

第48回 NMR 討論会

The 48th Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

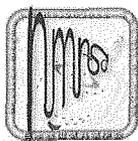
講演要旨集

— Abstracts —



会期 | 2009年11月10日(火), 11日(水), 12日(木)
November 10(Tue) - 12(Thu), 2009

会場 | 九州大学馬出病院キャンパス医学部百年講堂
Centennial Hall, Kyushu University Faculty of Medicine
〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1, Tel: 092-642-6257



主催: 日本核磁気共鳴学会

共催: 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

第48回NMR討論会の開催にあたって

運営委員長

こうだ
神田大輔
(九州大学)

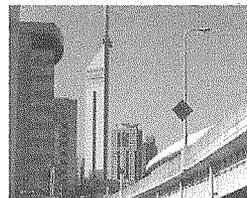


第48回NMR討論会を福岡で開催いたします。第46回札幌討論会および第47回つくば討論会で採用された「1つの会場を使うスタイル」を本年も踏襲し、すべての参加者が一同に会して議論をできるようにいたします。会場として使用する九州大学医学部百年講堂は地下鉄からのアクセスも良く、また十分な大きさと設備を備えています。是非、多くの方々に参加と発表をいただき、白熱した討論をお願いいたします。

例年どおり、若手口頭発表・若手ポスター賞表彰とチュートリアルコースを行います。核磁気共鳴分野の若手、大学院生、学生の方に、絶好の機会を活かして積極的に参加していただきたく思います。

福岡NMR討論会シンボルマークの説明

福岡タワー（右図）はその特徴的な外観から、福岡市のシンボリック的存在になっています。福岡タワーを中心に配置し、核スピンのダイナミックな動きを表しました。



第48回NMR討論会 運営委員会

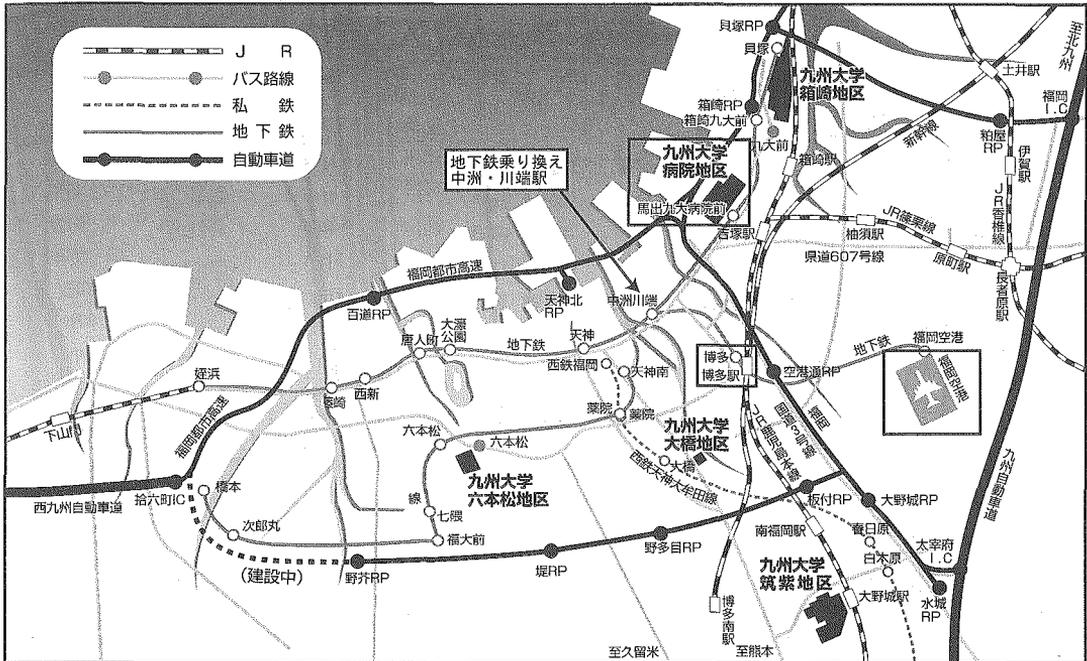
委員長 神田 大輔 (九州大学・生体防御医学研究所)

委員 (アイウエオ順)

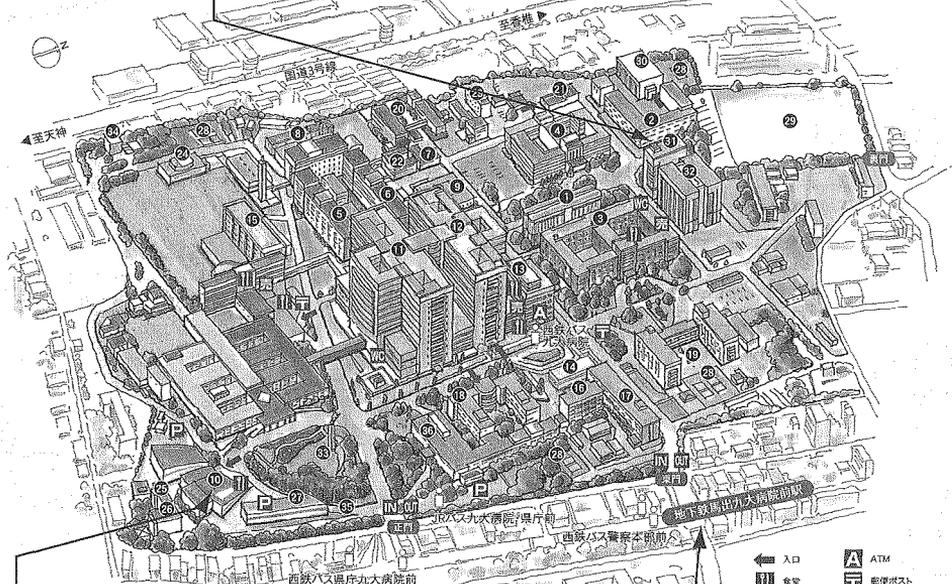
| | |
|-------|-------------------|
| 阿部 義人 | (九州大学・薬学研究院) |
| 植田 正 | (九州大学・薬学研究院) |
| 斉藤 貴士 | (九州大学・生体防御医学研究所) |
| 菅瀬 謙治 | (サントリー生物有機科学研究所) |
| 楯 真一 | (広島大学・大学院理学研究科) |
| 寺沢 宏明 | (熊本大学・大学院医学薬学研究部) |
| 廣明 秀一 | (神戸大学・大学院医学研究科) |

会場への交通案内とキャンパスマップ

NMR 討論会会場：九州大学馬出病院キャンパス医学部百年講堂
 チュートリアル会場：九州大学馬出病院キャンパスコラボステーション I
 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1



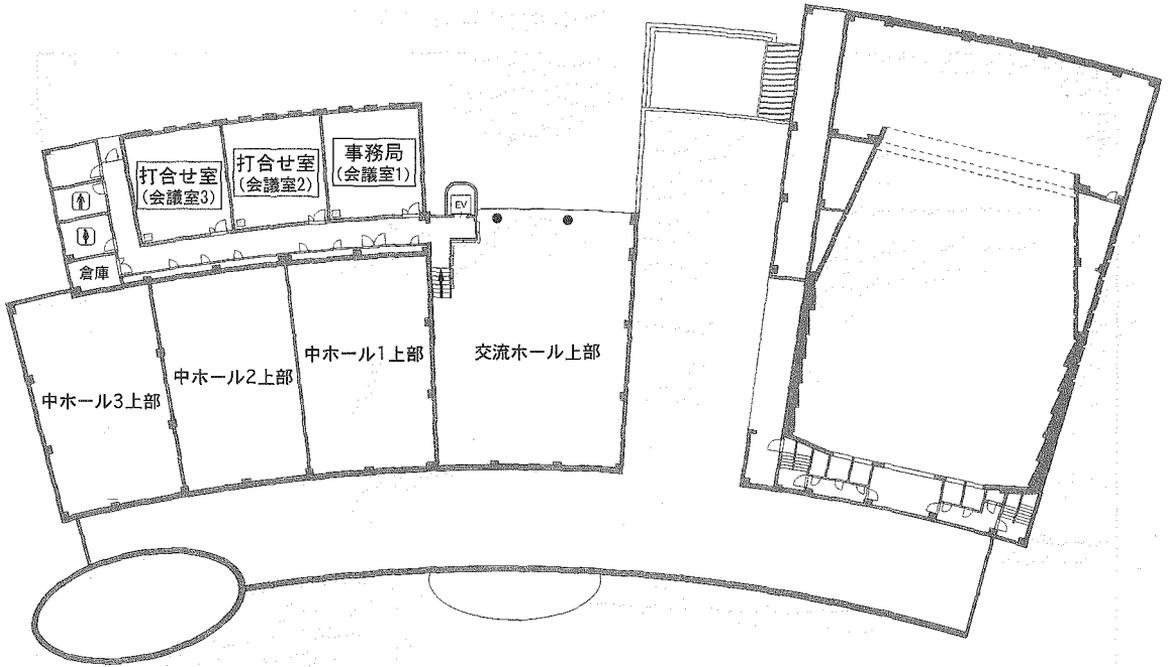
⑩ チュートリアル会場, コラボステーション I Tutorial Course, Venue, Station-1 for Collaborative Research



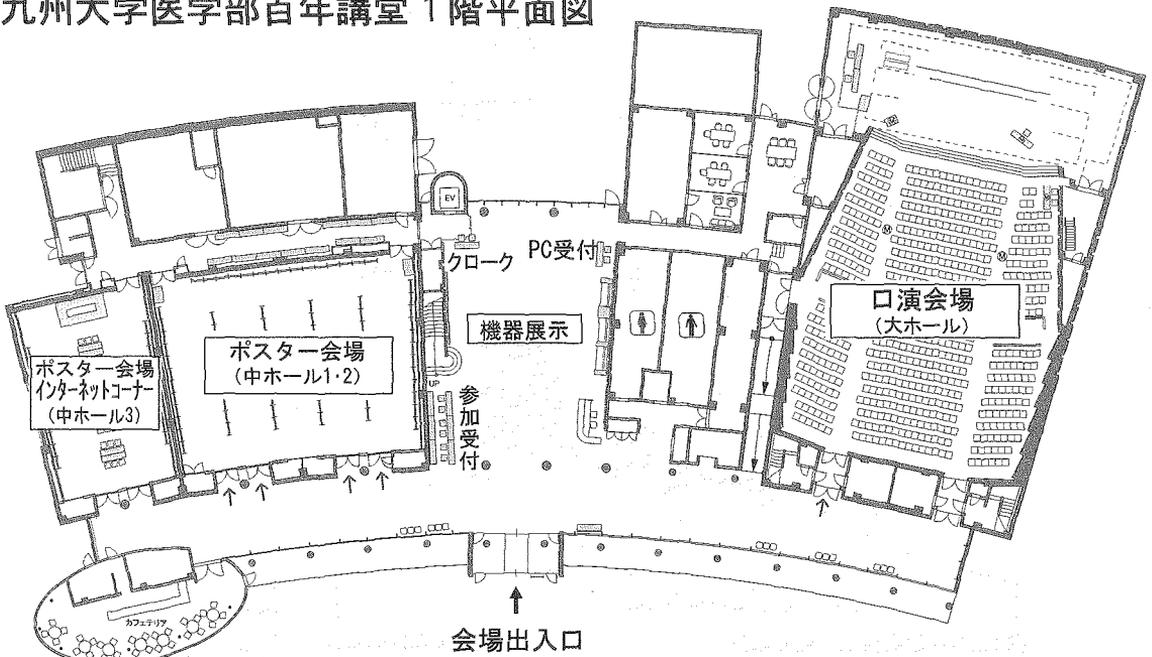
⑩ NMR 討論会会場, 百年講堂
 Annual Meeting Venue, Centennial Hall
 地下鉄駅, 馬出九大病院前
 Subway Station
 Maidashi-kyudaihyoinmae

会場の案内図

九州大学医学部百年講堂 2階平面図

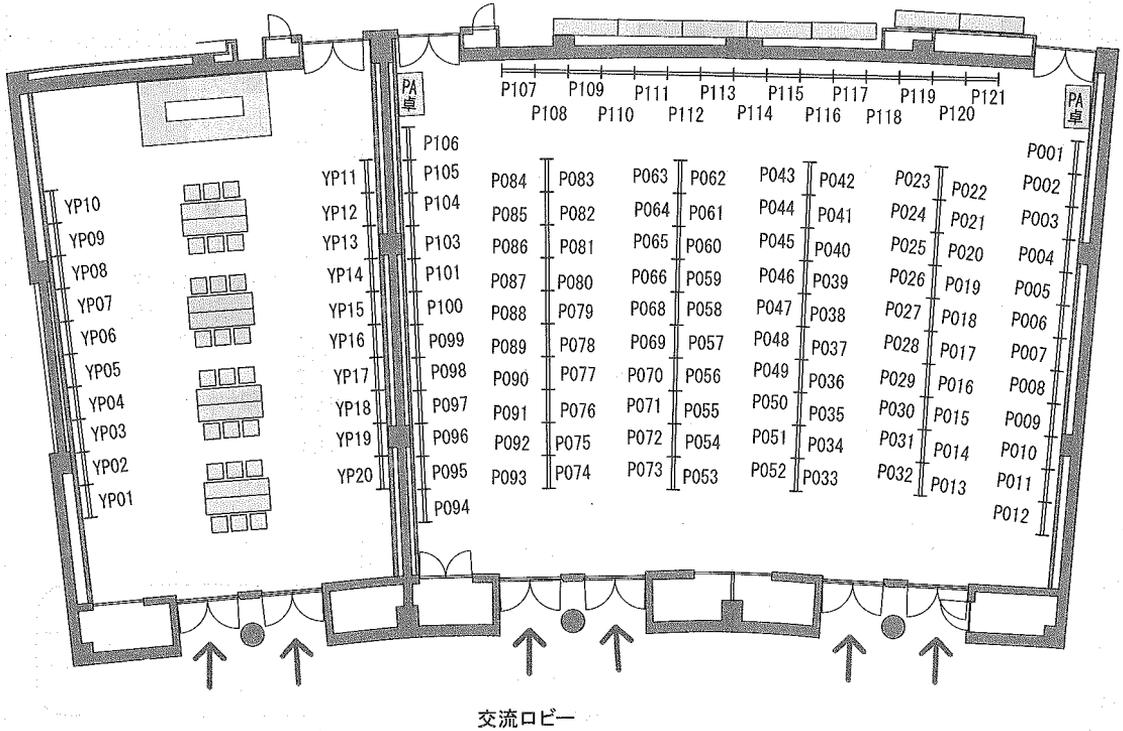


九州大学医学部百年講堂 1階平面図

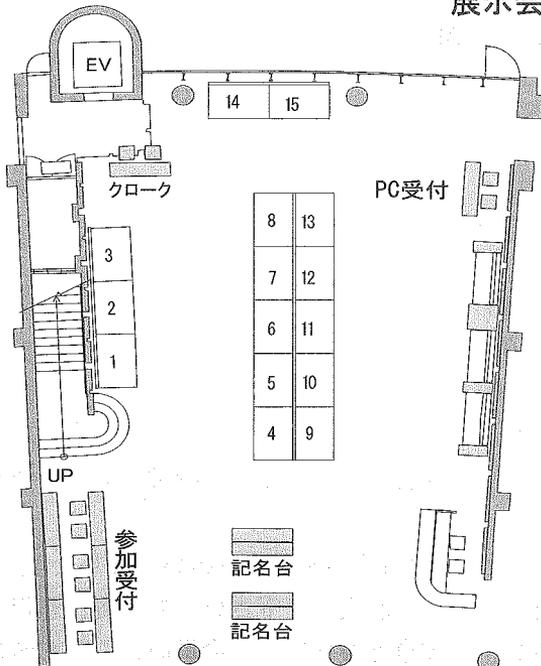


ポスター・展示会場詳細図

ポスター番号とパネル配置図(百年講堂中ホール1+2)



展示会場詳細図



| 小間番号 | 出展者名 |
|--------|-------------------------|
| 1 | SIサイエンス株式会社 |
| 2 | 株式会社シゲミ |
| 3 | セティ株式会社 |
| 4, 5 | ブルカー・バイオスピン株式会社 |
| 6 | 株式会社エムアールテクノロジー |
| 7, 8 | バリアン・テクノロジーズ・ジャパン・リミテッド |
| 9 | 大陽日酸株式会社 |
| 10 | 株式会社エルエイシステムズ |
| 11 | 株式会社フレックス |
| 12, 13 | 日本電子株式会社 |
| 14 | 大塚製薬株式会社 |
| 15 | 株式会社セルフフリーサイエンス |

討論会日程表

| 時 | 11月10日(火) | | | | 11月11日(水) | | | | 11月12日(木) | | | |
|----|-------------------|----------------------|-------|--------------|----------------------------------|-------|-------|---------------|---|----------------------|-------|--------------|
| | 大ホール | 中ホール | 玄関ホール | 会議室2 (2階) | 大ホール | 中ホール | 玄関ホール | 会議室2 (2階) | 大ホール | 中ホール | 玄関ホール | 会議室2 (2階) |
| 9 | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 一般 口演 | 休憩 | | | Oral 2L1 } 2L6 | Break | | | 一般 口演 (一部英語) | 休憩 | | |
| 11 | 1L1 } 1L6 | | 展示 | | | | | | 3L1 } 3L6 | | 展示 | |
| 12 | 総会 | | | | | | | | | | | |
| 13 | 昼食 | | | | 昼食 | | | | 昼食 | | | |
| | | | | | | | | 新評議員会 新理事会 | | | | |
| 14 | | ポスター 発表 (偶数番号) | | | | | | | | ポスター 発表 (奇数番号) | 展示 | |
| 15 | | | 展示 | | Oral 2L7 } 2L12 | Break | | | | | | |
| 16 | 若手ポ スター 賞口演 | | | | | | | | | 一般 口演 | 休憩 | |
| 17 | YP01 } YP20 | 休憩 | | | | | | | | 3L7 } 3L11 | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | |
| 19 | | | | | バスで移動 | | | | | | | |
| 20 | | | | 評議員会 | 懇親会(水族館) Banquet 若手ポスター賞表彰 | | | | | | | |
| 21 | | | | | バスで移動 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | チュートリアルコース 11月9日(火) 13:00-18:00 九州大学馬出病院キャンパス コラボステーション1 | | | |

参加者へのご案内

1. 受付と参加登録

◇受付

受付は百年講堂1階の入り口に設けます。

受付時間： 11月10日(火) 8:30～18:30
 11月11日(水) 8:30～18:00
 11月12日(木) 9:00～17:30

- ・事前登録された方で、参加費を支払い済みの方には、要旨集といっしょに、参加章(名札)をお送りしています。
- ・事前登録された方であっても、参加費の振り込みがない場合は当日参加登録扱いとなります。
- ・当日参加の方は受付デスクにお越し下さい。当日参加用紙に記入して下さい。参加費と懇親会費(懇親会に出席する場合)を現金でお支払い下さい。参加章と要旨集(非会員の方)をお渡します。

| 当日参加 | 会 員 | | 非 会 員 | |
|------------|--------|--------|---------|----------|
| | 正会員 | 学生会員 | 一 般 | 大学院生・大学生 |
| 年 会 参加費 | ¥4,000 | ¥2,000 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| 懇親会 | ¥6,000 | ¥4,000 | ¥6,000 | ¥4,000 |

◇ 参加章 (名札)

参加章に所属と氏名を各自で記入し、大会会場では必ずご着用下さい。参加章のない方のご入場は固くお断りいたします。

◇ 領収書の発行

参加章に印刷されている領収書をお使い下さい。それ以外の領収書が必要な方は、参加章を持参して会場の受付デスクへお越し下さい。

◇ 講演予稿集

講演予稿集は日本核磁気共鳴学会会員に事前送付されます。残部がある場合に限り、一冊につき5,000円で受付にて当日販売を行います。

討論会終了後は、予稿集本文が第48回NMR討論会ホームページで公開されます。

◇ 学会費の支払いと入会手続き

日本核磁気共鳴学会の本年度の学会費を未納の場合は、受付に設置する日本核磁気共鳴学会の受付でお支払い下さい。また、日本核磁気共鳴学会への入会も受け付けます。

2. 会場内のサービス・施設

◇ クローク

百年講堂の1階に開設するクロークにてお荷物をお預かりします。ただし、貴重品やコンピューターなどについては、破損、紛失などの責任は負いかねますので、各自でお持ち下さい。

| | | |
|------|-----------|--------------|
| 利用時間 | 11月10日(火) | 8:30 ~ 19:00 |
| | 11月11日(水) | 8:30 ~ 18:30 |
| | 11月12日(木) | 9:00 ~ 17:30 |

◇ 昼食

昼食は百年講堂のカフェテリア (ホテルニューオータニ博多直営)、九州大学病院レストラン、九州大学生協食堂があります。またキャンパスの外にもロイヤルホストなど食事をするところがあります。当日配布する昼食マップをご覧ください。

◇ インターネットコーナー

1階中ホール3に有線LAN接続のインターネットコーナーを設置します。コンピューターの用意はしませんので、各自ご持参下さい。

3. 年会についての問い合わせ

◇会期中

討論会会場本部 九州大学医学部百年講堂 2階会議室 1
〒 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

◇会期外

討論会事務局

〒 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1
九州大学 生体防御医学研究所 ワクチン開発構造生物学分野
第 48 回 NMR 討論会事務局
実行委員長：神田大輔（こうだだいすけ）
Tel: 092-642-6968/6833, Fax:092-642-6764
E-mail: nmr48@bioreg.kyushu-u.ac.jp

討論会参加登録事務局

〒 810-0072 福岡市中央区長浜 1-1-35 新 KBC ビル 9 階
株式会社 ICS コンベンションデザイン 九州支局
TEL: 092-751-3244, FAX: 092-751-3250
E-mail: nmr48@ics-inc.co.jp

4. 発表者へのご案内

◇座長の方へ

受付：座長の方は、担当時間の 10 分前までに「座長席」までおいで下さい。

進行：進行は座長に一任いたします。ただし、例年、終了時間が延びる傾向にありますが、口演時間終了後には会議や懇親会などが予定されております。質疑応答などにおいてインシアティブをとっていただき、終了予定時間を厳守していただくようお願い申し上げます。

◇口演者の方へ

受付：口演者の方は、口演前の休憩時間までに、「PC 受付」に口演に使用するコンピューターを持っておいで下さい。ただし、若手ポスター賞口演の方は、共通の PC に発表用データを移すための CD-ROM または U S B フラッシュメモリを持って来て下さい。

口演時間：進行は座長に一任されています。持ち時間は特別講演 45 分、一般口演 20 分、若手ポスター賞口演 10 分です。ベルの鳴動時刻は以下のとおりです。

| | 一鈴 | 二鈴(発表終了) | 三鈴(質疑終了) |
|----------------|------|----------|----------|
| 招待講演と特別講演 | 35 分 | 40 分 | 45 分 |
| 一般口演(日本語または英語) | 13 分 | 15 分 | 20 分 |
| 若手ポスター賞口演 | 6 分 | 7 分 | 10 分 |

口演方法：招待講演，特別講演，および一般口演（日本語と英語）の方は，液晶プロジェクターを用いたプレゼンテーションのみとなります。口演に使用するコンピューターは各自でお持ち込みください。音声出力には対応していません。バッテリー切れに備えて，必ず電源アダプターをご持参ください。液晶プロジェクターとの接続はD-sub15ピンとなります。一部のノートパソコン（特にMacintosh）では専用の変換ケーブルが必要となりますので，必ずご持参下さい。バックアップ用として，発表データをCD-ROMあるいはUSBフラッシュメモリで持参して下さい。

若手ポスター賞口演の方は，会場で用意するPC*に事前に発表用データをコピーしていただきます。11月10日（火）13:30までに，CD-ROMあるいはUSBフラッシュメモリを「発表者受付」までご持参下さい。

* Windows と Mac を一台ずつ用意します。Windows は OS Vista 32bit でパワーポイント 2007，Mac は OS X 10.5 でパワーポイント 2008 を使用します。なお，キーノートは使用できません。

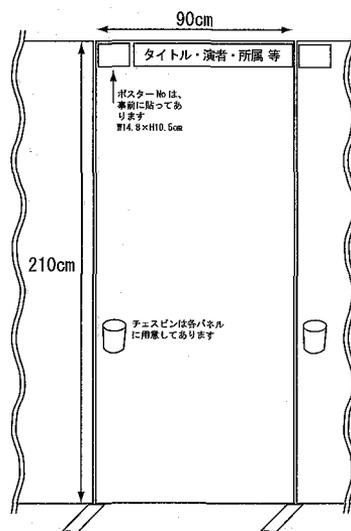
◇ ポスター発表の方へ

提示期間：ポスターは会期中の貼り替えは行いません。すべての発表ポスターは，11月10日（火）9:00 から 11:00 の間に掲示し，11月12日（木）15:00 から 18:00 の間に取り外してください。ポスターの撤去時刻を過ぎても取り外されないポスターは事務局で廃棄します。

ポスターの発表：ポスター番号の偶数番号（P002, P004,...）および若手ポスター賞候補者（YP01-YP20）は11月10日（火）13:30-15:00 にポスター討論を行ってください。奇数番号（P001, P003,...）は11月12日（木）13:30-15:00 にポスター討論を行ってください。討論の時間には，必ずポスターの前に立ち，質問と討論に応じて下さい。

展示場所：ポスター会場は1階中ホールです。演題番号の下三桁の数字の表示されたパネルに展示して下さい。

展示スペース：ポスターパネルサイズは縦210 cm x 横90 cm です。A0サイズでは横幅は84cmになります。左上隅20 cm四方のスペースに演題番号を表示してあります。画鋲は各ポスターパネルに用意します。発表代表者の氏名には左肩に小さな○印を付けて下さい。3 m離れた位置からでも，十分に読める文字の大きさを用いて下さい。図や表もできるだけ大きくして下さい。



5. 第48回日本核磁気共鳴学会 総会開催通知

日時：2009年11月10日（火）12:00～12:30

場所：九州大学医学部百年講堂大ホール

第48回日本核磁気共鳴学会総会を開催いたします。主な議題は下記の通りです。是非、ご出席下さい。

都合で出席できない方は委任状を総会開始前に、メールにて nmr48@bioreg.kyushu-u.ac.jp 宛にご提出下さい。また、委任状は討論会受付にも用意します。総会開始前に受付にご提出下さい。

議長 会長 阿久津 秀雄

総会議題 報告、承認事項

- 1) 開会の辞
- 2) 会長の挨拶
- 3) 討論会世話人の挨拶
- 4) 前年度活動報告、前年度決算の承認
- 5) 今年度活動報告、今年度予算執行中間報告
- 6) 次年度活動方針の提案、次年度予算の提案
- 7) 新評議員の承認
- 8) 会則変更の提案
- 9) 名誉会員の推戴の提案
- 10) その他
- 11) 次回 NMR 討論会世話人挨拶
- 12) 閉会の辞
- 13) その他

6. 理事会・評議委員会の案内

| | | |
|--------|------------------|------------------|
| 理事会 | 11月9日（月）18:30より | コラボステーションIの1階会議室 |
| 評議員会 | 11月10日（火）18:45より | 百年講堂2階会議室 |
| 新評議委員会 | 11月11日（水）12:10より | 百年講堂2階会議室 |
| 新理事会 | 11月11日（水）引き続いて | 百年講堂2階会議室 |

◇いずれも、食事の用意があります。



第48回NMR討論会

The 48th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan



会期： 2009年11月10日(火), 11日(水), 12日(木)
November 10 (Tue.) - 12 (Thu.), 2009
会場： 九州大学馬出病院キャンパス医学部百年講堂
Centennial Hall, Kyushu University Faculty of Medicine
〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1, Tel: 092-642-6257

第1日目 (11月10日(火)) / Day 1 (Nov. 10, Tue.) 日本語セッション / Japanese session

9:25~9:30

開会の挨拶 阿久津 秀雄 (日本核磁気共鳴学会会長)

9:30~10:30

座長 阿久津 秀雄

- 1 L 1 ランタノイドプローブを用いたタンパク質複合体の立体構造解析
PCS-based structure determinations of protein-protein complexes
○斉尾智英¹、横地政志²、久米田博之²、稲垣冬彦² (¹北海道大学大学院生命科学院, ²北海道大学大学院薬学研究所)
- 1 L 2 磁場配向性錯体による残余双極子相互作用の誘起
Induction of Residual Dipole Couplings by Magnetically Aligned Coordination Complexes
○佐藤宗太¹、諸原理¹、山口芳樹^{2,3}、加藤晃一^{2,4,5}、藤田 誠^{1,5} (¹東大院工、²名市大院薬、³理化学研究所、⁴分子科学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター、⁵CREST)
- 1 L 3 プリオンタンパク質構造変換におけるホットスポットと抗プリオン病化合物
Hot spot for pathogenic conversion of prion protein and anti-prion compounds
○鎌足雄司、早野陽介、木村力、武藤淳二、石倉孝一、山本典文、山口圭一、桑田一夫 (岐阜大学人獣感染防御研究センター)

10:30~10:50 休憩 / Coffee break

10:50~11:50

座長 児嶋 長次郎

- 1 L 4 45 kDa セリン/スレオニンキナーゼの NMR 構造解析
Structure analysis of 45 kDa protein kinase using NMR spectroscopy
○栃尾尚哉¹、小柴生造^{1,2}、横山順³、横山茂之^{1,4}、Yoon Ho Sup⁵、木川隆則^{1,6} (¹理研・生命分子システム基盤、²横浜市大・院生命ナノシステム、³太陽日酸、⁴東大・院理、⁵SBS, NTU、⁶東工大・院総理工)
- 1 L 5 NDSB 類が蛋白質のダイナミクスに及ぼす効果
Effects of non-detergent sulfobetaines on the dynamic structure of proteins
○若松馨、王海梅、松井文香、神谷歩、加藤瀬里、行木信一、菅瀬謙治 (群馬大学大学院工学研究科, サントリー-生物有機科学研究所)
- 1 L 6 時間領域データの共有再構成を用いた T2 計測による定量的ヒト脳内 2D CT-PRESS 法
Quantitative 2D Constant Time PRESS in human brain by T2 correction using 2D FT of shared time domain data
○渡邊 英宏、高屋 展宏、三森 文行 (国立環境研究所)

12:00~12:30

日本核磁気共鳴学会総会

Meeting of the NMR Society of Japan

12:30~13:30

昼食 / Lunch

13:30~15:00

ポスターセッション (偶数番号)

Poster presentations (even numbers)

若手ポスター賞ポスター発表審査

Poster presentations for Young Scientists Poster Awards

15:00~18:35

若手ポスター賞口頭発表審査

Oral presentations for Young Scientists Poster Awards

15:00~15:50

座長 朝倉 哲郎, 藤原 敏道

- Y P 0 1 クモ牽引糸、野蚕絹糸間の著しい物性の違いと関連するポリアラニン領域の異なる分子間 β 構造の発現
Difference in the β -sheet packing arrangements of polyalanine regions in spider and wild silkworm silks with different physical properties
○亀谷俊輔¹、山内一夫¹、朝倉哲郎^{1,2} (¹農工大院工、²農工大科学博物館)
- Y P 0 2 固体 NMR による抗菌ペプチド bovine lactoferrampin の細菌模倣膜中における動的構造解析
Dynamic structure of bovine lactoferrampin in mimetic bacterial membranes as studied by solid-state NMR
○堤 敦史¹、吉良 敦史²、梅山 万左子¹、川村 出¹、内藤 晶¹ (¹横国大・院工、²株式会社アルバック)
- Y P 0 3 Implicit membrane model を用いた分子動力学計算と固体 NMR スペクトルシミュレーションによる膜結合ペプチド・マストパランXの構造解析
Structural Analysis of Membrane-bound Peptide, Mastoparan-X by Molecular Dynamics using Implicit Membrane Model and Solid-state NMR Spectral Simulation
○池田恵介¹、亀田倫史²、原田英里砂¹、阿久津秀雄¹、藤原敏道¹ (¹阪大・蛋白研、²産総研・CBRC)
- Y P 0 4 二重共鳴マジック角コイル回転の研究開発
Implementation of double resonance magic angle coil spinning experiments
○犬飼宗弘、武田和行 (京都大学大学院理学研究科)
- Y P 0 5 ²H MAS NMR による電気伝導性有機錯体(EDO-TTF)₂PF₆の研究
²H MAS NMR Study of a Conductive Organic Complex (EDO-TTF)₂PF₆
○松永 達弥¹、水野 敬^{2,3}、中野 義明⁴、矢持 秀起¹、今城 文雄¹、竹腰 清乃理^{1,3} (¹京大院理、²日本電子、³CREST/JST、⁴京大低物セ)

15:50~17:00

座長 池上 貴久, 伊藤 隆

- Y P 0 6 超 1GHz 高温超伝導 NMR システムの開発 - 高温超伝導 500MHz NMR における固体 NMR の磁場安定化手法 -
Towards an HTS NMR spectrometer beyond 1GHz - Field stabilization method for solid state NMR in a 500MHz HTS NMR -
○高橋雅人^{1,2}、海老澤佑輔²、天明宏之助²、斉藤雄太³、高尾智明³、細野政美⁴、濱田衛⁵、山田和彦⁶、木吉司⁷、山崎俊夫¹、前田秀明^{1,2} (¹理化学研究所 SSBC、²横浜市立大学、³上智大学、⁴日本電子、⁵神戸製鋼所、⁶東京工業大学、⁷物質・材料研究機構)
- Y P 0 7 500MHz 高温超伝導 NMR 分光器による溶液 NMR 計測；超 1GHz NMR に向けて
Solution NMR measurements with a 500 MHz HTS NMR spectrometer; Towards a beyond 1 GHz NMR spectrometer
○柳澤吉紀^{1,2}、中込秀樹²、細野政美³、濱田衛⁴、吉川正敏⁵、大塚昭弘⁵、木吉司⁶、天明宏之助⁷、渡辺健太⁷、山崎俊夫¹、高橋雅人^{1,7}、前田秀明^{1,7} (¹理研 SSBC、²千葉大院・工学研究科、³日本電子、⁴神戸製鋼所、⁵JASTEC、⁶物質・材料研究機構、⁷横浜市大院)
- Y P 0 8 MRI による地盤液化状態モデル系におけるレイリー・テイラー不安定性の可視化
Visualization of the Rayleigh-Taylor instability in a soil liquefaction model system using magnetic resonance imaging
○小林恭平¹、石川堯洋¹、巨瀬勝美¹、半田晋也²、納口恭明³ (¹筑波大・数理物質科学研究科、²日本学術振興会特別研究員、³独立行政法人 防災科学技術研究所)

- Y P 0 9 三次元ファントムを用いたMRIにおける静磁場電流シミング手法の開発
Static magnetic field shimming for MRI using a geometrically specified 3D phantom
○繁木良介¹、安達聖¹、半田晋也²、巨瀬勝美¹ (筑波大学 数理物質科学研究科・電子物理工学専攻、²日本学術振興会特別研究員PD)
- Y P 1 0 FPGA ボードを用いた MRI 用パルスプログラマーの開発
Development of an MRI Pulse Programmer Using an FPGA board
○玉田大輝¹、半田晋也²、巨瀬勝美³ (筑波大学第三学群工学基礎学類、²日本学術振興会特別研究員 PD(国立環境研究所)、³筑波大学大学院数理物質科学研究科)
- Y P 1 1 地磁気 NMR における偏極法による高感度化
Sensitivity enhancement of the Earth's magnetic field NMR using polarization method
○赤羽英夫、渡邊翔大、糸崎秀夫 (大阪大学大学院基礎工学研究科)
- Y P 1 2 塩酸塩に含まれるアミノ基の窒素分子 NQR 物性評価
NQR Properties of nitrogen in amino group contained in salt of hydrochloride
○稲垣大介、赤羽英夫、糸崎秀夫 (大阪大学大学院基礎工学研究科)
- 17:00~17:15 休憩 / Coffee break
- 17:15~18:35
座長 河合 剛太, 若松 馨
- Y P 1 3 タイワンカブトムシ(*Oryctes rhinoceros*)由来オリクチンの溶液 NMR 構造解析・機能解析
NMR structure analysis of ORYCIN from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*, led to its functional characterization as a novel serine protease inhibitor
○堀田彰一朗¹、石橋純²、永田宏次¹、宮川拓也¹、山川稔^{2,3}、田之倉優¹ (東大・院・農生科、²生物研・生体防御、³筑波大・院・生命環境科学)
- Y P 1 4 アサイメントフリーな NMR 相互作用解析による蛋白質複合体構造の迅速決定
Rapid determination of protein complex structure by assignment-free NMR approach
○小玉優哉^{1,2,3}、Michael L. Reese⁴、榛葉信久²、Volker Dötsch⁵、鈴木榮一郎²、嶋田一夫^{3,6}、高橋栄夫³ (バイオ産業情報化コンソーシアム、²味の素(株)、³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、⁴Stanford University、⁵University of Frankfurt、⁶東大・院薬系)
- Y P 1 5 リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の立体構造と運動性
Structure and Dynamics of Lipocalin-type Prostaglandin D synthase
○加藤 信幸¹、島本 茂^{1,2}、圓尾 廣子¹、吉田 卓也¹、乾隆³、宮本 優也^{2,3}、小林 祐次⁵、藤森 功^{4,5}、鶴村 俊治⁴、有竹 浩介⁴、裏出 良博⁴、大久保 忠恭¹ (大阪大学大学院薬学研究科、²(独)学振特別研究員 DC、³大阪府立大学大学院、⁴大阪バイオサイエンス研究所、⁵大阪薬科大学)
- Y P 1 6 分子シャペロンカプセル化システムの構築
Construction of the Chaperonin Encapsulation System
○増原泰英¹、田中慎治¹、河田康志²、松崎勝巳¹、星野大¹ (京都大学大学院薬学研究科、²鳥取大学院工学研究科・医学研究科)
- Y P 1 7 化学交換を利用したアミロイドβタンパク質の過渡的オリゴマー会合体の検出
Transient oligomeric states of amyloid-β protein revealed by chemical exchange
○山口貴宏¹、松崎勝巳¹、星野大¹ (京大院薬)
- Y P 1 8 オキシステロール結合タンパク質 OSBP の disorder 領域と小胞体膜貫通タンパク質 VAP-A との複体形成機構
NMR study of a mechanism for complex formation between a disordered region of OSBP and an ER membrane protein VAP-A
○古板恭子¹、Jee, JunGoo^{1,2}、深田はるみ³、三島正規^{1,4}、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、²首都大学東京 戦略研究センター、³大阪府立大学 生命環境科学研究科、⁴首都大学東京 理工学研究科)
- Y P 1 9 NMR に基づくマウス外分泌ペプチド ESP4 の解析：受容体特異的認識機構の解明にむけて
NMR analyses of mouse ESP4 to elucidate specific ligand-receptor recognition mechanism
○谷口 雅浩¹、吉永 壮佐¹、はが 紗智子²、東原 和成²、寺沢 宏明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)

18:45~

日本核磁気共鳴学会評議員会 (百年講堂2階会議室)

第2日目 (11月11日 (水)) / Day 2 (Nov. 11, Wed.)
英語セッション / English session

9:00~10:25

Chairperson: Akira Naito

2 L 1 **Intermediate conformer of the Lyme disease vaccine candidate OspA probed with variable pressure NMR spectroscopy**

○Ryo Kitahara^{1,2}, Alana Simorellis³, Shigeyuki Yokoyama^{2,4,5}, Shohei Koide⁶, Kazuyuki Akasaka⁷ (¹Pharm. Sci. Ritsumeikan Univ., ²RIKEN-Harima, ³Dep.Chemi.Univ. Utah, ⁴RIKEN SSBC, ⁵Univ. Tokyo, ⁶Dep.Biochem. & Mol. Biol. Univ. Chicago, ⁷High Pressure Protein Research Center Kinki Univ.)

2 L 2 *Invited Lecture 1*

Structural Studies of Membrane Proteins Using NMR Experiments on Bicelles

Ayyalusamy Ramamoorthy (University of Michigan)

2 L 3 **Nuclear spin polarization of alkali-salts by optically-pumping atomic vapor**

Kiyoshi Ishikawa (Graduate School of Material Science, University of Hyogo)

10:25~10:45

Coffee break / 休憩

10:45~12:10

Chairperson: Ichio Shimada

2 L 4 *Invited Lecture 2*

Allosteric Effects on Ubiquitin Ligase Activity by a Novel E2 Binding Region: Integration of NMR, Crystallography, and Molecular Biology

R. Andrew Byrd (National Cancer Institute, Frederick)

2 L 5 **In-Cell NMR studies for intermolecular interactions and folding stability of proteins inside human cells**

○Kohsuke Inomata, Ayako Ohno, Hidehito Tochio, Shin Isogai, Takeshi Tenno, Ikuhiko Nakase, Toshihide Takeuchi, Shiroh Futaki, Yutaka Ito, Hidekazu Hiroaki, Masahiro Shirakawa (Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University,; CREST, JST,; Division of Structural Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University,; Institute for Chemical Research, Kyoto University,; SORST, JST)

2 L 6 *Honorary Lecture*

From Structural Chemistry to Structural Biology

Fuyuhiko Inagaki (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

12:10~13:45

昼食 / Lunch

(12:10~13:35 新評議員会と新理事会 (百年講堂2階会議室))

13:45~15:10

Chairperson: Masatsune Kainosho

2 L 7 *Invited Lecture 3*

The choreography of an enzyme's dance

Dorothee Kern (Brandeis University)

2 L 8 **Ligand-induced protein structural change revealed by orientation induced TROSY shift changes**
Shin-ichi Tate (Hiroshima University)

2 L 9 *Invited Lecture 4*
NMR investigation of the iron-ligated histidines of the Rieske protein from *Thermus thermophilus* supports a coupled proton and electron transfer mechanism
John Markley (University of Wisconsin, Madison)

15:10~15:30 Coffee break / 休憩

15:30~17:20

Chairperson: Takehiko Terao

2 L 1 0 *Invited Lecture 5*
Sensitivity and Structures in Solid-State NMR: Challenges in Characterization of Amyloid Misfolding and Graphite-based Nano-materials
Yoshitaka Ishii (University of Illinois at Chicago)

2 L 1 1 **Photoilluminated and pressure induced isomerization of retinal in retinal proteins and the structural changes of proteins as studied by solid-state NMR**
○Akira Naito¹, Kazuhiro Ohsawa¹, Hirohide Nishikawa¹, Akimori Wada², Naoki Kamo³, Izuru Kawamura¹
(¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, ²Kobe Pharmaceutical University, ³Faculty of Pharmaceutical Science, Matsuyama University)

Chairperson: Fumiyuki Mitsumori

2 L 1 2 *Invited Lecture 6*
Travelling-wave NMR and MRI
Klaas Prüssmann (University of Zürich)

18:00~

by chartered bus / バスで会場まで移動

19:00~21:00

Banquet / 懇親会 (Marine World Umino-nakamichi (aquarium) / 水族館マリンワールド海の中道)

21:00~

by chartered bus / バスで天神と博多まで移動

第3日目 (11月12日 (木)) / Day 3 (Nov. 12, Thu.)
日本語セッション (一部英語) / English & Japanese sessions

9:30~10:30

座長 廣明 秀一 / Chairperson: Hidekazu Hiroaki

3 L 1 一次元スペクトルの二次元処理
2D Analysis of 1D Spectrum
○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(元)国立精神・神経センター神経研究所、³実行データシステム(株))

3 L 2 超偏極希ガス NMR/MRI の研究開発: 高効率生成装置と多孔質材料ポア評価
Development of Hyperpolarized Noble Gas NMR/MRI: Efficient Polarizer and Characterization of Porous Materials
○服部峰之、平賀隆、秦信宏、早水紀久子、田中亮、大竹紀夫 ((独)産業技術総合研究所、東横化学(株))

CTUC

3 L 3 *English presentation*

Structure and dynamics of proteins at work inside cells

○Yutaka Ito, Junpei Hamatsu, Tomomi Hanashima, Masaki Mishima, Tsutomu Mikawa, Markus W?lchli, Brian O. Smith, Masahiro Shirakawa, Teppei Ikeya, and Peter G?ntert (Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; CREST/JST; Research Group for Bio-supramolecular Structure-Function, RIKEN; Bruker BioSpin; Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of Glasgow; Department of Molecular Engineering)

10:30~10:50 Coffee break / 休憩

10:50~11:50

Chairperson: Koichi Kato

3 L 4 *English presentation*

Structure and functions of domains of transcription factors studied by NMR spectroscopy and SPR analyses. --Analyses of the proteins with GST-tag

○Shunsuke Meshitsuka¹, Takahisa Ikegami², Hiroshi Hirota³, Kazuya Yamada⁴, Tamio Noguchi⁵, Yuki Horie¹, Kazuya Takahashi¹, Ojeiru F. Ezomo¹ (¹Tottori University Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, ²Osaka University Institute for Protein Research, ³Riken, ⁴Matsumoto University, ⁵Osaka Ohtani University)

3 L 5 *English presentation*

Relaxation analysis for clarifying the molecular mechanism of zinc ion concentration sensing by SmtB, a cyanobacterial transcription factor of Synechococcus PCC. 7942.

○Eugene Hayato Morita^{1,2}, Hidenori Hayashi^{3,4}, Shunnosuke Abe¹, Takahisa Ikegami⁵ (¹Faculty of Agriculture Ehime University, ²Venture Business Laboratory, Ehime University, ³Cell-Free Science and Technology Research Center, Ehime University, ⁴Faculty of Science, Ehime University, ⁵Institute for Protein Research, Osaka University)

3 L 6 *English presentation*

Real-time monitoring of enzymatic reaction and prion protein-RNA aptamer interaction

Ayako Furukawa, Tsukasa Mashima, Takashi Nagata, Ryuichi Sugiyama, Hiroshi Takaku, Fumiko Nishikawa, Satoshi Nishikawa and ○Masato Katahira (Yokohama City University, Chiba Institute of Technology, AIST)

11:50~13:30 昼食 / Lunch

13:30~15:00

ポスターセッション (奇数番号)

Poster presentations (odd numbers)

15:00~15:40

座長 竹腰 清乃理

3 L 7 新方式 NMR による世界最高感度実現

Achievement of the world's highest SNR by newly configured NMR with Superconducting Split-Magnet and Solenoidal RF Coil

○和久田毅¹, 川崎健司¹, 一木洋太¹, 朴ミンソク¹, 岡田道哉¹, 高妻孝光², 北口仁³ (¹日立製作所 日立研究所, ²茨城大学, ³物質・材料研究機構)

3 L 8 固体回転試料中の同種核多スピン系のスピン拡散: 拡散速度解析とその応用

Spin diffusion for homonuclear multi-spin systems in rotating solids: the analytical expression of the spin-diffusion rates and its applications

○桑原大介, 持田智行, 仁木國雄 (電気通信大学 研究設備センター, 神戸大学理学研究科, 電気通信大学 量子・物質工学科)

15:40~16:00 休憩 / Coffee break

16:00~17:00

座長 林 繁信

- 3 L 9 固体 ^{15}N NMR によるポリピロールの炭素化過程の研究
Carbonazation Process of Polypyrrole studied by SS ^{15}N NMR
○黒木重樹、川内進、尾崎純一、宮田清蔵（東京工業大学・院・理工・有機・高分子物質専攻、新エネルギー・産業技術総合開発機構）
- 3 L 1 0 ^{27}Al 固体 NMR による Al-MCM-41 の表面 Al 種の配位数変化の観測
Coordination Number Change of Surface Al Species on Al-MCM-41 Observed by ^{27}Al Solid-state NMR
○高橋利和、岩浪克之、林 繁信、坂倉俊康、安田弘之（産総研）
- 3 L 1 1 アンフォテリシン B イオンチャネル複合体における分子間相互作用の固体 NMR 解析
Solid-State NMR Studies on Intermolecular Interactions of Ion Channel Complex Formed by Amphotericin B
○松森信明、梅川雄一、多原主哲、土居幹嗣、大石徹、村田道雄（大阪大学大学院理学研究科）
-

17:00~17:05

閉会の挨拶 神田 大輔（第48回NMR討論会世話人代表）

チュートリアル Tutorial

前日 (11月9日(月)) / Day 0 (Nov. 9, Mon.)

会場：九州大学馬出病院キャンパス・コラボステーション1
〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1

共催：グローバルCOE「個体恒常性を担う細胞運命の決定とその破綻」
九州大学研究拠点形成プロジェクトP&P「構造生物学拠点形成」

13:00～14:30

OT1 基礎から理解する溶液 NMR の最新技術

廣明 秀一 先生 (神戸大学大学院医学研究科 特命教授)

NMR の魅力は、理論自体はかなり古くに完成されているにもかかわらず、方法論としてはいまだに完成されたものではなく、毎年何らかの進歩と発見が見られることである。本セミナーでは、まず NMR 初学者や NMR を使い始めた別分野の研究者のために、NMR の基礎と溶液 NMR 法の持つ特徴を概説し、その後、近年注目を集めている以下のトピックについてなるべくわかりやすく紹介する。

(1) sofast-NMR / best-NMR、(2) in-cell NMR、(3) NMR metabolomics、(4) LC-NMR

14:45～16:15

OT2 固体 NMR の方法

藤原 敏道 先生 (大阪大学 蛋白質研究所 教授)

分子運動性が制約されている固体状態の試料に適用する NMR 法とその分子構造解析への応用について解説する。内容としては、固体状態における核磁気相互作用の特徴、試料回転やラジオ波磁場の変調を用いた相互作用の制御など実験技術、スペクトルから得られる分子構造や運動性についての情報、データ解析法、さらに同位体試料の調製法などを紹介する。これらのことを、タンパク質など生体分子系などへの最近の応用例をまじえて示す。これらを通じて固体 NMR 法の特長、ユニークさ、課題、将来について言及する。

16:30～18:00

OT3 NMR はいかに創られたか: 3. 誕生から新たな展開へ

寺尾 武彦 先生 (京都大学 名誉教授)

教科書では長年にわたって積み重ねられた多数の研究成果が系統的に整理され、簡潔に淡々と記述されている。しかし、その行間には先人たちの血と汗と涙がにじみ、フィクションを超えるドラマが潜んでいる。本講演では時代を画した NMR の研究にスポットを当て、どのような時代背景の下でどういう人物が何をきっかけに歴史的な発想を得たのか、またどんな困難に出くわしてそれをどう解決して研究を完成させたかを人間的なエピソードを交えて話す。今回は Purcell らによる NMR の発見とパルス NMR 法の出現に焦点を当てる。若い方々が話を通じて科学するということがどういうことなのかを感じ取って頂ければ幸いである。

18:30～20:00 理事会 (コラボステーション1・1階会議室)

一般ポスター発表 / Poster presentation

- P 0 0 1 昆虫由来成長阻害因子 GBP の寄生による C 末端残基伸長部分が活性と生体膜相互作用に与える影響
○梅津喜崇¹、相沢智康^{1,2}、武藤香織³、山本宏子¹、神谷昌克^{1,2}、熊木康裕^{1,2}、水口峰之³、出村誠^{1,2}、早川洋一⁴、河野敬一^{1,2} (¹北大院・理、²北大院・生命、³富山大・薬、⁴佐賀大・農)
- P 0 0 2 アメロジエニンの動的性質
○熊木康裕¹、相沢智康^{1,2}、神谷昌克²、出村誠²、河野敬一^{1,2} (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)
- P 0 0 3 昆虫由来新規ケモカイン HCP の構造・機能解析
市橋俊¹、○神谷昌克²、相沢智康¹、熊木康裕¹、菊川峰志¹、出村誠²、早川洋一³、河野敬一¹ (¹北海道大学大学院理学院、²北海道大学大学院生命科学院、³佐賀大学農学部)
- P 0 0 4 ビッグディフェンシンのミセル相互作用と抗菌活性発現機構
河野隆英¹、水口峰之²、相沢智康³、出村誠³、川畑俊一郎⁴、○河野敬一³ (¹ミネソタ大、²富山大・薬、³北大・理、⁴九大・理)
- P 0 0 5 分子間 SS 結合を用いた Tom20-プレ配列ペプチド複合体の安定化とその運動性
○泉桂星^{1,2}、齋藤貴士²、神田大輔² (¹熊大・薬学部、²九大・生医研)
- P 0 0 6 細胞内へのグルコース取り込みの調節に関するタンパク質 CIP4 の TC10 および CDC42 結合ドメインの溶液構造解析
○小橋川敬博、久米田博之、叶大輔、稲垣冬彦 (北海道大学大学院薬学研究院)
- P 0 0 7 呼吸鎖におけるシトクロム c とシトクロム c 酸化酵素間電子伝達の機構解明
○野本直子¹、坂本光一¹、内田毅¹、伊藤(新澤)恭子²、吉川信也²、石森浩一郎¹ (¹北大・院理、²兵県大院・生命理)
- P 0 0 8 膜タンパク質 Ifitm5 の立体構造研究；溶液 NMR 法による立体構造解析に向けた試料調製
○塚本卓¹、李香蘭²、花方信孝²、出村誠¹ (¹北海道大学大学院生命科学院、²(独)物質・材料研究機構ナノテクノロジーイノベーションセンター)
- P 0 0 9 種々の DNA 塩基配列より形成される平行型四重鎖 DNA の立体構造解析
○中野佑亮¹、太虎林¹、長友重紀¹、山本泰彦¹、逸見光² (¹筑波大院教物、²農研機構・食総研)
- P 0 1 0 ヘム-四重鎖 DNA 複合体の立体構造解析
○斉藤香織¹、太虎林¹、長友重紀¹、山本泰彦¹、逸見光² (¹筑波大院教物、²農研機構・食総研)
- P 0 1 1 ミミズ由来 R 型レクチン C 末端ドメインと糖との結合様式に関する NMR 解析
○逸見光¹、久野敦²、海野幸子²、平林淳² (¹農研機構・食総研、²産総研・糖鎖医工学研究センター)
- P 0 1 2 イネクロモドメインタンパク質 OsLHP1 の NMR 構造解析
○若生俊行、鈴木倫太郎、山崎俊正 (農業生物資源研究所 タンパク質機能研究ユニット)
- P 0 1 3 幼若ホルモン結合タンパク質の構造機能解析
○鈴木倫太郎、藤本瑞、塩月孝博、門間充、多勢祥、宮澤光博、山崎俊正 (農業生物資源研究所)
- P 0 1 4 NMR 緩和測定による低分子量 G タンパク質 NiARL8 の立体構造変化の解析
○岡村英保、錦織雅樹、相宏宇、石川雅之、加藤悦子 (独)農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用ユニット)
- P 0 1 5 残余双極子相互作用を用いたタンパク質・DNA 複合体立体構造の精密化
○山崎和彦^{1,2}、木川隆則^{2,3}、渡部暁²、山崎智子¹、井上真²、関原明⁴、篠崎一雄⁴、横山茂之^{2,5} (¹産総研・年齢軸生命工学研究センター、²理研・生命分子システム基盤研究領域、³東工大院・総合理工、⁴理研・植物科学研究センター、⁵東大院・理)
- P 0 1 6 長い RNA の構造解析をめざした部位特異的安定同位体標識
篠阿弥宇¹、今井美咲¹、伊谷野悠里¹、斉藤裕之¹、福田健治²、○河合剛太¹ (¹千葉工大・工・生命環境科学、²太陽日酸・SI 合成研)
- P 0 1 7 人工 Ligase ribozyme の活性中心の立体構造解析
○目谷太樹¹、井川善也^{2,3}、河合剛太¹、坂本泰一¹ (¹千葉工大・工・生命環境科学、²九州大・院工、³JST, PRESTO)

