉末試料を低速 CP-MAS (2000 Hz) 測定したところ、運動のない状態のサイドバンドパターンを得る事に成功した。現在は得られたこれらのスペクトルから、カルボニル炭素の化学シフトテンソルの主値 (δ_{11} , δ_{22} , δ_{33}) の決定と軸対称回転運動の詳細を解析している。

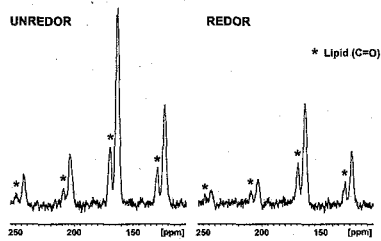


Fig. 3. ^{13}C - ^{31}P REDOR spectrum of ^{13}C -ECg (C=O) in liposomes. (MAS: 4000 Hz, NcTr: 12 ms)

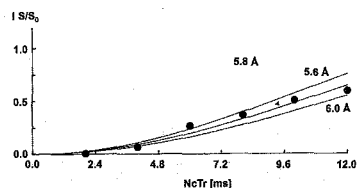


Fig. 4. Theoretical fitting to the ^{13}C - ^{31}P REDOR experimental data of ^{13}C -ECg (C=O) in liposomes.

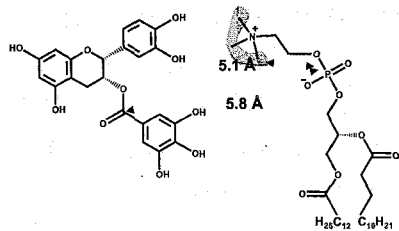


Fig. 5. The schematic representation of interaction between ECg and phospholipids obtained by REDOR experiment.

^{13}C - ^{31}P REDOR の測定を行ったところ、ECg のカルボニル炭素に REDOR 効果による信号強度の減衰が観測された (Fig. 3)。この信号強度の減衰を理論曲線にフィッティングさせることで、ECg のカルボニル炭素と MLV 構成リン脂質のリンとの間で分子間 ^{13}C - ^{31}P 原子間距離を算出した (Fig. 4)。その結果、その原子間距離は $5.8 \pm 0.2 \text{ \AA}$ であり、先行研究における NOESY 実験で得られた結果を支持するものであった。さらに、リン脂質分子内コリン基のトリメチル基炭素とリンとの REDOR 効果も観測され、同様の解析からこれらの分子内原子間距離は $5.1 \pm 0.2 \text{ \AA}$ であり、ECg との分子間原子間距離と同程度の値であった。本研究で得られた固体 NMR の結果は、脂質二重層に相互作用したカテキン類の動的状態を表す重要な情報であり、カテキン類と脂質二重層との相互作用メカニズムの解明につながると期待される。

- 【参考文献】** 1) Uekusa, Y. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9986–9992 (2007).
 2) 第 46 回 NMR 討論会講演要旨集 p.114 (2007).
 3) Kajiya, K. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1743–1747 (2004).

固体 NMR によるサーモトロピック液晶 6BA の 局所構造解析

¹金沢大学大学院 自然科学研究科、²物質・材料研究機構
○鈴木 陽^{1,2}、水野 元博¹、村上 美和²、丹所 正孝²、清水 禎²

Local-Structure Analysis of Thermotropic Liquid Crystal 6BA using Solid-State NMR

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University,

²National Institute for Materials Science

You Suzuki^{1,2}, Motohiro Mizuno¹, Miwa Murakami², Masataka Tansho², and Tadashi Shimizu²

4-*n*-alkylbenzoic acid (*n*BA, *n* is the number of carbon of alkyl chain) has a liquid crystal phase for $n \geq 4$. The crystal-nematic transition temperature of 6BA is 370.5 K, and the nematic-isotropic transition temperature is 385.7 K. From an investigation using infrared spectra, it is known that 6BA form dimer (Fig.1) by two hydrogen bonds in crystal phase, and some of dimer open one of their hydrogen bond in nematic phase. In this study, we investigate the molecular dynamics and orientation of 6BA by measuring ²H NMR and ¹³C NMR spectra and spin-lattice relaxation time.

[序]

固体 NMR は分子の運動や配向分布などの情報を与え、機能性材料の研究に用いられている。液晶性物質においては磁場や電場に対する分子の配向性を調べるのに固体 NMR は有効である。本研究では、4-*n*-アルキル安息香酸(*n*BA: *n* はアルキル鎖の炭素数)について分子の配向性および運動性を調べた。*n*BA の *n* が 4 以上のものは液晶相を持つ。また、*n*BA のカルボキシル基部分が水素結合のプロトンドナーとして利用でき、ピリジン環を含む物質などのプロトンアクセプターと混合することで新たな液晶性物質を作ることができる液晶材料としても注目されている。これまでに DSC の測定⁽¹⁾から 6BA の結晶-ネマチック相転移点は 370.5 K、ネマチック-等方性液体転移点は 385.7 K であることが分かっている。また、赤外吸収スペクトルによる研究⁽²⁾から 5BA

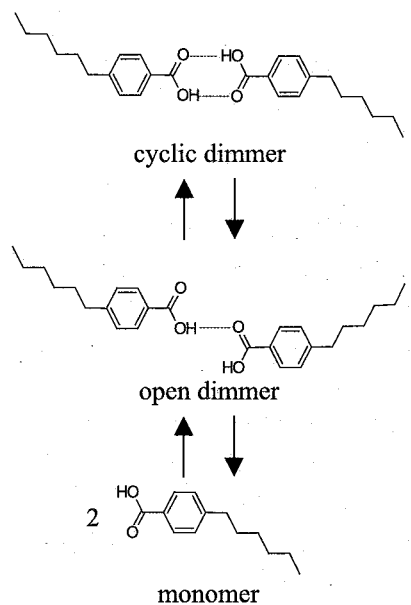


Fig. 1 Structure of 6BA dimer

²H NMR, ¹³C NMR, liquid crystal, 4-*n*-alkylbenzoic acid

すずき よう、みずの もとひろ、むらかみ みわ、たんしょ まさたか、しみず ただし

および 6BA については結晶相ではカルボキシル基が向かい合った二量体構造(Fig.1)であり、液晶相では水素結合していない C=O 結合が存在しているため、一部の二量体が解離し始め、単量体となることが知られている。本研究では 6BA について固体 ^2H , ^{13}C NMR のスペクトル及びスピン-格子緩和時間(T_1)を測定し、結晶相、液晶相の局所構造について考察した。

[実験]

試料は ^{13}C NMR の測定では東京化成工業の 6BA を用いた。固体 ^2H NMR の測定では試料を重エタノールで再結晶し、カルボキシル基の水素を重水素化したものを用いた。固体 ^2H , ^{13}C NMR のスペクトル及び T_1 の測定には Chemagnetics CMX-300 (7.0 T) および JEOL ECA-500 (11.7 T) を用い、 ^2H NMR の測定周波数はそれぞれ 45.8, 76.3 MHz、 ^{13}C NMR の測定周波数は 75, 125 MHz で行った。 ^2H NMR スペクトルの測定には四極子エコー法を、 T_1 の測定には反転回復法を用い、 ^{13}C NMR スペクトルの測定には CP-MAS 法、 T_1 の測定には Torchia のパルス系列を用いた。

[結果と考察]

結晶相である 293 K の固体 ^2H NMR スペクトル(Fig. 2)から四極子結合定数は 150 ± 3 kHz、非対称パラメータは 0.10 ± 0.05 と見積もられた。また、相転移点付近では結晶相のブロードなスペクトルと液晶相のシャープなスペクトルが混在しており、373 K 以上の液晶では 2 本の鋭いピークのみとなった。このスペクトルの分裂幅から分子の配向状態を示すオーダーパラメータを求めたところ温度上昇とともに減少し、共鳴周波数が 45.8 MHz による測定でオーダーパラメータの減少は顕著であった。これは強磁場の中では温度を上げて分子が配向性を保っていることを示している。

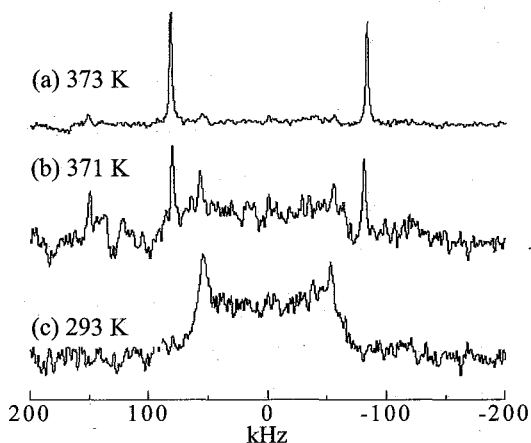


Fig. 2 ^2H NMR spectra of 6BA. $\nu = 45.8$ MHz
(a) nematic phase (b) transition temperature
(c) crystal phase

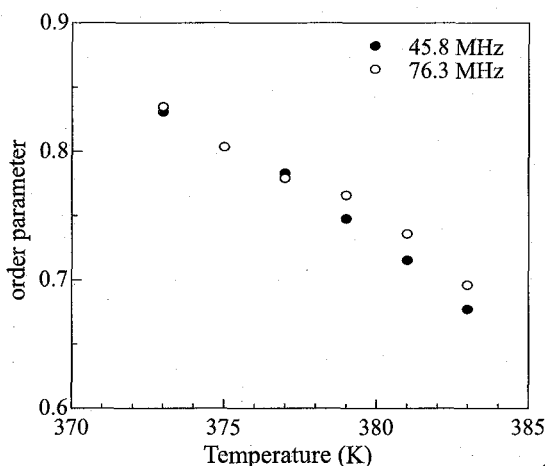


Fig. 3 Temperature dependence of order parameter obtained by ^2H NMR spectra.

(1) Manuel J. S. Monte et al. *J. Chem. Thermodynamics* **36** (2004) 385 - 392

(2) Takashi Kato et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **66** (1993) 3581 - 3584

HBAB のネマチック液晶相における
固体高分解能 ^{13}C NMR

○萩原祥子, 藤森裕基 日本大学大学院 総合基礎科学研究科

High-resolution ^{13}C NMR of HBAB in nematic phase

○Shoko HAGIWARA and Hiroki FUJIMORI.

Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University

High-resolution ^{13}C NMR experiments were performed in nematic and isotropic-liquid phases of liquid crystal, *N-p*-hexyloxybenzylidene-*p*-aminobenzonitrile (HBAB). Complete assignments of the ^{13}C NMR lines on the nematic phase aligned in the magnetic field have been established for HBAB. Spin-lattice relaxation times (T_1) of the ^{13}C NMR lines were measured by π - τ - $\pi/2$ pulse sequence. The temperature dependences of the T_1 of all carbon atoms showed continuous in the nematic phase.

[緒言] *N-p*-hexyloxybenzylidene-*p*-aminobenzonitrile (HBAB, Fig. 1)は、特定の温度範囲内で液晶相を示す。高温側から分子の配向、配列が共に無秩序で分子が自由な運動をしている等方性液体(I)相、分子配向に一軸性の秩序をもつネマチック(N)相、そして分子配向及び分子の重心位置に三次元の周期性をもつ結晶(C)相へと相転移する。HBABは同じく液晶物質である 4-octyloxy-*N*-(4-cyanobenzylidene)aniline (CBOOA, Fig. 2)との混合系において大気圧下でリエントラントネマチック相を形成することが知られている[1,2]。このような液晶相の形成には、分子構造やそれに伴う分子間相互作用が密接に関与している。そのため、液晶相形成のメカニズムの解明にはメゾスコピックな領域における研究が必要となる。しかし液晶相においては、その流動性の高さのため一般的な構造解析法が適用されない。そのため、分子の各構成原子核について測定することのできる NMR は、液晶の物性研究において非常に有用な測定法となる。しかし、液晶の物性研究における NMR の利用には、液晶相におけるスペクトル帰属法の確立が必須となる。そこで本研究では、液晶相転移後に生じる配向誘起シフト(AIS)の大きさ及びその符合の比較を各炭素核で行い、その結果の帰属への利用を試みた。帰属を決定した後、各炭素核におけるスピン-格子緩和時間(T_1)を測定した。

Keyword: 固体, 高分解能, 液晶, 帰属, スピン-格子緩和

はぎわら しょうこ ・ ふじもり ひろき

[実験] 重クロロホルム溶媒における HBAB の ^1H NMR, ^{13}C NMR, 及び ^1H - ^{13}C COSY NMR 測定を行い、溶液における各スペクトルの帰属を行った。磁場中で配向させた静止試料に対しては温度範囲 328~383 K、共鳴周波数 67.94 MHz において ^{13}C NMR 測定を行った。AIS を基に帰属を決定した後、各炭素核における T_1 測定を $\pi - \tau - \pi/2$ パルス系列における反転回復法により測定した。

[結果・考察] Fig. 3 は HBAB の I 相(a)と N 相(b)の ^{13}C NMR スペクトルとその帰属結果を示す。HBAB における各炭素核の T_1 測定の結果を、類似化合物である CBOOA における結果[3]と比較すると、分子末端シアノ基における相互作用が液晶の層形成に参与している可能性が示唆された。

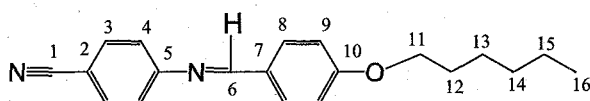


Fig. 1. Molecular structure of HBAB and numbering of carbon atoms.

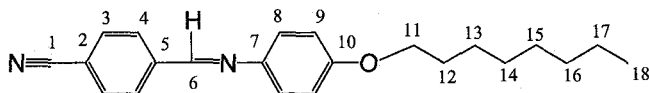


Fig. 2. Molecular structure of CBOOA and numbering of carbon atoms.

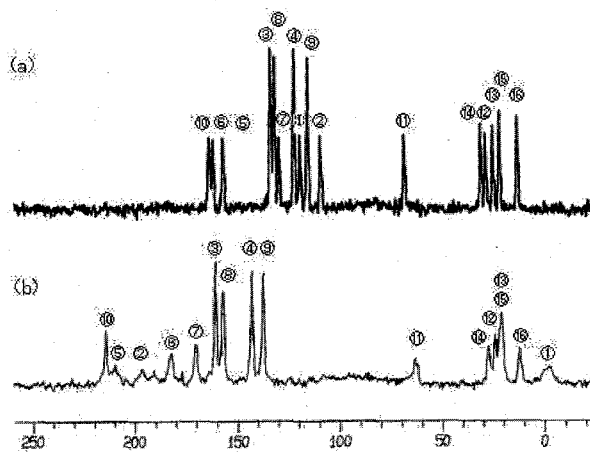


Fig. 3. ^{13}C NMR spectra of CBOOA in I phase (a) and N phase (b).

- [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. Hagiwara, Y. Iwama, and H. Fujimori, *Complex Systems*, 725 (2008).

気体拡散挙動からみた高分子のガラス状態 —NMR 法によるデータをもとに

吉水 広明, 神野 哲史, ○岡澤 誠裕

Characterization of the Polymer in Glassy State through Gas Diffusion Behaviors by NMR Spectroscopy

Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Hiroaki Yoshimizu, Satoshi Jin-no, ○Masahiro Okazawa

In this study, the gas transport behaviors of a glassy polymer were discussed from the spectrum width of the gas in the polymer and the self-diffusion coefficient determined by pulsed field gradient (PFG) NMR and ^{129}Xe NMR methods for the poly(phenylene oxide) (PPO) such as a glassy polymer. The relationships among self-diffusion coefficient, ^{129}Xe NMR chemical shifts and ^{129}Xe NMR line width were investigated. Self-diffusion coefficient showed a dependence of Xe concentration, although the NMR signal intensity decayed single-exponentially under each pressure. In other words, the apparent diffusion behaviors were averaging in observation timescale of the order of ms. As a result, it showed the dependence of gas concentration in PPO. In more short time, however, diffusion of the Xe in PPO was not averaging completely.

<緒言>

高分子膜材料を気体分離膜等へ応用するには、膜中での気体拡散挙動の詳細を知ることが重要である。拡散挙動検討の一つに拡散係数の測定が挙げられるが、ガラス状高分子では拡散経路が複雑なこともあり、単純な拡散方程式に基づく拡散係数の算出は正確ではない。一方、磁場勾配パルス(PFG) NMR 法は拡散分子そのものの NMR 信号から自己拡散係数を決定する方法であり、複雑な系において有効な一手段と思われる。本研究ではガラス状高分子中の気体拡散挙動について、PFG NMR 法を適用するとともに、 ^{129}Xe NMR 化学シフト値及びスペクトル線幅から検討を試みた。

<実験>

ガラス状高分子として、ポリ(2,6-ジメチル-1,4-フェニレンオキサイド) (PPO : $T_g \approx 220^\circ\text{C}$)を用いた。PPO 中の Xe と CO_2 の自己拡散係数を PFG NMR 法で決定した。また、Solid-echo 法によるスピンスピン緩和時間(T_2)測定を行い、緩和減衰時間 τ に伴う線幅の変化を観察した。

キーワード : ガラス状態, 気体拡散係数, ^{129}Xe NMR, PFG NMR, 高分子膜
よしみず ひろあき, じんの さとし, ○おかざわ まさひろ

<結果と考察>

^{129}Xe NMR 化学シフト値は Xe と高分子との相互作用に起因し、これは両者の時間平均距離に対応付けられるので、系の自由体積を検討できる。系の自由体積の大小で拡散性が一義的に理解される、液体及びゴム状高分子では、Xe の拡散係数は ^{129}Xe NMR 化学シフト値から見積もれる。一方、ガラス状高分子での観測値に二元収着モデルを適用して見積もられる Henry 及び Langmuir サイトの各化学シフト値と拡散係数との間に定量的相関は得られなかった。次に、PFG NMR 測定を行い PPO 中の Xe 原子の拡散挙動を観察した。Figure 1 に 70°C 、7atm における ^{129}Xe の NMR 相対信号強度が拡散挙動に基づき減衰する様子を示した（磁場勾配パルスの印加時間 $\delta=1.2\text{ms}$ 、拡散時間 $\Delta=400\text{ms}$ 、磁場勾配パルス強度 $g=0\sim 1000\text{G/cm}$ ）。

Figure 1 は単一指数減衰なので、この系における拡散成分は 1 成分である。これは、部分不動化モデルで考えられる Henry 及び Langmuir 各サイトでの拡散が $\Delta=400\text{ms}$ の間に既に平均化されていることを意味している。Figure 2 に 70°C 、 $\Delta=400\text{ms}$ における自己拡散係数の圧力(=濃度)依存性を示す。ガラス状高分子-気体系における気体輸送特性が二元収着並びに部分不動化モデルで説明可能な場合、Henry サイトにおける拡散係数は Langmuir サイトにおけるそれよりも大きく、分率は圧力とともに増える。したがって Figure 2 は、PPO 中を拡散する Xe は少なくとも 400ms の間に Henry・Langmuir 両サイトを頻繁に行き来した結果、平均値としての自己拡散係数が 1 成分としてしか観測できず、これが分率に従い増加したと解釈される。スペクトル線幅の検討結果はこれらの解釈を概ね補足するものであったが、 T_2 測定の際に使用した τ 値は数百 μs のオーダーで、 τ 値とともに線幅は先鋭化した。即ち、数百 μs 以下の時間では完全な平均化は起こらないことが明らかとなった。

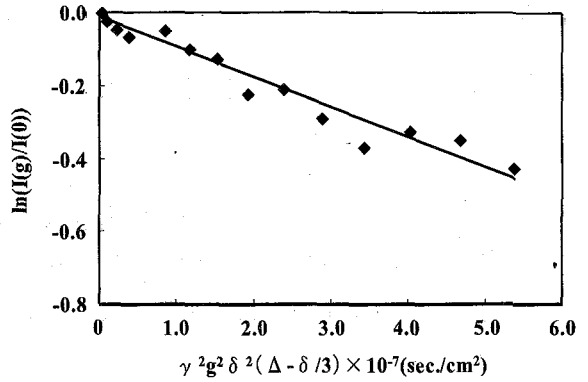


Figure 1 The plots of $\ln\{I(g)/I(0)\}$ against $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ for the ^{129}Xe in PPO at 70°C

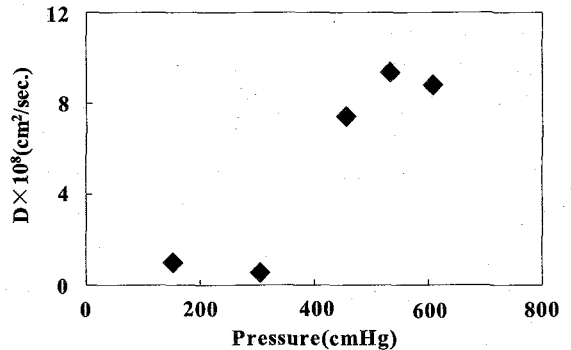


Figure 2 Pressure dependence of Xe self-diffusion coefficient for PPO membrane at 70°C .

吉水 広明, 藤原 弘文, ○奥村 佑生

Gas Transport Properties and NMR of Crystalline Phase of Poly(4-methyl-1-pentene)

Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Hiroaki Yoshimizu, Hirofumi Fujiwara, ○Yuki Okumura

The gas permeability and diffusivity for crystalline parts of poly(4-methyl-1-pentene)(PMP) are lower than those of PMP amorphous one above around room temperature. These findings contradict the relationship between free volume and gas transport properties. In this study, PMP was investigated by permeation and sorption measurements using several membranes with various degree of crystallinity under glass transition temperature. Further, ^{129}Xe NMR measurements were carried out to characterize the inter-chain spaces of PMP, and solid-state high-resolution ^{13}C NMR measurements and Dynamic Mechanical Analysis were performed to clarify the molecular motions of PMP. From the results, the abilities of gas transport in crystalline phase of PMP, and it was pointed out that these properties should be explained by not only free volume but also the local molecular motions.

＜緒言＞ ポリ 4-メチル-1-ペンテン(PMP)の結晶形態 I 型は, 7/2 ヘリックス鎖が正方晶に並び, その鎖間隙にヘリックス軸に沿った直径約 4 Å のシリンダー状空孔を有する. この特徴を反映して, 非晶相に比べ低密度の結晶相でもこの高分子間隙で比較的小さな気体分子の収着, 拡散, 透過が起こり得る. これまでに室温及びそれ以上の温度における PMP の透過及び収着測定を行ってきたが, 非晶相における透過性及び拡散性が結晶相のものを上回り, 自由体積分率の大小と気体輸送特性の関係とは相反する結果となった. これらの評価は, ガラス転移温度 T_g 以上の温度域で非晶相がゴム状態であるから, 自由体積分率よりも分子鎖の運動性の寄与の方が, 気体輸送特性に大きく反映されているためと思われる. 本研究では PMP の気体輸送特性を詳細に検討する目的で, T_g 以下における気体収着及び ^{129}Xe NMR 測定を行い, Xe 収着に有効な極微小空隙サイズなどとの相関関係を検討した. 更に分子運動性評価も行い, 気体輸送特性の良し悪しを決定する分子構造的要因について, 考察を試みた.

キーワード: ポリ 4-メチル-1-ペンテン, 結晶相, 気体収着特性, 気体拡散特性, ^{129}Xe NMR
よしみず ひろあき, ふじわら ひろふみ, ○おくむら ゆうき

<実験>種々の結晶化度を有する PMP サンプルを調製し、これらの気体透過及び収着測定を、室温及びそれ以下の温度域で行った。Xe が存在し得る有効空間の平均サイズを見積もるために ^{129}Xe NMR 測定を行ない、PMP に収着した ^{129}Xe 核の示す NMR 化学シフト値の濃度依存性を解析した。また PMP の局所分子運動性を検討するために動的粘弾性(DMS)並びに ^{13}C NMR 測定を行った。

<結果と考察> PMP54(数字は結晶化度 [%])の Xe 収着等温線を Fig. 1 に示す。温度低下に伴い収着量は増え、等温線は典型的な 2 元収着型になった。Table 1 に解析結果をまとめたが、Langmuir 項の値 (C_H' と b)の温度依存性が Henry 項のそれ (k_D)より著しいのがわかる。次に、種々の Xe 圧力下で ^{129}Xe NMR 測定を行い、PMP に収着した Xe の ^{129}Xe NMR 化学シフト値の濃度依存性を評価した。0°C 以下では、結晶相及び非晶相における Henry 並びに Langmuir サイト、即ち 3 つの収着サイトが存在すると考えられるが、NMR スペクトル上には収着 Xe に帰属されるピークは単一で対象性の良いものであった。従って NMR 観測タイムスケール内における拡散移動に基づく速いサイト間交換現象から、3 つの収着サイトの平均情報が反映されているといえる。以上を踏まえ、濃度依存化学シフト値から分子鎖間隙に対応するサイズを見積もった。球状または円柱状を仮定して算

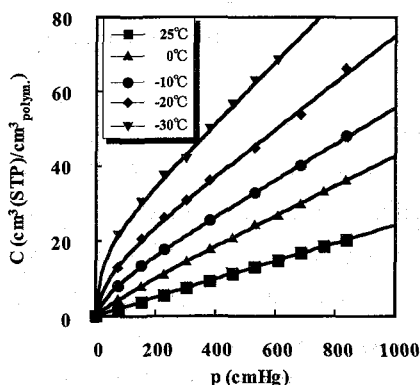


Figure 1 Xe sorption isotherms of PMP54.

Table 1 Dual-mode sorption parameters of Xe for PMP54 at various temperatures

Temp.	$k_D \times 10^2$	C_H'	$b \times 10^3$
0 °C	3.95	3.68	10.1
-10 °C	4.61	8.43	10.9
-20 °C	6.43	13.87	21.4
-30 °C	8.10	20.20	45.9

k_D : $\text{cm}^3(\text{STP})/\text{cm}^3_{\text{polym.}} \cdot \text{cmHg}$
 C_H' : $\text{cm}^3(\text{STP})/\text{cm}^3_{\text{polym.}}$, b : cmHg^{-1}

Table 2 Diameters, d_s and d_c of PMP samples

Temp.	d_s (Å)		d_c (Å)	
	Amorphous	PMP33	PMP80	Crystal
25 °C	(4.7)	4.6	4.6	(4.5)
0 °C	(5.0)	4.9	4.8	(4.7)
-20 °C	(5.0)	5.0	4.9	(4.7)
-50 °C	-	5.1	-	-

出される直径(Table 2: それぞれ d_s , d_c と表現)を、結晶化度 0 及び 100%に外挿して非晶相と結晶相の値も見積もった。これらの値は温度低下に伴い大きくなる傾向を示し、Xe が収着・拡散できる有効体積は、結晶・非晶を問わず僅かながら広がっている。更に結晶相の拡散の活性化エネルギーは非晶相のものより低いことから、非晶相の極微小空隙よりも、シリンダー状に連結した結晶相の分子鎖間隙空間の方がより有効な拡散経路となり得るので、側鎖の分子運動もかなり低下する低温域において結晶相の方が拡散性に優れるようになったと考えられた。

Solid state ^{195}Pt NMR of Pt nanoparticles protected by organic molecules¹Graduate School of Science, Kyoto University, ²School of Science, The University of Tokyo○Hirokazu Kobayashi,¹ Kazuyuki Takeda,¹ Tetsu Yonezawa²

Abstract

^{195}Pt solid state NMR studies are carried out in Pt nanoparticles (Pt NPs) protected by alkylthiols ($\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{SH}$) for various alkyl chain lengths. In order to trace the ^{195}Pt resonance line which can be as broad as several MHz due to the Knight shift, experiments are performed at a fixed frequency and variable static fields at 77 K using a home-built NMR system specially developed for this purpose. Each spectrum is analyzed on the basis of the “NMR layer model” developed by Bucher *et al.*, and is reproduced by a superposition of several Gaussian-type functions, the number of which depends on the size of the Pt NPs. The dependence of the ^{195}Pt NMR spectra on the length of alkyl chain and/or the diameter of Pt NPs is examined in detail.

【序論】

近年、白金ナノ粒子 (Pt NPs) は、触媒や燃料電池の材料として注目を集めている。Pt NPs の物性は表面 Pt 原子の電子状態に大きく依存し、これを詳細に調べるためには固体 ^{195}Pt NMR 法が非常に有効である。しかし、Pt NPs の ^{195}Pt NMR スペクトルはナイトシフトにより数 MHz の線幅をもつため、通常の装置、手法での測定は困難である。これを克服するため、われわれは無冷媒磁石と、77 K でインピーダンスマッチングできる自作のプローブを用い、磁場可変、周波数固定($\nu_0 = 53.9$ MHz)の条件下で Pt NPs の ^{195}Pt NMR スペクトル測定を行ってきた。^{1,2} また、測定を低ノイズで安定に制御するために、武田が開発した OPENCORE NMR 分光計^{3,4}を用いた。

本研究では、アルキル鎖長の異なるさまざまなアルキルチオールを保護基とする Pt NPs を合成し、 ^{195}Pt NMR スペクトルのアルキル鎖長依存性を調べた。また、同一のアルキルチオール保護基をもち、粒径が異なる Pt NPs の ^{195}Pt NMR スペクトルを測定し、その違いを比較、検討した。

固体 ^{195}Pt NMR, OPENCORE NMR 分光計, Pt ナノ粒子, ナイトシフト

こばやし ひろかず, たけだ かずゆき, よねざわ てつ

【実験】

アルキル鎖長の異なる n -アルキルチオール ($C_nH_{2n+1}SH$, $n = 6, 8, 10, 12, 18$, それぞれ C_nSH と略記) で保護された Pt NPs をそれぞれ合成し, ^{195}Pt NMR スペクトルを測定した. ^{195}Pt NMR 測定は上述の装置群を用い, 5.7-6.2 T の範囲で磁場を変化させながら行った. ^{195}Pt NMR スペクトルは, CPMG 法によって得られたスピンエコーのピーク面積を, 磁場/共鳴周波数 (B_0/ν_0) に対し, 一点ずつプロットすることにより得た.

【結果】

Figure 1 にドデカンチオール (C12) 保護 Pt NPs (PtC12SH) の ^{195}Pt NMR スペクトルを示す. このとき, NMR 層モデル⁵を適用すると, スペクトルは粒径に応じた個数の Gauss 型関数の重ね合わせでフィッティングできる. PtC12SH においては, 4 層の Pt 原子殻からなると仮定した場合に実験結果をよく再現でき, 表面 Pt 原子に由来する低磁場側のピークが強く観測された. また, 各ガウス型関数のピーク面積比も, その仮定と矛盾しない結果が得られた. このことから, 得られた Pt-C12NPs がほぼ均一な粒径 ($d \sim 2$ nm) をもつことが示唆された. 当日は, 他のアルキルチオール保護基をもつ Pt NPs の測定結果についても示し, アルキル鎖や粒径の違いによる ^{195}Pt NMR スペクトルの違いを議論し, Pt NPs の表面電子状態について詳細に述べる.

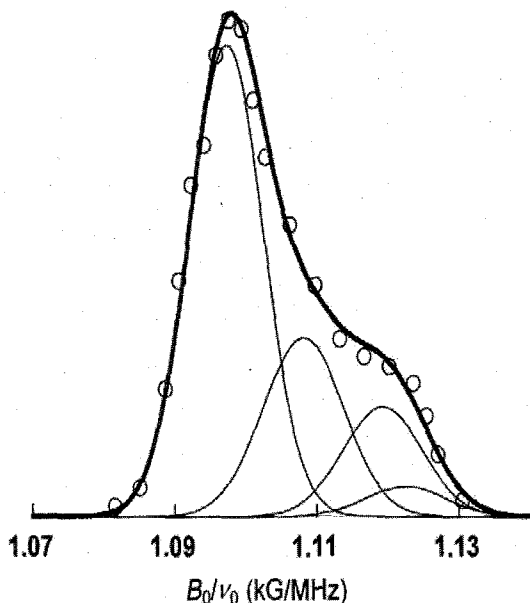


Figure 1. ^{195}Pt NMR spectrum of Pt-C12SH and the reproduced spectrum using NMR layer model.

当日は, 他のアルキルチオール保護基をもつ Pt NPs の測定結果についても示し, アルキル鎖や粒径の違いによる ^{195}Pt NMR スペクトルの違いを議論し, Pt NPs の表面電子状態について詳細に述べる.

【謝辞】

本研究は CREST/JST の支援を受けて行われた. この場を借りて感謝の意を表わす.

1. H. Kobayashi, K. Takeda, T. Yonezawa, 49th ENC, 2008, #122.
2. 小林 広和, 武田 和行, 米澤 徹, 2008, 第 43/8 回固体NMR・材料フォーラム要旨集, 48-49.
3. K. Takeda, *Rev. Sci. Instrum.*, 2006, 78, 033103.
4. K. Takeda, *J. Magn. Reson.*, 2008, 192, 218.
5. J. P. Bucher *et al.*, *Surf. Sci.*, 1989, 214, 347.

P087 地盤液状化モデル系を用いたレイリーテイラー不安定性のMRIによる可視化

○石川 堯洋¹、待井 豊¹、安達 聖¹、半田 晋也¹、巨瀬勝美¹、納口恭明²

1 筑波大学 数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻

2 独立行政法人 防災科学技術研究所

Visualization of Rayleigh-Taylor instability of Liquefaction Simulator Using MRI

Oshikawa T¹, Machii Y¹, Adachi S¹, Handa S¹, Kose K¹, Nohguchi Y²

1 Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

2 National Research Institute for Earth Science and Disaster Prevention

Fluid mechanical instability in a liquefaction system was visualized using a compact MRI system. The liquefaction system consists of two vertical layers of glass beads with different diameters (0.05 mm and 0.2 mm) naturally piled up in a bottle water. Vertical cross-sectional MR images of the interface between the two layers were successively acquired using a fast spin-echo sequence (slice thickness = 10 mm, matrix size = 128 × 64, pixel size = 0.5 mm × 4.0 mm, TR/TE = 450ms/10ms, ETL = 32) at 0.9 s time intervals. As a result, emergence of water layer and its wavy instability at the interface was clearly visualized just after external mechanical impacts to the bottle. Therefore, it was concluded that Rayleigh-Taylor instability was clearly observed in the liquefaction system.

1. はじめに

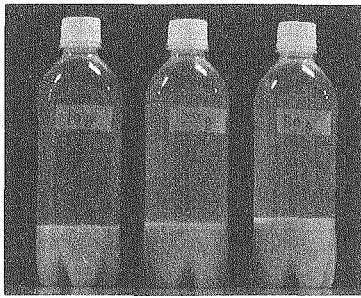
MRI は、光を通さない多孔質体中の流体計測において非常に有力な手法であり、これまでも多様な応用例が報告されている[1]。その代表的な応用例の一つが、地盤、土砂、岩石などの中の流体（水や石油など）の計測である。さて、最近、エキジョッカーと呼ばれる、ペットボトルを用いて地盤の液状化現象や噴砂現象を手軽に再現した系が、子供向けの科学イベントなどで大きな人気を集めている[2]。この系は、実験室における MR 計測にも適した構造を有しており、地盤の液状化に伴う物理現象を解明する上で非常に有用である。そこで、本研究では、この系における水の挙動を可視化し、液状化のメカニズムを明らかにすることを目的として MR 撮像を行った。

2. 試料と実験装置

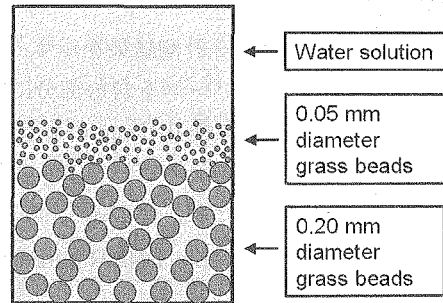
試料は、500ml のペットボトルの中に粒径の異なる 2 種類のガラスビーズと水を入れて作成した、以下の 3 種類のものである[2] (Fig.1 (a))。すなわち、平均粒径 0.2mm のガラスビーズは 187.5g で一定とし、平均粒径 0.05mm のガラスビーズは 10g、25g、50g の 3 種類に量を変化させ、それぞれに 450ml の純水と 0.1mmol/l 塩化ガドリニウム水溶液 (5ml) を加えて作成した。この試料は振り混ぜた後、十分な時間放置すると、ガラスビーズの粒径の差によって落下速度が異なるため、Fig.1 (b) のように上から順に溶液、平均粒径 0.05mm のガラスビーズが堆積した層、平均粒径 0.2mm のガラスビーズが堆積した層と層構造を形成する。この時ガラスビーズが堆積した層にも溶液は存在している。堆積した平均粒径 0.05mm ガラスビーズの層の厚さは、10g 試料では 2mm、25g 試料では 4mm、50g 試料では 10mm となっている。また、水の粘性を高めて現象の時間変化をゆるやかにするために、それぞれの試料は、冷蔵庫で約 5°C に冷却した後に実験に使用した。

キーワード: 液状化, レイリーテイラー不安定性

著者: いしかわ たかひろ, まちい ゆたか, あだち さとる, はんだ しんや, こせ かつみ, のうぐち やすあき



(a) Liquefaction system in PET bottles



(b) Schematic diagram of the liquefaction system

Fig.1 Specimens used in MRI experiments

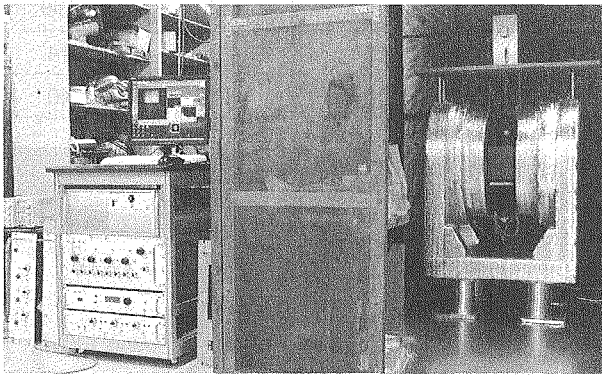


Fig.2 Overview of the compact MRI

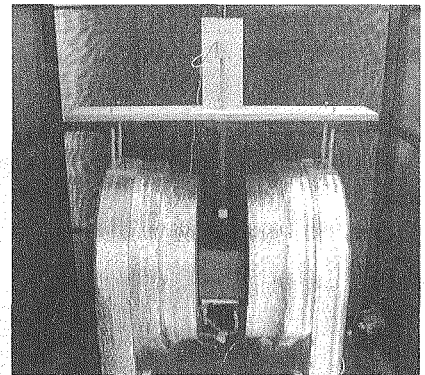


Fig.3 Impact system for the PET bottle

Fig.2 に本研究で使用した MRI 装置の全体像を示す。本システムは、永久磁石磁気回路（静磁場強度 0.2T、ギャップ 250mm、25ppm 均一領域 150mm 球）、勾配磁場コイル、RF プローブ、コンパクト MRI コンソールからなる。磁石のギャップには、挿入型勾配磁場コイルと 500ml ペットボトル容器のサイズに適した開口径 80mm、高さ 150mm の RF プローブを挿入した。なお、勾配磁場コイルの製作には Target Field 法を用いた[3, 4]。また Fig.3 に示したソレノイド撃力機構により、シーケンスに同期させて系に軽い振動を加えることができるようにした。

3. 実験方法

まず、MR 画像の画素強度解析の基礎データとなる、試料の各層に対応する成分を、それぞれ内径 20mm、高さ 30mm の樹脂製容器の中に入れ、2D スピンエコー法で TR と TE を変化させて撮像し、水のプロトン密度、T1、T2 を算出した。なお撮像は、それらのサンプルの温度を、それぞれ室温（25℃）と 5℃に保持して行った。

試料の撮像は、それらを冷蔵庫から取り出して十分に振った後、ガラスビーズを完全に沈降させてから行った。撮像シーケンスには、プロトン密度強調高速スピンエコー法（slice thickness = 10mm、matrix size = 128×64、pixel size = 0.5mm×4.0mm、TR/TE = 450/10ms、ETL = 32、NEX = 1、acq.time = 0.9sec.）を用いた。取得したデータは、フーリエ補間により pixel size = 0.5mm×1.0mm、matrix size 128×256 とした後、中心の 128×128 部分を切り出した。なお、撮像時には、噴砂現象を発生させるために、ペットボトルの蓋をソレノイド撃力機構によりシーケンスに同期させ繰り返し時間毎に打撃した。

4. 実験結果

Table.1 に NMR パラメタ計測結果を示す。プロトン密度は溶液部分を 1 とした相対密度で示した。このように、ガラスビーズを含む部分における T2 の短縮が顕著である。

Fig.4~6 に、それぞれ直径 0.05mm のガラスビーズを 10g~50g 使用した試料の 0.9 秒間隔の画像を示す。このように、ガラスビーズ 10g の系では、直径 0.2mm のガラスビーズの層から発生する水路は観測できなかったが、他の系では、矢印で示すように、波状の水分布が観測された。

Table.1 NMR parameters in the liquefaction system

	プロトン密度	常温		5°C	
		T1 (ms)	T2 (ms)	T1 (ms)	T2 (ms)
溶液層	1	350	250	220	190
φ0.05mm のビーズを含む層	0.42	70	12	75	14
φ0.2mm のビーズを含む層	0.47	140	30	150	40

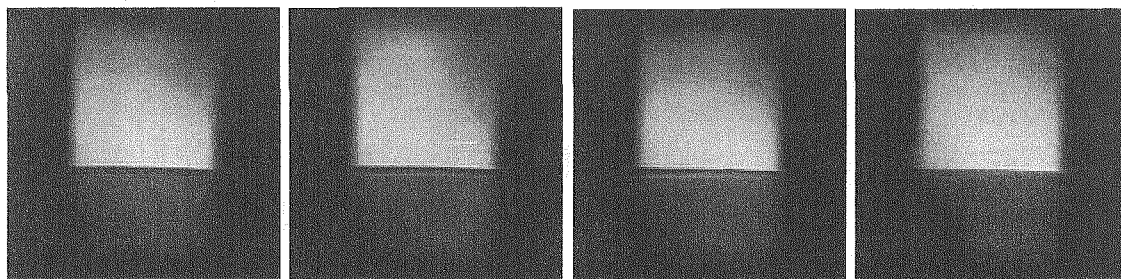


Fig.4 Successive images of a vertical cross section of the liquefaction system (10g of 0.05 mm diameter glass beads) acquired at 0.9 s time interval.