- P 0 1 8 In-cell NMR 法を用いた生細胞内におけるプロテイン G B1 ドメインの高次構造解析
○花島 知美^{1,2}、浜津 順平^{1,2}、白川 昌宏^{2,3}、三島 正規^{1,2}、池谷鉄平⁴、Peter Güntert⁴、伊藤 隆^{1,2} (1首都大院・理工、²CREST/JST、³京大院・工、⁴Frankfurt 大)
- P 0 1 9 In-cell NMR による TTHA1718 蛋白質の生細胞内構造およびダイナミクスの解析
○浜津順平^{1,2}、花島知美^{1,2}、三島正規^{1,2}、池谷鉄平³、Peter Güntert³、白川昌宏^{2,4}、伊藤隆^{1,2} (1首都大学東京、²CREST/JST、³フランクフルト大学、⁴京都大学)
- P 0 2 0 酸化ストレス防御に関わる転写コアクチベーター MBF1 と転写制御因子 AP-1 との複合体構造解析
○川崎久美子¹、永井義崇¹、広瀬進²、白川昌宏³、伊藤隆¹、三島正規¹ (1首都大学東京大学院理工学研究科、²国立遺伝学研究所、³京都大学工学研究科)
- P 0 2 1 PRE を用いた Rho-kinase スプリット PH ドメインの構造解析
佐藤明子¹、○金場哲平¹、寺脇慎一²、伊藤隆¹、天野陸紀³、貝淵弘三³、箱嶋敏雄²、三島正規¹ (1首都大院・理工、²奈良先端科学技術大学院・情報科学、³名古屋大・医学)
- P 0 2 2 溶液 NMR による転写抑制因子 SHARP/SMRT 複合体の立体構造及び機能解析
○三神すずか¹、伊藤隆¹、三島正規¹ (1首都大学東京)
- P 0 2 3 CCR5-リガンド間相互作用に関する構造生物学的解析
NMR study of a mechanism for complex formation between a disordered region of OSBP and an ER membrane protein VAP-A
○吉浦知絵¹、幸福裕¹、上田卓見¹、寺島裕也^{2,3}、松島綱治²、嶋田一夫^{1,4} (1東京大学大学院薬学系研究科、²東京大学大学院医学系研究科、³エフェクター細胞研究所、⁴BIRC・AIST)
- P 0 2 4 プラストシアニンと光合成膜反応膜蛋白質の高効率電子輸送機構の構造生物学的解明
○古我征道¹、小笠広起¹、野本直子¹、上田卓見¹、嶋田一夫^{1,2} (1東京大学大学院薬学系研究科、²バイオメディカル情報研究センター(BIRC)、産業技術総合研究所(AIST))
- P 0 2 5 重水中における mono-3-amino-3-deoxy(2AS, 3AS) - α -および β -CyD の ¹H, ¹³C-NMR 化学シフト全帰属
高橋圭子、○安藤啓太 (東京工芸大学)
- P 0 2 6 ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Esa1 のクロモドメインの NMR による立体構造解析
○下條秀朗¹、佐野徳彦²、森脇義仁¹、奥田昌彦¹、堀越正美²、西村善文¹ (1横浜市大・院生命ナノシステム、²東大・分生研・発生分化構造)
- P 0 2 7 NMR によるヒストンヌクレオソームコアの立体構造解析
○森脇義仁、佐藤昌彦、長土居有隆、西村善文 (横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科 生体超分子システム科学専攻 生体超分子機能科学研究室)
- P 0 2 8 SAIL 芳香族アミノ酸による蛋白質の構造・動態解析
○武田光広¹、甲斐荘正恒^{1,2} (1名古屋大学大学院理学研究科、²首都大学東京戦略研究センター)
- P 0 2 9 RAP80 ユビキチン結合モチーフによる Lys63 結合型ポリユビキチン鎖認識機構の解明
○関山直孝、磯貝信、有吉真理子、枳尾豪人、白川昌宏 (京都大学大学院工学研究科)
- P 0 3 0 腫瘍抑制因子 APC-SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ドメインの複合体立体構造解析
○海江田修至¹、松井千幸²、清末優子³、池上貴久¹ (1大阪大学蛋白質研究所、²株式会社カン研究所、³理化学研究所発生・再生科学総合研究センター)
- P 0 3 1 RNA 2 本鎖における中心部と末端部の GA-AG ミスマッチ塩基対の溶液構造の研究
○天野まゆみ (阪大・蛋白研)
- P 0 3 2 緑色蛍光タンパク質 GFP の自己会合とその抑制変異体の NMR 解析
○小佐見謙一、古板恭子、児嶋長次郎 (奈良先端大・バイオ)
- P 0 3 3 NMR によるヌクレオソームシャペロンタンパク質 HMG B 2 のドメイン相対配向解析
○上脇 隼一¹、森内 寛²、楯 直子²、楯 真一¹ (1広島大学・院・理、²武蔵野大学・薬)
- P 0 3 4 DIORITE 法を用いた高分子量タンパク質のドメイン再配向解析
○岸本浩一¹、田中利好²、河野俊之²、楯真一¹ (1広島大院・理・数理分子、²三菱化学生命研)
- P 0 3 5 沖縄モズクから抽出した高分子フコイダンの構造
○オージェルFエゾモ、堀江道喜¹、高橋和也²、川本仁志²、三木康成²、木村隆之²、飯塚舜介¹ (1鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医学専攻、²海産物のきむらや (株))

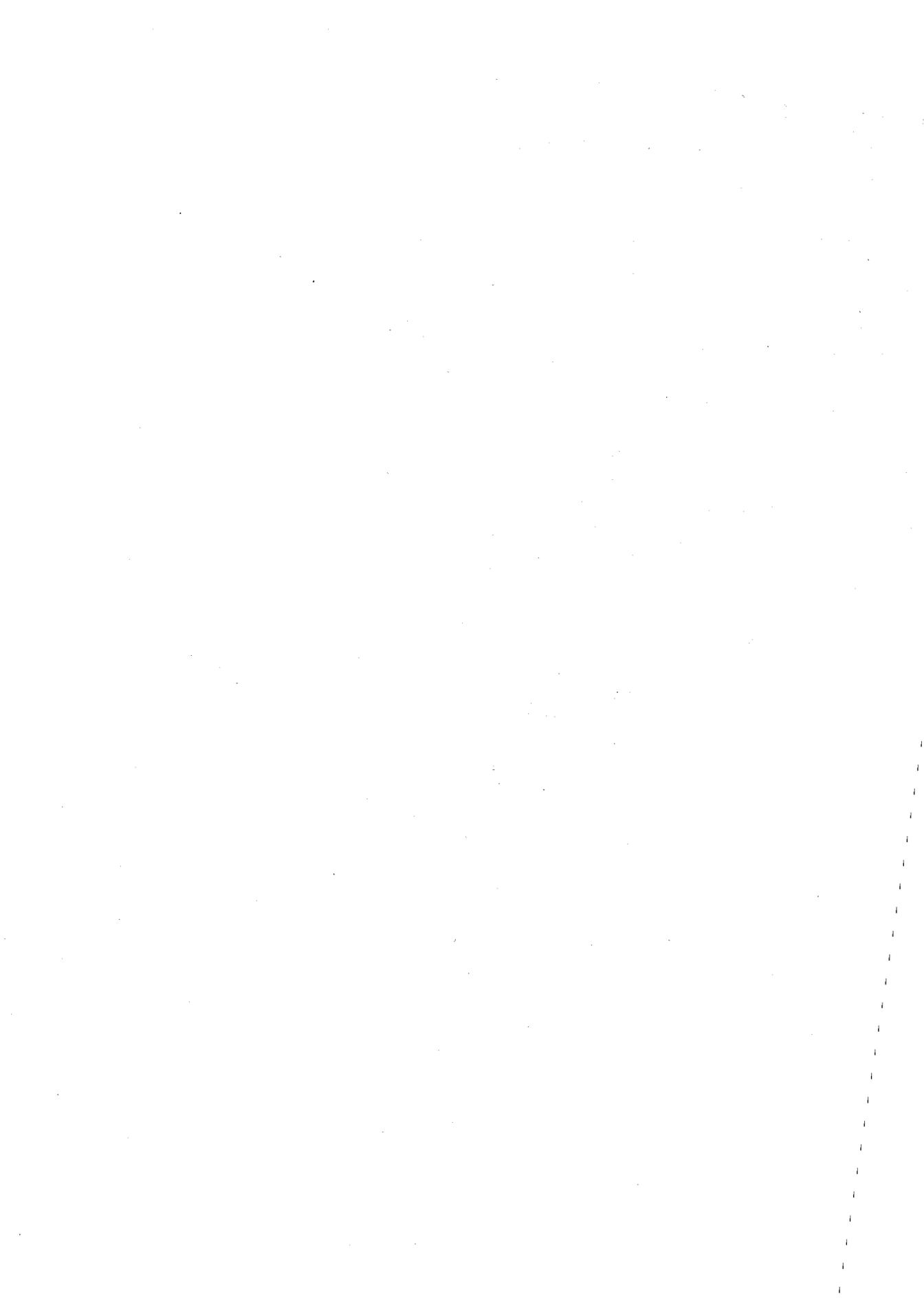
- P036 TICAM-1 および TICAM-2 TIR ドメインの溶液構造
榎園能章¹、○久米田博之¹、堀内正隆¹、小椋賢治¹、瀬谷司²、稲垣冬彦¹ (¹北海道大学 薬学部 構造生物学研究室、²北海道大学大学院 医学研究科免疫学分野)
- P037 NMRに基づくケモカイン受容体 CCR2 と制御因子フロントとの相互作用解析
○江崎芳¹、齋田晃弘¹、吉永壮佐¹、嶋田一夫²、寺島裕也^{3,4}、遠田悦子³、松島綱治³、寺沢宏明¹ (¹熊大・院・医薬、²東大・院・薬、³東大・院・医、⁴ECI)
- P038 ケモカインのシグナル伝達を制御する細胞内因子 FROUNT の構造生物学的研究
○齋田晃弘¹、江崎芳¹、吉永壮佐¹、嶋田一夫²、寺島裕也^{3,4}、遠田悦子³、松島綱治³、寺沢宏明¹ (¹熊大・院・医薬、²東大・院・薬、³東大・院・医、⁴ECI)
- P039 オスマウス特異的フェロモン ESP1 の立体構造と機能
○吉永壮佐¹、佐藤徹²、平金真¹、はか紗智子²、木本裕子²、嶋田一夫³、東原和成²、寺沢宏明¹ (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)
- P040 CYANA を用いた二量体タンパク質の三次元構造解析
○濱田季之^{1,2,3}、Yi-Jan Lin¹、黒崎千智^{1,3}、小柴生造^{1,3}、小林直宏¹、井上真^{1,3}、木川隆則^{1,3,4}、林文晶^{1,3}、武藤裕^{1,3}、大橋若奈¹、佐藤真奈美^{1,3}、赤坂領吾^{1,3}、新野睦子^{1,3}、寺田貴帆^{1,3}、白水美香子^{1,3}、好田真由美^{1,3}、田中昭子^{1,3}、林崎良英¹、横山茂之^{1,3,5}、廣田洋¹、Peter Güntert^{1,6} (¹理研 GSC、²鹿児島大院理工、³理研 SSBC、⁴東工大・院総理工、⁵東大院理、⁶J.W.Goethe 大学)
- P041 膜タンパク質ハロロドプシンの多次元固体 NMR 法による構造解析
樋口真理花¹、江川文字²、田巻初¹、神谷昌克¹、相沢智康¹、河野敬一³、藤原敏道²、○出村誠¹ (¹北大院・先端生命、²阪大・蛋白研、³北大院・理)
- P042 ポリアミノ酸-金属イオン錯体の固体 NMR
○平沖敏文、藤江正樹 (北大院工)
- P043 固体多核 NMR によるポリ(L-リジン)-リン酸水素錯体の研究
○永井圭祐、平沖敏文 (北大院工)
- P044 スズメバチのシルクの延伸配向挙動に関する固体 NMR 解析
○亀田恒徳 (農業生物資源研究所)
- P045 家蚕絹の繊維化機構とその応用
○鈴木悠¹、J.T.Gerig²、朝倉哲郎¹ (¹東京農工大学、²カリフォルニア大学サンタバーバラ校)
- P046 高い細胞接着性を有する新しい絹の作成と NMR 構造解析
○吉田愛¹、神谷昌克²、出村誠²、朝倉哲郎¹ (¹東京農工大学大学院・工学研究科、²北海道大学大学院・先端生命科学研究院)
- P047 油系ゲル化剤パルミチン酸デキストリンの物性研究
○長島敏雄¹、鈴木孝直²、小池秀明²、月岡大輔²、木川隆則^{1,3}、横山茂之^{1,4}、林文晶¹ (¹理研・生命分子システム、²千葉製粉株式会社、³東大院・総理工、⁴東大院・理)
- P048 固体 ¹³C NMR を用いた光照射による ppR- pHtrII の細胞質表面部位の相互作用変化の観測
○近藤隆博¹、川村出¹、西尾拓道¹、加茂直樹²、内藤晶¹ (¹横浜国立大学大学院工学府、²松山大学薬学部)
- P049 固体 NMR と TEM によるヒトカルシトニンのアミロイド様線維形成機構とその阻害効果の解析
○渡邊 (伊藤) ひかり¹、上平美弥²、近藤正志³、佐藤道夫³、中越雅道³、内藤晶¹ (¹横浜国立大学大学院工学府、²東北大・多元研、³横浜国立大学・機器分析評価センター)
- P050 NMR を用いたリン脂質膜中における緑茶カテキン類の相互作用部の解析
○植草義徳¹、上平美弥²、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、²信州大学農学部、³横浜国立大学大学院工学研究院)
- P051 固体 NMR と COMPASS 法を用いた H⁺-ATP 合成酵素 subunit c-ring の構造解析
○戸所泰人¹、田中健太郎¹、湯面郁子¹、岩崎郁¹、小林将俊¹、鈴木俊治^{2,3}、吉田賢右^{2,3}、藤原敏道¹、阿久津秀雄¹ (¹阪大・蛋白研、²東工大・資源研、³JST・ICORP・ATP 合成制御)
- P052 脂質膜界面における PH ドメインの構造および機能の解析
○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 創薬研究センター)

- P 0 5 3 1mmφ高速 MAS プロープによる新たな固体 NMR 法の可能性
○山内一夫¹、西山裕介²、石井佳誉³、朝倉哲郎¹、樋岡克哉² (¹東京農工大学、²日本電子、³イリノイ大学)
- P 0 5 4 1 mm超高速MAS プロープの開発
○遠藤由宇生¹、根本貴宏¹、蜂谷健一¹、西山裕介¹、下池田勇一¹、山内一夫²、樋岡克哉¹ (¹日本電子、²東京農工大学)
- P 0 5 5 高速 MAS 下における試料管内部の温度分布についての考察
浅野敦志、○北村成史、田中千香子、黒津卓三 (防衛大学校応用化学科)
- P 0 5 6 配向試料のためのオフセット依存性を改善した固体 NMR 分極移動法の開発
○西村勝之 (分子科学研究所)
- P 0 5 7 ¹³C Solid-State NMR Chromatography by Magic Angle Spinning ¹H T₁ Relaxation Ordered Spectroscopy
○西山裕介¹、Michael H. Frey²、Szeziwa Mukasa²、内海博明¹ (¹日本電子株式会社 NM 事業ユニット、²JEOL USA Inc.)
- P 0 5 8 固体 NMR プロープにおけるマジック角の微小角度精密調整法
○水野敬¹、樋岡克哉¹、竹腰清乃理² (¹日本電子株式会社、²京都大学大学院 理学研究科 化学専攻)
- P 0 5 9 SASS 法による PBLA の ¹³C 化学シフト異方性の測定と二次構造の評価
○神原孝之¹、水野敬²、竹腰清乃理¹、莊司顯³ (¹京都大学大学院理学研究科、²日本電子(株)、³群馬大学大学院工学研究科)
- P 0 6 0 硬い架橋のバイラジカルを使った動的核分極(DNP)
○松木陽^{1,2,6}、Thorsten Maly²、Olivier Ouari³、Hakim Karoui⁴、Francois Le Moigne⁴、Egon Rizzato⁴、Sevdalina Lyubenova⁵、Judith Herzfeld⁶、Thomas Prisner⁵、Paul Tordo³、Robert G. Griffin² (¹阪大蛋白研、²Francis Bitter Magnet Laboratory, MIT、³University of Aix-Marseille I and III、⁴University of Provence、⁵Institute of Physical and Theoretical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance、⁶Brandeis University)
- P 0 6 1 14T での高磁場 DNP による固体 NMR の高感度化
松木陽¹、○植田啓介¹、高橋大樹¹、出原敏孝²、小川勇²、戸田充²、藤原敏道¹ (¹大阪大学、²福井大学)
- P 0 6 2 光励起三重項 DNP による室温での p-terphenyl 結晶におけるプロトンの高偏極化
○根来誠、立石健一郎、香川晃徳、北川勝浩 (大阪大学基礎工学研究科)
- P 0 6 3 マイクロコイル MAS による極微量の薄膜リチウムイオン電池材料の解析
○野田泰斗¹、武田和行²、河村純一³、前川英己¹ (東北大工¹、京大理²、東北大多元研³)
- P 0 6 4 固体高分解能 NMR によるナノ粒子表面の修飾有機分子の結合状態とハイブリッド試料の構造解析
○相馬洋之、千葉亮、林繁信 (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)
- P 0 6 5 液晶 CBOOA と混合系液晶 CBOOA/HBAB における分子間相互作用の比較
○萩原祥子、谷本登、藤森裕基 (日本大学大学院総合基礎科学研究科)
- P 0 6 6 固体 NMR を用いた不飽和脂質を含有するバイセルに関する研究
○上釜奈緒子¹、辻 暁²、西村勝之¹ (¹分子科学研究所、²兵庫県立大学大学院)
- P 0 6 8 固体 NMR によるシルセスキオキサンを骨格とするエポキシ樹脂の構造解析
○前田史郎、黄前真吾、清水裕太、村上吉昭 (福井大院工、日東シンコー)
- P 0 6 9 固体 NMR を用いた新規水素貯蔵材料 $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ の局所構造解析
○小野泰輔¹、下田景士²、坪田雅己²、小島健一³、市川貴之²、小島由継² (¹広島大学先端物質科学研究科、²広島大学先進機能物質研究センター、³広島大学総合科学研究科)
- P 0 7 0 高圧水素ガスシール用ゴム材料中に溶解した水素の固体 NMR による解析
○藤原広匡^{1,2}、山辺純一郎^{2,3}、西村伸^{2,3} (¹産総研、²HYDROGENIUS、³九大)
- P 0 7 1 CsHSO₄-シリカナノ粒子複合材料における水素結合とプロトン拡散
○治村圭子、林繁信 (産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門)
- P 0 7 2 ゼオライトに吸着したジクロロメタンの観測
○小島奈津子、林繁信 (独立行政法人 産業技術総合研究所)

- P 0 7 3 ^{11}B - ^{11}B 2次元 MAS NMR によるボロシリケートガラスの構造解析
○村上美和¹、清水禎¹、丹所正孝¹、赤井智子²、矢澤哲夫³ (¹物質・材料研究機構、²産業技術総合研究所、³兵庫県立大学)
- P 0 7 4 バナジウム重水素化物の相構造および重水素の存在状態
○鈴木陽、林繁信 (産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門)
- P 0 7 5 固体 NMR 法による含フッ素化合物 β -CD 包接錯体の構造解析
○小糸祐介、龍野宏人、山田和彦、安藤慎治 (東京工業大学 理工学研究科 物質科学専攻)
- P 0 7 6 CAST/CNMR システムと合成による天然有機化合物の構造訂正
○越野広雪¹、叶躍奇¹、高橋俊哉¹、佐藤寛子² (¹独立行政法人理化学研究所、²国立情報学研究所)
- P 0 7 7 スルホン酸基を有するブロック共重合体中の水の拡散特性
○大窪貴洋、タベルニエ ブルーノ、貴傳名甲、大平昭博 (産業技術総合研究所)
- P 0 7 8 カルシウムアルミノシリケートの ^{27}Al NMR-融体構造の温度依存性-
○金橋康二¹、Jonathan F. Stebbins² (¹新日本製鐵 (株) 先端技術研究所、²Stanford 大学)
- P 0 7 9 石炭中微量ホウ素の化学構造解析
○高橋貴文、金橋康二 (新日本製鐵 (株) 先端技術研究所)
- P 0 8 0 高磁場 ^{43}Ca 固体 NMR によるカルシウムハイドロシリケートの構造解析
○橋本康博¹、名雪三依¹、松野信也¹、松井久仁雄²、丹所正孝³、清水禎³ (¹旭化成(株)、²旭化成建材(株)、³独物質材料研究機構)
- P 0 8 1 混合原子価モリブデン(V, VI)ポリ酸の固体 ^{95}Mo NMR
○飯島隆広¹、西村勝之¹、山瀬利博²、丹所正孝³、清水 禎³ (¹分子研、²東工大、³物材機構)
- P 0 8 2 高分子材料中における気体拡散挙動の NMR 法による観察
○吉水広明、岡澤誠裕、奥村祐生、傘俊人 (名古屋工業大学 大学院 工学研究科)
- P 0 8 3 高磁場、高速 MAS ^1H NMR によるゴム構造の研究
○小林将俊、小森佳彦、藤原敏道 (住友ゴム工業、阪大 蛋白研)
- P 0 8 4 ^{129}Xe NMR によるゼオライトの吸着特性評価、 銀ゼオライトについて
佐治修吾、河田陽子、今井宏彦、木村敦臣、○藤原英明 (阪大院・医)
- P 0 8 5 水素貯蔵材料 $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の熱分解における構造変化；固体 NMR による評価
小野泰輔、○下田景士、坪田雅己、小島健一、市川貴之、小島由継 (広島大学先進機能物質研究センター)
- P 0 8 6 高圧リフォールディングによるタンパク質立体構造解析試料の調製法
○小椋賢治、斎尾智英、小橋川敬博、稲垣冬彦 (北大院薬)
- P 0 8 7 NMR を利用して有機化合物を定量する場合の解析条件が定量値に与える影響に関する考察
○三浦亨¹、齋藤剛¹、井原俊英¹、小池昌義¹、前田恒昭¹、杉本直樹²、多田敦子²、西村哲治²、有福和紀³、末松孝子³、山田裕子⁴、吉田雄一⁴ (¹ (独) 産業技術総合研究所 計測標準研究部門、² 国立医薬品食品衛生研究所、³ 日本電子株式会社、⁴ 和光純薬工業株式会社)
- P 0 8 8 マウス由来乳がん細胞における超偏極 ^{13}C ピルビン酸の代謝解析と薬剤添加による影響の観測
○阿部孝政¹、久保均²、原田雅史²、前澤博³、西谷弘⁴ (¹ 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、² 徳島大学大学院 ヘルスパイオサイエンス研究部 画像情報医学分野、³ 徳島大学大学院 ヘルスパイオサイエンス研究部 放射線理工学分野、⁴ 徳島大学大学院 ヘルスパイオサイエンス研究部 放射線科学分野)
- P 0 8 9 Self-Diffusion of Ions in a Confined Nanostructure: NMR Assessment of Ionic Conduction in a Thermotropic Ionic Liquid Crystal
○Anton E. Frise^{1,2}, Takahiro Ichikawa¹, Masafumi Yoshio¹, Hiroyuki Ohno³, Sergey V. Dvinskikh², Istvan Furo², and Takashi Kato¹ (¹Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, ²Division of Physical Chemistry, Department of Chemistry, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, ³Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan.)
- P 0 9 0 STD 法と Water LOGSY 法---軽水近傍でのシグナル検出について
○降旗一夫、田代 (下高原) 櫻子、渋澤庸一、田代充 (¹ 東大院農・応生化、² 東薬大・薬、³ 明星大・理工)

- P091 Brevibacillus choshinensis 分泌発現系を用いたアミノ酸選択的安定同位体標識試料作成
○谷生道一、楠英樹、田中利好、田中剛史、河野俊之（株）三菱化学生命科学研究所
- P092 4塩基コドンを利用したメチオニン番号特異的安定同位体標識方法
○岡田潔^{1,2}、米山桃子^{1,3}、田中利好¹、田中剛史¹、河野俊之¹（¹株）三菱生命研、²現・東農大・応生、³現・奈良先端大・バイオ
- P093 網羅的代謝物アノテーションサーバーSpinAssignを用いたNMRメタボロミクス入門
○近山英輔、坪井裕理、長濱淳子、関山恭代、菊地淳（独）理化学研究所 植物科学研究センター
- P094 ¹³C標識生体サンプルを用いた比較メタボローム解析と植物抽出過程における代謝物プロファイリング
○関山恭代¹、近山英輔¹、菊地淳^{1,2,3}（¹理研・PSC、²横市院・生命、³名古屋大院・生命農）
- P095 SAIL法による蛋白質のTrp環シグナルの効率的帰属
○宮ノ入洋平¹、武田光広¹、寺内勉^{2,3}、小野明^{2,3}、甲斐荘正恒^{1,2}（¹名古屋大学大学院理学研究科附属構造生物学研究センター、²首都大東京・戦略研究センター、³SAILテクノロジーズ(株)）
- P096 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、森正之²、大木進野¹（¹北陸先端大学院大、²石川県立大）
- P097 多重共鳴NMRを用いた生体における集積コリンおよびグルコース代謝物の選択的計測
○五十嵐龍治、朽尾豪人、水澤圭吾、上平晃聖、山東信介、青山安宏、白川昌宏（京都大学大学院工学研究科）
- P098 コールドショックベクターと可溶性タグの組み合わせによる発現系構築と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）
- P099 データベースを利用したNMR主鎖シグナル自動帰属と立体構造解析
○小林直宏、阿久津秀雄、藤原敏道（大阪大学蛋白質研究所）
- P100 リジン¹³Cメチル化法を用いたユビキチン側鎖のNMR解析
○服部良一、大木出、古板恭子、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）
- P101 NMRと質量分析を用いた高精度メタボリック・プロファイリング法
○藤村由紀¹、三浦大典¹、梶井聡子²、根本直^{1,3,4}、高橋勝利^{1,3,4}、須永絵理⁴、割石博之^{1,3,5}（¹九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点、²九州大学大学院生物資源環境科学府、³九州大学バイオアーキテクチャーセンター、⁴(独)産業技術総合研究所、⁵九州大学大学院農学研究院）
- P103 血管径の変化によるガドリニウム造影剤濃度推定誤差の検討
○中村和浩¹、近藤靖¹、水沢重則¹、曾雌泰央²、陳國躍²、木下俊文¹（¹秋田県立脳血管研究センター、²秋田県立大学 システム科学技術学部）
- P104 マジックエコーDANTE法による自己再結像スライス選択
○増本寿史¹、橋本雄幸²、松井茂¹（¹筑波大学大学院数理物質科学研究科、²横浜創英短期大学情報学科）
- P105 フェリチン水溶液およびゲル試料における水の横緩和速度
○高屋展宏、渡邊英宏、三森文行（国立環境研究所）
- P106 高磁場環境対応の高性能非磁性薬液注入装置の開発
○平川慶子、森川秀行、村木秀樹、佐藤格夫、増野智彦、小池薫、大野暉吉（日本医科大学NMR研究施設、株式会社ユニフローズ、日本医科大学救急医学、京都大学医学部初期診療・救急医学）
- P107 ¹H-NMRメタボロミクスの医療応用—その2—透析治療の患者血漿と廃液の解析
○藤原正子¹、安藤一郎^{1,2}、根本直²、竹内和久^{1,3}、今井潤¹（¹東北大・薬、²産総研・バイオメディシナルセンター、³(医)宏人会中央クリニック）
- P108 新方式NMRを用いたタンパク質測定
○田中秀樹¹、長谷川学¹、岡田道哉¹、高妻孝光²、北口仁³（¹日立製作所 日立研究所、²茨城大学、³物質・材料研究機構）
- P109 高周波と静磁場の連成解析によるline-shape計算法
○朴ミンソク¹、岡田道哉¹、北口仁²（¹日立製作所 日立研究所、²物質・材料研究機構）
- P110 固体NMR用超伝導磁石のシムに起因する磁場揺動
○品川秀行¹、大木 忍¹、藤戸輝昭²、清水 禎¹（¹物質・材料研究機構、²(株)プローブ工房）

- P 1 1 1 小型超電導バルク磁石を用いたマイクロコイル NMR
○仲村高志¹、室洋一¹、越野広雪¹、藤戸輝昭²、寺尾武彦³ (¹独立行政法人理化学研究所、²プローブ工房、³京都大学)
- P 1 1 2 超電導バルク磁石の NMR 信号による磁場分布解析
○室洋一、仲村高志、越野広雪 (独立行政法人理化学研究所)
- P 1 1 3 溶液 ³³S NMR 低温プローブの開発
保母史郎^{1,2}、齋藤雄太^{2,3}、佐藤直樹^{1,2}、高橋雅人^{1,2}、高尾智明³、○前田秀明^{1,2} (¹横浜市立大学大学院、²理化学研究所生命分子システム基盤研究領域、³上智大学大学院)
- P 1 1 4 異種核相関実験における二次元 NMR スペクトルの共分散処理
○福地将志、武田和行、竹腰清乃理 (京都大学大学院理学研究科、CREST/JST)
- P 1 1 5 OPENCORE NMR 分光計を用いた MRI
犬飼宗弘、○武田和行 (京都大学大学院理学研究科)
- P 1 1 6 LC-CD-NMR の試み - 光学異性体の分離と化学構造解析を同時に行うために -
徳永隆司¹、岡本昌彦¹、田中浩三¹、都出千里²、○杉浦真喜子² (¹住友化学有機合成研究所、²神戸薬科大学)
- P 1 1 7 非線形サンプリングデータ解析法の改良
○吉田卓也、小林祐次、大久保忠恭 (大阪大学薬学研究科、大阪薬科大学)
- P 1 1 8 共振器応答に基づくパルス過渡現象の全補償
○田淵豊¹、根来誠¹、武田和行²、北川勝浩¹ (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)
- P 1 1 9 NQR を用いた靴に隠された物質探知
○中原優、篠原淳一郎、Bryn Baritõmpa、赤羽英夫、糸崎秀夫 (大阪大学大学基礎工学研究科)
- P 1 2 0 低分子量生体分子の化学シフト/NMR 立体構造を BMRB データベースへ登録するための日本サイト公開
○中谷英一^{1,2}、松浦孝範^{1,2}、Steven Mading³、原野陽子²、小林直宏²、Eldon L. Ulrich³、John L. Markley³、阿久津秀雄²、中村春木²、藤原敏道² (¹科学技術振興機構-BIRD、²大阪大学蛋白質研究所、³ウィスコンシン大学マディソン-BioMagResBank)
- P 1 2 1 ヒト基本転写因子 TFIIE alpha 酸性ドメインの動的構造解析
○小松正史¹、奥田昌彦¹、長土居有隆¹、菅瀬謙治²、西村善文¹ (¹横市・生命ナノシステム・生体超分子システム科学、²サントリー生物有機科学研究所)
-



口頭発表要旨

Lecture Abstracts

第一日目

11月10日(火)

日本語セッション

Day 1 (Nov. 10, Tue.)

(Japanese Session)

ランタノイドプローブを用いたタンパク質複合体の立体構造解析

○齊尾智英¹、横地政志²、久米田博之²、稲垣冬彦²

¹北海道大学大学院生命科学院、²北海道大学大学院薬学研究科

PCS-based structure determinations of protein-protein complexes

○Tomohide Saio¹, Masashi Yokochi², Hiroyuki Kumeta², Fuyuhiko Inagaki²

¹Graduate School of Life Science, Hokkaido University, and

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

A simple and fast method for protein-protein docking using pseudo-contact shifts (PCSs) and $^1\text{H}^{\text{N}}/^{15}\text{N}$ chemical shift perturbation data is presented. The PCSs are induced by a paramagnetic lanthanide ion that is fixed to the target protein using a lanthanide binding peptide tag attached via two linking points. The $^1\text{H}^{\text{N}}/^{15}\text{N}$ chemical shift perturbation data is transformed into contact-surface restraints, that is, highly ambiguous intermolecular distance restraints. The method is demonstrated with p62 PB1-PB1 complex, which forms front-to-back 20kDa of homo-dimer. The monomer structures were treated as rigid bodies and docked using backbone PCSs and backbone chemical shift perturbation data.

【序論】

NMR によるタンパク質複合体の立体構造解析においては、シグナル帰属や分子間 NOE 取得などが困難となる場合が多い。そのような場合、ランタノイドプローブから得られる PCS や RDC などの距離・角度情報が有用になる。常磁性ランタノイドイオンを対象タンパク質に結合させることで、ランタノイドイオンを中心として約 40 Å 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イオン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が(1)、他の一般的なタンパク質に対してはランタノイドイオンをタンパク質に固定化するタグ (Lanthanide Binding Tag: LBT) が必要である。私たちは、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、より強固にランタノイドイオンを固定できる LBT を開発した(2)。今回はさらに、2 点固定化 LBT を用いたランタノイドプローブを応用し、p62 PB1 ホモダイマーの立体構造決定を行った。p62 はオートファ

key words: 常磁性ランタノイド, ランタノイド結合タグ, pseudo-contact shift

○さいお ともひで、よこち まさし、くめた ひろゆき、いながき ふゆひこ

ジーにおける選択的タンパク質分解に関わるマルチドメインタンパク質である。p62はC末端のUBAドメインを介してユビキチンを認識することによりユビキチン化されたタンパク質を選択的に結合し、N末端のPB1ドメインを介した自己会合により多量化し、巨大な変性タンパク質凝集体を形成する。PB1ドメインを介した多量化は、凝集体の形成だけではなく凝集体のオートファゴソームへの移行においても重要であることが明らかになっている。本研究ではp62 PB1ドメインの保存された相互作用残基に対してアミノ酸変異を導入することで多量化を抑制し、1:1のダイマーを形成するコンストラクトを作成した。LBTにより固定化されたランタノイドイオンからのPCSデータと、主鎖アミドシグナルの化学シフト摂動データを用い、p62 PB1単体構造をドッキングすることによって複合体構造を決定した。

【手法】

A) コンストラクト作成

p62 PB1 domainにはOPCAモチーフから構成される酸性面と、保存されたりジン残基から構成される塩基性面が存在し、両者の結合によって自己会合がおこる(3)。本研究では、OPCAモチーフと塩基性面のそれぞれにアミノ酸変異を導入し、DR変異体(D67A/D69R)とKE変異体(K7E/R94A)を作成した(Fig. 1)。DR+KEが1:1のダイマーを形成することを分析超遠心により確認した。

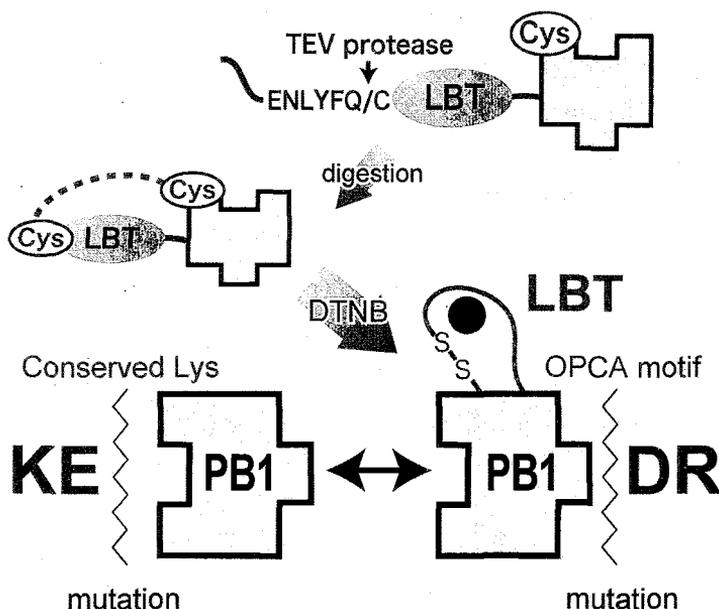


Fig. 1 Schematic overview of the preparation of the LBT-DR and the KE.

B) LBTの2点固定化

DR変異体に対して、次のような手順でLBTを2点固定化した(2)。① DR変異体表面にシステインを導入し、ランタノイド結合ペプチド(CYVDTNNDGAYEGDEL)をN末端に融合したコンストラクトを作成する。これを以降LBT-DRと呼ぶ。② LBT-DR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により酸化し、LBT N末端のシステインとDR変異体表面のシステインとをジスルフィド結合によって架橋する(Fig.1)。

C) 構造計算

DR変異体単体の立体構造をrigid-bodyとして扱い、PCSデータと結合面の情報に基づいてXplor-NIHを用いたドッキング計算を行った。DRを固定し、KEをランダム

な位置に配置した 100 個の座標を発生させ、そこから束縛条件を加えて構造計算を行った。結合面の情報は、LBT-DR/KE 複合体形成に伴う KE の主鎖アミドシグナルの化学シフト変化から取得した。化学シフト変化が 0.5 ppm 以上であった KE 中の残基が結合面を構成していると規定し、それらの残基中の原子が DR 中のいずれかの原子と近づくように制限を加えた。実際には、KE 中の特定の原子と DR 中の全原子との間の NOE 制限として扱い、原子間の距離 r の-6 乗平均に対して距離制限を適用した。 r^6 平均を用いることで、数個の原子対タンパク質中の全原子という曖昧な距離制限を加えることを可能にしている。

^{15}N LBT-DR/unlabeled KE または unlabeled LBT-DR/ ^{15}N KE それぞれに対して 1 等量のランタノイド (LuCl_3 , DyCl_3 , TbCl_3 , ErCl_3 , TmCl_3) を滴下し、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定して PCS を観測した。数種のアミノ酸選択 ^{15}N ラベルサンプルを用いてスペクトルを簡略化し、PCS の帰属の補助に用いた。構造計算に PCS データを用いるためには DR に対するランタノイドイオンの座標を求める必要がある。そこで、磁化率テンソル計算プログラム numbat を用い、 Dy^{3+} , Tb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} の 4 種の常磁性ランタノイドから観測される PCS データに基づいてイオンの位置を決定した。

【結果・考察】

Xplor-NIH を用い、 Tb^{3+} と Tm^{3+} 滴下時に観測された計 459 個の PCS と、化学シフト摂動マッピングから得た結合面の情報に基づいてドッキング計算を行った (Fig. 2)。PCS の isosurface は対象性を持ち、磁化率テンソルの主軸を中心に 180° 回転させた isosurface はもとの isosurface と重なる (Fig. 3)。そのため、1 つの PCS データセットから

は 4 個の縮退した解が得られる。本研究では、PCS データに加えて結合面の情報を導入することで縮退を解消し、収束

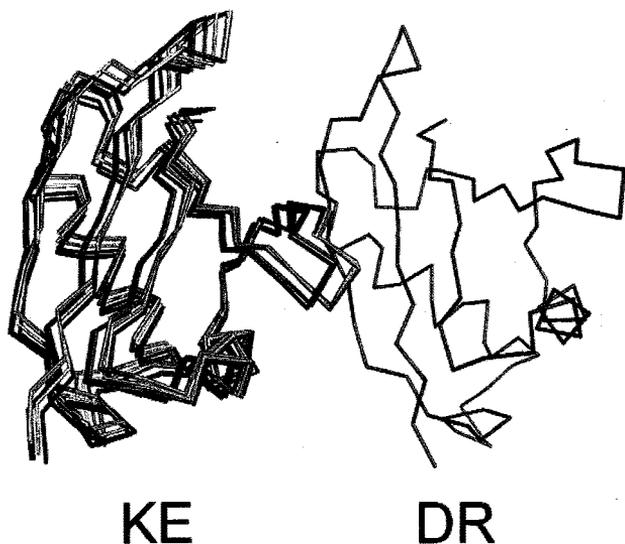


Fig. 2 The docking structure of the DR/ KE complex. Ensemble of 10 lowest energy structures is displayed. These structures have an average backbone RMSD of 0.31 Å.

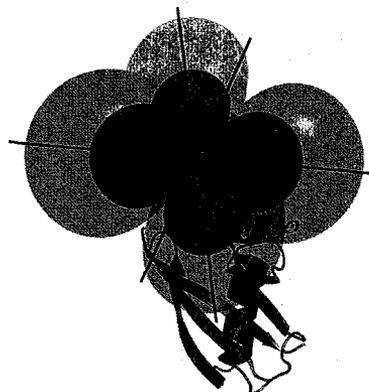


Fig. 3 Isosurface induced by Tb^{3+} . The principal axes of the $\Delta\chi$ -tensor are overlaid.

した解を得ることを可能にしている。

決定された立体構造の妥当性を評価するため、DR-KE 間の分子間 NOE を観測した。 $^{15}\text{N}^2\text{H}$ LBT-DR/unlabeled KE に対して N-NOESY を測定し、LBT-DR 主鎖アミドプロトンと KE 側鎖プロトンの間の NOE を取得した。KE と DR の結合界面に存在する残基間から数十個の NOE が観測され、それらはいずれもドッキング構造と矛盾しなかった。また、最安定構造に対する PCS の相関をとったところ、実験値と計算値はよく対応していた (Fig. 4)。PB1-PB1 複合体形成には OPCA-motif と保存されたリジンの静電的相互作用が重要であるが、今回決定した p62 PB1 複合体構造においても KE の OPCA-motif と DR の保存されたリジンが向かい合っており、他の PB1 と同様の結合様式であると考えられる。

一般的に、NMR によるタンパク質の立体構造解析のためには主鎖・側鎖シグナルの帰属や NOE 取得が必要となり、解析に時間を要する。高分子量タンパク質やその複合体を対象とした場合、帰属や分子間 NOE の取得にはさらに困難になる。本研究では、主鎖アミドから観測される PCS データと化学シフト摂動データに基づいて単体構造をドッキングすることで、複合体の構造決定をより迅速に行うことができることを示した。これまで、PCS などの常磁性プローブはヘムタンパク質やランタノイドイオンを結合できる一部の金属結合タンパク質に対してのみ応用されているだけだった。今回私たちは、タグを用いてランタノイドイオンを固定化することで、金属イオンを結合しない一般的なタンパク質に対してもランタノイドプローブに基づいた立体構造解析が可能であることを示した。

【参考文献】

- (1) Pintacuda G, Park AY, Keniry MA, Dixon NE, Otting G (2006) Lanthanide labeling offers fast NMR approach to 3D structure determinations of protein-protein complexes. *J Am Chem Soc.* 2006 128:3696-3702
- (2) Saio T, Ogura K, Yokochi M, Kobashigawa Y, Inagaki F. (2009) Two-point anchoring of a lanthanide-binding peptide to a target protein enhances the paramagnetic anisotropic effect. *J Biomol NMR* 44:157-166
- (3) Saio T, Yokochi M, Inagaki F. (2009) The NMR structure of the p62 PB1 domain, a key protein in autophagy and NF- κ B signaling pathway. *J Biomol NMR in press.*

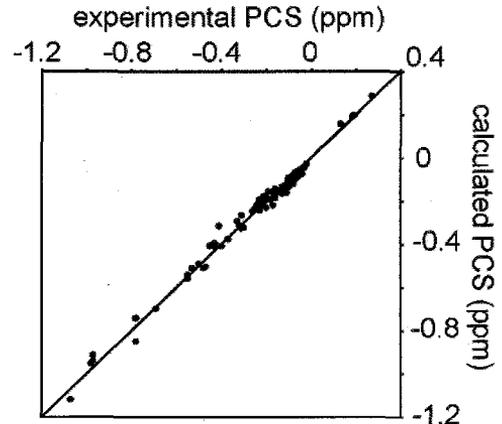


Fig. 4 Comparison between experimental and back-calculated PCS of backbone amide protons observed for LBT-LR/KE, in complex with Tb^{3+} .

磁場配向性錯体による残余双極子相互作用の誘起

○佐藤宗太¹, 諸原 理¹, 山口芳樹^{2,3}, 加藤晃一^{2,4,5}, 藤田 誠^{1,5}

¹東大院工

²名市大院薬

³理化学研究所

⁴分子科学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター

⁵CREST

Induction of Residual Dipole Couplings by Magnetically Aligned Coordination Complexes

○Sota Sato¹, Osamu Morohara¹, Yoshiki Yamaguchi^{2,3}, Koichi Kato^{2,4,5}, and Makoto Fujita^{1,5}

¹*School of Engineering, The Univ. of Tokyo*

²*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City Univ.*

³*RIKEN*

⁴*Institute for Molecular Science & Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences*

⁵*CREST*

Residual dipolar coupling (RDC) is observed by solution NMR for molecules which partially orient to magnetic field, which affords useful structural information. Though various alignment media have been investigated, such as liquid crystalline, bicelle, and phage, such polymeric structures make the prediction and control of the orienting behavior of the analyte difficult. A single molecule with a well-defined structure accumulating aromatic moieties in a parallel direction is a promising candidate as a molecular aligning material because an aromatic ring diamagnetically orients, and the accumulation effect is expected to strengthen the orienting property. We synthesized hollow cage complex with aromatic units and found that the complex oriented. Furthermore, we succeeded to observe RDC for small organic guest, which hardly shows RDC by itself, via the encapsulation in the host complex.

一般に溶液中において分子は速い回転運動をしており、溶液NMRにおいて双極子相互作用は観測されない。しかし、液晶やバイセル、ファージといった磁場配向性を有する物質を共存させると、衝突などの相互作用を通じて回転運動に異方性が誘起され、双極子相互作用が完全には消えきらずに観測される（残余双極子相互作用：Residual Dipole Coupling、以下RDCと表記）ことが知られている。RDC解析からは、従来の化学シフト値、スピン結合定数、NOEといった情報からは得られない、NMR観測可能な2つの核種を結ぶベクトルと分子内座標との角度情報を引き出すことができ、新しい構造解析法としてタンパク質などの生体高分子の構造解析に多用されてきている。しか

残余双極子相互作用, 反磁性磁場配向, 錯体

○さとうそうた, もろはらおさむ, やまぐちよしき, かとうこういち, ふじたまこと

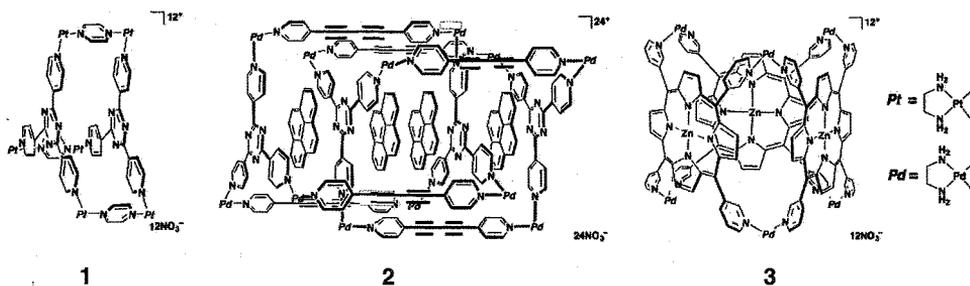
し、上述した磁場配向性材料は、分子量や立体構造に分布があり、また、解析対象分子との定まった相互作用の様式を持たないために、解析対象分子の配向性を予測・制御することが難しい。一義構造を有する、分子性の磁場配向性材料を開発できればこの問題を根本的に解決できるが、一般に単分子での磁場配向性は弱いので、いかに効率よく磁場配向する材料を開発し、さらに、いかに効率よく解析対象分子を配向させるかが重要である。

今回我々は、芳香族分子が示す反磁性磁場配向に着目し、複数の芳香族分子を方向を揃えて集積することで磁場配向性を制御することを検討した。さらに、この磁場配向性分子をホストとして用い、ゲスト分子の磁場配向を誘起することに成功した。

はじめに、単一構造を持ち、設計性が高い磁場配向性分子として、自己集合によって構築される錯体 **1** の磁場配向性を確認した。分子が磁場配向すると、スピン-スピン結合 J 値に RDC D 値が加わって観測され、この D 値は磁場強度の 2 乗 B^2 に比例することが知られている。そこで、300-920 MHz の NMR 装置を用いて 1J のスプリット値の測定を行ったところ、磁場配向性を示すことがわかった。 **2** は **1** よりも大きい RDC が観測されより強い磁場配向性を示すことから、芳香環の集積数を変えることで磁場配向の度合を制御できることもわかった。芳香環をプリズム状に揃えた錯体 **3** も同様に磁場配向性を示すことがわかり、磁場に対し芳香環を平行に保つ構造であれば磁場配向することが示された。

次に、錯体 **1** および **2** の内部に包接されたゲスト分子、ピレンの磁場配向性を検討した。ピレンは単独ではほとんど磁場配向性を示さないが、配向性錯体にホスト-ゲストの様式で包接することにより、錯体と一体となって一分子としてふるまい、その結果 RDC が容易に観測できることがわかった。RDC の大きさは、包接錯体の芳香環集積数に依存することがわかり、分子レベルでの磁場配向性ホストの構造制御が RDC 解析に有用であることがわかった。

本手法はゲスト分子の解析に特化しており、配向材料の種類が限られている小分子の RDC 解析試薬として有用である。今後、自己集合性錯体により合成した配向分子を利用したゲスト分子の構造解析を検討する。



プリオンタンパク質構造変換におけるホットスポットと抗プリオン化合物

○鎌足雄司¹, 早野陽介¹, 木村力¹, 武藤淳二¹, 石倉孝一¹, 山本典史¹, 山口圭一¹, 桑田一夫¹

¹岐阜大学人獣感染防御研究センター

Hot spot for pathogenic conversion of prion protein and anti-prion compounds

○Yuji O. Kamatari¹, Yosuke Hayano¹, Tsutomu Kimura¹, Junji Hosokawa-Muto¹, Takakazu Ishikura¹, Norifumi Yamamoto, Kei-ichi Yamaguchi¹, and Kazuo Kuwata¹

¹Center for Emerging Infectious Diseases, Gifu University.

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are fatal, untreatable neurodegenerative disease associated with the accumulation of the disease specific conformation for prion protein. Conversion from the cellular form (PrP^C) to the scrapie form (PrP^{Sc}) is essentially a misfolding process without changing in covalent structure. So far, we have reported a variety of anti-prion compounds [1,2], and it is also reported several anti-prion compounds from other groups. In this study, we compared binding property of these compounds to PrP^C to identify a hot spot for pathogenic conversion of prion protein. NMR chemical shift perturbation experiments showed the existence of the common binding site for several compounds, helix B and B-C loop, indicated that this site may be the hot spot for the conversion. NMR studies using a series of derivatives of an anti-prion compound, GN8, also showed that increasing the binding population on the hot spot increased the anti-prion activity. Computer simulation studies indicated that fluctuation in this region is reduced by binding the compounds. In summary, anti-prion compounds that act as chemical chaperon bind to the hot spot and reduced the flexibility in this site and block to the intermediate, PrP*, which converts to PrP^{Sc}.

プリオン病は、脳の海綿状変性を特徴とする致死性の神経変性疾患である。プリオン病の有効な治療法は確立されていない。プリオン病は、正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) が異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) へ構造変換され脳へ蓄積することによって引き起こされると考えられている。近年当センターでは、PrP^Cの構造に基づいた抗プリオン化合物開発を行っており、これまでいくつかの抗プリオン化合物を発見してきた[1,2]。また我々以外のグループにおいてもいくつかの抗プリオン化合物が報告されている。本研究では、これらの抗プリオン化合物の作用機構を比較した。また、プリオンタンパク質への結合部位を NMR 化学シフト摂動法により比較することにより、プリオンタンパク質構造変換におけるホットスポットを推定した。さらに、我々

Chemical shift perturbation, Anti-prion compounds, Protein-compound interaction

○かまたりゆうじ, はやのようすけ, きむらつとむ, むとうじゅんじ, いしくらたかかず, やまもとのりふみ, やまぐちけいいち, くわたかかずお

の発見した抗プリオン化合物である GN8 の類縁体を用いた実験は、このサイトへの結合量と抗プリオン活性との間に相関があることを示した。GN8 類縁体は天然状態のこのホットスポットに結合することにより揺らぎを抑え、異常型構造への構造変換の鍵となる中間状態 PrP* への変換を防ぐことにより抗プリオン活性を発揮していると考えることが出来る (Fig. 1)。プリオン蛋白質と GN8 の複合体の変性のシュミレーションの結果も、GN8 結合によりこのホットスポットの揺らぎが抑えられることを示しており [3]、この構造変換モデルを支持している。

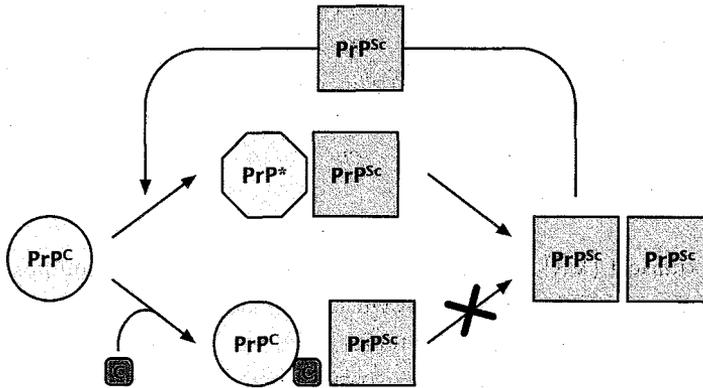


Fig. 1. A model of inhibitory mechanism by anti-prion compounds GN8 derivatives.

- [1] K. Kuwata et al. (2007) Proc Natl Acad Sci U S A 104, 11921-11926.
- [2] J. Hosokawa-Muto, Y. O. Kamatari, H. K. Nakamura & K. Kuwata (2009) Antimicrob Agents Chemother 53, 765-771.
- [3] N. Yamamoto & K. Kuwata (2009) J. Phys. Chem. B, 113, 12853-12856.

45kDa プロテインキナーゼVRK1のNMR構造解析

○梶尾尚哉¹, 小柴生造^{1, 2}, 横山茂之^{1, 3}, Yoon Ho Sup⁴, 木川隆則^{1, 5}
¹理研・生命分子システム基盤, ²横浜市大・院生命ナノシステム,
³東大・院理, ⁴SBS, NTU, ⁵東工大・院総理工

Structural analyses of 45 kDa protein kinase using NMR spectroscopy

○Naoya Tochio¹, Seizo Koshiba^{1, 2}, Shigeyuki Yokoyama^{1, 3}, Yoon Ho Sup⁴, and Takanori Kigawa^{1, 5}

¹RIKEN Systems and Structural Biology Center, Kanagawa, Japan.

²Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.

³Graduate School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

⁴School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, Singapore.

⁵Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Kanagawa, Japan.

Vaccinia related kinase 1 (VRK1) is a serine/threonine protein kinase composed of 396 amino acid residues (M.W. 45 kDa), which is known to mediate the cell response to DNA damage by phosphorylation of the p53 tumor suppressor. Toward the structure determination of the VRK1, we prepared various kinds of stable-isotope labeled samples and then tried many kinds of NMR experiments. With respect to the sample preparation, we successfully applied the cell-free protein synthesis system to produce the highly deuterated samples, the amino acid-selective labeled samples, and the Stereo-Array Isotope Labeling (SAIL) samples. As for the NMR methods, in addition to the combination of the TROSY techniques and the various multidimensional experiments, we tried to measure the Residual Dipolar Coupling (RDC) and the Paramagnetic Relaxation Enhancement (PRE). We will discuss general aspects of structure determination of proteins with the large molecular weight by using NMR spectroscopy.

Vaccinia related kinase 1 (VRK1)は、全長396残基（分子量45kDa）からなるセリン/スレオニンキナーゼであり、癌抑制因子p53をリン酸化することによりDNA損傷への応答を制御すると考えられている。我々はこれまでに、無細胞タンパク質合成技術を活用して、1)メチオニン、システインの α プロトンを除いて、98%以上の高度重水素

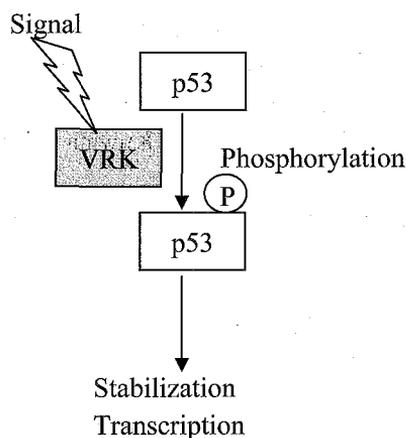


Figure 1. Signaling pathway of VRK1.