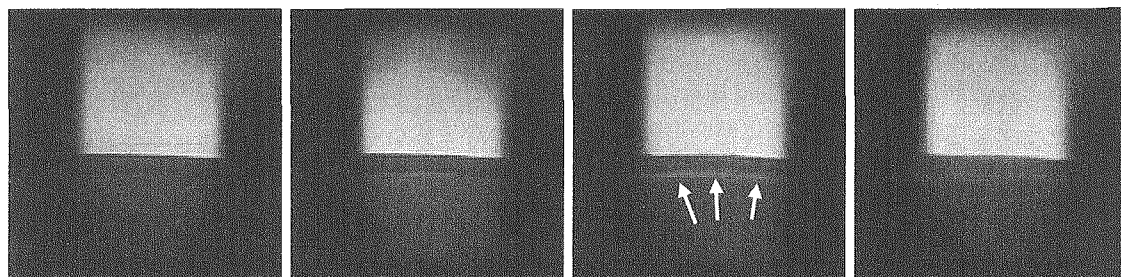


Fig.5 Successive images of a vertical cross section of the liquefaction system (25g of 0.05 mm diameter glass beads) acquired at 0.9 s time interval.

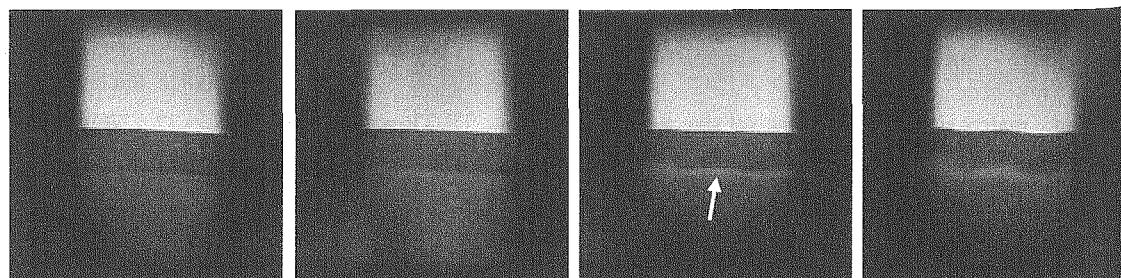


Fig.6 Successive images of a vertical cross section of the liquefaction system (50g of 0.05 mm diameter glass beads) acquired at 0.9 s time interval.

5. 考察

エキジョッカーにおける液状化と噴砂現象に関しては、納口によってそのメカニズムの説明が提案されている[5]。Fig.7を用いて、その仮説を紹介し、これにしたがって実験結果を検討する。

Fig.7 (a) は流体中で、2種類の粒径の異なるガラスビーズにより層構造が形成された状態である。(a)の状態に外部から衝撃を加えると、粒径が大きく透水性の良い下層から排出された水が、粒径が小さく透水性の小さい上層の下部に溜まる (Fig.7 (b))。その結果、密度不安定性 (レイリー・テイラー不安定性) が発生し、噴砂パターンを生み出す (Fig.7 (c))。このパターンの代表波長が密度不安定が発達する上部の層の厚さによって変化する。これは、Fig.5 と Fig.6 に示された実験結果と一致するものである。

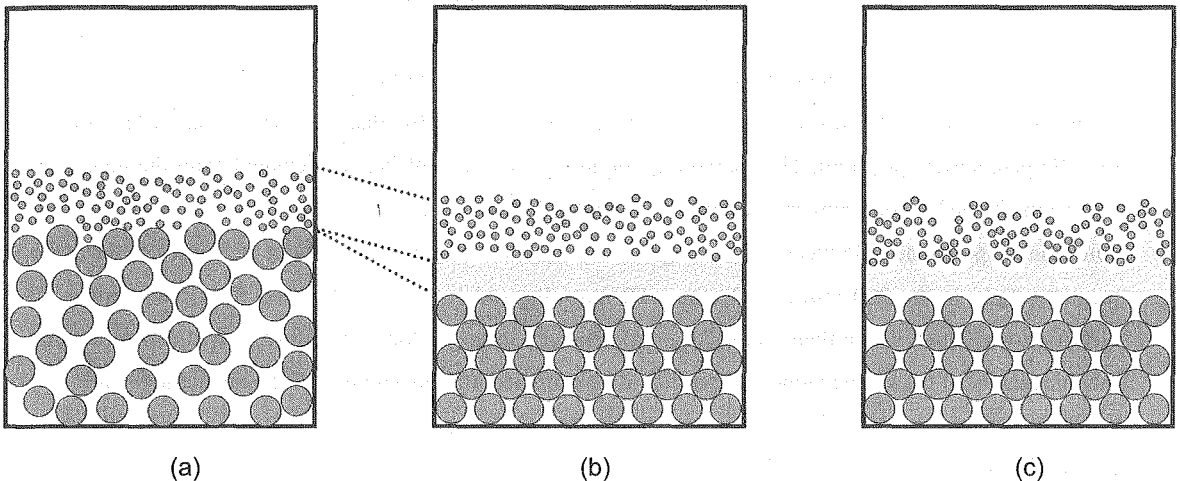


Fig.7 Mechanism of sand boiling

6. むすび

ペットボトルの内部に構築された地盤液状化モデル系を、時間分解能 0.9 秒の高速スピネコ法で撮像することにより、理論的に予見されていた、レイリー・テイラー不安定性に基づくパターン形成を観測することに成功した。今後は、撮像法の改良、撃力とそのタイミングのコントロールなどを行い、実験の再現性の向上とアーチファクトの解消などを行っていく予定である。

参考文献

- [1] Proceedings of the Eighth International Bologna Conference on Magnetic Resonance in Porous Media, Edited by Paola Fantazzini and John Gore, Magnetic Resonance Imaging, 2007;25:439-592.
- [2] 宮地良典, 兼子尚知: 地質ニュース 570 (2002) 26.
- [3] R.Turner, A target field approach to optimal coil design. J Phys D:Appl Ohys 1986;19:147-151.
- [4] Jianming Jin, "Electromagnetic Analysis and Design in Magnetic Resonance Imaging", CRC Press, 1998, ISBN 0-8493-9693-X.
- [5] 納口恭明, 「動力学始点からの地形変化の研究」, 物性研究, vol.82, No.3, (2004).

MR 画像歪み定量化手法による
静磁場分布および勾配磁場分布の評価
筑波大学大学院 数理物質科学研究科
○半田 晋也¹, 繁木 良介¹, 巨瀬 勝美¹

Assessment of a static magnetic field and magnetic gradient fields
in a compact MRI utilizing the geometric distortion of MR images.

Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

○S. Handa¹, R. Shigeki¹, K.Kose¹

Spatial distribution of the static magnetic field and magnetic gradient fields in a 0.3 T permanent magnetic circuit for a compact MRI was quantitatively evaluated using geometric distortion visualized in MR images of a 3D geometrical phantom. The spatial distribution of the gradient fields calculated from the geometric distortion showed a good agreement with that calculated from the theoretical wire pattern of the gradient coils and shape of the pole piece of the magnet. However, the homogeneity (about 171 ppm) of the static magnetic field in the 200 mm × 200 mm × 80 mm ellipsoidal volume calculated from the geometrical distortion was much worse than that (30.0 ppm) achieved in the factory. Therefore, it was concluded that inhomogeneity of the static magnetic field should be shimmed after installation of the magnetic circuit.

1. はじめに

我々のグループではこれまで、様々な応用に適したコンパクト MRI を開発してきた。それらのコンパクト MRI 装置は小型化が優先させるため、しばしば撮像視野の周辺部において静磁場の不均一性や勾配磁場の非線形性によって画像歪みが生じる。撮像視野の決定やシステムのトータルでの性能評価を行う上で、画像歪みの定量化を行い静磁場、勾配磁場の分布を評価することは非常に重要である。そこで、本研究では、3次元幾何学標準ファントムを作成し、0.3 T 永久磁石磁気回路を用いたコンパクト MRI システムにおける MR 画像歪みの定量化を行い、静磁場分布、勾配磁場分布の評価を行った。

2. MR 画像における勾配磁場分布と静磁場分布の与える影響

MR 画像上の座標を(u, v, w), 撮像対象の実座標を(x, y, z)と定義する。理想的な勾配磁場(G)と静磁場(B₀)においては、x=u, y=v, z=w が成り立っている。実際の MR 画像上には、勾配磁場と静磁場の不完全性により画像歪みが生じる。一般的な 3次元 SE 法において MR 画像の座標は、周波数エンコード軸の勾配磁場強度を G_x, 位相エンコード軸の勾配磁場強度を G_y, G_z とおくと、次式で表される[1]。

$$u = x + \frac{\Delta B_{G_x}(x, y, z)}{G_x} + \frac{\Delta B_0(x, y, z)}{G_x}, \quad v = y + \frac{\Delta B_{G_y}(x, y, z)}{G_y}, \quad w = z + \frac{\Delta B_{G_z}(x, y, z)}{G_z}$$

コンパクト MRI, 画像歪み

著者 : はんだしんや, しげきりょうすけ, こせかつみ

ここで $\Delta B_0(x, y, z)$ は静磁場の不完全性を, $\Delta B_{G_x}(x, y, z)$, $\Delta B_{G_y}(x, y, z)$, $\Delta B_{G_z}(x, y, z)$ はそれぞれ G_x , G_y , G_z の非直線性成分を表している. G_x が土の場合, 周波数エンコード軸の MR 座標 u_{\pm} は

$$u_+ = x + \frac{\Delta B_{G_x}(x, y, z)}{G_x} + \frac{\Delta B_0(x, y, z)}{G_x}, \quad u_- = x + \frac{\Delta B_{G_x}(x, y, z)}{G_x} - \frac{\Delta B_0(x, y, z)}{G_x}$$

で表される. 両者の加算平均を取った座標 u' と, 両者の差分を取り 2 で割った座標 u'' は次式で与えられる.

$$u' = \frac{(u_+ + u_-)}{2} = x + \frac{\Delta B_{G_x}(x, y, z)}{G_x}, \quad u'' = \frac{(u_+ - u_-)}{2} = \frac{\Delta B_0(x, y, z)}{G_x}$$

上式から分かるように u' は勾配磁場の非直線性成分のみを含み, u'' は静磁場の不完全性のみを含んでいる. よって, すでに幾何学的な寸法の分かっている特徴点を複数有するファントムの MR 画像から特徴点座標を抽出し, それをあらかじめ図面上より計算で求めた座標と比較を行うことで, 勾配磁場コイルの非直線性は次式で求められ.

$$\Delta x = u' - x = \frac{\Delta B_{G_x}(x, y, z)}{G_x}, \quad \Delta y = v - y = \frac{\Delta B_{G_y}(x, y, z)}{G_y}, \quad \Delta z = w - z = \frac{\Delta B_{G_z}(x, y, z)}{G_z}$$

また, 静磁場の分布は, 次式を用いて導出される.

$$\Delta B_0(x, y, z) = (u_+ - u_-) \frac{G_x}{2}$$

3. 実験及びデータ解析方法

幾何学歪の測定を行うために関節リウマチ診断用に開発された手専用コンパクト MRI システム (Fig 1) を使用した. このシステムの永久磁石磁気回路は, 静磁場強度 0.30 T, ギャップは 140 mm, 均一領域は 200 mm × 200 mm × 80 mm の回転楕円体内で 38.6 ppm, 重量 700 Kg となっている. 勾配磁場コイルは, G_x , G_y に関しては Target Field 法[2]により設計した 25 ターンのコイル, G_z に関しては, 遺伝的アルゴリズムで設計した 30 ターンのコイルを使用した. G_x , G_y , G_z の勾配磁場効率, それぞれ 0.18, 0.18, 0.29 G/cm/A となっている.

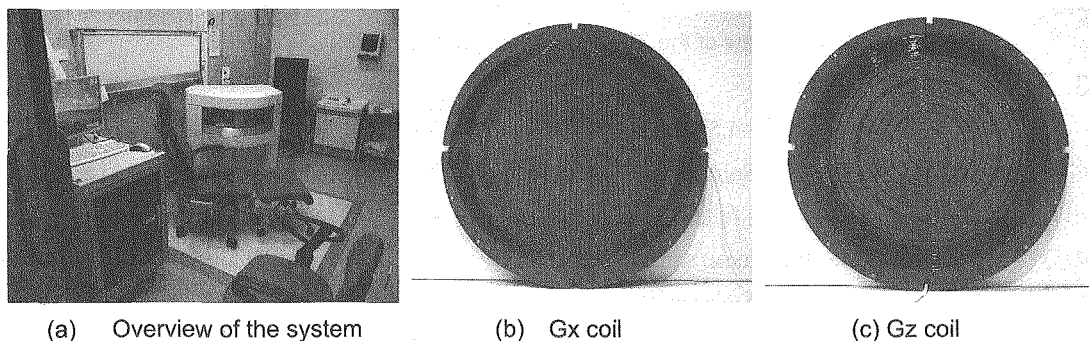


Fig 1. 0.3 T compact MRI system and the gradient coil set

このシステムの勾配磁場分布と静磁場分布を測定するために 3 次元標準ファントムを設計・製作した. この標準ファントム内には, 幾何学標準として, 10 mm 間隔で幅 10 mm, 深さ 4 mm の溝を縦横に掘った厚さ 8 mm のアクリル板を入れて使用した. 外形寸法の異なる溝彫りされたアクリル板を 3 種類それぞれ 2 枚ずつフライス加工により製作した. 1 組で 6 枚の加工済みアクリル板をアクリル樹脂系接着剤で貼り合わせ, それを幅 124 mm, 高さ 64 mm, 長さ 120 mm の長円

形容器に装填し、フタで密閉後、注口よりベビーオイルを充填した。上記の標準ファントムを2組作成し、Fig 2のように組み合わせて使用した。標準ファントム内容物の図面を図2に示す。この標準ファントムを3D-SE法($TR/TE = 100\text{ ms}/16\text{ ms}$, $NEX = 4$, 画素数: $512 \times 256 \times 128$, 画素サイズ: $(0.5\text{ mm})^3$, 撮像時間: 4時間)を用いて、周波数読み出し方向の勾配磁場の極性を変え2回撮像を行った。この撮像結果から、手で特徴点の抽出を行い、幾何学歪の定量化を行った。

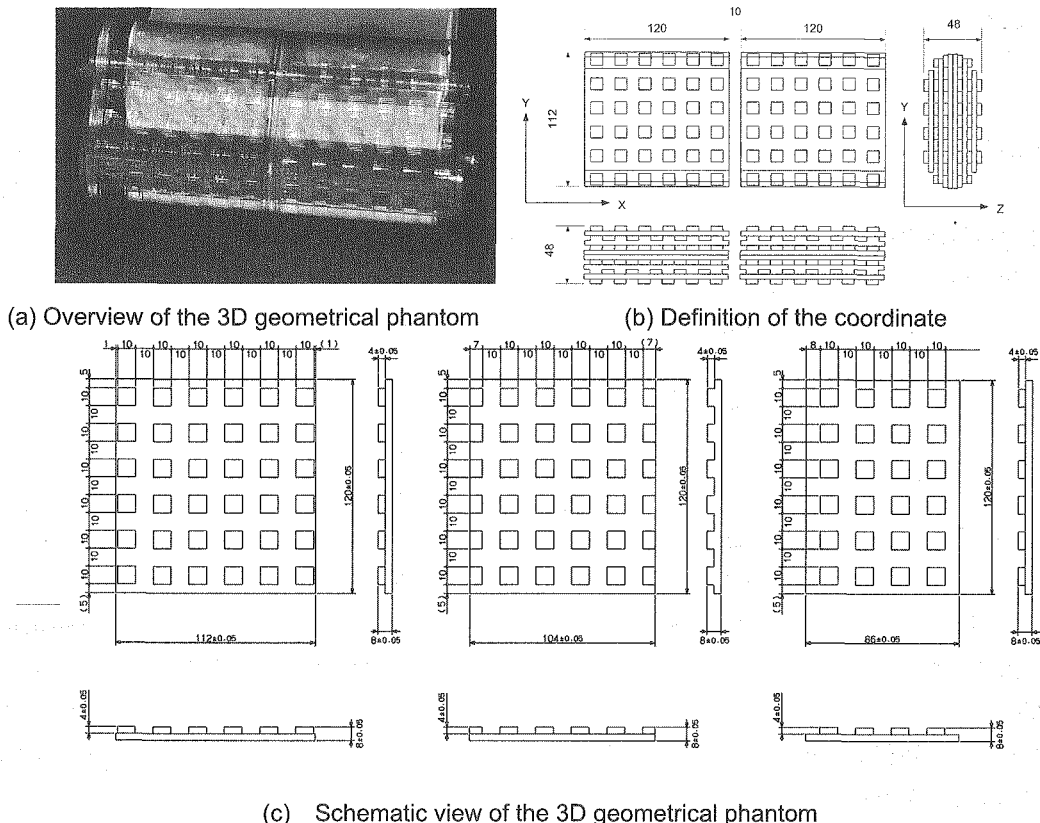


Fig 2. Overview of the 3D geometrical phantom used in this study

3. 撮像実験結果と考察

Fig 3に標準ファントムの $Z=5.5\text{ mm}$ の面における撮像結果と特徴点座標の抽出結果を示す。この画像上で特徴点の座標はBSpline関数による補間処理を行い表示した。これから、周波数読み出し軸方向(u方向)に非対称な歪みが観測された。Fig 4に勾配磁場の非線形性による画像歪みの分布と二乗平均(RMS: Root mean square)の統計結果を示す。これから、中心面から、Z方向に離れるにしたがって、勾配磁場の非線形性が低下していくことが分かる。これは、勾配磁場分布のシミュレーション結果とよく一致しており、勾配磁場コイルが設計通り機能していることが確認できる。Fig 5に静磁場の不均一性による画像歪みの計測結果とそれから求めた静磁場分布($Z=5.5\text{ mm}$)を示す。この結果から、均一領域($200\text{ mm} \times 200\text{ mm} \times 80\text{ mm}$ の回転楕円体)内での均一度を計算した結果、 171 ppm となった。この結果は工場出荷時のプロトン磁力計による検査結果である 30.0 ppm を大幅に上回っていた。この静磁場均一度の悪化は、輸送時の環境変化の影響や、設置場所における建物の構造部材の影響を受けている可能性を示唆しており、設置後に静磁場の再調整が必要であると考えられる。

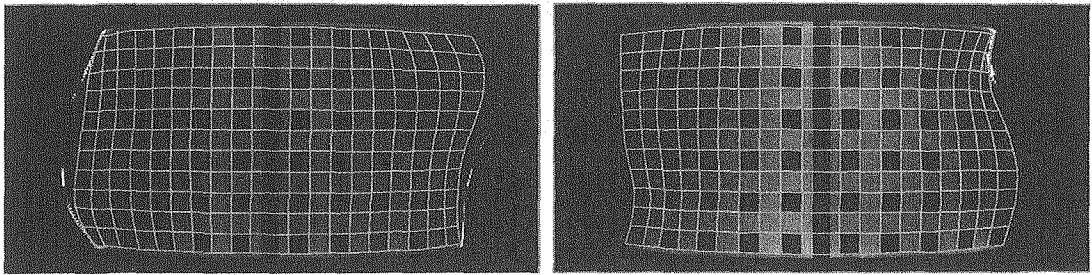


Fig 3. Cross-sectional images of the 3D geometrical phantom acquired with 3D spin echo sequence.. Left column image was acquire with a positive readout gradient Right column image was acquired with a minus readout gradient.

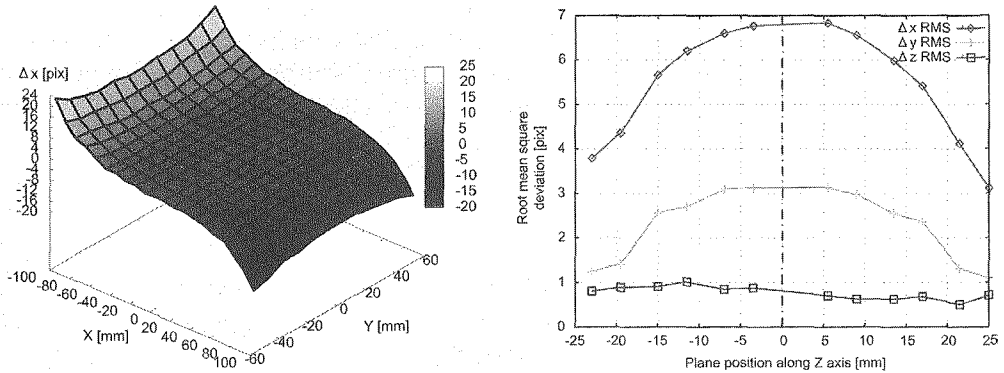


Fig 4. The spatial distribution of the gradient fields calculated from the geometric distortion. Left column image show the geometrical distortion map for the XY plane at Z = 5.5 mm. Right column image show the RMS geometrical distortion (Δx , Δy , Δz) for the each XY plane.

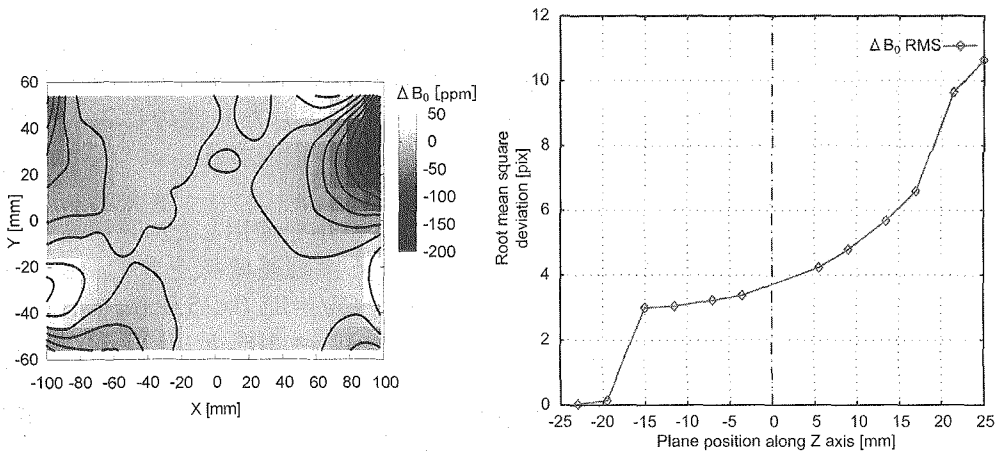


Fig 5. The spatial distribution of the static magnetic field calculated from the geometric distortion. Left column image show the inhomogeneity map of the static magnetic field for the XY plane at Z = 5.5 mm. Right column image show the RMS geometrical distortion for the each XY plane.

References

[1]. A. Kawanaka and M. Takagi, J. Phys. E. Sci. Instrum. 19 (1986).
 [2]. R. Turner, J. Phys D: Appl Phys 19 (1986).

P089 分画法を援用したヒト脳組織 T_1 分布の自動抽出法の検討

国立環境研究所 ○高屋 展宏, 渡邊 英宏, 三森 文行

Automated analysis of T_1 map aided by the tissue-segmentation.

National Institute for Environmental Studies

N. Takaya, H. Watanabe, F. Mitsumori

T_1 relaxation time of tissue water in human brain is an important parameter to indicate microscopic circumstances of the tissue. We measured a T_1 map in human brain at 4.7T using an IR-TurboFlash sequence. We analyze the T_1 distribution in grey matter (GM) or white matter (WM) regions by using tissue templates obtained from the tissue-segmentation. For the template, pixels which have probability of GM or WM over 50% was selected on the corresponding plane of 3D MDEFT image. Discrimination of pixels on the T_1 map from GM or WM was improved by performing a multi-components Gaussian fitting to the T_1 histogram extracted from the segmented T_1 map. Obtained T_1 values were 1.74s and 1.08s in GM and WM, which is consistent with those obtained by a ROI method.

【はじめに】

脳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 T_1 は静磁場の増加に伴って延長する。我々はこれまでに4.7Teslaにおけるヒト脳の灰白質、白質の T_1 値を測定し、その値が3Tや4Tに比べて延長していることを確認した。通常、組織ごとの T_1 を読み取るには T_1 マップ上にROI(region of interest)を設定してその平均値を得るのが一般的である。この方法では、ROIの選択にばらつきがある点と、組織の全体像を把握することができない問題点がある。標的組織の T_1 値の平均値や分布を自動読み取りできれば、より精密な解析が可能になると考え、昨年の本大会で T_1 マップと3D組織分画画像を用いた組織分画 T_1 マップを作成する試みを報告した[1]。しかし、この方法には課題があり、組織の境界領域における他組織の混入が問題であった。今回はこの対策についてあらかじめ組織テンプレートで選択した T_1 値のヒストグラムを多成分のガウス関数でフィッティングする方法について報告する。

【方法】

装置はVarian社製4.7T/92.5cmシステムに ^1H TEMコイルを使用した。健常被験者からIR-TurboFlashシーケ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 T_1 マップを作成した。同時に T_1 強調の3D MDEFT画像も測定して組織分画画像を作成した。最初の処理は白質の存在確率が94%, 90%, 80%, 50%以上の領域のみを利用して、組織分画画像を抽出した。スライス厚内のパーシャルボリュームの問題を考慮して T_1 マップと同じスライス面を含む前後3枚のスライスより組織分画画像を抽出した。次に3枚の画像を重ね合わせた画を

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

マスク画像として、 T_1 マップにマスク処理した。この後、前頭領域のみを抽出し、ヒストグラムの形式で T_1 値を取り出し2成分（白質、灰白質）のガウス関数でフィッティングした。今回はバリデーションのために前頭白質を手動抽出してヒストグラムを得てガウス関数による解析も行った。前頭皮質の場合は50%以上の領域を用いてマスク画像を作成し、得られたヒストグラムは3成分（白質、灰白質、CSF）のガウス関数でフィッティングした。

【結果と考察】

マスク処理に使う白質画像の確率を高くすると他組織の混入のない領域を抽出できるが、本来白質部に分類されるべき領域も逸失してしまう。確率を低くすると白質のほとんどを抽出することができるが、 T_1 値の分布は2成分からなり、境界領域からの灰白質の混入があった（Fig.1）。そのため、50%で得たヒストグラムを2成分のガウス関数でフィッティングして手動抽出に近い妥当な解析結果を得た（Fig.2）。

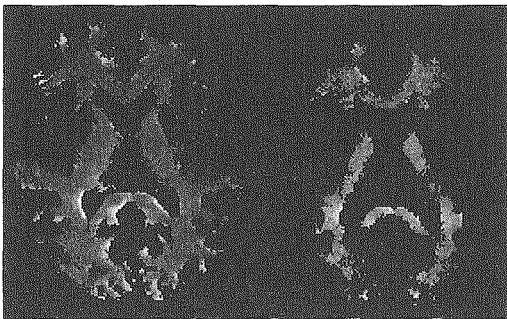


Figure 1. T_1 maps extracted using white matter segments with probabilities >50%(left) and >90%(right) as templates in human brain.

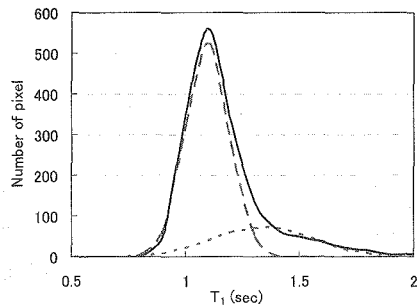


Figure 2. Distribution of T_1 values in the frontal white matter segment in a human brain (solid line) with fitted two-component Gaussian curves. (broken lines)

灰白質（前頭皮質）についても白質と同様に、灰白質の確率が50%以上の領域を使ってヒストグラム解析をした。白質の場合は混入する灰白質を考慮して2成分フィットを行ったが、灰白質の場合は、白質とCSFの混入があるので、3成分でフィッティングした。3成分のガウス関数で解析した前頭白質の T_1 値はROI法で測定した値にほぼ同じく、3成分でフィットすることにより、1成分フィットと比べて約32%の混入領域を除去することができた（Fig.3）。

本方法で得たヒストグラムより T_1 値の分布を得ることができるが、この分布には測定やフィッティング時の誤差が含まれており、解析は更なる検討を要する。

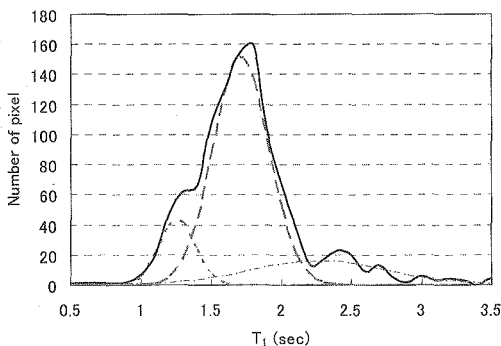


Figure 3. Distribution of T_1 values in the frontal grey matter segment in a human brain (solid line) with fitted three-component Gaussian curves. (broken lines)

【参考文献】

[1] 高屋展宏、渡邊英宏、三森文行 第46回NMR討論会講演要旨集, p360 (2007)

マジックエコー-DANTE 法によるスライス選択における横緩和効果

筑波大学大学院 数理工学科学研究科¹ 横浜創英短期大学 情報学科²○増本秀史¹、橋本雄幸²、松井茂¹

Transverse relaxation effects in slice selection by the magic-echo DANTE method

H. Masumoto,* T. Hashimoto,† and S. Matsui,*

*Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba,
Tsukuba, Ibaraki 305-8573†Department of Information Technology, Yokohama Soei Junior College,
Yokohama, Kanagawa 226-0015

We previously proposed a slice selection method for solid-state MRI by combined use of DANTE and magic echoes. Transverse relaxation effects are important in application of the method. It may be usual to compare profiles obtained by non-selective and selective excitation to estimate the transverse relaxation effects. However, the non-negligible receiver dead time hinders accurate measurement of the profile corresponding to the thermal equilibrium magnetization, leading to incorrect estimation of the relaxation effects. Here, we attempt to measure the transverse relaxation effects by comparing selective excitation profiles which have different transverse relaxation effects and by referencing simulation results.

【導入】我々は固体 MRI 用 slice 選択法として Magic Echo (ME) DANTE 法を前々回の本討論会で提案した。この方法における slice 選択中に起こる横緩和の影響は、この方法の有用性を左右するもので、検討が必要である。そこで我々は、横緩和の効果をシミュレーションおよび実験により調査した。特に、DANTE 選択励起法との組み合わせにより、選択励起中における ME line narrowing の効率の低下に注目した。選択励起中に起こる横緩和の影響を評価するには、非選択励起と選択励起の profile を比較することが簡潔であると考えられる。ここで、非選択励起 profile は横緩和が起こっていない熱平衡核磁化に相当している。しかし、一般に固体サンプルでは receiver の dead time の為に厳密に正しい熱平衡核磁化を得るのは困難であるため、この様な profile の比較では横緩和の評価に誤差が生じてしまう。そこで我々は異なる横緩和効果を含む選択励起同士の profile を比較し、シミュレーションと実験の対応をとることで横緩和効果を得ることを試みた。

【シミュレーションと実験】用いたシーケンスを Fig.1 に示す。

キーワード： slice selection, MRI, DANTE, magic echo, line narrowing

ますもとひでふみ、はしもとたけゆき、まついしげる

異なる横緩和の効果を導入するため、固体での実験では $\tau_D=180, 360\mu\text{s}$ 、水とシミュレーションでは $\tau_D=120, 300\mu\text{s}$ の二種類を用いた。これにより二種類の励起時間 (= 横緩和の影響が含まれる時間) をslice選択法に導入した。

緩和の効果は一般に、ME line narrowingを用いない場合は T_1, T_2 の効果が、ME line narrowingを用いる場合は $T_1, T_{1\rho}, T_2 \ln(\text{line narrowing下での横緩和時間})$ の効果が、それぞれ存在するが、 $T_1, T_{1\rho} \gg T$ (図を参照) として縦緩和の影響は無視し、 T_2 および $T_2 \ln$ の横緩和の影響のみを考慮した。

実験は自作の装置により、共鳴周波数 60MHzでプロトンに対して行なった。90度パルスの幅は $2.5\mu\text{s}$ である。磁場勾配の強度は、例えば $\tau_D=120\mu\text{s}$ の場合 4.1G/cmである。

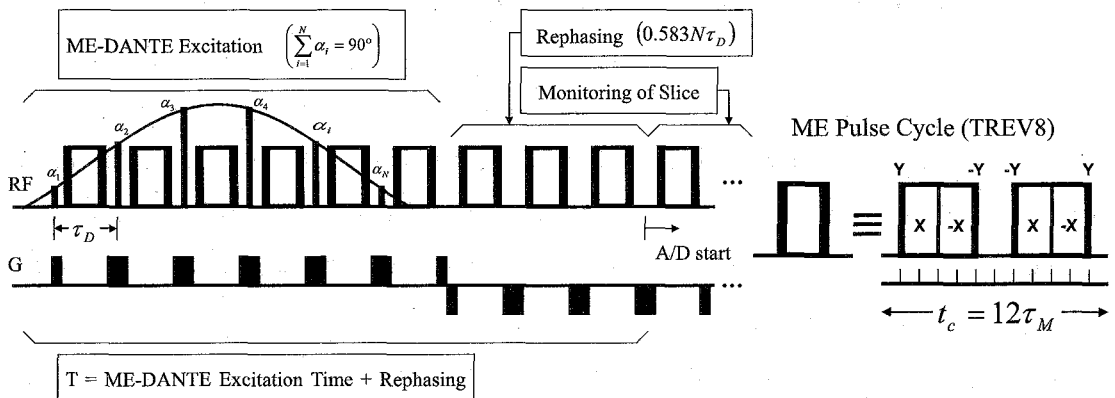


Fig.1 Magic Echo DANTE Sequence. Solid sample experiments were performed with Magic Echo line narrowing (TREV-8). Water sample experiments and simulations were performed without TREV-8. N was fixed at 6.

【結果と考察】 Fig.2 にシミュレーションで得られたprofileの T_2/T 依存性を示す。 T_2/T

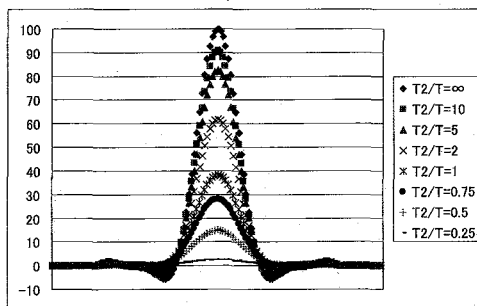


Fig.2 Simulation results.

T_2 broadening effect in Monitoring period (Fig. 1) is included.

現在、固体サンプルとして adamantane, polycarbonate を用いた実験を行なっている。実験結果はポスターにて発表する予定である。

【参考文献】 S. Matsui, H. Masumoto and T. Hashimoto, *J. Magn. Reson.* 186, 238-242 (2007)

P091

NMR マイクロイメージングによるマウスてんかん脳の 灌流画像取得

大阪大学 大学院 医学系研究科

○太田千香子 山本めぐみ 木村敦臣 藤原英明

Acquisition of perfusion images of epileptic mice brain by NMR micro-imaging
Graduate School of Medicine, the University of Osaka

Chikako Ota, Megumi Yamamoto, Atsuomi Kimura, Hideaki Fujiwara

To measure brain perfusion that explains blood flow of capillary vessels or functional vessels, nuclear medicinal technique has been used widely as the most accurate method. However, recent technological advancements allow us to measure the perfusion by MRI. Using FAIR (Flow-sensitive Alternating Inversion Recovery) based on a spin labeling method that magnetically labels arterial blood, we can measure the brain perfusion non-invasively. Therefore, we intended to enable the acquisition of the perfusion image of mice brain under a high magnetic field condition by the FAIR technique involving b-SSFP (balanced Steady State Free Precession) sequence. As a result, we succeeded in acquiring the images and monitoring the temporal change of the brain perfusion of epileptic mice.

【背景・目的】

脳組織の毛細血管あるいはそれに準ずる機能血管系の血流を表す脳灌流の測定はこれまで核医学的手法が最も正確とされ汎用されてきたが、近年の技術進歩によりMRIによる測定が可能となりつつある。動脈血を磁氣的に標識するスピンラベリング法に基づくFAIR法を用いることにより、脳灌流を非侵襲的に測定することが可能である。我々はFAIR法にb-SSFPを応用した手法を用い、超高磁場条件下(9.4T)でマウス脳の灌流画像を取得すること、及びカイニン酸投与マウスにおける灌流値の経時変化を観察することを目的として実験を行った。

キーワード: NMR マイクロイメージング 灌流 FAIR b-SSFP てんかん

おおたちかこ やまもとめぐみ きむらあつおみ ふじわらひであき

【方法】

測定は Varian-INOVA 400WB(9.4T)を用い、presaturation FAIR 法¹⁾にて行なった。撮影条件は TR/TE=4.2/2.1msec、フリップ角(α)=60°、スライス厚=1.0mm、FOV=1.92×1.92 cm²、matrix=128×128、8 shot、NEX=8 であり、撮像シーケンスには b-SSFP を用いた。また、T₁測定は飽和回復法(反転時間(TI))=0.63, 0.9, 1.3, 2.0, 4.0, 10 s)で行なった。実験動物はネブタール麻酔下の雄性ddy マウス(健常6匹、病態モデル4匹)を用いた。

得られた信号強度を以下の式¹⁾によって解析することにより、灌流値 f (ml/100g, tissue/min)を求めた。

$$\Delta M(t) = M_{ns}(t) - M_{ss}(t) = 2\alpha_0 M_0 \frac{f}{\lambda} \cdot \frac{[\exp(-t/T_{1app}) - \exp(-t/T_{1a})]}{(1/T_{1a} - 1/T_{1app})} \cdot [1 - \exp(-\tau/T_{1a})]$$

ここでM_{ns}(t)とM_{ss}(t)はそれぞれ反転パルスを測定スライスを含む全脳に照射した場合と測定スライスと同程度に照射した場合の信号強度、M₀は平衡磁化、T_{1app}はみかけのT₁、T_{1a}は動脈血のT₁、 α_0 は反転効率、 τ はpresaturationからの回復時間、 λ は血液組織分配係数を示す。

【結果】

得られた灌流画像と灌流値の経時変化を Fig.1 及び Fig. 3 に示す。局所的な灌流値を求めるための ROI は脳解剖図(Fig.2)²⁾を参考にして M₀ 画像上に囲った。健常マウスの測定値より脳灌流は皮質と視床で高い事がわかった(p<0.05)。これは先行研究の結果に一致する¹⁾。また Fig.3 よりカイニン酸投与により灌流量が投与後 30 分をピークに変化する事がわかった。

【考察】

FAIR 法に b-SSFP を応用した手法にて首尾よく脳灌流画像を時系列的に取得することが可能となり、カイニン酸投与により得たてんかんモデルマウスにおいて灌流量の変化を捉えることができた。Fig.3 の 30 分後のピークはてんかん発作による神経細胞の過剰な興奮状態を反映していると思われた。

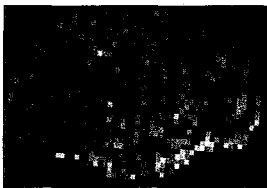


Fig.1 Perfusion image of mouse brain

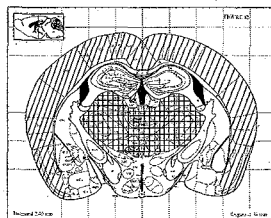


Fig.2 Mouse brain map
Shaded portion is thalamus
and checked portion is cortex.

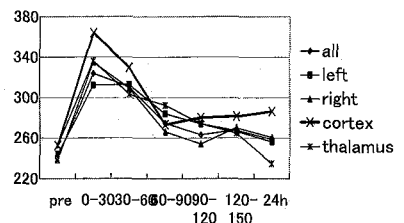


Fig.3 Temporal perfusion change
of epileptic mice

【参考文献】

- 1) Duhamel G, Callot V, Cozzone PJ, Kober F. Spinal Cord Blood Flow Measurement by Arterial Spin Labeling. Magn Reson Med 2008; 59: 846-854.
- 2) Paxinos G, Franklin KBJ. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press; 2001.

2D CT-PRESS によるヒト脳内高感度・高分解 *in vivo* ^1H スペクトロスコピー

○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

Highly sensitive and resolved *in vivo* ^1H spectroscopy in human brain
using 2D CT-PRESS

Hidehiro Watanabe, Nobuhiro Takaya, Fumiyuki Mitsumori
National Institute for Environmental Studies

Abstract

An ISIS CT-PRESS sequence which is a spin echo type of the constant time method was implemented on a 4.7-T whole-body spectrometer for peak detection of glutamate, GABA and glutamine in human brain with higher sensitivity. Three diagonal peaks of GABA C2H (2.28 ppm), Glu C4H (2.35 ppm) and Gln C4H (2.44 ppm) were resolved on CT-PRESS spectra in a phantom containing major brain metabolites. Signal to noise ratio of Glu C4H on a CT-PRESS spectrum was 2.24 times higher than that obtained by localized CT-COSY. In volunteer studies, these three peaks were also resolved on CT-PRESS spectra of parieto-occipital regions with sensitivity improvement by a factor of 1.7.