プロテインキナーゼ, 安定同位体標識, 無細胞タンパク質合成

○とちおなおや, こしばせいぞう, よこやましげゆき, Yoon Ho Sup,
 きがわたかのり

化標識試料、2)プロリンを除いた19種のアミノ酸選択 ^{15}N 標識試料、ならびに、3)立体整列標識 (SAIL) 試料を調製した。得られた ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N の三重標識試料とアミノ酸選択標識試料を用いて、各種三重共鳴TROSYスペクトルを測定することにより、90%以上の主鎖帰属を得ることができた。また、SAIL試料を用いたHCCH-TOCSY、CCH-TOCSY、および各種三次元および四次元NOESYスペクトルを測定し、側鎖帰属およびNOEを元にした構造計算を現在進めている。さらに、NOEによる比較的近距离の情報に加え、遠距離の構造情報としての残余双極子相互作用 (RDC) や常磁性緩和 (PRE) の情報なども活用することで、より高精度なVRK1の立体構造の解明を目指している。今後はこれらの技術を他の高分子量タンパク質の立体構造解析に適用し、より高効率な解析方法を検討することでハイスループットな解析技術を確立していきたいと考えている。

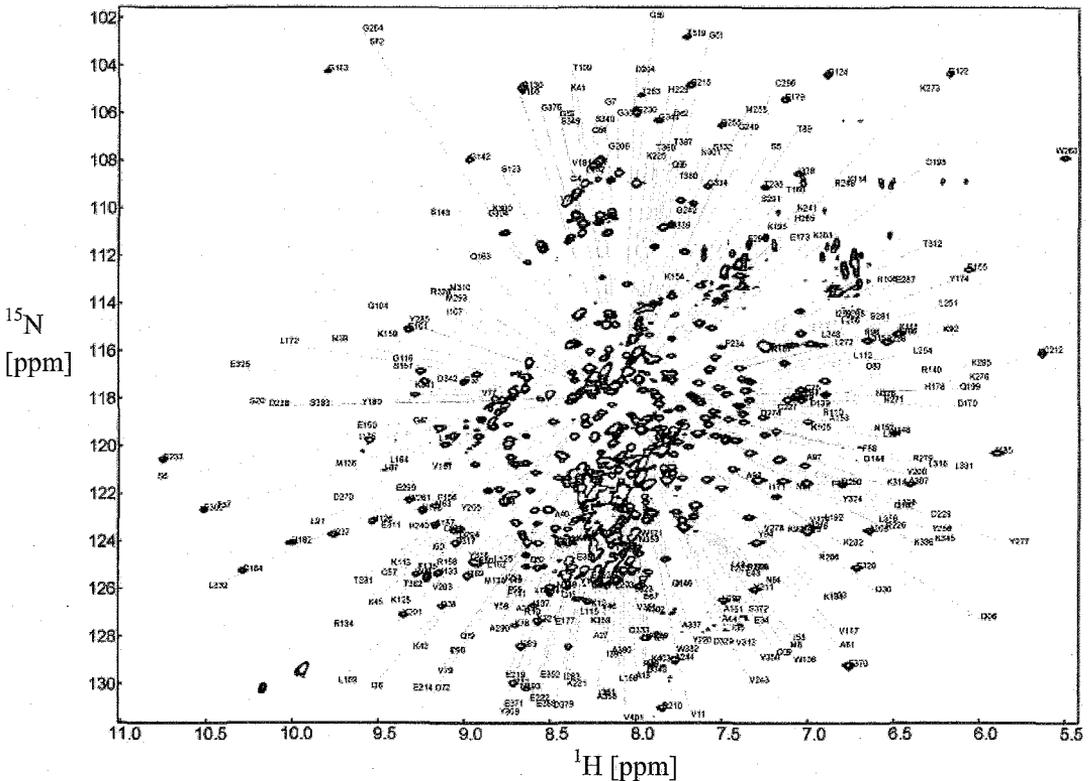


Figure 2. ^1H , ^{15}N TROSY-HSQC spectrum measured using Bruker 900 MHz spectrometer with cryoprobehead.

NDSB類が蛋白質のダイナミクスに及す効果

○若松馨¹, 王海梅¹, 松井文香¹, 神谷歩¹, 加藤瀬里¹, 行木信一¹,
菅瀬謙治²
¹群大・工
²サントリー生有研

Effects of non-detergent sulfobetaines on the dynamic structure of proteins

○Kaori Wakamatsu¹, Haimei Wang¹, Ayaka Matsui¹, Ayumi Kamiya¹, Seri Kato¹, Nobukazu Nameki¹, and Kenji Sugase²

¹*Graduate School of Engineering, Gunma University, Gunma, Japan.*

²*Suntory Institute for Bioorganic Research, Osaka, Japan.*

Aggregation of proteins is one of major bottlenecks in structure analyses of proteins by NMR and X-ray crystallography as well as in the production of biopharmaceuticals such as clinical monoclonal antibodies. Although several different classes of small chemicals that protect proteins from aggregation and denaturation are known, the stabilizing mechanisms have not been made clear for all compounds; the elucidation of the stabilization mechanisms would facilitate the design of better stabilizers. Non-detergent sulfobetaines (NDSBs), used as crystallization helpers, have been shown to stabilize many proteins under various conditions. We previously showed that NDSB-195, one of NDSBs, is useful also for NMR measurements of several proteins and that NDSB-195 does not affect static and fast (ns- μ s) dynamic structures of acidic fibroblast growth factor. Because NDSBs were suggested to affect the slow (\sim ms) chemical exchange motions of several proteins, dynamic structures of KIX-87 were investigated by relaxation dispersion analysis. The effects of other stabilizers on NMR measurements were also analyzed.

蛋白質の凝集はNMRやX線結晶解析による蛋白質の立体構造解析の主要なボトルネックとなっているだけでなく、医療用モノクローナル抗体の生産などでも問題になっている。異なる種類の低分子化合物が蛋白質の凝集や変性を防止するが、安定化メカニズムが分かっていない化合物もあり、その解明はより効果的な安定化剤のデザインに役立つと期待される。結晶化の補助剤として用いられてきたNon-detergent sulfobetaines (NDSB類) は色々な条件下で多くの蛋白質を安定化することが知られている。NDSB-195は蛋白質のNMR測定にも有用であること [1], NDSB-195は酸性繊維芽細胞増殖因子 (aFGF) の静的構造およびns \sim μ sの速い運動に影響を殆ど与えないことを我々は示してきた。NDSB-195は数種の蛋白質の遅い化学交換反応に影響を与えることが示唆されたので、本研究では化学交換が観測しやすいKIX-87蛋白質の動的構造をrelaxation dispersion法で解析することにした [2, 3]。また、NDSB-195以外の安定化剤もNMR測定で有用であるかを検討した。

NDSB, Dynamics, Stabilization

○わかまつかおり, わんはいめい, まついあやか, かみやあゆみ, かとうせり,
なめきのぶかず, すがせけんじ

【結果】

1. KIXの運動性に及ぼすNDSBの効果：

NDSBの添加によるaFGFの ^{15}N - ^1H HSQCシグナルの化学シフト変化は僅かであったのに対し、KIX-87では殆どのシグナルが大きな化学シフト変化を示した（図1）。また、幾つかのシグナルは強度が変化し、その変化の程度は磁場依存的であった。そこで、NDSBの添加はKIXの遅い運動性に影響を与えていると予想される。現在、緩和解析を行なっている。

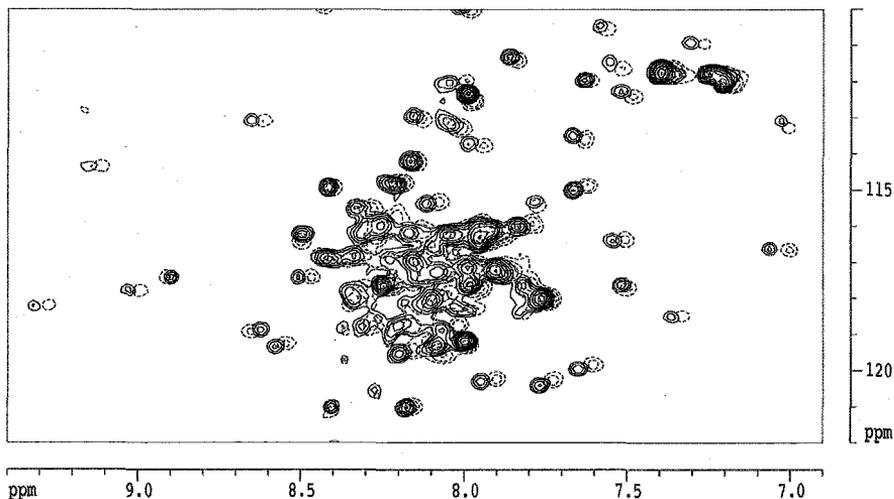


図1. KIX-87の ^{15}N - ^1H HSQCスペクトル（一部）. 実線：0.5 M NDSB存在下，破線：NDSB非存在下（実線に比べて等高線の間隔は2倍）.

2. NDSB-195以外の安定化剤のNMRへの応用の可能性：

蛋白質の安定化剤としては、グリセロール、トレハロース、アルギニン [4]、アルギニン+グルタミン酸混合物 [5] など知られている。これらの安定化剤が蛋白質の高温におけるNMR測定で利用できるかをGαi1で解析した。グリセロールはNDSB-195と同様に高温におけるシグナルの減少速度を低下させたが（半減期が延びた）、初期強度を低下させた。また、アルギニンやアルギニン+グルタミン酸混合物はシグナルの減少を促進した。蛋白質の高温でのNMR測定に役立つ化合物は現在のところ、NDSB類のみである。

【参考文献】

1. L. Xiang, et al., *J. Magn. Reson.* 194, 147–151 (2008).
2. M. Tollinger, et al., *Biochemistry* 45, 8885–8893 (2006).
3. K. Sugase, et al., *Nature* 447, 1021–1025 (2007).
4. K. Tsumoto, et al., *Biotechnol. Prog.* 20, 1301–1308 (2004).
5. A. P. Golovanov, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8933–8939 (2004).

時間領域データの共有再構成を用いた T_2 計測による 定量的ヒト脳内 2D CT-PRESS 法

○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

Quantitative 2D Constant Time PRESS in human brain by T_2 correction using 2D FT of shared time domain data

○Hidehiro Watanabe, Nobuhiro Takaya, Fumiyuki Mitsumori
National Institute for Environmental Studies

A fast T_2 correction and quantitation method on CT-PRESS spectra using 2D FT of shared time domain (TD) data is proposed. Spectra with varied T_{ct} were generated by reconstruction of several partial TD data having shared area with other partial TD data. Then, T_2 was calculated by curve-fitting of peak volumes on these spectra. T_2 of Cr singlets by this method was in good agreement with T_2 by conventional method using 1D spectra. After coil-loading factors were considered by the internal water reference method in quantitation protocol, concentration of glutamate in human brain was calculated as 8.0 mM which is in good agreement with reported values.

1. はじめに

励起パルスからデータ収集開始までを一定時間長 (T_{ct}) として 2 次元データを収集する Constant Time (CT) 法では、 F_1 方向の J_{HH} デカップリングによる良好なピーク分解が可能である。これまでに我々は、4.7 T ヒト用 MR 装置上で局所励起 CT-COSY 法を開発し、ヒト脳内の主要な神経伝達物質であるグルタミン酸 (Glu)、 γ -アミノ酪酸 (GABA) のピーク検出 (1) および濃度定量化を報告してきた。この定量化法では、 T_2 による信号減衰の補正、所謂 T_2 補正が必要であり、異なる T_{ct} 条件で取得した複数のスペクトルに対して J_{HH} を考慮したスペクトル解析を行うが、少なくとも 2 つのスペクトルを取得する必要があるため、80 分の測定時間が必要であった。このため、高感度化すべくスピンエコー型の CT 法へと発展させ、CT-PRESS 法にても上記ピークの検出が可能であることを報告した (2)。今回、時間領域 (TD) データの共有再構成法を用いることで高速化を達成する定量 CT-PRESS 法を提案し、ファントム実験およびヒト脳内グルタミン酸濃度定量化を行ったので報告する。

2. 方法

定量化法で用いる CT-PRESS パルスシーケンスは、水信号抑圧パルス、領域外飽和パルスに続き、局所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。 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を収集する。

ヒト脳、定量化、CT-PRESS

○わたなべひでひろ, たかやのぶひろ, みつもりふみゆき

N_1 回の全 t_1 ステップ終了後、得られた $N_1 \times N_2$ の全領域の 2D TD データに対して 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 補填を行う。続いて、Fig. 1 に示す様に、得られた $N_1 \times N_2$ の全領域 TD データから、まず $n_1 \times n_2$ の部分 TD データ領域 TD1 を切り出して再構成し、スペクトルを取得する。続いて、部分領域 TD1 とは異なるが、一部を共有する $n_1 \times n_2$ の部分領域 TD2 の再構成により、スペクトルを取得する。 t_1 方向のそれぞれの FID データは異なる TE を持っているので、TD1、TD2 からそれぞれ $T_{ct,1}$ 、 $T_{ct,2}$ で T_2 の重みの掛かったスペクトルが得られる。従って、1 回の測定で取得した全データ領域から複数のスペクトルを得ることができ、これらのスペクトル解析の結果、各代謝物ピークの T_2 補正が可能となり定量化ができる。

この提案方法を PC 上の MATLAB で開発した。模擬試料実験およびボランティア測定は、全身用 4.7 Tesla MRI 装置 INOVA (Varian, USA) を用いて行った。まず、本方法での T_2 測定実証のため、10 mM NAA、8 mM Cr、9 mM Glu、2 mM GABA、3 mM Gln を含む脳模擬試料実験を行い、提案法により T_2 を求めた。次に、singlet である Cr ピークの T_2 を異なる TE の 1D スペクトル列から求め、提案法による結果と比較した。ボランティア測定では、頭頂・後頭葉領域内の $30 \times 30 \times 30 \text{ mm}^3$ のボクセルから CT-PRESS 信号を測定時間 24 分で取得し、グルタミン酸の濃度定量化を行った。

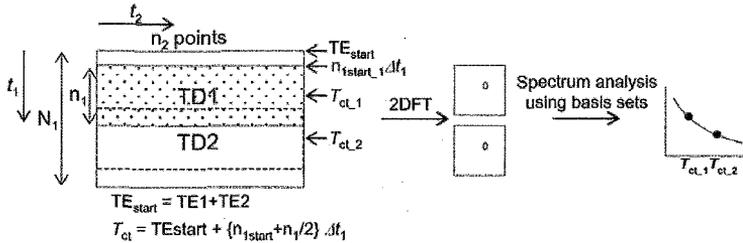


Fig. 1. A schematic of a proposed T_2 measurement method on highly resolved CT-PRESS spectra.

3. 結果

ファントム実験の結果、Cr ピークの T_2 は従来法で 574 ms、提案法で 582 ms であり、提案法により T_2 が求められることが実証できた。ヒト脳内のグルタミン酸は、8 mM と求められ、既報告値と同等であった。

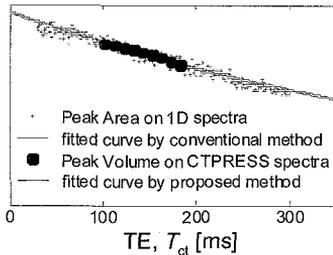


Fig. 2. Comparison between proposed T_2 measurement method on CT-PRESS spectra and the conventional method on 1D spectra. T_2 of Cr peak was calculated.

4. 結語

定量的 2D CT-PRESS 法は、30 分程度の測定時間でヒト脳内のグルタミン酸の濃度定量化が可能であり、この方法を用いて、GABA などの J_{HH} カップリングを有する代謝物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, 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, 第 47 回 NMR 討論会講演要旨集, pp. 360-361

第二日目

11月11日(水)

英語セッション

Day 2 (Nov. 11, Wed.)

(English Session)

OspA の立体構造揺らぎ

○北原亮¹²、Alana Simorellis³、横山茂之²⁴⁵、小出昌平⁶、赤坂一之²⁷

¹立命館大・薬、²理研播磨、³ユタ大・化学、⁴理研・生命分子システム、⁵東大院理、⁶シカゴ大・生化学分子生物、⁷近畿大・高圧力蛋白質研究センター

Intermediate conformer of the Lyme disease vaccine candidate OspA probed with variable pressure NMR spectroscopy

Ryo Kitahara¹², Alana Simorellis³, Shigeyuki Yokoyama²⁴⁵, Shohei Koide⁶, Kazuyuki Akasaka²⁷

¹Pharm, Sci. Ritsumeikan Univ., ²RIKEN-Harima, ³Dep.Chemi.Univ. Utah, ⁴RIKEN SSBC, ⁵Univ. Tokyo, ⁶Dep.Biochem. & Mol. Biol. Univ. Chicago, ⁷High Pressure Protein Research Center Kinki Univ.

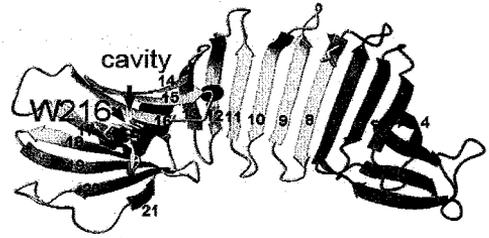
Outer surface protein A (OspA) from *Borrelia burgdorferi* consists of a unique single-layer β -sheet structure sandwiched by two globular domains and is involved in the transmission of Lyme disease from the host tick to the uninfected mammal. To find a link of its unique conformation to the mechanism of infection, here we study the stability and the conformational fluctuations of OspA using ¹⁵N/¹H two-dimensional NMR spectroscopy under pressure perturbation. We found that the unique folded structure (N) fluctuates with a hinge-like motion ($\tau \ll$ ms) in the middle of the non-globular single-layer β -sheet. In addition, the folded structure undergoes a major conformational transition ($\tau >$ ms) with a large volume decrease (-140 ml/mol) to a single, peculiar intermediate (I), in which about two thirds of the polypeptide chain in the C-terminal side is unstructured with the rest of the molecule largely intact. The uniqueness of the conformation and its relatively low free energy (32 kJ/mol above N) suggests that conformer I be identified with the putative high-energy conformer involved in the bacterial infection.

[序論] 高圧力NMR法は、約 3500 気圧までの高圧力下で溶液NMR測定を可能にする手法であり、これまでに 20 以上の球状蛋白質について測定が行われ、複数の蛋白質について天然状態を逸脱した準安定状態の存在を明らかにした。この手法を、大変ユニークな連続的 β シート構造を持つ 31 kDa の蛋白質に適応した例を紹介する。

Key word: Pressure, Intermediate, Vaccine

○きたはらりょう、アラナ シモレリス、よこやましげゆき、こいでしょうへい、あかさかかずゆき

Borrelia burgdorferi 由来の Outer surface protein A (OspA, 31 kDa) は、アメリカを中心に流行しているライム病の感染に関わる蛋白質である。*Borrelia burgdorferi* は、ダニによる媒介によりヒトを含む哺乳動物に感染する。細菌表面蛋白質である OspA は、その N 末端に修飾された脂質を介して細菌の細胞膜に結合している。OspA の C 末端ドメインはダニの腸管表面の受容体を認識する機能を持ち、*Borrelia* がダニの腸管内で共棲するためにこの機能が必須であると考えられている。また OspA は細菌感染の初期に働くためライム病のワクチンとして利用されたが、副作用の問題が生じたため安全性の高いワクチンが望まれている。



OspA は 21 本の逆平行の β ストランドを有し、C 末端に唯一の α ヘリックスを有する。N 末端と C 末端は球状ドメインであり、それを繋ぐ中央には非球状の露出した β シート構造が存在する。OspA の構造安定性については、ライム病ワクチン候補としての観点で意味があり、これまでに小出らにより熱測定や様々な分光学的研究がなされてきた。

【結果と考察】 0.1 MPa-250 MPa (313 K) までの範囲で $1D-^1H-NMR$ 、 $2D-TROSY$ 測定を行った。150MPa までの加圧とともに 1H 及び ^{15}N で明確な化学シフトの変化が観測された。特に、N 及び C 末端球状ドメインを繋ぐ中央 β シート領域の一部 ($\beta 7-\beta 9$) では、平均を大きく逸脱するシフトが観測されたことから、ミリ秒より速い時間スケール ($\tau < ms$) でこの β シート領域をヒンジとした構造揺らぎが存在することが示唆された。さらに 150 MPa-250 MPa では、加圧とともに一部のピークについて信号強度の減少と変性状態由来の多数の信号が観測された。このことから N 末端ドメイン ($\beta 1-\beta 7$) はその立体構造を保持するものの、中央 β シートと受容体及び抗体結合部位を含む C 末端ドメイン ($\beta 8-\beta 21$) の構造は壊れることが分かった。また TROSY スペクトルの中央部に分離した尖鋭な信号が複数生じていることから、転移の時間スケールはミリ秒より十分遅い ($\tau > ms$) と考えられる。この結果は、OspA は天然構造と変性構造の他に、中央 β シート領域と C 末端ドメインが変性した局所変性構造との化学平衡状態にあることを意味する。圧力下で安定化された局所変性構造は、これまでに重水素交換 NMR 法により示唆された各ドメインの安定性と良い一致を示した。局所変性構造では、受容体認識部位を含む 150 残基以上が変性しアームの如く伸びることにより広い範囲での受容体認識を可能にしていると推測される。また N 末端ドメインから独立した安定性を示す中央 β シート領域-C 末端ドメインは、抗体結合部位を含むフォールド可能な領域であることから不活性化ワクチンとしての候補となりうる。

Structural Studies of Membrane Proteins Using NMR Experiments on Bicelles

Ayyalusamy Ramamoorthy

Biophysics and Department of Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

Recent studies have shown that NMR spectroscopy is becoming a powerful technique to determine the atomic-level resolution structure of membrane proteins. A number of successful NMR approaches and model membranes have been reported. We are developing solid-state NMR methods to study the structure, dynamics, and topology of several membrane proteins and peptides that are embedded in carefully chosen model membranes. High-resolution experimental results obtained from magnetically aligned bicelles containing uniformly labeled transmembrane proteins, cytochrome b5 with and without cytochrome P450, will be presented along with results from MAS experiments.¹⁻³ Advantages of using rotating-frame and laboratory-frame NMR techniques, and spectral editing techniques, will also be presented. New approaches to study the membrane interaction of unstable amyloidogenic peptides will also be presented.

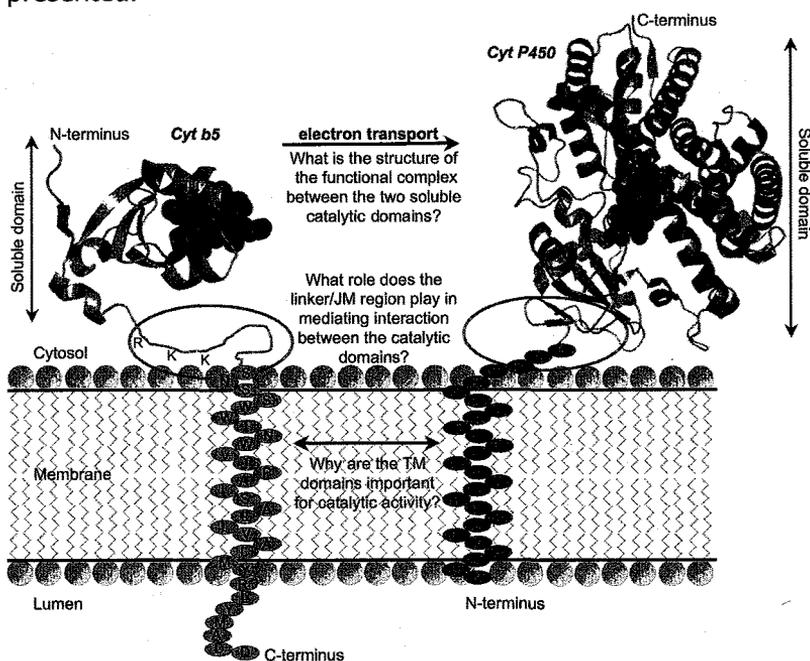
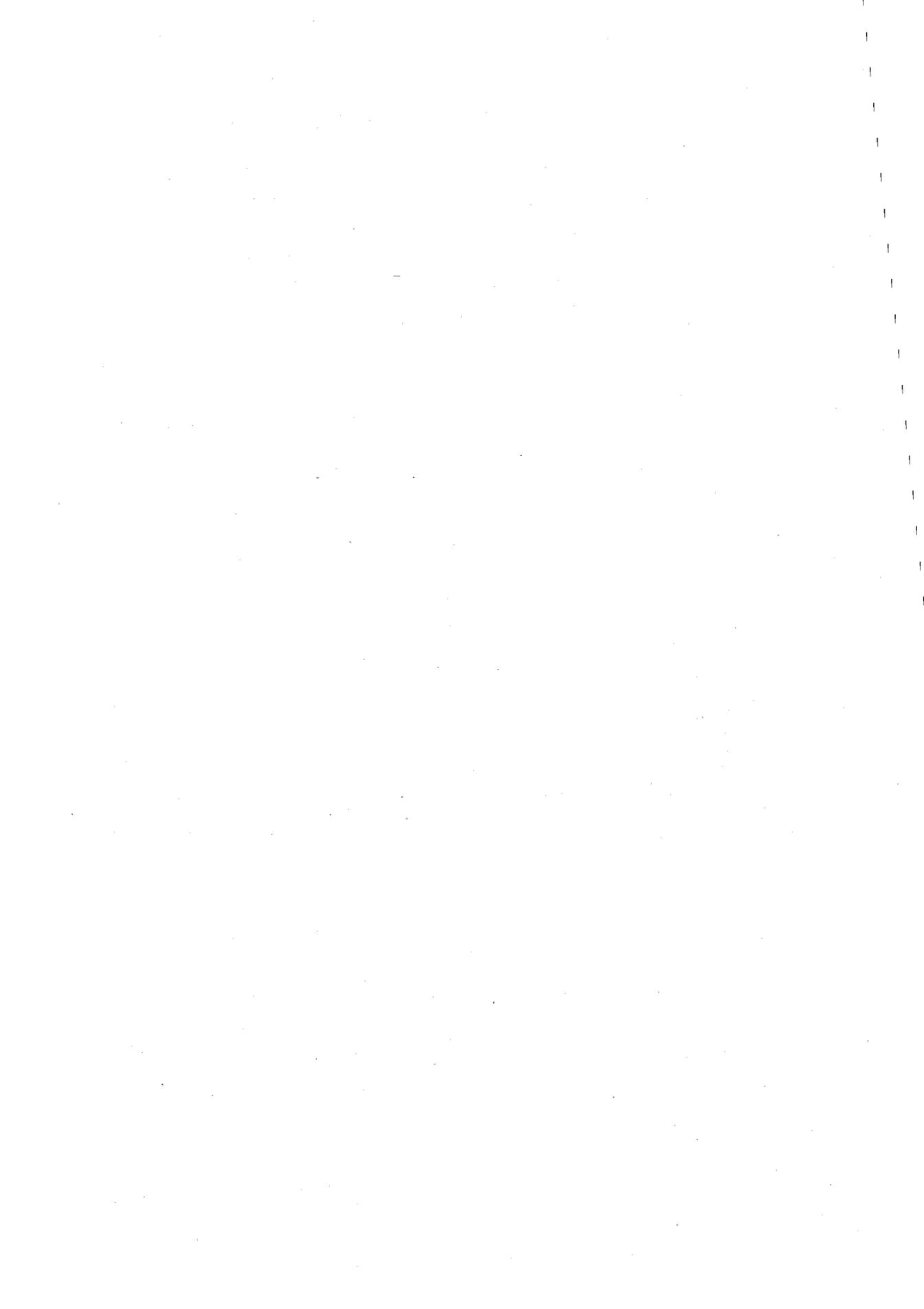


Figure 1: Cartoon model of the full-length form of Cyt-b5 and Cyt-P450. A cross-section of the soluble domains of Cyt-b5 (PDB code: 1CYO) in grey and Cyt-P450 (PDB code: 1PO5) in green is shown. The space-filling model in red represents the heme domain.

References

- 1) U. H. N. Dürr, K. Yamamoto, S.-C. Im, L. Waskell, and A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6670 (2007).
- 2) U. H. N. Dürr, L. Waskell, and A. Ramamoorthy, *BBA Biomembranes* **1768**, 3235-3259 (2007).
- 3) J. Xu, U. H. N. Dürr, S.-C. Im, Z. Gan, L. Waskell, and A. Ramamoorthy, *Angew. Chem.*, **47**, 7864-7867 (2008).



Nuclear spin polarization of alkali-salts by optically-pumping atomic vapor

Kiyoshi Ishikawa

Graduate School of Material Science, University of Hyogo, Japan

We report on the nuclear spin-polarization of solid alkali-salts by an optical pumping of atomic vapor. Spin-polarized alkali-metal atoms transported angular momentum as the electron and nuclear spin-polarization to the solid surface, where spin polarization mostly decayed fast but was partly injected to solid, and angular momentum was accumulated in the nuclear-spin system by the help of large relaxation time. The enhancement of NMR signals was measured at various magnetic fields, temperatures, laser frequencies, pump polarizations, and N₂ buffer-gas pressures. Comparing with the numerical simulation of spin currents by alkali-metal vapor, we discuss which spin-current is responsible for the nuclear spin-polarization of salts and how the NMR enhancement depends on the above parameters.

固体のアルカリ塩の核スピン偏極について、気体原子の光ポンピングによる方法を報告する。ガラス容器中で気体のアルカリ金属原子を光ポンピングすると、電子スピと核スピが偏極され、その流れが壁に向かって発生する。それらスピ流が壁に達すると、ほとんどは無駄に緩和するが、角運動量の一部は壁などの固体にわたり、固体の核スピを偏極する。固体中の核スピ緩和時間が長ければ、十分な角運動量が固体に蓄積する。一部のアルカリ金属は電気四重極モーメントが非常に小さく、緩和時間は室温で数分から数10時間にわたり、対称性のよいアルカリ塩は角運動量を蓄積する物質として適している。磁場 9.4 T における結果を2006年のNMR討論会で発表して以来3年間で、試料作成の再現性を改善し、さまざまな実験条件においてスピ偏極増大を観測した。講演では、レーザー光から、アルカリ金属原子を介し、固体にまで角運動量に移る機構を解説しながら、この新しい核スピ偏極法の特徴を紹介する。

実験では、試料として水素化セシウム (CsH, CsD) を使い、Cs イオンの NMR 信号を観測した。アルカリ塩の微結晶を側壁内面に生成させた円筒形ガラス容器を磁場中に設置し、Cs 原子を光ポンピングする。光ポンピングと信号検出は、同じ大きさの磁場で行なう。試料は固体であるが、興味あるのは核スピ偏極率なので、RF 単パルスにより誘起した FID 信号により偏極率を評価した。実験装置の配置は、希ガス原子のスピ交換

Hyperpolarization, Alkali salt, Optical pumping

いしかわ きよし

光ポンピングと類似しており、スピン偏極移行のためにはマイクロ波などは不要である。磁場は、9.4 T (Cs 共鳴周波数: 52.4 MHz), 2.7 T (15.1 MHz), 0.56 T (3.17 MHz) の3段階で切り替えた。試料温度は 70 ~ 140 °C の範囲で変化させた。励起レーザーは出力約 1 W で、Cs 原子の D_1 線 (894 nm) または D_2 線 (852 nm) に共鳴させた。 D_1 線のみならず D_2 線でも効率よい光ポンピングが可能なのは、原子のゼーマン分裂が、基底状態の超微細分裂より大きいからである。このような条件で、約 $10^{16} \text{ h/cm}^2 \cdot \text{s}$ @ 100 °C のスピン流が固体表面に流れ込むと期待できる。熱平衡状態の核スピン偏極を正確に評価することは難しいが、少なくとも 80 程度の偏極率の増大が得られた。

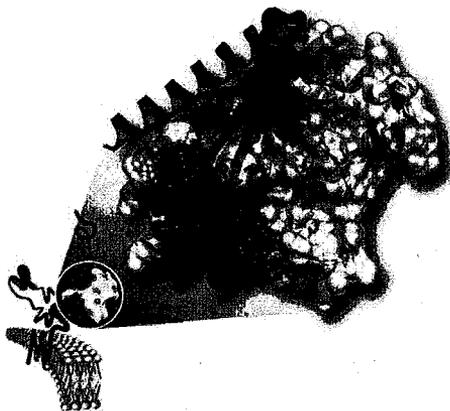
さて、この研究の特徴は、固体のスピン偏極のため気体原子を使うことである。希ガスのスピン交換光ポンピングでは、個々の希ガス原子が、スピン源となるアルカリ金属原子と衝突し、電子スピンから核スピンに偏極移行を実現させていた。それに対し、表面でしか相互作用の機会がない気体から固体に、スピン偏極が有意に移るのは驚きである。光から固体までのスピン偏極移行の過程を順に追っていくと、最初のステップは、レーザー光で誘起する気体のスピン流である。以下では、緩衝ガス圧により現象を分類する。1 気圧程度の緩衝ガスが存在する場合、Cs 原子は緩衝ガスと衝突しながら壁に向かって角運動量を運ぶ。角運動量を担っている原子自身が拡散で移動するので、スピン流も拡散モードである。さらに緩衝ガスは、原子の並進運動だけでなく、光学遷移やスピンドイナミクスにも影響する。たとえば、Cs 原子が緩衝ガスと衝突すると、電子スピン偏極が核スピンに移る — 超微細シフトポンピング、つまり、気体の電子スピン流と核スピン流は互いに結合する。緩衝ガスが 10^{-2} 気圧程度では、超微細シフトポンピングは無視できる。一方、緩衝ガスは拡散の速さを決め、光学遷移を消光させる。特に後者は、スピン偏極の符号に関わる点で重要である。最後に、緩衝ガスがない真空容器の場合、光ポンピングされた Cs 原子は、弾道運動ののち壁に衝突する。したがって、上で述べた複雑な過程はほとんど存在せず、独立な原子の光ポンピングのみがスピンの流れを決めることになる。実験では、緩衝ガスの有無によりスピン流の符号が反転し、したがって、スピン注入による固体の NMR 信号も符号を変えた。

スピン偏極移行の第 2 段階は固体表面におけるスピン相互作用であり、第 3 段階は固体内のスピン拡散である。気体のスピン流に比べ、こちらには未解決の課題が多い。表面と固体内部について、自由かつ容易に制御できるパラメータが少ないからである。アルカリ塩の核スピン偏極を、アルカリイオンの NMR 感度向上など応用につなげるためには、これら 3 つのステージのそれぞれで高効率なスピン偏極移行を実現する必要がある。今後、多くのアルカリ塩で最適な条件を見つけることを目標に、特に、固体表面と内部に注目し、基礎実験を行なう。

Allosteric Effects on Ubiquitin Ligase Activity by a Novel E2 Binding Region: Integration of NMR, Crystallography, and Molecular Biology

Ranabir Das¹, Jennifer Mariano², Yien Che Tsai², Ravi Kalathur³, Jess Li¹, Robert McFeeters¹, Amanda Altieri¹, Xinhua Ji³, Allan M. Weissman², **R. Andrew Byrd**¹. ¹Structural Biophysics Laboratory; ²Laboratory of Protein Dynamics and Signaling; and ³Macromolecular Crystallography Laboratory, CCR, NCI, Frederick, MD, USA.21702-1201

The ubiquitin ligase gp78 is an important regulator of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) and has been linked to metastasis in sarcomas. gp78 is a polytopic RING finger E3 that functions in cells with the ERAD E2, Ube2g2, and is characterized by an intriguingly complex domain structure for a single subunit E3. In addition to its RING finger, the extended cytoplasmic C terminal tail of gp78 includes a ubiquitin-binding CUE domain. Our examination of both of these domains by NMR spectroscopy reveals structures similar to previously described members of these families. A unique feature of gp78 is a discrete Ube2g2 binding region (G2BR) located near the C terminus of the protein that binds Ube2g2 with high specificity and affinity and that is required for the function of gp78 in cells. Our studies reveal a complex physical and functional interaction between the G2BR and Ube2g2. The G2BR not only has the capacity to bind Ube2g2 but to also stimulate ubiquitination by Ube2g2 and a truncated gp78 lacking endogenous G2BR when the G2BR is provided 'in trans'. We have characterized the biophysics of the G2BR:E2 interaction via calorimetry and determined the binding site via NMR and x-ray crystallography. The G2BR is unfolded in solution and adopts an alpha-helical topology and an extensive interaction interface when bound to Ube2g2. The interaction surface is identical in solution (by intermolecular NOESY data) and the crystal structure. Our structural and binding studies reveal G2BR-induced alterations in Ube2g2 interactions with the gp78 RING that suggest a mechanistic explanation for the enhanced activity observed with the G2BR. Further, we have determined that increased activity can also be observed specifically with Ube2g2 when other RING finger domains are employed in ubiquitination reactions. These findings provide new mechanistic insights into E2-RING finger function and suggest that binding of E2s by discrete domains, independent of their E1 and RING finger interaction sites, may provide a general mechanism for regulating their function. This suggests a previously unappreciated mechanism by which ubiquitylation can be regulated. It is possible that other pairs of E2s and E3s interact through domains, which have yet to be characterized, that are similar to the gp78 G2BR and its corresponding binding site on its E2. This introduces the possibility of entirely new therapeutic avenues in cancer and other diseases. Current work is exploring the design of modulators of these interactions.



In-Cell NMRによるヒト細胞内におけるタンパク質の分子間相互作用・安定性の解析

○猪股晃介^{1,2}, 真板(大野)綾子^{2,8}, 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, 二木史朗^{4,5}, 伊藤隆^{2,6}, 廣明秀一^{2,3}, 白川昌宏^{1,2,7}

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, ⁸徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

In-Cell NMR studies for intermolecular interactions and folding stability of proteins inside human cells

○Kohsuke Inomata^{1,2}, Ayako Ohno^{2,8}, Hidehito Tochio^{1,2}, Shin Isogai¹, Takeshi Tenno^{2,3}, Ikuhiko Nakase⁴, Toshihide Takeuchi⁴, Shiroh Futaki^{4,5}, Yutaka Ito^{2,6}, Hidekazu Hiroaki^{2,3}, Masahiro Shirakawa^{1,2,7}

¹ Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

² CREST, JST

³ Division of Structural Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University

⁴ Institute for Chemical Research, Kyoto University

⁵ SORST, JST

⁶ Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University

⁷ RIKEN, Yokohama Institute

⁸ Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima

In-cell NMR is an isotope-aided multi-dimensional NMR technique that enables observations of conformations and functions of proteins in living cells. However, application of in-cell NMR has been limited to *E. coli* or *Xenopus laevis* oocytes. For wider application, we have established a method to obtain high-resolution multi-dimensional heteronuclear NMR spectra of proteins inside living human cells. In this presentation, we will demonstrate two applications of our in-“human cell” NMR. First, we detected intermolecular interaction of ubiquitin with endogenous binding partners. Intriguingly, the interaction was observed exclusively inside cells, but not in cell lysates. Second, we evaluated the folding stability of ubiquitin inside living cells by performing a hydrogen exchange experiment coupled with in-cell NMR spectroscopy.

“In-cell NMR”は細胞内の蛋白質を異種核多次元NMR測定により選択的に観測し、生きた細胞内での蛋白質の構造・動的挙動を原子レベルで解析することを目的とする。しかしながら、従来のin-cell NMRは大腸菌やアフリカツメガエルの卵母細胞に限定されていた。

In-Cell NMR, Hetero-nuclear Multi-dimensional NMR, Mammalian cells

○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, いたう ゆたか, ひろあき ひでかず, しらかわ まさひろ

我々は、HIV-1ウイルスのTat1蛋白質由来のCell Penetrating Peptide(CPP)を利用して、高効率に安定同位体標識された蛋白質を細胞質に導入することで、世界に先駆けてヒト等高等哺乳動物の細胞におけるin-cell NMR測定に成功した。またその過程で、pyrenebutyrateによる細胞処理、細胞質におけるCPPの切断が、目的蛋白質の細胞質・核質への均一な導入に必須であることを見出している。本発表では、上記手法を用いて行った2つの応用実験について示す。

(1)ヒト細胞内に導入された蛋白質(ユビキチン:Ub)と細胞内在性の蛋白質との特異的な分子間相互作用の検出を行った(Fig. 1)。ユビキチンの野生型と変異体のin-cell NMRスペクトルを比較すると、特定の残基のピーク強度が変異体のそれに比べて著しく減少しており、細胞内在性蛋白質との特異的相互作用が示唆された。興味深いことに、野生型ユビキチンを導入した細胞の破碎液の上清を測定したところ、先のようなシグナル強度の減少は見られなかった。これらのことから、上記シグナル強度の減少を引き起こした相互作用は生きた細胞内でのみ現れる何らかの状態・構造と深く関連があると推測される。

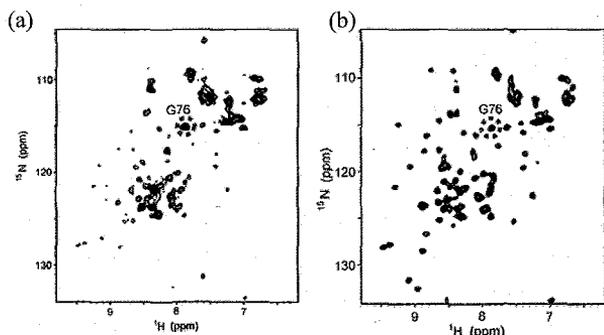


Figure 1
In-cell NMR spectra of (a) wild-type ubiquitin and (b) L8A, I44A, V70A ubiquitin derivative.

(2)細胞内での重水素/軽水素交換実験によって細胞内におけるUb(及びその変異体)の主鎖アミド水素の交換速度を測定し、*in vitro*のそれと比較した(Fig. 2)。得られる水素交換の速度は蛋白質のフォールディング安定性と関連付けることができる。蛋白質は、**macromolecular crowding** 効果や排除体積効果等の理論的考察と*in vitro*モデル実験の結果から、一般に細胞内の方が安定化する傾向にあると考えられていた。しかし、我々の実験結果はこの通説とは逆であった。すなわち、*in vitro*に比べて細胞内では水素交換の速度が一桁程度促進されており、細胞内では*in vitro*よりUbのフォールディングが不安定になることが示唆された。これまで生きた細胞内で蛋白質のフォールディング安定性を定量的に評価する手法はなかった。今回見られたUbの不安定化は、本法により初めて得られた知見である。

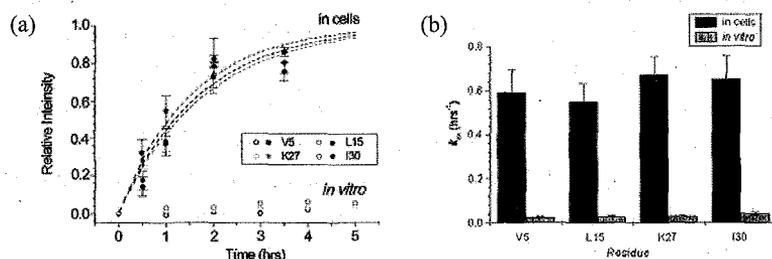


Figure 2 Hydrogen exchange experiment of ubiquitin in cells
(a) Build-up of cross-peaks of protected amides in the spectra of ubiquitin recovered in lysates collected at various times after protein transductions.
(b) The hydrogen exchange rates (k_{ex}) in cells (black) and *in vitro* (gray)

Fuyuhiko Inagaki

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

N12, W6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan

In 1972, I joined the laboratory of Prof. Tatsuo Miyazawa at the Department of Biophysics and Biochemistry, Faculty of Science, University of Tokyo, as a PhD student and started a structural study of biomolecules using NMR. I was interested in the structural information involved in the pseudo-contact shift induced by paramagnetic lanthanide ions, and I was able to determine the structure and conformational equilibrium of mononucleotides. In 1976, a Bruker WH270 was installed in Prof. Miyazawa's laboratory and I concentrated on the structural and functional studies of neurotoxins from snake venoms and the enzymatic mechanism of RNase T₁ using NMR. As a Japanese Ramsay Fellow, I stayed at Oxford from 1979 to 1981, working with Prof. R. J. P. Williams, and here I continued the neurotoxin work especially working on the dynamic aspects. After I came back from Oxford, I joined the Toray Research Center and started the application of 2D NMR to the structural determination of natural products. In 1986, I moved to the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Sciences as a section chief of Molecular Physiology, where I determined the chemical structures of glycolipids using two dimensional NMR. I proposed a non-empirical method using both TOCSY and NOESY to determine the sequence of sugar chains. Together with the glycolipid work, I started to determine the structure of EGF using 2D NMR, where the work of three groups including us reported essentially the same EGF structure. This showed the value of NMR as a objective method to determine protein structures. After the EGF work was completed, I started an HFSP project in collaboration with Dr. J. Schlessinger and Dr. A. Ullrich in 1990 which led me into the structural biology of signal transduction. The NMR structures of SH3 domains and complexes with their target peptides revealed their roles in the signal transduction. In 1998, I organized a research group of "Protein-protein interaction in intracellular signal transduction" supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas from the Japan Ministry of Education, Science and Culture. I stressed the communication among researchers from different fields including structural biology, molecular biology, and cellular biology. In 1999, I moved to the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University as a professor of Structural Biology and started X-ray crystallography as well as I continued NMR. This expanded my research field, and I studied protein structures to reveal whole biological systems. I studied the structural biology of NADPH oxidase in neutrophil in collaboration with Prof. H. Sumimoto of Kyushu University, the structural biology of innate immunity related to the IRF-3 production system with Prof T. Fujita of Kyoto University, and the structural biology of autophagy with Prof Y. Ohsumi of the National Institute of Basic Biology. I enjoyed

fruitful results in these subjects and benefitted from the human relations we established.

I have spent my time doing research from the beginnings of and all the way to the maturation of structural biology. I have been enjoying science challenges with my students and collaborators and I am proud that many young scientists were brought up in my laboratory: Prof. D. Kohda (Kyushu Univ.), Prof. Ichio Shimada (Tokyo Univ.), Prof. H. Terasawa (Kumamoto Univ.), Prof. S. Tate (Hiroshima Univ.), Prof. J. M. Lancelin (Lyon Univ.), Dr. H. Hatanaka (Tokyo Univ.), Dr. S. Ichikawa (Japan Women's Univ.), Dr. K. Nagata (Tokyo Univ.), Dr. K. Ogura (Hokkaido Univ.), Dr. S. Yuzawa (Kyushu Univ.) and Dr. N. Noda (Hokkaido Univ.) are among these, along with other young students.

Inagaki F, Miyazawa T. NMR Analyses of Molecular Conformations and Conformational Equilibria with Lanthanide Probe Method. *Prog Nuclear Magn Reson Spectrosc.*, 14, 67-111 (1981)

Inagaki F, Shimada I, Miyazawa T. Binding modes of inhibitors to ribonuclease T1 as studied by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry.*, 24, 1013-1020 (1985)

Kohda D, Go N, Hayashi K, Inagaki F. Tertiary structure of mouse epidermal growth factor determined by two-dimensional ¹H NMR. *J Biochem (Tokyo)*, 103, 741-743 (1988)

Kohda D, Hatanaka H, Odaka M, Mandiyan V, Ullrich A, Schlessinger J, Inagaki F. Solution structure of the SH3 domain of phospholipase C-gamma. *Cell.*, 72, 953-960 (1993)

Terasawa H, Kohda D, Hatanaka H, Tsuchiya S, Ogura K, Nagata K, Ishii S, Mandiyan V, Ullrich A, Schlessinger J, Inagaki F. Structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 complexed with a peptide from the guanine nucleotide releasing factor Sos. *Nat Struct Biol.*, 1, 891-897 (1994)

Ichikawa S, Hatanaka H, Takeuchi Y, Ohno S, Inagaki F. Solution structure of cysteine-rich domain of protein kinase C alpha. *J Biochem (Tokyo)*, 117, 566-574 (1995)

Hatanaka H, Ogura K, Moriyama K, Ichikawa S, Yahara I, Inagaki F. Tertiary structure of destrin and structural similarity between two actin-regulating protein families. *Cell.*, 85, 1047-1055 (1996)

Yuzawa S, Yokochi M, Hatanaka H, Ogura K, Kataoka M, Miura K, Mandiyan V, Schlessinger J, Inagaki F. Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility necessary for target recognition. *J Mol Biol.*, 306, 527-537 (2001)

Takahashi K, Suzuki NN, Horiuchi M, Mori M, Sahara W, Okabe Y, Fukuhara Y, Terasawa H, Akira S, Fujita T, Inagaki F. X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol.*, 10, 922-927 (2003)

Ogura K, Nobuhisa I, Yuzawa S, Takeya R, Torikai S, Saikawa K, Sumimoto H, Inagaki F. NMR solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox complexed with a p22phox-derived proline-rich peptide. *J Biol Chem.*, 281, 3660-3668 (2006)

Kobashigawa Y, Sakai M, Naito M, Yokochi M, Kumeta H, Makino Y, Ogura K, Tanaka S, Inagaki F. Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. *Nat Struct Mol Biol.*, 14, 503-510 (2007)

Noda, N.N., Ohsumi, Y., Inagaki, F. Atg systems from the protein structural point of view *Chem. Rev.*, 109, 1587-1598 (2009)

"The choreography of an enzyme's dance"

Dorothee Kern

Department of Biochemistry and Howard Hughes Medical Institute, Brandeis University, Waltham, MA, 02454

The synergy between structure and dynamics is essential to the function of biological macromolecules. While this is a widely accepted concept, key questions remain: Have proteins evolved so that substates necessary for activity are preferably accessible? How do motions on different timescales relate to each other and contribute to biological function? How can a protein interconvert among folded substates but avoid unfolding at the same time? What are the molecular pathways for conformational transitions? How does the energy landscape relate to protein function?

The talk will address these questions. We will quantitatively characterize the energy landscape of a signaling protein and reveal how its features explain allosteric activation. New insights into the transition state of the conformational switch are presented. Second, the energy landscape of an enzyme both during catalysis and in the absence of substrates is being characterized, which allows identification of dynamics that are linked to enzyme catalysis.

Both examples illustrate that motions in folded proteins are not random but preferentially follow the pathways, which create the configuration capable of proficient function. This situation is analogous to protein folding, which is biased so as to sample only a small portion of the energy landscape. The expansion of the concept of non-random sampling of conformational space for efficient biological function from folding to conformational rearrangements within the folded space combines both phenomena through the energy landscape. The timescale and amplitude of motion were characterized by a combination of NMR relaxation, x-ray, single molecule FRET experiments and molecular dynamics simulations. Finally, the hierarchy in space and time for proteins is discussed. The linkage between three different "tiers" of dynamic timescales: (i) Thermally driven, fast (ps), local atomic fluctuations, (ii) faster (ns) motions of whole segments and (iii) larger amplitude, collective, slower motions (μ s-ms), the time-scale of catalysis is characterized.

Ligand-induced protein structural change revealed by orientation induced TROSY shift changes**Shin-ichi Tate^{1,2}**¹*Department of Mathematical and Life sciences, School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Japan*²*PRESTO/JST*

We have been working on the development of a new NMR approach, DIORITE (Determination of the Induced ORientation by Trosy Experiments), for determining the relative domain orientation in large-molecular weight proteins, to which the conventional approach using the residual dipolar couplings (RDCs) cannot be readily applied. In this presentation, we will report our recent application of DIORITE to a various types of proteins. Another advantageous feature of DIORITE will also be described for the determination of the domain orientation of an anisotropically tumbling protein, which also hinders the RDC-based domain orientation analyses.

The use of anisotropic spin interactions that are observed for weakly aligned proteins has generated a various types of novel NMR application to protein structure analyses. We have previously reported the ¹⁵N TROSY shift change induced by weak alignment of protein can be explained by the combinatorial contributions from the residual dipolar coupling (RDC) and the residual chemical shift anisotropy (RCSA) associating with the amide ¹⁵N nuclei (1,2). The alignment-induced TROSY shift change found for each signal can be related to the corresponding peptide plane orientation against the magnetic field. The alignment-induced TROSY shift changes, thus, can provide the alignment tensor parameters consistent with those derived from the RDCs. In contrast to the RDCs, the use of the alignment-induced TROSY shift changes is spurious in its sensitivity for the large molecular weight proteins; the higher-field component in IPAP-HSQC spectrum is hard to observe for the proteins greater than 30 kDa. This TROSY-based approach for obtaining the alignment tensor gives a robust way to determine the domain orientation in the high molecular weight protein, to which the conventional RDC-based experiments is hindered in application.

Keywords: 異方性スピン相互作用, 蛋白質構造, 分子配向

たて しんいち

The TROSY-based alignment tensor analysis is called as DIORITE (2). For elucidating the performance of the DIORITE, we applied it to maltose binding protein (MBP) in the complexes with various ligands including α -, β -, and γ -cyclodextrins and also maltose. The X-ray structure of MBP in the maltose bound form altered the domain orientation from apo-form; the domain rotation was described by the hinge-rotation angle of 32.5 degrees. We applied the DIORITE to see if the DIORITE analysis can reproduce the domain rotation found in the crystal structure. The overlay of the TROSY spectra for MBP in the maltose bound form observed in the isotropic and anisotropic conditions is shown in Fig. 1, which shows significant shift changes induced by the alignment. Using the observed TROSY shift changes and the MBP crystal structure in its apo-form, the domain orientation was determined to have the hinge rotation angle of 32.9 degrees (Fig. 2). The angle was consistent with the X-ray results, which confirms that DIORITE analysis can give the right domain orientation; even though we neglect the intrinsic variations in ^{15}N CSA tensors.

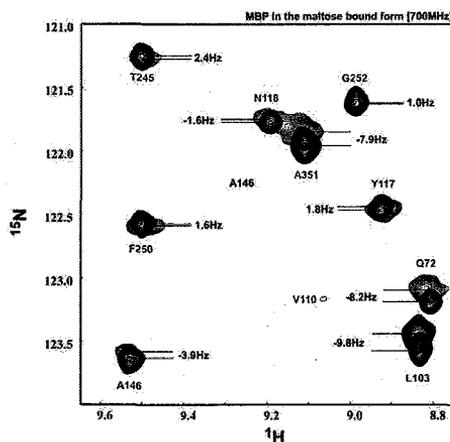


Fig. 1: Orientation-induced TROSY shift changes for MBP in the complex with maltose.

We additionally analyzed the domain orientations in MBP according to the ligand sizes. MBP binds to α -, β - and γ - cyclodextrins with similar affinities. The number of linked glucoses are different in the ligands; six, seven and eight glucose residues in α -, β -, and γ -cyclodextrin, respectively. The DIORITE analyses were applied to the MBP in each ligand. The analyses have shown the domain orientation were changes according to the ligand sizes. The hinge rotation angles induced by the binding to α -, β -, and γ -cyclodextrins were analyzed to give 22.4 degs., 13.3 degs. and 13.9 degs. The MBP in the α -cyclodextrin has shown the closer domain arrangement compared to the complex with the others. MBP was shown to have ability to adopt its domain orientation to appropriately grasp ligand.

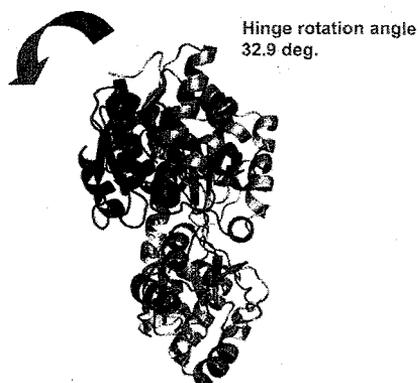


Fig. 2: Domain orientation of MBP in the complex with maltose determined by DIORITE.

In the presentation, we will also describe the other DIORITE application to the protein showing a highly anisotropic rotational diffusion, to which the RDCs-based domain orientation analyses are not readily applied.

References

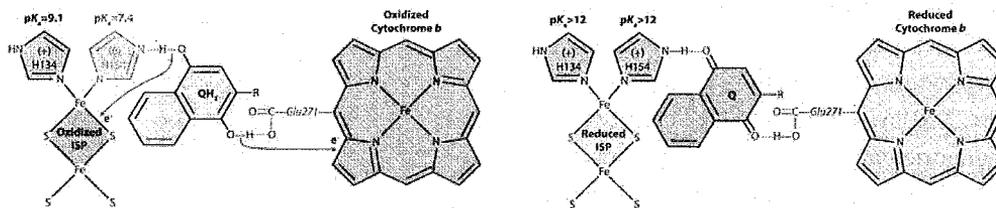
1. Tate, S. *et al.*, *J. Magn. Reson.* 171, 284-292 (2004).
2. Tate, S. *Anal. Sci.* 24, 39-49 (2008).

NMR investigation of the iron-ligated histidines of the Rieske protein from *Thermus thermophilus* supports a coupled proton and electron transfer mechanism

Kuang-Lung Hsueh,^a William M. Westler,^b and John L. Markley^{a,b}

^aGraduate Program in Biophysics, ^bNational Magnetic Resonance Facility at Madison, Biochemistry Department, 433 Babcock Drive, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706, USA
markley@nmrfam.wisc.edu

Our recent NMR investigations of iron-sulfur proteins have centered on the properties of the imidazoles of the two histidines (assigned ambiguously to His134 and His 154) that ligate the iron-sulfur cluster of the *Thermus thermophilus* Rieske protein (*TtRp*) in its oxidized state (1). We previously used directly-observed ¹⁵N NMR spectroscopy to measure the p*K*_a values of The sequence-specific assignment of these p*K*_a values is of critical interest, because of its pertinence to the mechanism of electron and proton transfer in the bifurcated Q-cycle. The extreme paramagnetism of the [2Fe-2S] complex prevented the assignment of these signals by conventional methods. Because the protein sequence of *TtRp* contains a single His-Leu sequence (H134-L135), the unique ¹³C'-¹⁵N connectivity detected from a sample of the protein labeled with [¹⁵N]-Leu and [¹³C, U-¹⁵N]-His could be used to identify the ¹³C' of His134 and, by difference, the ¹³C' of His154. Through-bond NMR correlations enabled these assignments to be extended to the ¹³C^α atoms of the two cluster ligated histidine residues. Correlation of the fitted p*K*_a values of the sequence-specifically assigned histidine ¹³C' and ¹³C^α signals with those from the ¹⁵N^{ε2} signals, led to unambiguous assignment of the p*K*_a values of oxidized *TtRp*: His134 p*K*_a = 9.1 and His154 p*K*_a = 7.4. These unambiguous assignments, which are the reverse of the prior tentative assignments (1), are consistent with a mechanism involving concerted transfer of an electron and a proton at the His154 site (see figure below). We currently are attempting to determine the p*K*_a values of His134 and His154 in the reduced form of the protein. Preliminary NMR results, confirm the expectation that both of these p*K*_a values are >> 10.5.