1. はじめに

これまで、局所励起 2D constant time COSY 法をヒト用 4.7T MR 装置で用いることで、 F_1 方向のデカップリングという特徴を利用して、ヒト脳内の神経伝達物質として重要なグルタミン酸 (Glu)、 γ -アミノ酪酸 (GABA) のピーク検出、濃度定量ができることを報告してきた (1, 2)。定量化では、constant time delay, T_{ct} を変化させた複数のスペクトルを取得する。これらのスペクトルに対して、基底スペクトルを用いたスペクトル解析によるピーク体積計算、 J_{HH} による信号強度変化を考慮した T_2 補正、内部水基準による RF コイル負荷の補正を行い、濃度定量を行う。この方法では、体積コイルを用いたヒト脳代謝物定量的の場合、感度の点から 1 時間 20 分の測定時間が必要であり、時間短縮の必要があった。

一方、これまでの CT-COSY による検討の結果、ヒト脳スペクトル上で、2.28 ppm の GABA C2H、2.35 ppm の Glu C4H の対角ピークが検出でき、これらのピークを解析することで定量化できることがわかってきた。そこで、今回、対角ピークのみを検出のため、高感度化が期待できるスピンエコー型の CT-PRESS 法を開発して、ヒト脳内でピーク検出ができるかを検討した。

2. 方法

開発した ISIS CT-PRESS は、水信号抑圧パルス、領域外飽和パルスに続き、局所

Keywords: human brain, glutamate, GABA, CT PRESS, *in vivo*

わたなべひろ, たかやのぶひろ, みつもりふみゆき

励起モジュールである ISIS 局所励起モジュール (x 方向) -90° スライスパルス (y 方向) $-1/2*TE1-180^\circ$ パルス $-1/2*(TE1+TE2)-\Delta t_1/2-180^\circ$ スライスパルス (z 方向) $-$ {データ収集} で構成される。それぞれの t_1 ステップ毎に $\Delta t_1/2$ シフトした時刻に第 2 番目の 180° パルスを印加し、得られたエコー信号の収集を行った。全 t_1 ステップ終了後、得られた 2D データセットに対して constant time 条件を満たす様に、1 ライン毎の FID データの前段に 0 補填を行い、再構成後、 F_1 方向に 1H デカップルが施された 2D CT-PRESS スペクトルを得た。

実験は、ヒト用 4.7 T MR 装置 (Varian 社製、INOVA) で行い、RF コイルには体積 TEM コイルを用いた。ファントム実験では、脳内の代謝物を模擬した 10 mM NAA、8 mM Cr、9 mM Glu、3 mM Gln、2 mM GABA の混合ファントムを用い、局所領域からの CT-PRESS 信号、CT-COSY 信号をそれぞれ取得した。ボランティア測定では、頭頂一後頭葉領域 27 ml ($30 \times 30 \times 30 \text{ mm}^3$) から測定時間 20 分で CT-PRESS 信号を取得した。ファントム実験、ボランティア測定の内いずれも、CT-PRESS では $TE1 = 15 \text{ ms}$ 、 $TE2 = 36 \text{ ms}$ 、 $T_{ct} = 126 \text{ ms}$ とした。ファントム実験では、CT-COSY の T_{ct} を 110 ms とした。全測定で、スペクトル帯域は、 $F_1 = 1 \text{ KHz}$ 、 $F_2 = 2 \text{ KHz}$ とし、 t_1 ステップ数 = 150、積算回数は 2 回とした。relaxation delay は、ファントム実験では 3 s、ボランティア測定では、4 s とした。

3. 結果

図 1 に、CT-PRESS(a)および CT-COSY(b)によるファントムスペクトルを示す。いずれのスペクトル上においても、GABA C2H (2.28 ppm)、Glu C4H (2.35 ppm)、Gln C4H (2.44 ppm) の 3 つの対角ピークが検出できた。CT-PRESS スペクトル上で、Glu C4H の信号対ノイズ比 (SNR) は、CT-COSY のそれと比較して 2.24 倍であった。

図 2 には、ヒト脳 CT-PRESS スペクトルを示す。ファントムスペクトルと同様、3 つの対角ピークを検出できた。得られた Glu C4H の単位時間当たりの SNR は、これまでに取得したヒト脳 CT-COSY スペクトルと比較して 1.7 倍であった。

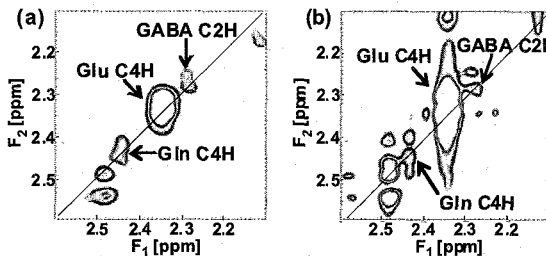


Fig. 1. Spectra of a brain phantom obtained by (a) CT-PRESS and (b) CT-COSY.

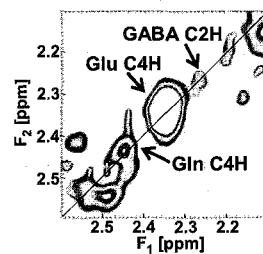


Fig. 2. A CT-PRESS spectrum of the human brain.

4. 結語

CT-PRESS 法で、ヒト脳内からグルタミン酸、GABA の高感度なピーク検出が可能であり、CT-COSY 法を用いるよりも短縮した測定時間での定量化が期待できる。

References

1. Watanebe, H., Takaya, N., Mitsumori, *NMR Biomed.*, 21(5), 518-526, 2008.
2. 渡邊英宏・高屋展宏・三森文行, Simultaneous quantitation of glutamate and GABA in the human brain using localized 2D CT-COSY: 2nd report, 第 46 回 NMR 討論会講演要旨集, pp.368-371

高橋征三¹、荻野孝史²、山口行治³

1 日本女子大学理学部物質生物科学科 2 国立精神・神経センター 神経研究所

3 実行データサイエンス(株)

Distribution of concentrations in salivary metabolites caused by intra-/inter-subject variations.

Seizo Takahashi¹, Takashi Ogino² and Yukiharu Yamaguchi³

1. Dept. Chem.& Biol. Sci., Japan Women's Univ. 2 Inst. Neuroscience, NCNP

3 Jikko Data Science. Inc.

Morning saliva before rising was collected from healthy young adult females to investigate the variation of metabolite concentrations by ¹H-NMR. The concentrations of most metabolites obeyed neither normal nor lognormal distributions. Fitting to inverse-Gaussian distribution was also unsuccessful. Thus the Box-Cox transformation was performed to make the data normal. It gave the average Box-Cox coefficient as 0.17±0.02. The value of 0.2 was adequate enough to an approximate coefficient for the analyses of metabolites in question of unknown distribution. The transformation reduces the apparent intra/inter subject variations.

我々は唾液の代謝物成分のなかから月経周期に応じた周期的変動を探索する目的で、¹H-NMRにより代謝物濃度の同時定量を試みてきた。唾液はその大部分が体内に再吸収される外分泌液で、血液と尿の中間的性格をもつにもかかわらず、臨床診断にはほとんど使われていない。その理由は、唾液成分が種々の外的、内的要因で大きく変動し、有意な生理的变化を抽出することが極めて難しいからである。

一般に薬物応答には個体間/個体内変動があり、そのメカニズムは分っていない。唾液は、神経支配をうけて血中から選択的に唾液腺を通して口腔に放出されるので、投与薬物が血液から組織に輸送されるメカニズムに酷似していると考えられる。ヒトへの臨床開発において、標的組織中の薬物濃度を適切に評価する手段がない現在、唾液代謝物濃度の研究は、薬物の血中濃度と組織内濃度の関係、ならびに薬物応答の個体間/個体内変動について、なんらかの洞察を与えるものと期待される。

「実験」2名の健康な若年女性を選び、起床直後の唾液を毎日30日間採取したもの、および基礎体温の高温期と低温期に1日4回採取したものを使った。起床直後の唾液は-40℃で長期保存し、使用前に室温で解凍して、サリベット™から遠心抽出した。測定には水信号を抑制する複合パルス列を考案して、Bruker AMX-400WBを用い、295Kで測定した。データ解析には統計解析ソフトJMP、STATAおよびPLS_ToolboxとMATLABプログラムMATNMRおよび自作プログラムを使用した。

キーワード 濃度分布、代謝物質、唾液、正規分布、個体変動

たかはし せいぞう、おぎの たかし、やまぐち ゆきはる

「結果と考察」

信号強度は吸収スペクトルを Voigt 曲線でフィットして求めた。分裂ピークは他と重なる成分を極力除外するために任意の狭い領域を選択し、ベースラインは直線で評価した。スペクトルの位相補正はマニュアルで行った。位相補正の誤差による強度評価の揺らぎはせいぜい数%以内であり、今回の解析結果には直接影響しない。

得られた代謝成分の強度データをヒストグラムにして描くと、最大値やピークの広がり物質ごとに違ったが、大多数が次式に示す正規分布と対数正規分布の中間の分布パターンを示した。正規分布は確率変数 x の確率分布から平均 μ 、分散 σ が定まる。

$$N(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma} \exp\left\{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right\} \quad -\infty < x < \infty$$

一方、対数正規分布は次式で定義され、同様に μ, σ が得られる。ここで得られる μ は相乗平均値であり、正規分布から得られる相加平均値 μ より小さい値として評価される。

$$LgN(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma x} \exp\left\{-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right\} \quad x > 0$$

唾液成分の代謝物濃度の中央値は常に相加平均値と相乗平均値の中間に位置した。しかもヒストグラムを対数正規分布と正規分布を混合してフィッティングすることは難しいことが分った。

1915年に Schrödinger と Smoluchowski は独立に、正にドリフトするブラウン運動の最初の通過時間が逆正規分布することを発見した。唾液の場合、ランダムな時間にパルス的に分泌した代謝物質が、一定速度で一定長の唾液腺をブラウン運動で拡散しながら通過し、最初に口腔に到達した濃度分布と考えれば、逆正規分布の可能性は十分にあると考えた。次式に示す逆正規分布は、2つのパラメータでひずみの違う分布を対数正規分布よりも柔軟にフィットできる特徴があり、正規分布と同様に加法則が成り立つなど対数正規分布より好ましい性質をもっている。

$$IG(x; \mu, \lambda) = \sqrt{\frac{\lambda}{2\pi}} x^{-3/2} \exp\left\{-\frac{\lambda(x-\mu)^2}{2\mu^2 x}\right\} \quad x, \mu, \lambda > 0$$

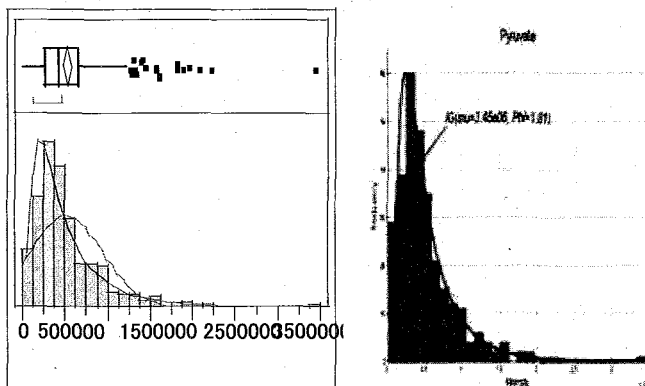


Fig. 1 Histogram of Pyruvate Concentration in Saliva

Curves are fitted to the Normal, Log-Normal(Left), and inverse Gaussian.Distributions(Right).

Note that the Log-Normal and inverse Gaussian Distributions underestimate the pyruvate concentration, and that hardly fit the concentrations nearby zero.

逆正規分布で一連のデータを解析した結果、期待どおり対数正規分布より適用範囲が広いが、必ずしも結果は好ましくないことが分った。たとえば図 1(右)に示すように、ゼロ濃度近傍の立ち上がり部分では対数正規分布のほうが優れている場合がある。さらに濃度ゼロでは定義されないという本質的な困難があるため、必ずしも代謝物濃度の解析に適していないと考えられる。そこでひずみ率など 3 番目のパラメータを入れる代わりに変数変換で正規化することを試みた。

たとえば図 1 に示したピルビン酸のデータを Box-Cox 変換して 0.214 ± 0.056 のべき乗をとると、図 2 (左)に示すように正規化できる。このようにして得た Box-Cox 係数の平均は 0.18 ± 0.02 であった。したがって正規分布する物質が観測される可能性は無視でき、対数正規分布からも系統的にずれていると結論された。複雑系のネットワーク理論は、自律的に存在し、他の物質によるフィードバック制御を受けない物質は正規分布し、鎖状に連なった複雑な代謝系をなす物質は対数正規分布すると主張する。実験結果は、観測される代謝系はそれらの中間にあることを意味する。

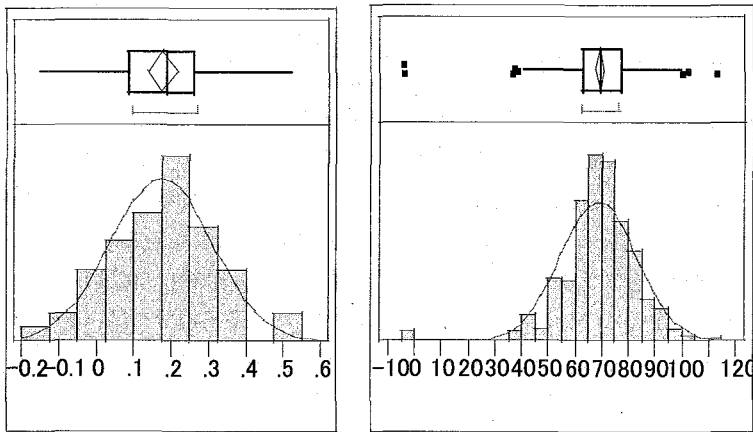


Fig. 2 (Left) Pyruvate Distribution of Concentration after the Box-Cox Transformation with the coefficient $\lambda = 0.214 \pm 0.056$. (Right) Distribution of Box-Cox Coefficients for all metabolites

今回の結果から、生体物質の濃度の評価において、従来のいわゆる平均濃度の求め方は、系統的なずれにより、分散成分の混入が無視できないため、個体差変動を過大評価していた可能性を示唆する。また観測値を正規分布させるためのスケール変換係数、つまり Box-Cox 係数とスケール変換後の平均濃度に対応する Box-Cox 定数の対数との間の直線関係の中に、下に凸の系統的なズレが認められた(図 3)。そこで Box-Cox 定数のスケール逆変換から得られた、代謝物濃度の平均値に相当する値と、Box-Cox 係数との相関を調べたところ、ゆるい正の相関が見出された。この結果は、高濃度の代謝物質ほど対数正規分布から離れることを意味する。

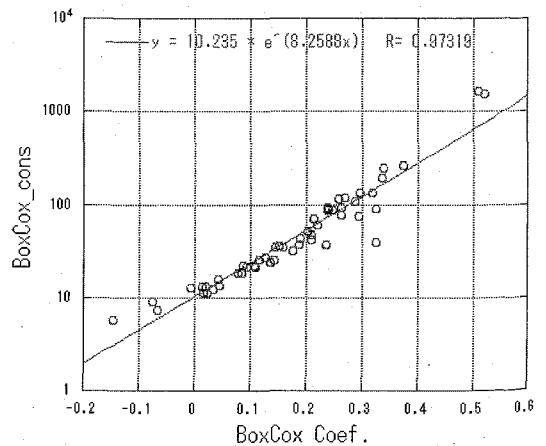


Fig 3 Correlation between the Box-Cox Coefficients and Logarithmic Constants

もし Box-Cox 係数の大きさが代謝制御ネットワークの長さや複雑さに関係しているならば、濃度の高い代謝物質は比較的少数の代謝制御系から構成されること、および濃度の低い代謝物質ほど精密に制御され、濃度の揺らぎは小さいことが示唆される。

今回の結果から、代謝物濃度分布は Box-Cox 係数としては非常に狭い範囲にあることが分かったので、濃度分布未知の生体成分の評価には、濃度の約 0.2 乗というスケール変換で正規化し、通常の統計解析をすれば、ほとんどの場合に系統誤差を避けることができると期待される。

系統誤差の一例として、図 4 に正規分布、対数正規分布、Box-Cox 変換による統計解析の結果を示す。統計分布を無視して統計解析すると、たとえばピルビン酸の代謝に及ぼす影響は、乳酸がピルビン酸の濃度を増大させる効果があり、酢酸より乳酸のほうが効果が大きいと推論されるが、じつは乳酸の効果は酢酸と同じかやや小さく、しかもピルビン酸の濃度を押し下げる方向に働くらしい。図の例では、対数正規分布するとした場合と、Box-Cox 変換による結果がほぼ一致した。おそらく強度の 0.2 乗と対数値で構成される強度分布の違いを検出できるほどデータの質が良くないのであろう。その意味で、対数正規分布による過去の統計解析結果に大きな間違いはないのかもしれない。

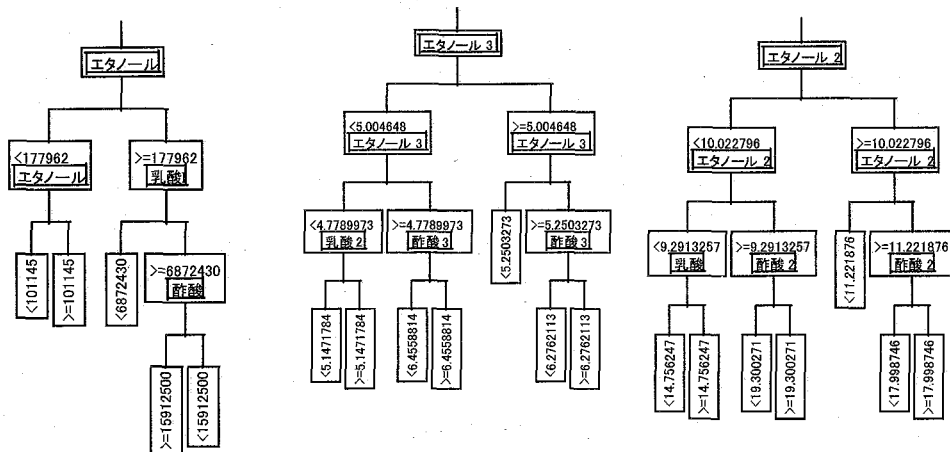


Fig. 4 Partition of Pyruvate Data against Ethanol, Lactate and Acetate.

Data are used intact intensities (Left), logarithmic intensities (Center) and involved intensities using power of 0.2 (Right). It corresponds to make the assumption of Normal Distribution, Log-Normal Distribution, and Normal Distribution after the Box-Cox transformation, respectively. The calculation under a normal distribution underestimates the contribution of Ethanol while overestimate that of Lactate. The latter two cases get similar results because of the difference in intensity distribution are rather small.

DNP-NMR を用いた多核 NMR メタボロミクスに関する 基礎的研究

日本医科大学 NMR 研究施設¹⁾、オックスフォード・インストゥルメンツ(株)²⁾、
京都大学 初期診療・救急医学講座³⁾、日本医科大学 救急医学講座⁴⁾

○平川慶子¹⁾、阿部孝政²⁾、小池薫³⁾、佐藤格夫⁴⁾、増野智彦⁴⁾、大野曜吉¹⁾

Basic research for multinuclear NMR based metabolomics with DNP-NMR

NMR laboratory, Nippon Medical School¹⁾, Oxford Instruments KK²⁾
Department of Primary Care & Emergency Medicine, Kyoto University³⁾
Department of Critical Care Medicine, Nippon Medical School⁴⁾

Keiko Hirkawa¹⁾, Takamasa Abe²⁾, Kaoru Koike³⁾, Norio Sato⁴⁾, Tomohiko Masusno⁴⁾
and Youkichi Ohno¹⁾

Dynamic Nuclear Polarisation (DNP) yields greatly enhanced signal for ¹³C, ³¹P and ¹⁵N nuclei in solution-state NMR spectroscopy. This procedure has been shown to yield a signal-to-noise enhancement of over 10,000 times compared to conventional NMR experiment. The present study investigated the feasibility of using DNP-NMR for metabolomic study.

【背景】我々は、NMR メタボロミクスを用いた疾患解明システムの確立をめざしている。これまでに、各種疾患における体液や臓器内の代謝物について、¹H NMR スペクトルを用いた網羅的解析を行った結果、出血性ショック後の蘇生効果や髄膜腫摘出物の新たな鑑別診断などに関して臨床応用につながる結果を得ることができた。炭素、窒素、リンは、生体分子に含まれる重要な元素であるが、観測対象となる同位体 (¹³C、¹⁵N、³¹P) の相対感度が低く、体液や臓器抽出物の NMR スペクトルについては、これまで良質なデータを得ることが困難であった。しかしながら、これらの観測核はケミカルシフト範囲が広く、代謝物 1 分子中に含まれる同一元素数も少ないなど分子情報を得るうえでは数々の利点があり、測定手法の改善により十分な S/N 比が獲得できれば、複数の核種による NMR スペクトルデータを用いた高精度のメタボローム解析が期待できる。感度の向上法としては、高磁場マグネットの使用、同位体濃縮などがあるが、設置環境やコスト面から、汎用性が低く、病態解析や診断応用などの臨床応用を目的とした NMR メタボロミクスへの応用は現在のところ困難である。

Key Words: DNP-NMR, metabolomics, phospholipid, ATP, choline

ひらかわけいこ

そこで、我々は、あらたに近年話題の DNP-NMR 法を用いた超高感度測定に注目し、多核 NMR スペクトルによるメタボローム解析への有用性に関する基礎的研究を開始した。今回、エネルギー代謝関連リン化合物およびリン脂質化合物の標準品などを用いて ^{31}P 、 ^{13}C 、 ^{15}N について DNP-NMR 測定におけるサンプル調整や測定条件の最適化と共に、thermal 測定データとの比較も行った。

【方法】

- (1) 測定試料；①ATP②ADP③PC④PEA⑤PtC⑥PtEA⑦大豆由来リン脂質混合物
- (2) NMR 測定；NMR 測定はすべて横浜理化学研究所 NMR 施設の 600MHz DRXR600 型 FT-NMR 装置 (Bruker) にて行った。DNP-NMR 測定における試料の超偏極化は装置に付設された *in vitro* DNP polarizer、Hypersense™ (Oxford instruments) を用いて行った。

【結果】

ラジカルの選択、偏極時間、ガラス化溶媒などを最適化することにより、今回測定した化合物については、 ^{31}P 、 ^{13}C 、 ^{15}N すべての核種について、DNP-NMR 測定で、1 回の積算で S/N 比のよいスペクトルデータを得ることができた。

緩和時間の影響など、今後検討すべき課題は多いが、リン脂質やエネルギー代謝関連リン化合物など、従来の測定法では満足の得られなかった代謝物の解析への活用が期待できる結果が得られた。

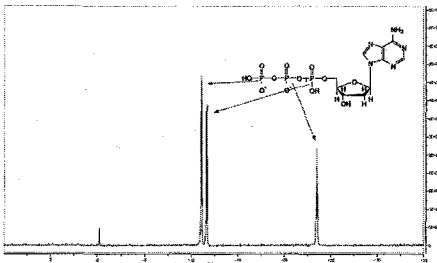


Fig.1 ^{31}P DNP-NMR spectrum of 500µg ATP with OX63. (1 scan)

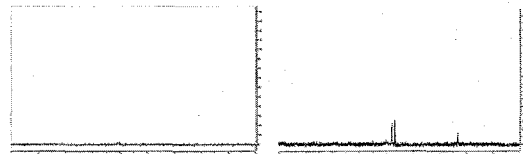


Fig.2 ^{31}P Thermal spectra of 500µg ATP with OX63. (Left: 1scan, Right: 512 scan)

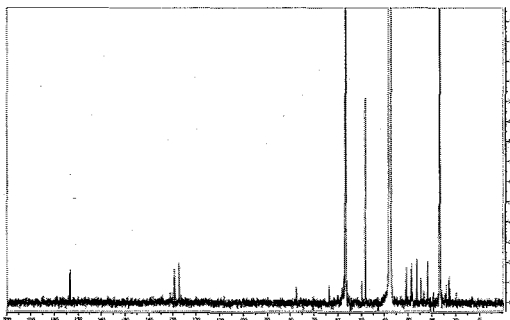


Fig.3 ^{13}C DNP-NMR spectra of Phospholipid from Soy bean. (1 scan)

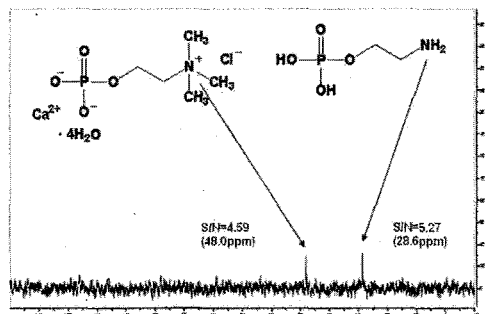


Fig.4 ^{15}N DNP-NMR spectra of PC/PEA=1:1 mixture.

In-Cell NMR 法による真核細胞内におけるタンパク質-タンパク質およびタンパク質-低分子薬剤間相互作用の観察への試み

¹ 京都大学工学研究科, ²CREST/JST, ³ 神戸大学医学研究科, ⁴ 京都大学化学研究所, ⁵SORST/JST, ⁶ 首都大学東京, ⁷ 理研横浜研究所
 ○猪股晃介^{1,2}, 大野(真板)綾子¹, 枋尾豪人^{1,2}, 磯貝信¹, 天野剛志^{2,3}, 中瀬生彦⁴, 武内敏秀⁴, 二木史朗^{4,5}, 伊藤隆^{2,6}, 廣明秀一^{2,3}, 白川昌宏^{1,2,7}

Trial for observation of protein-protein and protein-drug interaction inside eukaryotic cells by
 In-Cell NMR

Kohsuke Inomata^{1,2}, Ayako Ohno¹, Hidehito Tochio^{1,2}, Shin Isogai¹, Takeshi Tenno^{3,2},
 Ikuhiko Nakase⁴, Toshihide Takeuchi⁴, Shiroh Futaki^{4,5}, Yutaka Ito^{6,2}, Hidekazu Hiroaki^{3,2}, &
 Masahiro Shirakawa^{1,2,7}

¹Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University;; ²CREST, JST;; ³Division of Structural Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University;;

⁴Institute for Chemical Research, Kyoto University;; ⁵SORST, JST;; ⁶Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University;; ⁷RIKEN, Yokohama Institute, Suehirocho, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan

In-cell NMR is an isotope-aided multi-dimensional NMR technique that enables observations of conformations and functions of proteins in living cells. This method has been successfully applied to proteins in bacteria. However, application of in-cell NMR to eukaryotic cells is far limited to *Xenopus laevis* oocytes. We will a method to obtain high-resolution two-dimensional heteronuclear NMR spectra of proteins inside living human cells. And we will discuss the potential as the method for observation of protein-protein and protein-drug interaction inside mammalian cells.

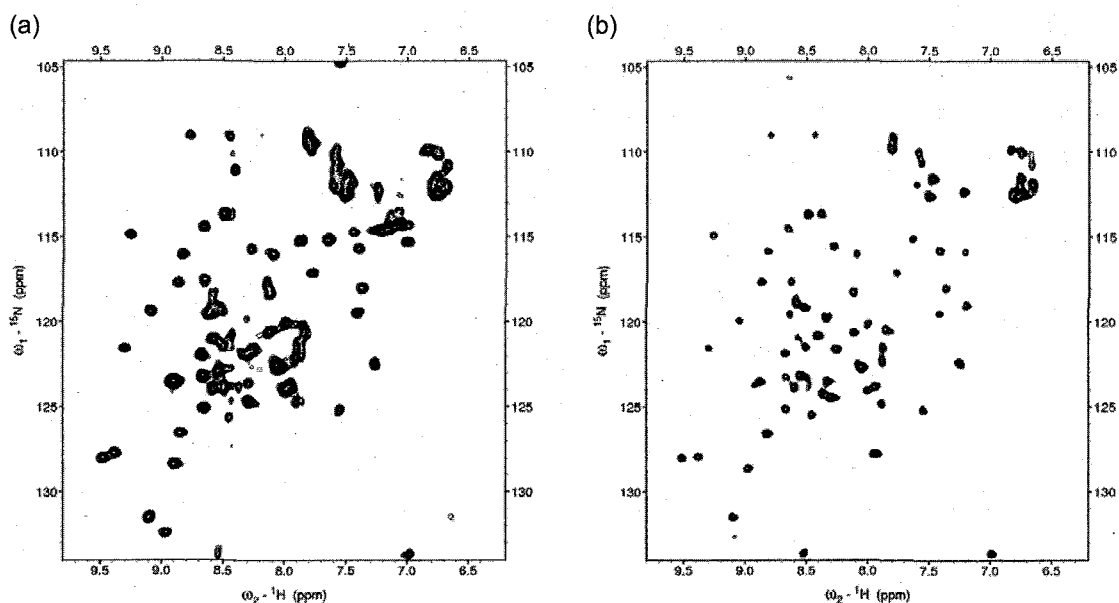
In-Cell NMR 法とは、NMR の生体非侵襲性を活かして、生きた細胞内におけるタンパク質等生体高分子を異種核多次元 NMR 測定するである。それにより、それら生体高分子の動態を選択的に観察・解析することができる。この方法は、大腸菌を用いた

In-Cell NMR, 異種核多次元 NMR, 高等哺乳細胞,

いのまた こうすけ, おおの あやこ, とちお ひでひと, いそがい しん, てんの たけし, なかせ いくひこ, たけうち としひで, ふたき しろ, いう ゆたか, ひろあき ひでかず, しらかわ まさひろ

実験系によってまず提案された。大腸菌を用いた In-Cell NMR によって、いくつかのグループが現在までに、生細胞内におけるタンパク質-タンパク質およびタンパク質-低分子リガンド相互作用の検出等の実験を報告している。更にこのような原核細胞での成功に続き、近年我々を含むいくつかのグループが真核細胞の一種であるアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた In-Cell NMR 法の確立がなされた。卵母細胞では大腸菌とは異なり、安定同位体標識されたタンパク質を効率よく発現させることができない。そのため、あらかじめ大腸菌等から大量に発現・精製した、安定同位体標識されたタンパク質をマイクロインジェクション法といった物理的な方法によって卵母細胞の中に注入することによって異種核多次元 NMR 測定を行う。つまり、細胞の体積が大きいアフリカツメガエルの卵母細胞等にしか応用できないという制約がある。

そこで我々は、この In-Cell NMR 法を、上記卵母細胞以外の真核細胞、例えばヒト等の哺乳動物体細胞へ拡張し、その中におけるタンパク質-タンパク質およびタンパク質-低分子薬剤間相互作用等を観察するための方法の開発を行っている。本発表では、In-Cell NMR 法に適用する真核細胞をヒト由来細胞株として、観察したいタンパク質を高効率に細胞内へ導入する方法の検討を行い、細胞内におけるタンパク質の ^1H - ^{15}N 二次元 NMR 測定を行った結果を示すことによって、In-Cell NMR 法によるヒト等の高等動物体細胞内におけるタンパク質-タンパク質およびタンパク質-低分子薬剤間相互作用解析等への応用についての展望を議論する。



Two-dimensional ^1H - ^{15}N correlation spectra of ^{15}N labeled ubiquitin derivative

(a) in-cell NMR

(b) *in vitro*

使った In-cell NMR 測定手法の開発

(¹京都大学工学研究科分子工学専攻,²横浜市立大学大学院総合理学研究科生体超分子システム科学専攻,³大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻)

○真板(大野)綾子¹, 朽尾豪人¹, 猪俣晃介¹, 杉原文徳², 菊地和也³, 白川昌宏¹

¹⁹F-labeled protein probes for detection by in-cell NMR spectroscopy and ¹⁹F-labeled relaxation-based MRI probe

(¹ Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University;

² International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University; ³ Division of Advanced Science and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University)

Ayako Ohno¹, Hidehito Tochio¹, Kohsuke Inomata¹, Fuminori Sugihara², Kazuya Kikuchi³ & Masahiro Shirakawa¹

Analyses of structures, dynamics and interactions with ligands or binding-partners in living cells are vital to understand the functions of intracellular proteins. In this study, we focused on ¹⁹F nuclei, which provides high NMR sensitivity and gives nearly no *in vivo* background signal. We have developed the ¹⁹F-labeled proteinaceous probes and low molecular weight compounds, which are aimed to be used for the detection of protein by in-cell NMR or an enzyme activity by MRI. The former is a ¹⁹F/¹⁵N-labeled ubiquitin derivative, which is introduced into human HeLa cell. We detected signals for two phenylalanine residues of ubiquitin in in-cell ¹⁹F-NMR experiment. The latter is paramagnetic relaxation-based MRI probe for detecting caspase-3. *In vitro* MRI signal has appeared accompanying enzyme-activated cleavage of this probe due to attenuation of paramagnetic relaxation by Gd³⁺ compound.

生体内での細胞内タンパク質の構造、動態や、リガンドとの相互作用を *in situ* で解析することは、タンパク質の機能を理解する上で極めて重要である。本研究では、生きた細胞内でのタンパク質の構造、機能解析に向けて、NMR による高感度検出が可能で、生体内には観測可能な状態では殆ど存在しない ¹⁹F 核を利用した タンパク質性プローブや低分子化合物の開発を目指し、その有用性を In-cell NMR や *in vitro* MRI

キーワード： ¹⁹F 標識, In-cell NMR, 分子プローブ

著者ふりがな： まいた (おおの) あやこ、とちお ひでひと、いのまた こうすけ、
すぎはら ふみのり、きくち かずや、 しらかわ まさひろ

により評価した。

タンパク質性プローブ

フッ素ラベル化アミノ酸を用いて ^{19}F 標識したタンパク質性のプローブを、哺乳類の培養細胞へ導入し、*In-cell* ^{19}F -NMR 測定により標的タンパク質由来のシグナルや、薬剤などのリガンド結合に伴う化学シフト変化を検出することを目指した。まず、モデルタンパク質としてユビキチンを研究対象に用いた。フッ素ラベル化アミノ酸 (4-Fluoro-L-Phenylalanine) により、ユビキチンの Phe 4 と Phe 45 に、 ^{19}F 標識を導入した。この標識ユビキチンを CPP (細胞膜透過性ペプチド) によって細胞内へ導入し、*In-cell* での ^{19}F -NMR 測定を行った。その結果、400 MHz の NMR 装置においても、非常に弱いですが、ユビキチンの二つのフェニルアラニン由来のピークを検出することができた。 ^{19}F -NMR 測定後に、上清の一次元 $^1\text{H}\{-^{15}\text{N}\}$ SOFAST-HMQC を測定し、細胞外にユビキチン-CPP が漏れていないことを確認した。さらに、他のタンパク質を導入するための系も、現在、開発中である。ターゲットには、FK506 やラパマイシンなどの免疫抑制剤に結合するプロリン異性化酵素 FKBP12(12 kDa)を用いた。まず、フッ素ラベル化アミノ酸 (5-Fluoro-L-tryptophan) を用いて、FKBP12 のトリプトファン残基(Trp59)に ^{19}F を導入した標識体を調製した。Trp59 の側鎖は、免疫抑制剤との複合体結晶構造 (PDB: 1FKJ) より、薬剤の認識に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。 ^{19}F 標識 FKBP12 を用いて、*in vitro* での ^{19}F -NMR によってリガンド結合に伴う化学シフト変化を調べた結果、Trp59 の側鎖由来のピークが、FK506 やラパマイシンとの結合に伴い、有意に変化することを確認した。現在、 ^{19}F 標識 FKBP12 を細胞に導入するための系を準備中である。

低分子化合物プローブ

低分子化合物プローブでは、常磁性効果を利用した ^{19}F スイッチング MRI プローブを作成し、ファントムを使った *in vitro* での MRI により Caspase-3 の酵素活性の検出に成功した。この低分子化合物プローブ Gd-DOTA-DEVD-Tfb は、エフェクター部位のガドリウム錯体と、Caspase-3 に認識されるセンサー部位と ^{19}F のプローブ部分からなる。インタクトな状態では、 ^{19}F のプローブ部分とガドリウム錯体が近接するため、常磁性効果により、弱い MRI シグナルしか観測されないが、Caspase-3 による酵素切断を受けることにより、エフェクター部位が切り離され、高感度な MRI シグナルが観測される。まず、*in vitro* の NMR 測定を行い、インタクトな状態のプローブ Gd-DOTA-DEVD-Tfb と、エフェクターのガドリウムがない DOTA-DEVD-Tfb の ^{19}F -NMR を測定し、後者に強い ^{19}F シグナルが観測されることを確認した。また、このプローブに、Caspase-3 を添加した後の経時変化を、 ^{19}F -NMR で追跡した。その結果、時間を追うごとにプローブの ^{19}F シグナルの増大がみられた。さらに、このプローブのファントムを使った *in vitro* MRI を観測したところ、 ^{19}F -NMR と同様に、Caspase3 の添加に伴い、MRI シグナルが顕著に検出された。

¹理研PSC、²横浜市院国際総合、³名古屋大学生命農

○近山英輔¹、春名英明²、菊地淳^{1,2,3}

Toward NMR-based comprehensive metabolomic analysis with SpinAssign

¹RIKEN PSC, ²International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University, ³Graduate School of Bioagri. Sci., Nagoya University

Toward comprehensive metabolite identification by NMR, we have been developing SpinAssign, an NMR spectrum analysis system, and an HSQC-based metabolite chemical shift database. Currently, we have detected more than 600 peaks derived from metabolites in a ¹³C-HSQC spectrum, which is one of the most comprehensive detection in the world, by using SpinAssign, the database, a stable isotope labeling technique, and refined protocols. Further, we have been integrating several relating methodologies including SpinAssign LIMS and HalMol toward the method of the most comprehensive identification of metabolites by NMR.

<はじめに> メタボローム解析における NMR は質量分析計 (MS) に比べ感度が低いという欠点があるものの、分解能の高さ、サンプル計測時の非侵襲性の利点が高い。後者は特に *in vivo* 計測を可能とし、NMR によるメタボローム計測は現在の分子論的オミクス技術の中で唯一、生きた細胞内のオームデータを非破壊で計測することのできる技術であり、完全な初期条件の再現性が難しい複雑な生命システムを理解するための貴重な方法論として今後の更なる発展が期待される。

<代謝物同定システム SpinAssign の機能拡張> NMR による代謝物の網羅的同定に向けて、我々はこれまで ¹³C-HSQC ベースの代謝物化学シフトデータベース (CSDB) と Windows 上で動作する Java ソフトウェア SpinAssign を開発してきた。CSDB は我々自身が計測し蓄積している標品の化学シフトデータベースであり、溶媒と測定条件を一定にすることで高精度の CSDB の構築を目指している。SpinAssign はメタボローム用 NMR スペクトル解析ソフトウェアで、現在 1D/2D/3D スペクトルに対応しており、CSDB とそれを用いた生体抽出物の ¹³C-HSQC スペクトルの解析が主機能である。複数のスペクトル上で複数のクロスヘアを同期して対話的に解析することに優れているため、¹³C-HSQC スペクトル上で CSDB によって代謝物候補をアノテートされたピークを他の異種核多次元相関スペクトルで結合し高信頼の代謝物同定を達成することに特に優れている。我々はさらに NMR によるメタボローム解析を一般利用可能とするために我々の CSDB と SpinAssign の簡易機能をウェブ上に実装した SpinAssign WEB を構築した。これは PRIME (<http://prime.psc.riken.jp>) 上で無料利用可能である。現在ユーザーの抽出物 ¹³C-HSQC クエリーピーク (リン酸緩衝液、pH 7、298 K) に対し約 80 代謝物のアノテーションが可能となっており、今後は 300 代謝物に増強予定である。我々は上記システムを用いて、生物サンプルからの代謝混合物の一斉検出を目指している。現在、細胞への安定同位体標識技術、NMR サンプル条件の最適化によりを

キーワード: メタボローム、LIMS、データベース、代謝物、ウェブ

ちかやま えいすけ、はるな ひであき、きくち じゅん

クライオプローブを装備した 700MHzマシンによる ^{13}C -HSQCスペクトルの長時間測定で、*Arabidopsis* T87 培養細胞粗抽出物から細胞内代謝物由来の 600 以上という世界最高レベルの ^{13}C -HSQCピーク数を検出することが可能となった。このうち約 40%がCSDBと一致し、78 個の代謝物の検出が確認された。未同定ピークを含めると全体で 150~200 代謝物程度の検出が達成されていると見積もられた。我々はさらなる低濃度物質の一斉検出に向けて、NMRサンプル調製と計測／解析方法論の開発を進めている。

<CSDB構築の高効率化: HalMolソフトウェアとLIMS開発> 一方、自然界には数十万以上の代謝物が存在すると考えられているため、CSDBの対象化合物をランダムに選択し計測することは極めて非効率的である。従って、実際に研究対象としているサンプル中すでに検出されている代謝物を優先的に同定しデータベース化することが望ましい。そこで我々は検出されているがデータベースに存在しない未同定ピークに対して候補化合物を予測するHalMolシステムを構築した。さらに新規開発中のSpinAssign LIMS (LIMS)と組み合わせ標品計測ルーチンに組み込むことで効率的な薬品リソースとNMRリソースの運用が可能となりつつある (Fig. 1)。このLIMSは代謝物情報とNMRデータを蓄積するサーバ側とデータ閲覧と化学シフト登録部分を持つクライアント側より成る。サーバー側は、関係データベース (RDB) 上に代謝物データとNMRスペクトル／ピーク、原子アサイン、計測ステータス、ユーザーアカウントなどをテーブル化し実装した。RDBにはKEGGから約 12000 の代謝物情報をインポートした。クライアント部からは複数のNMR計測者による ^{13}C -HSQCスペクトルからの化学シフトの蓄積を容易にする。このシステムは化学シフトの入力エラー発見をサポートする自動機能が複数実装されており、データベースのキュレーションに役立っている。我々はこれらのシステムを統合し世界最高の網羅的一斉同定法の達成を目指す。

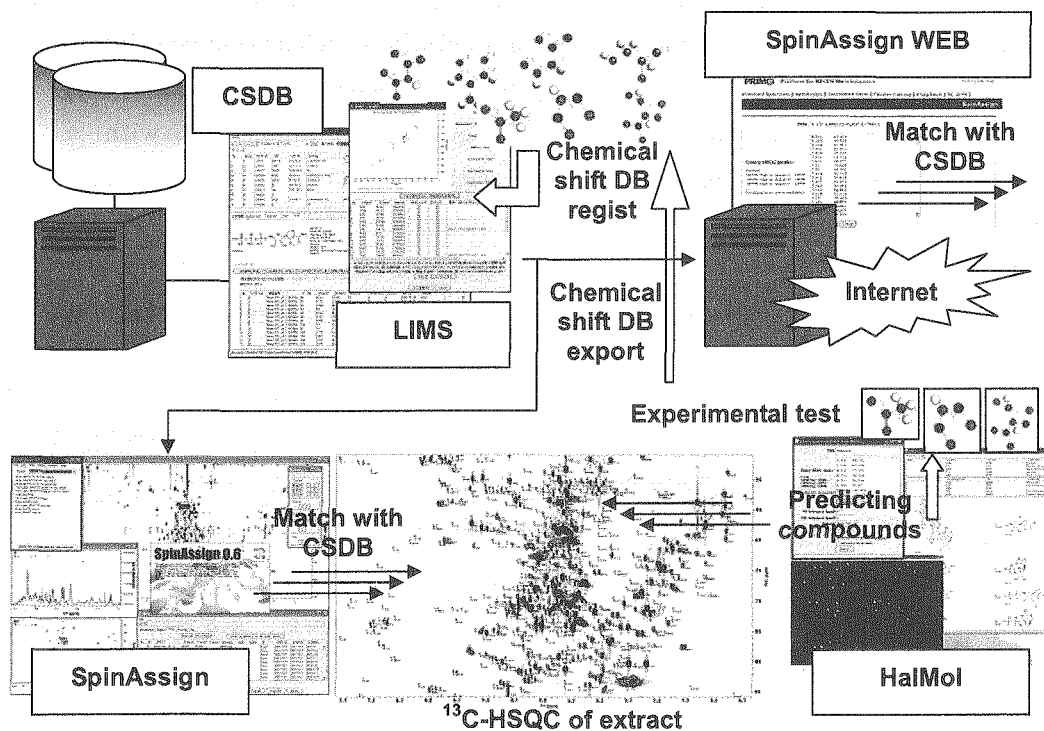


Fig. 1 Integration of metabolite identification resources

マウス新生仔尿の NMR-メタボリック・プロファイリング解析

産総研バイオメディシナル情報研究センター・東京薬科大学

○清水悠介

東京薬科大学

高橋滋, 青柳俊, 高橋勇二,

産総研バイオメディシナル情報解析研究センター

須永絵理, 金澤健治, 根本直

Non-target and targeted NMR-metabolic profiling with urine from newborn mouse.

Biomedical Information Research Center, AIST/

Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Yusuke Shimizu

Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Shigeru Takahashi, Shun Aoyagi, Yuji Takahashi

Biomedical Information Research Center, AIST

Eri Sunaga, Kenji Kanazawa, Tadashi Nemoto

Non-target NMR-metabolic profiling is one of simple and useful approaches to assess, evaluate, and track metabolic situations in biological systems by using mixture solution like urine. However, once in a while, problems in limitations such as sample volume, viscosity, salt concentration, and others take place as far as using biological samples.

In this study, we tried to measure NMR spectra using highly diluted urine with conventional NMR spectrometer/probe head and with standard 5mm diameter NMR tubes, then analyzed by principal component analysis (PCA). Urine samples from newborn mice (<0.03ml) were collected by pressing their abdomen and analyzed along with that from adults. Target spectrum was further analyzed by targeted profiling to grasp major chemicals. Methodology, protocol, and its usefulness will be presented.

マウス新生仔は人間の未熟児モデルとも言われているが、誕生後に劇的に変化すると考えられるその代謝系の基礎的な情報は十分に得られているというわけではない。

メタボリック・プロファイリング、マウス新生仔、尿、混合物解析、多変量解析

しみず ゆうすけ、たかはし しげる、すなが えり、あおやぎ しゅん、かなざわ けんじ、たかはし ゆうじ、ねもと ただし

そこで、胚発生開始後 18.5 日目と考えられる時期に帝王切開により強制出産させたマウス新生仔個体から尿を採取して、代謝変化を包括的に把握する混合物解析法であるメタボリック・プロファイリングを行い、その変化を追跡することを計画した。

マウス新生仔は体重約 2 グラムと大変に小さい。1 回に採取できる尿量は 20 ~ 30 μ L 程度であり、標準的 NMR 装置の 5mm プローブヘッドを使う限り試料量は絶対的に不足しているが、我々以外のラボで簡便に実施できる手技・手法の確立を目指してあえて標準的プローブヘッドを利用して大希釈で計測、解析を試みた。

試料尿 10 μ L を 60 倍に希釈し、ロック溶媒、内部標準 (TSP) を添加して DANTE パルスによる溶媒前飽和 1D スペクトル JEOL ECA-800 (800MHz \cdot HCN5mm \cdot S/N=1360) を用いて計測した。

FID は 16k の real points を与え 128 回の積算を行って得た。FFT 後は絶対値微分を行い、その後 0.04ppm ごとに積分を行って数値化した。

プロファイリングの結果、親尿および新生仔尿の希釈スペクトルは十分な S/N を示し、PCA 散布図を描くことが出来た。また標的型解析を適用することで各群を特徴でづける物質を検討した。

またより広く利用されている 500MHz 機にても本手法が可能であると確認した。

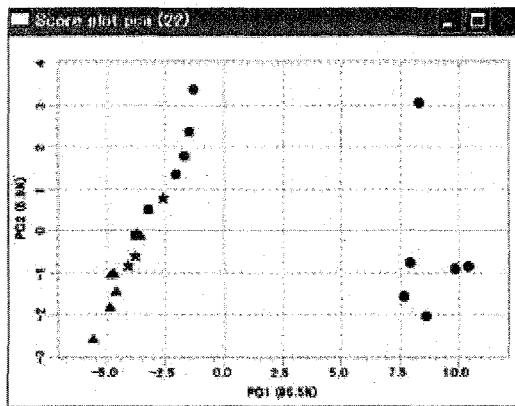


Fig. 1

PCA score plot of spectral data from highly diluted urine.
Data from adults (right) and newborn (left) are clearly separated.

ガドリニウム造影剤投与後の持続的スピンラベル法 による脳血流計測値の変化

(秋田県立脳血管研究センター) ○中村 和浩、近藤 靖、木下 俊文
(秋田県立大学 システム科学技術学部) 陳 国躍

Influence of dynamic susceptibility contrast agent to cerebral blood flow estimated by continuous arterial spin labeling.

○ K. Nakamura, Y. Kondoh, T. Kinoshita (Akita Research Institute for Brain and Blood Vessels) G.Chen (Akita Prefectural University)

Rat cerebral blood flow (CBF) estimation of continuous arterial spin labeling (CASL) techniques is influenced by dynamic susceptibility contrast (DSC) agent injection. After injection of DSC agent, CBF value of CASL is dramatically reduced as the decrement of water longitudinal decay time in blood vessels. We evaluated the duration of the DSC agent influence. The CBF estimation of CASL after DSC agent injection shows that at least 60 min is required for the recovery.

1. はじめに

我々はこれまで、ガドリニウム造影剤 (Gd 造影剤) を用いた動的磁化率コントラスト (DSC) 法と持続的スピンラベル (CASL) 法を用いた脳血流量計測法に関してその相違を検討してきた [1-3]。CASL 法は脳組織へ流入する血液中プロトンの縦磁化を反転させた状態で撮像した画像と縦磁化を反転させない状態で撮像した画像の差画像に基づき脳血流量 (CBF) を推定する手法である [4,5]。そのため CASL 法では、血液中プロトンの反転磁化が対象組織に到達するまで充分保たれていなければならない。血液中プロトンの縦緩和時間はおよそ 1.5 秒程度であり、ラット等の小動物では頸動脈において反転されたプロトンが脳組織に到達する時間は数 100ms であることから、頸動脈で血液中プロトンを反転させる CASL 法が適応できる。一方、DSC 法は Gd 造影剤を静脈内へ注入し、磁気共鳴信号を連続的に測定することで、その信号動態から CBF を推定する [6]。Gd 造影剤を投与すると血液中プロトンの縦緩和時間が減少し、頸動脈でプロトンを反転させる CASL 法での測定が困難になる。本発表では、Gd 造影剤投与後の CASL 法測定例について報告し、投与後どの程度の時間間隔をおけば CASL 法での測定が可能になるかを検討した結果について報告する。

キーワード：脳血流量計測、DSC法、CASL法、Gd 造影剤

著者：なかむら かずひろ、こんどう やすし、ちん こくやく、きのした とし
ふみ

2. 方法

MRI 装置内で Gd 造影剤を投与するためのポリエチレンチューブ(PE No.50,イントラメディック社) 90 cm を麻酔下においてあらかじめ尾静脈に挿入した5匹の Sprague-Dawley ラット(8 週令;290±30g)を用いた。CASL 法による CBF(CBF-CASL)画像の取得には、送受信分離型 RF コイルおよび頸部ラベルコイル(Rapid Complete, Rapid biomedical 社)を利用した。CBF の推定に用いる MR 画像は、グラジエントエコー法により TR/TE :8 ms/4 ms で取得し、10 回の加算平均画像を使用した。CBF-CASL は

$\lambda/T_{1b} \cdot (M_b^0 - M_b^{ss}) / (M_b^{ss} + (2\alpha - 1)M_b^0)$ より算出される。 λ は脳組織と血液の分配係数、 T_{1b} は脳組織プロトンの縦緩和時間、 M_b^0 はコントロール画像における信号強度、 M_b^{ss} は反転パルス印加画像における信号強度、 α はラベル化効率である [1,2,3,5]。CBF-CASL の算出において T_{1b} 、 α 、 λ はそれぞれ 1.7 sec, 0.9, 1.0 とした [5]。CBF-CASL を測定後、Gd 造影剤(OMNISCAN®、第一三共) 0.2cc を尾静脈より投与し、その直後から 15 分ごとに 6 回にわたって CASL-CBF を計測した。CASL-CBF は尾状核領域に関心領域を設定しその平均値を求め、投与前の値との比を検討した。

3. 結果・考察

Gd 造影剤投与前の CASL-CBF は 118 ± 19 ml/100g/min であった。Fig. 1 に Gd 造影剤投与後の CASL-CBF の変化を示す。Gd 造影剤を投与すると血液中プロトンの縦緩和時間は短くなり、頸動脈で反転させた血中プロトンは脳組織に到達する前に元の状態へ戻ってしまう。そのため、ラベル化効率を定数とすれば、CASL-CBF の値は著しく減少することになる。Gd 造影剤の血漿中濃度は 50 分ほどの半減期をもつことが知られており、Fig. 1 にみられる CASL-CBF の変化は Gd 造影剤の血漿中濃度を反映したものと考えられる。測定の度にラベル化効率を実測することは難しく、Gd 造影剤投与後少なくとも 60 分は CASL 法による CBF 計測は難しいことが理解された。

参考文献

- [1] Kagaya et al., Proc ISMRM 14 (2006) 1467、[2] 加賀谷ら,生体医工学 44 (2006) 286-292、[3] Nakamura et al., Proc IEEE EMBC 30 (2008) 839-842、[4] Donald SW et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 (1992) 212-216、[5] Silva AC et al., Magn Reson Med. 33 (1995) 209-214、[6] Ostergaard L et al., Magn Reson Med, 36: 715-725, 1996

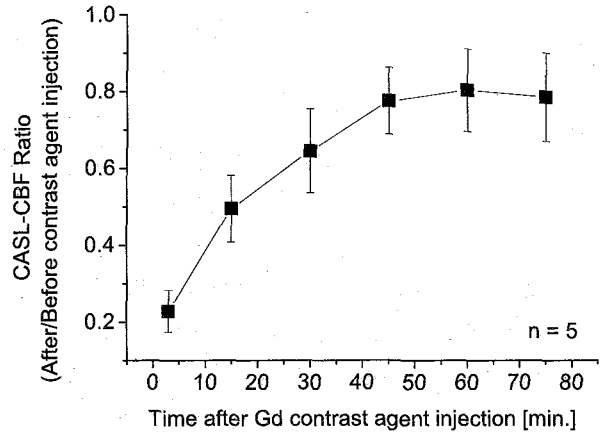


Fig. 1 : Recovery of CASL-CBF after Gd contrast agent injection. CASL-CBF value was indicated with the ratio between after and before contrast agent injection.

(¹横浜市総科、²早大先進理工、³理研RCAI、⁴理研PSC、⁵名大院生命農)
○中西裕美子¹、縫島裕美¹、伊達康博²、加藤完¹、福田真嗣^{1,3}、近山英輔⁴、
大野博司^{1,3}、菊地淳^{1,4,5}

Platform for the evaluation of functional foods based on gut microbial ecology
(¹Int. Grad. Sch. Arts. Sci., Yokohama City Univ, ² Dept. Life Sci. Med. Sci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ³RIKEN RCAI, ⁴RIKEN PSC, ⁵Grad. Sch. of Bioagri. Sci., Nagoya Univ.)

○Yumiko Nakanishi, Yumi Nuijima, Yasuhiro Date, Tamotsu Kato, Shinji Fukuda, Eisuke Chikayama, Hiroshi Ohno, and Jun Kikuchi

【緒言】

腸内細菌叢の改善が宿主の健康維持・増進に貢献することから、現在、NMR メタボミクス研究においても、腸内細菌叢と NMR による代謝物の解析が行われ、腸内細菌叢と代謝物の関連性から複雑な腸内の解析が試みられている。機能的食品の摂取が腸内環境の改善をもたらすことから、我々は、食事による腸内細菌叢の変動と健康との関連性に着目した。マウスをモデルとし、繊維食と通常食を交互に与え、変動する腸内細菌叢と代謝物を経時的に採取し、腸内細菌叢と代謝物との相関解析を行った。この解析法により、繊維を利用する腸内細菌とその代謝物との関連性が示唆された。このような食事と腸内細菌叢と代謝物の関連性を追跡していくことで、健康な腸内環境の評価を代謝物解析から行うことが可能になると考えられる。

キーワード：腸内フローラ、ニュートリメタボミクス、機能的食品、相関解析、データマイニング

なかにしゆみこ、ぬいじまゆみ、だてやすひろ、かとうたもつ、ふくだしんじ、ちかやまえいすけ、おおのひろし、きくちじゅん

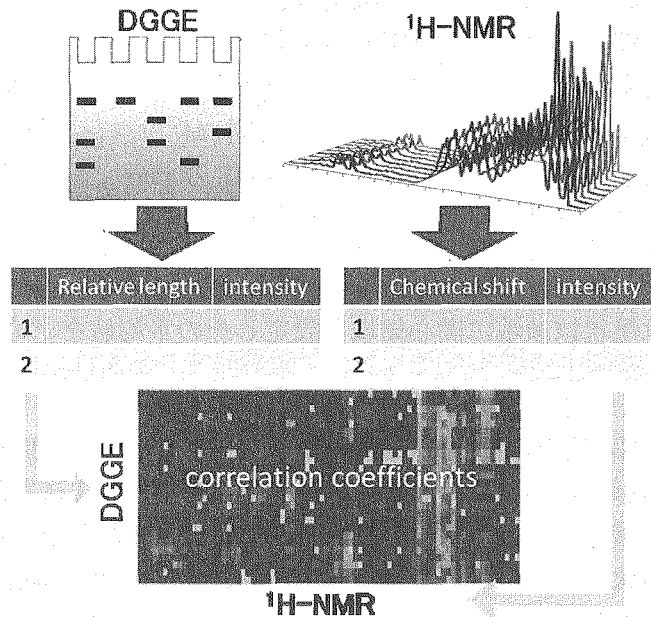


Fig. 1. Scheme of the correlation analysis between microflora and metabolites

[方法]

BALB/cマウスに5%セルロースを含む繊維食と通常食を交互に一週間与え、毎日糞便を採取した。糞便をリン酸緩衝液で抽出し、 $^1\text{H-NMR}$ により代謝物を測定した。腸内細菌叢の解析はDenaturant Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)法により解析を行い、この電気泳動のバンドの位置と強度を数値化した。 $^1\text{H-NMR}$ も同様にケミカルシフトと強度を数値化し、これら2つの数値データの相関係数を計算した。相関の強いDGGEバンドはDNAシーケンスによる微生物種の同定、NMR代謝物データベースから代謝物の物質同定を行った。

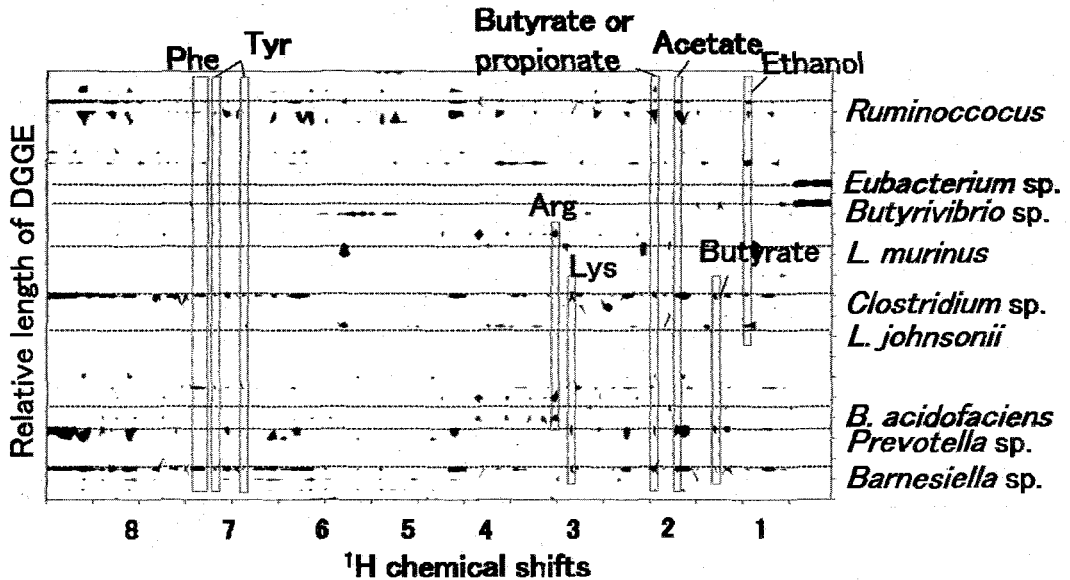


Fig. 2. The correlation display between microflora and metabolites. Contours indicate the value of correlation coefficients adopted $0.5 < |r|$.

[結果と考察]

DGGE 解析により、繊維食摂食群で *Butyrivibrio* sp.、*Clostridium* sp.、*Lactobacillus johnsonii*、*Prevotella* sp.、*Barnesiella* sp.が増加していた。この中で *Clostridium* sp.、*Prevotella* sp.、*Barnesiella* sp.は Butyrate、Acetate、Lys のシグナルと正の相関があり、Tyr と Phe とは負の相関があることがわかった。セルロース摂食により Butyrate が増加することが知られているため、今回の解析で Butyrate 産生にかかわる菌種を特定することができた。しかし、相関関係から腸内細菌と代謝物を直接もしくは間接的に産生しているかはわからない。今後、より明確な関連性が見出すための試みも始動しており、本会で討論をしたいと考えている。

[参考文献]

(1) Akiyama, K., Chikayama, E., Yuasa, H., Shimada, Y., Tohge, T., Shinozaki, K., Hirai-Yokota, M., Sakurai, T.* and Saito, K. *In Silico Biology* **8**, e27 (2008).

シミュレーションによるプローブコイルの性能予測

(株)日立製作所日立研究所¹、物質・材料研究機構²○朴ミンソク¹、岡田道哉¹、北口 仁²

Predicting Performances of a Probe Coil by Computer Simulation

¹Hitachi Research Laboratory, Hitachi, Ltd., ²National Institute for Materials Science, Minseok Park¹, Michiya Okada¹, and Hitoshi Kitaguchi²

The Signal-to-Noise Ratio (SNR) of a solenoidal coil for the 600MHz cryogenic probe is predicted by means of simulation. Computer simulation is a must to use tool in designing modern probe coils, especially when the probe operates under a special environment such as cryogenic temperature. To enhance the prediction accuracy, the distribution of the radio frequency magnetic field should be taken into consideration. The SNR formula is refined and combined with field simulation to predict the SNR of a solenoidal coil. The predicted SNR is 5048 being 12% higher than the measured SNR 4523. Coils with higher SNR were designed and are under evaluation.

1. 緒言

高性能のプローブを開発する上で、シミュレーションは有効な手段の一つである。特に、温度や圧力などの使用条件が特殊なプローブを開発する場合には、実機試験に多大な時間と労力がかかるため、シミュレーションを用いた性能予測が更に重要になる。

今までの多くの研究は、プローブコイルから照射される高周波磁場(Radio-Frequency 磁場、以下、RF 磁場)の分布を求めるために、Biot-Savart 法則を用いて来た。2000 年以後は、Biot-Savart 法の他に、高周波電磁波の数値解析例も報告されている¹⁾。

我々は、数値電磁場解析法を利用してプローブコイルの感度(Signal-to-Noise Ratio、以下、SNR)予測を行った。今までの研究¹⁾が RF 磁場と電界の分布を求めコイル形状間の優劣を評価するに止まっていたことに対し、我々は、シミュレーションで求めた RF 磁場と電界から Q 値と filling factor、磁場均一度を計算し、SNR の絶対値を予測した。

2. シミュレーションと SNR 計算

Hoult らは reciprocal theorem を用いて、SNR を

$$\Psi = KM_0 \sqrt{\eta \mu_0 V_s Q_c} / \sqrt{8k_B T_c F \Delta f} \quad (1)$$

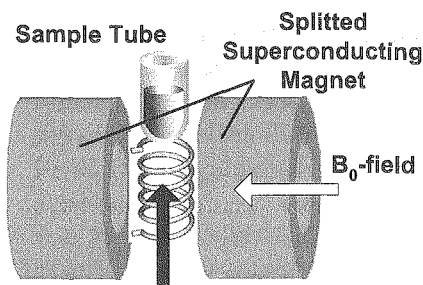
キーワード: プローブ コイル シミュレーション SNR

著者: ○ぱく みんなそく、おかだ みちや、きたぐち ひとし

と表現した²⁾。ここで、 K は RF 磁場の不均一度を表す inhomogeneity factor、 η は filling factor、 V_s は試料体積、 Q_c はコイルの quality factor、 T_c はコイル温度、 F は受信回路の雑音 factor、 Δf は受信帯域幅である。我々は、式(1)を基に SNR の計算方法を検討し、inhomogeneity factor K の表現として、

$$K = \int_{\text{sample}} B_1 \sin(\gamma B_1 \tau_{90}) dV / \sqrt{\int_{\text{allspace}} B_1^2 dV} \quad (2)$$

を得た。 B_1 は RF 磁場の強度、 τ_{90} は 90 度パルスの幅である。



RF B-field by Solenoidal Coil

Fig. 2. New NMR Spectrometer

我々は、Computer Simulation Technology 社の電磁場シミュレータ Microwave Studio®から求めた電磁場分布を式(1)と(2)で解析して、新方式 NMR 装置に用いる 600MHz 用低温プローブの SNR を計算した。新方式 NMR 装置は、通常の超電導磁石を2つに分割したスプリット方式超電導磁石をもっており、スプリット方式超電導磁石では、図1に示すように通常の試料管測定にソレノイド型のプローブコイルを用いることができる。ソレノイド型プローブコイルは、一般的に使われるプローブコイルより SNR が高いことが知られており、低温プローブにソレノイド型プローブコイルを搭載することで SNR

向上が期待される。図2に、シミュレーションで求めたソレノイド型プローブコイルの電磁場分布を示す。本報告の方法で予測した SNR は 5048 であり、実測値 4523 と 12% の誤差で一致し、設計ツールとして有用性を確認した。誤差の原因はシミュレーションで表現されていない実装要因と、磁場不均一度と考えられる。

3. まとめ

低温プローブ用コイルを開発するため、シミュレーションによる SNR 予測法を開発した。 SNR の計算値と実測値との誤差は 12% であった。現在、本報告の方法を用いて設計した新たなプローブコイルの評価試験を行っており、今後も高 SNR のプローブ開発を続行する予定である。

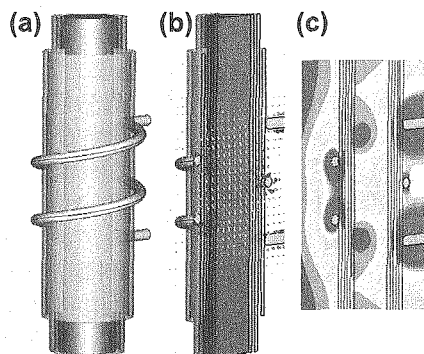


Fig. 1. A 2-turn solenoidal coil: (a) simulation model, (b) the RF-B field distribution, and (c) the E-field.

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費委託研究、(19文科振199号)の一環として行われました。

4. 参考文献

- (1) F. Doty, et. al. *J. Magn. Reson.* 182, 239 (2006)
- (2) D. I. Hoult and R. E. Richards, *J. Magn. Reson.* 24, 71 (1976)

クライオコイル MAS プローブによる 固体高分解能 NMR の高感度化

○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)

Highly gained sensitivity with high-resolution solid-state NMR
by means of Cryo-Coil MAS NMR probe
Takashi Mizuno,^{1,4} Katsuya Hioka,^{1,4} Koji Fujioka² and K. Takegoshi^{3,4}
(¹JEOL Ltd., ²Cryo Ware Inc., ³Kyoto University, ⁴CREST/JST)

Cryo-Coil MAS - cryogenical system of the detector circuit thermally insulated from sample area for high-resolution solid-state NMR - has been developed to gain S/N. There have been innovated some elementary techniques for cryogenical system, such as detector coil with high-Q value and duplexer. At the moment, in cooling the whole detector-circuit, the S/N gain of 3.4-fold compared with room-temperature in high-resolution ¹H NMR (301.4 MHz) was obtained. A group of these elementary techniques are applicable for a variety of band including low frequency nuclei.

1. 序論 近年、溶液 NMR では、マグネットの高磁場化と、クライオプローブの導入によって、NMR の感度が劇的な向上を見せている。クライオプローブは、検出コイルを冷却することによって第一の主要な熱雑音を抑制し、導体抵抗の減少に伴ってコイル Q を増加させ、アンプの雑音温度を下げるができる。その反面、熱的隔離を行うためフィリングファクタは小さくなるが、改善面がその減少分を上回れば、総合的に高い S/N のゲイン (感度向上比) を得ることができる。

本共同研究では、固体高分解能 NMR においてクライオプローブを達成することを一つの目的として、試料を室温下に回転し検出系を断熱的に冷却する装置を開発してきた。Figure 1a は、Cryo-Coil MAS プローブのプロトタイプ第 1 号機で、8 kHz で回転する試料管と 12-25K に冷却されたコイルをとまなう検出回路との間を断熱したものである。ここでは、真空中で運転できること、試料系-検出コイル系間隔が 1 mm の設計においてコイルを冷却することができることなどの、プローブの基盤となる技術は示されたが、コイルのみの冷却による感度向上状況を確認したに過ぎない。[1]

NMR の S/N は、プローブ中に含まれる諸特性値に対して、以下の様な関係にある。[2]

$$\frac{V_S}{V_N} \propto \sqrt{\frac{Q\eta}{T_c + T_a}} \quad (1)$$

1

Key Words: クライオプローブ, 固体 NMR, MAS, 感度向上

○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

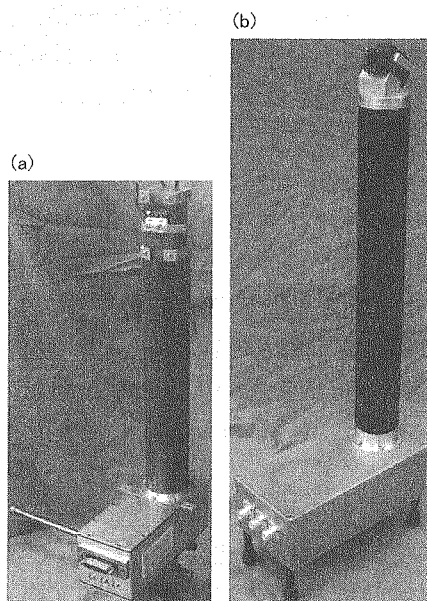


Figure 1: Photographs of prototype of Cryo-Coil MAS probe. (a) The 1st prototype of cryo-coil MAS probe for 7.1 T WB. (b) The 2nd prototype of cryo-coil MAS probe for both 7.1 T and 14.1 T WB.

ただし、 Q はコイル Q 値、 η はフィリングファクター、 T_c はコイル温度、 T_a はアンプの雑音温度である。この式から、数倍におよぶS/Nゲインの向上には、コイルのみの冷却では不十分であり、低雑音プリアンプの導入が不可欠であることが指摘される。今回、我々は、コイル以外の検出システム（デュプレクサ、プリアンプ）も冷却して ^1H MAS-NMR観測を行うことができるシステムを開発することができたので、ここに報告する。

2. 回路の冷却仕様 [3] 開発当初は液体ヘリウム貯留式で、ステンレス製の外壁を持ったプローブを考えてきたが、機械設計の検討を進めるうちに、加工性・非磁性・堅牢性・熱絶縁性などの観点から、FRP製の真空多重管（トランスファーチューブ）を利用した液体ヘリウムフロー式へと方針を転換した。すなわち、真空層にFRP/真鍮製のトランスファーチューブを挿入する。FRPにより室温域に置かれた部品からの熱流入を遮断したその先端に、無酸素銅でできた第1熱交換器を設置する。第1熱交換器は液体ヘリウムの気化により $\sim 1\text{ W}$ の冷却能力を維持する。実際には、第1熱交換器に接続された部品（主としてサンプルコイルまわりのパーツ）が $\sim 10\text{ K}$ まで冷却されることが確認された。

気化した低温のヘリウムガスは、トランスファーチューブの外管を通して内管を冷やしながら戻ってくる。チューブの中ほどにはアルミのブロックが置かれ、そこにすえつけられた銅パイプを冷却するための第2熱交換器が形成されている。このパイプは輻射シールドと呼ばれ、輻射熱を反射し第1熱交換器およびトランスファーチューブに対する熱流入を防ぐためのものである。シールドはプローブの下方まで延長され、そこにアルミ製のプレートが接続される。もちろん、このプレートも室温域に置かれた部品に直接接触はしていない。プレート上に信号切替系（プリアンプ、デュプレクサ、方向性結合器）を設置した状態で、 45 K まで冷却されることが確認された。この冷却システムは、冷凍機を必要とせず、液体ヘリウムのみを必要とするため、システム全体が熱平衡に到達するまで時間が2 \sim 3時間と省時間である。また、送液用のトランスファーチューブがフレキシブルであるため、冷却運転させながらプローブを磁場から出し入れすることが可能である。

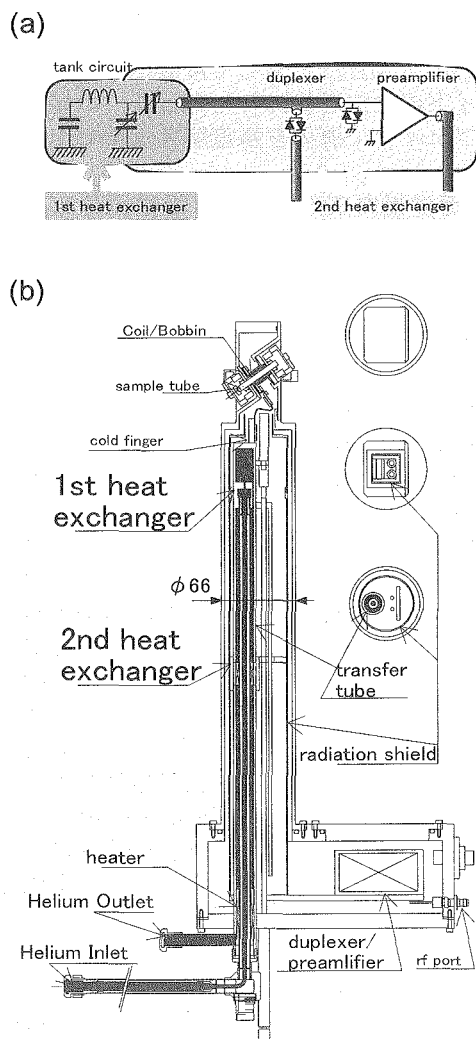


Figure 2: Cryogenical specification of the prototype of Cryo-Coil MAS probe. (a) Schematic illustration of NMR-detection rf circuits and heat exchangers. (b) A cross-section view of the prototype. Hatched zone indicates liquid helium and vaporized gas helium flowing path.

3. 表面インピーダンスの理論的解析 Q 値 (いわゆる Loaded-Q 値) の、コイル冷却による依存性をネットワークアナライザによって調べた。Figure 3. に、その実験結果を示す。Q 値は、当該の回路に電流を流したときに蓄えられるエネルギーと、回路で消費される損失の比で与えられ、高周波損失は導体損・誘電損・放射損に由来する。温度依存性が顕著なのは導体損であるから、冷却によって Q 値を向上するには、できるだけ純度の高い導体で、誘電損などの効果を抑えたボビンを使うことが重要である。今回のプロトタイプに用いられた NMR コイルは、搬送周波数を 7.1 T の磁場に対する ^1H の周波数 (301.4 MHz) に対して最適化されたソレノイドの寸法形状にしたがって、ボビンをサファイヤで導体は無電解メッキで作成された。

導体損由来の抵抗は、渦電流分布を解くことで得られる表面インピーダンスの実成分に対応する。表面インピーダンスを、形状因子 (導体線路の形状に由来) と表面粗度因子 (導体表面/界面の面粗度に由来) とに分け、電磁気学に従って渦電流分布を解析的に解いた理論値のグラフを (Figure 3, dotted line) に示す。しかし、これにより得られる理論的な Q-T 依存性は、低温になるほど実験値と乖離が大きくなっている。古典電磁気学では、電流密度に限界を設けず、無限に大きくなり得るものとして扱っていたが、導体の電気伝導度に由来する電子の平均自由行程長さよりも表皮深さが小さくなる領域においては、電流密度は制限を受ける。この自由電子ガスモデルに基づいて導体の表面インピーダンスの計算を行い、古典電磁気学によって得られた値に補正を加えた (Figure 3, dashed line)。この結果は、電気伝導度、温度、周波数による導体損の変化と、それに基づく Q-T 依存性を定性的に説明している。

4. ^1H -NMR スペクトル クライオプローブでは、プリアンプを冷却して低雑音化するため、デュプレクサーも冷却する必要がある。我々は、低温で利用できる GaAs 系ダイオードを利用し、さらに低抵抗のスイッチング素子として MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems) スイッチを利用した (GaAs 系ダイオードは動的抵抗が比較的に高く、RF パルス照射時に過大なプリアンプ入力を及ぼす恐れがあるため) 新規なデュプレクサーを製作した。プレート上に信号切替系 (プリアンプ、デュプレクサ、方向性結合器) を設置した状態で、実際に 45 K の周囲温度下でデュプレクサが動作し、NMR 信号を観測することができた。[4]

高い Loaded-Q 値依存性を伴う検出コイル、低温用デュプレクサ、それに市販の低温用低雑音プリアンプ (形式 BZP12UB1CR: B&Z technologies Co.) を適用した Cryo-Coil MAS プローブのプロトタイプ、および S/N のゲインを比較するため、同一のスピンングシステ

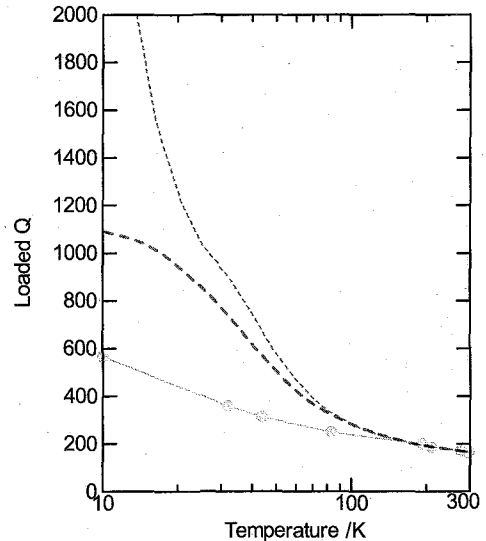


Figure 3: Coil's temperature dependence of the loaded-Q for the prototype of Cryo-Coil MAS probe. (○· Solid line) Experimental plots of loaded Q of the thin layer solenoid / sapphire bobbin system measured by 3 dB line width of network analyzer. (Dotted line) Theoretical deduced curve of loaded Q for the temperature dependence of resistivity of typical oxygen-free-copper based on classical electromagnetim. (Dashed line) Theoretical deduced curve of loaded Q for the temperature dependence of resistivity of typical oxygen-free-copper modified by free electron gas model.

ムを利用した市販機 (Varian technologies Co.)、を使った実験により得られた ^1H -NMR スペクトルを Figure 4 に示す。共通実験条件は下記のとおり。試料:アダマンタン (試料管径 5 mm, 内径 3.4 mm), 回転速度 7.2 kHz, 磁場:7.1T WB (搬送周波数:301.4 MHz at ^1H), 分光計:OPENCORE NMR システム (京大), 1 スキャン. [5]

全体を室温に置いたときのスペクトルを Figure 4a に、極低温に冷却したときのスペクトルを Figure 4b に示す。また、比較のため、同じ試料管/システムを利用している、Chemagnetics 社の三重共鳴プローブにより得られたスペクトルを Figure 4c に示す。Figure 4a と 4b を比較することにより、冷却による S/N のゲインが 3.4 倍得られたことが分かった。また、市販機の結果 (Figure 4c) と比較しても、 ~ 3.0 倍のゲインの増加が得られた。

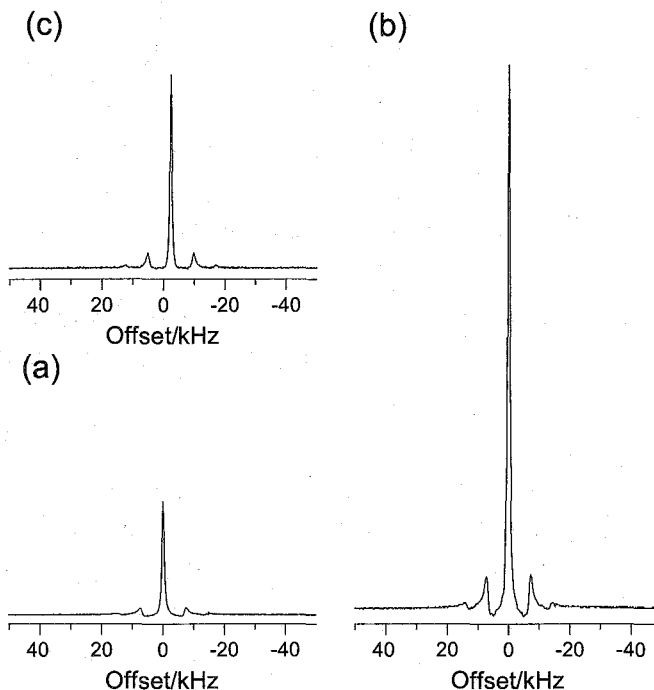


Figure 4: The Comparison of ^1H NMR spectra observed by Cryo-Coil MAS probe, and conventional room-temperature probe. The noise level of each spectrum is same. (a, b) The spectra by the 1st prototype of Cryo-Coil MAS probe using low-temperature duplexer. The experimental condition are shown as follows: (a) sample temp.: r.t. (~ 298 K), coil temp.: r.t., ambient temp. around preamplifier: r.t., (b) sample temp.: r.t. (~ 298 K), coil temp.: ~ 10 K, ambient temp. around preamplifier: ~ 45 K, (c) The spectra by the Chemagnetics 5 mm triple-tuned MAS probe using low lossy duplexer (> -0.2 dB). sample temp.: r.t., coil temp.: r.t., ambient temp. around preamplifier: r.t..

5. 結論 300 MHz の帯域において、Cryo-Coil MAS プローブにより、室温時の約 3 倍の S/N のゲインを示すことが確かめられた。この結果は、Cryo-Coil MAS プローブがすでに実用化されている溶液クライオプローブと同等のゲイン性能を得ていることを示す。現在、無機材料・工業材料への応用を念頭に低周波核種にターゲットを絞り、フィリングファクタ向上のために試料系-検出コイル系間隔を 0.5 mm とした、Cryo-Coil MAS プローブのプロトタイプ第 2 号機を製作中である (Figure 1b)。

謝辞

本研究は、CREST/JST (平成 17 年度採択) により支援された。

参考文献

- [1] T. Mizuno, K. Hioka, K. Fujioka and K. Takegoshi, Rev. Sci. Instrum. 79 (2008) 044706
- [2] D. I. Hoult and R. E. Richards, J. Magn. Reson. 24 (1976) 71-85
- [3] T. Mizuno and K. Takegoshi, Pat. Pend. JP 2007-83324(A) (2007)
- [4] T. Mizuno and K. Takegoshi, Pat. Pending (2008)
- [5] K. Takeda, J. Magn. Reson. 192 (2008) 218-229

新方式 NMR におけるプローブ由来の不整磁場

(株)日立製作所日立研究所¹、物質・材料研究機構²

○ 田中 秀樹¹、長谷川 学¹、岡田 道哉¹、北口 仁²

Magnetic field inhomogeneity derived from probe of advanced NMR system

¹Hitachi Research Laboratory, Hitachi, Ltd., ²National Institute for Materials Science

H. Tanaka¹, M. Hasegawa¹, M. Okada¹ and H. Kitaguchi²

We present an advanced NMR system which has a probe with a solenoidal RF coil and a superconducting split magnet. In this system, the probe is combined horizontally with the magnet and a sample tube is inserted from above. Therefore, the probe's RF shield needs passage holes where the sample tube passes through. These passage holes are not necessary in conventional NMR systems. In this poster, we present the differences of the magnetic field inhomogeneity between our advanced NMR system and conventional NMR systems.

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¹⁾。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容易としている²⁾。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構造である。ただしプローブ筐体には試験管を通過させるための穴が必要となる。

2. 試験管通過口に伴う不整磁場

Fig. 2 に従来 NMR と新方式 NMR におけるプローブ筐体の差異を示す。1970 年代で主に使用されていたシステムでは、銅線を用いた電磁石または永久磁石で水平方向に静磁場を作り、これに対し鉛直方向からプローブを挿入していた。磁石が超電導化した 1980 年代からは、鉛直方向静磁場と平行してプローブを挿入している。一方、我々が提案している新方式 NMR は水平方向静磁場と平行してプローブを挿入する形状であり、

キーワード：新方式 NMR, スプリット型超電導磁石, 水平磁場, プローブ, 不整磁場

田中 秀樹 (たなか ひでき)

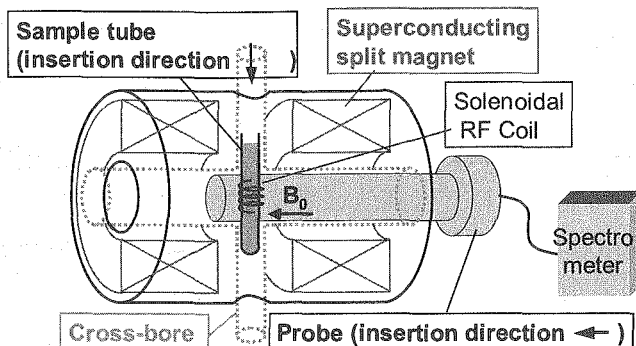


Fig.1 Schematic diagram of superconducting split-magnet with cross-bore.

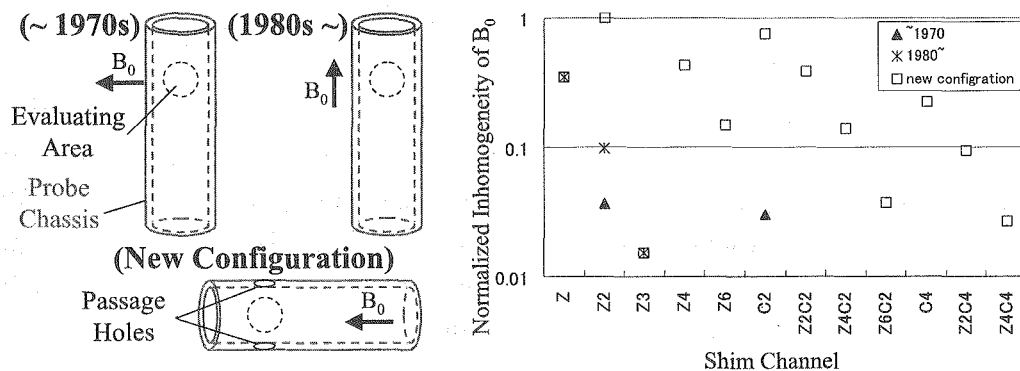


Fig. 2 Models of NMR probe and results of numerical calculation.