Supported by NIH grant GM58667. NMR data were collected at the National Magnetic Resonance Facility at Madison, with support from the NIH National Center for Research Resources (P41 RR02301).

1. Lin, I. J.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Song, J.; Westler, W. M.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10672-3.

Sensitivity and Structures in Solid-State NMR: Challenges in Characterization of Amyloid Misfolding and Graphite-based Nano-materials

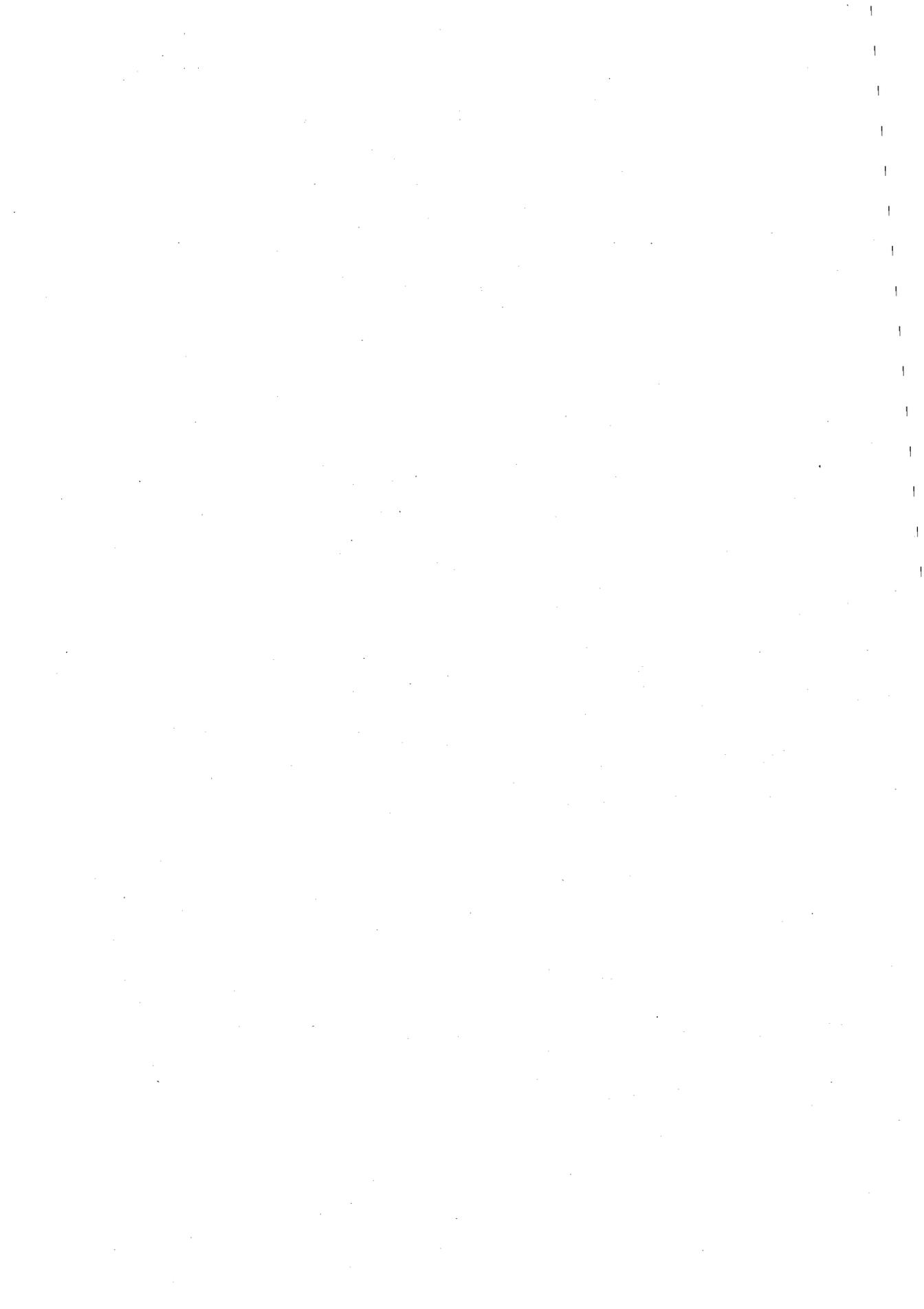
Yoshitaka Ishii

Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago, 845 W. Taylor M/C111,
Chicago, Illinois 60607, USA

Four separate topics on recent progress of solid-state NMR (SSNMR) in our laboratory are presented. First, we discuss a novel approach to enhance sensitivity and to elucidate structural information with paramagnetic relaxation enhancement for amyloid fibrils and other biomolecules in SSNMR. In ^{13}C SSNMR, 95-99 % of the experimental time is typically consumed for long recycle delay (1-4 s) between signal acquisitions, which has been considered to be essential in order to recover ^1H magnetization via T_1 relaxation as well as to prevent degradation of samples or NMR probes by RF irradiation. Interestingly, very little effort has been made to reduce the recycle delays that dominate experimental time over the past 30 years. We present that paramagnetic doping and fast magic angle spinning drastically reduces experimental time by a factor of 5-20 in multidimensional protein SSNMR^{1,2} without any major problems, while providing additional structural information. We discuss the detection limit of multi-dimensional SSNMR in this approach for ^{13}C - and ^{15}N -labeled ubiquitin. Applications are demonstrated for Alzheimer's β ($\text{A}\beta$) fibrils and other proteins. Second, we present SSNMR studies of Cu(II)-bound $\text{A}\beta$ fibrils, which are suspected to produce oxidative species such as H_2O_2 toxic to neurons, via a catalysis-like mechanism. ^{13}C SSNMR analysis provides molecular-level basis on the potential binding site(s) of Cu(II) to insoluble $\text{A}\beta(1-40)$ fibrils and the stoichiometry of Cu(II) binding to $\text{A}\beta$. The extent of the structural changes upon Cu(II) binding is also examined. Third, we discuss SSNMR studies of site-resolved structural characterization of neuro-toxic amyloid intermediates for 40-residue Alzheimer's β amyloid, $\text{A}\beta(1-40)$. In our approach, we combine detection of morphology changes by electron microscopy (EM) and structural examination for freeze-trapped intermediates by SSNMR.^{3,4} We demonstrate that a neurotoxic β -sheet intermediate (I_β) of 20-40 nm diameter exists prior to fibrillization by EM for the wild-type $\text{A}\beta(1-40)$ and a pathogenic mutant of $\text{A}\beta$, E22G. It is shown that the SSNMR approach reveals the sequence-specific secondary and supramolecular structures for the amyloid intermediate for $\text{A}\beta(1-40)$ and the effects of the E22G pathogenic mutation on the molecular structure. In the last topic, we present our SSNMR studies on graphite oxide in efforts to establish SSNMR methods for characterizing chemically modified graphene, a single sheet of graphite. It is shown that multi-dimensional SSNMR on ^{13}C -labeled graphite oxide provides detailed information on its complex chemical connectivity.⁵ The motivation and prospects in applications to chemically modified graphene will be discussed.

References:

- (1) Wickramasinghe, N. P.; Parthasarathy, S.; Jones, C. R.; Bhardwaj, C.; Long, F.; Kotecha, M.; Mehboob, S.; Fung, L. W. M.; Past, J.; Samoson, A.; Ishii, Y. *Nature Methods* **2009**, *6*, 215-218.
- (2) Wickramasinghe, N. P.; Kotecha, M.; Samoson, A.; Past, J.; Ishii, Y. *J. Magn. Reson.* **2007**, *184*, 350-356.
- (3) Chimon, S.; Shaibat, M. A.; Jones, C. R.; Calero, D. C.; Aizezi, B.; Ishii, Y. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1157-1164.
- (4) Chimon, S.; Ishii, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13472-13473.
- (5) Cai, W.; Pine, R. D.; Stadermann, F.; Park, S.; Shaibat, M.; Ishii, Y.; Yang, D.; Velamakanni, A.; An, S. J.; Stoller, M.; An, J.; Chen, D. M.; Ruoff, R. S. *Science* **2008**, *321*, 1815-1818.



Photoilluminated and pressure induced isomerization of retinal proteins and structural changes of proteins as studied by solid-state NMR

○Akira Naito¹, Kazuhiro Ohsawa¹, Hirohide Nishikawa¹, Yuya Tomonaga¹, Akimori Wada², Naoki Kamao³, Izuru Kawamura¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan.

²Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan. ³Faculty of Pharmaceutical Science, Matsuyama University, Matsuyama, Japan.

Pressure was applied to [15, 20-¹³C]retinal-bacteriorhodopsin (bR) by the centrifugal force induced by MAS. It was observed that the ¹³C NMR signal of 13-*cis* configurations increased as the pressure was increased. It was also revealed that [1-¹³C]Tyr185 signals corresponding to 13-*cis* configurations increased as the pressure increased. These results clearly indicated that retinal isomerization was generated by pressure change and affects the change of protein structure. Photoillumination experiments were performed to observe the photoisomerization of phoborhodopsin (ppR) using the photoillumination system in the solid state NMR. We could successfully observe the photoisomerization from ground-state (13.4 ppm) to M-intermediate (22.3 ppm) since the life time of the M-intermediate is quite long. This result indicates that the M-state of retinal takes 13-*cis* configuration.

【Introduction】

Membrane proteins play important roles as transporter or signal transduction. Particularly retinal proteins usually absorb photo energy as a photoreceptor to generate photoisomerization, and consequently change the structure and dynamics of membrane proteins to show transporter and signal transduction activities. Although retinal isomerization rate is very rapid, mechanism of photoisomerization and a number of intermediates have been identified. On the contrary, Structure and dynamics changes of proteins induced by the photoisomerization of retinal have not been studied well in spite of the important process of activity. In this work, we have performed to clarify the change of structure of bacteriorhodopsin (bR) that has photoinduced proton pump activity and phoborhodopsin (ppR) that has signal transduction activity as a photoreceptor. To induce retinal isomerization, we have first developed the pressure¹ induced and photoillumination² systems equipped in the solid-state NMR spectrometer. Using this newly developed system, changes of protein structure accompanied by the retinal isomerization were investigated.

[Materials and methods]

Halobacterium salinarum was grown in a synthetic medium including [ζ -¹⁵N]Lys, [15,20-¹³C]retinal, and [1-¹³C]Tyr to yield ¹³C-labeled bR in PM. PM was isolated by standard method and suspended in HEPES buffer at pH 7. [15,20-¹³C]retinal-ppR with His-Tag at the C-terminal were expressed in *Escherichia coli* BL21 strain in M9 medium containing [1-¹³C]Tyr, and [15,20-¹³C]retinal. Purified proteins in DM micelles were

Retinal Protein, Photoillumination, Pressure application

○ないとうあきら, おおさわかずひろ, にしかわひろひで, ともながゆうや, わだあきもり, かもなおき, かわむらいずる

incorporated into a lipid film of egg PC. *In situ* photoillumination was performed by an optical fiber from outside the magnet through a tightly sealed piece of cap made of optical fiber glued to the rotor. Pressure on the samples was naturally applied by the centrifugal force induced by the MAS frequency. Since the centrifugal force is proportional to the square of rotor radius and frequency, the pressure at the inner wall was estimated using the following equation, $P=(4/3)\pi^2v^2r^2\rho$, where P , v , r and ρ represent pressure, MAS frequency, rotor radius and density, respectively.

[Results and Discussion]

Pressure induced structure change of bR

Fig. 1a shows MAS frequency dependence of ^{13}C NMR spectra of $[\text{15-}^{13}\text{C}]$ retinal-bR. The signal due to 13-*cis*, 15-*syn* retinal increased as the MAS frequency increased from 4 kHz to 9 kHz. This result indicates that equilibrium constant $K=[\text{all-trans}]/[\text{13-cis, 15-syn}]$ decreased, because molar volume change is negative value. Similarly, 13-*cis* signal increased as the pressure increased in the case of $[\zeta\text{-}^{15}\text{N}]$ retinal-bR, although signal broadening was observed at spinning frequency of 12 kHz (Fig. 1b). Further, $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{Tyr185}$ signal due to 13-*cis* retinal increased as the pressure increase (Fig. 1c). This result indicates that structure of proteins was also changed followed by the retinal isomerization.

Photoilluminated structure change of ppR

Photoisomerization of photo receptor protein, ppR, was observed by photoillumination experiments. Since life time of M-intermediate is about 1.7 s, one can expect that the M-intermediate can be trapped under photoillumination at the wave length of 500 nm. Actually ground-state (G-state) signal at 13.4 ppm decrease and M-state signal at 22.2 ppm increased for the $[\text{20-}^{13}\text{C}]$ retinal-ppR dissolved as octyl glycoside micelle. This signal can be assigned to the M-state with 13-*cis* retinal configuration. On the other hand, signal of the M-intermediate appeared with very weak intensity in the case of $[\text{20-}^{13}\text{C}]$ retinal-ppR incorporated in the egg PC lipid bilayers. Since the M-state is known to the signal transduction state, it is important to observe the structure change of proteins induced by the structure change of retinal and is now under investigation

[References]

1. I. Kawamura et al. Photochem. & Photobiol. 2007, 83, 346-350
2. I. Kawamura et al. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 1016-1017

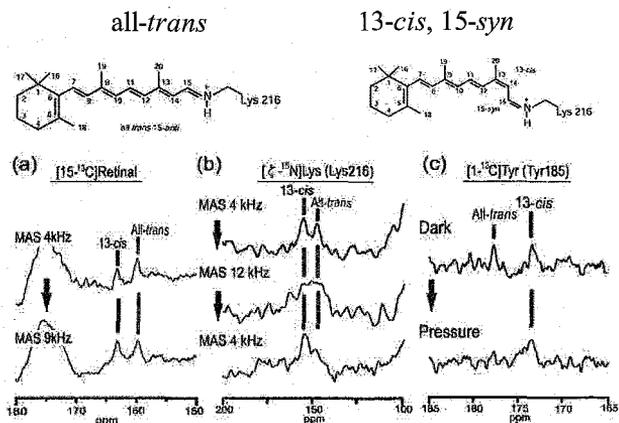


Fig. 1. Structures of *all-trans* and 13-*cis*, 15-*syn* retinals (top) and MAS speed variation of ^{13}C NMR spectra of $[\text{15-}^{13}\text{C}]$ retinal-bR, $[\zeta\text{-}^{15}\text{N}]\text{Lys216}$ (b), $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{Tyr185}$ -bR (c) (bottom).

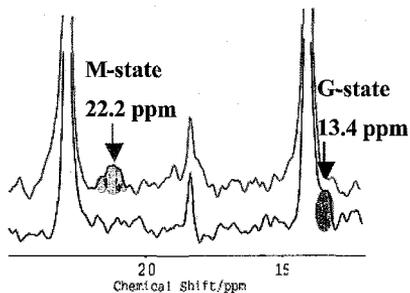


Fig.2. ^{13}C NMR spectra of $[\text{20-}^{13}\text{C}]$ retinal-ppR with photoillumination (top) and without photoillumination (bottom).

Klaas P. Pruessmann, Ph.D.

Institute for Biomedical Engineering, University and ETH Zurich, Zurich, Switzerland

NMR signal detection is traditionally based on near-field Faraday induction (1) in one or multiple radio-frequency (RF) resonators that closely surround the sample. Other known principles, involving structured-material flux guides (2), SQUIDs (3), atomic magnetometers (4), or magneto-resistive elements (5) equally rely on close-range coupling. The present contribution addresses a mechanism that permits longer-range detection. As recently shown (6), NMR can also be excited and detected by travelling RF waves sent and received by an antenna.

In cylindrical NMR and MRI systems the formation of travelling waves at the Larmor frequency is usually suppressed by structures surrounding the sample, such as gradient coils, cryostats, and RF screens. Their conductive surfaces admit axially travelling waves only beyond some cut-off frequency which is roughly reciprocal to the bore width and typically much higher than the Larmor frequency. However, in recent wide-bore, high-field magnets the cut-off and 1H Larmor frequencies are sufficiently similar to enable the travelling-wave approach. Its first demonstration was accomplished in a superconducting 7.0-T magnet with a 58 cm-diameter bore lined with an RF screen. When enclosing only air the bore has a cut-off frequency of 303 MHz, which can be readily brought below the 1H Larmor frequency of 298 MHz by introducing small amounts of dielectric loading. Travelling waves along the magnet's bore were excited and detected by a circularly polarized patch antenna, effectively using the RF screen as a waveguide.

Using this setup, NMR spectra were obtained from 9 cm³ of aqueous 10% ethanol solution. The patch antenna was initially mounted at the end of the RF screen, 70 cm from the sample. The experiment was then repeated with gradually increasing antenna distances. Figure 1 shows the full initial spectrum and magnified methyl triplets for the subsequent scans. It illustrates that meaningful data were obtained with the probe placed well outside the magnet and a well-resolved spectrum was still detected at a distance of 2.6 m from the sample.

One potential benefit of the travelling-wave approach is enhanced excitation uniformity in large samples, particularly in human MRI subjects. In traditional resonant probes the RF fields form standing waves whose magnitude varies strongly across samples of similar size as (or larger than) the RF wavelength. The non-uniformity is due to the underlying electrodynamics, which require that the magnetic field exhibit curvature according to its frequency and the ambient material. In travelling waves this curvature translates into spatial phase variation, which does not hamper common MRI techniques. For reasons of safety, this benefit was initially demonstrated in a volunteer's lower extremities, ensuring that the chest and head remained outside the waveguide. The antenna was placed at the opposite end of the bore, 70 cm from the ankle. The resulting MR image (Fig.2, left) indeed shows the right lower leg with improved uniformity relative to a reference scan with a birdcage resonator (Fig.2, right).

By improving the extent and uniformity of spatial coverage, travelling-wave MRI promises to facilitate the exploration of highest field strengths for human studies (7, 8). A further promising application is high-field screening. The ability to perform spatially resolved NMR in large volumes may simplify studies of large numbers of small animals (9) or inanimate samples in parallel. Brief discussions will be dedicated to the reciprocity, efficiency, and sensitivity of travelling-wave NMR probes, the issue of RF diffraction, wave impedance matching, and the role of propagation-related phase delays.

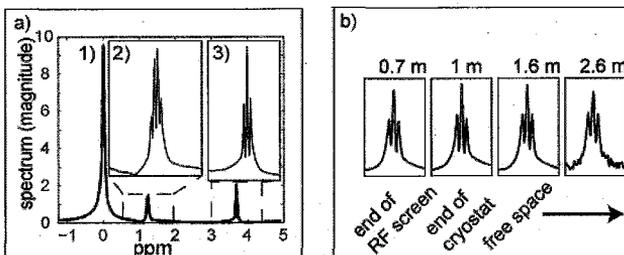
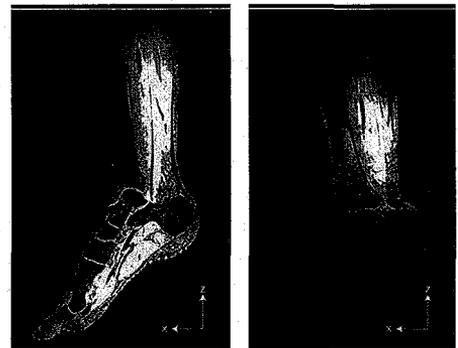
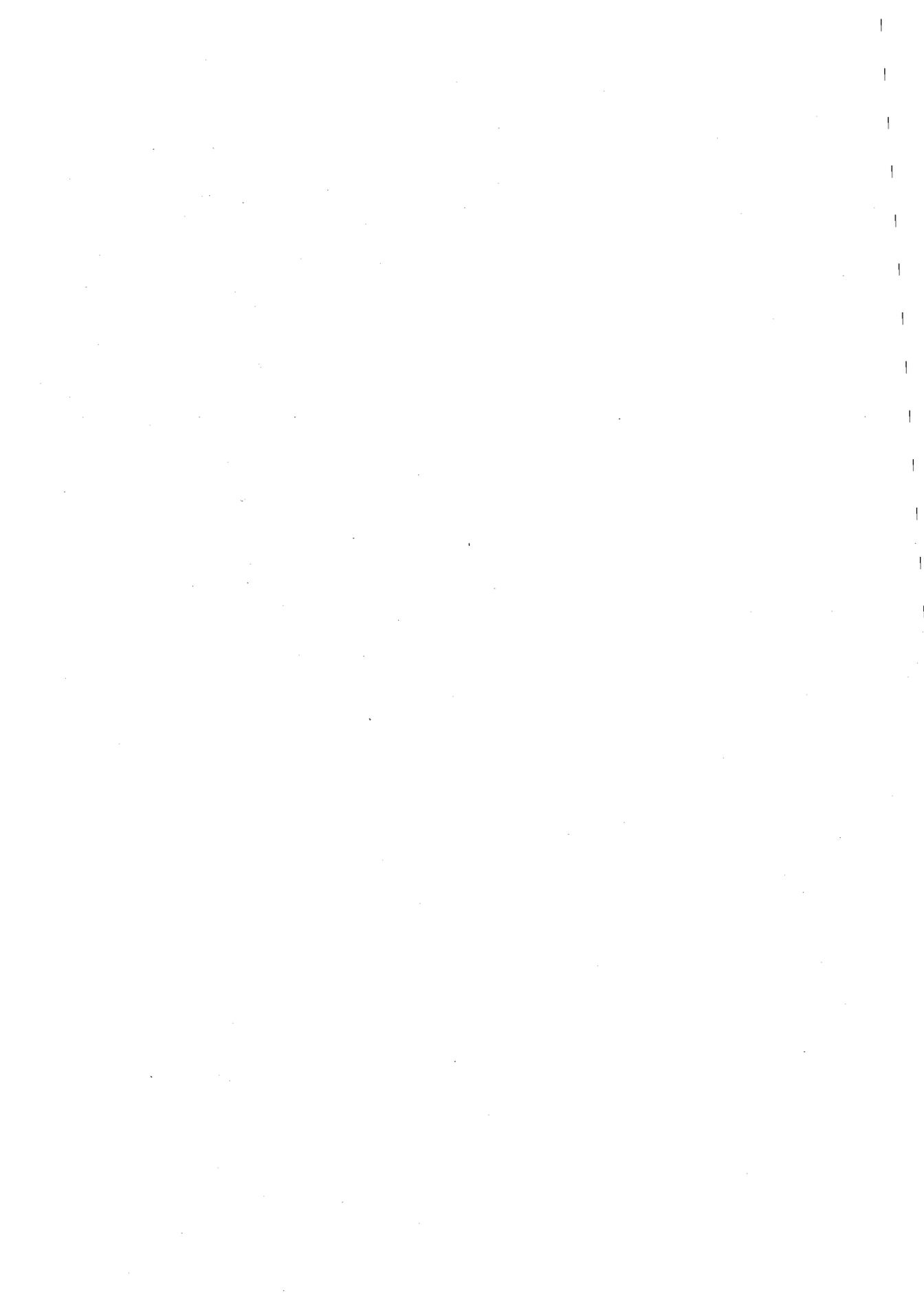


Fig.1 (above): Travelling-wave NMR of aqueous ethanol solution, at antenna distances up to 2.6 m. **Fig.2:** Travelling-wave MRI of a lower leg (left), compared to data obtained with a birdcage resonator (right).



References: (1) Hahn, E. L. Phys Rev 77, 297 (1950). (2) Wiltshire, M. C. K. et al. Science 291, 849-851 (2001). (3) Day, E. P. Phys Rev Lett 29, 540 (1972). (4) Savukov, I. M. & Romalis, M. V. Phys Rev Lett 94, 123001 (2005). (5) Verpillat, F. et al. PNAS 105, 2271-2273 (2008). (6) Brunner, D., et al. Nature 457(7232):994-998 (2009). (7) Vaughan, T. et al. Magn Reson Med 56, 1274-1282 (2006). (8) Atkinson, I. C. et al. J Magn Reson Imag 26, 1222-1227 (2007). (9) Bock, N. A. et al. Magn Reson Med 49, 158-167 (2003).



第三日目

11月12日(木)

日本語セッション (一部英語)

Day 3 (Nov. 12, Thu.)

(English & Japanese sessions)

FID の2次元処理の試み

○高橋征三¹、荻野孝史²、山口行治³

¹日女大理 ²(元)国立精神神経センター神経研 ³(株)実行データサイエン

2 dimensional array data was made from the 1 dimensional NMR acquisitions. The FIDs in 2D, arrayed from each acquisition, was made the principal component analysis. Making use of the largest 4 principal components, one dimensional spectrum was reconstructed substantially free from the field fluctuation. Then, the single FID was made an array in 2 dimensions, deleting the points successively. The resulting 2D FT spectrum contains all the peaks on the diagonal position, while each peak spreads according to its line-shape along the axes. Thus, the overlap of peaks became minimum as well as the influence of baseline roll. The power spectrum on the diagonal position gave rise to the Lorentzian line shape because of the presence of dispersion at the off-center position from the peak. The present method may most effectively benefit to the inherently heavily overlapped poor quality spectrum such as the case of MRS.

1次元情報しか持たないデータは2次元処理しても新しい情報をもたらさないので、まったく無意味な計算のように思われる。ところが *in vivo* NMR はさまざまな悪条件下で測定および解析を余儀なくされる場合がある。たとえば試料が測定中に動く、S/N 比が小さい、水の消え残りの影響でベースラインがゆがむ、データ点が制限される、ピークの重なりが大きい等々である。こういう場合には2次元処理に意外な効用があることが分った。

1次元情報を2次元配列にする2種類の方法を考えた。一つは FID を取得するたびに2次元配列として並べる方法である。すると本質的に同じ情報をもつデータ群が得られる。従来はその平均値しか利用されてこなかった。このデータに多変量解析を適用すれば、スペクトル全体がゆらぐような変動を容易に抽出できる。今回は見かけの化学シフトの変動を補正することを試みた。

二番目の試みとして、1つの FID から1点ずつデータ点を取り除き2次元に配列した、擬似的2次元データを作成した。FT の結果、各ピークは対角方向に並び共鳴線は軸方向に広がるので、ピーク間の重なりは非常に小さく、結果としてベースラインのゆがみの影響は実質上無視できる程度まで軽減されることが分った。またピークの中心からはずれた位置に分散スペクトルが重なっているので対角方向の絶対値表示スペクトルから擬似的吸収スペクトルが得られた。

[方法] 唾液サンプルをモデルに NS=4、8Kx64 の FID を集め、PLS_toolbox™ を使って主値解析した。主値解析は FID の実数部分、虚数部分を別々に行い複素数に戻した。この結果は複素数のまま計算できる MATLAB™ の Statistics_Tool の結果と一致した。つぎに 8K の FID から1点ずつゼロで置き換えたデータを2次元方向に並べ、8K x 8K の2次元データを作り MATLAB で FFT 処理した。位相補正は最初の FID で行い。得られたパラメータを2次元データに共通因子として与えた。

キーワード NMR データ処理 FID 主値解析 2次元 強度 MRS

[結果] 主値の第1成分(PC1)は90%程度の強度を示した。絶対値では95%以上であった。PC1をFTすると、スペクトルはノイズも含めて積算スペクトルと一致した。

残り1%以上の強度を持つ主値は4ないし5個であった。PC1~PC4を足し合わせると、本来のスペクトルと同程度の線幅のスペクトルが得られた。それ以上の成分を足し合わせてもノイズが増大する以外の見かけ上の変化はなかった。

つぎに1つのFIDから1点ずつ取り除いたFIDを作成し2次元に並べたデータを通常のFFTを行って評価した。図は1K x 1Kデータセットで表示した。スペクトルの軸方向への投影は1次元スペクトルと同じである。対角方向は分散スペクトルの負の成分がピーク位置を中心に対称的に存在する。その結果、見かけ上二量子スペクトルと類似の線形を示す。ピークの重なりは非対角位置に現れる。したがってピークの重なりの影響や水の消え残りに起因するベースラインゆがみの影響が軽減される。またスピン多重項の分裂は対角線上に乗るために、軸方向の成分はすべて単一ピークとして現れる。このことはベースラインの変動を伴うので、強度解析において一長一短であろう。

対角方向には分散による負の強度が重なる(図2)。絶対値表示すると対角方向にローレンツ曲線を与えるが、そのスペクトルは差分絶対値表示より強度ひずみが小さいと思われる。差分絶対値法はS/Nの低下が実用上の問題となるが、その点では本法がとくに優れているわけではない。しかしピークが存在するかどうかの判定が難しいときには、本法は軸方向成分をトレースすることによって確認できるという利点がある。

[考察] 本方法はMRSの解析に有用な手法を提供する。ベースライン評価が難しいときやピークが重なりノイズとの区別が困難な場合にとくに有効と思われる。対角項の絶対値表示は位相補正が困難なケースに差分絶対値法に代わる方法として提唱したい。

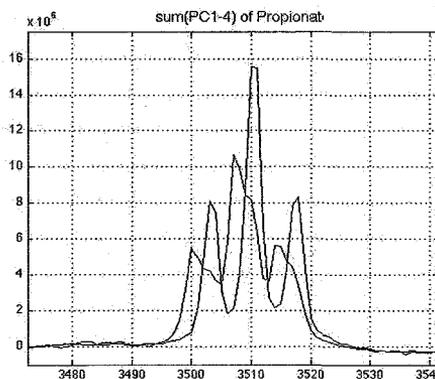


図1 単純な積算スペクトルと4成分の主値から求めた磁場補正スペクトルの比較

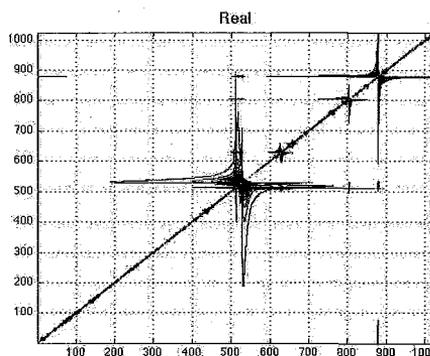


図2 1次元データから得られる擬似的2次元NMRスペクトル

超偏極希ガスNMR/MRIの研究開発：高効率生成装置と多孔質材料ポア評価

○服部峰之¹、平賀隆¹、秦信宏¹、早水紀久子¹、田中亮²、大竹紀夫²
¹(独)産業技術総合研究所、
²東横化学(株)

Development of Hyperpolarized Noble Gas NMR/MRI: Efficient Polarizer and Characterization of Porous Materials

OMineyuki Hattori¹, Takashi Hiraga¹, Nobuhiro Hata¹, Kikuko Hayamizu¹, Ryo Tanaka², and Norio Ohtake²

¹ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan.

² Toyoko Kagaku Co.,Ltd., Kawasaki, Japan.

¹²⁹Xe NMR techniques have been applied to probe porosity of mesoporous materials and the pore size is known to relate with the chemical shift. Since the Van der Waals radius of Xe is known to be 0.216 nm, the possible pore size to adsorb xenon should be larger than 0.4 nm in diameter. Then the mean pore diameters ranging from 0.4 to 300 nm are the possible target to show the relationship experimentally. We have developed an apparatus to produce the laser induced hyperpolarized (HP) Xe gas and tried to apply it to a self-assembled porous silica sample, which is known as a candidate of low-dielectric constant materials for interconnects in future ultra-large scale integrated circuits.

【序論】³He, ¹²⁹Xeの核スピンの1/2の希ガスは、RbのD₁線 (5²S_{1/2}-5²P_{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, 4]。超偏極キセノンガスを連続的に生成する際に、偏極率と生成速度(フロー速度)を同時に向上させることが、課題となってきた。図1. に連続フロー型超偏極希ガス生成装置の構成を示す[5]。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。これまでに、Rbの濃度を上昇するために、セルの温度を110℃程度から300℃程度まで上昇させることを可能としたが、レーザー光源の性能が不十分と思われ、80cm程度のフロー速度では、1%程度の偏極率しか観測されていなかった。

超偏極, 希ガス, 多孔質

○はっとりみねゆき, ひらがたかし, はたのぶひろ, はやみずきくこ, たなかりょう, おおたけのりお

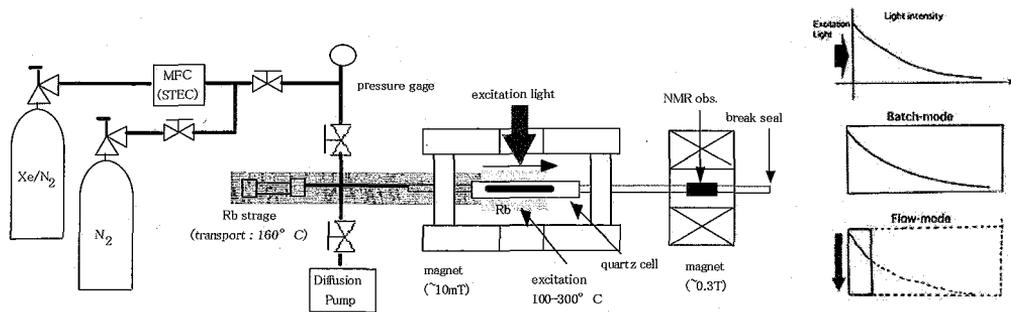


図1. (左) 連続フロー型超偏極キセノンガス製造装置 (特許第 4169122 号)、(右上) 励起光の分布、(右中段) 溜式 (Batch) と (右下) 連続フロー式 (Flow) の比較

【超偏極希ガス生成用半導体レーザーの狭帯域化】 常圧のガスと共存している、Rb の吸収線幅は、40W 級 795nm 域の LDA に比較すると 20 倍程度狭い。半導体レーザーの発振波長を常圧における Rb の吸収線幅程度まで狭帯域化し、波長の長時間安定性を向上する。40W 狭帯域化レーザーを 4 個製作した。(線幅 0.1nm 以下、 $40W \times 2 \times 2 = 160W$)。

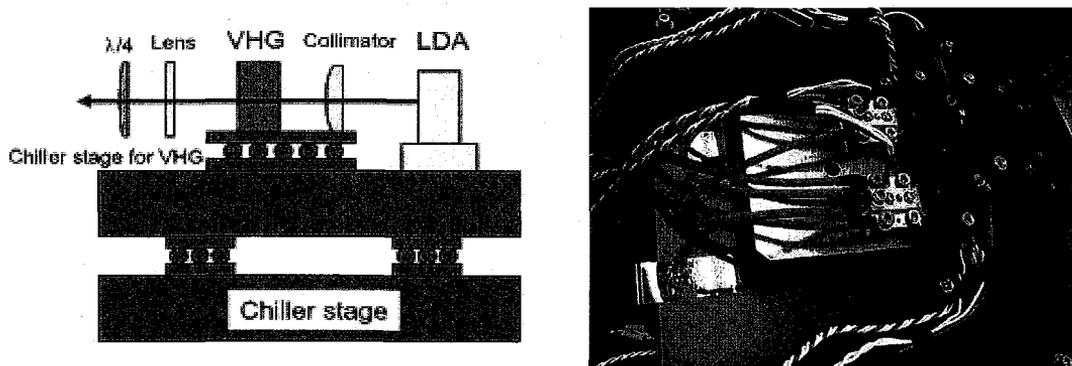


図2. (左) VHG による半導体レーザー狭帯域化の光学配置図、(右) 今回製作した LDA の写真 (2 個)

【実験と結果】 27W を 160W に置き換えることにより、40~100ccm の流速で、偏極率約 20% の超偏極キセノンガスの生成に成功した。

【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 ; 服部峰之, 超偏極キセノンガス生成装置実用機の研究開発, 工業材料, 52(3), 86-89 (2004).
 [5] 服部峰之、平賀隆、村山守男, 特開 2003-245263 号公報

Yutaka Ito^{1,2}, Junpei Hamatsu¹, Tomomi Hanashima¹, Masaki Mishima^{1,2}, Tsutomu Mikawa³, Markus Wälchli⁴, Brian O. Smith⁵, Masahiro Shirakawa^{2,6} Teppei Ikeya^{1,7} and Peter Güntert^{1,7}

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

Abstract

In-cell NMR spectroscopy yields multi-dimensional NMR spectra of macromolecules in living cells^{1,2}. For the first time we have determined the 3D structure of a protein exclusively on the basis of information obtained in living cells³. This approach provides the tools that will permit the effects of molecular crowding in the cytosol and the conformations of proteins to be investigated in living cells.

In this presentation the efficiency of the key methods for this success, rapid data collection using nonlinear sampling and selective protonation at methyl groups to enable the identification of unambiguous long-range NOE interactions, will be discussed. We also present our recent applications of in-cell NMR to *Thermus thermophilus* HB8 TTHA1718 and *Streptococcus* protein G B1 domain in living *E. coli* cells.

Introduction

Proteins in living cells work in an extremely crowded environment where they interact specifically with other proteins, nucleic acids, co-factors and ligands. *In vivo* observations of 3D structures, dynamics and interactions of proteins are required for fully understanding the structural basis of their functions inside cells. The non-invasive character of NMR spectroscopy and its ability to provide data at atomic resolution make NMR ideally suited for the task. Recently, these advantages of NMR spectroscopy have been combined to obtain information about the conformation and dynamics of biological macromolecules inside living cells³. In order to overcome problems caused by the instability and the low sensitivity of living cell samples, we used rapid measurement of the 3D NMR spectra by nonlinear sampling of the indirectly acquired dimensions and maximum entropy data processing (MaxEnt), which have not however been used widely, in particular, for NOESY-type experiments. Here we evaluated the effect of the artefacts arising by employing nonlinear sampling and MaxEnt processing to 3D NOESY-type spectra by calculating structures from distance restraints obtained in simulated 3D NOESY spectra with various nonlinear sampling points.

Results and Discussion

The simulated raw data were reconstructed from real 3D ¹³C-separated and ¹⁵N-separated NOESY-HSQC spectra, which were used for the structure determination of TTHA1718 *in vitro*. The original 3D raw data have 512, 128 and 32 complex points for t_3 (¹H), t_1 (¹H) and t_2 (¹³C or ¹⁵N) dimensions, respectively. Total six pairs of simulated NOESY spectra were

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

processed. The analysis of NOE cross peaks in these simulated spectra and structure calculations were performed by employing essentially identical protocols used for the structure determination of TTHA1718 in-cell³. Figure 1 shows the superposed 20 final structures calculated from each sets of simulated 3D ¹³C-separated and ¹⁵N-separated NOESY spectra.

The main expected artefacts arising from nonlinear sampling and MaxEnt processing were (1) the mis-calibration of intensities of cross peaks and (2) the emergence of false cross peaks. The latter problem is presumably not significant because the automated NOE assignment algorithm excludes the “orphan” artefact cross peaks. The deviation of intensities for NOE

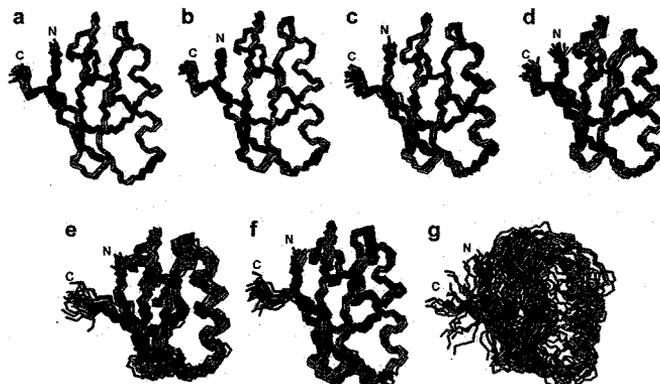


Figure 1: TTHA1718 structures calculated from simulated 3D NOESY data with various nonlinear sampling points. a, 64 and 32 linearly sampled complex points for t_1 (¹H) and t_2 (¹³C or ¹⁵N), respectively. **b,** 1024 randomly selected complex points out of the sampling space with 64 (t_1 , ¹H) x 32 (t_2 , ¹³C or ¹⁵N) complex points. **c,** 512 randomly selected complex points. **d,** 256 randomly selected complex points. **e** and **f,** 128 randomly selected complex points. **g,** 16 and 8 linearly sampled complex points for t_1 (¹H) and t_2 (¹³C or ¹⁵N), respectively. For the structure calculations presented in **f,** NOE-derived distance restraints involving side-chain methyl groups, which were used for the case of TTHA1718 in-cell, were added.

cross peaks from “real” values is usually not so harmful for structure calculations, since the NOE intensities were generally interpreted to distance restraints with relatively large (a few angstroms) tolerances. However, the mis-calibration of intensities was eventually significant in the case with much reduced data points, e.g. the case with 128 random sampling points. There was a tendency that the more data points were omitted, the more underestimated the intensities of weaker cross peaks. This caused the drop of numbers of picked NOE cross peaks in the spectra, thus providing poorer convergence in final structures. Nevertheless, we would emphasise that, with the same number of FIDs, the convergence in final structures were much worse when the data were acquired linearly, suggesting that nonlinear sampling approach is very advantageous, comparing to conventional linear sampling scheme. Also the result showed that the poor convergence in final structures can be overcome by supplementing some “critical” selectively measured long-range distance restraints, e.g. NOE-derived distance restraints involving side-chain methyl groups. As another demonstration of our methodologies for protein structural analyses *in vivo* after the case of *Thermus thermophilus* HB8 TTHA1718, we initiated in-cell NMR studies of *Streptococcus* protein G B1 domain in living *E. coli* cells.

References:

1. Serber, Z. et al. High-resolution macromolecular NMR spectroscopy inside living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2446-2447 (2001).
2. Reckel, S., Hänsel, R., Löhr, F. & Dötsch, V. In-cell NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **51**, 91-101 (2007).
3. Sakakibara, D. et al. Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nature* **458**, 102-105 (2009).

**Structure and functions of domains of transcription factors
studied by NMR spectroscopy and interactome analyses**
—Analyses of the proteins with GST tag—

○Shunsuke Meshitsuka¹, Yuki Horie¹, Kazuya Takahashi¹, Ojeiru F. Ezomo¹, Mohammed S. Mustak¹, Takahisa Ikegami², Hiroshi Hirota³, Kazuya Yamada⁴, Tamio Noguchi⁵

¹Tottori University Graduate School of Medical Science, Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, ²Osaka University Institute for Protein Research, ³Riken, ⁴Matsumoto University, ⁵Osaka Ohtani University

The structures of the DNA binding domains of transcription factors have been well studied and classified into several types of functional structures. However, the structure and function of the domains of transcription factors other than the DNA binding domains were not yet known. It has been reported that the processes of transcription were regulated by several transcription factors interacting with each other. In the present investigation, we analyzed the structures of N-terminal and C-terminal domains of transcription factors such as HEX, GATA2, SHARP2 and HNF1 α in the presence GST-tag. The protein-protein interaction was also analyzed by surface plasmon resonance (SPR).

Regulation of the cell differentiation is very important in the progress of regenerative medicine. However, the mechanism of the regulation of differentiation has not been revealed yet. The structures and the roles of DNA binding domains of transcription factors have been understood well. However, the structures and functions of the domains of transcription factors other than the DNA binding domain have scarcely been reported. Hex (haematopoietically expressed homeobox) is essential for monocyte and B cell differentiation. Hex is one of the orphan homeobox genes, which is identified in human promyelotic leukemia cell line and found in rat, mouse, chicken, xenopus, zebrafish and C.elegance. Hex is constituted 271 amino acids and has a proline rich repressor domain in N-terminal region (Hex-N:45-136AA), a homeodomain in center (Hex-HD:137-196AA) and an activator domain in C-terminal region, which has many negatively charged amino acids such as glutamic acid and aspartic acid (Hex-C:197-271AA). In early mouse embryo, Hex is expressed in anterior visceral endoderm and rostral definitive endoderm. In adult mouse, Hex is expressed in liver, lung, thyroid gland, spleen, vascular smooth muscle cells and multipotent haematopoietic cells.

Transcription factor, protein-protein interaction, GST-tag

○めしつかしゅんすけ, ほりえゆうき, たかはしかずや, エゾモ オジエイル, モハメド ムスタク, いけがみたかひさ, ひろたひろし, やまだかずや, のぐちたみお

The knock out mouse of Hex is embryonically lethal around E10.5 due to a lack of substantial liver formation, thyroid gland formation, forebrain formation. In general, homeobox transcription factors bind to A/T rich sequences. Hex binds directly to specific sequences such as 5'-TAAT-3', 5'-CAAG-3', 5'-ATTAA-3' using homeodomain. It is also reported that Hex binds directly to transcription factors such as HNF1 α , AP1, GATA2, PML and HC8, and regulates the transcription of their target genes and contributes to regulate the differentiation of the cells. However, the detail function of Hex is unclear till now. The methods of the production and purification of proteins using affinity tag such as GST (glutathione S-transferase) tag, histidine tag, MBP (maltose binding protein) tag are familiar in the protein science for their easy and rapid procedure. The molecular weight of protein is restricted in NMR analyses. The protein larger than 30kDa molecular weight is not suitable for ordinary NMR analyses by the reasons of peak broadening and signal overlapping. Thus, it is thought that affinity tags except for His tag are necessary to be removed from fusion proteins by protease. GST-tag is beneficial for expression and purification in E.coli. However, some problems in preparing NMR samples often arise when fusion protein is cleaved by protease such as thrombin. One of the problems is nonspecific cleavage reaction by protease and another problem is decrease of the solubility of the protein after removing GST-tag.

The domains of Hex, HNF1 α , SHARP2 and GATA2 were expressed with GST-tag in E.coli by the conventional method and purified by gel chromatography to be a single band in SDS-PAGE. The labeled proteins were obtained in M9 culture with ¹⁵N-ammonium chloride and ¹³C-glucose. NMR measurements were carried out by Varian Inova 500 at 25°C with 10% of D₂O in shigemi tubes. NMR spectral analyses were carried out by NMRPipe and displayed by sparky software. The protein structure was calculated by Cyana.

NMR spectra of Hex-C were measured without cleaving GST-tag and sufficiently well resolved signals were obtained. The signals from the backbone atoms of ¹H, ¹³C and ¹⁵N were assigned. In the present study, we analyzed the detail structure and functions of Hex-C, which is negatively charged and activator domain of the transcription factor Hex. It is also shown that the C terminal domain of GATA2 interacts with Hex-C. On the other hand HNF1 α -POU domain interacts with Hex-N. The protein-protein interactions were confirmed by SPR analyses to obtain the dissociation constants of specific interactions.

緩和解析による藍色細菌 *Synechococcus* PCC. 7942 の 転写因子 SmtB の亜鉛イオン濃度検知機構解明

○森田勇人^{1,2}、林秀則^{3,4}、阿部俊之助¹、池上貴久⁵

¹愛媛大・農, ²愛媛大・ベンチャービジネスラボラトリー

³愛媛大・無細胞, ⁴愛媛大・理, ⁵阪大・蛋白研

Relaxation analysis for clarifying the molecular mechanism of zinc ion concentration sensing by SmtB, a cyanobacterial transcription factor of *Synechococcus* PCC. 7942.

○Eugene Hayato Morita^{1,2}, Hidenori Hayashi^{3,4}, Shunnosuke Abe¹, Takahisa Ikegam⁵

¹ Faculty of Agriculture Ehime University, Ehime, Japan, ² Venture Business Laboratory,

Ehime University, Ehime, Japan, ³ Cell-Free Science and Technology Research Center,

Ehime University, Ehime, Japan, ⁴ Faculty of Science, Ehime University, Ehime, Japan,

⁵ Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

In *Synechococcus* sp. PCC 7942, the *smt* locus is responsible for tolerance to divalent cations such as zinc and cadmium. In the *smt* locus, there are two divergently transcribed genes, *smtA* and *smtB*. The *smtA* encodes a class II metallothionein, and the *smtB* encodes a trans-acting repressor for *smtA* expression. SmtB also functions as the sensor for cytosolic divalent cations, and the relationship between the structural changes of SmtB, induced by the metal-ion sensing, and the functional regulation of SmtB is still unclear.

To this end, we have measured the T1, T2, and NOE relaxation NMR spectra of each amino acid constituting SmtB with/without the presence of zinc ions. In consideration of our biochemical results, we have found that in the N-terminal flexible region, the rigid structure around Cys14 is induced by the zinc ion binding with SmtB.

「研究の背景と目的」

重金属イオンは、細胞内の代謝に必須の微量元素であるものが多く存在するが、その適正量からの過剰/不足は強い細胞毒性を示す場合が多く、その細胞内濃度制御は厳密に行われている。藍色細菌 *Synechococcus* PCC. 7942 は、細胞質内の亜鉛イオンを初めとする2価金属イオン濃度をクラスIIタイプのメタロチオネイン SmtA の発現により制御している。SmtA の発現は重金属イオン濃度センサー機能と転写抑制因子機能を併せ持つ122アミノ酸から構成される SmtB (ゲノム上でも SmtA の上流域にコードされている) により制御さ

藍色細菌, 転写因子, 亜鉛イオン濃度検知機構

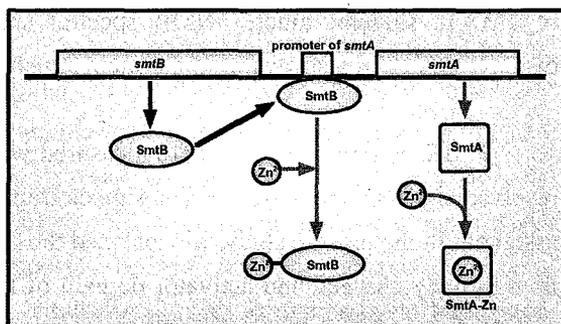


図1 藍藻の重金属耐性機構のモデル

○もりたはやと, はやしひでのり, あべしゅんのすけ, いけがみたかひさ

れている。SmtB は亜鉛イオン以外に、カドミウムイオン、ヒ素イオン、水銀イオンなどの2価金属イオン濃度を検知する能力を持つが、その検知濃度域は金属イオンの種類により異なっている。また、近年 SmtB のホモログが淡水性藍色細菌だけでなく海水性藍色細菌においても見つかってきている。さらに、これら藍色細菌の生育環境に含まれる2価金属イオン濃度に対する耐性は菌の種類により異なっており、SmtBにより発現制御を受ける2価金属イオン濃度の直接の濃度調節体は、メタロチオネイン様タンパク質だけでなく、イオントランスポーターなど多くの種類があることもわかってきている。

そこで本研究では、SmtB による細胞内2価金属イオン濃度検知・制御機構を特に亜鉛イオンについて構造化学的手法と分子生物学的手法とを組み合わせることを目的とした。

「実験手法」

SmtB をコードする遺伝子を大腸菌大量発現用ベクターに組み込むことで作製した大腸菌大量発現用プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) /pLysS に形質転換することで、SmtB の大腸菌大量発現系を作製した。SmtB への点変異の導入には、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO)を用いた。SmtB の安定同位体標識は、M9 最少培地に添加するN源、C源に¹⁵N塩化アンモニウム、¹³Cグルコースを用いることで行った。亜鉛イオンを結合した SmtB は、SmtB 溶液に酢酸亜鉛を2等量添加することで作製した。

「実験結果」

亜鉛イオン結合に伴う、SmtB を構成するアミノ酸主鎖の化学シフトの変化量の大きさをもとに、点変位の導入を行い、亜鉛イオン濃度との結合親和性を、ゲルシフトアッセイなどにより、解析することで、SmtB への亜鉛イオンの結合サイトを特定するとともに、SmtB がその選択的 DNA 配列を認識するために必須のアミノ酸残基を特定した。

さらに、亜鉛イオンとの結合に伴う SmtB 主鎖の運動性の変化を T_1 , T_2 , NOE 測定を行うことで解析したところ、Cys14を含む SmtB のアミド末端領域の運動性が低下しており、亜鉛イオンとの結合に伴い、その構造が堅くなっていることがわかった。また、この領域を欠失した SmtB を作製すると、亜鉛イオンとの結合能力が低下することから、SmtB と亜鉛イオンとの結合において、Cys14 を含むアミド末端領域の構造変化が、SmtB と選択的DNA配列との結合親和性を弱める原因となる構造変化を誘起すると結論した。

酵素反応のリアルタイムモニタリングとアプタマーによるプリオンタンパク質の捕捉機構

古川亜矢子¹, 真嶋司¹, 永田崇¹, 杉山隆一², 高久洋², 西川富美子³, 西川諭³, ○片平正人¹

¹横浜市大・院生命ナノシステム科学, ²千葉工大・生命環境, ³産総研・年齢軸

Real-time monitoring of enzymatic reaction and prion protein-RNA aptamer interaction

Ayako Furukawa¹, Tsukasa Mashima¹, Takashi Nagata¹, Ryuichi Sugiyama², Hiroshi Takaku², Fumiko Nishikawa³, Satoshi Nishikawa³ and ○Masato Katahira¹

¹Grad. Sch. Nanobioscience, Yokohama City Univ., Yokohama, Japan, ²Life & Env. Sci., Chiba Inst. Tech., Chiba, Japan, and ³Age Dimension Res. Center, AIST, Tsukuba, Japan.

APOBEC3G (A3G) converts a cytosine of HIV DNA to a uracil through deamination, which confers anti-HIV activity on A3G. We succeeded to monitor the deamination reaction in real-time by the use of NMR signals. This method is superior to conventional biochemical methods to examine the enzymatic reaction in terms of its higher temporal and spatial resolution. This time, this method has demonstrated that a substrate site located close to a 5' end of DNA is deaminated faster than that to a 3' end. This result suggests that A3G processively deaminates multiple substrate sites through sliding in a 3'→5' direction. The study on the mode of the interaction between prion protein and its RNA aptamer will also be presented.

[序]

HIVはヒトに感染後、自らのゲノムRNAを鋳型にマイナス鎖DNAを合成し、その後これを2本鎖DNAとしヒトのゲノムに組み込む。ヒトの有するAPOBEC3G (A3G) タンパク質は、HIVのマイナス鎖DNAに作用し、シトシン塩基をデアミネーションしてウラシル塩基に変換する事で、HIVのゲノム情報を無意味なものにする。こうしてA3Gは抗HIV活性を発揮する。

我々はA3Gの立体構造及び1本鎖DNAとの相互作用様式を決定した[1]。さらにNMRシグナルを用いる事で、A3Gによるデアミネーション反応をリアルタイムでモニタリングする事に成功した[1]。この手法はこれまで用いられていた生化学的手法に比べ、デアミネーションが生じている箇所をより高い空間分解能で特定でき、またリアルタイムでのモニタリングである為、反応過程をより高い時間分解能で追跡できるという優位性を有している。また酵素反応を生じさせる際の温度、基質と酵素の濃度や比率等を調整する事で、反応速度をモニタリングに適した速度にすることができる。これによって解析可能な対象過程を広げ、反応の動的メカニズムにより踏み込む事ができる。今回この手法を応用し、A3Gの反応機構の本質を理解する事を目指した結果について報告する。

リアルタイムモニタリング, プリオンタンパク質, アプタマー

ふるかわあやこ, ましまつかさ, ながたたかし, すぎやまりゅういち, たかくひろし, にしかわふみこ, にしかわさとし, ○かたひらまさと

またプリオンタンパク質とそのRNAアプタマーの相互作用に関して得た知見についても報告する。

【結果と考案】

①リアルタイムモニタリングによるA3Gの反応機構の解析

A3Gによるデアミネーション反応の基質となる配列を2つ有した1本鎖DNAを調製した。これにA3Gを作用させデアミネーションによるシトシンからウラシルへの変換反応を、シトシン及びウラシルのピークの強度をモニターする事によって追跡した。その結果、5' 端寄りの基質配列中のシトシンのピークの強度がより早く減衰・消失し、それに対応してウラシルのピークがより早く出現・増大する事が分かった (Figure 1)。即ちDNAの5' 端寄りに配置された基質配列中のシトシンの方が、同3' 端寄りに配置された基質配列中のシトシンよりも早くデアミネーションされる事が分かった。この結果は、A3Gが1本鎖DNA上で3' →5' の方向にスライディングしながらデアミネーション反応を起こす為、確率論的に5' 端寄りの基質配列においてより高い頻度で塩基の変換が生じたことを示唆していると考えられる。

②プリオンタンパク質とそのRNAアプタマーの相互作用の解析

r (GGAGGAGGAGGA) (R12)は、プリオンタンパク質を高い親和性(解離定数 $\sim 10^{-8}$ M)で捕捉するRNAアプタマーである。我々はR12が分子内で平行型の4重鎖を形成し、それがさらに2量化した構造をとる事を見出した[2]。プリオンタンパク質の系統的な部分ペプチドを用いた結合実験から、プリオンタンパク質中の2つの部位がR12との結合に関与している事が分かった。この2つの部位の変異体を用いた解析から、リジンとリン酸基との間の静電相互作用、及びトリプトファンとグアニン塩基テトラッド平面との間のスタッキング相互作用が、高い親和性をもたらしていると考えられた。さらに2量化したR12の各単量体が、プリオンタンパク質中の2つの結合部位と同時に結合する事によって、親和性がより高められている事が示唆された。

[1] Furukawa *et al.*, *EMBO J.*, 28, 440-451 (2009).

[2] Mashima *et al.*, *Nucleic Acids Res.* in press (2009).

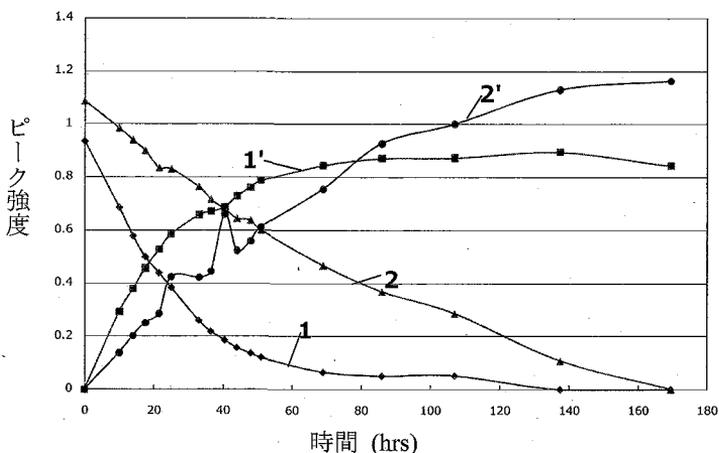


Figure 1. Time-course of the intensity after the addition of A3G. Peaks 1 and 2 correspond to each cytosine in the site located close to either 5' or 3' end, respectively. Peaks 1' and 2' correspond to each uracil converted from the two cytosines, respectively.

新方式NMRによる世界最高感度実現

○ 和久田毅¹, 川崎健司¹, 一木洋太¹, 朴ミンソク¹, 田中秀樹¹,
岡田道哉¹, 高妻孝光², 北口仁³

¹日立製作所 日立研究所

²茨城大学

³物質・材料研究機構

Sensitivity improvement of NMR spectrometer with cross-bore, superconducting split-magnet, and cryogenic solenoidal probe coil

○ Tsuyoshi Wakuda¹, Kenji Kawasaki¹, Yota Ichiki¹, Minseok Park¹, Hideki Tanaka¹,
Michiya Okada¹, Takamitsu Kohzuma² and Hitoshi Kitaguchi³

¹Hitachi Research Laboratory, Hitachi Ltd., Hitachi, Japan.

²Ibaraki University, Mito, Japan.

³National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan.

We have been developing a new NMR spectrometer having two special features; one is the superconducting split-magnet, and the other is the cryogenic solenoidal RF coil. We have successfully completed the magnet development with magnetic fields up to 14 Tesla. A cryogenic probe for the novel 600MHz NMR magnet has optimized. Then, a signal to noise ratio of the novel 600MHz NMR has reached over 8000. In this presentation, we show the recent achievements on the development of this new NMR spectrometer.

我々は新方式NMRの開発を2003年度から行ってきた。新方式NMRの特徴は、スプリット型超電導磁石とソレノイド型RFコイルであり、従来方式NMRを超える測定感度の実証を主な目標としてきた。超電導磁石がNMRに利用されるようになって以来、サドル型RFコイルを用いた装置が主流となった。一般的な超電導磁石の中では、ソレノイド型RFコイルに溶液試料入りの試験管を装填することが困難なためである。これに対し、我々はスプリット型超電導磁石を開発することで、感度優位性を持つソレノイド型RFコイルによる溶液NMR測定を可能とした。まず300MHz機を作製し、基本設計の妥当性と原理確認検証を05年度までに終了した。その成果を受けて600MHz機と300MHz 2号機を作製した。

Fig.1に新方式NMRの外観と断面図を示す。プローブは磁石横方向から挿入され、試験管は磁石上方から挿入される。静磁場方向は水平方向であり、高周波磁場方向は鉛直方向である。超電導磁石は左右2分割された形で構成され、1つの容器に納められている。このような構造の超電導磁石は世界で初めてである。主磁場発生用の超電導主コイルの内側にも磁場調整用の超電導シムコイルを配置することで、磁場中心の直径20mm球における不整磁場振幅を0.1ppm以下に抑制した^(1,2)。

新方式NMRにおける感度向上履歴をFig.2に示す。作製した300MHzおよび600MHz常温プローブを用いソレノイド型RFコイルの感度優位性を実証した⁽³⁾。

新方式NMR, スプリット型超電導磁石, ソレノイド型RFコイル

○ わくだつよし, かわさきけんじ, いちきようた, ぱくみんそく, たなかひでき,
おかだみちや, こうづまたかみつ, きたぐちひとし

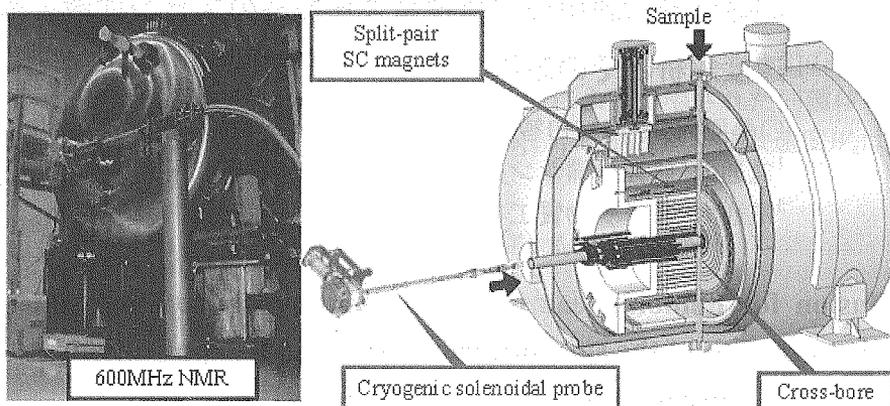


Fig. 1 Appearance and cross-section view of the novel NMR system.

して600MHz低温プローブの開発を進めた。低温プローブの冷却システムおよび低雑音アンプ (LNA) も独自開発したものである⁽⁴⁾。2008年までに標準試料 (直径5mm管, 0.1% E.B.) における測定感度は5000に到達していた⁽⁵⁾。しかし, 更なる感度向上には, 試料における信号損失の低減と, 高周波磁場均一度向上の両立が必要であった。この課題に対し, 高周波磁場シミュレーションを実施し, ソレノイド型RFコイルの改良を行った。その結果, 標準試料における測定感度において8000を超えることに成功した。

感度優位性の実証以外では, 常温プローブによる多核種測定, 傾斜磁場利用測定⁽⁶⁾, 十字ボアを活かしたフロー測定⁽⁷⁾の実証を行った。以上の測定には独自開発した分光器, ロックシステム⁽⁸⁾を用いた。このように, 新方式NMRによる感度優位性と基本性能の実証を成功裡に終了した。現在は, 600MHz機を一時休止し, 300MHz 2号機による新規アプリケーションの実証を継続中である。詳細は当日報告する。

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 (17文科振260号, 18文科振489号, 19文科振199号) の一環として行われました。

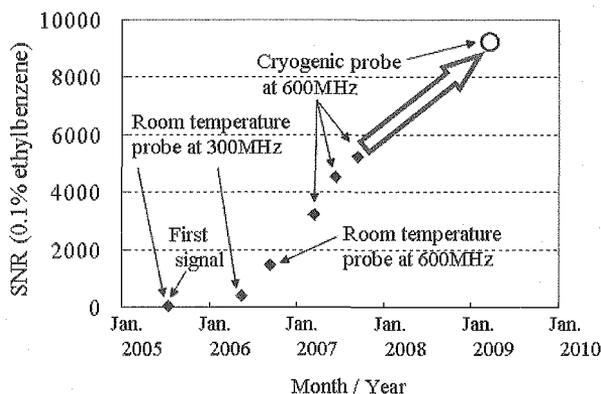


Fig.2 History of Signal-to-noise ratio at our system.

参考: NMR討論会講演要旨集 (1-4, 6-8) 第46回 (2007) P392, 396, 400, 404, 408, 414, 418, (5) 第47回 (2008) P390

新方式NMR, スプリット型超電導磁石, ソレノイド型RFコイル

〇わくだつよし, かわさきけんじ, いちきようた, ぱくみんそく, たなかひでき, おかだみちや, こうづまたかみつ, きたぐちひとし

固体回転試料中の同種核多スピンのスピンドiffusion : 拡散速度解析とその応用

○桑原大介¹, 持田智行², 仁木國雄³

¹電通大 研究設備センター, ²神戸大学理学研究科,

³電通大 量子・物質工

Spin diffusion for homonuclear multi-spin systems in rotating solids: the analytical expression of the spin-diffusion rates and its applications

○Daisuke Kuwahara¹, Tomoyuki Mochida², Kunio Nikki³

¹*Coordinated Center for UEC Research Facilities, The University of Electro-Communications*

²*Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kobe University*

³*Department of Applied Physics and Chemistry, The University of Electro-Communications*

In this study, we focused on deriving an analytical expression for the spin-diffusion rate W_z of a homonuclear multi-spin system undergoing MAS. The analytical expression derived here consists of a dipolar coupling constant and an integral term. The integrand consists of FID signal functions of two resolved resonance lines among which the polarization transfer takes place. Therefore, in principle the spin-diffusion rate W_z can be calculated without any special information such as double-quantum NMR spectra. In addition, we presented a new model for a homonuclear multi-spin system in the solid state. Two applications, in which the analytical expression modified for this model are employed, are presented. Applications of this expression based on the new model will be of great utility for elucidating the structure of various molecular materials in the solid state.

1. 緒言

本研究では、マジック角試料回転を行っている固体試料中の同種核多スピン系 (¹H多スピン系, ¹³C多スピン系など) に対するスピンドiffusion速度解析式 (基本式) を導出した。基本式は、双極子結合定数の項と積分項から構成される。積分項には、その間でスピンドiffusionが起きる2本の共鳴線のFID信号のみが含まれている。さらに本研究では、固体試料中の同種核多スピン系をいくつかの部分系に分ける新たなスピン系モデルを提唱した。新たなスピン系モデルに合わせて基本式を変形した結果、部分系間の最近接原子間距離を計算することが可能となった。今回、この新しい解析手法 (すなわち基本式と新たなスピン系モデルの組み合わせ) を用いて、電荷移動錯体における相転移前後の構造変化の解明、および、高速試料回転でカーボンファイバーに浸透した n -アルカンの浸透状態の解明を行った。

spin-diffusion, ¹H, MAS

○くわはらだいすけ, もちだともゆき, にきくにお

2. 基本式と新たなスピン系モデル

基本式の導出は, Suter[1]のスピン系モデルに基づき, またKubo[2]のスピン拡散速度式導出法を参考にして行った. Fig. 1(a)はSuterにより提唱された同種核多スピン系のモデルであり, このモデルを使うと部分系 S_1, S_2 間のスピン拡散速度 W_z は次式で与えられる.

$$W_z = -\frac{1}{15} d_c^2 \int_0^\infty G(\omega_r, \tau) (f_0(\tau) \cdot g_0^*(\tau) + f_0^*(\tau) \cdot g_0(\tau)) d\tau \quad (1)$$

ここで, $G(\omega_r, \tau) = \frac{1}{2} \sum_{n=\pm 1, \pm 2} \exp\{in\omega_r \tau\}$ (2), $d_c = \gamma_s^2 \hbar / r^3$ (3)である.

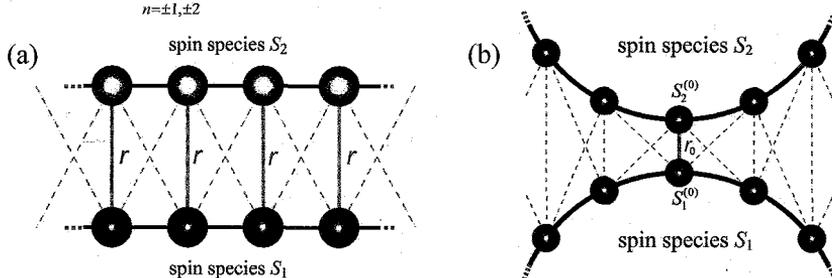


Figure 1. (a) Model system by Suter *et al.* (b) Model system presented in this study.

現実の物質系において, その中の同種核多スピン系が Fig. 1(a)のように近似のできることはまれである. 本研究では Fig. 1(a)に比べてはるかに応用範囲の広い同種核多スピン系モデルとして, Fig. 1(b)を提唱した. 我々はさらに, Fig. 1(b)のもとでも $d_c = \gamma_s^2 \hbar / r_0^3$ (3')と読みかえるだけで, 基本式(1)がそのまま成立するということを明らかにした.

3. 応用例

デカメチルフェロセン(D)・アセナフテンキノロン(A)錯体 (Fig 2(a)) 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. DA錯体は, -16°C で構造相転移を起こすことが知られているが, X線結晶解析では 低温側の結晶構造を明らかにすることができなかった. 今回, この新しい解析手法 (すなわち基本式と新たなスピン系モデルの組み合わせ) を用いて, “D分子とA分子の最近接 ^1H 間距離が 相転移前後で 0.4\AA 変化すること”, “相転移温度下でA分子がD平面に関して 8.4° 度傾くこと”を見出した. 応用例 2 の詳細については, 本会議場にて説明する.

[1] Suter, D.; Ernst, R. R. *Phys. Rev. B* 1985, 32, 5608-5627.

[2] Kubo, A.; McDowell, C. A. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 1988, 84, 3713-3730.

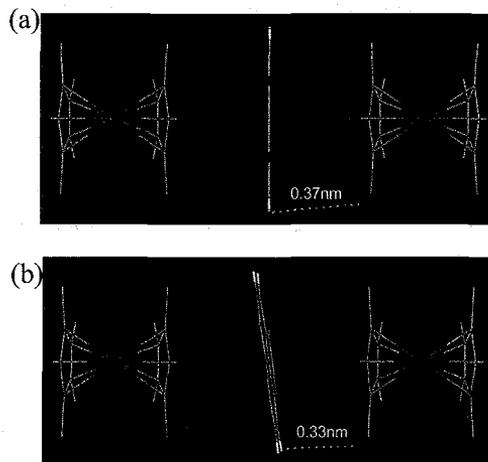


Figure 2. (a) Molecular arrangement in the complex, based on the X-ray data at 20°C . (b) Molecular arrangement at -27.7°C determined on the basis of Eqs. (1)-(3).

○黒木重樹¹、川内進¹、尾崎純一¹、宮田清蔵^{1, 2}¹東京工業大学・院・理工・有機・高分子物質専攻²新エネルギー・産業技術総合開発機構**Carbonization Process of Polypyrrole studied by SS ¹⁵N NMR**Shigeki KUROKI,¹ Susumu Kawauchi,¹ Junichi OZAKI,¹ and Seizo MIYATA^{1,2}¹Department of Organic and Polymeric Materials, Graduate School of Engineering, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552, JAPAN²New energy and Industrial Technology Development Organization, 1310 Omiya-cho, Saiwai-ku, Kawasaki, Kanagawa 212-8554, JAPAN)

Tel: +81-3-5734-2581, Fax: +81-3-5734-2581, E-mail: skuroki@polymer.titech.ac.jp

Recently, we developed a new non-precious ORR catalyst carbonized from nitrogen-containing polymers. We call these materials carbon alloy catalysts (CACT). The CACT combine high oxygen-reduction activity with good durability. We considered that the nitrogen species contained in CACT are very important for ORR activity and focused on characterizing the chemical structure around the nitrogen atoms in CACT. Therefore we synthesized ¹⁵N labeled polypyrrole (PPY) and pyrolyzed PPY at various temperatures, then measured solid state ¹⁵N NMR spectra and XPS spectra. E_{onset} of PPY pyrolyzed at 900 deg. (PPYFe900) is 0.82V.

【緒言】 固体高分子形燃料電池 (PEFC) は、低温発電が可能であるため耐高温用断熱材などを使わなくても良いという長所があるものの、高い触媒機能を有する高価な白金を使用しなければならないコスト上の大きな欠点がある。白金は、燃料電池の正極及び負極の両極で使用されている。負極の白金は、ルテニウムとの合金やその微粒子化による表面積の拡大などをはかることにより使用量は年々少なくなっている。しかしながら、正極においては未だに酸素還元触媒として白金が多量に使用されている。このような状況下、白金に代わる高い酸素還元特性と安定性を有する新触媒の開発が、国内外で精力的に進められている。

これまでの研究は鉄やコバルトなどの卑金属を活性中心とする触媒の開発であった。この研究は、Jasinskiによるコバルトフタロシアニン触媒の発見と、それに続くJahnkeらによる広範なN₄系錯体の探索とその熱処理による高性能化の流れを汲むものである。この他、酸化物、窒化物、炭化物、カルコケナイド化合物などのセラミックス材料も検討されている。しかしながら、これらの触媒の発電性能は十分ではなく、また耐久性の面でも問題があり実用化に至ってはいない。2006年、Zelenayらは、化学的に調製されたCo-Polypyrrole-Carbon composite (Co-PPY-C) が熱処理することなしに、高い酸素還元活性を示すことを示した[1]。しかし、その後はポリアニリンに鉄・コバルト系の塩を混合し、熱処理することにより高活性な非白金系酸素還元触媒が得られることを報告している。一方、我々のグループは鉄及びコバルトフタロシアニンと熱硬化性樹脂の混合物を 600~1000°Cの温度で熱処理した試料が高い酸素還元活性を示すことを報告してきている[2]。その酸素還元の活性点に関してはまだ結論は得られていないが、窒素原子の存在がその活性に何らかの寄与をしていると考えている。

以上踏まえ、我々は窒素含有高分子ポリピロールの熱処理物が酸化還元活性を示すか、また化学構造、特に窒素原子周りの構造がどのように変化しているかを固体 NMR および XPS を用いて明らかにしたのでその結果を報告する。

キーワード：ポリピロール、炭素化過程、固体¹⁵N NMR

○くろきしげき、かわうちすすむ、おざきじゅんいち、みやたせいぞう

[実験]ポリピロール(PPY)は2つの方法で化学重合した。一方は塩化第二鉄(FeCl_3)を、もう一方は過硫酸アンモニウム(APS)を酸化剤として用い重合を行った。 ^{15}N NMR測定のため、 ^{15}N ラベルピロールを通常のピロールに12.5%~50%混合することにより試料を合成した。今後これらをそれぞれPPYFeおよびPPYAと呼ぶ。試料は N_2 ガス気流下で熱処理を行った。

電極触媒活性は回転ディスク電極法を用いて評価、熱分解過程はTG/DTA、熱分解過程における構造変化は固体NMR、最終生成物の構造は固体NMR及びXPSで評価した。

[結果・考察]まず、TG/DTAより、室温から1000°CまでのPPYFeおよびPPYAの熱処理による質量減少過程を調べた。その結果、両者ともほぼ同様の質量減少過程をたどることがわかった。

次に、回転ディスク電極法を用いて得られた酸素還元ボルタモグラムをFig.1に示す。同じPPYを原料にしなが、異なる酸素還元活性を持つ試料が得られたことがわかる。この結果から、PPYFeがPPYAよりも高い酸素還元活性を示すことが明らかになった。特に900°Cでの熱処理により得られたPPYFe900は、我々が今まで得ている鉄及びコバルトフタロシアンと熱硬化性樹脂混合物系の熱処理物と同様の酸素還元活性を示している、

そこで、各々の試料のXPSスペクトル及び固体 ^{15}N NMRスペクトルとXPSスペクトルを測定した。その結果、すべての試料において、ピリジン型、グラファイト型、ピロール型に由来する信号が、XPS、NMRどちらのスペクトルにも観測された。酸素還元活性の高い試料においては、ピロール型窒素の大きな減少が見られることがわかった。

[謝辞]本研究はNEDO産業技術研究助成事業により実施された。

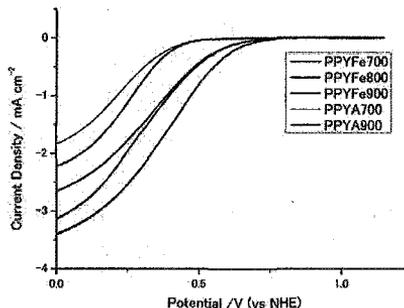


Fig.1 Oxygen reduction voltammograms of the pyrolyzed polypyrroles.

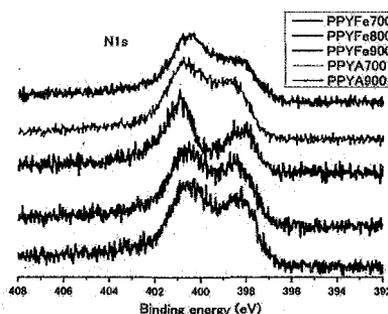


Fig.2 N1s XPS spectra of the pyrolyzed polypyrroles.

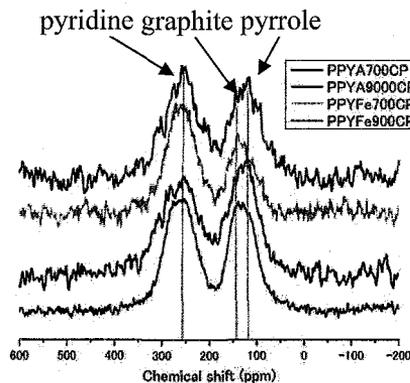


Fig.3 ^{15}N CP/MAS NMR spectra of the pyrolyzed polypyrroles.

[1]Bashyam, R.; Zelenay, P. *Nature* **2006**, 443, 63-66.

[2] Ozaki, J.; Nozawa, K.; Yamada, K.; Uchiyama, Y.; Furuichi, A.; Yokoyama, T.; Oya, A.; Brown, L.J.; Cashion J.D. *J.Appl.Electrochem.* **2006**, 36, 239-247.

^{27}Al 固体NMRによるAl-MCM-41の表面Al種の配位数変化の観測

○高橋利和¹, 岩浪克之¹, 林 繁信², 坂倉利康¹, 安田弘之¹

¹産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門

²産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

Coordination Number Change of Surface Al Species on Al-MCM-41 Observed by ^{27}Al Solid-State NMR

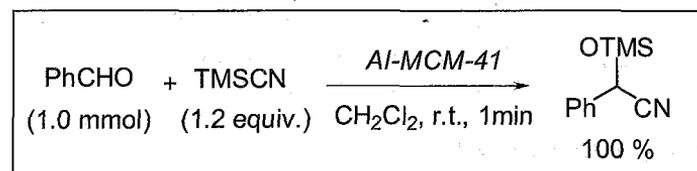
○Toshikazu Takahashi¹, Katsuyuki Iwanami¹, Shigenobu Hayashi², Toshiyasu Sakakura¹, Hiroyuki Yasuda¹

¹Research Institute for Innovation in Sustainable Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan.

²Research Institute of Instrumentation Frontier, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan..

The specific catalytic activity of Al-MCM-41 (Si/Al=20) towards cyano-silylation and related reactions concerning with carbonyl compounds was elucidated by structure analysis using solid-state NMR methods. A ^{27}Al MAS spectrum of Al-MCM-41 with simple excitation using 15° flip angle showed hexa-coordinated Al species (denoted as Al^{VI}). This signal disappeared when the acidic protons on the catalyst surface was substituted by Na^+ through NaNO_3 aq treatment. The re-protonated Al-MCM-41, which was prepared by substitution of the surface Na^+ to H^+ through NH_4Cl aq treatment and subsequent calcinations, showed Al^{VI} signals again. The Si/Al ratio obtained from XRF data showed no apparent change during these procedures. Amorphous silica-alumina (Si/Al=20) (denoted as ASA20) showed almost negligible signal around Al^{VI} region and this feature is not changed during the same substitution procedures. Thus the catalytic activities of these materials were coincident with the existence of Al^{VI} species on it. This evidence strongly suggests that the surface Al^{VI} species is the active site.

【はじめに】 われわれはヘキサゴナル規則性細孔を有するメソポーラスシリカ Al-MCM-41 (Si/Al=20) がカルボニル化合物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。(2008, Chem. Comm., スキーム)。同じ触媒は最近向山アルドール反応や細見アシル化反



^{27}Al MAS Spectra, Al-MCM-41 catalyst, proton exchange

○たかはしとしかず, いわなみかつゆき, はやししげのぶ, さかくらとしやす, やすだひろゆき

このような架橋酸素上の H^+ はしばしばシリカ、アルミナ単独では発現し得ない強い酸性を示すことが知られている。しかし同様の酸性 H^+ を有するアモルファスシリカアルミナ (ASA) にはほとんど活性が見いだされない。Al-MCM-41触媒の固体NMR実験から、サンプルの化学処理によって六配位Alのシグナルが生成、消滅を繰り返すことが明らかになったので報告する。

【実験】 Al-MCM-41 (Si/Al=20) はセチルトリメチルアンモニウムブロミドをテンプレートとして、コロイダルシリカとアルミン酸ナトリウムの水熱合成によって合成し、550°Cで焼成して得た。窒素吸着実験、小角X線散乱実験等によりヘキサゴナル規則性細孔構造をもつことを確認した。表面積は約970 m^2/g であった。また同じ条件でテンプレートを加えずにアモルファスシリカアルミナASA20を合成した。表面積は約160 m^2/g であった。酸性 H^+ の Na^+ 置換は1M $NaNO_3$ 水溶液中で6 hリフラックスしたのち、ろ過、洗浄、乾燥によって得た。 Na^+ 体の H^+ 置換については1M NH_4Cl 水溶液中で6 hリフラックスし、ろ過、洗浄、乾燥に至る一連の操作を3回繰り返して NH_4^+ 体を得、これを焼成して得た。またこれらの置換操作の前後でSi/Al比が変化していないことをXRFによって確認した。固体NMRは4mm MAS プローブを備えたBruker AVANCE NMR装置 ($\nu_0^H=400.13$ MHz) を用いた。 ^{27}Al の標準物質として1M 硝酸アルミニウム水溶液を用い(0 ppm)、各パルス強度におけるNutation速度の標定も行った。シングルパルス測定においてはシグナルの比ができる限り核種の存在比を再現するように15°パルスを用いた。

【結果・考察】 Al-MCM-41の ^{27}Al スペクトル(a)には 50 ppm付近に四配位 (Al^{IV})、0 ppm付近に六配位 (Al^{VI}) のアルミからなるピークがそれぞれ確認された。Al-MCM-41表面の酸性プロトン H^+ を Na^+ で置換すると Al^{VI} がほとんど消滅し、 Al^{IV} のシグナルのみが残る(b)。仮にこの変化が Al^{VI} の脱離によるものと仮定すると、Alの総量は置換後に大幅に低下する筈である。実際にはXRFの結果において有意なSi/Al比の変化が見られないため、この仮説は否定され、なんらかの過程を経て $Al^{VI} \rightarrow Al^{IV}$ の変化が起こったと考えざるを得ない。またこの結果から、観測される Al^{VI} のほとんどすべてが表面付近にあると結論づけられる。次に Na^+ 型Al-MCM-41を再度置換しなおして得た H^+ 体サンプル(c)についてみると、 Al^{VI} に基づくシグナルが復活していることがわかる。またASA20について同様に調製した H^+ 体(d)、 Na^+ 体(e)のスペクトルを比較してみると、いずれも Al^{VI} はほとんど存在しないことがわかる。Al-MCM-41の触媒活性については Na^+ 体はなく、 H^+ 体、再 H^+ 体だけが強い活性を持つことがわかっている。一方、ASA20の触媒活性は H^+ 体、 Na^+ 体にかかわらずほとんどない。このことから、表面に局在する Al^{VI} こそが活性サイトの有力な候補と考えられる。本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の支援の下に行われた。

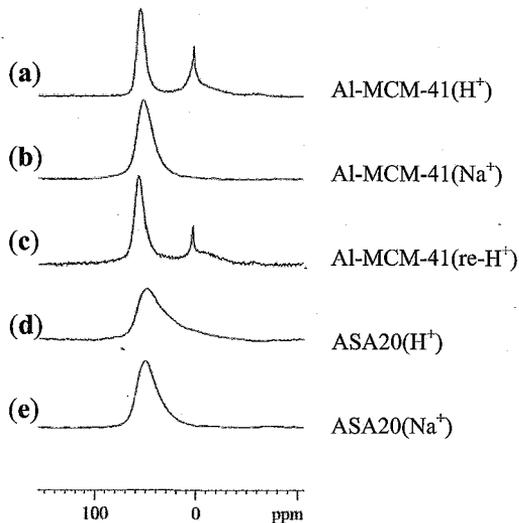


Fig. 1 ^{27}Al Simple excitation MAS spectra of Al-MCM41(a-c) and ASA20(d,e). The conditions of each spectrum are described in the text.

アンフォテリシンBチャネル複合体における分子間相互作用の固体NMR解析

○松森信明, 梅川雄一, 多原主哲, 土居幹嗣, 大石徹, 村田道雄
 阪大院理

Solid-State NMR Studies on Intermolecular Interactions of Ion Channel Complex Formed by Amphotericin B

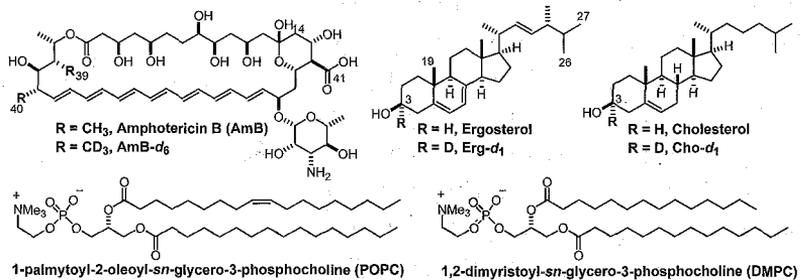
○Nobuaki Matsumori, Yuichi Umegawa, Kazuaki Tahara, Mokotsugu Doi, Tohru Oishi, and Michio Murata

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Japan.

Although amphotericin B (AmB) is thought to exert its antifungal activity by forming ion-channel together with ergosterol, no previous study has directly proven the AmB-ergosterol interaction. To establish the interaction, we measured solid-state ^2H NMR using deuterated sterols and AmB. The spectra showed that fast axial rotation of ergosterol was inhibited by the coexistence of AmB, whereas that of cholesterol was essentially unchanged by AmB, thus demonstrating that ergosterol has significant interaction with AmB.

Then, to further confirm the direct interaction between AmB and ergosterol, we measured ^{13}C - ^{19}F REDOR using ^{19}F -AmB and ^{13}C -ergosterol. The results unexpectedly revealed that the AmB-ergosterol interaction occurs not only in a parallel manner but also in an antiparallel orientation. Based on these results, we will propose a model of AmB-sterol interaction.

ポリエンマクロライド系抗生物質アンフォテリシンB (AmB) は、脂質膜中でイオン透過性チャネル複合体を形成し、抗真菌活性を発揮する。AmBはステロールと相互作用してチャネル複合体を形成すると考えられており、その選択毒性は、ヒト細胞膜に含まれるコレステロールに比べて、真菌細胞膜に含まれるエルゴステロールに対する親和性の高さに起因するとされている。しかし、AmBとステロールの分子間相互作用を直接観測した研究はまだない。そこで我々はまず重水素標識したステロール(Erg- d_1 , Cho- d_1) およびAmB (AmB- d_6) を調製し、重水素固体NMRを用いて脂質二重膜中におけるステロールおよびAmBの運動性を評価した¹⁾。



アンフォテリシンB, 脂質二重膜, 固体NMR

○まつもりのぶあき, うめがわゆういち, たはらかずあき, どいもとつぐ, おおいしとおる, むらたみちお

Cho- d_1 およびErg- d_1 は化学合成によって調製した。これらの重水素化ステロールを用いて、不飽和リン脂質であるPOPC (palmitoyloleoylphosphatidylcholine) 膜中における ^2H NMRを測定した。Erg- d_1 は粉末状態で114 kHz程度の四極子分裂を示すが、POPC膜中では高速で軸回転運動をしているため、Fig. 1aのように分裂幅が39 kHz程度になる。次にAmB含有POPC膜でErg- d_1 の ^2H NMRを測定すると、Fig. 1bに示すようにシグナルが顕著にブロードニングした。これはAmBとの相互作用によってエルゴステロールの回転運動が阻害されたためと考えられる。Cho- d_1 を用いて同様の測定を行ったが、AmBを共存させても運動性の低下がみられなかったことから (Fig. 2)、コレステロールはAmBとほとんど相互作用していないことが確認された。

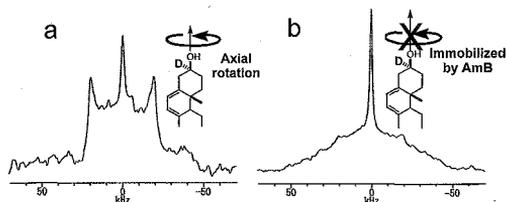


Fig. 1 ^2H NMR spectra of Erg- d_1 in POPC bilayers
a) Erg- d_1 :POPC = 1:18
b) Erg- d_1 :AmB:POPC = 1:2:18

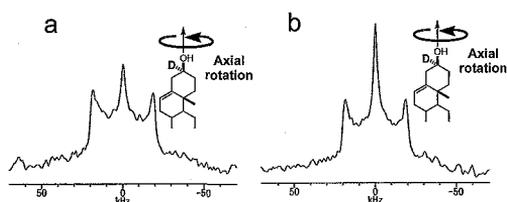


Fig. 2 ^2H NMR spectra of Cho- d_1 in POPC bilayers
a) Cho- d_1 :POPC = 1:18
b) Cho- d_1 :AmB:POPC = 1:2:18

また、AmB生産菌に3- d_3 プロピオン酸ナトリウムを取り込ませて生合成的に調製したAmB- d_6 を用いて、POPC膜中におけるAmBの運動性についても検討した。その結果、AmBは膜中でほぼ静止しているが、エルゴステロール含有膜ではAmBの運動性が増加することが明らかとなった。つまり、AmBとエルゴステロールが共存すると、両者の運動性が近くなることが示された。このように、 ^2H NMRを用いてAmBとエルゴステロールが直接相互作用していることを初めて実験的に示すことができた。

一方、脂質膜を不飽和リン脂質のPOPCから飽和リン脂質DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine) に変えて ^2H NMRを測定すると、AmBとエルゴステロールの相互作用がほとんど検出されなかった。これは、AmBとDMPC間の相互作用が強いため、AmB-エルゴステロール相互作用が相対的に弱められたためと考えられる。このように、AmBとステロール間の相互作用はリン脂質の種類に依存することも明らかとなった。

次に、AmBとステロール間の相互作用を直接観測するために、 ^{13}C 標識したエルゴステロール及び14位にFを導入した14-F-AmBを調製し²⁾、 ^{13}C - ^{19}F REDOR法による分子間相互作用の観測を行った。 ^{13}C エルゴステロールは酵母菌に2- ^{13}C 酢酸ナトリウムを取り込ませて生合成的に調製し、14-F-AmBはAmBから化学的に誘導した。上記と同様にPOPC膜中で両標識体を混合し、分子間で ^{13}C - ^{19}F REDORを測定した。その結果、REDORはエルゴステロールの19位メチル基だけでなく、26, 27位メチル基にも観測された。このことは、AmBとエルゴステロールは平行に並んで相互作用しているだけでなく、逆平行の配向も存在していることを示唆している。このように、AmBとエルゴステロールの分子間相互作用の直接観測に初めて成功した。

以上の結果に基づいて、AmBとステロールの相互作用モデルについても議論する。

References

- 1) Matsumori N. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11855.
- 2) Matsumori N. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565.

若手ポスター賞発表要旨

Abstracts of Young Scientists Poster Awards

クモ牽引糸、野蚕絹糸間の著しい物性の違いと関連する
ポリアラニン領域の異なる分子間β構造の発現

○亀谷俊輔¹、山内一夫¹、朝倉哲郎^{1,2}

¹農工大院工・²農工大科学博物館

Difference in the β-sheet packing arrangements of polyalanine regions in spider and wild silkworm silks with different physical properties

○Shunsuke Kametani¹, Kazuo Yamauchi¹ and Tetsuo Asakura^{1,2}

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology.

²Nature and Science Museum, Tokyo University of Agriculture and Technology.

Many of the silk fibroins produced by silkworms and spiders consist largely of alternating blocks of polyalanine and glycine-rich domains and show a range of tensile properties. It is generally agreed that the exceptionally high tensile strength of spider dragline silk can be attributed to crystalline β-sheet regions formed by the polyalanine sequences. Solid-state NMR and X-ray diffraction show that the β-sheet packing arrangements depend on the length of the polyalanine repeats. Short repeats up to (Ala)₆ crystallized in a rectangular lattice, while longer repeats crystallized in a staggered lattice. The crystalline regions of *N. clavata* (Ala₆) adopted mainly the former while those of *S. c. ricini* (Ala₁₂) mainly the latter. We suggest that these differences in packing arrangements of polyalanine repeats may have important implications for tensile and other physical properties of these silks

【緒言】

クモ牽引糸は野蚕の一種のエリ蚕絹繊維と比較して、はるかに高い強度を示す(Fig.1a)。これらの絹の繊維強度は、一次配列中のアラニン連鎖領域(結晶領域)のβ-sheet構造の存在に起因すると言われているが、クモ牽引糸とエリ蚕絹ではアラニン連鎖領域のアラニン数に著しい違いがあり、エリ蚕絹は2倍長い(Fig.1b,c)。

本研究では、その原因の解明と関連して、鎖長を変化させた一連のβ-sheet構造を有するアラニンオリゴペプチドについて、¹³C CP/MASNMR、分子間REDOR、¹H driven spin diffusionNMR

(PDSO)、粉末X線回折、分子動力学(MD)計算、¹³CNMR化学シフト計算を併用することで、アラニン連鎖領域について分子間構造モデルを提出することを目的とした。

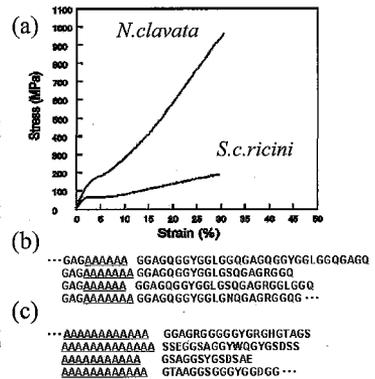


Fig.1 (a) Stress-strain curves of dragline silk and silkworm silks. The primary structures of (b)*N.clavipes* dragline silk and (c) *S.c.ricini* silk.

固体NMR、ポリアラニン、βシート構造

○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)_n n=3-8, 12)を合成した。その際、各種固体 NMR 測定のために応じて、適宜、残基特異的に¹³Cならびに¹⁵Nラベル化を行なった。また、(Ala)_{3,4}については、溶媒処理を変えることによって、100%平行型(P-)と100%逆平行型(AP-)β-sheet構造を調整した。クモ牽引糸およびエリ蚕絹のアラニンC α ラベル化は、経口投与にて行なった。

各種固体 NMR の測定は Bruker Avance 400 を用いて行なった。また、一連のアラニンオリゴペプチドについて、β-sheet構造がP-またはAP-であるか、決定するために FT-IR 測定を行なうとともに、さらに分子間配置の情報を得るために、粉末 X 線回折測定を行なった。¹³C NMR 化学シフト計算は、奈良女子大黒子教授との共同研究にて行なった。最終的に、分子間配置の異なるβ-sheet構造を提案するために、Material Studio を用いて MD 計算を行なった。

【結果】

アラニンオリゴペプチドの¹³C CP/MASNMR、粉末 X 線回折及び FT-IR スペクトル

一連のアラニンオリゴペプチド((Ala)_n n=3-8, 12)について、¹³C CP/MASNMR スペクトル(AlaCβ域)と粉末 X 線回折パターン(Fig.2)、ならびに FT-IR スペクトル(Fig.3)を測定した。(Ala)₃のデータは、P-および AP-の間で著しく異なることが分かる。P-および AP-を作り分けることのできる(Ala)₄の場合も同様であった。(Ala)₅以上では、一種類のβ-sheet構造のみ得られるが、(Ala)_{3,4}のP-および AP-間のパターンと比較することによって、(Ala)₅以上は、AP-構造であることがわかる。実際、(Ala)₅以上の¹³C=O、C α ピークはシングルであり、その化学シフト値は AP β-sheet構造のデータと一致する。

さらに、一連のAlaCβピークを比較すると、途中でスペクトルパターンが著しく異なることがわかる。すなわち、(Ala)_{5,6}では、約20ppmのシングルピークのみであるが(両側ピークは末端基由来)、(Ala)₇以上からピークの線形が大きく変化する。その線形は、(Ala)₈ならびに(Ala)₁₂も同様である。また、粉末 X 線回折でも、(Ala)₆以下で観測される $2\theta=19.2^\circ$ のピークが、(Ala)₇以上では $2\theta=20.4^\circ$ にシフトする。すなわち、コンフォメーションは、いずれも AP-β-sheet構造であるが、分子間構造が、(Ala)₇を境にそれ以上と以下で大きく異なることがわかる。

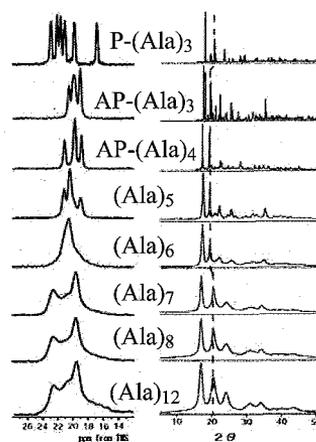


Fig.2 ¹³C CP/MAS NMR spectra of Ala Cβ (left) and X-ray diffraction powder patterns (right) of Ala oligopeptides.

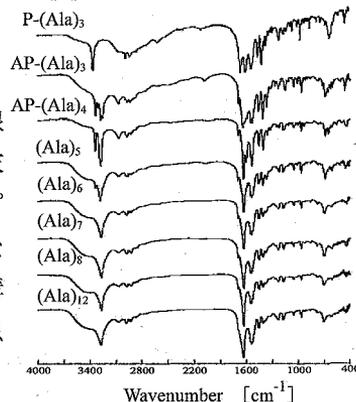


Fig.3 FT-IR spectra of Ala oligopeptides.

(Ala)₇の分子間構造の検討

次に、AP-(Ala)₇の分子間構造について、より詳細に解析を進めるために、中央の4残基のみを選択的に¹³Cラベルした(Ala)₃[3-¹³C]Ala⁴(Ala)₃を合成し、そのAlaCβピークの線形をノンラベル試料(Ala)₇と比較した(Fig.4a,b)。17ppm付近の高磁場のブロードなピーク(矢印)の消失以外は、スペクトルは概ね一致した。17ppmのピークは、末端残基由来である。従って、AlaCβの3つの主ピークは、一本鎖中の局所構造の不均一性を反映したものではなく、分子間構造の不均一性を反映したことがわかる。

さらに、¹³C,¹⁵N均一ラベル化された(Ala)₇を用いてPDSM測定を行い、分子間構造の検討を

続けた(Fig.5)。mixing timeを100msに設定して測定したスペクトルにおいて、22.7ppm(A)と19.6ppm(C)間に相関ピークが得られ、この2つのピークを与える¹³C核は近い距離に存在していることが分かった。一方、真ん中の21ppm(B)のピークは相関ピークが見られず、対応する¹³C核は、他の2つの核から遠い位置に存在していることが分かった。このことから、22.7ppmと19.6ppmの¹³C核が近い分子間構造と21ppmの独立した分子間構造の存在が確認され、それぞれの構造は互いに離れた領域として存在していることが示唆された。実際、(Ala)₃[3-¹³C]Ala⁴(Ala)₃をTFAで処理した所(Fig.4c)、真ん中の21ppm付近のピークが見かけ上、消失した。これは、TFA処理によって、21ppmのピークを与える分子間構造が変化し、両側のピークに変化したことに起因する。ただし、Fig.4cの2本のピークにおいて、高磁場のピーク強度が少し高いことから、高磁場ピークのすそに21ppmのピークが少し残っていると考えられる。

(Ala)₆及び(Ala)₇分子間構造モデルの作成

まず、(Ala)₇の構造モデルを作成するために、分子間REDORの測定を行った。(Ala)₃[3-¹³C]Ala⁴(Ala)₃ならびに(Ala)₄[¹⁵N]Ala⁵(Ala)₂を合成し、1:3の比率で混合した試料について、REDOR測定により異種核間原子間距離測定を行った。その結果、(Ala)₇の¹³Cβ核とシート間の位置にある¹⁵N核の距離は3.8±0.1Åと見積もることができた。さらに、AP-(Ala)₄およびP-(Ala)₃、AP-(Ala)₃についての単結晶X線解析による分子間構造、(Ala)₆及び(Ala)₇の粉末X線回折スペクトルならびにMD計算を行なうことによ

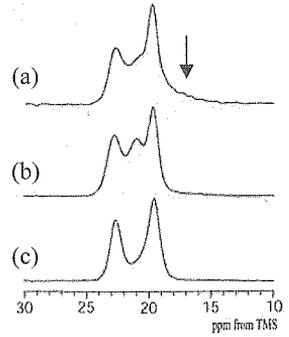


Fig.4 ¹³C CP/MAS spectra of AlaCβ in (Ala)₇. (a) natural abundance. (b) A₃[3-¹³C]A⁴A₃. (c) The same sample as (b) except for the TFA treatment.

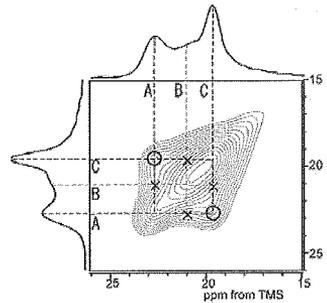


Fig.5 PDSM ¹³C NMR spectrum (AlaCβ region was expanded).

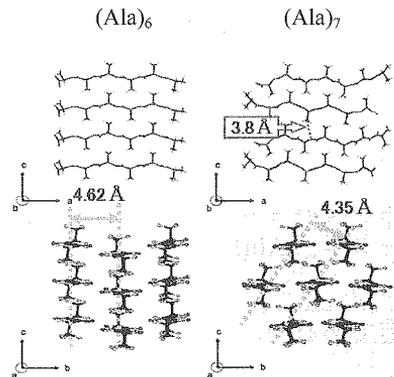


Fig.6 (a) Proposed β-sheet packing models of (Ala)₆ and (Ala)₇.

て、(Ala)₆ならびに(Ala)₇の構造モデルを提案した(Fig.6)。シート間の並びに違いがあり、(Ala)₆ではシート間が重なるが、(Ala)₇の主構造では、シート間がずれている。

(Ala)₆及び(Ala)₇分子間構造モデルに基づく¹³C NMR 化学シフト計算

(Ala)₆と(Ala)₇分子間構造モデルを用いて、¹³C NMR 化学シフト計算を行った(Fig.7)。すなわち、(Ala)₆と(Ala)₇構造について、着目した AlaC β核を取り囲む5本の分子鎖からなる集合体を作成、AlaC β¹³C NMR 化学シフト計算を行った。その結果、AP-(Ala)₇の AlaC βは2種類の異なった環境を反映して、約5ppmのシフト差を与える2つの化学シフトを生ずることを示した。また、AP-(Ala)₆の AlaC β化学シフトの計算値は、その間になる。これらの傾向は実測をよく説明する。

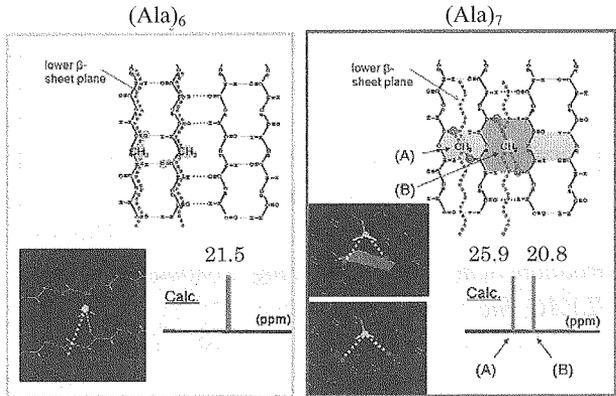


Fig.7 Calculated AlaC β chemical shifts of (Ala)₆ and (Ala)₇ (Stick spectra).

クモ牽引糸ならびにエリ蚕絹繊維の分子間構造の違い

クモ牽引糸、エリ蚕絹繊維の¹³C CP/MASNMR スペクトル(AlaC β域)と粉末 X 線回折パターンを Fig.8 にまとめた。比較のために(Ala)₆及び(Ala)₇の AlaC βピークを示した。クモ牽引糸ならびにエリ蚕絹繊維の AlaC β主ピークは、各々、(Ala)₆及び(Ala)₇の AlaC βピークと類似している。その天然繊維の粉末 X 線回折パターンは、特にクモ牽引糸では非晶部分が多い。結晶部分についてみると、エリ蚕絹繊維は、概ね、(Ala)₇型のパターンで再現できる。一方、クモ牽引糸は、(Ala)₆と(Ala)₇の混在型で再現できる。これは、AlaC βピークにおいて、(Ala)₆の線幅に比較してクモ牽引糸の線幅がかなり広く、一部、(Ala)₇のピークが混在することと対応している。

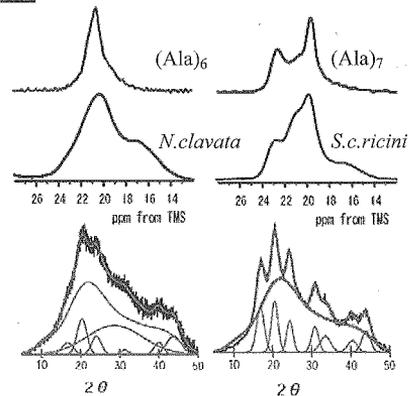


Fig.8 ¹³C CP/MAS NMR spectra of (Ala)₆, (Ala)₇, *N.clavata* and *S.c. ricini* silks. The X-ray diffraction powder patterns together with the simulation are also shown.

以上のように、クモ牽引糸中の(Ala)₆型構造の存在が、高い繊維強度の源になっていると考えられる。この構造の存在と高い繊維強度との関連についての研究は、今後、解明すべきテーマである。

尚、本研究は一部、生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業(平成20-22年度)、科学研究費補助金 基盤研究 S(課題番号18105007;平成18-22年度)ならびに科学技術振興機構先端計測分析技術・機器開発事業(平成20-22年度)により実施された。

固体NMRによる抗菌ペプチドbovine lactoferrampinの細菌模倣膜中における動的構造解析

○堤 敦史¹, 吉良 敦史², 梅山 万左子¹, 川村 出¹, 内藤 晶¹

¹横国大・院工

²株式会社アルバック

Dynamic structure of bovine lactoferrampin in mimetic bacterial membranes as studied by solid-state NMR

○Atsushi Tsutsumi¹, Atsushi Kira², Masako Umeyama¹, Izuru Kawamura¹, and Akira Naito¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University.

²ULVAC, Inc.

Bovine lactoferrampin(LFampinB) is a new antimicrobial peptide found in the sequence of bovine lactoferrin, and consists of 17 amino acid residues. It is revealed that LFampinB affects to bacterial membranes which contain acidic phospholipids, and kills bacteria. This mechanism, however, is not revealed in a molecular level. In addition, proposed antimicrobial mechanisms are often depending on structure and orientation of peptides. Thus it is important to determine the orientation and local structure of LFampinB in biological membranes for further understanding of antimicrobial mechanism. In this report, we performed ¹³C, ³¹P NMR and ¹³C-³¹P REDOR measurements. The results show that LFampin formed α -helix from Leu³ to Phe¹¹. Furthermore the helix axis of LFampinB tilts 47° to membrane normal.