唯一、プローブと試験管が直交するシステムである。Fig. 2 にプローブ筐体起因の不整磁場を数値計算で求めた結果を示す。複雑な分布を持つ Z2C2 や Z4C2 などの磁場モードにおいて、新方式 NMR の不整磁場が大きいという結果が得られた。これらの不整磁場は試験管通過口に起因している。

不整磁場対策としてプローブ材料の無磁性化などを行った結果、クロロホルムを用いたスペクトル幅評価で半値幅 0.3Hz, 0.55% 高さ幅 7.7Hz など良好な値が得られた。詳細は当日報告する。

3. 謝辞

本研究を推進するにあたり、正田英介 先生、木村錫一 先生、高妻孝光 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（19文科振199号）の一環として行われました。

5. 参考文献

- (1) D. I. Hoult and R. E. Rechards, 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, 北口 第 46 回 NMR 討論会 講演要旨集 P82 (2007)

P104 水素貯蔵材料評価用高温・雰囲気制御 NMR システムの開発

(東北大学特定領域研究推進支援センター¹、東北大学大学院工学研究科²、
(株)プローブ工房³、日本電子(株)⁴)

○橋本真一¹、野田泰斗²、前川英己²、高村仁^{1,2}、藤戸輝昭³、池田武義⁴

Development of NMR system for in-situ analysis of hydride materials
under high temperature and pressure

¹Tohoku University, Center for Research Strategy and Support, ²Tohoku University,
Graduate School of Engineering, ³JOEL Ltd., ⁴Probe Kobo Ltd.

S.Hashimoto¹, H.Noda², H.Maekawa², H.Takamura^{1,2}, T.Fujito³, T.Ikeda⁴

An NMR system for in-situ analysis of hydride materials under high temperature and pressure conditions was developed. The system consists of gas pressure and flow rate controlling system, temperature controlling system, a high temperature NMR probe for both ¹H and multinuclear measurements and a sample tube holder. Sample temperature can be controlled up to 350°C by heated N₂ gas flow. Atmosphere in the sample tube can be substituted by H₂ or Ar and pressurized up to 1MPa.

はじめに

水素貯蔵材料として用いられる金属水素化物の水素の結合状態や、そのダイナミクスの観測は水素吸放出特性を理解する上で重要である。固体 NMR による測定は原子レベルの観測が可能のため、有用な手法の一つだが、実際の水素吸放出条件で観測されている例はまだ少ない。そこで、本研究では、水素吸放出条件下での高分解能 NMR 測定を in-situ で可能にした高温・雰囲気制御 NMR システムを開発したので報告する。

システムの概要

開発は Chemagnetics 社製 CMX Infinity 300 wide bore MNR 分光装置 (300MHz) をベースに行った。開発したシステムはガス圧力・流量制御部、温度可変装置部、高温プローブ、試料管ホルダーからなる。図 1 に全体の構成図を示す。ガス圧力・流量制御部のマスフローコントローラーおよび、試料管ホルダー後方の背圧弁を操作することにより、試料管内を H₂ または Ar 雰囲気保持し、一定流量 (最大 100ml/min)

キーワード 水素貯蔵材料、固体 NMR、高温、高圧、装置開発

著者ふりがな はしもと しんいち、のだ はると、まえかわ ひでき、
たかむら ひとし、ふじと てるあき、いけだ たけよし

を供給しながら雰囲気圧力を 1MPa（絶対圧）まで昇圧可能にした。試料はグローブ BOX 内で試料管に設置後、大気に暴露されることがないように、試料管ホルダーには小型バルブを取り付けるとともに、ガス圧力・流量制御部には配管内のパージが可能なように真空排気系を設けた。

図 2 に高温プローブの外観を示す。開発した高温プローブはジャンパー線の取付けにより高周波用（1H）と低周波用（多核）を切替えることが出来る。低バックグラウンド化のため、高温プローブのコイルセンターから離れた部分にプローブヒータを設置し、試料温度は加熱した N_2 の熱風により試料温度を最大 $350^{\circ}C$ まで制御可能にした。その結果、昇温時でもバックグラウンドノイズは比較的強く抑えられ、 $250^{\circ}C$ における $LiBH_4$ の高温相での 1H スペクトル観測が可能であることを確認した。今後、測定する水素貯蔵材料および条件の拡大を図っていく予定である。

謝辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から委託を受けた「水素貯蔵材料先端基盤研究事業（HYDRO☆STAR）」の一環として実施された。

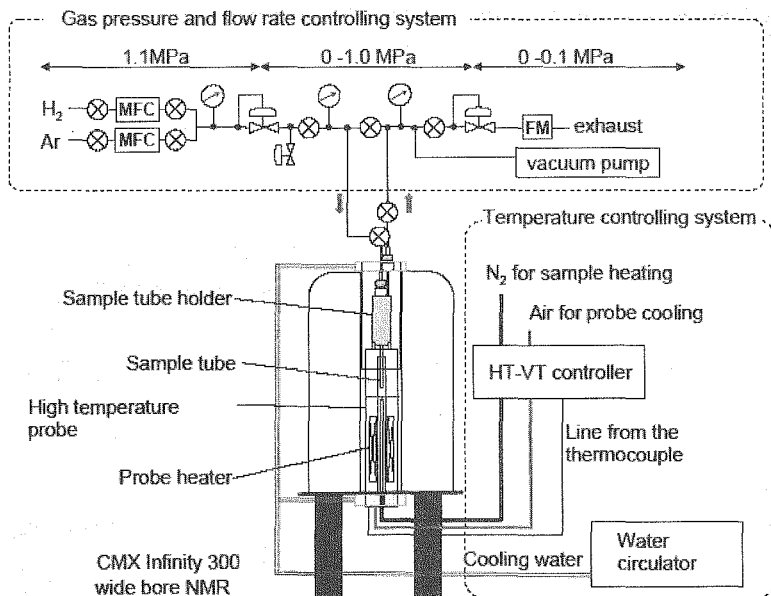


図 1 開発した高温・雰囲気制御 NMR システムの構成図

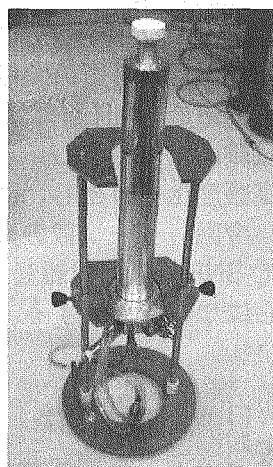


図 2 高温プローブ

新方式NMR用低温プローブの開発(2)

(株)日立製作所日立研究所¹、(株)日立製作所基礎研究所²
物質・材料研究機構³

○ 一木 洋太¹、川崎 健司¹、福田 祐三¹、山本 浩之²、岡田 道哉¹、北口 仁³

**Development of Cryogenic Probe System for NMR Spectrometer with
Superconducting Split-Magnet (2)**

¹Hitachi Research Laboratory, Hitachi, Ltd.,

²Advanced Research Laboratory, Hitachi, Ltd.,

³National Institute for Materials Science

Y. Ichiki¹, K. Kawasaki¹, Y. Fukuda¹, H. Yamamoto², M. Okada¹, H. Kitaguchi³

For high sensitivity NMR measurement we have developed cryogenic NMR probes with a solenoidal RF coil for a split-pair superconducting magnet. Signal-to-noise ratio (SNR) of a four-turn solenoidal RF coil and a two-turn one installed in the cryogenic probe was measured. The results indicated that the SNR of two-turn RF coil was higher than that of four-turn one. The reason is that the quality factor of the specimen Q_s of two-turn RF coil is higher than that of four-turn one.

1. はじめに

我々のグループでは、スプリット型超電導磁石を用いた新方式 NMR 装置を開発している。本装置の特徴は、高感度化が期待できるソレノイド型 RF コイルを使用し、溶液 NMR 計測が可能なることである。これまでに常温プローブを用いた感度評価試験により、ソレノイド型 RF コイルによる感度向上を実証した[1]。またさらなる高感度化を目指し、600MHz 超電導磁石用の低温プローブの開発を進めている[2]。

今回、ターン数の異なる2つのソレノイド型 RF コイルを低温プローブへ実装して SNR (信号対雑音比) 測定を行い、その比較結果から得られた高感度化への見通しについて報告する。

2. 新方式 NMR 用低温プローブの概要

新方式 NMR 用低温プローブシステムの構成を Fig. 1 に示す。低温プローブは冷却ユニットとトランスファチューブで接続されており、その中には極低温のヘリウムガスを循環させるための配管が設置されている。RF コイル近傍には熱交換器が設置され、前述したヘリウムガスによって約 5 K に冷却される。RF コイルは、熱交換器に固定された支持構造を通じて約 10 K に伝導冷却される。

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、感度

いちきょうた

3. 測定結果

RF コイルの Q 値と SNR の関係を調べるために、4 ターンおよび 2 ターンの RF コイルを低温プローブへ実装し、SNR 測定を実施した。測定試料は 0.1 % エチルベンゼンである。Table 1 にそれぞれの RF コイルの Q 値および SNR をまとめた。 Q_L 、 Q_C はそれぞれ、試料を挿入した RF コイルの Q 値、RF コイル単体の Q 値である。また Q_s は試料の損失による Q 値であり、次式によって計算される。

$$\frac{1}{Q_L} = \frac{1}{Q_C} + \frac{1}{Q_s} \quad (1)$$

Table 1 を見ると、 Q_C は 2 ターンよりも 4 ターンの方が大きい、 Q_s は Q_C の差以上に 2 ターンの方が大きく、結果的に Q_L は 2 ターンの方が大きい値となった。SNR は Q_L の 1/2 乗に比例するため、結局 2 ターンの方が高い SNR を得られた。以上より、ターン数を増やしただけでは Q_s が低下し、SNR が下がってしまうことがわかった。高感度化のためには Q_C だけでなく、 Q_s の向上が重要である。 Q_s は主に RF コイルが発生する電界による損失で決まるため、RF コイル形状に依存する値である。したがって、RF コイル形状を最適化し、 Q_s を向上させることが必要である。

また、LNA（低雑音増幅器）の改良により、2 ターンの SNR は 4523 から 5226 に向上した。発表では、LNA の改良による SNR 向上についても報告する。

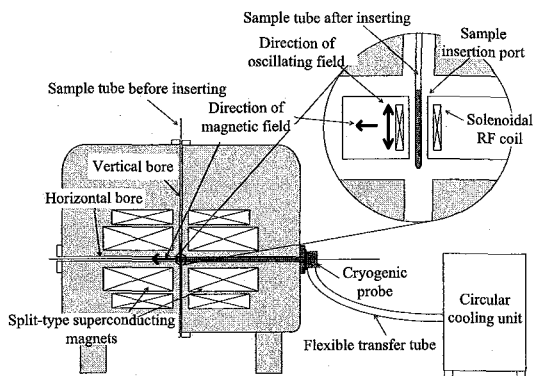


Fig. 1 Schematic of cryogenic probe system for split-pair superconducting magnet.

Table 1 Quality factors and SNR for cryogenic probe.

Coil type	Q_L	Q_C	Q_s	SNR
4 turns	1660	2730	4240	3359
2 turns	1990	2140	28400	4523 (5226*)

*: 改良した LNA を用いた値

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、高妻孝光 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費委託研究（19文科振199号）の一環として行われました。

5. 参考文献

- [1] 川崎 他、「新方式 NMR 用高感度 NMR プローブの開発」、第 46 回 NMR 討論会講演要旨集 p. 408 (2007)
- [2] 福田 他、「新方式 NMR 用低温プローブの開発」、第 46 回 NMR 討論会講演要旨集 p. 400 (2007)

超 1GHz NMR にむけて;

電源通電モードにおける磁場安定化と 3D-NMR 計測

¹ 理化学研究所 SSBC, ² 千葉大院・工,³ 日本電子, ⁴ 神戸製鋼, ⁵ 物材機構, ⁶ 横浜市大院柳澤 吉紀^{1,2}, 中込 秀樹², 細野 政美³, 濱田 衛⁴, 木吉 司⁵, 保母 史郎⁶,
山崎 俊夫¹, 高橋 雅人^{1,6}, ○前田 秀明^{1,6}

Towards a beyond 1 GHz NMR spectrometer;

Field stabilization and 3D-NMR measurement in an external current mode

¹RIKEN, ²Chiba Univ., ³JEOL Ltd., ⁴Kobe Steel, Ltd., ⁵NIMS, ⁶Yokohama City Univ.Yoshinori Yanagisawa^{1,2}, Hideki Nakagome², Masami Hosono³, Mamoru Hamada⁴,
Tsukasa Kiyoshi⁵, Fumio Hobo⁶, Toshio Yamazaki¹, Masato Takahashi^{1,6},○Hideaki Maeda^{1,6}

We have started a project to develop a beyond 1GHz NMR by using a Bi-2223 high temperature superconducting (HTS) innermost coil. Due to small residual resistance in 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, which have to be stabilized. In this study we show results of NMR measurements using a conventional 500 MHz NMR spectrometer in such an external current mode. The field fluctuation is stabilized by an internal ²H lock. The quality of the 1D-solution NMR spectra and the 3D-spectrum of ubiquitin observed in external current mode are equivalent to those in persistent current mode.

〈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。我々は、Bi-2223 高温超伝導インサートコイルを用いた超1GHz NMR スペクトロメータを開発するプロジェクトを進めている¹⁾。高温超伝導コイルには微弱な残留抵抗があり、超伝導接続も開発されていない。それゆえ、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、電源電流リップルにより磁場が変動するので、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手法として²H内部ロックを一定の条件化で使用すれば従来の永久電流モードと同じレベルの高分解能多次元溶液 NMR が可能であることを実証する^{2), 3)}。

キーワード：超 1GHz NMR、磁場変動、²H 内部ロック、通電モード、HNCO

著者ふりがな：やなぎさわ よしのり、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、ほぼ ふみお、やまざき としお、たかはし まさと、まえだ ひであき

〈実験方法〉

最初に、500 MHz NMR (Bruker Biospin 社) を永久電流モードで運転した状態で室温シム調整を行っておく。次に外部電源をコイルに接続し、永久電流スイッチを”閉じた”状態で電源電流値をコイル電流値まで上昇させる。次いで永久電流スイッチを”開く”ことで電源通電モードに移行する。電源電流値とコイル電流値にわずかな差があるため、通電モード移行直後は磁場の値が 20-30 ppm だけ変動する。この磁場の初期変動 (~1 時間) が収まった後再び室温シムを調整し磁場均一度を向上させた後、溶液 NMR 計測を行った。今回の実験系では電流リードからの熱侵入 (10W) により液体ヘリウム冷媒が急速に蒸発してしまうため、一回の実験で NMR 計測に使える時間は最長 5 時間程度に制限される。計測は以下の手順で行った。なお、通電に使用した電源 (Danfysik, 854) は世界最高レベルの安定度を持つ。

- (1) 通電モード時の磁場変動計測
- (2) 長時間の ^2H 内部ロックの安定性評価
- (3) 基礎 NMR 特性評価: 線形・感度・水消し (Presaturation, 3919WATERGATE)
- (4) 3D-HNCO 計測 (ユビキチン)

〈結果と考察〉

- (1) 通電モードの磁場変動: Fig. 1 に通電モードにおける磁場安定度を示す。磁場の値は NMR ピークの周波数を計測した。磁場変動振幅は $\pm 0.1\text{ppm}$ 程度である。既に報告した様に、 ^2H 内部ロックで安定化可能な変動レベルは $\pm 1.5\text{ppm}^2$ であるが、磁場変動幅はこれに比べて十分小さい。

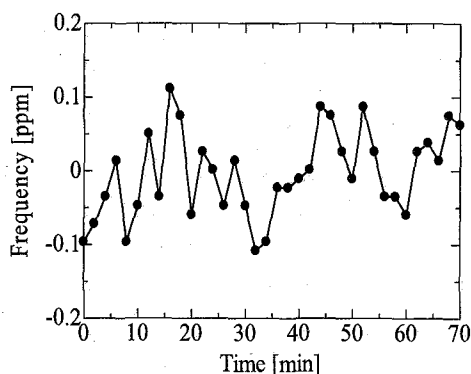


Fig. 1. Normalized field fluctuation in external current mode.

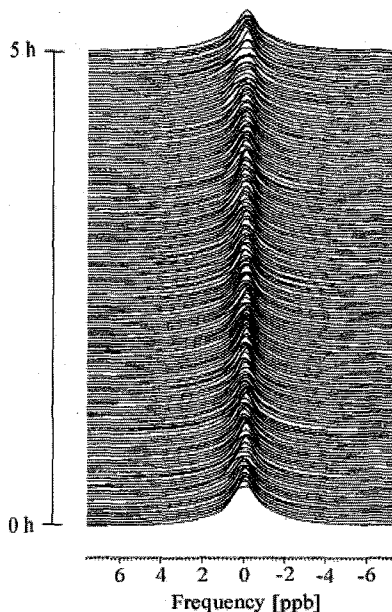


Fig. 2. Long-term stability of the NMR spectra with internal ^2H lock and auto shimming of z and z^2 in external current mode..

- (2) ^2H 内部ロックの効果: 通電モードにおいて、内部ロックを動作させながら、2 分ごとに 5 時間にわたって線形試験を続けた結果を Fig. 2 示す。サンプルは重水素化アセトン

溶媒中の 1%クロロホルムである。通電モードでは電流リードからの熱侵入により液体 He が急速に蒸発するためクライオ内圧が変動し磁場均一度が崩れてしまう。そのため Z、Z² 項をオートシムにより常時補正しながら計測を行った。スペクトルのピーク周波数と線形がほぼ完全に保たれている。今回の実験では冷媒の液体 He が蒸発してしまうため計測は 5 時間で打ち切ったが、液体ヘリウム冷媒補充の必要がない小型冷凍機を用いるヘリウム再凝縮型のクライオスタット⁴⁾を使用すれば同じ技術で 100 時間以上連続してロックを動作させ高分解能 NMR 計測が可能である。これについては別報で示した。⁴⁾

- (3) NMR 基礎特性：Fig. 3 に通電モードでの NMR スペクトルの線形試験の結果を示す。サンプルは重水素化アセトン溶媒中 1%クロロホルムである。±20Hz のピークはサンプルスピンによるサイドバンドである。ピークの線形は 0.53、8、11Hz であり、永久電流モードと同等である。また適切なループ時間を選択することで電源電流由来の 2Hz の磁場変動ピーク²⁾が抑えられている。Fig. 4 に 3919WATERGATE を用いた水消し試験の結果を示す。サンプルは 2mM スクロース水溶液である。PFG 印加直後はロックの制御系に入力されるエラー信号⁵⁾がゼロになる空白時間が生じる。通電モードでは、磁場が定常的に変動しているの、これが大きな影響を及ぼす。制御系の積分時定数²⁾をそれより長く設定することでリフォーカスが問題なく実行され、水シグナルがよく消えた良質なスペクトルが取得できている。

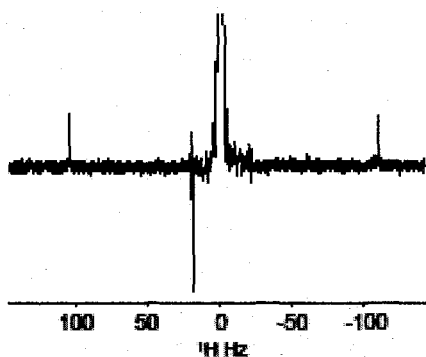


Fig. 3. The line shape of CHCl₃ in acetone-d₆ obtained in external current mode

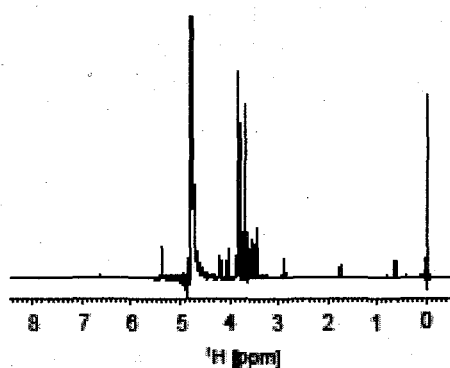
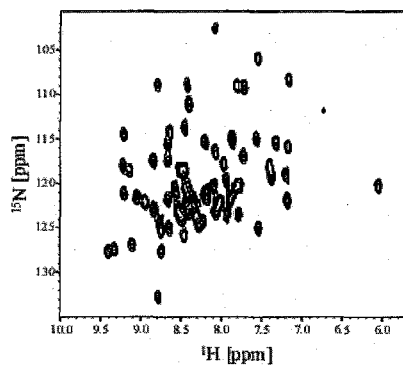
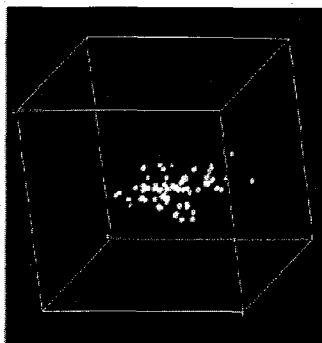


Fig. 4. Water suppression test with 3919WATERGATE obtained in external current mode.

- (4) 多次元 NMR: 以上の結果より線形・水消し・長時間磁場安定度など多次元 NMR 計測を通電モードで行う要素がクリアできたので、次に標識クロレユビキチンの、3D-HNCO 計測を行った。計測中には ²H 内部ロックを動作させた。計測ポイント数は、1H: 1024、15N: 32、13C: 64 とした。計測時間は約 3 時間である。磁場均一度悪化を防ぐため Z、Z² 項をオートシムで調整した。Fig. 5 (a) に 3 次元スペクトルを、Fig. 5 (b) に 3 次元スペクトルの ¹H-¹⁵N 平面への投影 (¹³C の時間領域における最初のデータセットを 2 次元フーリエ変換したもの) を示す。スペクトルに t₁ ノイズはなく、計測時間中に磁場変動が ²H 内部ロックで完全に安定化されていることがわかる。また水シグナルも消えており、PFG 後のリフォーカスが問題なく行われていることがわかる。計測されたスペクトルは永久電流モードで取得されたスペクトルと同等

であり、通電モードにおいても ^2H 内部ロックで磁場変動を安定化することによりタンパクの 3D-NMR 計測が可能であることが実証された。



<結論>

通電モードでも ^2H 内部ロックを活用すれば、従来の永久電流と同レベルの多次元 NMR が可能である。今回の試験では、ヘリウム蒸発量の関係で計測時間が5時間程度に限定されたが、今後、ヘリウム再凝縮型のクライオを用いることで、計測時間を100時間以上に拡張できる。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。

[参考文献]

- 1) T. Kiyoshi, A. Otsuka, S. Choi, S. Matsumoto, K. Zaitsu, T. Hase, M. Hamada, M. Hosono, M. Takahashi, T. Yamazaki, H. Maeda, NMR Upgrading Project Towards 1.05 GHz, IEEE Trans. Appl. Supercond., 18 (2008) 860-863.
- 2) Y. Yanagisawa, H. Nakagome, M. Hoshino, M. Hamada, T. Kiyoshi, F. Hobo, M. Takahashi, T. Yamazaki, and H. Maeda, Towards beyond-1GHz solution NMR: internal ^2H lock operation in an external current mode, J. Mag. Res. 192 (2008) 329-337.
- 3) Y. Yanagisawa, H. Nakagome, M. Hoshino, M. Hamada, T. Kiyoshi, F. Hobo, M. Takahashi, T. Yamazaki, H. Maeda, Towards beyond-1 GHz NMR: Field stabilization and NMR measurement in the external current mode. to be published in Journal of KIASC (2008)
- 4) 高橋、斎藤、柳澤、保母、高尾、中込、細野、濱田、木吉、山崎、前田；電源励磁による高温超電導磁石を使った固体 NMR 用外部ロックの開発、第 47 回 NMR 討論会 (2008)
- 5) Timothy D. W. Claridge, High resolution NMR techniques in Organic Chemistry, Elsevier (1999)

(独) 物質・材料研究機構

○端健二郎、清水禎、藤戸輝昭、後藤敦、大木忍

High-Field NMR with a Newly Designed Hybrid Magnet System
NIMS

K. Hashi, T. Shimizu, T. Fujito, A. Goto and S. Ohki

NMR measurements with a newly designed hybrid magnet system installed in the National Institute for Materials Science were performed up to 28 T. A modified resistive insert magnet improved the field homogeneity of the hybrid magnet from 186 ppm/±5mm to 16 ppm/±5mm along the z -axis. Reconstruction of a power source for the resistive magnet suppressed the field instability from 30 ppm_{rms} to 3 ppm_{rms}. These improvements enable us to have an NMR spectrum with narrower line width.

アルミやホウ素など核スピンの 1/2 より大きい四極子核はガラスや触媒などの多くの機能性材料に含まれているが、その高分解能NMR測定では、四極子相互作用による線幅の増大によって十分な分解能を得ることが困難であることが多い。四極子核の高分解能NMRスペクトルを得るために、MQMASなどの方法も考えられているが、測定磁場を高くすることが最も原理的に有効な手段である。そこで超伝導磁石のみでは達成することが困難な 25 Tを超える定常磁場での固体NMR測定を可能とするために電磁石と超伝導磁石を組み合わせたハイブリッド磁石を用いた装置開発を行っている。これ

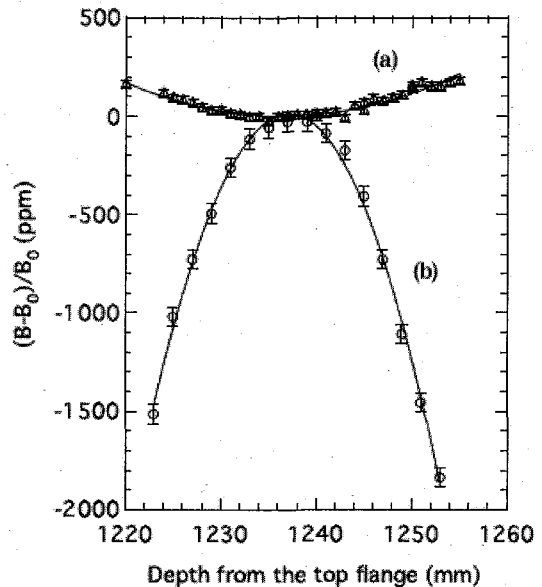


Fig.1 Field profiles of (a) the new and (b) the previous magnets measured at $B_0=28\text{T}$ and $B_0=30\text{T}$, respectively.

キーワード：強磁場、ハイブリッド磁石、装置開発

ふりがな : ○はし けんじろう、しみず ただし、ふじと てるあき、
ごとう あつし、おおき しのぶ

までの測定で空間分解能、時間安定度とも100ppm程度しかないことが分かっていた[1]。今回、空間分解能を向上させるために電磁石の構造を変え、磁場分布がより均一になるよう変更を行った[2]。また時間安定度を向上させるために、電磁石電源にFETドロップを導入するなどの改良を行った[3]。これらの改良を行ったハイブリッド磁石を用いたNMR測定結果について報告する。測定はKBrの ^{79}Br 核をプローブとしたNMR測定を行い、試料位置を変化させながら共鳴周波数を測定することによって磁場プロファイルを得た。また、磁場中心において、シングルショットスペクトルの共鳴周波数の時間変化を測定することによって、時間安定度の測定を行った。

図1に改良前と改良後の磁場プロファイルを示す。磁場中心は変わっていないが、均一度が改良前の186ppm/±5mmから16ppm/±5mmまで、およそ1.2倍改善されていることがわかる。図2に改良前と改良後の磁場の時間変化を示す。改良前には30ppm_{rms}あった磁場の揺らぎが改良後には3ppm_{rms}まで低減化されている。これら空間分解能、時間安定度を向上させたハイブリッド磁石を用いたシングルショットNMRスペクトルを図3に示す。改良前に同一試料について測定した結果と比べて信号対雑音比(S/N)と線幅が格段に改善されていることが分かる。中心ピークの裾にあるウィグルも小さくなり、線幅は約700Hz(2ppm)まで狭くなっている。しかし、固体高分解能の目安となる1ppm以下の分解能には達していない。特に磁場の揺らぎは信号の積算を困難にするため、より一層の磁場の安定化が必要となっている。今後、磁場揺らぎの補正機や室温シムの開発が必要である。

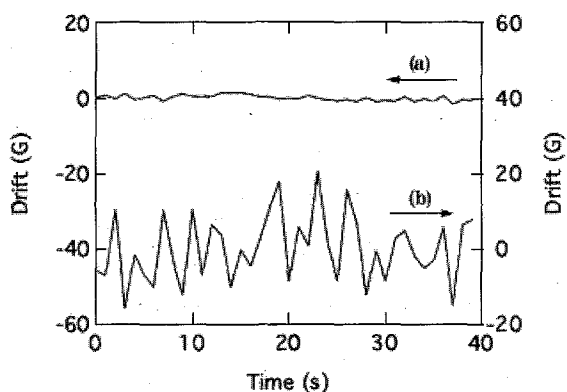


Fig.2 Field stability of the magnetic field (a) after and (b) before the reconstruction of the power source at $B_0=28\text{T}$ and $B_0=30\text{T}$, respectively.

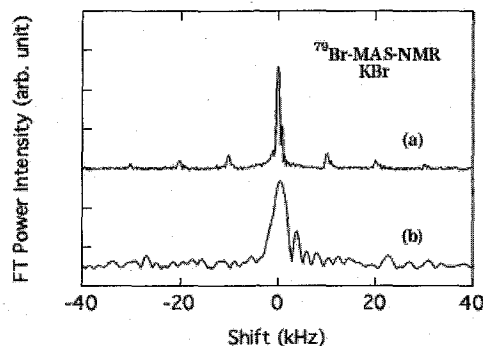


Fig.3 Single shot ^{79}Br -MAS-NMR spectra measured with (a) the new magnet at 28T and (b) the previous magnet at $B_0=30\text{T}$.

[1] K. Hashi, et al.: Jpn. J. Appl. Phys. 44 (2005) 4194.

[2] T. Asano, et al.: J. Phys: Conference 51 (2006) 573.

[3] G. Kido, et al.: J. Phys: Conference 51 (2006) 580.

溶液 ^{33}S NMR 低温プローブの開発¹ 理化学研究所 SSBC, ² 横浜市立大学, ³ 上智大学○ 保母 史郎², 高橋 雅人^{1,2}, 斎藤 雄太³,
高尾 智明³, 前田 秀明^{1,2}Development of ^{33}S Cryogenic probe¹ RIKEN, ² Yokohama City Univ., ³ Sophia Univ.○ Fumio Hobo², Masato Takahashi^{1,2}, Yuta Saito³, Tomoaki Takao³, Hideaki Maeda^{1,2}

A cryogenic probe for ^{33}S solution NMR has been developed for higher sensitivity gain than a commercial probe. ^{33}S -detected experiments have the advantage of absence of solvent peaks and high conductivity tolerance. However, their inherently low sensitivity has made measurement difficult. The introduction of cryogenic probes with high ^{33}S -sensitivity is an important development for practical utilities of ^{33}S solution NMR. The effect on the sensitivity by ^{33}S cryogenic probe will be presented.

はじめに

硫黄の NMR 計測可能な唯一の同位体が硫黄 33 (^{33}S) である。 ^{33}S は四極子核 ($I=3/2$) であり、低い天然存在比 (0.76%)、小さい磁気回転比 ($2.0517 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、大きい四極子モーメント ($Q = -6.4 \times 10^{-28} \text{ m}^2$)、そして低い共鳴周波数を持つ。この性質が ^{33}S の検出感度を下げ、 ^{33}S NMR 計測を難しくしている。このため ^{33}S NMR に関する溶液 NMR の研究例は少なく、固体 NMR でも僅かしかない。

^{33}S NMR はケミカルシフトが 1000ppm に及び、線幅も数 Hz から数千 Hz と化合物によって大きな多様性がある。溶液 ^{33}S NMR は硫黄核が対称電場中にあるスルホン酸やスルホン酸塩の研究例が多いが、最近では In-vivo NMR や高出力プローブによる非対称電場中の硫黄核の計測例も出ている。しかし ^{33}S NMR の感度はまだ不十分であり、高い積算回数と高濃度サンプルが必要である。例えば、タウリンを多く含む貝類 (カキは 100g あたり 1.2g 程度) は計測可能だが、メタボローム研究に向けたヒト血液中のタウリン (約 $160 \mu\text{M}$) 計測は、サンプル濃度が低いため困難である。そこで本研究では、生体の低濃度サンプルの ^{33}S NMR など低周波核の計測を容易にする高感度プローブの開発を目的としている。

NMR の感度を向上させる技術の 1 つに、低温プローブとして高周波 (RF) コイルやプリアンプを冷却し熱ノイズを減らす方法がある。 ^1H 低温プローブはイオン伝導や誘電損失による感度低下が問題になる。しかし ^{33}S のような低周波核では低温プローブでもサンプルロスの影響が小さくなるので、大口径のサンプル管を用いサンプル量を増やし、感度を向上させる手法も併用できる。本研究では大口径 (10mm) の溶液 ^{33}S NMR 低温プローブを開発し、標準試料として用いられる硫酸ナトリウムをはじめ、生体試料のタウリンやシステイン酸を計測したので報告する。

 ^{33}S 低温プローブ

11.7 テスラ超伝導マグネット用 (^1H で 500MHz) の溶液 ^{33}S 低温プローブを開発した。システムは 2 段小型冷凍機 (GM/JT 冷凍機)、ヘリウム輸送ライン、低温プローブから構成されている。冷却システムは当研究室で開発された [1]。

キーワード: ^{33}S NMR spectroscopy, Cryogenic probe technology,
Sensitivity, Signal-to-noise ratio
ほぼふみお、たかはしまさと、さいとうゆうた、たかおともあき、まえだひであき

本研究では Fig.1 に示す ^{33}S NMR シグナルを検出する RF ユニット(=RF コイル+RF 回路)を制作し、低温プローブ内部の冷却ステージに接続固定した。プローブは口径 10mm のサンプル管タイプであり、計測には約 3ml のサンプルを要する。RF ユニットは ^{33}S (38.36MHz)コイルと ^2H 地場周波数ロックの 2 つの RF コイルで構成されている。内側の ^{33}S 用コイルは低周波数であり、インピーダンス整合を容易にするために、3 回巻きコイルを直列に接続した内径 14.9mm の鞍型コイルを用いた。 ^{33}S 用コイルは無酸素銅箔から基盤作成機で切り抜き、成形後、サファイア管に固定して熱アンカーをとっている。重水ロックコイルは直径 20mm の鞍型コイルを用いた。このコイルはアルミニウム箔から切り抜き、テフロン治具に固定した。それぞれの RF コイルには非磁性コンデンサーが半田付けして、独立した RF 共振回路を構成している。

^{33}S 低温プローブと市販 5mm ブロードバンドプローブ(ブルカー VSP500)の感度を比較して Fig.2, Fig.3 に示す。理論上は 10 倍程度の高感度化をサンプル量増加と RF コイル冷却から期待できる。本実験では共振回路のマッチングがまだ十分ではなく、プリアンプも室温であるが、硫酸ナトリウム、タウリンで約 3 倍の感度上昇を得た。これらの改良により今後は理論値までの感度が増加するものと期待している。今回の結果で特徴的なのは、1M 硫酸ナトリウム水溶液は高イオン導電率の試料だが、導電率のほとんど無い 20mM タウリンと同じ感度上昇率になっている点である。このことから低周波核の低温プローブでは、大口径サンプル管を用いてもサンプルロスの影響が少ないことが分かる。これは塩濃度の高い生体サンプルや In-vivo の計測において利点となる。

当日には、2mM のタウリン水溶液と 20mM システイン酸水溶液の ^{33}S NMR も併せて報告する。

参考文献

- 1) F. Yoshimoto, M. Takahashi, T. Horiuchi, F. Hobo, K. Inoue, T. Miki, M. Hamada, T. Okamura, S. Yokoyama and H. Maeda, *Advances in Cryogenic Engineering: Transactions of the Cryogenic Engineering Conference* 51 (2006) 704–711.

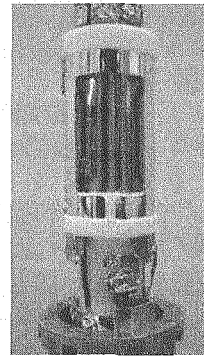


Fig.1 RF circuit unit of ^{33}S cryogenic probe. The inner coil is a RF coil of 38.36MHz for ^{33}S . The outer coil is a RF coil of 76.75 MHz for ^2H lock.

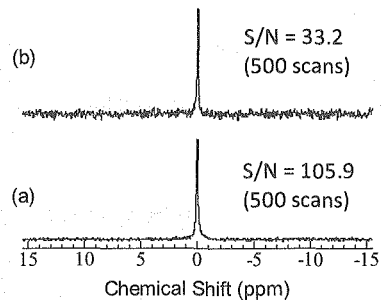


Fig.2 ^{33}S NMR spectrum of a 1M Na_2SO_4 solution, recorded by (a) 10mm ^{33}S cryogenic probe at the RF coil temperature of 11.4 K, (b) 5mm Bruker broadband probe VSP500.

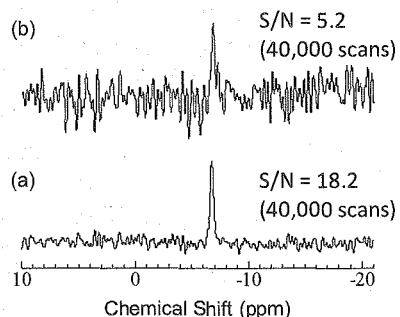


Fig.3 ^{33}S NMR spectrum of a 20mM Taurine solution, recorded by (a) 10mm ^{33}S cryogenic probe at the RF coil temperature of 18 K, (b) 5mm Bruker broadband probe VSP500.

超偏極 Xe ガス連続生成装置の小型化と ^{129}Xe NMR による多孔質材料への Xe ガス吸着解析

産業技術総合研究所 光技術研究部門

○服部峰之、平賀隆、早水紀久子、山本典孝、浅沼達哉

Apparatus for Producing Hyperpolarized Xenon Gas and Adsorption Property of Xenon Gas on Mesoporous Materials using ^{129}Xe Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Photonics R. I., National Institute of Advanced Industrial Science and Technology.

Mineyuki Hattori, Takashi Hiraga, Kikuko Hayamizu, Noritaka Yamamoto, Tatsuya Asanuma

[abstract] An apparatus for producing a hyperpolarized noble gas by polarizing a noble gas in the presence of an optical pumping catalyst under application of magnetic field and laser light, including a cell having a thin reaction chamber, a gas introduction conduit connected in fluid communication with the reaction chamber for feeding the noble gas, a gas discharge conduit connected in fluid communication with the reaction chamber, a first gate valve having an outlet port connected to the gas introduction conduit and an inlet port adapted to be in fluid communication with a noble gas introduction line, a second gate valve having an inlet port connected to the gas discharge conduit and an outlet port, and a capillary tube removably connected to the outlet port of the second valve for recovering a hyperpolarized noble gas produced in the reaction chamber. The apparatus may be directly connected to NMR or MRI.

【目的】 ^3He , ^{129}Xe の核スピンの $1/2$ の希ガスは、Rb の D_1 線 ($5^2S_{1/2}-5^2P_{1/2}$) を光ポンピングしたアルカリ金属とのスピン交換を行って、NMR 信号を飛躍的に増強できる[1]。超偏極希ガスの生成については希ガスを滞留させた状態で、すなわちバッチ方式による超偏極希ガスに変換する方法や、フローセルを用いた連続的な変換を行う方法が各種提案されている[2,3]。しかしながら、従来の方法においては、いずれも超偏極希ガスの生成効率が低く、その利用効率は利用能率が悪いという問題があったことから、これまでに以下の装置を提案してきた。固体ルビジウムと固体キセノンとが酸素不在の減圧状態で封入されたガラスセルを加熱して気体キセノンと気液混合ルビジウムとする手段と、そのガラスセルに磁場をかけてレーザー光を照射する手段とを具備し、生成した超偏極キセノンガスを取り出しながらキセノンガスを導入する手段と該操作で圧力が降下しないように制御する圧力調整手段とを具備することを特徴とする超偏極キセノンガスの生成装置[4]。さらに、隙間を介して対向する平板面を有し、照射するレーザー光の光パワー密度が十分に生かせる範囲の照射面積を有する平面型フローセル部内の隙間に希ガスと光ポンピング用触媒の混合気体を一方向に流通させる超偏極希ガスの生成装置[5]。また、セルや配管等の内壁と衝突によるスピン緩和の発生を抑制して、長距離送給しても超偏極希ガスの NMR 信号強度が低下しない生成装置と、超偏極希ガス生成セルの下流に、内径 0.1~1.25mm の極細キャピラリー管を備えることが有効であることを見出し、改善された新しい装置を提案している[6]。これまで提案の装置や方法は各々の特徴を有し、優れた効果を奏するものであるが、バッチ方式とフローセル方式の双方の特徴を生かし、しかも装置そのものの製造、組立て、メンテナンスが容易であって、かつ偏極希ガスの生成効率とその利用効率性にも優れたシステムを構成するとの観点においては検討すべき余地が残されていた。ここでは、以上の課題を解決することのできる新しい超偏極希ガスの生成装置を開発し、これを NMR/MRI 装置へ利用することを目的としている。

超偏極, ^{129}Xe NMR, 連続フロー, 多孔質, 吸着

はっとりみねゆき, ひらがたかし, やまもとのりたか, あさぬまたつや

【方法】光ポンピング用触媒の Rb の濃度を高めることができれば、励起光を強くして Xe 核と偏極 Rb との衝突回数も増大させられ、偏極効率を効果的に上昇させられることが予想される。Rb の数密度を増加させる方法として、ここでは、偏極操作を行うセル部分の温度を上昇させることを考える。Rb の蒸気圧の温度依存性を図 1. に示す[7]。これから、Rb 金属を透明なセルに封入して Rb ランプからの光を照射すると透過する光量はセルの温度の上昇に伴い減少することが期待される。図 2. に Rb ランプ光の透過率の実測値を示すが、実際にこのような振る舞いが観測されている。これまでの円筒状ガラス容器を採用した偏極装置[2-4]では、励起光強度は入射方向の入射面からの距離に依存して指数関数で減少する。円筒状ガラス容器内での Rb 等の濃度は、励起光が強い部位に最適化して決定するため、入射面からの距離が離れた励起光強度が弱い部分かなりの体積を占めることになる。こうした励起効率の低い部位での偏極率の低下は、ガス分子が対流・拡散によって効率の高い部位に移動することにより解消されるが、全体の励起効率を低下させている原因となる。

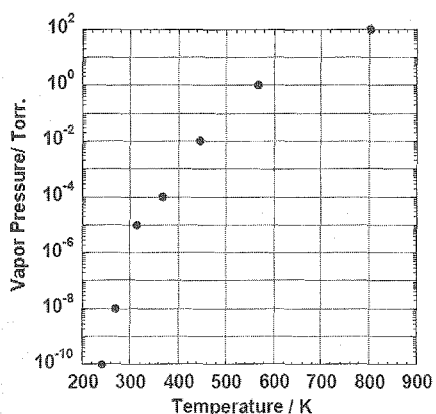


図 1. Rb の蒸気圧の温度依存性

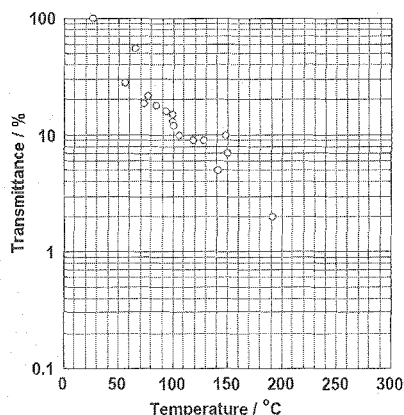


図 2. Rb ランプ光の透過率の温度依存性

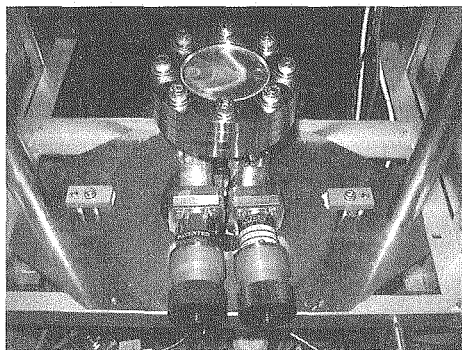
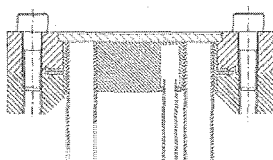
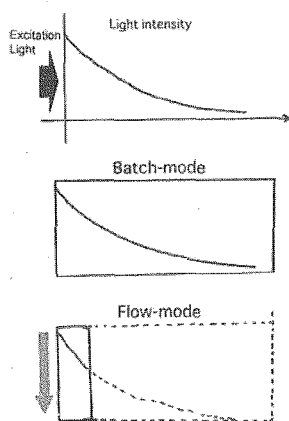


図 3. (上)励起光の分布、(中段)溜式(Batch)と(下)連続フロー式(Flow)の比較

図 4. (中央)偏極セル部の断面図、(右;写真)真空チャンバー等で利用する ICF フランジと石英製ビューポートを利用した小型の連続フロー型偏極セルを開発した(特願 2006-316485)。

この問題を回避するため、図3. に示すような、最大効率で超偏極希ガスを得られる構造として、隙間を介して対向する平板面を有し、照射するレーザー光の光パワー密度が十分に生かせる範囲の照射面積を有する平面型フローセル部内の隙間に希ガスと光ポンピング用触媒の混合気体を一方向に流通させるとともに、隙間を有するフローセル部内には励起光を照射し、かつフローセル部の励起光照射面に垂直に磁力線が通過するように磁場を印加するようにした[5]。

図4. に今回開発した超偏極希ガスの生成装置を示す。この装置は以下の特徴をもつ、(1) 隙間を介して対向する平板面を有し、隙間には希ガスと光ポンピング用触媒の混合気体が流通する平面型セル部と、レーザー光を照射して平面型セル内に励起用光を照射するレーザー光照射部と、平板面に垂直もしくは略垂直に磁力線が通過するようにした磁場印加部と、平面型セル部の温度調節部とを備えた超偏極希ガスの生成装置であって、前記平面型セル部は、少なくとも平板面的一方がレーザー光透過性とし、希ガス導入のための気体導入部と生成された超偏極希ガスの導出部を有し、気体導入部は希ガスの導入とその停止が、バルブを開けた時に気体導入のための上流側から平面型セル部である下流側を見通すことが可能な構造のバルブにより切換え自在とされているとともに、超偏極希ガスの導出部は平面型セル部である上流側から生成された超偏極希ガスの導出部となる下流側を見通すことが可能な構造のバルブにより導出と停止が切換え自在とされ、かつ、該導出部には極細キャピラリー管が連結と脱着可能に設けられている。(2) 平面型セル部は、光ポンピング用触媒の供給部を、気体導入部と一体または別体として備えている。(3) 平面型セル部は、次の部材：(A) レーザー光透過性の円形平板面をリング状支持体に支持した光透過平板面部材、(B) 円形の平板面に希ガスの導入管部と超偏極希ガスの導出管部を垂直もしくは略垂直に立設して開孔させた気体導出入平板面部材、(C) 前記(A)と(B)の部材の接続用金具により接続一体化され、必要に応じて分離可能な構造により構成されている。(4) 光ポンピング用触媒は、気体導入部側に設置されたバルブに接続されて設置された触媒溜より(A)光透過平板面部材のレーザー光透過性の平板面に移送される。図5. に偏極用セルの中にRb触媒を移送する際の構成と、超偏極希ガスを生成するときの構成を示した。

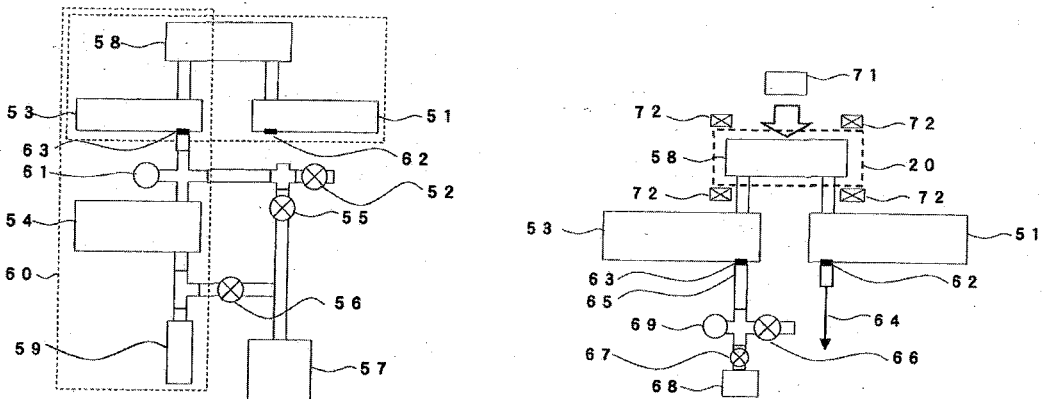


図5. (左) Rb 触媒の移送の場合、(右) 超偏極キセノンガスの生成の場合
 58 平板型セル部； 51、52、53、54、55、56 バルブ； 57 超高真空排気系； 59 触媒溜； 60 加熱装置； 62、63 分離機構； 64 極細キャピラリー管； 65 気体導入部； 66、67 バルブ； 70 加熱装置； 71 レーザー光照射装置； 72 磁場発生装置

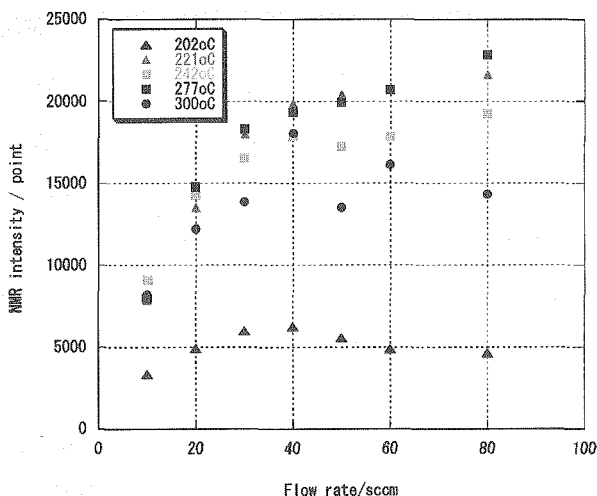
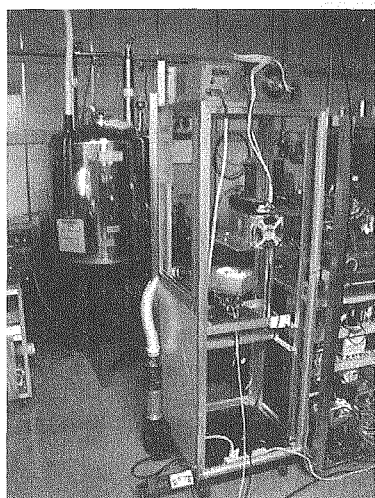


図6. ^{129}Xe NMR 信号強度の温度、流速依存性

【実験と結果】NMR tecmag Apollo、 ^{129}Xe 74.747MHz、FA=90°、NS=16、Xe:N₂ 混合比(98%:2%)、励起光源：PD-LD: LML-794.7B-05 (27W 0.2nm)、Cell gap = 0.38mm。図6. に結果を示す。277°C、80sccm の場合に最大の信号強度を得た。

本装置を用いて、吸着物を除いたポア径 0.5,1,約 2nm のシリカ (5A,13X,Low-k) に吸着した Xe の ^{129}Xe NMR スペクトルを 168~313 K の温度で取得した。超偏極 Xe ガスを流通させた場合は信号強度は、熱平衡の Xe ガスよりも大きな信号を与え、これら多孔質でのガス交換の存在が示された。

【まとめ】新しく開発した生成装置は、金属製フランジと石英製ビューポートを利用した連続フロータイプのセルで次のような長所がある。(1) いままでのガラスセルに比べて、本構成では、セル内をより加圧することができるので、偏極率と超偏極希ガス生成量を同時に増大できる。(2) 長いキャピラリーを取り付けて内部の超偏極したガスを直接 NMR 装置へ導入できる。(3) 別に用意した真空マニピュールドにおいてルビジウム金属を蒸着して、セル部分だけを交換する構成なので、MRI 装置に真空機器を近づけなくてよい。また、セルの再利用がいままでのガラスセルに比べて容易。今回の装置は、これまで開発してきた偏極希ガスの生成装置を更に発展させ、バッチ方式とフローセル方式の双方の特徴を生かし、しかも装置そのものの製造、組立て、メンテナンスが容易であって、かつ偏極希ガスの生成効率とその利用効率性にも優れたシステムを構成することが可能となった。

【参考文献】

[1] W. Happer, E. Miron, S. Schaefer, D. Schreiber, W. A. van Wijngaarden, and X. Zeng, Phys. Rev. A29, 3092 (1984).
 [2] B. Driehuys, G. D. Cates, E. Miron, K. Sauer, and W. Happer, Appl. Phys. Lett. 69, 1668 (1996).
 [3] M. E. Wagshul and T. E. Chupp, Phys. Rev. A40, 4447 (1989). ; W. J. Cummings, O. Hausser, W. Lorenzon, D. R. Swenson, B. Larson, Phys. Rev. A51, 4842 (1995).
 [4] 大竹紀夫、村山守男、平賀隆、服部峰之、本間 一弘, 特開 2004-262668 号公報
 [5] 服部峰之、平賀隆、村山守男, 特開 2003-245263 号公報
 [6] 服部峰之、平賀隆、浅沼達哉, 特開 2006-322802 号公報
 [7] T. J. Killian, Phys. Rev. 27, 578 (1926).

半導体における動的核偏極技術の開発

物質・材料研究機構ナノ計測センター¹, 科学技術振興機構さきがけ²
○後藤 敦^{1,2}, 清水 禎¹, 端健二郎¹, 大木 忍¹, 瀧澤智恵子¹

Development of dynamic nuclear polarization techniques in semiconductors

National Institute for Materials Science¹, PRESTO-Japan Science and Technology Agency²

Atsushi Goto^{1,2}, Tadashi Shimizu¹, Kenjiro Hashi¹, Shinobu Ohki¹ and Chieko Takizawa¹

We have studied polarization transfer dynamics in optically oriented nuclear spins in the semi-insulating semiconductor InP:Fe in order to examine local environments at hyperpolarized nuclei. Couplings in optically oriented nuclear spins have been revealed by the cross relaxation rates under the optical pumping condition.

[研究の背景と目的] 固体中の偏極核スピン（超偏極）はNMRや偏極中性子散乱などの先端計測・分析や原子核実験において高感度な観測プローブになるものと期待されています。また、近年では、半導体ナノ構造内の電子スピン物性（半導体スピントロニクス）の研究の進展に伴い、半導体における超偏極に注目が集まりつつあります。このような状況を背景に、私達は半導体における偏極核スピンの生成と制御のための技術開発を進めています[1]。具体的には、化合物半導体における光ポンピング法を偏極源とし、さらにNMRの手法を援用することで、目的の場所に目的の核スピンの偏極を生成する手法の開発を目指しています。

ところで、固体中の超偏極では、よく知られた気体中の超偏極とは異なった固有の興味深い現象が観測されます。これらは、固体における複雑な相互作用に起因するものと考えられています。私達は、固体の超偏極状態における相互作用の知見を得ることを目的に、化合物半導体、リン化インジウムInPにおいて、光ポンピング条件下で核スピン間の偏極移動のダイナミクスを調べました。その結果から、偏極核スピン系における相互作用の詳細が明らかとなりました[2]。

キーワード：光ポンピング、動的核偏極、化合物半導体

ごとうあつし、しみずただし、はしけんじろう、おおきしのぶ、たきざわちえこ

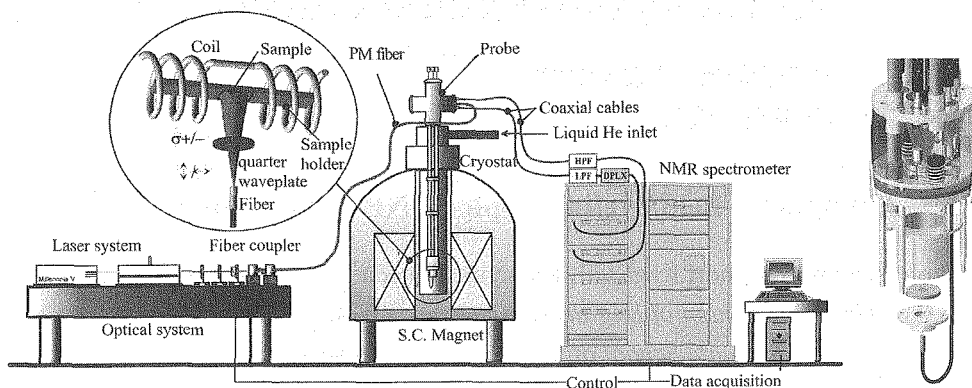


Fig. 1 System configuration (left) and the probe end (right)

[実験結果] 測定は、私達が開発したシステム（図 1）を用いて行いました[1]。試料を(100)面が磁場に垂直になるように設置し、円偏光を表面に垂直（磁場に平行）に照射した状態で、 ^{31}P - ^{115}In の交差緩和時間 T_{IS} を測定し、その結果から交差分極スペクトル密度を解析しました[2]。その結果、 InP の超偏極状態では、通常の大極子相互作用の他、電子スピンを介した kHz オーダーの間接相互作用 (J_{IS}) が存在することが明らかとなりました。また、この結果から間接相互作用の異方性についての知見も得られました。

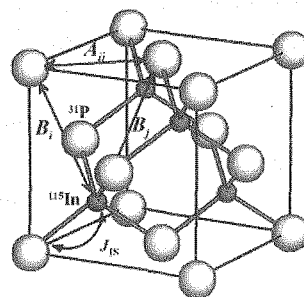


Fig. 2 Internuclear couplings in InP . A_{ij} and B_{ij} : homo- and hetero-nuclear dipolar couplings. J_{IS} : heteronuclear indirect couplings between neighboring sites.

[謝辞] 本研究実施にあたり、清水は物材機構（NIMS）国際ナノアーキテクトニクス研究拠点（文部科学省「世界トップレベル国際研究拠点形成促進プログラム」）の援助に感謝いたします。端は科学研究費補助金（日本学術振興会）の援助に感謝いたします。大木はNIMS ナノテクノロジー拠点プロジェクト（文部科学省「先端研究施設共用イノベーション創出事業」）の援助に感謝いたします。後藤はNIMS強磁場共用ステーションのサポートに感謝いたします。なお、本研究で用いたシステムの一部は平成14年度NEDO産業技術研究助成事業の援助を得て整備いたしました。

[1] A. Goto et al., Review of Scientific Instruments 77, 093904 (2006).

[2] A. Goto, et al., Physical Review B 77, 115203 (2008).

(1 阪大院基、2 京大院理)

○根来 誠¹、香川 晃徳¹、武田 和行²、北川 勝浩¹**A magnetic-field cycling triplet-DNP NMR system**○ Makoto Negoro¹, Akinori Kagawa¹, Kazuyuki Takeda², and Masahiro Kitagawa¹*Graduate School of Engineering Science, Osaka University**Graduate School of Science, Kyoto University*

Abstract: Toward NMR quantum computing with hyperpolarized nuclear spins beyond the entanglement threshold, a system has been developed enabling dynamic nuclear polarization (DNP) using electron spins in the photo-excited triplet state with X-band microwave apparatus, followed by solid-state NMR experiments using the polarized nuclear spin system. In order to perform the triplet-DNP and NMR procedures in different magnetic fields, the triplet-DNP system and the NMR system are made to be spatially separated, between which the sample can be shuttled. It is shown that the system developed in this work fulfils the requirements for solid-state NMR quantum computing with hyperpolarized nuclear spin systems according to our scenario discussed in the text.

量子計算が古典計算を凌駕するためにはエンタングルメントが必要不可欠であり、エンタングルメントを利用した真の NMR 量子計算には、超偏極核スピンを量子ビット (qubit) として用いる必要がある [1, 2]。我々は「光励起三重項電子スピンを用いた動的核偏極 (triplet-DNP)」によって核スピンを高偏極させて、NMR 量子計算に応用する方策をとっている。triplet-DNP によるアプローチは、NMR 量子計算を目指している他のグループによる「フリーラジカルを用いた動的核偏極」に比べて [3]、以下の二点で優れていると考えられる。まず一つ目は、三重項電子の寿命は有限であるので、偏極後に光励起を止めれば常磁性電子からの核スピン系へのデコヒーレンスに苦しまされないという点である。もう一つの利点は、いくつかの光励起可能な分子の三重項状態の電子スピン偏極は温度、磁場に関係なく 0.1 のオーダーであるので、ミリ波技術や極低温技術なしで目標の核スピン偏極を達成できることである。実際 triplet-DNP を用いて、光励起可能なペンタセンを少量ドープしたナフタレンの ¹H 偏極が 100K、0.3T 下で 0.7 まで向上できることが報告されている [4, 5]。NMR 量子計算では共鳴周波数の違い、すなわち、核種や化学シフトの違いでそれぞれの核スピンを別の qubit として区別する。0.3T という磁場は triplet-DNP が非常に良く確立されている磁場ではあるが、量子計算の観点からはより多くの qubit を確保するため出来るだけ高磁場であることが望まれる。

Key Word: triplet-DNP, solid-state NMR quantum computing, DNP, field-cycling, entanglement

ねごろまこと、かがわあきのり、たけだかずゆき、きたがわまさひろ

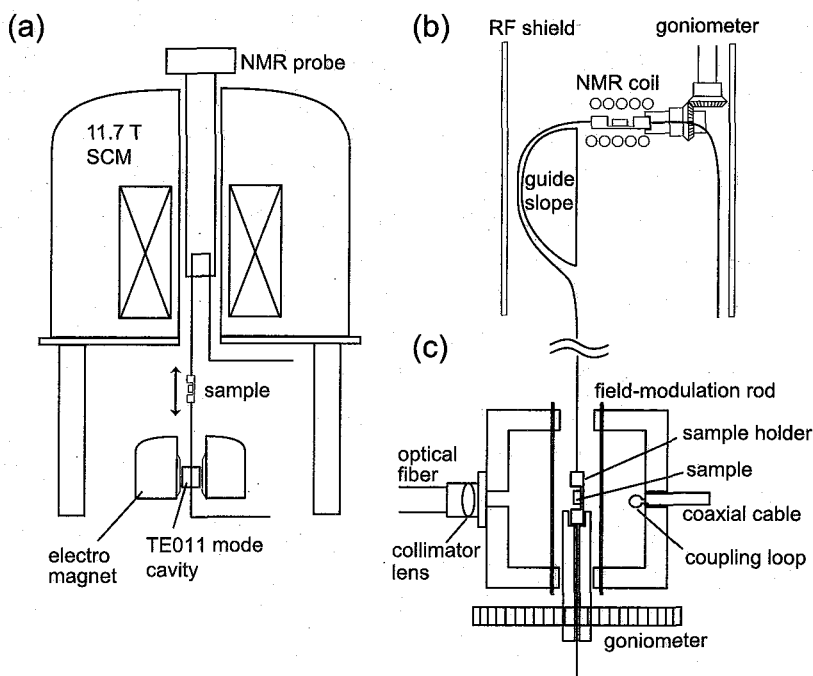


図 1: (a) Schematic diagram of a field-cycling triplet-DNP NMR system. The sample is to be shuttled between the high magnetic field (11.7 T) in a superconducting magnet (SCM) and the low field (~ 0.3 T) in an electromagnet. The system is thermally insulated with a vacuum double-layered tube (not shown in the figure), and the sample can be cooled with nitrogen gas flow. In the high field, the sample moves along a guide slope toward inside the NMR coil until the sample holder is docked with the goniometer, as described in (b). In the low field, a TE011 mode X-band cavity is employed as described in (c), and a laser beam and X-band microwave irradiations can be applied together with magnetic field sweep by means of a quadrupole coil which is composed of four field-modulation rods. The sample holder can also be docked with the goniometer assembled with the cavity.

そこで本研究では図 1 に示す、低磁場で triplet-DNP を行った後サンプルを高磁場にシャトルし、高磁場で量子計算、NMR 観測を行える磁場循環 triplet-DNP NMR システムを開発した。スプリット電磁石に置かれた図 1(c) に示すキャビティー中で triplet-DNP が行われる。このキャビティーの共振周波数は 9.065GHz (X バンド) で、レーザー照射用の窓が取り付けられている。triplet-DNP において最も効率の良い電子-核間の偏極移動メカニズムであると報告されている ICP(Integrated Cross Polarization) を行うために、磁場スイープのためのコイルも内装されている [4, 5, 6]。三重項状態の電子スピン偏極はサンプルの磁場に対する角度に大きく依存するので [7]、ゴニオメーターでサンプルの角度を調節可能にしてある。また、スピン格子緩和を抑制するために冷却窒素ガスフローでサンプルの温度を下げるができるようになっている。triplet-DNP で十分な偏極が達成された後、サンプルホルダーにつけられた紐を引っ張って図 1(b) に示す直上の 11.7T の超伝導磁石内の NMR プローブへとシャトルされる。シャトルにかかる時間は約 5 秒で、この間に磁化がほとんど緩和しないことは確認済みである。また、サンプルの

急激な温度変化はサンプルの質を著しく低下させるので、サンプルの通り道、NMRプローブも冷却窒素ガスが充満するようになっている。サンプルをある程度重水素化すれば熱容量が低くなるので早く偏極することが知られている [8]。ただし ^2H 核は ^{13}C 観測時に線幅の原因となるため、 ^2H デカップルが必要となる。よって我々は、500MHz(^1H)、125MHz(^{13}C)、76MHz(^2H)の三重共振回路を製作した。300Wのパワーアンプを用いて、それぞれのチャンネルで130kHz、110kHz、55kHzの強度のラジオ波照射が可能である。

開発した系の性能を確かめるために三つの実験を行った。まず、濃度0.01mol%でペンタセンをドーブしたナフタレン単結晶試料で ^1H の高偏極化を確認した。0.2958T、203K下において50Hzで90分間ICPを繰り返した後に11.7Tにシャトルして得られたスペクトルを図2に示す。熱平衡状態の信号強度と比較すると、偏極率は0.11であると見積もられる。これは0.2958T(11.7T)、203K下の熱平衡状態の ^1H 偏極のおよそ74000(1900)倍になる。次に、同じサンプルを用いて天然存在 ^{13}C の高偏極化を行った。図3(a)-(d)はゴニオメーターで角度を30度ずつ変えて測定した ^{13}C の交差偏極(CP)スペクトルで、図3(e)は再び図3(a)の角度に戻して測定したものであり、シャトルを何度も繰り返しても角度の再現性が保たれていることを示して

いる。最後に、99.4%の割合で ^2H 重水素化されたナフタレンに0.01mol%の濃度でペンタセンをドーブした単結晶試料において、0.6%の存在比で残留する ^1H の偏極をtriplet-DNPにより飛躍的に増大させた後、NMR測定を行った。図4(b)に示すように、 ^1H - ^1H 間の双極子相互作用が弱いために図2(a)の重水素化していない試料のスペクトルと比べて、線幅は1桁程度狭くなった。この場合、線幅の主な要因は ^1H - ^2H 間の双極子相互作用であり、 ^2H デカップリングを施すことによって、スペクトルはさらに先鋭化した(図4(a))。

我々は今回磁場循環 triplet-DNP ^1H - ^{13}C - ^2H 三重共鳴固体 NMR システムを開発した。この装置を使えば、ペンタセンドープ99.4% ^2H ナフタレンに1- ^{13}C ナフタレンをドーブした系を用い、 ^1H デカップリングや ^2H デカップリングを行うことで、 ^1H - ^{13}C の2qubit系でエンタングルメントを利用した真のNMR量子計算が行えると考えている [9]。残念ながら図3に示すように、ナフタレンは分子構造の対称性が高いため、複数の ^{13}C を化学シフトの違いで識別することが難しい。そこで我々は現在、より多qubitの量子計算を目指し、化学シフトの違いが大きい別の分子をペンタセンドープ ^2H ナフタレンにドーブする方法を研究している。本研究で開発した装置は高偏極化された固体核スピン系の高精度量子操作、高分解能NMR分光を可能にするまったく新しい装置である。我々はこの装置をNMR量子計算以外の実験以外にも応用できないかを模索している。

本研究は日本科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業の援助を受けて行われた。

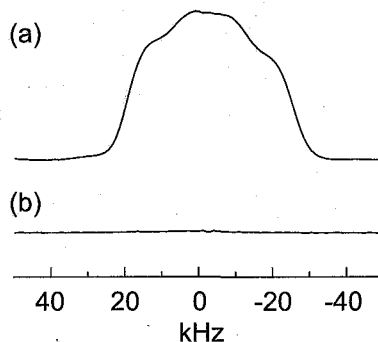


図2: ^1H NMR spectra obtained (a) after repeating the ICP sequences at a rate of 50 Hz for 90 minutes, and (b) without the ICP sequence.

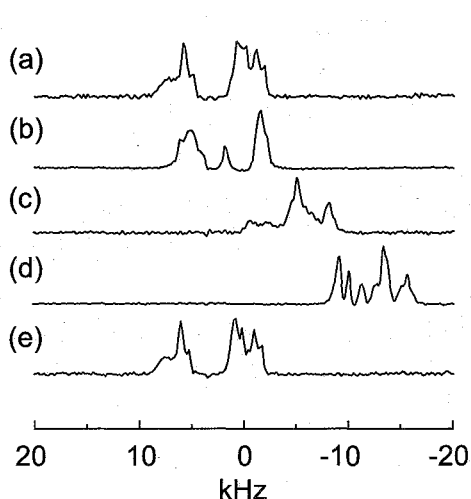


図 3: Enhanced natural-abundance ^{13}C CP spectra in single crystal of pentacene-doped naphthalene under ^1H decoupling. The relative goniometer angles in (b)-(d) with respect to that in (a) were 30, 60, and 90 degrees. The spectrum shown in (e) was measured after obtaining the spectra in (a)-(d) by restoring the goniometer angle to that used for (a).

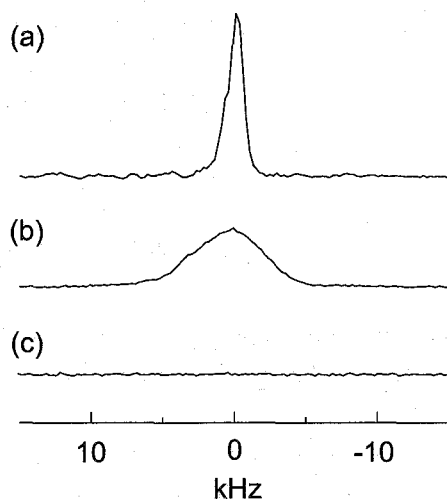


図 4: Polarized residual ^1H NMR spectra (a) with and (b) without double-quantum ^2H decoupling. For comparison, the spectrum without triple-DNP is shown in (c).

References

- [1] S. L. Braunstein, C. M. Caves, R. Jozsa, N. Linden, S. Popescu and R. Schack, *Phys. Rev. Lett.* **83**, 1054 (1999).
- [2] R. Rahimi, K. Takeda, M. Ozawa and M. Kitagawa, *J. Phys. A: Math. Gen.* **39**, 2151 (2006).
- [3] H. J. Cho, J. Baugh, C. A. Ryan, D. G. Cory and C. Ramanathan, *J. Magn. Res.* **187**, 242 (2007).
- [4] K. Takeda, K. Takegoshi and T. Terao, *J. Phys. Soc. Japan* **73**, 2313 (2004).
- [5] K. Takeda, K. Takegoshi and T. Terao, *J. Phys. Soc. Japan* **73**, 2319 (2004).
- [6] A. Henstra, T.-S. Lin, J. Schmidt and W.Th. Wenckebach, *Chem. Phys. Lett.* **165**, 6 (1990).
- [7] D. J. Sloop, T.-L. YU, T.-S. Lin and S. I. Weissman, *J. Chem. Phys.* **75**, 1746 (1981).
- [8] A. Kagawa, Y. Murokawa, K. Takeda and M. Kitagawa,
 “部分的重水素を用いたプロトンスピン拡散速度の制御による DNP 効率の最適化”,
 poster session
- [9] M. Negoro, S. Yamanaka, A. Kagawa, K. Takeda, and M. Kitagawa, in *Proceedings of the 8th International Conference on Quantum Communication, Measurement and Computing*, 137-140 (2006).

PDB への登録サポートサイト; PDBj-BMRB Website

¹大阪大学蛋白質研究所 ²科学技術振興機構-BIRD○原野陽子¹ 中谷英一^{1,2} 中村春木¹ 阿久津秀雄¹ 藤原敏道¹

Data deposition supporting website at Osaka for Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) and Protein Data Bank (PDB)

¹ Institute for Protein Research, Osaka University² Japan Science and Technology Agency - BIRD○Yoko Harano¹, Eiichi Nakatani^{1,2}, Haruki Nakamura¹, Hideo Akutsu¹, Toshimichi Fujiwara¹

BMRB and PDB are international databases for NMR experimental and structural data derived from NMR, X-ray and electron microscopy investigations of biological macromolecules. Especially, a new single web interface allows depositing the NMR data to both BMRB and PDB. PDBj-BMRB (Protein Data Bank Japan, Osaka) works for supporting that these databases become more convenient for researchers in Asia and Oceania. In this poster, we would like to present new and updated contents of our website for supporting data deposition this year.

BMRB と PDB は共に国際的生体高分子データベースであり、化学シフト等の NMR 実験データ、X 線・NMR・電子顕微鏡実験から解析された構造データを其々取り扱っている。特に、生体高分子 NMR 研究の分野において共通する為、NMR 実験データ・NMR 構造データの一括登録サイト ADIT-NMR が昨年公開された。

PDBj-BMRB グループは、大阪大学蛋白質研究所に拠点を置き、アジア・オセアニア地域の NMR 研究者に BMRB がより利用しやすくなるようなシステムの構築に取り組んでいる。特にこの 1 年は、当グループが独自に運営している ADIT-NMR 登録サポートサイト[Fig.1] の充実化に重点をおいて取り組んできた。

生体高分子データベース、NMR、BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank)、PDB (Protein Data Bank)、PDBj (Protein Data Bank Japan)

はらのようこ、なかたにえいいち、なかむらはるき、あくつひでお、ふじわらとしみち

主な追加・更新コンテンツは次のとおりである。

- ADIT-NMR 操作説明書の更新
- ADIT-NMR 入力項目説明書の BMRB 項目更新と PDB 項目追加
- BMRB が提供している登録データファイル作成ソフトの操作説明書の更新
- 登録に関係のある PDB、BMRB からの最新注意事項のお知らせ
- BMRB データベースの利用統計の公開
- サイトの多言語化(英語版、日本語版、韓国語版、簡体・繁体中国語版)

The screenshot shows the PDBj-BMRB website interface. At the top, there are navigation links for 'HOME', 'BMRBサイト', '登録サイト', '登録の手引き', and 'お問い合わせ'. The main header features the PDBj logo and the text '日本語 English 日本語 简体中文 繁體中文'. Below this is the BMRB logo and 'at Osaka Site' with the tagline 'A Repository for Data from NMR Spectroscopy on Proteins, Peptides, and Nucleic Acids'. The main content area is titled 'PDBj-BMRB Website' and contains several sections: 'BMRB Database', 'Data Deposition', and 'Dep Manual'. On the right side, there are sections for 'お知らせ' (News), '配布資料' (Distribution Materials), '利用統計' (Usage Statistics), and '更新履歴' (Update History). Annotations with arrows point to these sections from the right side of the image.

← Multilingual sites for Asian

← ADIT-NMR for BMRB and PDB deposition

← News

← Manuals for data deposition

- Overview of deposition
- Overview of ADIT-NMR
- Tutorial for input of ADIT-NMR

← Statistics for usage of PDBj-BMRB

URL: <http://bmrbddep.protein.osaka-u.ac.jp/>

Fig.1 PDBj-BMRB website for supporting data deposition

本発表では、このサポートサイトの追加・更新コンテンツ、および BMRB データベースの最新利用統計について紹介する。

Contribution of nuclear magnetism in levitating objects by the magneto-Archimedes effect

Kazuyuki Takeda²

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

ABSTRACT: The role of the nuclear magnetization in a diamagnetic body levitating by the magneto-Archimedes effect is investigated. A correction is given to the original equation describing the magneto-Archimedes levitation condition by taking account of nuclear magnetic susceptibility, which has not been considered so far. This work predicts that the force acting on the nuclear spins can make a discernible, macroscopic kinetic effect in the levitating body, when the nuclear magnetization is manipulated by the established NMR technology. An experimental setup developed to confirm this prediction is also presented together with a demonstration of the magneto-Archimedes levitation inside an NMR magnet.

1. Introduction

A diamagnetic body such as a droplet of water has, by its very definition, negative magnetic susceptibility. In the presence of a magnetic field, a force acts on the diamagnetic body when the scale of the magnetic-field inhomogeneity is larger than the size of the body. This effect of the diamagnetic force is to push the body out of the magnet. In the upper region of the bore of a vertical superconducting magnet, the diamagnetic force is against the gravitational force. These forces balance when the magnetic field times the magnetic-field gradient equals to $1400 \text{ T}^2 \text{ m}^{-1}$. Then the water droplet is known to stay floating in the air[1], forming a spherical shape like that in an agravic spacecraft. Diamagnetic levitation of a frog[2] and an apple[3] have also been demonstrated.

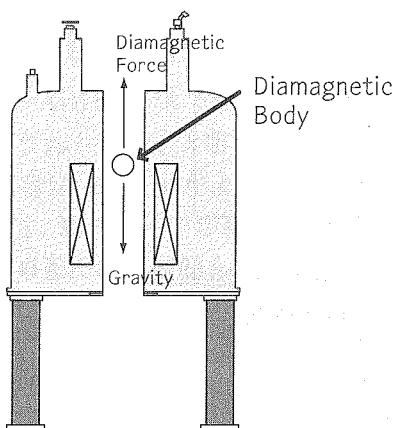


Fig. 1. A cartoon drawn to explain that a diamagnetic object can levitate inside a vertical superconducting magnet when the diamagnetic force cancels the gravitational pull toward the earth.

¹Key Words: 磁気浮上、磁気アルキメデス効果、核磁化

²たけだ かずゆき

2. Magneto-Archimedes levitation

Unfortunately the condition $1400 \text{ T}^2 \text{ m}^{-1}$ is so demanding that only a few institutes in the world having very strong magnets can demonstrate diamagnetic levitation. Nevertheless, levitation is also possible in more popularly used, less strong magnets by introducing paramagnetic medium like oxygen gas[4], which has a tendency of, in contrast to the diamagnetic material, being attracted toward inside the magnet. As the oxygen gas is dragged into the magnet, its density gradient becomes so strong that the buoyant force is significantly enhanced according to the Archimedes' principle, which states that the buoyancy is given by the weight of the medium pushed away by the body. In this case, when the condition

$$[(\chi_w + \chi_a)/\mu_0]B(z_0)\frac{dB(z_0)}{dz} = (\rho_w - \rho_a)g - \rho_w g \quad (1)$$

is satisfied, the body, e.g., a water droplet, stays floating in the air at the position z_0 that fulfills Eq. (1). Here, χ_w and χ_a are the susceptibilities of water and oxygen gas, and ρ_w and ρ_a are their densities. $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ H m}^{-1}$ and $g = 9.8 \text{ m s}^{-2}$ are the permeability of vacuum and the acceleration of gravity. The static magnetic field B is assumed to be axially symmetric about the z axis. For example, at room temperature and atmospheric pressure, $\chi_w = 9.0 \cdot 10^{-6}$ and $\chi_a = 1.8 \cdot 10^{-6}$. Then, according to Eq. (1), the levitation condition is obtained as $B(dB/dz) = 1140 \text{ T}^2 \text{ m}^{-1}$. The requirement on the magnetic field becomes less demanding as increasing the pressure of the oxygen gas. At 10 atm, χ_a is 10 times that at 1 atm, so that the levitation condition reduces to $B(dB/dz) = 455 \text{ T}^2 \text{ m}^{-1}$. Magnetic enhancement of the buoyant force in the paramagnetic media is known as the magneto-Archimedes effect[4].

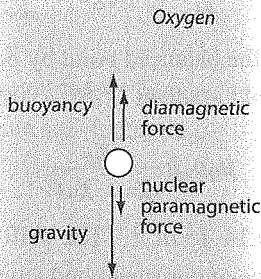


Fig. 2. The balance of forces due to gravity, diamagnetic force, buoyancy, and nuclear paramagnetic force.

3. Don't disregard the nuclear magnetism!

This work addresses *previously unconsidered* contribution of the nuclear magnetization in the magnetically levitating bodies. To be specific, let us consider the proton magnetization in water levitating by the magneto-Archimedes effect. Assuming that the proton spin system is in thermal equilibrium

at room temperature, its susceptibility χ_p is given by

$$\chi_p = \frac{\mu_0 \rho \gamma^2 \hbar^2 I(I+1)}{3kT} = 4 \cdot 10^{-9}, \quad (2)$$

where $\rho = 6.7 \cdot 10^{28} \text{ m}^{-3}$ is the density of the protons in water, $\gamma = 2\pi \cdot 4.26 \cdot 10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$ is the gyromagnetic ratio, and $I = 1/2$. Taking account of the nuclear paramagnetism, the author suggests to correct Eq. (1) as

$$[(\chi_w - \chi_a + \chi_p)/\mu_0]B(z_0) \frac{dB(z_0)}{dz} = \rho_w g. \quad (3)$$

That is, in the floating body there should be a balance of forces due to the nuclear paramagnetic force as well as the gravity, the diamagnetic force, and the buoyancy, as described in Fig. 2.

4. How to detect the contribution of the nuclear magnetism?

In order to verify whether the nuclear paramagnetism does really in fact have a discernible effect on the balance of forces, the author proposes an experiment exploiting the unique feature of the nuclear magnetism; the nuclear magnetization can be *manipulated* by the established NMR technology. The idea is to manipulate the proton magnetization by applying resonant rf pulses at the levitating object, and to observe the motion of the body with a CCD camera placed beside the body, as described in Fig. 3(a). When the proton susceptibility χ_p is modulated by the resonant rf irradiation, the body is expected to shift its position so as to fulfill the balance of forces given by Eq. (3). Thus, the contribution of the proton spins to the levitation condition can be observed through the position of the body. Let us now consider that the sign of the proton susceptibility χ_p is inverted by applying a π pulse or adiabatic inversion. Then the point z'_0 of the balanced forces would be such that

$$[(\chi_w - \chi_a - \chi_p)/\mu_0]B(z'_0) \frac{dB(z'_0)}{dz} = \rho_w g. \quad (4)$$

Thus, the effect of the spin inversion would be to shift the balanced point by $\delta z = z'_0 - z_0$. In order to estimate the shift δz , we note that the field times the field gradient $B(dB/dz)$ should shift by

$$B(z'_0) \frac{dB(z'_0)}{dz} - B(z_0) \frac{dB(z_0)}{dz} = \mu_0 \rho_w g \frac{2\chi_p}{(\chi_w - \chi_a)^2}, \quad (5)$$

which is, when the oxygen pressure is 10 atm, ca. $0.14 \text{ T}^2 \text{ m}^{-1}$. The shift δz one would expect depends on the field profile of the magnet in use. For one of our superconducting magnets (a JASTEC wide-bore 14 T magnet), δz is estimated to be on the order of $10 \text{ } \mu\text{m}$, which is rather small but not impossible to observe.

Moreover, the kinetic motion of the body could be enhanced by *mechanical resonance* by applying successive spin inversions in synchronous with the characteristic oscillation of the levitating body around the balanced point. In fact, it was observed that levitating bodies by the magneto-Archimedes effect bobbed up and down upon perturbations such as slight and sudden change of the oxygen pressure. For the case of a piece of Delaware grape shown in Fig. 3(b), the body was found to oscillate with a period of several hundred milliseconds. The characteristic frequency of the mechanical resonance can be derived by approximating $B(dB/dz)$ by a linear function in the vicinity of the balanced

point z_0 , i.e., $B(dB/dz) = a(z - z_0)$. Then, the Newton's equation of motion is reduced to that of a harmonic oscillator, from which the characteristic frequency f_c is obtained as

$$f_c = \sqrt{\frac{a|\chi_w - \chi_a|}{\mu_0 \rho_w}}. \quad (6)$$

Since the juicy Delaware grape is composed almost of water, its susceptibility and density were approximated by those of water. Then, using $a = 8000 \text{ T}^2 \text{ m}^{-2}$ for our case, the period of oscillation (the inverse of the characteristic frequency f_c) was calculated to be $\approx 800 \text{ ms}$, which is quite consistent with what was observed.