【序論】

Bovine lactoferrampin(LFampinB)は、乳汁中のタンパク質bovine lactoferrinより同定された、アミノ酸17残基からなる抗菌ペプチドである⁽¹⁾(Fig.1)。以前に発表した発表したbovine lactoferrin⁽²⁾と同様に、LFampinBは、酸性リン脂質を多く含む細菌膜に特異的に親和し、抗菌活性を発現することが知られているが、その分子レベルでの活性メカニズムは明らかにされていない。また、現在提唱されている抗菌活性のメカニズムには、ペプチドの構造や脂質膜中での配向に依存するものが存在するので、LFampinBの抗菌活性のメカニズムを理解する上で、生体膜中での配向や局所構造を分子レベルで明らかにすることが重要である。本研究では、¹³C固体NMR測定を行うことで、LFampinBの細菌模倣膜中での配向や動的構造を解析し、³¹P NMR測定から膜との相互作用解析を行い、抗菌活性との相関を明らかにすることを目的としている。

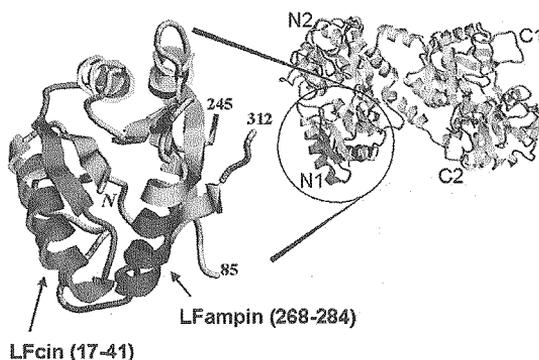


Fig.1 Bovine lactoferrin and derived peptides

固体NMR, 抗菌ペプチド, 化学シフト異方性

○つつみあつし, きらあつし, うめやままさこ, かわむらいずる, ないとうあきら

【実験】

Leu³, Leu⁴, Ala⁷, Phe¹¹, Gly¹²のカルボニル炭素が¹³C同位体標識されたアミノ酸を用いて、Fmoc固相合成法により部位特異的¹³C標識LFampinBを合成した。細菌模倣膜(DMPG:DMPC:CL=65:25:10,重量比)を形成させた後、ペプチド:脂質をモル比で1:10としてペプチドを細菌模倣膜分散系に滴下し、NMR測定試料とした。NMR測定にはChemagnetics CMX infinity-400 FT-NMR分光器を使用し、¹³C 静止状態DD-MASおよびCP-MAS NMR測定からLFampinBの動的構造を、³¹P NMR測定からペプチドとリン脂質の相互作用を、¹³C-³¹P REDOR測定から脂質頭部とLFampinBの¹³C 標識部位の距離を測定し、LFampinBの膜中の深度をそれぞれ測定した。

【結果と考察】

リン脂質膜との相互作用

³¹P NMR測定を行うことにより、ペプチドとリン脂質との相互作用によるリン脂質頭部基の運動性の変化を観測した。中性膜であるDMPC膜に対しては、膜を磁場に配向させる性質があることが判明したが、膜を乱す可能性を示唆する等方信号成分は現れなかった。酸性膜であるDMPG膜に対しては、相転移点を境に異方性が減少していることが観測された。これは、脂質二分子膜を形成した状態の膜と、膜構造に欠陥のある状態の交換が速いために起きたと考えられる。細菌模倣膜に対しては、LFampinBを加えた際に0 ppmに等方ピークが現れ、膜に欠陥が生じていることを示唆している(Fig.2)。

脂質膜中でのLFampinBの挙動

ペプチドがhelixを形成し、脂質二分子膜中で脂質膜面の法線の周りで一軸回転運動を行う様子をFig.3に表す。この回転運動の特徴は、helix軸が回転軸になるのではなく、脂質膜面の法線が回転軸になる点である。即ち、膜に親和性の高いアミノ酸残基は常に同じ側を向いている事を意味している。したがって、カルボニル炭素の異方性は個々のアミノ酸残基により異なる。この異方性の理論値 $\Delta\delta_{cal}$ は、回転軸に対するhelix軸の傾き ζ とhelix軸内のカルボニル平面の面角 γ を用いて以下の式のように表せる⁽³⁾。

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

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

この式より、化学シフトの異方性 $\Delta\delta$ は振幅 $3/2\sin^2\zeta$ を持ち、 γ に依存して振動すること

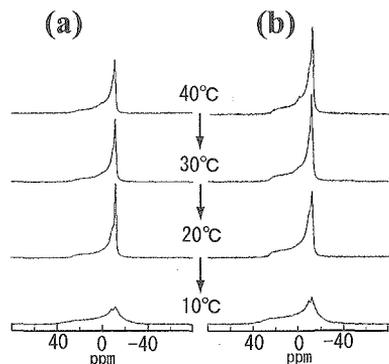


Fig.2 Temperature variation of ³¹P-Static NMR spectra (a) membrane only, (b) peptide: lipid=1:20

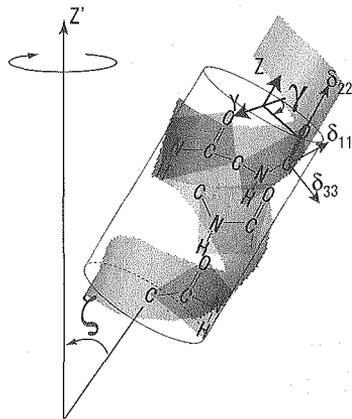


Fig. 3 X, Y, Z, coordinate system when a helix rotates about bilayer normal

が分かる(化学シフト振動パターン)。また、 ζ と各アミノ酸残基により異なる γ を決定するために以下の測定を行った。まず、水和試料による ^{13}C DD-MAS測定により、二次構造の決定を行った(Table1)。この結果、LFampinBはLeu³からGly¹²近傍までhelixを形成していることが判明した。次に、DD-Static測定から各アミノ酸残基の異方性の実測値 $\Delta\delta_{\text{obs}}$ を得た。最後に試料を凍結乾燥し、CP-MAS測定を行い各カルボニル炭素のテンソルの主値 δ_{11} , δ_{22} , δ_{33} を決定した。Fig.4にはAla⁷の測定結果の例を示す。 $\Delta\delta_{\text{cal}}$ と $\Delta\delta_{\text{obs}}$ の一致を示すRMSD値から、このhelixの脂質膜法線からの傾きを47°と決定した。また、(1)式の右辺の二項目を引いた以下の(2)式において、決定した ζ を固定し γ を変化させることで、helix内のカルボニル炭素における異方性の化学シフト振動パターン(Fig.5)が得られる。

$$\Delta\delta_{(r)\text{cal}} = \frac{3}{2} \sin^2 \zeta (\delta_{11} \cos^2 \gamma + \delta_{33} \sin^2 \gamma - \delta_{22}) \quad (2)$$

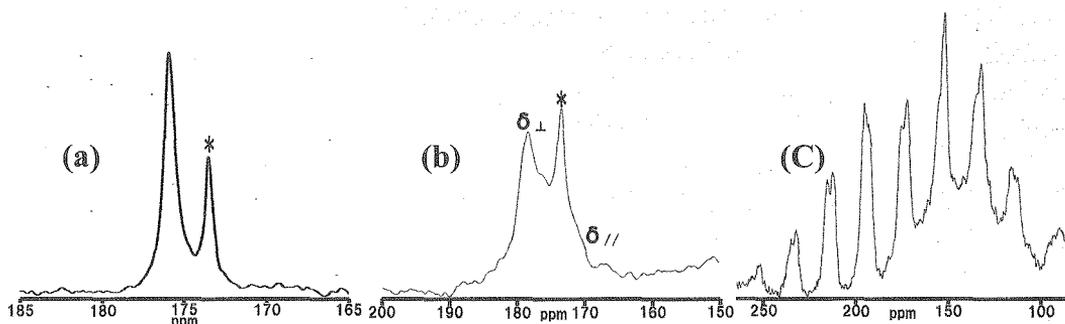


Fig.4 ^{13}C NMR spectra for $[1-^{13}\text{C}]$ Ala⁷ LFampinB (a) DD-MAS 4kHz (b) DD-Static (c) CP-MAS 2kHz * peak of lipid

Table1 ^{13}C NMR measurement results of the $[1-^{13}\text{C}]$ for LFampinB (ppm)

| アミノ酸残基 | δ_{\perp} | δ_{\parallel} | $\Delta\delta$ | δ_{iso} | δ_{11} | δ_{22} | δ_{33} | 二次構造 |
|-------------------|------------------|----------------------|----------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
| Leu ³ | 195.3 | 132.45 | -62.85 | 174.35 | 248 | 178 | 97 | Helix |
| Leu ⁴ | 156.21 | 213.48 | 57.27 | 175.3 | 250 | 188 | 88 | Helix |
| Ala ⁷ | 178.69 | 170.5 | -8.19 | 175.96 | 247 | 187 | 94 | Helix |
| Phe ¹¹ | 172.45 | 176.29 | 3.84 | 173.73 | 249 | 173 | 99 | random coil |
| Gly ¹² | 171.08 | 173.75 | 2.67 | 171.97 | 247 | 171 | 98 | Helix |

この曲線を解析することにより、helixの種類や境界を判断することが出来る。Fig.5に見られる振動パターンから、Leu³からAla⁷までは α -helixを形成していることが判明した。さらに、LFampinBは α -helixを形成するがPhe¹¹近傍からC末端に向けて振動パターンから外れているので α -helixがここで、崩れていることがわかる。この構造はミセルで得られた構造とも合致する⁽⁴⁾。今回の測定では粉末試料を用いてCP-MAS測定を行い、各アミノ酸のセ

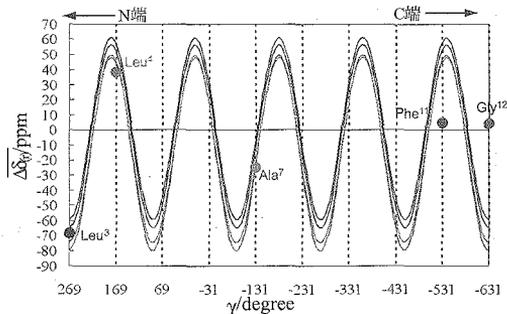


Fig. 5 Chemical shift oscillation for the $[1-^{13}\text{C}]$ chemical shift anisotropy of LFampinB

ンターバンドの化学シフト値がhelixからrandom coilへと変化していることが観測された。これは乾燥により、helix構造が部分的に崩れてしまった可能性が考えられる。

LFampinBの脂質膜中での深度

REDOR法は、REDOR効果による信号の減衰から、原子間距離を精密に測定する手法である。この手法を利用し、リン脂質の頭部基とLFampinB中の同位体標識したカルボニル炭素との距離を測定し、脂質膜中におけるLFampinBの深度決定を試みた。Fig.6からhelix中のN末端側とC末端側では共に5.9Å程度の距離が得られ、大きな差異はないことが判明した。この結果は、helixが膜法線に対して大きな角度で膜中に挿入しているため、膜中に深く埋もれる部位がないことを示している。しかし、部位によっては2スピン系の寄与が含まれている可能性が示唆されており、現在精度の高い距離の測定法を検討中である。

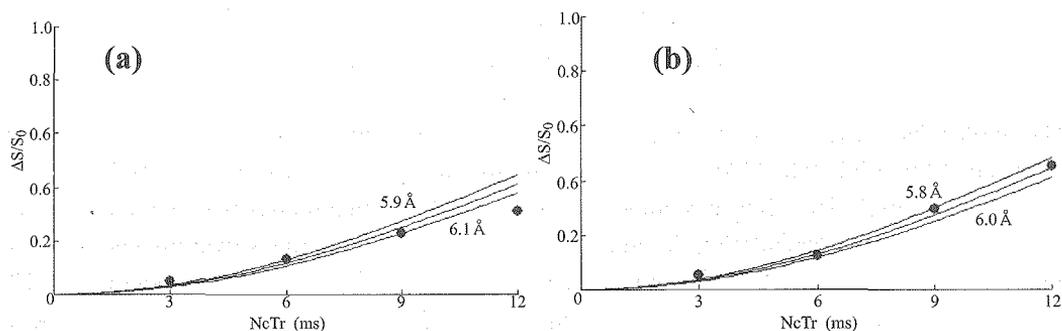


Fig.6 experimental data and theoretical REDOR curves fitting to LFampinB (a) $[1-^{13}C]$ Leu³ (b) $[1-^{13}C]$ Phe¹¹

【まとめ】

今回の結果や以前に行ったQCM測定やカリウムイオン濃度測定と合わせて、LFampinBは酸性膜を多く含む細菌膜に特異的に親和し、酸性膜に対して孔をあけるような性質があると判明した。また、その際にはLFampinBが両親媒性の α -helixを形成し、そのhelix軸を脂質膜面法線に対して47°傾けて膜表面部位に位置し、回転運動する動的構造および膜への挿入度が明らかになった(Fig.7)。今後は、これらの結果から、孔をあける作用との相関を明確にしていく予定である。

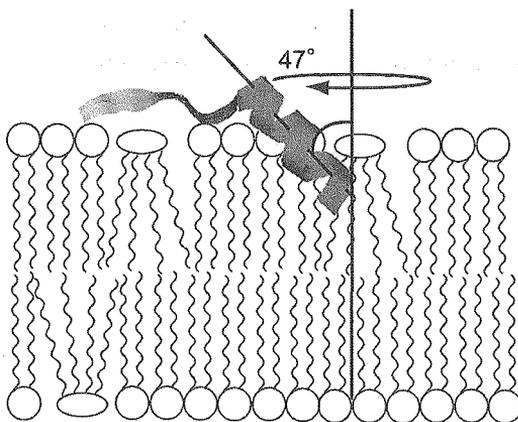


Fig.7 Structure of LFampinB bound to acidic lipid bilayer

【参考文献】

- (1) Van der kraan et al. 2004 *Peptides* **25**, 177-183.
- (2) M.Umeyama et al. 2006 *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1523-1528.
- (3) S. Toraya et al. 2004 *Biophys. J.* **87**, 3323-3335.
- (4) Evan F. Haney et al. 2007 *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2355-2364.

Implicit membrane modelを用いた分子動力学計算と
 固体NMRスペクトルシミュレーションによる
 膜結合ペプチド・マストパランXの構造解析

○池田恵介¹, 亀田倫史², 原田英里砂¹, 阿久津秀雄¹, 藤原敏道¹

¹阪大・蛋白質

²産総研・CBRC

**Structural Analysis of Membrane-bound Peptide, Mastoparan-X
 by Molecular Dynamics using Implicit Membrane Model
 and Solid-state NMR Spectral Simulation**

○Keisuke Ikeda¹, Tomoshi Kameda², Erisa Harada¹, Hideo Akutsu¹,
 and Toshimichi Fujiwara¹

¹*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

²*Computational Biology Research Center, AIST, Tokyo, Japan.*

The molecular structure of a wasp venom peptide, mastoparan-X in lipid bilayers was determined by solid-state MAS NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations. A structural ensemble including orientations of the peptide in membranes was obtained by the molecular dynamics calculation in implicit membranes, where the solvation energy was approximately estimated by the generalized Born/accessible surface area model. NMR spectra were simulated using the structures in the ensemble. (1) The conformation-dependent chemical shift was calculated by SHIFTX and SPARTA. (2) ¹³C NMR spectra, the intensities of which depend on the distance between ¹H spins in the peptide and ²H/³¹P spins in lipids were simulated by spin dynamics calculations. We extracted the molecular structure with respect to membranes and the orientation of the peptide including sidechains from the ensemble by a comparison between the observed and the predicted spectra.

1. 序論

固体NMRスペクトル測定によって、膜ペプチド・蛋白質を脂質二重膜に埋め込んだ状態で、原子分解能で構造を決定することが可能である。また、溶媒・脂質分子中の核スピントタンパク質分中の核スピンの双極子相互作用の測定から、膜中での分子の位置・配向を決定できる。しかし、¹³C完全標識試料では溶液NMRスペクトルと比較して一般的に分解能は低い。また、ピークのオーバーラップを避けるために、部位特異的に蛋白質を同位体標識すると得られる構造情報量が限られることも構造決定上問題となる。

本発表では、分解能の低いスペクトルからできる限り情報を取得し、限られた情報から脂質膜中での立体構造を決定することを目的とし、膜系の分子動力学計算と固体NMRスペクトル計算を組み合わせ、膜ペプチド・蛋白質の構造決定を行う方法を報告する。例として、リン脂質リポソームに強く結合しているハチ毒ペプチド・マストパランX (INWKGIAAMAKKLL-NH₂)の構造解析結果を示す。

分子動力学計算, スペクトルシミュレーション, 膜ペプチド・蛋白質

○いけだけいすけ,かめだとし,はらだえりさ,あくつひでお,ふじわらとしみち

2. 方法

分子動力学計算:計算にはCHARMM力場(param 22 + CMAP)を使用した。二面角や原子間距離などの構造制限情報は加えなかった。高速に脂質膜中のペプチドの分子動力学計算を行うため、溶媒和エネルギーを一般化ボルンエネルギーと溶媒露出表面エネルギーの和で近似するimplicit membrane modelを用いた。レプリカ交換法を用いて(32 replicas、300-800 K)、構造空間を効率的にサンプリングした。初期構造としてextendした構造を用い、16 nsまで計算した(step size 2 fs、SHAKE拘束下)。

化学シフト予測:分子動力学計算から得られた構造アンサンブル中のマストパラメータXの分子構造それぞれについて、 C_{α} 、 C_{β} 、 C' の化学シフト値を計算した。予測にはSPARTAおよびSHIFTXを使用した。

^{13}C -Observation of X-Selective ^1H -Depolarization (COXSHD)スペクトル計算:COXSHDスペクトル測定により、シグナル強度がペプチド中の ^1H 核と重水素化脂質(DMPC- d_{67} /DMPG- d_{67})膜中の $^2\text{H}/^{31}\text{P}$ 核間の距離に依存しているスペクトルを得た。アンサンブルの構造・配向を用いてCOXSHD (1D)スペクトルをスピンドYNAMIX計算によって作成した。これまで解析されていない側鎖のスペクトル領域を加えた全領域(0-140 ppm)について計算した。

3. 結果・考察

主成分分析:分子動力学計算から得られた構造アンサンブル(7-16 ns、9000 structures)の原子座標について主成分分析を行ったところ、300 Kにおける分子構造は第1・第2主軸平面上で5つのクラスターに分類された(Fig. 1)。すべてのクラスターでペプチドは膜界面に存在していた。

主鎖構造:アンサンブルのうち、主鎖 C_{α} 、 C' 、側鎖 C_{β} 化学シフトレベルで実測値と一致している(RMSD < 1.3 ppm)構造は、N末1-2残基はフレキシブルな構造をとり、残りの3-14残基は α -helix構造を形成していた。この構造は主成分分析において、自由エネルギーが最も低いクラスターに存在していた。また、これは以前に報告されている主鎖構造と一致した(Biophys. J. 91, 1368)。

膜配向:COXSHDスペクトルに最も良くフィットする分子の配向・構造を決定した。ペプチド分子は膜面にほぼ平行に横たわり、ヘリックスの疎水面を膜中へ向けていた。この配向は主鎖構造同様、自由エネルギーの低いクラスターにみられるものであった。

側鎖構造:COXSHDスペクトルのフィットがよい構造についてTrp3の側鎖構造を解析した。可能な二面角として $(\chi_1, \chi_2) = (-60^\circ, 90^\circ)$ 、 $(-60^\circ, -30^\circ)$ 、 $(180^\circ, -90^\circ)$ が得られ、側鎖のインドール環を膜に深く挿入していることが明らかとなった。

4. 結論

Implicit membrane modelを用いた分子動力学計算によって、膜結合状態のマストパラメータXについて、実験的に妥当な構造空間を高速にサンプリングすることができた。計算構造とスペクトルシミュレーションを組み合わせた解析を用いることで、化学シフトと分解能の低い1D COXSHDスペクトルから、膜中でのペプチド分子の配向だけでなく、側鎖の構造を得ることが可能となった。本解析法は十分高速な計算であるため、膜蛋白質など大きな系に適用可能である。

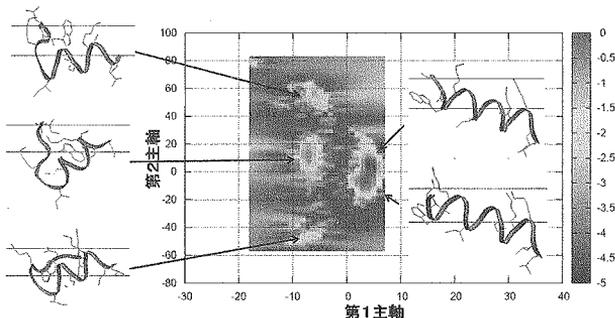


Fig. 1 Principle component analysis

Implementation of double resonance magic angle coil spinning experiments

○Munehiro Inukai, and Kazuyuki Takeda

Graduate School of Science, Kyoto University

Abstract: We present an extension of magic angle coil spinning (MACS) solid-state NMR spectroscopy to double-resonance experiments, enabling implementation of powerful double-resonance solid-state NMR methodologies including cross polarization, proton decoupling, and two-dimensional correlation spectroscopy etc., while still enjoying the merits that are intrinsic to MACS, such as high concentration sensitivity, eliminated magnetic susceptibility-induced field distortion, and an easy-to-use approach with the conventional and widespread hardware.

[Introduction]

In many applications of NMR to materials of chemical/biological interest, the concentration sensitivity, i.e., the sensitivity per unit sample volume, is often more important than that of the mass sensitivity, and the need to gain the former in NMR analysis of sparse, volume-limited samples stimulated development of a tiny detection coil called as a microcoil[1-3]. By reducing the size of the coil one can significantly enhance the filling factor (the ratio of the sample volume to the coil volume) and thereby the attainable concentration sensitivity. Magic Angle Spinning (MAS) has recently stimulated its combination with microcoil NMR in the context of concentration sensitivity, and among several reports on microcoil-MAS NMR spectroscopy[4-6], a remarkable idea put forth by Sakellariou et al. involves spinning of the microcoil together with the sample of interest, and wireless, inductive signal transmission between the spinning microcoil and the primary circuit of the MAS probe[7]. In this outstanding strategy, referred to as Magic Angle Coil Spinning (MACS), the coil can be wound directly around the capillary sample so as to gain the filling factor, while inhomogeneous magnetic field distortion due to bulk magnetic susceptibility of the wire of the microcoil is eliminated by spinning the microcoil at the magic angle. Furthermore, the importance of the MACS approach cannot be overstated from the practical point of view, because it requires no other than a standard, popularly used MAS probe, while any other approaches for microcoil MAS do require some hardware modification inside the MAS probe. Thus, the idea of MACS provides a versatile strategy toward high-resolution solid-state NMR measurements with enhanced concentration sensitivity. Currently, the MACS experiments are demonstrated in ^1H NMR, ^{29}Si NMR and ^{23}Na NMR, while it is often required in solid-state NMR to carry out double-resonance experiments (e.g., cross polarization, proton decoupling,

キーワード：マイクロコイル、マジック角コイル回転

ふりがな：○いぬかいむねひろ、たけだかずゆき

and two-dimensional correlation spectroscopy). In this work, we integrate MACS and double-resonance NMR spectroscopy into an easy-to-use, powerful, and sensitive analytical tool for polycrystalline and amorphous solid materials with a small volume of the order of 0.1 mm or less, opening a new arena of chemical analysis in which one can enjoy benefits from both MACS and double-resonance NMR spectroscopy.

[Double-resonance magic angle coil spinning]

Fig. 1a describes a circuit diagram for a doubly-tuned MACS resonator, to be put inside a rotor (a sample tube specially designed for MAS) and spun together with the rotor in the conventional doubly-tuned MAS probe. The doubly-tuned MACS resonator is composed of two capacitors C_1 and C_2 and two inductors L_1 and L_2 , and their mutual inductance is denoted by M . V_1 and V_2 represent electromotive forces induced by the primary circuit (not described in the figure) in the probe through the inductive couplings.

We wound two coils (inner diameter: 0.5 mm) with 80 μm polyurethane-coated copper wire, and assembled the doubly-tuned MACS resonator in an axially symmetric form using two chip capacitors, as shown in Fig. 1b. We put the two coils apart from each other, so that their coupling M is negligible.

In order to evaluate sensitivity enhancement introduced by employing the doubly-tuned MACS resonator, we examined the frequencies of nutation, i.e., rotational motion of nuclear magnetization under resonant radiofrequency irradiation, for both the ^1H and ^{13}C channels of a commercial MAS probe with and without the doubly-tuned MACS resonator shown in Fig. 1. In Fig. 2a, the ^1H and ^{13}C nutation frequencies are plotted for various radiofrequency powers, showing the enhancement factors of 5.4 ($=46.2/8.60$) and 7.0 ($=26.6/3.80$) for the ^1H and ^{13}C channels. Fig. 2b and c show ^{13}C CP-MAS spectra of an identical polycrystalline sample of uniformly ^{13}C -labeled L-alanine, where the sample was put into the rotor as usual in b, while the doubly-tuned MACS resonator was attached to the sample in c. As expected, the latter resulted in an enhancement factor of ca. 7 in the ^{13}C NMR sensitivity, in good agreement with the enhancement factor in the ^{13}C nutation efficiency described in Fig. 2a.

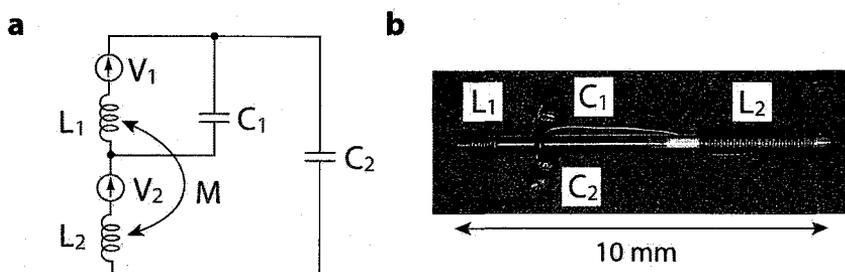


Figure 1. (a) A circuit diagram for implementing double-resonance MACS experiments. A doubly-tuned MACS resonator was fabricated with two $1 \times 0.5 \times 0.5$ mm chip capacitors, as shown in (b). This doubly-tuned MACS resonator is intended for ^1H - ^{13}C double-resonance solid-state NMR experiments in a magnetic field of 7 T, and the inductances L_1 and L_2 are adjusted so that the resonance frequencies match the Larmor frequencies for the ^1H (300 MHz) and ^{13}C (75 MHz) spins.

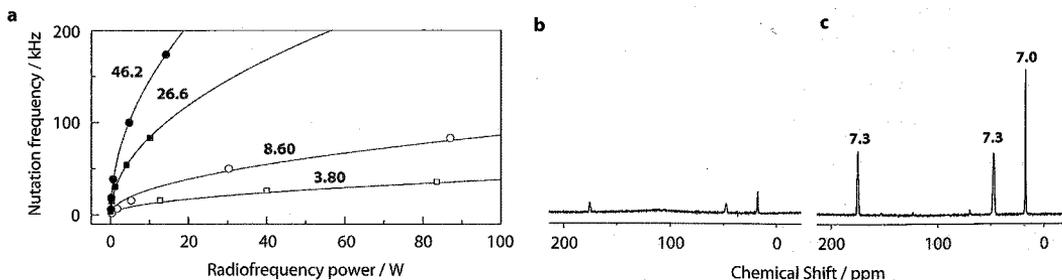


Figure 2. (a) Radiofrequency-power dependence of the nutation frequencies for the ¹³C and ¹H spins in a commercial MAS probe doubly-tunable at frequency bands around 300 MHz and 75 MHz. The square symbols represent the ¹³C nutation frequencies with (filled squares) and without (open squares) the doubly-tuned MACS resonator, and the circle symbols represent the ¹H nutation frequencies with (filled circles) and without (open circles) the MACS resonator. The data points were fitted by a square root function of the form $y = a\sqrt{x}$, and the coefficient a is depicted for each set of the data. (b,c) A ¹³C CP-MAS spectrum of polycrystalline ¹³C-labeled L-alanine obtained without the doubly-tuned MACS resonator (b) and with the MACS resonator (c). The numbers 7.0, 7.3, and 7.3 indicate the enhancement factors of the ¹³C peak intensities. In both (b) and (c), the spinning frequency was 10 kHz and the signals were accumulated over 1000 times.

[Application to organic samples]

In Fig. 3a shown is a ¹³C CP-MAS spectrum of partially ¹³C-¹⁵N-labeled 42-mer amyloid peptide (A β 42), known to play a critical role in the etiology of Alzheimer's disease. Here the sample amount was ~0.1 mg, and the spectrum was obtained with double-resonance MACS by accumulating the ¹³C NMR signal for 2.08 days, while the expected experimental time required to attain the same signal-to-noise ratio with the conventional probe exceeds 100 days. Fig. 3b shows another example of double-resonance MACS demonstrating two-dimensional ¹³C-¹³C correlation experiment by means of dipolar-assisted rotational resonance (DARR) in polycrystalline ¹³C-labeled histidine Multi-dimensional NMR.

[Summary]

Since the signal-to-noise ratio is proportional to the square root of the number of signal accumulations, this result indicates that double-resonance MACS accelerates the experimental time by a factor of ca. 49 compared to the same measurement with the conventional approach, making double-resonance solid-state MAS NMR of sparse materials feasible, and importantly, it has been possible simply by putting the doubly-tuned MACS resonator into a commercially available, standard and widespread double-resonance MAS probe without any hardware modification.

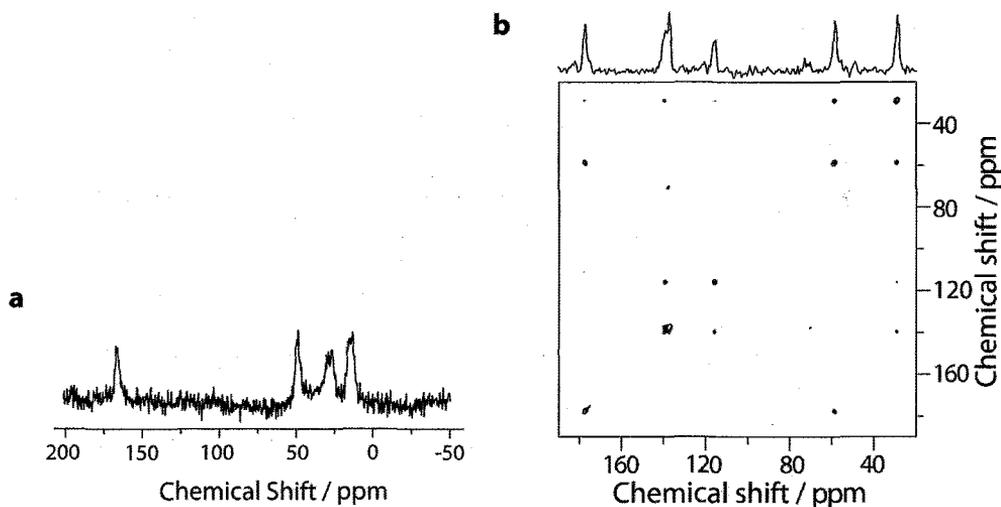


Figure 3. (a) A ^{13}C CP-MAS spectrum of A β 42 (~0.1 mg of sample) partially ^{13}C -labeled at the 35-Met and 42-Ala amino acid residues. (b) A two-dimensional ^{13}C - ^{13}C DARR correlation spectrum in uniformly ^{13}C -labelled polycrystalline histidine (0.1 mg of sample). Both data were acquired using the doubly-tuned MACS resonator.

[Acknowledgement]

We thank Prof. K. Takegoshi at Kyoto University and Prof. M. Kitagawa at Osaka University for fruitful discussions on the subject. The A β 42 sample used in this work was provided by Prof. K. Irie and Dr. Y. Masuda. This work has been financially supported by the CREST program of Japan Science and Technology Agency.

References

- [1] D.L. Olson, T.L. Peck, A.G. Webb, R.L. Magin and J.V. Sweedler, *Science* **270**, 1967 (1995).
- [2] K. Yamauchi, J.W.G. Janssen and A.P.M. Kentgens, *J. Magn. Reson.* **167**, 87 (2004).
- [3] A.P.M. Kentgens, J. Bart, P.J.M. van Bentum, A. Brinkmann, E.R.H. van Eck, J.G.E. Gardeniers, J.W.G. Janssen, P. Knijn, S. Vasa and M.H.W. Verkuijlen, *J. Chem. Phys.* **128**, 052202 (2008).
- [4] H. Janssen, A. Brinkmann, E.R.H. van Eck, J.M. van Bentum and A.P.M. Kentgens, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 8722 (2006).
- [5] K. Yamauchi and T. Asakura, *Chem. Lett.* **35**, 426 (2006).
- [6] M. Inukai and K. Takeda, *Concepts in Magnetic Resonance 33B*, **115** (2008).
- [7] D. Sakellariou, G. le Goff and J.-F. Jacquinot, *Nature* **447**, 694 (2007).

^2H MAS NMRによる電気伝導性有機錯体 $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$ の研究○松永 達弥¹, 水野 敬^{2,3}, 中野 義明⁴, 矢持 秀起⁴, 今城 文雄¹, 竹腰 清乃理^{1,3}¹京大院理, ²日本電子, ³CREST/JST, ⁴京大低物セ **^2H MAS NMR Study of
a Conductive Organic Complex $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$** ○Matsunaga Tatsuya¹, Takashi Mizuno^{2,3}, Yoshiaki Nakano⁴, Hideki Yamochi⁴, Fumio Imashiro¹, K. Takegoshi^{1,3}¹Graduate School of Science, Kyoto University, ²JEOL, ³CREST/Japan Science and Technology Agency, ⁴Research Center for Low Temperature and Materials Sciences, Kyoto University

After the first synthesis of the conductive organic complex, perylene-bromine, in 1954, numerous studies on its properties as well as mechanism of conduction have been reported, with the hope of product high-temperature superconductive materials. $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$, which is one of the conductive organic complexes, shows transformation from metallic phase (HTP) to insulator phase (LTP) at ca. $T_c = 7^\circ\text{C}$. In this work, we apply ^2H magic-angle-spinning (MAS) NMR to partly deuterated $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$ to analyze its transformation mechanism. It is shown that two resolved ^2H MAS signals coexist; the HTP signal appears at -2.9 ppm (34.6°C) and -1.3 ppm (-23.1°C) and the LTP signal stays at 7.1 ppm, respectively.

【初めに】

1954年に高伝導錯体 perylene-bromine が合成されて以降、有機錯体に導電性を賦与する研究は目覚ましい発展を遂げた。当初は有機錯体による高温超伝導の実現に強い関心が持たれたが、その過程で見つかった多彩な物性もまた新たな関心を集めている。本研究で取り上げた (ethylenedioxytetratrafalvalene)₂PF₆ ($(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$)は高速、高効率な光誘起相転移が起きることで注目されている物質であり、また $T_c = 7^\circ\text{C}$ で金属-絶縁体転移(M-I転移)をすることが知られている。このM-I転移ではEDO-TTFの変形や電荷秩序化、PF₆の秩序化がほぼ同時に起こっているが何が転移機構を支配しているのかははっきりしていない。

伝導性有機錯体についてNMRを用いた研究は、(DMe-DCNQI)₂Li^[3]や κ -(BEDT-TTF)₂X^[4]な

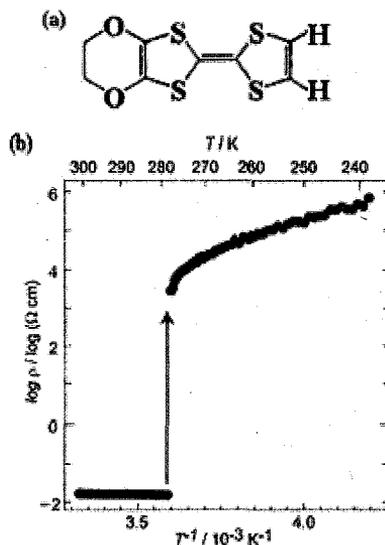


Fig.1 (a)A molecular model of EDO-TTF (b)Temperature dependence of resistivity (ρ) of $(\text{EDOTTF})_2\text{PF}_6$ ^[2]

Key Words: ^2H NMR, organic complex, $(\text{EDOTTF})_2\text{PF}_6$

著者ふり仮名：○まつながたつや、みずのたかし、なかのよしあき、やもちひでき、いましろふみお、たけごしきよのり

どがいくつかあるものの余り多くはない。これは ^{13}C などの同位体置換物質の合成に手間がかかることや、同位体置換の必要が無い ^1H では同種核間スピン相互作用が大きいことが主な理由である。そこで本研究では比較的簡単に合成できる ^2H 部分置換体を用いて $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$ のM-I転移の解析を行った。この方法では置換によりHサイトを限定できる。また ^2H の四極子相互作用はMASで平均化することが出来るため化学シフトのみのシンプルな高分解能スペクトルが得られるという利点がある。

【実験】

EDO-TTFのビニル水素(Fig. 1(a)のH部分)を ^2H 部分置換した EDO-TTF-d_2 ($(\text{EDO-TTF-d}_2)_2\text{PF}_6$)を試料として用いた。 $-20^\circ\text{C}\sim 30^\circ\text{C}$ での化学シフト及び T_1 の測定には14.1 Tマグネット、Doty社製固体高分解能MASプローブ、JEOL-ECA分光計を用いた。試料の温度は試料と共にローターに詰めた $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ の ^{207}Pb MAS NMR スペクトルにより求めた。ローターをテフロンスペーサーで区切り、上下に $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を、中央に試料を詰めることで互いが混ざり合うのを防いだ。

【結果】

Fig. 2に ^2H MAS NMR スペクトルのセンターバンドの温度変化を示す。どの温度でも2つのピークが見られ、その比率は相転移に伴い温度依存する。この挙動は一次相転移に従っている。高周波数側ピークが電気伝導を示す高温相(HTP)であり、低周波数側ピークが絶縁を示す低温相(LTP)である。ところがB3LYP/6-31G*での化学シフト計算^[5]によるとHTP、LTPどちらのピークも6~7ppm付近に3,4本のピークが現れると計算された。したがってHTPのピークはこの計算結果と異なる化学シフトを持ち、このシフト差は伝導電子の影響だと考えた。HTPピーク強度の比率の温度依存性をFig. 3に示す。転移温度近傍でなくてもHTP、LTPの比率は温度と共に緩やかに変化する。これはFig. 1(b)の伝導率の変化に見られる明確な相転移の様子とは異なる。これは転移温度でのHTPの割合が約70%であることから、パーコレーション理論を用いると擬2次元的な伝導性を持つと考えられる。

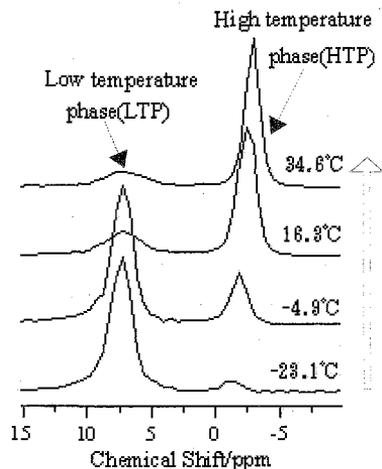


Fig.2 Temperature dependence of ^2H MAS NMR spectra of $(\text{EDO-TTF-d}_2)_2\text{PF}_6$ with increasing temperature (14.1 T). HTP signal moves from -2.9 ppm to -1.3 ppm, while LTP stays at 7.1 ppm, respectively.

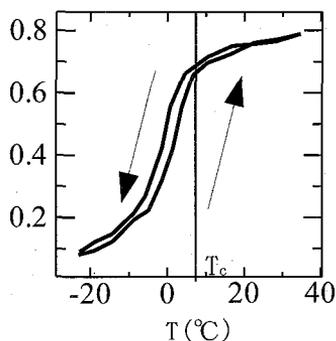


Fig.3 Temperature dependence of the peak intensity ratio of HTP.

Reference.

- [1] H. Inokuchi, Bull. Chem. Soc. Jpn. 1952, 25, 28.
- [2] A. Ota, H. Yamochi, G. Saito, J. Mater. Chem., 2002, 12, 2600.
- [3] Y. Shinohara, et al., Phys. Rev. B. 76.035128.
- [4] K. Miyagawa, K. Kanoda, Chem. Rev. 2004, 104, 5635.
- [5] Frisch, M. J., et al., Gaussian 03, Revision C. 02, Gaussian, Inc: Wallingford CT, 2004.

超 1GHz 高温超伝導 NMR システムの開発 高温超伝導 500MHz NMR における 固体 NMR の磁場安定化手法

¹理化学研究所 SSBC, ²横浜市立大学, ³上智大学, ⁴日本電子,
⁵神戸製鋼所, ⁶東京工業大学, ⁷物質・材料研究機構
○ 高橋雅人^{1,2}, 海老澤佑輔², 天明宏之助², 斉藤雄太³, 高尾智明³,
細野政美⁴, 濱田衛⁵, 山田和彦⁶, 木吉司⁷, 山崎俊夫¹, 前田秀明^{1,2}

Towards an HTS NMR spectrometer beyond 1GHz - Field stabilization method for solid state NMR in a 500MHz HTS NMR -

¹RIKEN SSBC, ²Yokohama City Univ., ³Sophia Univ., ⁴JEOL Ltd.,
⁵Kobe Steel, Ltd., ⁶Tokyo Institute of Technology, ⁷NIMS
○ Masato Takahashi^{1,2}, Yusuke Ebisawa², Konosuke Tennmei², Yuta Saito³,
Tomoaki Takao³, Masami Hosono⁴, Mamoru Hamada⁵, Kazuhiko Yamada⁶,
Tsukasa Kiyoshi⁷, Toshio Yamazaki¹, Hideaki Maeda^{1,2}

Achieving a higher magnetic field is important for higher sensitivity, better resolution and for solid state NMR. However, the common Low Temperature Superconductors (LTS) are incapable of generating in excess of 23.5 T. This project replaces the innermost Nb₃Sn coil of the 920MHz NMR with a Bi2223 High Temperature Superconductor (HTS) coil for operation beyond 1GHz⁽¹⁾. Unfortunately, the HTS coil has a small residual resistance and a joint resistance, which prevent the persistent mode of operation. Thus, an external power supply for the HTS is needed, which causes current ripples resulting in modulated spectra.

The difficulty of z^1 shimming in case of HTS magnet caused by its wire shape was indicated by Hahn et. al.⁽²⁾, which suggested that the z^1 shim and the HTS coil were magnetically coupled and affected each other. Such z^1 magnetic field fluctuation cannot be fully compensated by the conventional lock system. Thus, an external lock system which can continuously compensates z^1 component has been developed. A pair of microcoils is installed both above and below the sample. A PC calculates the change of z^0 and z^1 magnetic field errors and controls the currents of z^0 and z^1 compensation coils to stabilize the magnetic field.

The most volatile components of shims are basically z^0 and z^1 in conventional LTS magnets. This system is applicable to the solution and solid-state NMR, such as deuterium NMR and NMR spectroscopy in non deuterated solvents.

緒言

固体 NMR では、NMR の高磁場化が有効である。我々は、高温超伝導を用いた超 1GHz NMR システムの開発を開始した⁽¹⁾。装置は、溶液 NMR と固体 NMR に適用できる。今回、第 1 段階として、高温超伝導 500MHz NMR システムを開発し、固体 NMR 計測を行った。高温超伝導では永久電流モードで使用できないため、外部電源から通

キーワード：高磁場 NMR、磁場安定化、外部ロック

たかはしまさと、えびさわゆうすけ、てんめいこうのすけ、さいとうゆうた、たかおともあき、ほそのまさみ、はまだまもる、やまだかずひこ、きよしつかさ、やまざきとしお、まえだひであき

電するモードで運転する。この場合、高温超伝導線の磁化 ($10^{-6} \sim 10^{-8}$) や、外部電源の電流変化 (10^{-6}) による磁場変動を受けるため磁場を安定化させるロックシステムが必要になる。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、外部ロックを行うことになる。

Hahn ら⁽²⁾は高温超伝導磁石では超伝導線がテープ状であるために発生する磁化のために z^1 シミングが難しくなることを指摘している。これと同様にテープ線に発生した磁化が外部電源の電流変化の影響を受けて変動し、 z^1 変動エラー磁場を作る可能性がある。さらに、超 1GHz NMR はつくば物質・材料研究機構に設置するが、近隣の大形マグネットの漏れ磁場で z^1 成分が生じる可能性がある。外部ロックの難しさは、ロックコイルとサンプルが別の場所に設置されるため、両者間の磁場の補正が必要なることにある。 z^1 成分が時間変動すると、単純な外部ロックでは、この補正が不可能になるため、本磁石では z^1 を常時補正できる外部ロックが必須である。このための外部ロックを開発したので報告する。

実験結果と考察

固体 NMR 用に Fig. 1 に外部ロックシステムの構成を示す。 z^1 成分を検知するために、固体 NMR プロブ内に ^7Li 溶液マイクロコイル (ロック用) を MAS ハウジングの上下に設置し、両方のマイクロコイルの FID 信号を周波数カウンタで交互に測定した。得られた磁場を用いて、プロブ内に設置した z^0 と z^1 の磁場補正コイルの電流を制御し、 z^0 、 z^1 磁場成分のフィードバック制御を行った。これにより磁場変動成分のうち z^0 、 z^1 方向の磁場を安定化することができる。その結果、Fig. 2 に示すようにこれまでよりも長期にわたって安定した NMR 磁場と線形を作ることができた。この間、制御した補正電流値から z^0 、 z^1 磁場成分が変動していることが確認でき、この方式の有効性も実証できた。

通常の永久電流モードの NMR 磁石でも変動がもっとも大きい z^0 、 z^1 磁場成分を補正することがこの方法により可能となるため、従来からのロックが使用できない高分解能固体 NMR や重水素溶媒なしの溶液 NMR でも有用である。

- (1) T. Kiyoshi, A. Otsuka, S. Choi, S. Matsumoto, K. Zaitzu, T. Hase, M. Hamada, M. Hosono, M. Takahashi, T. Yamazaki, H. Maeda; IEEE Transactions on Applied Superconductivity, 18 (2008) 860-863.
- (2) S. Hahn, M.C. Ahn, J. Bascunan, W. Yao, Y. Iwasa; presented at the Applied Superconductivity Conference, 2008.

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。

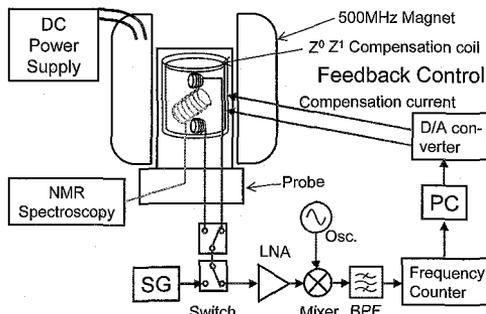


Fig. 1. A magnetic field stabilization system using two microcoils NMR and a frequency counter for z^0 and z^1 magnetic field compensation. This system is worked as an external lock system for solid state NMR using an external power supplied magnet.

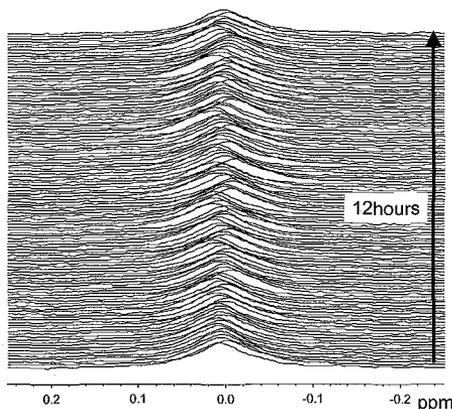


Fig. 2. A stacked plot of solid-state ^{13}C NMR for adamantane measured in the external current mode, while the external lock system continuously stabilize the magnetic field for 12 hours.

500MHz 高温超伝導NMR分光器による溶液NMR計測； 超1GHz NMRに向けて

○柳澤吉紀^{1,2}, 中込秀樹², 細野政美³, 濱田衛⁴, 吉川正敏⁵,
大塚昭弘⁵, 木吉司⁶, 天明宏之助⁷, 渡辺健太⁷, 山崎俊夫¹,
高橋雅人^{1,7}, 前田秀明^{1,7}

¹理研SSBC, ²千葉大院・工学研究科, ³日本電子,

⁴神戸製鋼所, ⁵JASTEC, ⁶物質・材料研究機構, ⁷横浜市大院

Solution NMR measurements with a 500 MHz HTS NMR spectrometer; Towards a beyond 1 GHz NMR spectrometer

○Yoshinori Yanagisawa^{1,2}, Hideki Nakagome², Masami Hosono³, Mamoru Hamada⁴,
Masatoshi Yoshikawa⁵, Akihiro Otsuka⁵, Tsukasa Kiyoshi⁶, Kohnosuke Tenmei⁷,
Toshio Yamazaki¹, Masato Takahashi¹, Hideaki Maeda^{1,7}
¹RIKEN SSBC, Kanagawa, Japan, ²Graduate School of Engineering, Chiba University, Chiba,
Japan, ³JEOL, Tokyo, Japan, ⁴Kobe Steel, Hyogo, Japan, ⁵JASTEC, Hyogo, Japan, ⁶National
Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan, ⁷Yokohama City University, Kanagawa, Japan

We have started a project to develop a 1.03 GHz NMR spectrometer using a Bi-2223 high temperature superconducting (HTS) coil. An innermost low temperature superconducting (LTS) coil of the 920 MHz NMR magnet installed in National Institute for Materials Science is to be replaced by an HTS insert coil. However, HTS coil generates a magnetic field drift after the magnet excitation caused by magnetization of HTS. Furthermore, current ripple of the DC power supply for the LTS/HTS magnet causes a magnetic field fluctuation. These problems must be solved for high resolution solution NMR measurements such as protein research, as they require a magnetic field stability of 10^{-10} . In this paper, we firstly describe a LTS/HTS 500 MHz NMR magnet developed as a first step towards 1.03 GHz NMR, and secondly we will show results on; (1) magnetic field drift caused by magnetization of the HTS and magnetic field fluctuation caused by current ripple; (2) field stabilization by internal deuterium lock; (3) basic NMR test results; and (4) 2D- and 3D- NMR measurements on protein solutions.

1. 緒言

我々は高温超伝導 (HTS) コイルを用いた超1GHz (1.03 GHz) のNMRスペクトロメータの開発を進めている [1]。HTSは臨界磁場が30T以上あり、超1GHz (>23.5T) のNMR磁石を実現できる唯一の超伝導線材である。超1GHz磁石では、高磁場コイルにHTS、低磁場コイルにLTSを用いる。HTSコイルには微小な残留抵抗があるため永久電流モードで運転した場合、NMR磁石として必要な磁場安定度 ($10^{-8}/h$) を実現できない。その

超1GHz NMR, 磁場変動, タンパク質

○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, よしかわまさとし, おおつかあきひろ, きよしつかさ, てんめいこうのすけ, わたなべけんた, やまざきとしお, たかはしまさと, まえだひであき

ため電源通電モードで運転する必要があるが、電源電流リップルにより磁石磁場が変動してしまうので、これを安定化しなければ高分解能NMR計測は不可能である。さらにHTS線材は強い磁化を持ち、励磁後にこれが緩和するのでHTS磁石磁場の値が一方向にドリフトしてしまう。これが大きいと、 ^2H 内部ロックが動作せず、磁場安定化ができなくなる可能性がある[2]。これまで、重水素内部ロックの応答性評価と制御の最適化、電源通電モードにおけるLTS NMR磁石の磁場変動安定化手法の開発を行い、通電モードでも溶液NMR計測に必要な安定磁場が実現できることを明らかにしてきた[3]。今回は LTS/HTS 1.03 GHz NMR開発の第1ステップとしてLTSとHTSを組み合わせた 500 MHz NMRスペクトロメータを開発し、LTS NMR磁石と同等の磁場安定度を実現し、タンパク質の多次元NMR計測を実証したので、報告する。

2. 実験方法

強い電磁力に対抗して銅合金シートで補強したBi-2223 高温超伝導テープ線材(4.55mmx0.36mm)をポリマーテープでラップし、内層コイルを製作した。コイルの製作法としては、ダブルパンケーキ方式(テープレコーダのテープを巻く様な巻き方、それを積み上げる)とソレノイド巻き方式(糸巻きを巻く様な巻き方)がある。超伝導線のテープ形状を考慮すれば、パンケーキ方式での製作が容易であるが、磁場の均一度の観点からはソレノイド方式が良い。ここでは、数種類のコイルの試作を経て、ソレノイドコイルの製作に成功した。HTSコイルは内径81.2mm、外径121mm、高さ375mmである。このHTSコイルを既存のLTS磁石の内層LTSコイルと置き換えることでHTS/LTS NMR磁石を製作した。磁石は500 MHz NMR装置として運転した。既に基礎研究により、 ^2H 内部ロックは $\pm 1.5\text{ppm}$ までの振幅の磁場揺らぎを 10^{-10} まで安定化できることが明らかになっている[3]。この条件を満たす直流電源として1ppm以下の電流安定度を持つ高安定化直流電源(Danfysik社)を開発した。NMR磁石を通電モードで運転すると、そのままでは電流リードからの熱侵入が大きく冷媒の液体ヘリウムが急速に蒸発してしまう。そのため、本磁石では、ジュール熱の発生と室温から低温部への熱伝導を低く抑制するために、電流リードの一部に高温超伝導のバルク体を用いた。更に、4ケルビン極低温冷凍機を液体ヘリウム槽の上部に設置し、蒸発したヘリウムガスを液体ヘリウムに再凝縮するように工夫した[4]。これらによりヘリウムの蒸発が抑制され、長期間の連続運転を行うことができた。冷凍機としては2種類使用し、各々について2ヶ月間運転し比較した。

以上の磁石を励磁し、理化学研究所において、通電下でのNMRによる評価試験を行った。計測・評価試験の項目は次の通りである。

- (1) 励磁後の磁場ドリフト
- (2) 重水素内部ロックによる磁場変動の安定化実証
- (3) 線形計測や感度計測などの基礎特性
- (4) タンパク質の多次元NMR計測による総合的な性能検証

3. 結果と考察

(1) 磁場ドリフトと磁場変動: Figure 1 に第1回目の励磁直後の磁場変動を示す。磁場の計測には市販のNMRメータ(Metrolab Instruments社)を用いた。励磁直後に電流が一定になった後にも、磁場の値だけが大きく上昇($1.9 \times 10^{-5}/\text{h}$)する。上昇率は徐々に低下し、15時間後には $6.7 \times 10^{-7}/\text{h}$ になる。一方、図に破線で第2回目の通電の結果を示す。この通電では、電流を1%余分に流し(145A)、次に定格の144Aまで戻すいわゆるオーバーシュート(オーバーフィールド)通電[5]を行った。この場合、初

期の磁場ドリフトが抑制されている。これは、本手法により、HTSの磁化の緩和が抑制されるためである。本現象については、既にHTSコイルを用いた別の実験で確認している[5]。この様にLTS/HTSコイルの磁場ドリフトの抑制にはオーバーシュート通電が非常に有効であることが明らかになった。

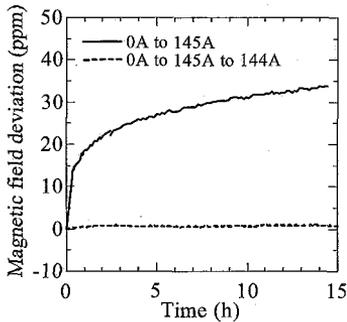


Fig. 1. Magnetic field drift after the magnet excitation. Solid line and dashed line show drift after the normal excitation and the overshooting excitation.

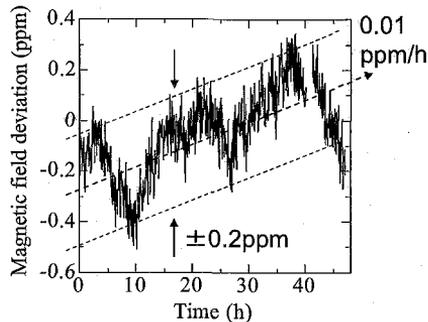


Fig. 2. Magnetic field fluctuation after the normal excitation at the 20th day.

Figure 2 に第1回目の通電による励磁から20日後の磁場変動を示す。磁場の値は重水素化アセトン溶媒中の1%クロロホルムのピーク周波数から求めた。驚くべきことに、この時点でもHTSの磁化緩和による磁場ドリフトが残っているが、その値は $10^{-8}/\text{h}$ (0.01ppm/h)にまで低下しており、永久電流モードのLTS磁石と同程度の変動率が得られている。この長期変動に加え $\pm 0.2\text{ppm}$ の振幅で1日周期での変動と、さらに小さな短期変動がみられる。前者は電源の温度変動により電流値が変動するためであり、後者は電源の短期的な電流リップル(1分程度の周期)に起因する磁場変動である。今回用いた ^2H 内部ロックでは磁場変動が $\pm 1.5\text{ppm}$ 以下であれば安定化できるため、この時点でロックを適用するのに十分安定な磁場が得られたと判断した。

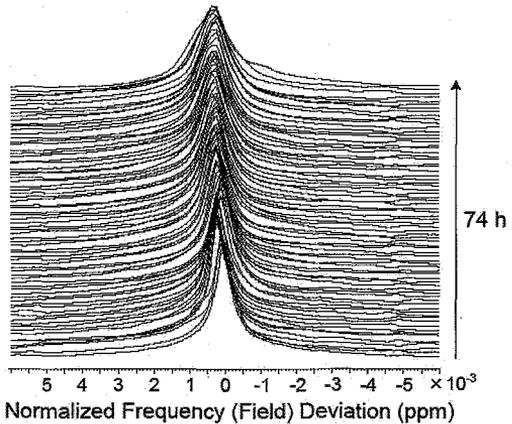


Fig. 3. Magnetic field stability with internal deuterium lock operation. Sample is 1% chloroform in acetone-d6.

(2) 内部ロックによる磁場安定化: Figure 3 に ^2H 内部ロックをかけた場合のNMRスペクトル周波数と線形の安定度を示す。サンプルは重水素化アセトン溶媒中の1%クロロホルムを用いて、74時間にわたって単発のスペクトルを計測した。計測中は磁場均一度の劣化を防ぐために z^1 、 z^2 に関してオートシムを動作させた。ピーク周波数の変位は 5×10^{-10} (0.5 ppb)であり、内部ロックにより永久電流モードのLTS磁石(ロック動作下)と同程度の安定度が得られることを実証できた。またスペクトルの半値幅は計測開始時0.67 Hz、計測終了時 1.31Hzであり、溶液NMR計測に必要な磁場安定度と磁場均一度が得られている。

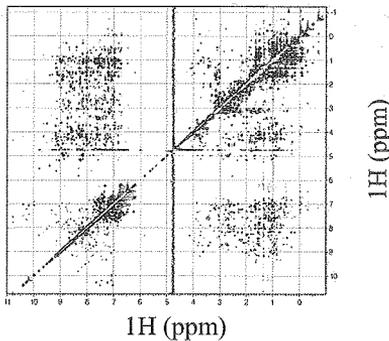


Fig. 4. NOESY using WATERGATE. Sample is 2mM lysozyme in 90% H₂O / 10% D₂O

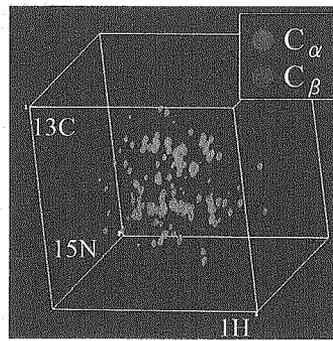


Fig. 5. HNCACB. Sample is double labeled 2mM chlorella ubiquitin in 90% H₂O / 10% D₂O

(3) 多次元NMR計測：以上の結果より、通電モードのLTS/HTS NMRにおいて多次元NMR計測を行うのに必要な基礎的要素を確立できた。そこで最後にリゾチームの2D-NOESY、標識クロレラユビキチンの3D-HNCACBの計測を行った(第2回目の励磁試験)。NOESYの結果をFig. 4に、HNCACBの結果をFig. 5示す。磁場が不安定な場合に生じるであろう t_1 ノイズはなく、磁場変動は十分安定化できている。線形がよく水信号も十分抑制されている。以上の結果、LTS/HTS磁石を用いても、タンパク質の構造解析に用いる多次元NMR計測が十分可能である事を実証できた。

4. まとめ

世界ではじめて通電モードの高分解能LTS/HTS 500 MHz NMRを開発した。これを用いて、タンパク質の構造解析に用いる多次元NMR計測の可能性を実証した。以上により1.03 GHz NMR開発へむけた大きな突破口が開かれた。今後は、この技術に基づき、1.03 GHz NMRスペクトロメータの開発・評価を行う。本装置は、来年度には完成し、NMR計測を開始する予定である。

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. Zaitzu, T. Hase, M. Hamada, M. Hosono, M. Takahashi, T. Yamazaki, and H. Maeda, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **18** (2008) 860.
- [2] Y. Koyama, T. Takao, Y. Yanagisawa, H. Nakagome, M. Hamada, T. Kiyoshi, M. Takahashi, and H. Maeda, *Physica C* **469** (2009) 694.
- [3] Y. Yanagisawa, H. Nakagome, M. Hosono, M. Hamada, T. Kiyoshi, F. Hobo, M. Takahashi, T. Yamazaki, and H. Maeda, *J. Mag. Res.* **192** (2008) 329.
- [4] A. Otsuka, T. Kiyoshi, S. Matsumoto, K. Kominato, and M. Takeda, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **18** (2008) 852.
- [5] Y. Yanagisawa, H. Nakagome, Y. Koyama, R. Hu, T. Takao, M. Hamada, T. Kiyoshi, M. Takahashi, H. Maeda, *Physica C*, Article in press.

MRIによる地盤液状化モデル系におけるレイリー・テイラー不安定性の可視化

○小林恭平¹, 石川堯洋¹, 巨瀬勝美¹, 半田晋也², 納口恭明³

¹筑波大・数理物質科学研究科

²日本学術振興会特別研究員

³独立行政法人 防災科学技術研究所

Visualization of the Rayleigh-Taylor instability in a soil liquefaction model system using magnetic resonance imaging

○Kyohei Kobayashi¹, Takashi Ishikawa¹, Kose Katsumi¹, Shinya Handa², Yasuaki Nohguchi³

¹Institute of Applied Physics, Tsukuba University, Ibaraki, Japan.

²Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan.

³National Research Institute for Earth Science and Disaster Prevention, Ibaraki, Japan.

In 2001, a soil liquefaction model system constructed in a PET (polyethylene terephthalate) bottle was invented for scientific education and promotion of disaster prevention. This model, consisting of water and two kinds of sands with different grain sizes, had a layered structure resulting from mixing and sedimentation. When the bottle is mechanically shocked from outside like an earthquake, sand boiling induced by liquefaction is observed. In 2002, Nohguchi proposed a hypothesis that this sand boiling is caused by the Rayleigh-Taylor instability of the water film produced between the two sand layers and the liquefied intermediate sand layer. In this work we applied MRI to the liquefaction model system to verify the hypothesis proposed by Nohguchi.

1. はじめに

液状化現象とは地下水位の高い地盤に地盤などにより外部から力が加えられた時に、その地盤があたかも液体のような振る舞いになる現象である。液状化現象は地中から水を含んだ土砂が噴出する噴砂と呼ばれる現象も引き起こすが、そのメカニズムの詳細は分かっていない。2001年、科学教育や災害防止を目的としてペットボトルを用いた液状化現象のモデルシステムが開発された[1]。このモデルシステムは水と径の異なる2種類のガラスビーズから作られ、十分に振り混ぜた後、平らな面に静かに置き、外部から振動を与えることで液状化現象や噴砂現象の様子を再現できる系となっている。また、この系における噴砂現象は2002年、納口により、レイリー・テイラー不安定性によるものではないかと提案された[2]。そこで昨年度からこの系における水の挙動をMRIで可視化し、液状化のメカニズムを解明することを目的としてMR撮像を行ってきた。これまでの研究では液状化現象の過程で起きるレイリー・テイラー不安定性および、噴砂現象を可視化し、納口によって提案されていた仮説(Fig.1)の正当性を示唆する結果を得た[3, 4]。

液状化現象, レイリー・テイラー不安定性

○ こばやしきょうへい, いしかわたかひろ, こせかつみ, はんだしんや, のうぐちやすあき

ところが石川らの発表における撮像条件では、液状化の現象を完全に理解し、種々の解析をするための時間分解能および空間分解能が十分に足りていないと言えなかった。そこで本研究では、撮像手法の改善に加えてモデル系の粘性を高めることにより、現象の起こる時間スケールを拡大し、時間分解能や画像のSNRを向上させることを目的とした。

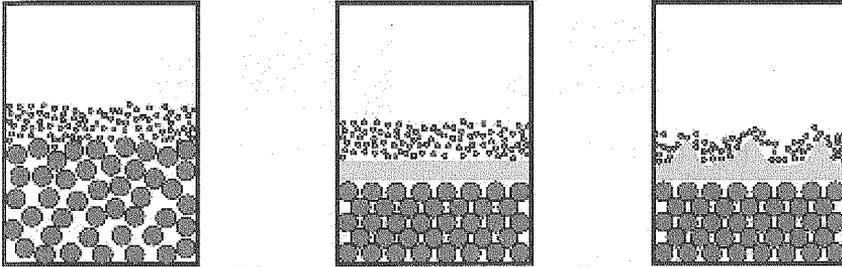


Fig.1 填砂現象のメカニズムの仮説

2. 試料と実験装置

試料は、500 ml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50%エタノール水溶液を入れて作成した(Fig.2)。まず、径の大きなガラスビーズ(平均粒径0.2 mm)は187.0 gで一定とし、径の小さなガラスビーズ(平均粒径0.05 mm)は25 g, 50 gの2種類を用い、それぞれに50%エタノール水溶液440 mlを入れ、さらに水溶液に含まれるプロトンの T_1 を短縮させるために塩化ガドリニウム水溶液を0.05 ml程度加えた。この試料はFig.3のように上から順にエタノール水溶液、0.05 mmガラスビーズ層、0.2 mmガラスビーズ層という層構造を形成する。このとき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0.05 mmガラスビーズ層の厚さは25 g 試料で5 mm, 50 g 試料では10 mmとなっている。また、流体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。

Fig.4 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0.2 T, ギャップ250 mm, 25 ppm均一領域150 mm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(ギャップ160 mm)と500 mlペットボトル容器のサイズに適した開口系80 mm, 高さ150 mmのRFプローブを挿入した。

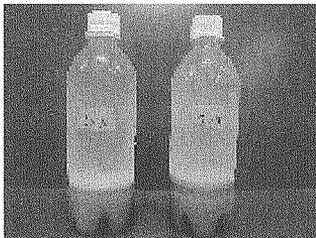


Fig.2 液状化モデルシステム

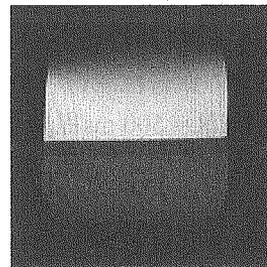


Fig.3 液状化モデル系の
スピンエコー法による鉛直断層
(TR / TE = 800ms / 10 ms)

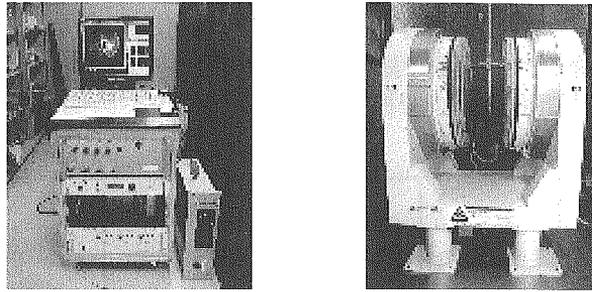


Fig.4 0.2 T永久磁石磁気回路とMRIコンソール

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、試料の各層に対する成分を、それぞれ内径20 mm、高さ30 mm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、エタノール水溶液の T_1 、 T_2 を算出した。なお、撮像はそれらのサンプルの温度を5°C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、気泡緩衝材に組み装置に挿入し、約5分経過させガラスビーズが完全に沈降してから行った。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 = 7.5 mm, matrix size = 128×64, pixel size = 0.8×1.6 mm, TE = 10 ms, ETL = 32, NEX = 1)を用い、0.05 mmガラスビーズ25 gの試料はTR = 700ms, 0.05 mmガラスビーズ50 gの試料はTR = 800 msでそれぞれ撮像した。なお、填砂現象を誘起するために、電磁ソレノイドを用いてペットボトルのふたをパルスシーケンスに同期して軽く打撃した。

4. 実験結果と考察

Fig.5, Fig.6に直径0.05 mmのガラスビーズをそれぞれ25 g, 50 g使用した試料の画像を示す。撮像結果は左端の画像が衝撃を与える前のモデル系の状態で、2枚目以降はFig.6が1.4秒間隔, Fig.7は1.6秒間隔の画像になっている。この図を見ると、両方の系において2枚目の画像では2種類のガラスビーズ層の間に溶液層が現れていることが分かる。そして3, 4枚目の画像ではこの溶液層が波状の不安定性を形成し填砂現象が起きていることが分かる。これは上部に位置する径の小さなガラスビーズ層とその間にある溶液層の間にレイリー・テイラー不安定性と呼ばれる密度不安定性が起きたためと考えられる。

また、前回の報告における直径0.05 mmガラスビーズ50 gの試料で、水を用いた試料の撮像ではTR = 500 ms程度が填砂現象を見る上での下限だったが、エタノール水溶液を用いた試料を使用することにより、TR = 800 msでの撮像でも十分な時間分解能と画像の高い画像のSNRを達成することができた。

また直径0.05 mmガラスビーズ25 gの系でもレイリー・テイラー不安定性および填砂現象は確認でき、上層の厚さの違いによる填砂脈の波長の違いを確認できたため、水を用いた場合とエタノール水溶液を用いた場合とで、液状化現象における水の挙動は変わらないことを示すことができた。

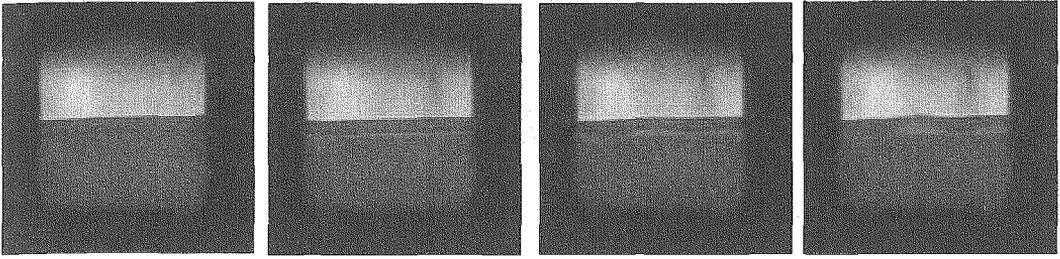


Fig.5 液状化モデル系の撮像結果(0.05mm径ビーズ25g, 溶液層の $T_1/T_2 = 180\text{ms}/145\text{ms}$)

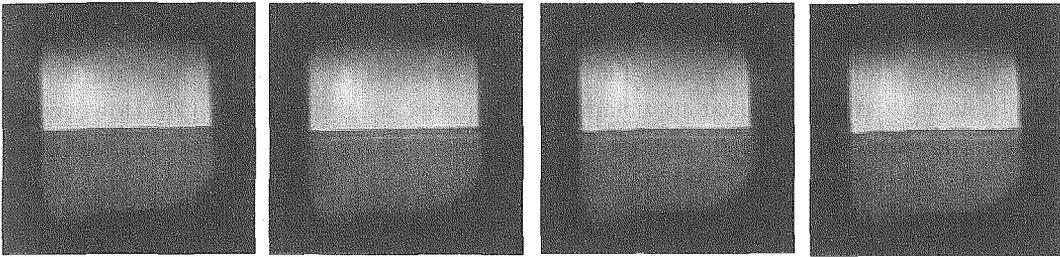


Fig.6 液状化モデル系の撮像結果(0.05mm径ビーズ50g, 溶液層の $T_1/T_2 = 200\text{ms}/120\text{ms}$)

6. むすび

50%エタノール水溶液を用いたエキジョッカーを用いて撮像を行うことにより、時間分解能や空間分解能を向上させることができ、再現性良く液状化現象の過程を撮像できるようになった。

今後は長方形の容器を用いた場合や、より大きな容器での液状化現象の過程を撮像していく予定である。

参考文献

- [1] 宮地良典, 兼子尚知: 地質ニュース 570(2002) 26.
- [2] Y.Nohguchi, Proceedings of the 37th Japan National Conference on Geotechnical Engineering 2003(2002)
- [3] 石川堯洋, 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, NMR討論会講演要旨集, p346-347, 2008, つくば

三次元ファントムを用いたMRIにおける静磁場電流シミング手法の開発

○繁木良介¹, 安達聖¹, 半田晋也², 巨瀬勝美¹

¹筑波大学 数理物質科学研究科・電子物理工学専攻

²日本学術振興会特別研究員PD

Static magnetic field shimming for MRI using a geometrically specified 3D phantom

○Ryosuke Shigeki¹, Satoru Adachi¹, Shinya Handa², and Katsumi Kose¹

¹*Institute Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.*

²*Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan.*

The “gradient shimming” technique, that utilizes phase images acquired with shim current offsets, is now routinely used to obtain homogeneous magnetic fields [1]. However, if nonlinearity of the magnetic field gradients generated by the gradient coils is not corrected, evaluation of the magnetic field homogeneity is not exact. To solve this problem, the magnetic field distribution should be measured in the correct (not distorted) spatial coordinates [2]. In this study, we measured the magnetic field distribution using a 3D geometrical phantom, developed a shimming method, and evaluated the magnetic field homogeneity of a permanent magnet.

1. はじめに

MRIにおける静磁場や勾配磁場の不均一性を評価するために、三次元ファントムを用いる手法が、いくつか報告されている[1]。この手法の特長は、これらの不均一性が、正確な三次元座標において決定され、画像歪みの補正などに適用されることにある。

ところで、静磁場の均一化には、一般に、シムコイルが使用されている。シムコイルに流す電流の最適化には、これまで、位相画像を活用した、いわゆるグラジエントシミングが広く使用されてきた[2]。この手法は、各シムコイルが発生する磁場分布を位相画像から求め、静磁場ができるだけ均一になるように各シムコイルの電流値を決定する方法であるが、この手法では、勾配磁場の非線形性が評価・補正されていない限り、その磁場分布は正確な三次元座標において決定されているとは言い難い。このため、グラジエントシミングは、ユーザーが使う範囲においては、実用的で全く問題のない方法であるが、研究者や開発技術者が、シムコイルの定量的な評価に基づいてシミングの有効性を評価する場合には問題がある。

そこで、本研究では、上記の問題を解決するために、三次元ファントムによって計測した、正確な三次元座標に基づいてシムコイルの作る不均一磁場を求め、それを用いてシミングを行う方法を開発したので、その結果を報告する。

3D geometrical phantom, shimming method

○ しげきりょうすけ, あだちさとる, はんだしんや, こせかつみ

2. 実験

2.1 実験装置

本研究で使用した低温室用コンパクトMRIシステムを Fig.1 に示す. 本システムは, 雪氷の構造解析を目的としており, 永久磁石磁気回路は -5°C から 10°C まで温度制御可能な低温室内に, コンソールは低温室外に隣接して設置している. 永久磁石の使用は, 静磁場強度 1T, ギャップ 60mm, 30mm 球内での均一度 15.3ppm である. 永久磁石の均一度は, 工場製作時の温度 (25°C) で調節されているため, 通常使用する -5°C では静磁場の均一度が悪化する. そのため本システムでは, 空間的な変化がそれぞれ $X^2, XY, Y^2, Z^0, Z^2, Z^3$ に比例した磁場を発生する 6 個のシムコイルを使用している. 各シムコイルの電流値の設定は, それぞれ独立して -1.000A から 1.000A まで可能である.

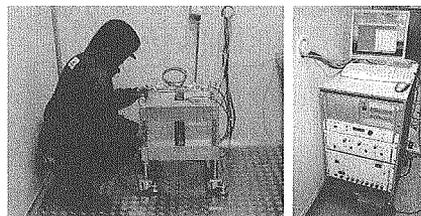


Fig.1 The compact MRI system

2.2 三次元ファントムを用いた静磁場電流シミング法

MRI では, 均一な静磁場 H_0 に線形な磁場勾配 G を加えて, 試料の NMR 信号の位置を, 磁場強度に対応した歳差運動周波数 $\omega(x)$ で識別している. x 方向に沿った静磁場強度を $H(x)$ とすれば, $\omega(x)$ は

$$\omega(x) = \gamma H(x) = \gamma H_0 + \gamma Gx$$

と表される. ここで γ は磁気回転比である.

よって, 撮像対象とする試料の画像上での位置と, 実際の位置との関係は γH_0 を除くと磁場強度に比例する. 静磁場 H_0 が均一な場合に両者は直線的に対応するが, 不均一な場合には画像上での画素の位置の直線的位置からの「ずれ」として現われる. 逆に, 局所的な画素のずれを評価することにより, 静磁場分布を計測できる[3].

本研究で使用した三次元ファントムとその設計図を Fig.2 に示す. 直径 23.9mm, 厚みが 3mm で縦横に幅 1mm, 深さ 1mm の格子状の溝を掘ったアクリル板を重ね, 直径 26.0mm, 高さ 61mm の円筒容器に装填し, 撮像の際にはベビーオイル (Johnson & Johnson 社製) を充填した. 三次元ファントムにおいて, 溝が交差する点 (画像において描出される多数の直方体の頂点) を基準点とし, 局所的な画素のずれの評価に用いた.

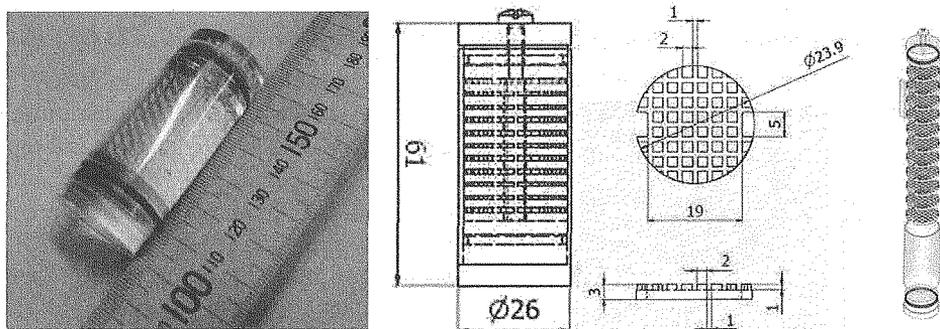


Fig.2 Photograph of the 3D phantom and its geometrical specification.

The unit of the numbers in the right figure is mm.

シムコイルが発生する磁場分布計測は、一つのシムコイルの電流値を 1.000A にして、他の電流値はゼロとしたときに得られるファントム画像と、シムコイルに流す電流値をすべてゼロとして撮像したファントム画像（基準画像）を比較し、基準点の画像上でのリード方向に沿った座標の差を計測することにより行った。基準点の画像上での座標の算出は自作 GUI ソフトウェアを使用した。撮像は 3D 強制回復スピンエコー法 (TR/TE = 100ms/10ms, NEX = 4, matrix size = 256³, voxel size = (100μm)³) を使用した。各シムコイルの磁場分布を以下に示す多項式で二乗近似し、シムコイルに流す電流値の最適化に用いた。

$$f(x, y, z) = \sum_{l,m,n=0}^N a_{lmn} \phi_{lmn}(x, y, z), \quad \phi_{lmn}(x, y, z) = x^l y^m z^n, \quad (l+m+n) \leq 3$$

上記の多項式において、係数が電流値に比例する。計算機上で各シムコイルに流す電流値の組み合わせを変更し、仮想的なシミングを行った。-1.000A から 1.000A の間で、基準画像における、基準点の原座標からのずれの平均二乗偏差 (Root mean square: RMS) が最も小さくなるような電流値の組み合わせを数値的に探索した。

3. 結果と考察

Fig.3に、三次元ファントムの基準画像におけるサーフェスレンダリングと、スライス面の画像を示す。静磁場の不均一性により、リード方向 (y方向) に沿って画素が移動し、画像歪みとして描出されている様子が分かる。

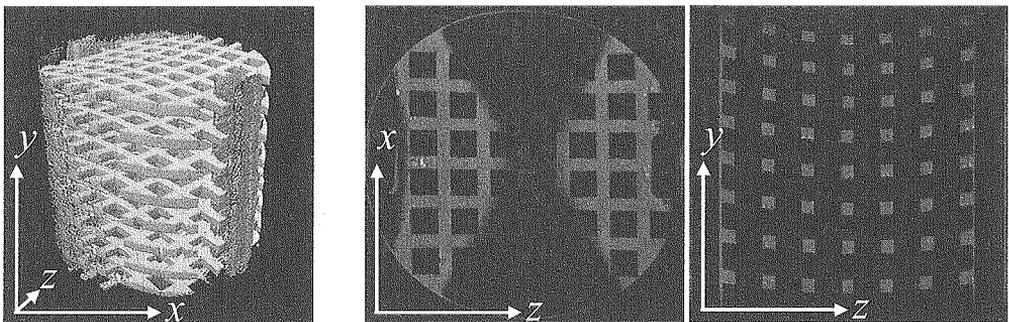


Fig.3 Reference image (no shim current)

各シムコイルが発生する磁場分布計測結果の一例として、Fig.4に、X²シムコイルのみに電流を加えて撮像したファントム画像のスライス面と、基準画像からの、基準点のリード方向に沿った移動量 (座標の差) を求めたグラフを示す。解析した範囲は、17mm×17mm×19mmの直方体の領域である。グラフはX²シムコイルが発生する磁場分布を現す。

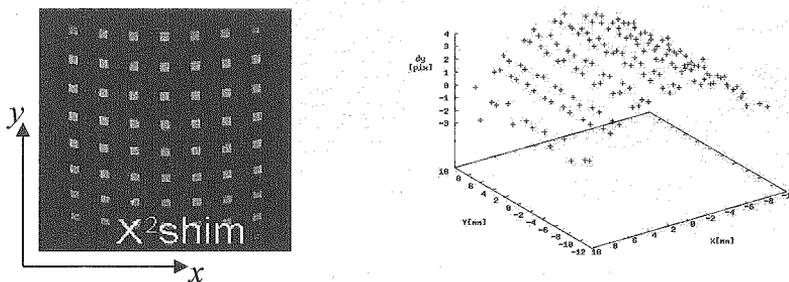


Fig.4 Result of the x² shim coil. Left: Phantom image acquired with full scale current for x² shim coil. Right: Magnetic field distribution produced by the x² shim coil.

Table 1 に、シムコイルに流す最適な電流値の組み合わせの数値探索結果を示す。この際、計算上では、解析領域内における基準点の実座標からのリード方向 (y 座標) の画素のずれの RMS は 1.38 ピクセルとなった。ここで、 z^3 シムコイルは軸を一致させ、半径を変えた二つの円形コイルをプローブの両側に配置しており、in と out は、その内側と外側のコイルを意味している。

Table 1. Result of the Current value acquired with the numerical search

| Shim coil | X^2 | XY | Y^2 | Z^0 | Z^2 | Z^3 in | Z^3 out |
|-------------|--------|-------|-------|-------|--------|----------|-----------|
| Current (A) | -0.590 | 0.021 | 0.682 | 1.000 | -1.000 | -0.145 | 0.284 |

Fig.5 に各シムコイルに流す電流値を最適化して撮像したファントム画像と、基準画像のサーフェスレンダリングを示す。静磁場不均一性による画像歪みが大きく改善されている様子が分かる。Table 2 に二つの画像における、基準点の実座標からのリード方向に沿ったずれの最大値、最小値、RMS の値を示す。RMS の値が 4.2 ピクセルから 1.4 ピクセルに向上し、計算結果ともほぼ一致したため、本手法は有用であると考えられる。

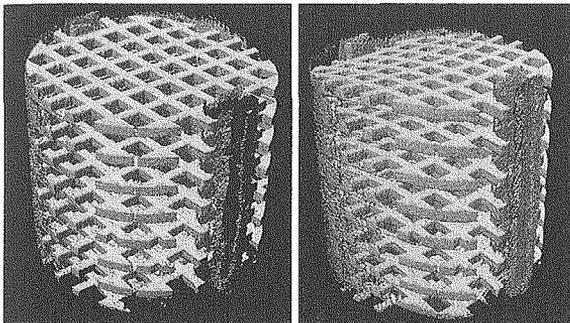


Fig.5 3D surface rendered images of the phantom acquired with and without optimum shim current

Table 2. Difference of the position of control points between two images

| | Optimized image | Reference image |
|------------|-----------------|-----------------|
| MAX(pixel) | 4.2 | 10.9 |
| MIN(pixel) | -4.9 | -12.8 |
| RMS(pixel) | 1.4 | 4.2 |

4. 結語

三次元ファントムを用いて、低温室用コンパクト MRI システムにおける、シムコイルに流す電流値の最適化を行った。最適化した電流値を使用して撮像を行った結果、解析領域内のリード方向 (y 座標) 画素のずれの RMS が 1.4 ピクセル程度となり、計算結果ともほぼ一致したため、本手法は有用であると結論した。

参考文献

- [1] D. Wang et al. "A nobel phantom and method for comprehensive 3-dimensional measurement and correction of geometric distortion in magnetic resonance imaging" Magn Reson Imag 2004; 22:529-42.
- [2] P. Van Zijl et al. "Optimized shimming for high resolution NMR using three dimensional Image based field mapping" J. Magn. Reson. 1994; A111: 203-207.
- [3] A. Kawanaka et al. "Estimation of static magnetic field and gradient fields from NMR image" J. Phys E: Sci. Instrum, 1986; 19:871-75.

○玉田大輝¹, 半田晋也², 巨瀬勝美³

1 筑波大学第三学群工学基礎学類, 2 日本学術振興会特別研究員 PD(国立環境研究所), 3 筑波大学大学院数理物質科学研究科

Development of an MRI Pulse Programmer Using an FPGA board

Daiki Tamada¹, Shinya Handa², Katsumi Kose³

1 College of Engineering Sciences, University of Tsukuba, 2 JSPS Research fellow(National Institute for Environmental Studies), 3 Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

MRI require a complicated pulse programmer because three channel gradient waveforms and two channel RF waveforms must be controlled at high and amplitude resolution. Up to now, MRI pulse programmer using a DSP and a microprocessor are reported. However, their performance is limited by their architecture. In this study, we developed a more flexible MRI pulse programmer using an FPGA board.

1. はじめに

NMRスペクトロメータ及びMRIシステムは化学分析や医療診断で広く使用されているが、近年それ以外の分野にも広く浸透しつつあり、装置も多様化している。よって多様な用途に適応したNMR/MRIシステムの開発には容易に移植・変更が可能なPulse Programmerが有効である。これまでにDSP、マイクロプロセッサ、FPGAなどを用いたNMR用、またはMRI用のPulse Programmerが開発されている[1-3]。ところが、NMR用のPulse Programmerには多くの開発報告があるが、MRI用のものは少ない。その理由として、MRIシステムではRF波形のみでなく3チャンネルの勾配磁場を高精度に制御する必要があり、NMR用に比べ複雑な機構になるためである。ところで、MRI用のパルスプログラマとしてはDSPやマイクロプロセッサを用いたものが報告されているが、それらも、ハードウェア上のフレキシビリティには限界がある。そこで、我々はFPGAを用いた高速かつフレキシブルなMRI用Pulse Programmerを開発した。

キーワード：FPGA,パルスプログラマー

○たまだだいき, はんだしんや, こせかつみ

2. パルスプログラマのハードウェア構成

FPGAの開発に当たって、XILINX社製のSpartan3A評価ボードを用いた。クロック周波数は50MHzで20nsの時間分解能を実現することができる。

この評価ボードには、12bitDAコンバータ (Linear Technology 社製 LTC2624) が搭載されている。今回はこのDACを用いて波形を生成した。

また、PCからFPGAへのデータのダウンロードにはFTDI 社製 USB モジュール FT245Rを用いた。

USB-FPGA間ではシリアル通信によってパルスのタイミング、イベント、グラジエントのamplitudeデータを連続して送信しイベントの数×48bit(6Byte)のデータビットとして送受信を行っている。Table. 1に48bitのデータのビット数の内訳を示す。

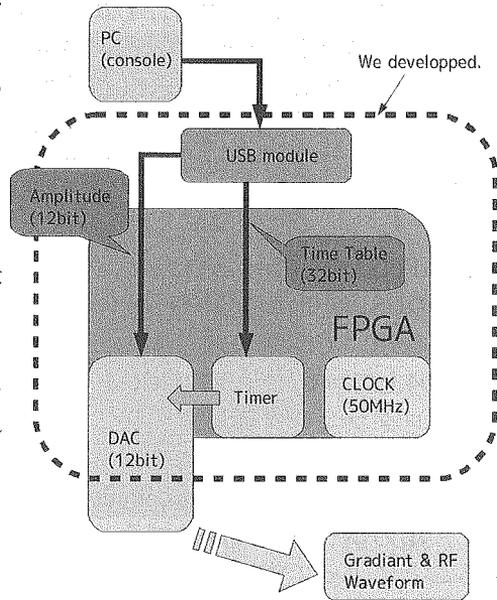


Fig.1 Architecture of PPG outline. Each data bits were sent out via USB.

| Data Bits Description | Number of Bits |
|------------------------------|----------------|
| Timing Data Bits | 32 |
| Event ID Data Bits | 4 |
| Gradient Amplitude Data Bits | 12 |

Table.1 Detail of the data bits for the pulse programmer. Timing Data Bits describe when each pulse send out. Event ID Data Bits show which event such as Gx,Gy,Gz,RF phase, RF trigger, AD trigger are selected. Gradient Amplitude Data Bits are amplitude for each pulse. This table can be edited in console program we developed.

○ソフトウェアの構成

FPGAの開発はverilogHDL言語を使用し、XILINX社の統合開発環境ISE上で行った。FPGA側のプログラムはタイミングモジュール、DACモジュール、クロック生成モジュール、シリアル受信モジュールで構成される。

PCから送信されたデータビットはシリアル受信モジュールで解析され、Timing

Data Bitsを読み出す。読み出された時に Timing Data Bits をタイミングモジュールに送信し、その時からモジュールのカウンタが 0 から 4294967295 までのカウンタアップを開始する。この時、1 カウントは 20ns である。Timing Data Bits とカウンタの差が 0 になったときに DAC モジュールに Gradient Amplitude Data Bits, Event ID Data Bits が送信されてパルスが出力される。この時に次の命令の Timing Data Bits が読み出され、タイミングモジュールに送信される。これを繰り返すことによってシーケンスを発生させる。

PCからFPGAを制御するプログラム(Fig.2)のUSB制御部分はFTDI社のドライバを用いて開発した。また、Ubuntu9.04上でコンパイラにGCCを用いたプログラミング環境で開発を行った。このプログラムによってパルスのタイミングと、amplitude データ、出力ポートを10進数で入力することによって指定することができる。

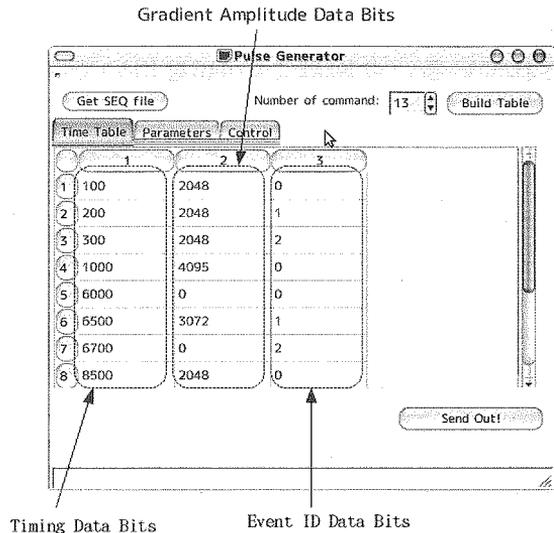


Fig.2 Pulse programmer control program

4. 実験結果

ホスト PC 上で繰り返し時間 0.6ms の FLASH シーケンスのテーブルを作成し、実際に Pulse Programmer を制御してパルスを出力した際の勾配磁場波形を Fig. 3 に示す。20ns の時間分解能でパルスを制御できることを確認した。DAC の立ち上がりの遅延時間は約 5 μ s であった。

現在、DAC の出力レンジは 0~3.3V であるため、正負の勾配磁場を発生するためにはオフセットをかけて電圧を変換する必要がある。また、現在用いている DAC の分解能は 12bit であり、このままでは撮像に用いるにはやや不足するので、将来的により高い分解能の DAC を用いる予定である。

FPGA 側のプログラムを書き換えることによってさらに複雑なシーケンスも実現することが可能であり、多様な場合に対応できることを確認した。今後、我々は今回開発した Pulse Programmer を実際に MRI システムに接続して有用性を実験的に検証

する予定である。

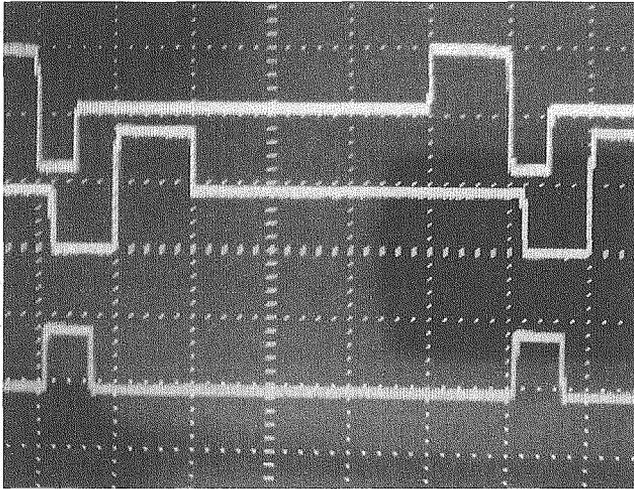


Fig.3 FLASH sequence gradient waveform. The horizontal axis is $100\mu\text{s}/\text{div}$. The vertical axis is $2.00\text{V}/\text{div}$. $\text{TR} = 600\mu\text{s}$.

1. K. Kose and T. Haishi, in *Spatially Resolved Magnetic Resonance*, edited by P. Blumler, B. Blumich, R. Botto, and E. Fukushima Wiley-VCH, New York, 1998, p. 703.

2. S. Handa, T. Domalain and K.Kose, Single-chip pulse programmer for magnetic resonance imaging using a 32-bit microcontroller, *Rev. Sci. Instrum* 78, 084705 (2007).

3. Kazuyuki Takeda, OPENCORE NMR: Open-source core modules for implementing an integrated FPGA-based NMR spectrometer, *J. Magn. Reson.* 192, 218-229 (2008)

Sensitivity enhancement of the Earth's magnetic field NMR using polarization method

○Hideo Sato-Akaba, Shota Watanabe, and Hideo Itozaki

Graduate School of Science Engineering, Osaka University, Toyonaka, Japan.

We have developed a low cost Earth's magnetic field NMR apparatus to investigate aqueous solutions. To enhance the signal intensity, a magnetic pre-polarization method was used. The coil constant of the solenoid coil for magnetic pre-polarization was 4.9 mT/A. The duration of the pre-polarization was dependant on the spin lattice relaxation times of the samples. Single shot proton FID signals from water (10-500 ml) were observed with a pre-polarization field of 49 mT and duration of 5 s. The estimated Earth's magnetic field inhomogeneity in our laboratory was approximately 170 nT over a cylinder of ϕ 70 x 140mm.

はじめに

地磁気NMRは、自然に存在する地磁気をNMR共鳴磁場としているため広範囲にわたり均質な磁場を得ることができる[1]。そのため比較的大きな試料空間を提供することが容易である。また、巨大で高価なマグネットを必要としないというメリットがあり安価に作成できる。しかしながら一方で、地磁気は ~ 0.04 mTと非常に微弱であることから水素原子核の磁化は微弱となりその検出が困難であるというデメリットがある。また共鳴周波数が ~ 1.5 kHzとなることからコイルによる検出感度は高磁場NMRにくらべ格段に低下する。それらを克服するため、地磁気NMRのような低磁場NMRでは数十mTほどの磁場をNMR信号受信前に印加しサンプルを磁化させるpre-polarization法を用いるのが一般的である。Pre-polarization法に使う空芯マグネットはNMR信号取得時には出力がゼロになっており、磁化読み取り磁場に使用しないので均質な磁場を必要としない。そのため均質な磁場を作るための補正用コイル等が不要となる。本研究では、地磁気NMR装置を作製しpre-polarization法の有効性、地磁気の磁場均質性について評価した。

システムの概要

地磁気NMR装置の主な構成は、RF送受信用ソレノイドコイル (635 mH, 280 Ω)、pre-polarization用ソレノイドコイル (54 mH, 1.78 Ω , 4.9 mT/A)、pre-polarization用コイル駆動制御回路、RF共振回路、小信号増幅回路 (~ 80 dB) からなり、それぞれ研究室で開発したものである。試料空間はおよそ直径76 mm x 長さ140 mmとなっている。装置制御信号出力、FID信号取り込みには、AD/DAボード (NI DAQCard-6024E) を用いた。図1に全体の構成図を示す。制御ソフトはLabVIEWを用いて開発した。測定環境は、大阪大学豊中キャンパス研究室にて行っており特別な電磁遮蔽室は使っていない。

地磁気NMR, 偏極法, 装置開発

○あかばひでお, わたなべしょうた, いとぎきひでお

地磁気NMR測定

より大きな磁化を生成させるため、pre-polarization法では地磁気と垂直な方向に磁場(強度:0~50 mT、継続時間:0.5~5 s)を印加しサンプルの磁化を行った。生成した磁化が減衰する前に送受信コイルを用いて90° RFパルスを送信する。FID信号の受信はRFパルス送信と同期して開始した。磁化強度が印加磁場に比例することから、FID信号強度も印加磁場に比例して増加することを確認した(図2)。信号強度は印加磁場に比例して大きくなるが、コイル電流に起因する発熱を避けるため今回作製した空冷コイルでは発生磁場強度の上限は約50mTとした。

水溶液の検出限界を評価するため、500 ml容器と100 ml容器に水10~500 mlを入れ水素原子核のFID信号を測定した。積算無しの測定において、SN=1とした場合の測定限界は0.5 mlであった。図3には水100mlからのFID信号の結果を示す。NMR信号は直接ADボードで取り込むため、信号の周期は地磁気でのラーモア周波数となっている。室温では水の T_2 は2.4 sであったが、FID信号の減衰から求めた T_2^* は0.10 sと短縮されていた。これは、磁場の不均質性による効果がFID信号の減衰に支配的であったためと考えられる。そこで、線幅 7.3Hzより磁場の不均質性を評価すると、研究室では試料領域(直径74x 長さ140 mm)において170 nT 程度であった。

最後に、今回非常に簡易な地磁気NMR装置を作製し、高感度化について実験を行った。Pre-polarization法(印加磁場:49 mT)を使うことにより水において測定限界0.5mlを達成することができ、地磁気を用いた水溶液のNMR研究に応用できることが示唆された。

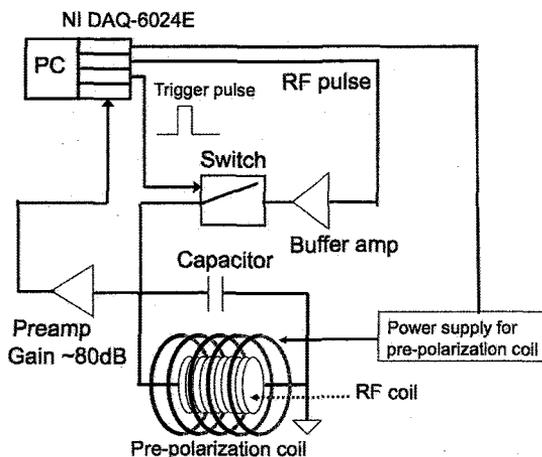


Fig. 1 Diagram of a homemade Earth's magnetic field NMR apparatus.

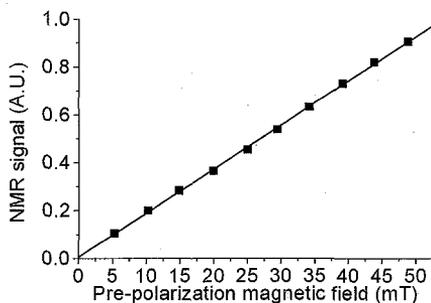


Fig. 2 Dependence of ^1H NMR signals on the pre-polarization magnetic field.

参考文献

[1] P.T. Callaghan, A. Coy, R. Dykstra, C. D. Eccles, M. E. Halse, M. W. Hunter, O.R. Mercier, and J. N. Robinson: *Appl. Magn. Reson.* **32**, 63-74 (2007)

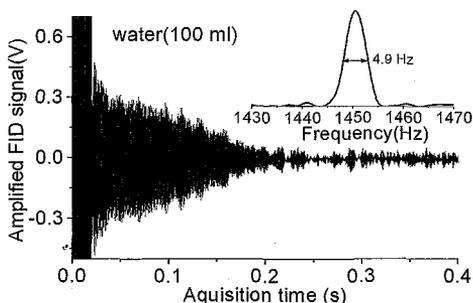


Fig. 3 Single shot FID signal from 100 ml water without magnetic field shimming.

○稲垣大介、赤羽英夫、糸崎秀夫
大阪大学大学院基礎工学研究科

NQR Properties of nitrogen in amino group contained in salt of hydrochloride

○Daisuke Inagaki, Hideo Akaba, Hideo Itozaki
Graduate School of Science Engineering, Osaka University

The ^{14}N NQR properties of diethylamine hydrochloride, which has a chemical structure in the vicinity of nitrogen similar to that of methamphetamine, were investigated. The ^{14}N NQR frequency was found to be 1.006MHz at room temperature, although quantum chemical simulations using BHandHLYP method predicted a NQR frequency of 1.58 MHz. Relaxation times T_1 and T_2 of the nitrogen were 1.1s and 1.8 ms, respectively.

1. はじめに

核四極共鳴(NQR)は共鳴吸収現象の一種であり、NMRのように外部磁場によるスピン整列を必要とせず、その共鳴周波数は分子中におけるスピン量子数 $I=1$ 以上の原子周辺の電場勾配に依存する。不正薬物の多くに含まれる ^{14}N 原子は $I=1$ でありNQR現象を起こすため、不正薬物の同定等への応用が期待される。

本研究は、不正薬物であるメタンフェタミン塩酸塩と ^{14}N 原子周辺の構造が類似するジエチルアミン塩酸塩(Fig. 1)を用いて、ジエチルアミン塩酸塩のNQR共鳴周波数が77Kで1.0395MHzというEdmondsらの報告⁽¹⁾をもとに計測を行い、NQR共鳴をテストした。また、計測パラメータの最適化を図るために縦緩和時間(T_1)と横緩和時間(T_2^*)の評価も併せて行った。

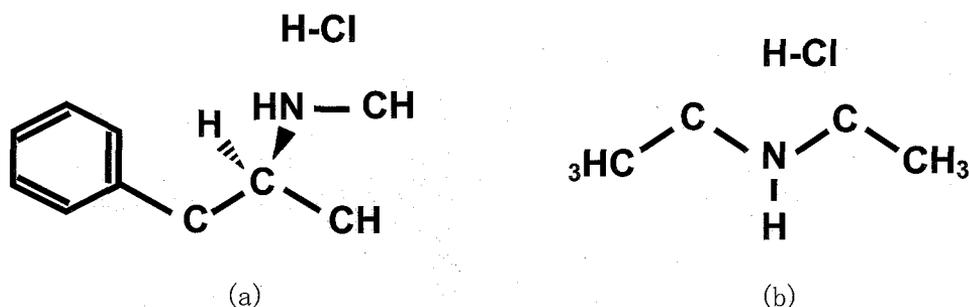


Fig.1 Structures of methamphetamine hydrochloride (a) and diethylamine hydrochloride (b)

NQR、量子化学計算、塩酸塩

○いながきだいすけ、あかばひでお、いとぎきひでお

2. NQR測定

常温下でFIDシーケンスによるジエチルアミン塩酸塩12gの計測を行った。計測を行うにあたり、NQRコンソールにTecmag社製のApolloを使用し、NQR信号の送受信に用いるコイルは直径4.0cm、高さ3.0cmの筒に銅線を43回巻きつけたものを使用した。また、金属シールド内にコイルを設置することで、環境ノイズの低減に努めた。FIDシーケンスによる計測では、中心周波数1MHzの励起パルスを用い、パルス幅を30 μ s、オフセットを450 μ s、休止時間を1.2sに設定した。また、S/N比を向上させるために2000回の積算を行った。

計測の結果、1.006MHzで信号を確認することができた(Fig. 2)。計測された周波数がEdmondsらの報告1.0395MHzと一致しなかったのは、計測環境によって分子中の電場勾配が微小に異なるためと考えられる。

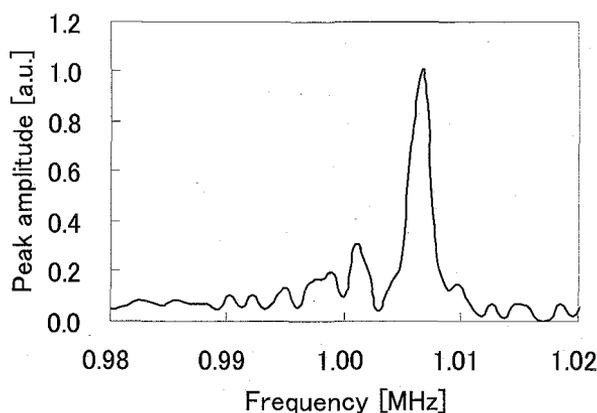


Fig. 2 ^{14}N NQR spectrum of diethylamine hydrochloride

T_1 と T_2^* について、反転回復法($(\pi)_0-t-(\pi/2)_0-$)およびFID信号の減衰により評価を行ったところ、 $T_1=1.1\text{s}$ (Fig. 3)および $T_2^*=1.8\text{ms}$ (Fig. 4)を得た。

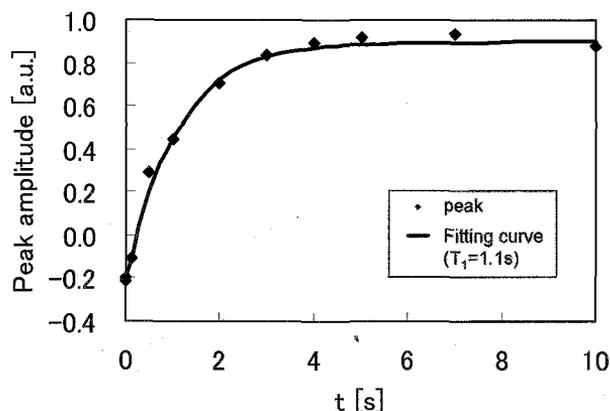


Fig. 3 Inversion recovery curve of ^{14}N NQR signal from diethylamine hydrochloride

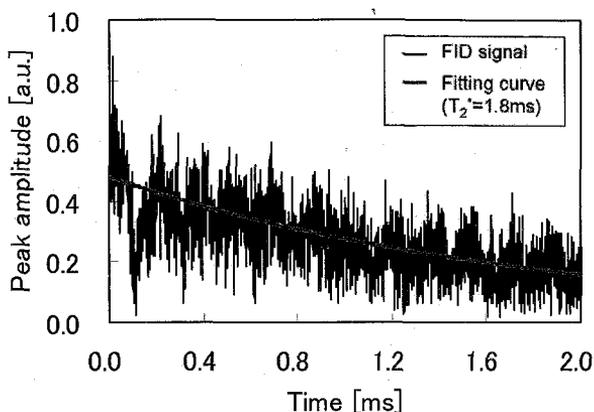


Fig. 4 FID signal of diethylamine
A line shows fitting result for T_2^* .

T_1 は計測時間に影響し、 T_2^* は信号の減衰しにくさに影響する。今回の計測によって、ジエチルアミン塩酸塩は T_2^* が長いことから、励起パルスの照射後にNQR信号が減衰しにくく、信号を取得するのは容易であると考えられる。しかし、 T_1 が長いことから、励起された磁化ベクトルが緩和するのに時間がかかり、FIDシーケンスでは計測が非効率的である。よって、ジエチルアミン塩酸塩の計測では、1度の励起で複数回の積算を可能とするシーケンスが計測の効率化を図る上で有効であると考えられる。そこで、本研究ではSpin Lock Spin Echo (SLSE: $(\pi/2)_0 - (\tau - (\pi/2)_{90} - \tau)_n$)シーケンスを用いて再度計測を行い、計測の効率化に努めた。SLSEは位相が 90° 違う2種類のパルスを用いて磁化ベクトルをロックし、1度の励起で複数個のエコー信号を取得することができるシーケンスである。SLSEシーケンスによる計測において、2種類のパルスはどちらも中心周波数1MHz、パルス幅 $30\mu\text{s}$ とした。オフセットは $70\mu\text{s}$ 、休止時間は1.2sに設定し、パルス間隔 τ は $550\mu\text{s}$ とした。1回の励起で信号取得を16回行い、励起は2000回としたので、積算回数は32000回となった。これにより、計測時間がFID使用時と同じになった。計測の結果をFig. 5に示す。なお、Fig. 5の縦軸はFig. 2と同様のレンジとなるように規格化した。

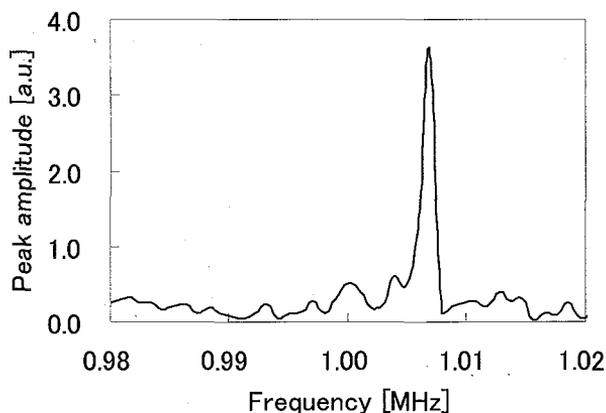


Fig. 5 ^{14}N NQR spectrum of diethylamine hydrochloride
measured with SLSE sequence

Fig. 2とFig. 5を比較すると、同じ計測時間内でSLSEシーケンスによって得られたNQR信号強度は、FIDシーケンスによって得られたNQR信号強度の約4倍となっている。これより、本研究のSLSEシーケンスを用いた計測はFIDシーケンスを用いた計測に比べて信号取得の効率が良いと考えられる。

3. シミュレーション

量子化学計算によるNQR共鳴周波数のシミュレーションでは、Gaussian03によって分子構造の最適化を行った後、電場勾配テンソルを計算し、NQR共鳴周波数を予測する。本研究では ^{14}N 原子核のNQRを用いるため、 ^{14}N 分子周辺の分子構造が類似していれば、シミュレーションによる予測誤差は同程度になると考えられる。本研究では、シミュレーションの計算方法に摂動法と密度汎関数法を用いてジエチルアミン塩酸塩NQR周波数を計算し、実測値との計算誤差を検討した。シミュレーション方法によってジエチルアミン塩酸塩の計算誤差に大きな差は見られず、最も精度良い結果でもBHandHLYPによる予測誤差52%と、一様に大きな誤差が出てしまった。これは、分子の集合体をサンプルとして計測を行っているのに対し、シミュレーションでは分子1個に焦点を当てているため、結晶内での分子構造が精度よく定められていないことが原因であると考えられる。

4. 結論

本研究を通して、ジエチルアミン塩酸塩のNQR信号を1.006MHzで確認することができた。また、ジエチルアミン塩酸塩の緩和時間についても、 $T_1=1.1\text{ s}$ および $T_2^*=1.8\text{ ms}$ であることを評価することができた。

Reference

- (1) D. T. EDMONDS, M. J. HUNT, AND A. L. MACKAY : " Pure Quadrupole Resonance of ^{14}N in a Tetrahedral Environment" , JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE 9, p. 66-74 (1973)

タイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) 由来 オリクチンの溶液NMR構造解析・機能解析

○堀田彰一朗¹, 石橋純², 永田宏次¹, 宮川拓也¹, 山川稔^{2,3}, 田之倉優¹

¹東大・院・農生科

²生物研・生体防御

³筑波大・院・生命環境科学

NMR structure analysis of ORYCTIN from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*, led to its functional characterization as a novel serine protease inhibitor

○ Shoichiro Horita¹, Jun Ishibashi², Koji Nagata¹, Takuya Miyakawa¹, Minoru Yamakawa^{2,3} and Masaru Tanokura¹

¹Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Japan.

²National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.

³Graduate School of Life and Environmental Biology, University of Tsukuba, Japan.

Oryctin was isolated from the hemolymph of the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*, in a process of searching for antibacterial peptides. However, the function of oryctin remains unknown. We have determined the three-dimensional structure of oryctin and revealed that it adopts a fold similar to Kazal-type serine protease inhibitors. The functional assays have shown that oryctin indeed inhibits chymotrypsin- α and elastase. The binding regions of oryctin to chymotrypsin- α and elastase have been identified based on the chemical shift perturbation.

序論

タイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) の幼虫は、家畜糞尿などの堆肥中で成長し、細菌・ウイルス・カビ等の微生物の感染を受けやすい環境下に生息するため、各種微生物に対する生体防御機構が高度に発達している。オリクチンは 66 個のアミノ酸残基と 3 本のジスルフィド結合からなるタンパク質で、このタイワンカブトムシ幼虫の血リンパから精製・単離された。オリクチンに似たアミノ酸配列を有するタンパク質は他に見つかっていないため、新規の立体構造と抗菌作用機構を有すると期待された。しかし、大腸菌を宿主として得られた組換えオリクチンは天然物と同一のアミノ酸配列および同一のジスルフィド結合を有するにもかかわらずまったく抗菌活性を示さなかったため、オリクチンの機能に関する知見は再検討を余儀なくされた。オリクチンの機能解析として RNA 干渉によるオリクチン遺伝子のノックダウンが試みられているが、現在までにオリクチンの生体内機能を示唆するデータは得られていない。また、類似配列を有するタンパク質がないために、アミノ酸配列の相同性に基

Kazal-type serine protease inhibitor, ovomucoid, serine protease inhibitor

ほりたしょういちろう、いしばしじゅん、ながたこうじ、みやかわたくや、やまかわみのる、たのくらまさる

く機能推定も困難である。このような状況の下、われわれは、オリクチン分子の立体構造を決定し、立体構造の特徴や他のタンパク質との類似性から、オリクチンの機能を推定するという構造生物学的アプローチを選択した。本研究により、オリクチンがセリンプロテアーゼ阻害剤であるオボムコイドインヒビターと似た立体構造を有し、実際にセリンプロテアーゼ阻害活性を有することを明らかにした。

結果と考察

<NMR 溶液構造解析>

改変 pET-28a(+)プラスミドにオリクチン cDNA を組み込み N 末端側に TEV プロテアーゼで切除可能な 6×His タグを付加したオリクチンの発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 Star(DE3)に形質転換した。多核多次元 NMR 測定のため、 ^{13}C , ^{15}N 標識用最少培地でこの大腸菌を培養し、1 mM IPTG、37°C、6 時間発現誘導を行った。菌体破碎後、Ni-NTA Sepharose 精製、TEV プロテアーゼ消化、Mono S 精製し、濃縮・緩衝液交換により、50 mM NaPi (pH 6.8), 100 mM NaCl, 0.02% NaN_3 を含む 90% H_2O , 10% D_2O に溶解した 2 mM ^{13}C , ^{15}N 標識オリクチン試料を得た。この試料を用いて多核 2 次元 NMR および種々の 3 次元 NMR を測定し、観測可能なほぼすべての ^1H , ^{13}C , ^{15}N 原子の NMR シグナルを帰属した。NMR データに基づき得られた水素原子間距離制限 573 個、主鎖二面角制限 79 個、水素結合距離制限 3 個を構造情報として CYANA プログラムに入力し、オリクチンの立体構造を算出した。最終構造 10 個のアンサンブルにおいて、主鎖原子と水素を除く全原子の RMSD はそれぞれ 0.78 Å と 1.44 Å であった。

<立体構造類似タンパク質の探索>

Dali サーバー (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/) を用いた立体構造類似タンパク質の探索の結果、セリンプロテアーゼの一種である七面鳥由来オボムコイドインヒビター OMTKY3 との立体構造類似性 (Z 値は 2.4) が検出された。

<プロテアーゼ阻害活性測定>

オリクチンが OMTKY3 と同様にプロテアーゼ阻害活性を有するかどうか、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、メタロプロテアーゼの 3 種に対する阻害活性測定を行ったところ、オリクチンはセリンプロテアーゼに対してのみ阻害活性を有することを見出した。セリンプロテアーゼの種類により阻害の程度は異なり、オリクチンは α -キモトリプシンを強く阻害 ($K_i = 6.9 \pm 0.7 \times 10^{-9}$ M)、エラスターゼを中程度に阻害する ($K_i = 2.7 \pm 0.2 \times 10^{-7}$ M) が、トリプシンに対しては全く阻害しないことを明らかにした。

<化学シフト擾動法による相互作用部位の解析>

オリクチン分子のプロテアーゼ認識に関わっている領域を調べるため、オリクチンのみとオリクチン + α -キモトリプシンまたはエラスターゼとで化学シフトを比較し、化学シフトの変化量から相互作用部位を解析した。結果、オリクチンは両方のセリンプロテアーゼを共通する 3 つの領域で認識すると示唆された。

<総括>

本研究により、機能未知であったオリクチンの立体構造を決定し、オリクチンが新規セリンプロテアーゼ阻害剤であることを見出した。今後 RNAi 等の実験を通し、PPO 活性化系、血液凝固系に関して関連を調べる。

アサイメントフリーなNMR相互作用解析による蛋白質複合体構造の迅速決定

○小玉優哉^{1, 2, 3}, Michael L. Reese⁴, 榛葉信久², Volker Dötsch⁵, 鈴木榮一郎², 嶋田一夫^{3, 6}, 高橋栄夫³

¹バイオ産業情報化コンソーシアム, ²味の素(株), ³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, ⁴Stanford University, ⁵University of Frankfurt, ⁶東大・院薬系

Rapid determination of protein complex structure by assignment-free NMR approach

○Yuya Kodama^{1, 2, 3}, Michael L. Reese⁴, Nobuhisa Shimba², Volker Dötsch⁵, Ei-ichiro Suzuki², Ichio Shimada^{3, 6}, and Hideo Takahashi³

¹Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), ²Ajinomoto Co., Inc., ³Biomedical Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), ⁴Stanford University, ⁵University of Frankfurt, ⁶The University of Tokyo

To obtain the information about protein-protein interfaces by NMR, the resonance assignments are generally essential, but are a time-consuming task, especially for a large protein. In this study, we present an effective and rapid approach for identification of the protein-protein interface, where we record only a few NMR spectra of a protein labeled with a unique combination of a single ¹⁵N-labeled amino acid and several site-specifically ¹³C-labeled amino acids to obtain the information about the amino acid types and number of the contact residues and then we search the molecular surface to satisfy the obtained information by computation. When the candidates are very limited, we can identify the contact residues. We also demonstrate that the information obtained by our assignment-free NMR approach is useful for rapid protein-protein docking study.