The experimental examination of whether the nuclear spins can really "shake" a macroscopic body is in progress, and will be presented elsewhere.

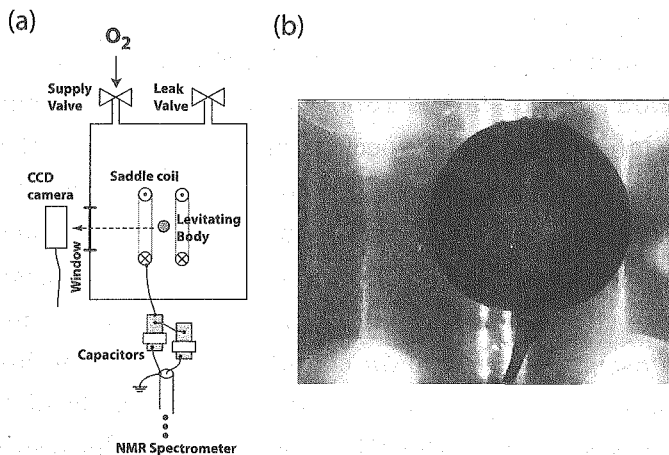


Fig. 3. (a) An experimental setup to be placed inside the bore of a vertical superconducting magnet. (b) A piece of Delaware grape floating inside a 14 T superconducting magnet at 0.3 m above the magnet center. The bore was filled with oxygen gas with a pressure of 0.72 MPa. The white spots at the corners of the frame are due to illumination LEDs placed inside the dark bore.

Acknowledgment

This work has been supported by Grant-in-Aid for Young Scientists (A) of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

References

- [1] M. Tagami, M. Hamai, I. Mori, K. Watanabe and M. Motokawa, *J. Cryst. Growth* **203**, 594 (1999).
- [2] M.V. Berry and A.K. Geim, *Eur. J. Phys.* **18**, 307 (1997).
- [3] I. Mogi, K. Takahashi, S. Awaji, K. Watanabe and M. Motokawa, *J. Phys.: Conference Series* **51**, 431 (2006).
- [4] Y. Ikezoe, N. Hirota, J. Nakagawa and K. Kitazawa, *Nature* **393**, 749 (1998).

解析手法の検討

(日本電子(株)・応用研究グループ¹、長岡技術科学大学工学部物質・材料系²)

○櫻井智司¹、内海博明¹、河原成元²

Investigation of analysis for vulcanized natural rubber by
inverse measurements with FG-MAS probe
(Application & Research Group, JEOL Ltd.¹,
Department of Chemistry, Nagaoka University of Technology²)
Satoshi Sakurai¹, Hiroaki Utsumi¹, Seiichi Kawahara²

Analysis of crosslinking junctions of crosslinked rubber samples has been made through solid-, solution- and latex-state NMR spectroscopies up to date. If we apply ordinary pulse techniques of solution-state NMR spectroscopy under MAS, it is possible to positively analyze the crosslinking junctions, more exactly, because the rubber samples have high mobility. In this case, the analysis through inverse measurements are quite effective to shorten a time for the measurement. However, because the signals assigned to the main chains are too big, the huge correlation signals of the main peaks interfere with the small signals of the crosslinking junctions under a resolution of the ¹H observation. In the present study, an attempt to analyze the crosslinking junctions of the rubber samples was made by solution-state NMR spectroscopy under MAS with selective neglect of the main correlation signals.

【緒言】ゴム試料に関しては、これまで固体NMRでの解析や、ラテックス状態の溶液NMRによる解析結果が報告されている¹⁾。多くのゴム試料は運動性が高いため、高速MAS下では通常溶液NMRで使用されている測定手法を用いることが可能であり、特にインバース測定による解析は時間短縮に有効であると考えられる。しかしながら、ゴム試料では主鎖由来の信号が側鎖由来の信号に比べ大き過ぎるために、¹H観測の分離能ではメインピークの巨大な相関信号が邪魔になる。そこでメインの相関信号を¹³C選択波形パルスを用いることによってセレクトアウトすることにより、微細構造由来の解析が可能であるかを検討した。

キーワード：ゴム、FG-MAS、インバース測定

さくらいさとし、うつみひろあき、かわはらせいいち

【実験】測定はJNM-ECA600で行い、プローブには4mm ϕ FG-MASプローブを使用した。試料には架橋密度 1.36×10^{-4} mol/cm³の加硫天然ゴムを使用し、試料の中心に約1mm ϕ の穴を開け、その空間にLock溶媒としてD₂O溶媒を加えた。その状態でNMR Lockを掛け、試料回転速度17kHzで、¹H、¹³C、¹³C-DEPT、yselect ¹H-¹³C HMQCを測定した。yselect ¹H-¹³C HMQCは¹³C核側の最後の90度パルスを変形パルス(EBURP)に変更したシーケンスを作成して用いた (Fig. 1)。

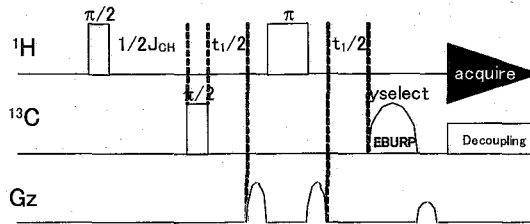


Fig. 1 Pulse Sequence of yselect ¹H-¹³C HMQC

【結果】¹³C側の選択波形パルスを使用して、メイン信号由来の相関ピークをセレクトアウトすることにより、インバース測定による架橋構造由来の相関信号を観測することができた。

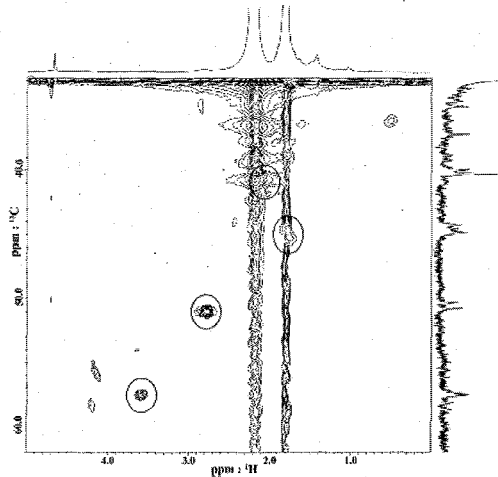


Fig. 2 yselect ¹H-¹³C HMQC spectrum

【考察】FG-MASを用いることにより、メイン信号由来の相関ピークをセレクトアウトしたインバース測定による解析が可能になり、従来よりの¹³C観測手法に比べ時間短縮を行うことができた。ただし、メインピークに近い相関信号を解析するためにはまだ十分ではなく、更なる改善が必要であると思われる。

1. 日本ゴム協会誌、河原成元、第79巻、第10号(2006) p.487-493

大阪大学大学院 基礎工学研究科
○東馬 真矢、糸崎 秀夫、安田 大輔

Non-contact detection of TNT by Nuclear Quadrupole Resonance
Graduate School of Science Engineering, Osaka University
Shinya Toma, Hideo Itozaki, Daisuke Yasuda

Abstract

In the Nuclear Quadrupole Resonance (NQR), detecting TNT which is included in explosives is one of the most important subject. TNT signal has so long T_1 and so short T_2^* relaxation time that it is difficult to detect quickly. In this paper, we considered TNT detection techniques, Q-damping, multi-pulse sequence SLSE, and antenna. Q-damper enables to detect short T_2^* materials. SLSE is effective to long T_1 materials. As a result, we can detect TNT located in 4cm of the antenna.

本文

核四極共鳴(Nuclear Quadrupole Resonance: NQR)は化学物質を直接探知できる技術である。多くの爆発物や不正薬物は、その窒素核 ^{14}N が NQR 反応を起こすため、地雷探知やテロ対策の分野への応用が期待されている。

NQR はある一定の共鳴周波数を持った電波を物質に照射することで核スピンの励起を行い、その緩和の過程を計測する方法である。この共鳴周波数は、物質の電場勾配によって決定される。この電場勾配は物質の構造に依存するため、物質固有である。そのため、共鳴周波数の違いによって物質の同定が可能となる。NQR は物質が持つ電場勾配を利用するため、NMR のように事前にスピンの整列を行う必要がないため強磁場を照射する必要がない。

NQR において、重要な課題のひとつが爆発物である TNT の探知である。TNT は、700kHz から 900kHz の低周波数に複数の共鳴周波数を持つ。また物性としては、縦緩和時間(T_1)が約 3s と非常に長く、横緩和時間(T_2^*)は 300~600 μs と非常に短い。 T_1 が計測時間に、 T_2^* が信号発生時間に影響を与えることを考えると、TNT は短時間で積算の回数を増やすことが困難であるといえる。このことは、地雷探知や手荷物検査といった非接触検知をする際には大きな問題となってくる。

非接触検知を短時間に行うために、次に示す課題の研究とその結果を報告する。

キーワード：NQR、核四極共鳴、TNT

著者ふりがな：とうま しんや

1. Q-damper の使用による送信信号の残留成分の低減

700kHz から 900kHz のパルスを照射すると、送信信号の残留成分により NQR 信号を受信するまでの時間が長くなる問題がある。この問題を解決するために、Q-damper 回路を用いた。この回路は送信パルス終了と同時に動作し、一時的にアンテナの Q 値を低下させることが可能である。これにより送信信号の残留成分を大幅に減らし、速いタイミングで強い信号を得ることが可能となった。

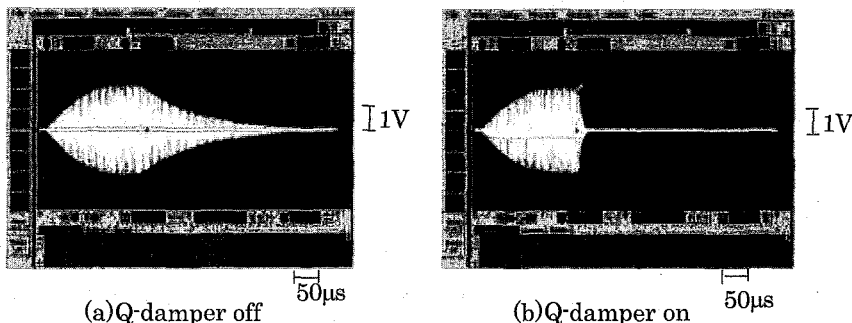


Fig.1: Transmitting pulse shapes:(a)Q-damper off, (b)Q-damper on while trigger pulse

2. マルチパルスシーケンスの検討による高感度化

1 回の励起で複数回の積算が可能となるマルチパルスシーケンスである、Spin-Locking Spin-Echo (SLSE: $\theta_0 - (\tau - \theta_{90} - \tau -)_n$) による検討を行った。SLSE は T_1 が長い物質に適したシーケンスであり、励起後に拡散していく核スピンを何度も再結合させ、その過程で発生するエコー信号を観測する方法である。これにより、同一時間における積算回数を 100 倍以上にすることが可能となった。

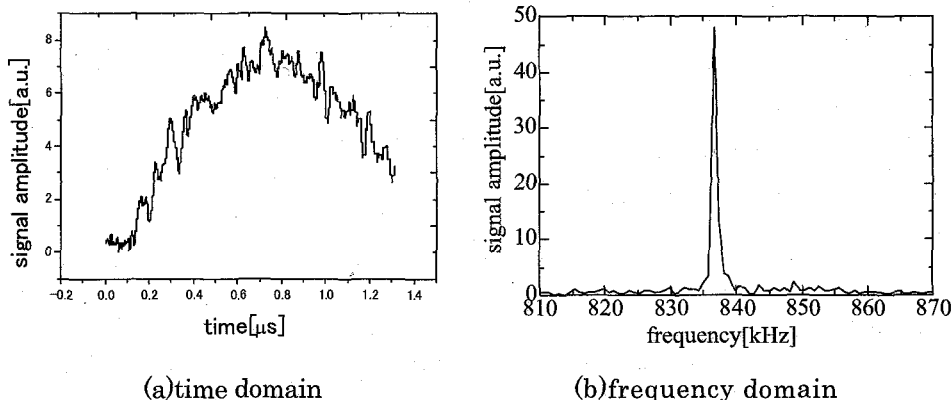


Fig.2: The SLSE signal from TNT(837kHz), $\tau = 0.8\text{ms}$, scan number 40000

Q-damper の使用と SLSE の併用により TNT の信号計測を短時間で行うことが可能となった。またアンテナと周辺回路の改良によって高電力投入を可能にし、240g の TNT サンプルの 4cm までの非接触検知に成功した。

産業技術総合研究所 計測標準研究部門

○鍋島真美、山路俊樹、衣笠晋一、齋藤剛

SDBS-NMR Our activities on a high reliable data-construction

National Metrology Institute of Japan (NMIJ), AIST

Mami Nabeshima, Toshiki Yamaji, Shinichi Kinugasa, Takeshi Saito

We have been constructing a highly reliable NMR database of SDBS (Spectral Database for Organic Compounds, SDBS-NMR) open freely through AIST's web site. SDBS-NMR has following characteristics. We accumulate high quality NMR spectra, which are measured and evaluated by ourselves. Chemical structures for the spectra with their chemical shift assignments are also provided. We analyze DEPT, HMBC and other spectra for supporting accurate NMR assignments. We also take into account concentration of the solutions for keeping the best NMR measurement conditions. The number of accesses to SDBS-NMR is more than a half of all SDBS accesses, which exceeds a hundred thousand accesses a day.

【はじめに】

SDBS(有機化合物のスペクトルデータベース)は、産総研が Web を通して無料公開している、一つの化合物に対し 6 種類(MS、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、IR、Raman および ESR)のスペクトルを有するスペクトルデータベースである(SDBS-Web)。SDBS-Web は、2007 年度 1 日平均 10 万件以上のアクセスがあり、アクセス数は年々増加の傾向にある。SDBS-NMR は、この中の NMR のスペクトルデータベースである。多岐にわたる種類の有機化合物の ^1H NMR、 ^{13}C NMR の溶液 NMR スペクトルを集積し、それらのスペクトル画像・ピーク及びシフトリスト・帰属情報を付与した構造式画像を公開している。

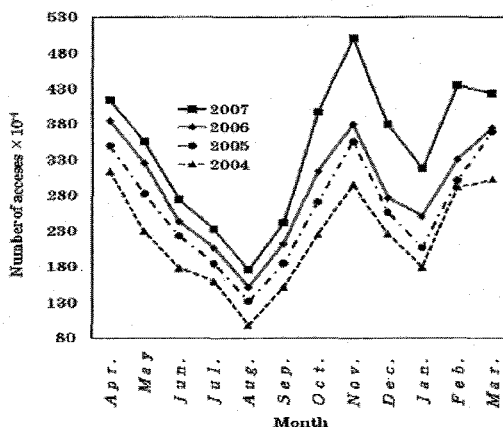


Figure 1. Monthly accumulated accesses for SDBS-Web during the last four years.

キーワード: SDBS 溶液 NMR データベース構築 信頼性 Web

なべしま まみ、やまじ としき、きぬがさ しんいち、さいとう たけし

【SDBS-NMR の特徴】

ここに収録した一つ一つの NMR スペクトルの特徴は、

- ・ 正確な化学シフトと定量性を確保している点
- ・ 独自に測定した高分解能なデータから構築している点
- ・ 得られた測定データを精査選定している点
- ・ 構造式に帰属を付与している点

である。Web に公開する為のスペクトルは、化合物ごとに最適な調製を行った溶液で測定している。代表的な測定条件は表 1 に示した。この条件下では、磁場のシム条件がスペクトルの分解能に大きな影響を与えるので、良好な測定条件での測定を行っていることを常に確認している。公開する為のスペクトルは、以下の条件を満たすことを最低限の原則としている。すなわち ^1H NMR の TMS ピークが、窓関数無しでプロセスして半値幅 0.5 Hz 以下であり、かつ TMS の ^{29}Si サテライトのピーク高さの位置でピーク幅が 3 Hz 以下であることである。

Table 1. Typical conditions on SDBS-NMR measurements.

	^1H NMR	^{13}C NMR
Spectral Width	4000 Hz	20 253 Hz
Acquisition Time	16.38 s	3.23 s
Relaxation Delay	13.72 s	2.75 s
Scan Times	32	1000

【SDBS-NMR の取組み】

SDBS-NMR では、常に信頼性の高いスペクトルを公開するために、以下の点を配慮した作業を行っている。

- ① 化学シフトの基準を TMS としている(重水溶媒の場合は TSP を TMS に換算)、
- ② 測定温度を一定(30°C)にしている、
- ③ 必要に応じて表 1 で示した観測幅を広げる、
- ④ 調製濃度をなるべく一定にしている。

これらに加え、特に ^{13}C NMR では必要に応じて、積算回数を増したり、遅延時間を長くしたりすることで、感度の良くない信号もしっかりとピークとして認識ができるようにしている。

さらに Web には公開しないが、DEPT・HMQC・HMBC 等の測定及び解析を行い、帰属の正確さを確保している。以上のような、厳密な条件下で、調製・測定・解析を行い、スペクトルの精度と正確な帰属を維持し、その結果としての高い信頼性を得ている。

【終わりに】

上に述べたような、日々の努力の積み重ねが、SDBS-Web 全体のアクセスのうち半数以上に上る NMR を支えている。溶液 NMR スペクトルの利便性・有用性は周知のことである。それがさらに多くのユーザーから信頼支持され活用されるために、高品質のスペクトルを集積したデータベース構築を継続しなければならない。ユーザーの声に耳を傾けることで即応性を備え、時代のニーズを常に感じとりながら、世界に正確で適格な化合物スペクトル情報の発信が行えるよう、発展させていく計画である。

大阪大学大学院基礎工学研究科

○稲垣大介、宋宇光、東馬真矢、安田大輔、糸崎秀夫

NQR Frequency Identification of Alkaloid

Graduate School of Science Engineering, Osaka University

Daisuke Inagaki, Yuguang Song, Shinya Toma, Daisuke Yasuda,

Hideo Itozaki

NQR frequencies of norephedrine are identified experimentally with referring to quantum chemical simulation. Their frequencies are 3.088MHz and 3.092MHz, which correspond to l-norephedrine and d-norephedrine respectively. Quantum chemical simulations support to determine search frequency region in the experiment. 6-31+G(d) basis function and DFT are used in this simulation.

序論

NQR 周波数は原子核周辺の電場勾配に依存する。分子によって電場勾配は異なるため、NQR 周波数も分子ごとに違う数値となるので、NQR を用いることで分子の特定が可能となる。アルカロイド系分子を始めとして、NQR 周波数が調べられていない物質が多く存在し、効率的に NQR 周波数のデータを収集することが課題となっている。

本研究では、アルカロイド系分子であるノルエフェドリンに注目し、量子化学計算とその結果に基づく実験によって、NQR 周波数の同定を試み、NQR 周波数を求めることができた。

計算

量子化学計算は Gaussian 03 を用いて行った。短時間で精度よく構造計算をするために、本実験では DFT(PBE1PBE)を用い、6-31G+(d)の基底系によって構造最適化を行った。

キーワード：NQR、量子化学計算、アルカロイド

著者ふりがな：いながき だいすけ

DFT は全エネルギーが最小になるように電子密度を決定して同時に系のエネルギーも見積もる方法であり、汎関数には経験的な側面があるものの、Hartree-Fock 法や 2 次の摂動法を用いた計算より精度よく、しかも低コストで計算ができる。また、基底系である 6-31G+(d) は、それぞれの原子価に二つの基底関数を持ち、水素以外の原子に d 関数および diffuse 関数を考慮に入れたものとなっている。

構造最適化の後、核スピンの電場勾配テンソルを計算し、NQR 周波数の予測を行う。本研究では ^{14}N 原子核の NQR を用いるため、 ^{14}N 周辺の構造が似ている分子による NQR 周波数の計算予測値と実験値の計算誤差は同程度になるものと考えられる。そこで、本研究では NQR に用いる ^{14}N 原子周辺の構造がノルエフェドリンに類似し、かつ NQR 周波数が判明している分子としてイソプロピルアミン、テトラブチルアミンを選択し、ノルエフェドリンの NQR 周波数予測値と実測値の計算誤差を推定する基準とした。また、ノルエフェドリンの構造異性体であるノルプソイドエフェドリンについても計算を行った。

実験

計算により得られた結果をもとに、絞り込まれた周波数域に対し実験を行った。本研究ではノルエフェドリン 25g が入った未開封の瓶を試薬とし、直径 5cm、高さ 5cm の厚紙の筒に直径 0.5mm のリッツ線を 10 回巻いたコイルを使用した。照射パルスは磁場強度 0.0073T、パルスの幅を 100 μs 、間隔を 100ms とした。単一のパルスを照射することによる励起で得られる FID 信号は一般に S/N 比が低いため、積算回数を 1000 回にして S/N 比を高めた。

結果、考察

ノルエフェドリン、ノルプソイドエフェドリン、イソプロピルアミン、テトラブチルアミンの分子構造を Fig.1 に示す。ただし、ノルエフェドリンおよびノルプソイドエフェドリンは L 型と D 型の二種類の構造が存在するので、それらを別個に示した。また、Fig.1 に示した物質について、NQR 周波数の計算値および実験値を Table 1 に示す。ただし、ノルエフェドリンは今回の実験で NQR 周波数を計測したため、実験値と誤差の項目に※印を付している。また、ノルプソイドエフェドリンは今回計測しておらず、NQR 周波数が調べられていない物質であるため、実験値については示していない。

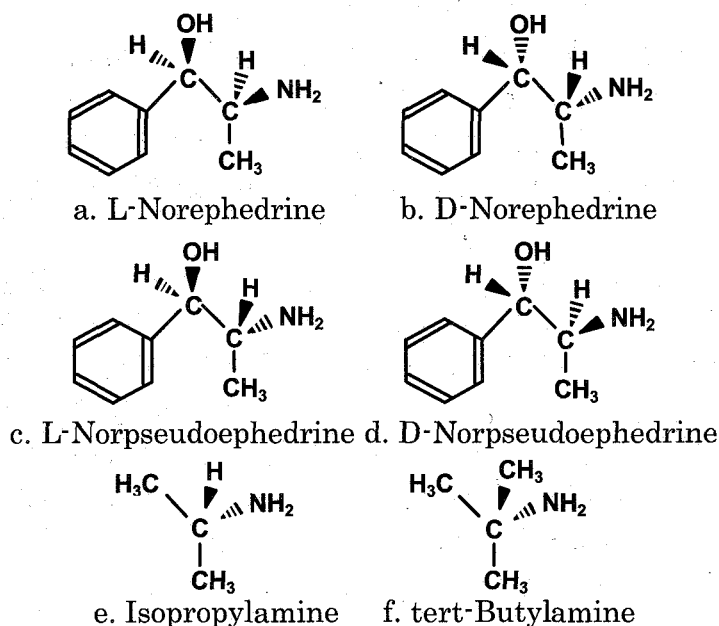


Fig.1 Structure of molecules

Fig.1 から、ノルエフェドリン、ノルpseudoエフェドリン、イソプロピルアミン、テトラブチルアミンはすべて ^{14}N が二つの ^1H および ^{12}C と単結合しており、 ^{14}N 周辺の構造は類似しているといえる。

Table 1 Result of NQR frequencies simulation

Molecule	NQR frequency [MHz]		Error [%]
	Experiment	Simulation	
L-Norephedrine	3.088 [*]	3.238	4.86 [*]
D-Norephedrine	3.092 [*]	3.240	4.79 [*]
L-Norpseudoephedrine	—	3.261	—
D-Norpseudoephedrine	—	3.261	—
Isopropylamine	3.261 ¹⁾	3.357	2.9
tert-Butylamine	3.355 ¹⁾	3.397	1.1

Table 1 から、基底系 6-31G+(d)により DFT (PBE1PBE) で計算したイソプロピルアミンとテトラブチルアミンの NQR 周波数は実験値との計算誤差が比較的小さかったことから、ノルエフェドリンも同様に誤差が小さくなると考え、周波数域 3.076~3.238MHz の範囲で FID 計測を行い、実験により周波数同定を試みた。その結果、送信周波数 3.090MHz のときに、3.088MHz と 3.092MHz で NQR 信号を観測できた (Fig.2)。

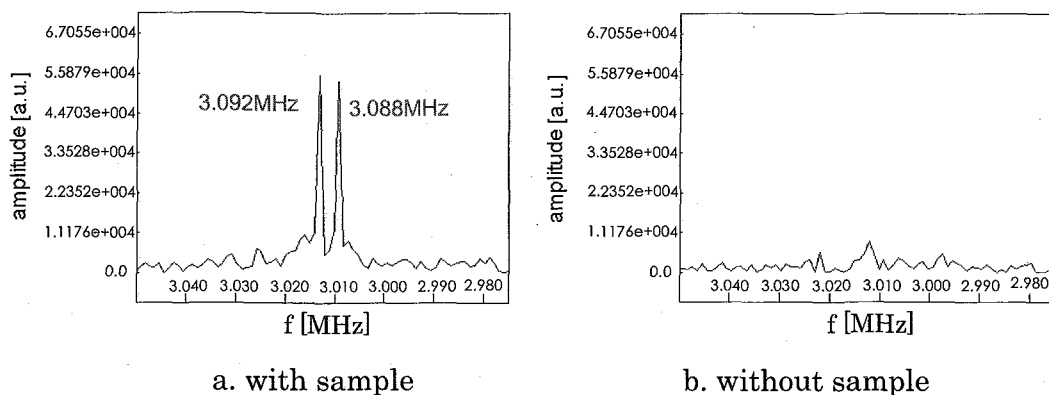


Fig.2 NQR frequency identify of Norephedrine

サンプルの有無による比較を繰り返して確認したが、サンプルが有る場合のみ常に 3.088MHz と 3.092MHz のピークが観測できた。両者の NQR 周波数差は 0.004MHz 程度である。一方量子化学計算では、ノルエフェドリンの D 型と L 型の差は 0.002MHz 程度であるが、ノルプソイドエフェドリンとは 0.02MHz の違いがあることから、これらのピークはノルエフェドリンの D 型と L 型と判断した。

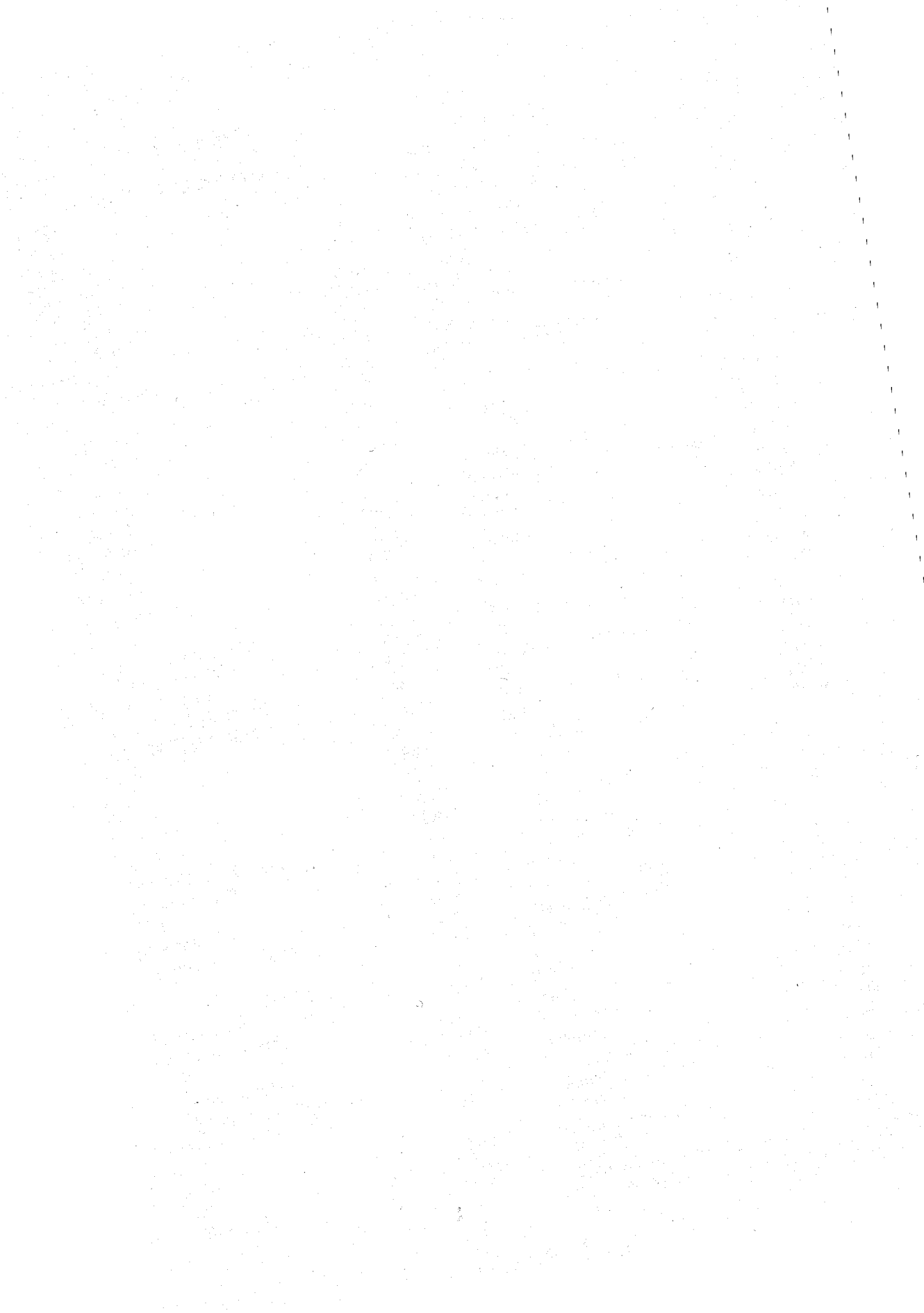
予測値と実験値の約 4.8% の計算誤差は、量子化学計算が絶対零度を前提としているのに対して、実験が室温(300K)で測定していることなどが考えられる。

まとめ

本研究では、Gaussian 03 を用いて量子化学計算を行った結果、分子の NQR 周波数を精度よく予測し、それを基にしてノルエフェドリンの NQR 周波数を 3.088MHz、3.092MHz と同定することができた。

参考文献

¹⁾Onda S; Harada H; Nakamura D; Kubo M; JOMRA4 J Magn Resonance; 8; 3; 1972; 238; 242;





キーワード索引

(数字・アルファベット)

+TIPs	P018
¹¹ B	3L8
¹¹ B NMR	YP02
¹²⁹ Xe NMR	P064
¹²⁹ Xe NMR	P084
¹²⁹ Xe NMR	P085
¹²⁹ Xe NMR	P109
¹³ C NMR	P082
¹³ C-DNP-NMR	2L10
¹⁴ N	3L8
1500°C	P080
¹⁹ F NMR	P040
¹⁹ F NMR	P041
¹⁹ F NMR	P043
¹⁹ F NMR	YP02
¹⁹ F NMR	YP04
¹⁹ F 標識	P096
¹⁹⁵ Pt NMR	P086
¹ H MAS NMR	P062
¹ H NMR	YP04
¹ H- ¹ H Long range COSY	P052
¹ H- ²⁷ Al FSLG HETCOR	P074
¹ H スピン拡散	YP11
¹ H スピン-格子緩和時間	P071
180° 選択励起特性	1L2
²⁵ Mg	P075
²⁷ Al	P069
² H NMR	1L4
² H NMR	P060
² H NMR	P082
³³ S NMR spectroscopy	P108
3D NMR 計測	P106
^{47,49} Ti	P075
4D NMR	P007
4- <i>n</i> -alkylbenzoic acid	P082

(A)

Adenomatous polyposis coli	YP03
Al-MCM-41 触媒	P074
Alq3	P069
Anisotropic rotation	P021
Anisotropic spin interaction	2L2
Antiretroviral activity	P030
AP-1	P022
ARL	P025
ATP	P094
ATP アーゼ	P034

(B)

B-box 2 domain	P030
BCN	3L8
bentDNA	YP06
BEST (Band-selective Excitation Short-Transient)	P048
BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank)	P112
BPTI	P010
<i>Brevibacillus choshinensis</i>	P008
b-SSFP	P091
β2 ミクログロブリン	YP05

(C)

Capping enzyme	P003
CASL 法	P099
Cell adhesion ability	P015
Chemical-shift anisotropy recoupling	YP08
Choline	P094
COCODARR	YP08
Collective motion	P016
CP	3L8
CP/MAS	YP12
CPMAS	P074
CPMG	YP17
Cryogenic probe technology	P108
CSA	2L2
CSA	P003
CSA	P021
CT-PRESS	P092

(D)

DANTE	P090
Deuterium label	P003
Deuteration	3L11
DHFR	P016
Dipolar recoupling	YP08
DNA 組換え修復	P029
DNP	2L9
DNP	3L11
DNP	P050
DNP	P111
DNP-NMR	P050
DNP-NMR	P094
Domain orientation	P003
Domain orientation	P021
DOSY	P051
Double-acquisition	YP08
DSC 法	P099
Dynamic nuclear polarisation	P050
Dynamic Nuclear Polarization(DNP)	2L10

	(E)		(L)	
EBI		P018	Lanthanide binding tag	YP01
EF-hand		P032	Lanthanide ion	YP01
Entanglement		P111	LC-NMR	P052
Ethylene glycol		P078	LGP2	P019
Eukaryotic cells		P095	Ligation	3L3
			LIMS	P097
	(F)		Line narrowing	P090
F ₁ F ₀ -ATP synthase		1L4	Liquid crystal	P082
FAIR		P091	Loop mutation	P016
FG-MAS		P114	Losartan	P024
Field-cycling		P111	LysM domain	P027
FSLG-242		YP08		
			(M)	
	(G)		Magic echo	P090
GABA		P092	MAS	P102
GB1		3L3	MAS ローター	1L3
Gd 造影剤		P099	MaxEnt	1L6
Glutamate		P092	Maximum entropy processing	2L3
GM1 ガングリオシド		P033	MBF1	P022
GPCR		P023	MDA5	P019
GPVI		P024	Metabolomics	P094
			Metabonomics	P050
	(H)		MQMAS	P069
H/D 交換法		YP05	MQNMR	P056
H ⁺ -ATP 合成酵素		1L4	MRI	P090
HeLa 細胞		3L13		
HETCOR		3L8		
HMG		P021	N-acetyl glucosamine (GlcNAc)	P027
HNCO		P106	NDSB	3L4
HPF		P020	NMR	P003
HR-MAS		P004	NMR	P021
Human brain		P092	NMR	P027
Hydrophobic matching		1L4	NMR	P112
Hydroxyl group density		3L7	NMR 構造解析	P015
Hyperpolarisation		P050	NMR 滴定	P053
			NMR マイクロイメージング	P091
	(I)		Non-linear sampling	P048
In-cell NMR		2L3	NQR	P115
In-cell NMR		3L13	NQR	P117
In-Cell NMR		P032		
In-cell NMR		P048		
In-Cell NMR		P095		
In-cell NMR		P096		
Intein		3L3		
In vivo		P092		
Isotope labeling		P008		
			(O)	
	(K)		OLED	P069
Kluyveromyces lactis		P009	OPENCORE NMR 分光計	P086
			(P)	
			PDB (Protein Data Bank)	P112
			PDBj (Protein Data Bank Japan)	P112
			PFG NMR	2L10
			PFG NMR	P084
			PH domain	P061

Photo-excited triplet spin	3L11	Solvent	P078
Phospholipid	P094	Sortase	3L3
PLC- δ 1	P061	Spin diffusion	3L11
Polycomb	P047	STMAS	YP13
Protein dynamics	P016	Structural proteomics	P030
Protein ligation	3L3	Styrene-butadiene-rubber (SBR)	P071
Protein structure	2L2	SWAP-70	P061
Protein structure	2L3		
Pseudo-contact shift	YP01		(T)
Pt ナノ粒子	P086	T ₁ 緩和時間	P089
Pulsed ESR	P048	T ₂ 緩和速度	1L1
		Ti-Mg 触媒	P075
		TNT	P115
QCPMG (Q)	P054	Trim5 α	P030
Q 値	YP15	Triplet-DNP	P111
		trNOE	P028
			(U)
RDC (R)	YP07	UBA ドメイン	P046
Recombinant protein	P008	UPR	P036
REDOR	P060		
REDOR	P081		(V)
REDOR Filter	P058	Variable temperature	P078
Relaxation dispersion	P016	Very-fast magic-angle spinning	P071
Relaxation reagent	3L7		
Residual dipolar coupling	YP01		(W)
Retroviral restruction	P030	Water-gate	P002
RF コイル	YP17	Water-LOGSY	P002
RGD 配列	P015	Weak alignment	2L2
RLR	P019	Web	P116
RNA	P036	Wood Materials	P078
RNA	YP07		
RNA アプタマー	3L15		(X)
RNA 結合タンパク質	3L15	Xe-129 NMR	2L10
		Xe-129 NMR	P084
		Xe-129 NMR	P085
		Xenopus laevis oocyte	P048
		X 線構造解析	YP09
			(Y)
SAIL (S)	P005	YfiA	P020
Sc-45 NMR	P073		
SDBS	P116		(Z)
Secretion	P008	ZZ exchange 法	1L5
Segment label	3L3		
Sensitivity	P108		
SH3 ドメイン	YP03		
Signal-to-noise ratio	P108		
Silica	3L7		
Silk-like materials	P015		
Solid-state	P069		
Solid-state NMR	P078		
Solid-state NMR quantum computing	P111		
Solid state ²⁹ Si NMR	3L7		
Solubility	3L3		
Solution NMR method	2L2		

	(あ行)		延伸・圧縮	P063
圧力		P006	オキシム	P053
アミノ酸選択標識		1L6	遅い構造揺らぎ	P006
アミロイド線維		P059		
アミロイド線維		YP05	(か行)	
アミロイド線維形成阻害		P059	加圧	P104
アミロイド線維形成速度		P059	カーボンナノファイバー	P076
アミロイドβ		P033	開発	P055
アモルファスシリカアルミナ		P074	外部ロック	YP16
アラニンオリゴマー		YP09	化学シフト	P064
アルカロイド		P117	化学シフト予測	YP18
アルキル安息香酸		P082	踵骨骨密度計測	YP17
アルツハイマー病		P033	拡散移動	3L1
アロステリックエフェクター		P042	拡散係数	P104
安定化		3L4	核磁化	P113
安定同位体		P012	核磁気共鳴	2L9
安定同位体標識		P009	核四極共鳴	P115
安定同位体標識		YP07	化合物半導体	P110
安定同位体標識タンパク質		P010	カルモジュリン	P032
安定同位体ラベル		YP09	画像解析	P089
アンフォテリシン B		P060	画像歪み	P088
イオン液体		3L1	活性炭	P077
イオン液体		YP11	カテキン類	P081
イオン性		3L1	過渡現象	YP15
イオン認識		YP02	可溶化	P049
イオン認識		YP04	可溶性タゲ	P013
異種核多次元 NMR		2L3	ガラス	P080
異種核多次元 NMR		P029	ガラス状態	P084
異種核多次元 NMR		P032	感度	3L4
異種核多次元 NMR		P095	感度	P105
一残基選択的安定同位体標識		P001	感度向上	P054
遺伝的多型-代謝物相関		3L10	感度向上	P102
遺伝的アルゴリズム		1L2	灌流	P091
遺伝子組み換えカイコ		2L4	緩和解析	P031
イメージング		P089	緩和時間	P049
インバース測定		P114	緩和時間解析	1L4
インパルス応答		YP15	緩和時間分布、電解質膜	P067
ウイルス増殖関連因子		P025	緩和時間	P070
ウィルスベクター		P010	緩和試薬	3L7
ウェブ		P097	緩和分散法	1L5
運動性		3L4	擬クリプタン	YP04
運動性		P005	擬コンタクトシフト	3L15
運動性		P070	木質材料	P078
液晶		P082	キセノン	1L3
液晶		P083	帰属	P083
液状化現象		P087	気体拡散係数	P084
エチレングリコール		P078	気体拡散特性	P085
エッジ面-ベーサル面		P076	気体収着特性	P085
エルゴステロール		P060	キチナーゼ	P027
延伸		P065	キチンオリゴ糖	P027

基底面	P076	高分解能固体 NMR	2L9
絹様材料	P015	高分子	P068
機能性食品	P100	高分子膜	2L10
気密性	1L3	高分子膜	P084
キャビティ	P006	酵母	P009
吸着	P064	コールドショックベクター	P013
吸着	P076	固体	P083
吸着	P110	固体 ^{195}Pt NMR	P086
強磁場	P107	固体 ^1H NMR	P071
凝集	3L4	固体 ^{29}Si NMR	3L7
共重合ポリマー	P051	固体 ^2H -NMR	P076
共発現	P011	固体 MRI	P090
極性	P076	固体 NMR	3L6
金属錯体	P053	固体 NMR	P054
クライオプローブ	P102	固体 NMR	P055
グルタミン	P092	固体 NMR	P056
グルタミン酸	P092	固体 NMR	P057
結合状態	P072	固体 NMR	P058
結晶化	P070	固体 NMR	P059
結晶構造解析	P068	固体 NMR	P066
結晶相	P085	固体 NMR	P068
血小板凝集	P024	固体 NMR	P072
ケモインフォマティクス	YP18	固体 NMR	P081
減衰率	3L12	固体 NMR	P104
コアクチベーター	P022	固体 NMR	YP12
コイル	P101	固体 NMR	YP16
高圧	P104	固体 NMR 構造解析	YP09
高温	P104	固体 NMR	YP10
高温超電導	P106	固体 NMR	3L5
高温超電導	YP16	固体高分解能 NMR	P102
高感度化	YP13	固体高分解能 2次元 NMR	1L4
抗菌ペプチド	P011	固体重水素 NMR	1L4
抗菌ペプチド	P028	個体変動	P093
光合成	P017	骨密度	YP17
光合成	P026	固定化	P004
交差飽和法	P001	ゴム	P114
高磁場 MRI	P089	コラーゲン	P024
高磁場 NMR	P106	クロマチン	P047
高磁場 NMR	YP16	混合物 NMR	3L9
構造解析	P047	混合物解析	P098
構造解析	YP12	混合粉砕	3L5
構造決定	3L4	コンパクト MRI	YP17
構造決定		コンパクト MRI	P088
構造予測	YP18		
高速 MAS	YP10	(さ行)	
高速試料回転	P056	最大エントロピー法	P007
高等哺乳細胞	P095	細胞情報伝達	3L14
高分解能	P083	細胞接着性	P015
固体核磁気共鳴	2L9	細胞接着性配列	2L4
固体高分解能 ^1H NMR	YP11	細胞膜透過性ペプチド	3L13
固体高分解能 NMR	2L4	サテライトシグナル	3L2

サブユニット	P039	水酸基密度	3L7
酸化還元電位	P037	水素貯蔵材料	P104
酸化還元電位	P038	水平磁場	P103
三重共鳴 NMR	P007	スピナー格子緩和	P083
酸素親和性	P040	スプリット型超電導磁石	P103
サンプル	3L4	スプリット型超電導マグネット	P105
残余双極子結合	3L15	スライス選択	P090
紫外線吸収剤	P049	正規分布	P093
磁気アルキメデス効果	P113	生体高分子データベース	P112
磁気浮上	P113	性能予測	P101
四極子核	YP13	生分解性高分子	3L6
四極子核	P057	生分解性高分子	P066
自己回帰過程	3L12	ゼオライト	P064
自己拡散係数	P049	赤血球	P042
脂質再構成	YP14	選択的プロトン標識	2L3
脂質二重膜	2L9	選択的プロトン標識	P032
脂質二重膜	P061	相関解析	P100
脂質二重膜	P081	相関時間	P041
脂質膜	P059	相互作用	P004
脂質膜	P060	相互作用	P014
ジスルフィド結合	P010	相互作用	P081
自然免疫	P019	層状シリケート	YP19
シトクロム c	P038	層状薄膜水	YP19
磁場安定化	P106	装置開発	P104
磁場安定化	YP16	装置開発	P107
ジピリン	YP02	相転移	YP11
シミュレーション	P101	組成-分子量相関	P051
重水素 NMR	P079	ソレノイド型アンテナ	P105
重水素標識	P001		
純度試験	3L2		
常磁性	P079	(た行)	
常磁性 NMR	P037	大環状配位子	P053
常磁性 NMR	P038	代謝物	3L9
常磁性 NMR	P039	代謝物	P097
常磁性 NMR	P042	代謝物-代謝物相関	3L10
常磁性緩和	P041	代謝物質	P093
常磁性緩和促進	3L15	大腸菌	P011
常磁性シフト	P017	大腸菌	P013
常磁性シフト	P026	ダイナミクス	1L5
常磁性シフト	P040	ダイナミクス	P058
常磁性シフト	P043	大量発現	P013
小胞体ストレス	P036	唾液	P093
植物細胞	P010	多核固体 NMR	P077
シリカゲル	3L7	タグ蛋白質	P035
新規測定法	P055	多孔質	P110
信号強度	P064	多次元マジック角回転固体 NMR 法	YP14
信号対雑音比	P101		
親水性残基	2L4	多変量解析	P098
新生仔	P098	単斜晶	P063
新方式 NMR	P103	炭素ナノ繊維	P076
信頼性	P116	蛋白質	2L3
		タンパク質	P010

タンパク質	P036	(な行)	
タンパク質間相互作用	3L14	ナイトシフト	P086
タンパク質間相互作用	P001	内部ロック	P106
蛋白質間相互作用	YP03	ナノ粒子	P072
タンパク質機能ドメイン	3L14	ニュートリメタボノミクス	P100
タンパク質結晶	P079	尿	P098
蛋白質-代謝物相関	3L10	二量子遷移	P068
タンパク質-タンパク質間相互作用	P031	二量体	P046
		熱安定性	P037
蛋白質ダイナミクス	P006	脳	P089
タンパク質のダイナミクス	P038	脳血流量計測	P099
蛋白質の立体構造解析	P018	能動制御	YP15
蛋白質複合体	YP03	濃度分布	P093
単離鎖	P039		
チオレドキシソ	P035	(は行)	
秩序パラメータ	1L4	配位結合	P043
潮解性物質	1L3	配向性	P065
超 1GHz NMR	P106	配向度	P063
超高温 in-situ プローブ	P080	ハイブリッド磁石	P107
超高磁場	P073	培養細胞	3L13
超高磁場	P075	パターン認識	3L9
超高分子量ポリエチレン	P063	半導体ナノ粒子	YP12
腸内フローラ	P100	ピーク推定	3L12
超偏極	P109	光駆動型アニオンポンプ	YP14
通電モード	P106	光受容体	P034
低温プローブ	P101	光照射	YP10
低温プローブ	P105	光ポンピング	P110
低 γ 核	P075	光励起三重項電子スピン	3L11
低分子量 G タンパク質	P025	微小管	P018
データ処理	3L12	非晶質	P070
データベース	P097	ヒスチジンキナーゼ様ドメイン	P034
データベース構築	P116	微生物産生高分子	3L6
データマイニング	P100	微生物産生高分子	P066
鉄	1L1	非線形サンプリング	1L6
鉄錯体	YP04	非線形サンプリング	2L3
転移交差飽和法	P004	非線形サンプリング	P007
添加剤	P070	非線形サンプリング	P032
てんかん	P091	ヒト脳	1L1
電気二重層キャパシタ	P077	ヒト脳	P092
電子スピン	2L9	表面	YP12
電子伝達	P017	表面修飾	P072
電子伝達	P026	微量元素	YP13
電子伝達	P031	微量成分	P052
転写	P022	ファミリー	P023
糖	P014	フィトクロム	P034
等温滴定型カロリメトリー(ITC)	P027	フェリチン	1L1
糖結合タンパク質	P014	フェロモン	P023
糖脂質・タンパク質相互作用	P033	不均一系	P004
動的核分極	2L9	不均一系触媒	P074
		複合体構造解析	3L14
		不整磁場	P103

フッ素化ヘム	P040	膜タンパク質	YP14
フッ素化ヘム	P041	マジックエコー	P090
フッ素化ヘム	P043	慢性腎臓病	3L9
部分構造検索	YP18	水分子ダイナミクス	YP19
部分的重水素化	3L11	無細胞タンパク質合成	P012
不溶性顆粒	P011	無細胞タンパク質合成	P001
プローブ	P103	メタボリック・プロファイリング	P098
プローブコイル	P101	メタボリックバランス	3L10
噴砂現象	P087	メタボローム	P097
分子イメージング	1L1	メタボローム	YP18
分子運動	3L1	メタボロミクス	3L9
分子間距離	YP11	モデルフリー解析	P031
分子間相互作用	1L5	モルホロジー	P063
分子間力	3L1		
分子クラスター	P056	(や行)	
分子プローブ	P096	ユビキチン	P046
分泌発現	P009	溶液	P027
閉環メタセシス	P053	溶液	P078
平行および逆平行 β シート構造	YP09	溶液 NMR	P105
ヘパリン	3L2	溶液 NMR	P116
ペプチド	P023	溶媒和効果	P056
ペプチド認識	3L14	溶融状態	P080
ヘム	P037	横緩和	P090
ヘム	P038	四極子核	YP13
ヘム	P039		
ヘム	P042	(ら行)	
ヘムタンパク質	P017	ラジオ波パルス	YP15
ヘムタンパク質	P041	ラメラ構造	2L4
ヘムタンパク質	P043	立体構造	P020
ヘモグロビン	P039	立体構造	P032
ヘモグロビン	P040	立体構造	YP06
ヘモグロビン	P042	立体構造解析	P025
ヘリウム	1L3	立体構造解析	P029
ペロブスカイト型プロトン伝導体	P073	リボソーム	P020
変性	3L4	リポソーム	P081
縫合糸	P065	リポ多糖	P028
芳香環の回転運動	P005	量子化学計算	P117
包接化合物	3L5	緑膿菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	P037
ポリ(ϵ -L-リジン)	3L6	リングング	P057
ポリ(γ -グルタミン酸)	P066	リン酸化ペプチド	3L14
ポリ 4-メチル-1-ペンテン	P085	リン脂質膜	P081
ポリアニリン	P062	レイリーテイラー不安定性	P087
ポリグリコール酸	P065	レクチン	P014
ポリマーブレンド	3L6	レチナール	P058
ポリマーブレンド	P066	レチナール異性化	YP10
		連続フロー	P109
(ま行)			
マウス新生仔	P098		
巻き戻し条件	P035		
膜タンパク質	2L9		
膜タンパク質	P058		

著者索引

(アルファベット)

A. V. Struts	1L4	Tetsuo Asakura	2L4	池上貴久	YP03
Ajayan Vinu	3L8	Tokuko Watanabe	2L7	池田武義	P104
AL Mamun	P068	Toshiki Tamura	2L4	池田忠作	YP02
Atsuko Sasaki	2L3	Toshimichi Fujiwara	2L9	石井毅	3L4
Ayako Egawa	2L9	Toshitaka Idehara	2L9	石井剛志	P081
Brian O. Smith	2L3	Tsutomu Mikawa	2L3	石川堯洋	1L2
Chan Hyung Bae	P044	Ulrich L. Günther	2L10	石川堯洋	P087
Chin Yu	2L1	Warren S. Warren	2L8	石川雅之	P025
Chojiro Kojima	2L9	Yasumoto Nakazawa	2L4	石森浩一郎	P031
Daisuke Sakakibara	2L3	Yumi Tanioka	2L4	磯貝信	3L13
Daniel Nietlispach	P007	Yutaka Ito	2L3	磯貝信	P046
Frans A. A. Mulder	P006			磯貝信	P095
Frederick W. Dahlquist	P006	(あ行)		市川聡	YP06
Hideo Akutsu	2L9	相沢智康	P011	一木洋太	P105
Hiroki Takahashi	2L9	相沢智康	P028	出田圭子	P076
Hwa Jung Yi	P044	相沢智康	P031	出田圭子	P077
Hyun Ho Jung	P044	相沢智康	P035	伊藤(新澤)恭子	P031
Isamu Ogawa	2L9	相沢智康	YP14	伊藤ひかり	P059
Jae Il Kim	P044	青木雅昭	P030	伊藤隆	3L13
Jee JunGoo	P036	青柳俊	P098	伊藤隆	P007
JeeJunGoo	1L6	赤坂一之	1L7	伊藤隆	P018
Jennifer H. Wolstencroft	P045	赤坂一之	P006	伊藤隆	P020
JunGoo Jee	P034	赤阪一之	P038	伊藤隆	P022
JunGoo Jee	YP06	赤澤大輔	P024	伊藤隆	P029
Junpei Hamatsu	2L4	秋根茂久	P053	伊藤隆	P032
Kazuo Yamauchi	2L4	秋根茂久	YP04	伊藤隆	P048
Klaus Müller	YP19	阿久津秀雄	1L4	伊藤隆	P095
Kokoro Hayashi	2L9	阿久津秀雄	P112	糸崎秀夫	P115
Lyndon Emsley	2L5	攪上将規	P063	糸崎秀夫	P117
M. F. Brown	1L4	阿部友樹	P059	稲垣大介	P117
Markus Wälchli	2L3	朝倉哲郎	P015	稲垣冬彦	3L3
Markus Wälchli	P048	朝倉哲郎	P065	稲垣冬彦	P019
Markus Wälchli	P007	朝倉哲郎	YP09	稲垣冬彦	YP01
Masahiro Shirakawa	2L3	浅沼達哉	P109	犬飼宗弘	YP08
Masaki Mishima	2L3	浅野敦志	P071	井上仁	P029
Michael Garwood	2L6	芦田淳	P056	井上裕介	3L4
Michael P. Williamson	P045	阿曾幸男	P070	猪俣晃介	3L13
Mitsuru Toda	2L9	安達聖	P087	猪股晃介	P095
Miwako Saeki	2L9	安達裕子	P064	猪俣晃介	P096
Peter Güntert	2L3	阿部翔吾	P046	今井潤	3L9
Poul Erik Hansen	P045	阿部孝政	P050	今井貴雄	3L15
Robert G. Griffin	2L11	阿部孝政	P094	今川佑介	P036
Saif Ullah	P045	雨澤浩史	P073	入江清史	P037
Shin-ichi Tate	2L2	新屋隆士	P079	入江清史	P038
Sin-Hyeog Im	P044	有賀克彦	3L8	岩崎亜衣	P032
Tepei Ikeya	2L3	有田恭平	P046	岩浪克之	P074
		有吉真理子	P046	植草義徳	P081
		安東真理子	P073	上田寛	P024
		飯島隆広	P054	上田雅美	P020
		五十嵐俊介	P001	上原宏樹	P063
		五十嵐龍治	P048	上脇隼一	P021

内木宏延	YP05	小澤新一郎	P001	川畑俊一郎	P028
内田毅	P031	翁長章子	P027	川原晃	P062
内海博明	P075	小野明	P005	河原郁美	P036
内海博明	P114	小野克輝	P024	河原成元	P114
内海真穂	P033	岡田道哉	P101	川村出	P058
梅川雄一	P060			川村出	P059
梅津喜崇	P011	(代行)		川村出	YP10
梅津喜崇	P035	海江田修至	YP03	木川隆則	3L14
梅原崇史	P030	甲斐荘正恒	P001	木川隆則	P012
雲財悟	P046	甲斐荘正恒	P005	木川隆則	P030
海野幸子	P014	香川晃徳	3L11	北川勝浩	3L11
江川文子	YP14	香川晃徳	P111	北川勝浩	P111
榎本舞弓	3L4	葛西卓磨	3L14	菊地和也	P096
及川格	P073	梶弘典	P069	菊地淳	3L10
大石徹	P060	粕谷厚生	YP12	菊地淳	P097
大岡宏造	P017	片平正人	3L15	菊地淳	P100
大木出	P047	加藤悦子	P025	菊地淳	YP18
大木忍	P107	加藤悦子	P027	岸田拓郎	YP15
大木忍	P110	加藤悦子	P034	岸本浩一	P003
大木進野	P010	加藤久美子	3L6	北川勝浩	YP15
大窪貴洋	P067	加藤晃一	P033	北口仁	P101
大澤匡範	P001	加藤こずえ	P024	北口仁	P103
大澤匡範	P004	加藤完	P100	北口仁	P105
太田千香子	P091	金澤健治	P098	北原亮	P006
大友征宇	P017	金場哲平	P018	北原亮	P038
大友征宇	P026	金山公三	P078	氣田佳喜	P080
大西玲奈	YP05	金子敬輔	3L4	貴傳名甲	P067
大沼貴之	P027	金橋康二	YP13	衣笠晋一	P116
大野綾子	3L13	金橋康二	P080	木下俊文	P099
大野綾子	P095	神野哲史	P084	木村敦臣	P064
大野博司	P100	神谷歩	3L4	木村敦臣	P091
大野曜吉	P094	神谷昌克	P011	木村一雄	P052
大橋竜太郎	P057	神谷昌克	P015	木本裕子	P023
大橋竜太郎	P075	神谷昌克	P028	木吉司	P106
大平昭博	P067	神谷昌克	P031	木吉司	YP16
大前英司	P016	神谷昌克	P035	清末優子	YP03
大山貴子	3L15	神谷昌克	YP14	清野肇	P073
岡澤誠裕	P084	上平美弥	P059	金泰坤	P077
岡隆司	P049	上平美弥	P081	日下康成	P069
岡田道哉	P101	亀谷俊輔	YP09	国本浩喜	3L6
岡田道哉	P103	河合剛太	3L12	窪田健二	3L4
岡田道哉	P105	河合剛太	YP07	久保田一	3L12
岡野栄之	3L15	川口謙	P052	久保均	P050
岡村英保	P025	川崎健司	P105	熊木康裕	P011
岡村英保	P027	河田陽子	P064	熊木康裕	P035
荻野孝史	P093	川西徹	P070	熊澤茂則	P081
小國正晴	YP19	河野敬一	P028	久米田博之	3L3
奥村佑生	P085	河野敬一	P031	久米田博之	P019
小椋賢治	3L3	河野敬一	YP14	黒津卓三	P071
小椋賢治	P019	河野敬一	P035	桑原大介	YP11
小椋賢治	YP01	河野敬一	P011	月向邦彦	P016

小池薫	P094	佐治修吾	P064	須藤倫崇	3L10
河野憲二	P036	佐藤明子	P020	須永絵理	P098
河野俊之	1L6	佐藤惇志	P042	関英子	P012
河野俊之	3L4	佐藤格夫	P094	関英子	P030
河野俊之	P003	佐藤徹	P023	関志朗	3L1
河野俊之	P008	山同精一朗	YP12	関根素馨	P065
河野俊之	P034	繁木良介	P088	宋宇光	P117
向朧	3L4	重光佳基	P007		
小柴生造	3L14	品川麻衣	3L2		
小柴生造	P012	篠阿弥宇	YP07	(た行)	
児嶋長次郎	1L6	柴田武彦	P029	太虎林	P037
児嶋長次郎	P013	柴田友和	P039	太虎林	P038
児嶋長次郎	P034	嶋田一夫	P001	太虎林	P039
児嶋長次郎	P036	嶋田一夫	P004	太虎林	P040
児嶋長次郎	P047	嶋田一夫	P009	太虎林	P041
児嶋長次郎	YP06	嶋田一夫	P023	太虎林	P042
巨瀬勝美	1L2	嶋田一夫	P024	太虎林	P043
巨瀬勝美	P087	清水禎	3L8	高尾智明	P108
巨瀬勝美	P088	清水禎	P057	高尾智明	YP16
巨瀬勝美	YP17	清水禎	P073	高木美菜子	3L5
後藤敦	P107	清水禎	P075	高崎将充	P026
後藤敦	P110	清水禎	P082	高野誠	P034
後藤祐児	YP05	清水禎	P107	高橋清大	P019
小沼剛	YP05	清水禎	P110	高橋滋	P098
小橋川敬博	3L3	清水悠介	P098	高橋征三	P093
小林武志	3L9	清水裕太	P066	高橋貴文	YP13
小林広和	P086	下池田勇一	YP13	高橋利和	P074
小林将俊	1L4	張相敏	P077	高橋栄夫	P009
小松雅明	P046	白川昌宏	3L13	高橋栄夫	P024
近藤靖	P099	白川昌宏	P022	高橋雅人	P106
		白川昌宏	P046	高橋雅人	P108
		白川昌宏	P048	高橋雅人	YP16
(さ行)		白川昌宏	P095	高橋勇二	P098
斉尾智英	YP01	白川昌宏	P096	高見浩介	P069
齋藤公児	P076	白川昌宏	P096	高村仁	P104
齋藤公児	P077	城守隆宏	3L9	高屋展宏	1L1
齋藤公児	YP13	秦旭栄	P030	高屋展宏	P089
齋藤剛	P116	榛葉信久	3L2	高屋展宏	P092
齋藤正規	P077	菅瀬謙治	1L5	瀧澤智恵子	P110
齋藤雅由	P075	菅野純夫	3L14	竹内和久	3L9
斎藤雄太	P108	杉木俊彦	P009	武内敏秀	P095
斎藤雄太	YP16	杉田圭太郎	P028	竹内誠	P010
酒井智美	P048	杉本収	P081	竹腰清乃理	3L8
榎原大介	P032	杉元宏行	P078	竹腰清乃理	P102
坂倉俊康	P074	杉山孝司	3L15	竹腰清乃理	YP08
坂本光一	P031	杉原文徳	P096	武田和行	3L11
坂本直也	YP02	鈴木秋弘	P040	武田和行	P086
咲山航	P065	鈴木秋弘	P041	武田和行	P111
櫻井一正	YP05	鈴木秋弘	P043	武田和行	P113
櫻井智司	P114	鈴木榮一郎	3L2	武田和行	YP08
笹川拡明	P033	鈴木勉	P001	武田和行	YP15
佐々木敦子	P032	鈴木陽	P082	武田光広	P005

田島可奈	YP10	出村誠	P035	中山勉	P081
田代(下高原) 桜子	P002	出村誠	YP14	鍋島達弥	P053
田代充	P002	寺内勉	P005	鍋島達弥	YP02
楯真一	P003	寺沢宏明	P023	鍋島達弥	YP04
楯真一	P016	寺田勝英	3L5	鍋島真美	P116
楯真一	P021	天野剛志	3L13	行木信一	3L4
伊達康博	P100	天野剛志	P046	名雪三依	P051
田所利雄	P053	天野剛志	P048	成田亮	P019
田仲昭子	3L14	天野剛志	P095	西尾拓道	P058
田中克業	P064	東馬真矢	P115	西ヶ谷有輝	1L6
田中啓二	P046	東馬真矢	P117	西ヶ谷有輝	P034
田中剛史	P008	徳田尚美	P061	西川諭	3L15
田中千香子	P015	枳尾尚哉	3L14	西川富美子	3L15
田中千香子	P071	枳尾豪人	3L13	西川大英	YP10
田中秀樹	P103	枳尾豪人	P046	錦織雅樹	P025
田中利好	1L6	枳尾豪人	P048	西田雅一	P078
田中利好	P003	枳尾豪人	P095	西村勝之	P054
田中利好	P008	枳尾豪人	P096	西村勝之	P055
田中利好	P034	戸所泰人	1L4	西山裕介	P069
田辺純子	P058	土肥浩二	P010	縫島裕美	P100
谷生道一	P008	豊永翔	P004	根来誠	P111
谷口和也	YP17			根来誠	YP15
谷村隆次	P024	(な行)		根本貴宏	YP13
多原主哲	P060	内藤晶	P058	根本直	P098
田淵豊	YP15	内藤晶	P059	納口恭明	P087
玉井淳史	P010	内藤晶	P081	野田泰斗	P104
丹治健一	P081	内藤晶	YP10	野田泰斗	P073
丹所正孝	3L8	中井利仁	P057	野田泰斗	YP12
丹所正孝	P073	中井利仁	P075		
丹所正孝	P082	永井義崇	P020	(は行)	
近山英輔	3L10	永井義崇	P022	はが紗智子	P023
近山英輔	P097	永江峰幸	P029	萩原祥子	P083
近山英輔	P100	中込秀樹	P106	朴ミンソク	P101
近山英輔	YP18	中込秀樹	YP16	箱嶋敏雄	P018
千葉亮	P072	長島敏雄	P030	箱嶋敏雄	P036
茶谷絵里	YP05	中瀬生彦	P095	端健二郎	P107
陳国躍	P099	永田崇	3L15	端健二郎	P110
辻暁	P058	中谷英一	P112	橋本真一	P104
辻暁	P061	長友重紀	P037	橋本雄幸	P090
辻暁	YP10	長友重紀	P038	橋本康博	P051
辻重幸	P062	長友重紀	P039	長谷川学	P103
土江祐介	P007	長友重紀	P040	服部峰之	P109
土川博史	P060	長友重紀	P041	花島知美	P032
都築誠二	3L1	長友重紀	P042	濱田衛	P106
都築奈津子	P019	長友重紀	P043	濱田衛	YP16
出口健三	P075	中西裕美子	P100	浜津順平	P032
勅使河原喬史	P049	中野隆行	P052	林こころ	P013
出村誠	P011	中村和浩	P099	林崎良英	3L14
出村誠	P015	中村浩蔵	P081	林繁信	1L3
出村誠	P028	中村春木	P112	林繁信	P072
出村誠	P031	中村英章	YP11	林宣宏	P032

林文晶	P030	古板恭子	YP06	三浦謹一郎	YP07
早水紀久子	3L1	古市英資	P043	三上真一	P037
早水紀久子	P109	古川亜矢子	3L15	美川務	P029
原田拓志	P030	古川裕理	YP04	三木恒久	P078
原田雅史	P050	古田拓	3L10	三島正規	P007
原野陽子	P112	逸見光	P014	三島正規	P018
原英之	P048	逸見光	P017	三島正規	P020
春名英明	P097	逸見光	P026	三島正規	P022
春名英明	YP18	逸見光	P038	三島正規	P029
半田晋也	1L2	北條江里	P011	三島正規	P032
半田晋也	P087	細田和男	3L4	水口峰之	P028
半田晋也	P088	細野政美	P106	水関和哉	P040
半田晋也	YP17	細野政美	YP16	水野敬	P102
樋岡克哉	P102	保母史郎	P106	水野元博	P079
東原和成	P023	保母史郎	P108	水野元博	P082
樋口誠	P017	保母史郎	YP16	三森文行	1L1
樋口真理花	YP14	堀内正隆	P019	三森文行	P089
久野敦	P014	堀内裕司	P016	三森文行	P092
平井玲子	P019	堀口紅実子	YP09	宮崎泰斗	P041
平賀隆	P109	堀俊祐	P071	宮崎玉樹	P070
平川慶子	P094	本多尚	P062	宮東達也	P079
平野優	P017			宮原浩嘉	3L7
平林淳	P014			宮原令二	P049
平良東記	P027	(ま行)		宮脇仁	P076
廣明秀一	3L13	真板(大野)綾子	P096	宮脇仁	P077
廣明秀一	P095	前川英己	P073	三好利一	P068
広瀬進	P022	前川英己	P104	関庚薰	3L7
廣田洋	P030	前川英己	YP12	村岡義之	P026
福井泰久	P061	前崎綾子	P018	村上美和	3L8
福井陽子	P047	前田史郎	3L6	村上美和	P082
福島達也	P069	前田史郎	P066	村田恵介	3L12
福田真嗣	P100	前田秀明	P106	村田俊平	YP06
福田祐三	P105	前田秀明	P108	村田道雄	P060
福地将志	YP08	前田秀明	YP16	室川遊	3L11
福原忠雄	P049	前野寛大	P006	持田勲	P076
藤岡耕治	P102	牧泰史	P020	持田勲	P077
藤田尚志	P019	真嶋司	3L15	持田恵一	3L10
藤田孝	P075	増野智彦	P094	持田智行	YP11
藤戸輝昭	P104	増本秀史	P090	元田容子	3L14
藤戸輝昭	P107	待井豊	1L2	森田翔	P063
藤原敏道	1L4	待井豊	P087	森利之	3L8
藤原敏道	P112	松井茂	P090	森智行	P018
藤原敏道	YP14	松井千幸	YP03	森正之	P010
藤原英明	P064	松尾賢典	P076	森本大智	P046
藤原英明	P091	松上明正	3L15		
藤原弘文	P085	松下直弘	P060		
藤原正子	3L9	松田彰	YP06		
藤森裕基	P083	松田貴意	P012	(や行)	
二木史郎	3L13	松田貴意	P030	八木澤仁	P061
二木史朗	P095	松田夏子	P012	八木正典	YP05
降旗一夫	P002	松森信明	P060	安田大輔	P115
		丸山穰	3L9	安田大輔	P117
				安田弘之	P074

柳澤勝彦	P033	米持悦生	3L5
柳澤吉紀	P106	米山光俊	P019
柳澤吉紀	YP16		
矢吹孝	P030	(5行)	
山内一夫	P065	李華	3L14
山内一夫	YP09		
山口秀幸	3L2	(わ行)	
山口行治	P093	若松馨	3L4
山口芳樹	P033	和田昭盛	YP10
山腰良晃	P080	和田明	P020
山崎俊夫	3L15	渡辺啓介	YP19
山崎俊夫	P069	渡部暁	P030
山崎俊夫	P106	渡辺拓実	P020
山崎俊夫	YP16	渡邊英宏	1L1
山崎俊正	P034	渡邊英宏	P089
山路俊樹	P116	渡邊英宏	P092
山根衣寿美	P059		
山延健	P063		
山本雅	3L14		
山本直樹	P033		
山本典孝	P109		
山本浩之	P105		
山本めぐみ	P091		
山本泰彦	P037		
山本泰彦	P038		
山本泰彦	P039		
山本泰彦	P040		
山本泰彦	P041		
山本泰彦	P042		
山本泰彦	P043		
山本寛子	P060		
尹聖昊	P076		
尹聖昊	P077		
横川真梨子	P004		
横地政志	YP01		
横山茂之	3L14		
横山茂之	P006		
横山茂之	P030		
横山茂之	P038		
横山順	P012		
吉川信也	P031		
吉澤良隆	P024		
吉田愛	P015		
吉田和之	P051		
吉田充	P026		
好田真由美	P030		
吉永壮佐	P023		
吉橋泰生	3L5		
吉水広明	P084		
吉水広明	P085		
米澤徹	P086		

参加登録者一覧

氏名

所属

[招待講演者]

Lyndon Emsley	Univ. of Lyon (France)
Michael Garwood	Univ. of Minnesota (USA)
Robert G. Griffin	MIT (USA)
Warren S. Warren	Duke Univ. (USA)
Chin Yu	National Tsing Hua Univ. (Taiwan)
渡部徳子	青山学院女子短期大学

[参加登録者]

相沢智康	北海道大学大学院先端生命科学研究院
赤坂一之	近畿大学先端技術総合研究所
阿久津秀雄	大阪大学蛋白質研究所
朝倉哲郎	東京農工大学大学院共生科学技術研究院
浅野敦志	防衛大学校
芦田淳	バリアンテクノロジー ジャパン リミテッド
東利雄	アステラス製薬合成技術研究所
阿曾幸男	国立医薬品食品衛生研究所
安達清治	大阪大学理学部
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/Biotools 事業本部
天野剛志	神戸大学大学院医学研究科
新井彩子	三菱化学科学技術研究センター
荒井珠貴	筑波大学自然学類化学専攻
荒木涼子	筑波大学自然学類
荒木力太	ブルカー・バイオスピン株式会社
荒田洋治	東京大学名誉教授
新屋隆士	金沢大学大学院自然科学研究科
安藤勲	東京工業大学名誉教授
飯島隆広	分子科学研究所
飯塚舜介	鳥取大学大学院医学系研究科
飯淵宏昭	千葉工業大学工学研究科生命環境科学専攻構造生物学研究室
石川堯洋	筑波大学大学院数理工学科学研究科電子・物理工学専攻巨瀬研究室
磯貝信	京都大学大学院工学研究科

一木洋太	株式会社日立製作所日立研究所
出田圭子	九州大学先導物質化学研究所
伊藤隆	首都大学東京大学院理工学研究科
稲垣冬彦	北大大学院薬学研究院
稲角直也	大阪大学大学院理学研究科技術部
猪股晃介	京都大学大学院工学研究科
今井美咲	千葉工業大学工学研究科生命環境科学専攻構造生物学研究室
入江清史	筑波大学大学院数理物質科学研究科化学専攻
岩下孝	(財) サントリー生物有機科学研究所
岩田健太郎	武田薬品工業株式会社
植木定雄	ブルカー・バイオスピン株式会社
植草義徳	静岡県立大学大学院生活健康科学研究科
上松照幸	株式会社巴商会
上脇隼一	広島大学大学院理学研究科
内海博明	日本電子(株)AIDARGIT
内海真穂	名古屋市立大学大学院薬学研究科
江奈武一郎	株式会社住化分析センター
大木出	奈良先端科学技術大学院大学
大木進野	北陸先端科学技術大学院大学
大窪貴洋	産業技術総合研究所
太田千香子	大阪大学大学院医学系研究科
大友征宇	茨城大学理学部
大野靖	日本たばこ産業株式会社
大橋竜太郎	独立行政法人物質材料研究所
岡澤誠裕	名古屋工業大学工学部
岡田敦司	大正製薬株式会社
岡村英保	独立行政法人農業生物資源研究所植物・微生物相互作用研究ユニット
小川あきつ	杏林製薬
奥村佑生	名古屋工業大学工学部
小澤新一郎	東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室
小野克輝	(社)バイオ産業情報化コンソーシアム
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
海江田修至	大阪大学蛋白質研究所
鹿毛真人	筑波大学大学院数理物質科学研究科
梶山聡美	大日本住友製薬株式会社薬物動態研究所
片平正人	横浜市立大学・国際総合科学研究科

片平律子	協和発酵
加藤賢一	ブルカー・バイオスピン株式会社
門良一	京都産業大学理学部物理科学科
金坂将	住友化学
金橋康二	新日本製鐵(株)
金場哲平	首都大学東京大学院理工学研究科
神谷昌克	北大院・先端生命
神原孝之	京都大学理学研究科
河合剛太	千葉工業大学工学部
川口哲朗	ブルカー・バイオスピン株式会社
川島裕之	産業技術総合研究所
河野敬一	北海道大学大学院理学研究院
河原郁美	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
川村出	横浜国立大学大学院工学研究院
木川隆則	理化学研究所 SSBC
菊地淳	理化学研究所
岸本浩一	広島大学大学院理学研究科
衣笠晋一	(独) 産業技術総合研究所
久昌正寛	三菱化学科学技術研究センター
清谷多美子	昭和薬科大学
串田克彦	バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド
久保田由美子	財団法人微生物化学研究会
熊木康裕	北海道大学大学院理学院高分解能核磁気共鳴装置研究室
熊澤茂則	静岡県立大学
久米田博之	北海道大学薬学部構造生物学研究室
栗田順一	バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド
栗林秀人	バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド
黒津卓三	防衛大学校応用化学科
河野俊之	三菱化学生命科学研究所
木暮希望	住友化学筑波研究所
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
後藤敦	独立行政法人物質・材料研究機構ナノ計測センター
小沼剛	大阪大学蛋白質研究所構造形成研究室
小橋川敬博	北海道大学大学院薬学研究院
小林尚玄	新潟大学脳研究所
小林広和	京大院理

小林将俊	住友ゴム工業（株）
近藤晃弘	（株）住化分析センター
斉尾智英	北海道大学生命科学院構造生物学
斉藤香織	筑波大学自然科学類化学専攻
齋藤剛	産業技術総合研究所
斉藤裕之	千葉工業大学構造生物学研究室
坂本光一	北海道大学大学院理学院化学専攻
坂本泰一	千葉工業大学工学部
坂本直也	筑波大学大学院数理物質科学研究科
坂本雅夫	J S R株式会社物性分析室
佐久間千勢子	東京薬科大学
櫻井愛子	（株）三菱化学科学技術研究センター
櫻井智司	日本電子株式会社応用研究センター
笹川拓明	日本電子株式会社分析機器本部応用研究グループ第一チーム
佐治修吾	大阪大学大学院医学系研究科
佐藤明子	首都大学東京大学院理工学研究科
佐藤惇志	筑波大学大学院数理物質科学研究科
佐藤一	ブルカー・バイオスピン株式会社
佐野孝	新日本石油株式会社
沢辺紀子	東京理科大学薬学部
重光佳基	首都大学東京理工学研究科
篠阿弥宇	千葉工業大学大学院工学研究科生命環境科学専攻構造生物学研究室
柴田友和	筑波大学大学院数理物質科学研究科化学専攻生物無機化学研究室
清水貴宏	ブルカー・バイオスピン株式会社
秦旭栄	理研・横浜研究所・SSBC
神藤平三郎	農業生物資源研究所
菅瀬謙治	（財）サントリー生物有機科学研究所・第1研究部
杉浦眞喜子	神戸薬科大学
杉木俊彦	社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム
杉元宏行	独立行政法人産業技術総合研究所サステナブルマテリアル研究部門
助川伸也	千葉工業大学大学院
鈴木浩一	ソニー株式会社
鈴木倫太郎	農業生物資源研究所
鈴木陽	金沢大学大学院
関口和彦	富山化学工業株式会社
関根素馨	三井化学分析センター

瀬野利直	広島大学総合科学部
太虎林	筑波大学大学院数理物質科学研究科
Dai Bona	東京海洋大学海洋科学部
高橋征三	日本女子大学理学部物質生物科学科
高橋貴文	新日本製鐵（株）先端技術研究所
高橋利和	産業技術総合研究所
高橋雅人	理化学研究所生命分子システム基盤研究領域
高屋展宏	国立環境研究所
竹内誠	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
竹腰清乃理	京都大学大学院理学研究科化学
武田和行	京都大学大学院理学研究科
武田光広	名古屋大学
田島可奈	横浜国立大学大学院
楯真一	広島大学大学院理学研究科
田所利雄	筑波大学大学院数理物質科学研究科物質創成先端科学専攻
田中俊之	筑波大学大学院生命環境科学研究科
田中秀樹	日立製作所
田中亮	東横化学株式会社
谷生道一	（株）三菱化学生命科学研究所
谷口和也	筑波大学大学院数理物質科学研究科
田淵豊	大阪大学基礎工学研究科システム創成専攻電子光科学領域
田村友美	ブルカー・バイオスピン株式会社
丹所正孝	（独）物質・材料研究機構
近山英輔	理化学研究所
千葉亮	産業技術総合研究所計測フロンティア研究部門
塚原剛彦	東京工業大学
津田栄	産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門
土江松美	大阪市立大学理学研究科
津野久幸	日本電子（株）分析機器営業本部 AI 販促 G
出口知章	千葉工業大学大学院工学研究科生命環境科学専攻構造生物学研究室
手島圭三	広島大学生物圏科学研究科
出村誠	北大先端生命
寺尾武彦	京都大学名誉教授
東馬真矢	大阪大学基礎工学研究科糸崎研究室
堂本竹雄	ブルカー・バイオスピン株式会社
徳田尚美	兵庫県立大学大学院生命理学研究科

戸田芳子	旭化成基盤技術研究所
朽尾豪人	京都大学大学院工学研究科
都出千里	神戸薬科大学
豊永翔	東京大学大学院薬学系研究科
鳥居実恵	名古屋大学全学技術センター工学技術系
内藤晶	横浜国立大学大学院工学研究院
永井義崇	首都大学東京大学院理工学研究科
永江峰幸	首都大学東京大学院
長尾聡	奈良先端科学技術大学院大学
中島翔平	アサヒビール(株) 健康おいしさ研究所
中嶋勇輔	京都大学理学部
永田崇	横浜市立大学大学院
長友重紀	筑波大学大学院数理物質科学研究科
中西裕美子	横浜市立大学大学院国際総合科学研究科
中野隆行	(株) 東レリサーチセンター生物科学研究部
中野路子	自然科学研究機構分子科学研究所
中野佑亮	筑波大学自然学類
中村和浩	秋田県立脳血管研究センター
中村英章	電気通信大学大学院電気通信学研究科量子・物質工学専攻
鍋島達弥	筑波大学大学院数理物質科学研究科
鍋島真美	産業技術総合研究所計測標準研究部門先端材料科高分子標準研究室
名雪三依	旭化成株式会社
西ヶ谷有輝	奈良先端科学技術大学院大学
西川忠輝	ブルカー・バイオスピン株式会社
西村勝之	分子科学研究所
西村浩人	ブルカー・バイオスピン株式会社
西山裕介	日本電子
根来誠	大阪大学大学院基礎工学研究科
根本直	産業技術総合研究所
野田康夫	関西学院大学理工学部
野田泰斗	東北大学工学研究科
野間弘昭	(独) 産業技術総合研究所
野村祐介	千葉工業大学
萩原祥子	日本大学大学院総合基礎科学研究科
朴ミンソク	日立製作所日立研究所
端健二郎	(独) 物質・材料研究機構

橋本真一	東北大学特定領域研究推進支援センター
畑中稔	ブルカー・バイオスピン株式会社
服部峰之	(独) 産業技術総合研究所
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
林繁信	産業技術総合研究所
早水紀久子	独立行政法人産業技術総合研究所
原野陽子	大阪大学蛋白質研究所
原英之	ブルカー・バイオスピン株式会社
半田晋也	日本学術振興会特別研究員 PD(筑波大学大学院数理物質科学研究科)
樋口真理花	北海道大学生命科学院
平川慶子	日本医科大学 NMR 研究施設
平田清美	株式会社巴商会
廣瀬功治	ブルカー・バイオスピン株式会社
深澤隼	京大院理
福井陽子	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
福士江里	北海道大学大学院農学研究院
福地将志	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
福原忠雄	資生堂リサーチセンター
藤原敏道	大阪大学蛋白質研
藤原英明	大阪大学医学系研究科
藤原正子	東北大学大学院薬学研究科
二見紘史	千葉工業大学工学研究科生命環境科学専攻
降旗一夫	東京大学大学院・農学生命科学研究科
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
古市英資	筑波大学大学院数理物質科学研究科化学専攻
古川裕理	筑波大学大学院数理物質科学研究科物質創成先端科学専攻
ベルヒリマーカス	ブルカー・バイオスピン株式会社
逸見光	農研機構・食品総合研究所
細田和男	前橋工科大学生命情報学科西川研
保母史郎	横浜市立大学大学院
堀井文敬	福井大遠赤外研究セ
堀内裕司	広島大学大学院理学研究科
堀口紅実子	農工大院工・科博
堀俊祐	防衛大学校応用化学科
本多尚	横浜市立大学
前田史郎	福井大学大学院工学研究科

真板(大野)綾子	京都大学工学研究科分子工学専攻生体分子機能化学講座
前野覚大	近畿大学大学院生物理工学研究科
増田慧子	千葉工業大学構造生物学研究室
増本秀史	筑波大学数理物質科学研究科
待井豊	筑波大学数理物質科学研究科
松井茂	筑波大学物理工学系
松川真吾	東京海洋大学海洋科学部
松永達弥	京大院理学部分子構造化学研究室
松原康史	三菱化学株式会社イノベーションセンター横浜センター
松本一史	京都大学大学院理学研究科化学専攻分子構造化学研究室
松森信明	大阪大学大学院理学研究科
丸吉京介	第一三共株式会社
三上真一	筑波大学大学院数理物質科学研究科
水関和哉	筑波大学大学院数理物質科学研究科化学専攻
三田雅典	株式会社村田製作所野洲事業所
水野敬	日本電子株式会社
水野元博	金沢大学大学院自然科学研究科
三森文行	国立環境研究所
宮崎泰斗	筑波大学大学院数理物質科学研究科
宮ノ入洋平	名古屋大学
三好利一	産業技術総合研究所
関庚薫	旭硝子(株)
村上美和	物質・材料研究機構
村木裕	山田化学工業株式会社
村田恵介	千葉工業大学工学専攻科
村田道雄	大阪大学大学院理学研究科
目谷太樹	千葉工業大学
最上祐貴	京都大学理学部化学科分子構造化学
森田翔	群馬大学大学院工学研究科
守谷潤	エーザイ株式会社
八島秀仁	ブルカー・バイオスピン株式会社
柳澤吉紀	千葉大学
山内一夫	東京農工大学大学院共生科学技術研究院
山口秀幸	味の素株式会社
山崎俊正	農業生物資源研究所
山田啓太	京都大学理学部分子構造研究室

山路俊樹	独立行政法人産業技術総合研究所
山延健	群馬大学大学院工学研究科
山本昭彦	ブルカー・バイオスピン株式会社
山本泰彦	筑波大学大学院数理物質科学研究科
横田信三	宇都宮大学農学部森林科学科
吉田愛	東京農工大学工学部朝倉研究室
吉田充	農研機構食品総合研究所
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
吉水広明	名古屋工業大学大学院
米持悦生	東邦大学薬学部
若松馨	群馬大学大学院工学研究科
渡辺啓介	東京工業大学大学院理工学研究科
渡辺直樹	筑波大学自然学類
渡邊英宏	国立環境研究所化学環境研究領域