蛋白質間相互作用は、生体の代謝やシグナル伝達をはじめとした種々の現象に関与していることから、相互作用界面に関する情報を迅速に得ることは、創薬研究などを効率的に展開していく上で極めて重要となる。しかしながら、それらの情報を得るためには、例えばX線結晶構造解析においては結晶化の作業、NMR解析においてはNMRシグナルを帰属するための測定、解析作業が必要となり、多大な時間と労力を要することになる。そこで、我々は、対象とする個々の蛋白質の立体構造が既知であれば、NMRシグナルを帰属することなく、複合体の相互作用部位を迅速に同定できる手法の開発に取り組んだ。¹H-¹³C相関スペクトル上におけるシグナル分布は、各アミノ酸残基の原子タイプ [¹³C_x (x=α, β, γ, …)] ごとに局在している。したがって、シグナルが出現する範囲が重ならないような安定同位体標識アミノ酸を複数選び、それらで標識

蛋白質間相互作用, 部位特異的安定同位体標識, ドッキングシミュレーション

○こだまゆうや, まいけるりーす, しんばのぶひさ, ふおるかーどっち, すずきえい
いちろう, しまだいちお, たかはしひでお

蛋白質を調製するならば、シグナルの化学シフト値から、アミノ酸の種類を同定することができる。さらに、この試料を用いて相互作用実験を行うならば、相互作用界面に存在するアミノ酸の種類と個数を知ることができる。蛋白質の表面において、観測対象の各アミノ酸に関するこの実験結果を最もよく満たす箇所が、相互作用界面である。ゆえに、立体構造が既知であれば、実験結果とアミノ酸残基の位置関係を基に、相互作用界面を形成するアミノ酸残基の特定が可能となる。我々はそのための解析用ソフトウェアを開発し、化学シフト変化が起きたシグナルの個数と立体構造情報から、相互作用界面を形成するアミノ酸残基を自動で決定できるようにした。このようにして、NMRシグナルを帰属することなく、1つのサンプルに対する実験結果から、極めて迅速に相互作用界面を同定することが可能となった。さらに、本手法により得られる相互作用界面の情報を拘束条件としてドッキングシミュレーションを行うことにより、複合体のモデル構造を迅速に構築することが可能である。

本研究では、複合体の立体構造が既知である、分子量26.4 kのyeast ubiquitin hydrolase (YUH)と8.6 kのyeast ubiquitin(Y-Ub)を用いて、本手法が正しく機能することを実証した。まず、部位特異的に標識されたYUHへY-Ubを滴定し、滴定前後のNMRスペクトルから、化学シフト変化が起きたシグナルの個数を得た。この実験結果を解析用ソフトウェアで処理することで、Fig. 1に示すように、相互作用界面を構成するアミノ酸残基の同定に成功した。さらに、得られた界面情報を基に、HADDOCK (*J. Am. Chem. Soc.*, 125, 1731-1737 (2003))を用いてYUH-ubiquitin複合体構造の再構築を試みたところ、fraction of native contacts \geq 0.3、ligand RMSD \leq 5.0 Åの精度で複合体構造の再構築に成功した (Fig. 2)。実験結果に基づく複合体モデル構造を迅速に構築できることから、例えば構造情報に基づく創薬の初期段階などにおいて、今回示すストラテジーは有用であると考えられる。

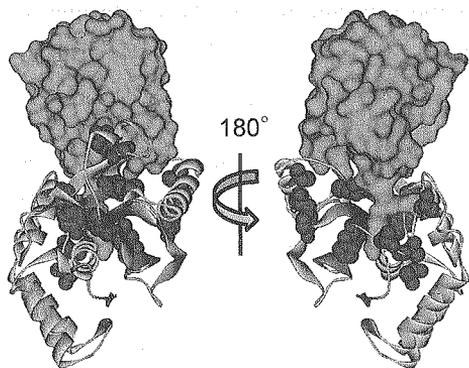


Fig. 1 The complex structure of YUH and ubiquitin, depicted as ribbon and surface representation, respectively (PDB code: 1CMX). The residues at the interaction surface of YUH, determined by our method, are depicted as CPK models.

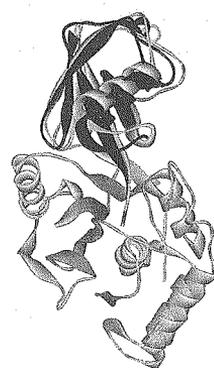


Fig. 2 The structure of YUH-ubiquitin complex predicted by using HADDOCK (black ribbon) is superimposed onto the crystal structure of the complex (gray ribbon) by YUH. The predicted structure of YUH is not shown for clarity.

リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の立体構造と運動性

○加藤 信幸¹, 島本 茂^{1,2}, 圓尾 廣子¹, 吉田 卓也¹, 乾 隆³, 宮本 優也^{2,3}, 小林 祐次⁵, 藤森 功^{4,5}, 鶴村 俊治⁴, 有竹 浩介⁴, 裏出 良博⁴, 大久保 忠恭¹

¹大阪大学大学院薬学研究科,²(独)学振特別研究員DC,³大阪府立大学大学院,⁴大阪バイオサイエンス研究所,⁵大阪薬科大学

Structure and Dynamics of Lipocalin-type Prostaglandin D synthase

○Nobuyuki Kato¹, Shigeru Shimamoto^{1,2}, Hiroko Maruo¹, Takuya Yoshida¹, Takashi Inui³, Yuya Miyamoto^{2,3}, Yuji Kobayashi⁵, Ko Fujimori^{4,5}, Toshiharu Tsurumura⁴, Kosuke Aritake⁴, Yoshihiro Urade⁴ and Tadayasu Ohkubo¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University, ²JSPS Res. Fellow, ³Graduate School of Biological Science, Osaka Prefecture University, ⁴Department of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute, ⁵Osaka University of Pharmaceutical Science

Abstract

Lipocalin-type prostaglandin (PG) D synthase (L-PGDS) possesses dual functions as a PGD₂-synthesizing enzyme and a transporter for lipophilic ligands. It catalyzes the isomerization of PGH₂ to produce PGD₂, an endogenous somnogen, in the brain. L-PGDS also has the ability to bind various lipophilic molecules such as retinoid, bilirubin, and biliverdin. Recently, we have determined the solution structure of L-PGDS - U-46619, substrate analog complex by NMR and revealed that the U-46619 binds to the upper end of the cavity. Comparison of complex structure with free form L-PGDS structure revealed that H2-helix and EF-loop located at the upper end of the β-barrel change the conformation to cover the entry of the cavity upon U-46619 binding.

【序論】

リポカリン型プロスタグランジン(PG)D合成酵素(L-PGDS, Fig.1)は、哺乳類の脳内に豊富に存在し、PGH₂から睡眠誘発に関与するPGD₂を産生する酵素であるとともに、レチノイドやビリルビン、ビリベルジンなどの大きさ、形状の異なる疎水性低分子のスカベンジャーとしての役割も担う多機能蛋白質である¹⁾。これまでの溶液NMR法による立体構造解析から、βバレル構造の内部にL-PGDSの所属するリポカリンファミリーの中でも特に大きな疎水性cavityを持ち、このことが大きさも化学構造も異なる様々な疎水性低分子との結合を可能にしていることが明らかとなった²⁾。さらに、βバレル内の疎水性cavityの上部に位置するEF-loopとリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素, プロスタグランジン, 溶液 NMR

○かとう のぶゆき, しまもと しげる, まるお ひろこ, よしだ たくや, いぬい たかし, みやもと ゆうや, こばやし ゆうじ, ふじもり こう, つるむら としはる, ありたけ こうすけ, うらで よしひろ, おおくぼ ただやす

H2-helixの立体構造変化がリガンド結合に重要であることが示唆された。

【実験】

大腸菌を用いた大量発現系で培地の栄養源に安定同位体化合物を用い ^{13}C 、 ^{15}N ラベルしたL-PGDSを調製した。L-PGDS単独、L-PGDS・U-46619複合体、およびP110A変異体についてHNCACBおよびCBCA(CO)NHを用いて主鎖帰属を、 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE、 T_1 、 T_2 緩和時間測定から主鎖の運動性の解析を行った。

【結果および考察】

我々は、溶液NMR法を用いてL-PGDSと反応基質 PGH_2 の安定誘導體であるU-46619(Fig.2)の複合体構造を用いて決定し、U-46619がcavityの上部に結合することを明らかにした。さらにL-PGDSとU-46619複合体の構造を比較し、U-46619が結合する際にcavity上部に位置するEF-loopおよびH2-helixがU-46619を覆うように変化することが明らかとなった。(Fig.3)

構造変化の果たす役割を明らかにするため、L-PGDS、L-PGDS・U-46619複合体、および不活性型変異体L-PGDS P110Aの立体構造解析および緩和時間の測定等により運動性の解明を行った。 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE、 T_1 、 T_2 緩和時間測定からL-PGDS単体では β バレル領域に比べて、cavity上部の開口している領域の運動性が高いことが明らかとなった。また、L-PGDSとU-46619複合体を比較して、特にEF-loopおよび H_2 -helix領域の緩和時間に差があり、 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOEにおいて H_2 -helix、CD-loop、EF-loop、GH-loopにおいて高い値が示されたことから、U-46619結合によってcavity上部の運動性が低下したと考えられた。これらのことから、リガンド結合に際して、cavity上部に位置しているEF-loopおよび H_2 -helix領域の運動が重要であると考えられる。さらに現在、不活性型変異体であるP110A変異体の緩和時間測定を行い、変異がこの領域の運動性に与える影響を解析中である。

【文献】

¹⁾Inui T., et al. J.Biol.Chem.,278,2845-2852,(2003)

²⁾Shimamoto S., et al. J.Biol.Chem.,282,31373-31379,(2007)

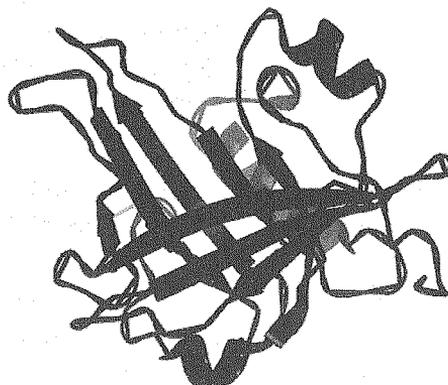


Fig.1 NMR solution structure of lipocalin-type prostaglandin D synthase (PDB ID:2E4J)

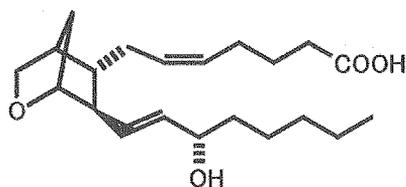


Fig.2 Chemical formula of U-46619

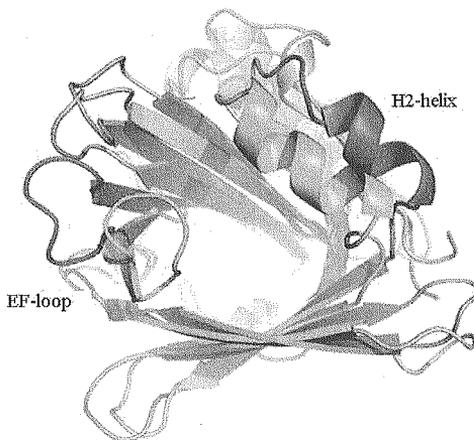


Fig.3 Superposition of free form of L-PGDS and L-PGDS-U-46619 complex

分子シャペロンカプセル化システムの構築

○増原泰英¹, 田中慎治¹, 河田康志², 松崎勝巳¹, 星野大¹¹京都大学大学院薬学研究科²鳥取大学大学院工学研究科・医学研究科**Construction of the Chaperonin Encapsulation System**○Yasuhide Masuhara¹, Shinji Tanaka¹, Yasushi Kawata², Katsumi Matsuzaki¹, Masaru Hoshino¹¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan² Graduate School of Engineering, Tottori University, Graduate School of Medical Science, Tottori University, Tottori, Japan

To analyze a protein with strong tendency of aggregation by high-resolution solution NMR, the novel chaperonin encapsulation system was developed. GroEL and GroES in *Escherichia coli*, also known as chaperonin, temporarily form a large complex to sequester a substrate protein in its hydrophilic space. Using an ATPase deficient mutant of GroEL, SR398 and a 12-residue GroEL-binding peptide, SBP, we succeeded to record a ¹H,¹⁵N-HSQC spectrum of ubiquitin which was encapsulated in SR398/GroES cavity. Although the spectrum in complex corresponded well to that in solution, linewidth of each resonance peak was found to be broadened by two fold, indicating a restriction of mobility of ubiquitin probably due to the interaction through hydrophobic SBP tag sequence. To further improve the system, a removable SBP-tag sequence was designed.

【序論】溶液高分解能 NMR は、水溶液中におけるタンパク質の立体構造、ならびにその運動性を解析する手法として、今日の構造生物学において重要な役割を果たしている。しかし、測定に必要とされる高濃度のタンパク質存在下においては、測定タンパク質の非特異的な凝集や、化学交換などに起因するみかけの分子量の増大により、シグナルのブロードニングが起り、解析が困難、あるいは不可能になってしまうことが少なくない。この問題を克服するためには、測定タンパク質を1分子ずつ物理的に隔離し、非特異的な分子間相互作用を抑制することが最も有効であると考えられる。

そこで本研究では、大腸菌の分子シャペロン GroEL/GroES 複合体に着目した。GroEL/GroES 複合体は巨大な親水性の空洞を形成し、その内部に基質タンパク質を隔離する特徴を持つ (Fig. 1A)。この中に目的タンパク質を封入することを考えた。Fig. 1A の反応機構中に形成される GroEL, GroES, 基質タンパク質からなる三重複合体を安定に保つことにより、内部のタンパク質の会合を効率的に抑制することが可能であると考えられる。そこで、GroES と安定な複合体を形成することが知られてい

Molecular chaperone, Aggregation prone protein, Solution NMR

○まずはらやすひで, たなかしんじ, かわたやすし, まつざきかつみ, ほしのまさる

る SR398 (Single Ring D398A) 変異型 GroEL を用いた。

GroEL は変性タンパク質を特異的に認識・結合する。任意のタンパク質を天然状態を保持したまま SR398 に結合させるため、GroEL に高い親和性で結合する 12 残基のペプチド配列 (SBP, Table1) を測定タンパク質に付加することを考えた (Fig. 1B)。測定タンパク質のモデルとして、溶液 NMR での解析が十分にされているユビキチン (Ubq) を用いた (Table1)。

¹⁵N 標識 Ubq-SBP を用いて、SR398/GroES 複体内に安定に封入し、その 15N-HSQC スペクトルを獲得した。その結果、複合体中でのスペクトルは溶液中単体のものとよく一致し、ユビキチンの高次構造が保持されていることが明らかになった。その一方で各共鳴シグナルの線幅は 2 倍程度増大し、複合体内部での運動性が抑制されていることが示唆された。

【方法・結果】 Ubq の溶液中の高次構造は、シャペロン複合体の内部空洞より十分小さいため、複合体中でも十分な分解能で NMR 測定できると考えられる (Fig. 2)。それゆえ運動性低下の原因として、疎水性の高い SBP が GroEL の基質認識部位、あるいは内部空洞の内壁と相互作用している可能性が考えられた。上記の考察を基に、複合体中での運動性を改善するため、またより天然に近い配列で測定タンパク質を解析するため、SR398/GroES 複体に封入後、測定タンパク質から SBP を取り除くシステムの開発に臨んだ。

封入後に SBP を取り除くため、SBP と測定タンパク質 Ubq の双方に Cys を導入し (SBP-C, Ubq-C)、ジスルフィド結合で両者を繋げて (Ubq-CC-SBP) SR398/GroES 複体中に隔離した後、還元剤で結合を切断することを試みた (Fig. 1B)。

大腸菌株 BL21 (DE3) pLysS を用いて、¹⁵N 標識した Ubq-C を作製した。一方、SBP-C は Fmoc 固相合成法により作製し、逆相 HPLC を用いて精製した。その後、SBP-C をジチオピリジンにより修飾し、SBP-C のチオピリジン体を精製した。チオピリジン体は遊離チオール基を選択的に求核攻撃するため、SBP-C のチオピリジン体を Ubq-C と反応させることで、高収率で Ubq-CC-SBP を得た。現在、得られた Ubq-CC-SBP を用いて、SR398/GroES との複合体を作製し、その NMR スペクトルの取得・解析を行っている。

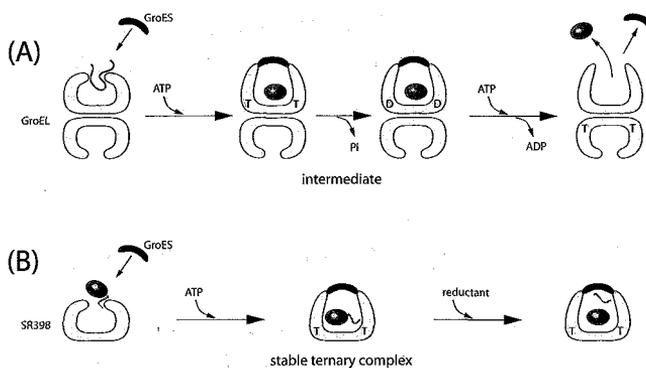


Fig. 1 (A) Reaction cycle of GroEL and GroES. (B) Chaperonin encapsulation system.

Table1 Sequences of model substrate proteins.

| Abbreviation | Sequence |
|--------------|---|
| SBP | SWMITTPWGFLHP |
| Ubq-SBP | Ubq-SHHHHHHC-GGG-SWMITTPWGFLHP |
| Ubq-CC-SBP | Ubq-C-HHHHHH (Ubq-C) C-GGG-SWMITTPWGFLHP (SBP-C) |

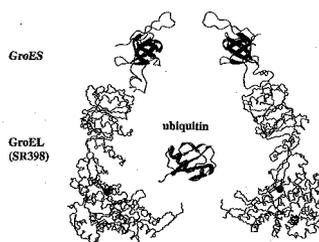


Fig. 2 Structural model of the ternary complex.

化学交換を利用したアミロイドβタンパク質の過渡的オリゴマー会合体の検出

○山口貴宏¹, 松崎勝巳¹, 星野大¹

¹京大院薬

Transient oligomeric states of amyloid-β protein revealed by chemical exchange

○Takahiro Yamaguchi¹, Katsumi Matsuzaki, and Masaru Hoshino¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan.

The aggregation and fibril formation of amyloid β-protein (Aβ) are the hallmarks of Alzheimer's disease. Aβ is supposed to self-associate with each other and form nucleus through conformational change. Although nucleation is a critical step in the aggregation of Aβ, detailed mechanism is unknown because of its transient nature.

The peak intensity of an NMR signal depends on molecular motion, and is, in principle, expected to increase with temperature. By analyzing ¹H-¹⁵N and ¹H-¹³C HSQC spectra of Aβ-(1-40) in detail, however, we found that the signal intensity decreased with increasing temperature. These results suggest the presence of a chemical exchange, in which soluble Aβ may self-associate with each other, forming short-lived oligomers which rapidly dissociate into monomers.

【序論】

アルツハイマー病患者脳においてアミロイドβタンパク質(Aβ)の線維状凝集体(アミロイド線維)の沈着が見られる。アミロイド線維の形成機構として重合核依存性重合モデルが提唱されている。同モデルによると線維形成は凝集核形成過程と線維伸長過程に分けられる。凝集核は可溶性モノマー数分子が会合し、コンホメーション変化を伴って形成されると考えられるが、その過程は非常にエネルギー障壁が高く、自発的な凝集核の形成は極めて起こりにくい。一方、ひとたび凝集核が形成されると可溶性モノマーの凝集核への速やかな結合が進行する。アミロイド線維形成において凝集核の形成が律速であるが、凝集核は過渡的にしか存在しないため、その構造、及び形成機構の詳細は不明である。

一般に溶液NMRのシグナル強度は分子の回転相関時間に依存するため温度上昇に伴い増加する。ところが、Aβを様々な条件下で測定したところ、そのピーク強度は温度上昇に伴い減少することが分かった。¹H-¹⁵N 並びに¹H-¹³C HSQCスペクトルを詳細に解析した結果、可溶性モノマーと過渡的に形成されるオリゴマーとの間に化学交換が存在することが示唆された。

アミロイドβタンパク質, オリゴマー, 化学交換

○やまぐちたかひろ, まつざきかつみ, ほしのまさる

【実験】

^{15}N -A β -(1-40)、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -A β -(1-40) をそれぞれ90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O 、100% D_2O のリン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、それぞれ ^1H - ^{15}N 、 ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを様々な温度のもと測定した。HNCACB、HN(COCA)HA、HCCH-TOCSYにより各ピークの帰属を行った。

【結果と考察】

^{15}N -A β -(1-40)を用いて4°C、及び25°Cにおいて ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを測定した (Fig. 1)。その結果、25°Cにおいて著しいピーク強度の減少が観測された。ピーク強度の減少は可逆的であり、25°Cでの測定後、再び4°Cで測定を行うと、はじめに測定したときと同じピーク強度を示した。よって、25°Cにおけるピーク強度の減少はA β の不可逆な凝集によるものではないことが分かった。一般に溶液NMRのシグナル強度は分子の回転相関時間に依存するため温度上昇に伴い増加する。A β においてはこの逆の現象が見られたが、その原因の一つとして易動性のアミド水素と溶媒である水との交換速度の増加が挙げられる。そこで、非易動性水素核を指標として同様の測定を試みた。重水中で ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを測定し、 $^1\text{H}\alpha$ - $^{13}\text{C}\alpha$ の共鳴ピーク強度の温度依存性を解析した結果、 ^{15}N の場合と同様に温度上昇に伴いピーク強度の減少が見られた (Fig. 2)。

これらの結果により、温度上昇に伴うピーク強度減少の要因として、水との交換の他に化学交換の寄与が示唆される。化学交換に関する詳細は現段階では不明であるが、以下のように考察している。すなわち、水溶液中でA β モノマーは互いに会合しオリゴマーを形成するが、そのオリゴマーは過渡的で素早くモノマーに解離し、モノマー-オリゴマー間で平衡にある可能性が考えられる。これらの過渡的に形成されるオリゴマーが何らかの機構により安定化されることによりアミロイド線維形成の凝集核へと転移するのではないかと考えられる。

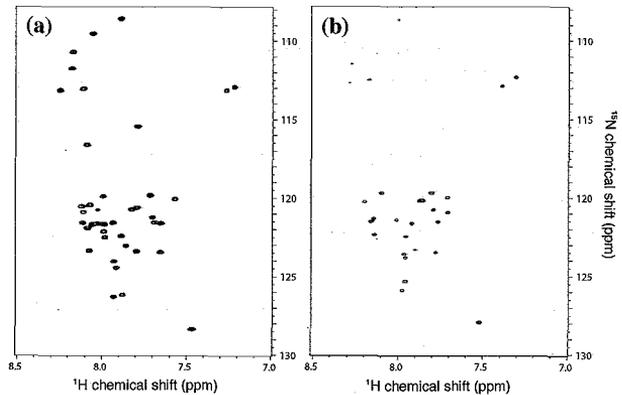


Fig. 1 ^1H - ^{15}N HSQC spectra of A β -(1-40) at 4°C (a) and 25°C (b).

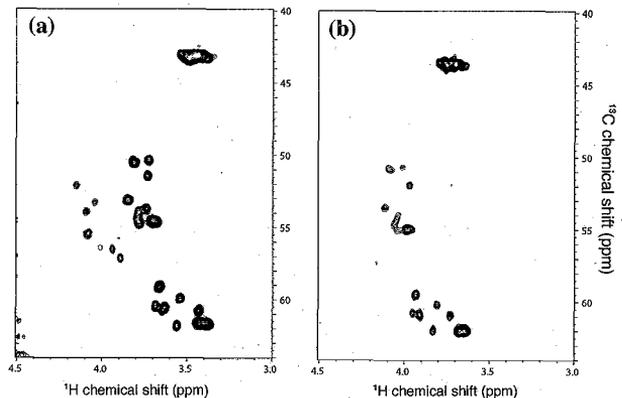


Fig. 2 $\text{H}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ region of ^1H - ^{13}C HSQC spectra of A β -(1-40) at 4°C (a) and 25°C (b).

オキシステロール結合タンパク質OSBPのdisorder領域と小胞体膜貫通タンパク質VAP-Aとの複合体形成機構

○古板恭子¹、Jee, JunGoo^{1,2}、深田はるみ³、三島正規^{1,4}、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首都大学東京 戦略研究センター、³大阪府立大学 生命環境科学研究科、⁴首都大学東京 理工学研究科

NMR study of a mechanism for complex formation between a disordered region of OSBP and an ER membrane protein VAP-A

○Kyoko Furuita¹, JunGoo Jee^{1,2}, Harumi Fukada³, Masaki Mishima^{1,4} and Chojiro Kojima¹
¹Graduate School of Biological Sciences, ²Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, ³Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, ⁴Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

Oxysterol binding protein (OSBP) is a cytosolic receptor of cholesterol and oxysterols, and localized to the endoplasmic reticulum (ER) by the binding to cytoplasmic major sperm protein (MSP) domain of integral ER protein VAMP-associated protein-A (VAP-A). Interaction of OSBP with VAP-A requires FFAT motif of OSBP. In order to understand the interaction between VAP-A and OSBP, we have determined solution NMR structure of the complex between VAP-A MSP domain (VAP-A_{MSP}) and OSBP fragment containing FFAT motif (OSBP_F). Most residues in FFAT motif were found to directly interact with VAP-A_{MSP}. ¹⁵N hetero NOE of OSBP_F showed that OSBP_F was disordered in the unbound state. ¹⁵N-HSQC titration experiment of VAP-A_{MSP} with OSBP_F showed that VAP-A_{MSP} and OSBP_F formed an intermediate complex.

【導入】

Oxysterol binding protein (OSBP)は、オキシステロール及びコレステロールの細胞内受容体であり、脂質の恒常性に関わることが知られている。OSBPは通常の細胞では、小胞体膜表面に局在するが、この局在には、OSBPの中ほどにあるFFATモチーフと小胞体膜貫通タンパク質VAMP-associated protein-A (VAP-A)の細胞質側にあるMajor Sperm Protein (MSP)ドメインとの相互作用が必須である。本研究では、OSBPとVAP-Aとの相互作用の詳細を明らかにするために、①VAP-A MSPドメイン(human VAP-A 5-128, VAP-A_{MSP})とFFATモチーフを含むOSBPフラグメント(human OSBP 346-379, OSBP_F)からなる複合体の立体構造解析、②OSBP_Fの運動性の解析、および③VAP-A_{MSP}とOSBP_Fを用いたNMRタイトレーション等を行った。

溶液構造 中間複合体 天然変性タンパク質

○ ふるいた きょうこ、じー じゅんぐー、ふかだ はるみ、みしま まさき、こじま ちょうじろう

【結果】

① VAP-A_{MSP}:OSBP_F複合体の立体構造解析

複合体の立体構造は、まずCYANAを用いて構造計算を行い、得られた構造をAMBERにより精密化することで決定した。得られた立体構造をFigure1に示す。VAP-A_{MSP}は7本のβストランドおよび1つのαヘリックスを含み、逆平行βシートからなる免疫グロブリン様βサンドイッチ構造を有していた。OSBP_FはFFATモチーフ部分がストランド状、そのC末端側で屈曲し、VAP-A_{MSP}のβストランドC~Fにわたって結合していた。複合体は静電的相互作用、疎水的相互作用および主鎖間の水素結合により安定化されていた。

② OSBP_Fの運動性の解析

OSBPのアミノ酸配列から、FFATモチーフを含むOSBPの中央の領域は構造を持たないと予測された。OSBP_Fに関して¹⁵N異種核NOEを測定したところ、フリーの状態では全ての残基が負のNOEを示し、フリーのOSBP_Fは構造を持たないことが示された。VAP-A_{MSP}との複合体形成時には、FFATモチーフ及びその周辺の残基は正のNOEを示し、構造が安定化することが示された。

③ NMRタイトレーション実験

¹⁵N標識VAP-A_{MSP}に対し、非標識OSBP_Fの¹⁵N-HSQCタイトレーション実験を行った。VAP-A_{MSP}のいくつかの残基は、OSBP_F混合比の増加にともない、2サイトモデル (R+L⇌RL; R, receptor; L, ligand) では説明できないピークの変化を示した。このことから、VAP-A_{MSP}とOSBP_Fは複合体形成においてなんらかの中間体を形成すると考えられた。

【考察】

以上の結果に加え、OSBP_Fの野生型及び変異体とVAP-A_{MSP}を用いたITC実験及びOSBP_F変異体を用いたNMRタイトレーション実験の結果から、OSBPはVAP-A_{MSP}との結合において、FFATモチーフとその周辺の構造を持たない領域がVAP-A_{MSP}と非特異的に相互作用して中間複合体を形成し、結合領域が構造をとることで最終的に安定な複合体に移行するという“fly-casting”経路をとると考えられる。

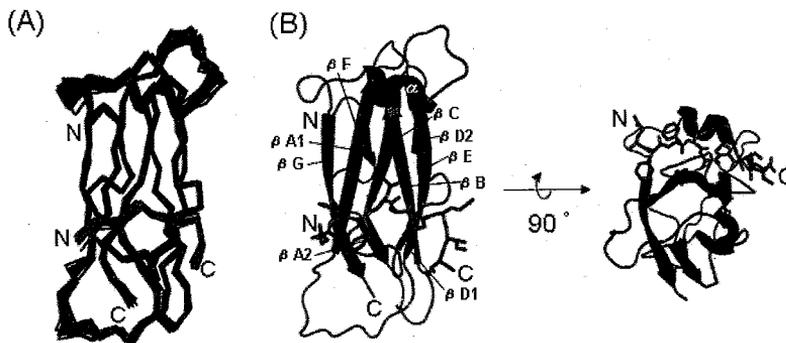


Figure 1. Solution structure of the complex between VAP-A (6-125) and OSBP (358-366). (A) Superimposed picture of 20 lowest energy structures. (B) Ribbon representation of VAP-A_{MSP}. OSBP_F is shown in stick model.

NMRに基づくマウス外分泌ペプチドESP4の解析： 受容体特異的認識機構の解明にむけて

○谷口 雅浩¹、吉永 壮佐¹、はが 紗智子²、東原 和成²、
寺沢 宏明¹

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

NMR analyses of mouse ESP4 to elucidate specific ligand-receptor recognition mechanism

○Masahiro Taniguchi¹, Sosuke Yoshinaga¹, Sachiko Haga², Kazushige Touhara²,
Hiroaki Terasawa¹

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

² Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

Pheromones are defined as chemical substances that convey informations about social and reproductive behaviours in the same species. Recently, we identified a male-specific 7 kDa peptide from the extraorbital lacrimal gland (ELG) and named the peptide exocrine gland-secreting peptide 1 (ESP1). ESP forms a new multigene family which consists of 38 genes. ESP4 is expressed in the ELG, the Harderian gland and the submaxillary gland of both male and female. The purpose in this study is to elucidate specific ligand-receptor recognition mechanism based on structural analyses. We performed solution NMR analyses and revealed that ESP4 contains α -helical structures as well as ESP1 and has also an additional α -helix at the C-terminal region. We discuss about structure-activity relationship of ESP4 and ESP1 based on NMR analyses.

【序論】

フェロモンとは、同じ種の間で、社会行動や生殖行動に影響を与える物質である。多くの哺乳動物は、鼻腔下部にある鋤鼻器官でフェロモンを感知すると考えられている。フェロモンの重要な働きとして、同種の別個体を正確に認識する役割がある。個体認識の仕組みを理解する上で、受容体がどのようにしてフェロモンを厳密に認識するかを理解することは重要であるが、特異性発現のメカニズムの理解は十分でない。

東原らは、オスマウスの涙より分泌される新規ペプチドを同定した¹⁾。このペプチドが外分泌腺に分泌されることから、ESP (exocrine gland-secreting peptide) 1と命名し、38種類からなる新規の多重遺伝子ファミリー (ESP ファミリー) を構成することを明らかにした²⁾。ESP4は、眼窩外涙腺、顎下腺、ハーダー腺に分泌されている

フェロモン、ファミリー、立体構造解析

○たにぐちまさひろ、よしながそうすけ、はがさちこ、とうはらかずしげ、
てらさわひろあき

ファミリー分子である。我々は、ESP4 と ESP1 のアミノ酸配列相同性は高いにもかかわらず、これらが異なる受容体において認識されることを示唆する結果を得ている（未発表）。本研究は、ESP4 の立体構造および受容体認識機構を解明し、構造生物学の観点から受容体認識における特異性を明らかにすることを目的とする。

【実験】

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した ESP4 を大腸菌の発現系により大量に発現させ、ニッケルアフィニティクロマトグラフィーにより粗精製を行い、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーにて精製した。精製した試料を用いて、各種の多核多次元 NMR 測定を行い、信号の帰属を行った。NMR 測定は Bruker 社製クライオプローブ付属 AVANCE600 を使い、スペクトル解析には Olivia を使用した。

【結果と考察】

大腸菌を用いて発現した結果、ESP4 は単量体とジスルフィド結合に起因する二量体を形成していた。逆相クロマトグラフィーにて単量体と二量体を分離・精製し、マウス鋤鼻器官における鋤鼻神経系刺激活性を調べたところ、単量体のみが活性を持つことが分かった。また、単量体 ESP4 による刺激を受けた細胞は、ESP1 受容体を発現している細胞とは異なることから、これらの受容体が異なることが強く示唆された。

ESP4 単量体の立体構造決定に向けて、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した ESP4 を用いて 各種の三次元測定を行い、NMR シグナルの帰属を完了した。NOESY、 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE、HNHA の各スペクトルの解析および化学シフト値に基づく二次構造解析の結果、ESP4 は C 末端領域に ESP1 には見られない α -ヘリックスを持つことが示唆された。そして、ESP4 を構成する α -ヘリックスのうち、1 本は負電荷に富んだ分子表面を、もう 1 本は正電荷に富んだ面を持つことを示唆するデータを得た。当研究室で立体構造を決定した ESP1 と比較すると、ESP4 の表面における電荷分布は、ESP1 の表面電荷分布と大きく異なることが推察された。受容体の特異的認識における、ESP4 に特徴的な C 末端領域の α -ヘリックスの存在や、分子表面の電荷分布の違いの関与を明らかにするために、ESP4 の立体構造決定に向けて NMR 解析を進めている。

【展望】

今後は、「1つのリガンドに対して受容体は1つである」というフェロモン認識における仮説³⁾を解明するために、ESP4 と ESP1 での受容体認識の差異を構造生物学的観点から明らかにしていく。

【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⁾Luo M. *et al.*, *Current Opinion in Neurobiology*, **14**, 428-434 (2004)

YP20 ピロ化アミロイドβのオリゴマー形成に関するNMR解析

○岩本 成人¹、斉藤 貴志²、河野 俊之³、西道 隆臣²、
寺沢 宏明¹

¹熊本大・院・医薬、²理研・BSI、³三菱化学生命研

NMR study of oligomerization process of pyroglutamyl amyloid beta peptides

○Shigeto Iwamoto¹, Takashi Saito², Toshiyuki Kohno³, Takaomi C. Saido²,
Hiroaki Terasawa¹

¹Facul. of Med. and Pharm. Sci., Kumamoto Univ., ²RIKEN BSI, ³Mitsubishi Kagaku Inst. Life Sciences

Amyloid beta peptides (Aβ) are thought to be neurotoxic polypeptides in Alzheimer's disease (AD), one of the most common pathology of late-onset dementia. The neurotoxicity of AD was previously thought to be caused by amyloid fibrils. However, recent physiological studies indicate that soluble Aβ oligomers, intermediate in the formation of amyloid fibrils, may be potent neurotoxin. Especially, N-terminal pyroglutamyl-Aβ is more hydrophobic, resistant to degradation, and prone to aggregation. Moreover, senile plaques in AD patients are predominantly comprised of pyroglutamyl-Aβ. The purpose of this study is to elucidate the role of pyroglutamyl-Aβ at oligomerization process. We report here the NMR analyses of Aβ peptides and discuss the molecular mechanism of oligomerization.

【背景・目的】

社会の高齢化とともに、認知症の患者数は増加の一途をたどっている。主要な認知症の一つであるアルツハイマー病（AD）は、患者数が世界で1800万人に達しており、根本的な治療法の確立が求められている。アミロイドベータペプチド（Aβ）は、AD患者の脳内に典型的病理として認められる「老人斑」の構成主体であり、老人斑は、AβがAβオリゴマー、アミロイド線維を経て細胞外に蓄積することによって生じる。従来、老人斑を形成するアミロイド線維が、ADの神経毒性の原因と考えられてきた。しかし、近年、アミロイド線維を形成する前の中間体であるAβオリゴマーが、より強い毒性を有するということが示されてきた[1]。また、Aβはアミノ末端のピロ化により、さらに毒性が強まるという報告もある[2]。ピロ化Aβは、アミノ末端の1,2番目のアミノ酸がアミノペプチダーゼによって切断され、3番目に位置するグルタミン酸の側鎖がグルタミルシクラーゼにより環化されることで生じる。さらに、老人斑を構成するAβには様々な分子種が存在するが、ピロ化Aβは健常者に比べてAD患者に多いことも知られている[3]。本研究は、毒性が強いとされるピロ化AβについてNMR解析を行い、オリゴマー形成におけるピロ化Aβの果たす役割を明らかにすることを目的とする。

キーワード：アミロイドベータペプチド、オリゴマー、ピロ化

○いわもとしげと、さいとうたかし、こうのとしゆき、さいどうたかおみ、
てらさわひろあき

【実験】

^{15}N 標識、 ^{13}C , ^{15}N 標識 A β を遺伝子組換え大腸菌を用いて大量発現させた。ニックルアフィニティークロマトグラフィーによる粗精製の後、YUH (Yeast Ubiquitin Hydrolase) によってタグ部を切断し、逆相クロマトグラフィーを用いて精製を行った。得られた安定同位体標識 A β を用いて、2次元 ^1H - ^{15}N HSQC、各種 3次元測定を行った。また、凝集能の高いピロ化 A β についても、同様に精製法を確立した。さらに、安定同位体標識したピロ化 A β を用いて、2次元 ^1H - ^{15}N HSQC 測定、各種 3次元測定による主鎖帰属を進めた。NMR 測定は、Bruker 社の 600 MHz (CRYOPROBE 付) の NMR 装置を用いて行い、スペクトル解析には NMRPipe, Olivia を使用した。

【結果・考察】

安定同位体標識した A β を大量に得るため、ユビキチン融合タンパク質として A β を大量発現できる発現系を構築した。そして、融合タンパク質として A β を発現することで、A β の凝集抑制・発現量増加を達成した。A β は、ピロ化によって、アミノ末端の電荷減少・疎水性の増大が見られ、その凝集能が増大することが知られている。そのため、変性剤である尿素を精製段階で加え、A β の凝集を抑制することができた。さらに、アミノ末端のピロ化を促進する溶液条件についても検討を行った。

各種多次元 NMR 測定の結果、Phe4 や Arg5 といったアミノ末端を除き、A β とピロ化 A β の間で、スペクトルの大きな変化は見られなかった。つまり、モノマー状態のコンフォメーションは、ピロ化の影響をほとんど受けないことが分かった。よって、A β のピロ化による毒性の原因として、電荷の消失による分子間の電荷の反発の減少や、Asp1, Ala2 の脱落に伴った、アミノ末端と疎水性の高い領域 (Lys16—Ala21) との分子内相互作用の増加が示唆された。

また、ピロ化 A β について化学シフト値に基づく二次構造予測を行ったところ、ほぼランダムコイル状態と予測されたが、疎水性コアとされる Lys16—Ala21 以外にも、アミノ末端側で β ストランド構造を取り得る可能性が示唆された。

さらに、Photo-Induced Cross-linking of Unmodified Proteins (PICUP) により [4]、A β オリゴマーを光架橋させ、NMR 測定試料と同じ濃度の試料中に A β オリゴマーが存在することを確認した。

【展望】

今後は、ピロ化によるアミノ末端の運動性への影響を、溶液 NMR を用いた緩和解析によって明らかにする。また、PICUP を用いて、A β とピロ化 A β のオリゴマー形成能の違いについて検討する。そして、各種 A β オリゴマーの中で、毒性の主因となるオリゴマーを明らかにする。さらに、*in vitro* で強い毒性を持つことが示された A β オリゴマーについて *in vivo* 実験を行い、その毒性を解析する。

【参考文献】

- [1] Hardy, J. *et al.*, *Science*, **297**, 353-356, (2002)
- [2] Saido, T.C. *et al.*, *Neuron*, **14**, 457-466, (1995)
- [3] Piccini, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 34186-34192, (2005)
- [4] Bitan, G. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 35176-35184, (2001)

ポスター発表要旨

Poster Abstracts

昆虫由来成長阻害因子GBPの寄生によるC末端残基伸長部分が活性と生体膜相互作用に与える影響

○梅津喜崇¹, 相沢智康^{1, 2}, 武藤香織³, 山本宏子¹, 神谷昌克^{1, 2}, 熊木康裕^{1, 2}, 水口峰之³, 出村誠^{1, 2}, 早川洋一⁴, 河野敬一^{1, 2}

(¹北大院・理, ²北大院・生命, ³富山大・薬, ⁴佐賀大・農)

The C-terminal Elongation of Growth-Blocking Peptide (GBP) Enhances Its Biological Activity and Micelle Binding Affinity

○Yoshitaka Umetsu¹, Tomoyasu Aizawa^{1, 2}, Kaori Muto³, Hiroko Yamamoto¹, Masakatsu Kamiya^{1, 2}, Yasuhiro Kumaki^{1, 2}, Mineyuki Mizuguchi³, Makoto Demura^{1, 2}, Yoichi Hayakawa⁴, and Keiichi Kawano^{1, 2}

¹Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo Japan.

²Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo Japan.

³Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, Toyama University, Toyama Japan

⁴Department of Applied Biological Sciences, Saga University, Saga Japan

Growth-blocking peptide (GBP) is a hormone-like peptide that suppresses the growth of the host armyworm. While 23 amino acid GBP (1-23 GBP) is expressed in nonparasitized armyworm plasma, the parasitization by wasp produces 28 amino acid GBP (1-28 GBP) through an elongation of the C-terminal amino acid sequence. In this study, we characterized the GBP variants, which consist of various lengths of the C-terminal region, by comparing their biological activities and three-dimensional structures. The results of an injection study indicate that 1-28 GBP most strongly suppresses larval growth. NMR analysis shows that the C-terminal region of 1-28 GBP undergoes a conformational transition from a random-coiled state to an α -helical state in the presence of dodecylphosphocholine (DPC) micelles. This suggests that binding of the C-terminal region would affect larval growth activity.

【緒言】

Growth-blocking peptide (GBP) は、カリヤコマコバチ *Cotesia kariyai* に寄生されたアワヨトウ *Pseudaletia separata* の幼虫から、幼虫の成長や蛹化変態を阻害する因子として発見された25残基からなるペプチドである。また、多種類の昆虫からGBPと相同性の極めて高いペプチドが発見され、その活性が幼虫に対する麻痺、心臓拍動の制御、異物を排除する血球細胞の活性化など多岐にわたることから、GBPファミリーは多機能のサイトカインであることが明らかになっている。その後の研究で、GBPはアワヨトウの遺伝子由来産物であり、未寄生の幼虫では全長23残基からなる1-23GBPが発現していること、寄生を受けた場合は感染するポリドナウイルスの影響

Growth-blocking peptide, Dodecylphosphocholine, Cytokine

○うめつよしとか、あいざわともやす、むとうかおり、やまもとひろこ、かみやまさかつ、くまきやすひろ、みずぐちみねゆき、でむらまこと、はやかわよういち、かわのけいいち

で、終止コドンがチロシンに翻訳されて28残基からなる1-28GBPとして合成されること、28残基として発現されたこのペプチドが血清中のプロテアーゼなどによって25残基(1-25GBP)まで分解を受けることが示唆されている。興味深いことに、1-28GBPは1-23、1-25GBPと比較して強い成長阻害活性を持つことが明らかになっている。しかし一方では、レセプターが完全には同定されておらず、1-28GBPが強い活性を有するメカニズムについてはわかっていない。そこで本研究では、1-28GBPがなぜ強い活性を有するのかについての分子レベルでの知見を得るために、主にNMR法による立体構造の解析から比較を行った。

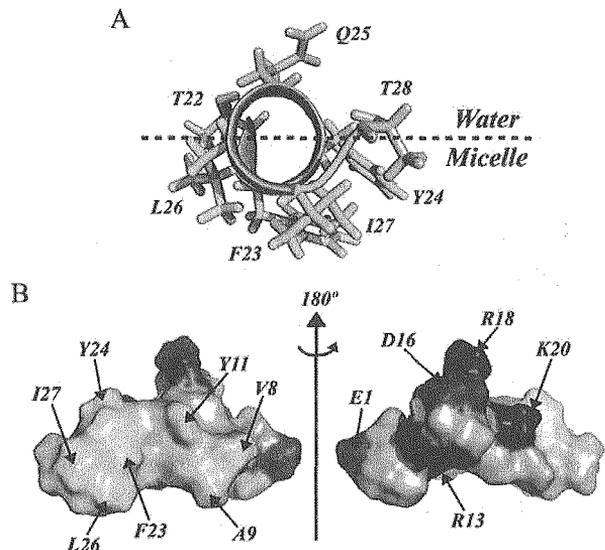
【実験】

大腸菌を用いてノンラベル、¹⁵NラベルGBPを発現・精製し、実験に使用した。Bruker DRX 500MHz, JEOL ECA 600MHzのNMR装置を用いて測定を行い、水溶液中、及びDPCミセル中における立体構造解析などを行った。

【結果と考察】

1-23、1-28GBPの立体構造解析を行った結果、N末端部分や活性に重要なβシート領域の構造に明確な違いはなく、活性の違いはフレキシブルなC末端部分が影響していることが示唆された。また、1-28GBPは生体膜と結合することが示唆されたため、生体膜モデルとして使用されるDPCミセル中での立体構造解析を行った。その結果、N末端、βシート領域の化学シフトにほとんど変化がなくこの領域の生体膜との相互作用への寄与は低いと考えられた。一方、C末端部分はDPCミセルの影響で大きく変化し、立体構造解析から、1-28GBPでは両親媒性ヘリックスを形成することが明らかになった。さらに、緩和測定やスピラベル実験などから、1-28GBPは主にこのC末端ヘリックスの疎水面において生体膜と相互作用をしていることが示唆された。これらの結果から、1-28GBPは生体膜との相互作用によりプロテアーゼなどによる分解の影響を受けにくくなること。さらに、生体膜表面にある受容体近傍でのGBP濃度が上昇するため、1-23GBPと比較して活性が強くなるメカニズムが推定された。

FIGURE. Interface between 1-28 GBP and DPC micelles. A, helical region (Thr22-Thr28) is viewed along the helical axis. B, view of the surface model of membrane-bound 1-28 GBP. The side-chains of residues Val8, Ala9, Tyr11, Phe23, Tyr24, Leu26, and Ile27 form a hydrophobic patch.



アメロジェニンの動的性質

○¹熊木康裕、²相沢智康、²神谷昌克、²出村誠、^{1,2}河野敬一
(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、³富山大学大学院医学薬学研究部)

Dynamical property of amelogenin

Yasuhiro Kumaki¹, Tomoyasu Aizawa², Masakatsu Kamiya², Makoto
Demura² and Keiichi Kawano^{1,2}

(¹Graduate School of Science, Hokkaido University, ²Graduate School of
Life Science, Hokkaido University)

Amelogenin is a major component of enamel matrix proteins. The self-assembly of the amelogenin is believed to play an essential role in regulating the growth and organization of enamel crystals during enamel formation. Recently, it was reported that the self-assembly of the amelogenin is sensitive to the temperature and pH. The elucidation of the amelogenin assembly process is indispensable for the understanding of the mechanisms of enamel formation. The purpose of the present study is to obtain the insight into the self-assembly process of the amelogenin in the atomic level. As a first step, we have completed NMR assignments of the ¹³C/¹⁵N-labeled recombinant porcine amelogenin under the condition where amelogenin is monomeric. In addition, the dynamic property such as the relaxation are being examined in several temperatures and pH's.

アメロジェニンはエナメルマトリクス蛋白質の主要な成分である。このアメロジェニンの自己凝集は、エナメル組織の形成において重要な役割を果たしていることが知られている。近年、このアメロジェニンの自己凝集は温度及び pH に依存することが報告されている^{[1],[2]}。この自己凝集プロセスの解明はエナメル組織の形成メカニズムの理解に不可欠である。

本研究の目的は、NMR によってアメロジェニン分子の自己凝集過程に関する原子レベルでの知見を得ることである。その第一段階として、¹³C 及び ¹⁵N で標識された豚由来のアメロジェニン蛋白質について、各種三重共鳴測定を行い NMR 信号の帰属を完了した。NMR の測定はアメロジェニン分子が単量体で存在すると考えられ、また比較的分離の良い ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルが得られる (Fig.1) 低温 (283 K)、及び低 pH (3.0) の条件で行った。以前からアメロジェニン単量体の構造は温度、pH、塩濃度に極めて敏感であると考えられており^[4]、また最近の報告でアメロジェニンは単量体では伸びきった構造をとっていることが示唆されている^[3]。そこで我々は現在緩和測定、重水素交換測定などの NMR 実験によって、

キーワード: アメロジェニン、自己凝集

くまきやすひろ、あいざわともやす、かみやまさかつ、でむらまこと、かわのけいいち

アメロジェニン分子の動的な性質に焦点をあて、またpH や温度といった条件が動的性質にどのように影響を与えるかについて調べている。

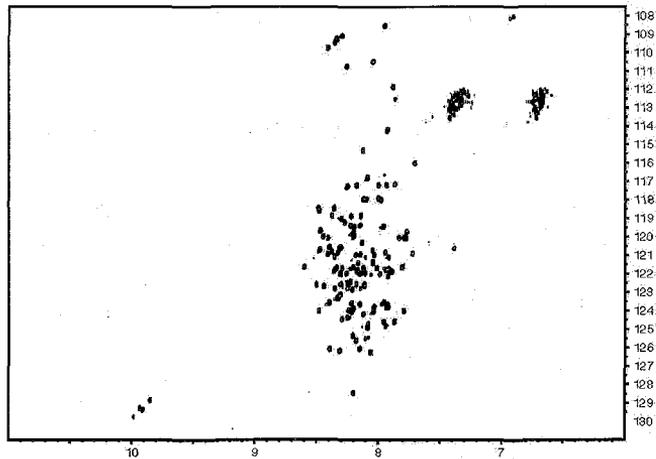


Fig.1 ^1H - ^{15}N HSQC spectra for ^{15}N -labeled recombinant porcine amelogenin at pH 3.0 and 283 K.

<参考文献>

- [1] Moradian-Oldak J, Leung W, Fincham AG. *J. Struct. Biol.* **122**:320-327, 1998.
- [2] Petta V, Moradian-Oldak J, Yannopoulos SN, Bouropoulos N. *Eur. J. Oral Sci.* **114** (Suppl. 1): 308-314, 2006.
- [3] Delak K, Harcup C, Lakshminarayanan R, Sun Z, Fan Y, Moradian-Oldak J, Evans JS. *Biochemistry*, **48**, 2272-2281, 2009.
- [4] Buchko GW, Tarasevich BJ, Bekhazi J, Snead ML, Shaw WJ. *Biochemistry*, **47**, 13215-13222, 2008.

昆虫由来新規ケモカインHCPの構造・機能解析

市橋俊¹, ○神谷昌克², 相沢智康¹, 熊木康裕¹, 菊川峰志¹, 出村誠², 早川洋一³, 河野敬一¹

¹北大院・理

²北大院・生命

³佐賀大・農

Structural and functional analysis of a novel chemokine, HCP from an insect

○Suguru Ichihashi¹, Masakatsu Kamiya², Tomoyasu Aizawa¹, Yasuhiro Kumaki¹, Takashi Kikukawa¹, Makoto Demura², Yoichi Hayakawa³, and Keiichi Kawano¹

¹Graduate School of Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

²Graduate School of Life Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

³Faculty of Agriculture, Saga University, Saga, Japan.

Insect blood cells (hemocytes) comprise an essential arm of the immune system. Several factors mediating recognition and phagocytosis of foreign intruders by hemocytes have been identified but the mechanisms regulating hemocyte movement remain fragmentary. Embryonic hemocytes from *Drosophila* migrate along stereotypical routes in response to chemotactic signals from PVF ligands: members of the platelet-derived growth factor family. Embryonic and larval hemocytes also accumulate at external wounds, but PVFs are not required for this response suggesting involvement by other, unknown factors. Here we report the identification of hemocyte chemotactic peptide (HCP) from the moth *Pseudaletia separata*, and present evidence that it stimulates aggregation and directed movement of phagocytic hemocytes. Spatio-temporal studies revealed that HCP is expressed in both epidermal cells and hemocytes, while structure-function studies identified post-translational modifications important for activity. HCP also shares similarities with another group of cytokines from moths called ENF-peptides. Taken together, our results identify HCP as a chemotactic cytokine that enhances clotting at wound sites in larvae.

我々は最近、イネの害虫であるアワヨトウの幼虫の外皮から傷口の修復に関与する分子Hemocyte chemotactic peptide (HCP)を単離・同定した (Fig. 1, 2)。HCPは32残基のペプチドであり、その主鎖構造は逆平行βシート構造とターン構造からなることがNMRによる構造解析から明らかになっている (Fig. 3)。HCPは血球細胞の凝集を促す作用を持つがその分子機構は不明である。本研究では種々のHCP変異体を作製し、分子機構の一端を明らかにすることを目的とする。本発表では、変異体の血球細胞を用いたアッセイおよびNMR解析により血球凝集活性に関する構造・活性相関を議論する予定である。

Chemokine, Innate immunity, Peptide

いちしすぐる, ○かみやまさかつ, あいざわともやす, くまきやすひろ, きくかわたかし, でむらまこと, はやかわよういち, かわのけいいち

実験

HCPは大腸菌発現系においてHisタグ、enterokinase切断認識サイトを付加したTrx融合コンストラクトを作製した。作製したコンストラクトは大腸菌BL21(DE3)株に形質転換し、IPTGにより組み換え体の発現誘導を行った。菌体破碎後の可溶性画分をNi-NTAカラムによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。enterokinaseによる酵素切断によってHisタグ、Trx部分が除去され、逆相HPLCによってHCPを精製した。最終的に凍結乾燥処理によって各種解析用のHCP試料を得た。変異体コンストラクトの作製はStratagene社 QuikChange Site-directed Mutagenesis Kitを用いて行った。

各種NMR測定はクライオプローブ付きBruker DRX500およびJEOL ECA600を用いた。構造計算にはCNS1.2を用いた。

結果と考察

大腸菌発現系によりTrx融合HCPを用いたHCPの大量調製の方法を確立した。¹⁵N、¹³C同位体ラベル化HCP試料に関するもノンラベル試料と同様な発現、精製過程で作製した。

HCPの主鎖構造はN末、C末の両末端付近の比較的フレキシブルな領域と7番目および19番目のシステイン残基の間のリジットなコア構造領域からなっている。コア構造領域は2本のβストランド間の水素結合とジスルフィド結合により安定化されている。同一種由来の非常によく似た構造をもつサイトカインGBPの構造-機能相関の解析からコア構造領域はもちろんのこと両末端も活性維持に重要であることが明らかになっている。また、HCPはコア構造のC末端側の2つのトレオニンにGlcNACが修飾し、活性に非常に重要な役割を担っていることも明らかになっており、本研究ではC末端側をトランケートした変異体を作製した。現在、血球凝集活性の測定とNMRによる構造解析を行っている。

参考文献

Nakatogawa S, Oda Y, Kamiya M, Kamijima T, Aizawa T, Clark KD, Demura M, Kawano K, Strand MR, Hayakawa Y. A novel peptide mediates aggregation and migration of hemocytes from an insect. *Curr Biol*. 2009 **19**:779-85.

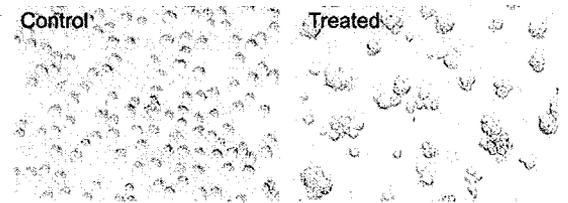


Fig. 1. Hemocyte aggregation by HCP

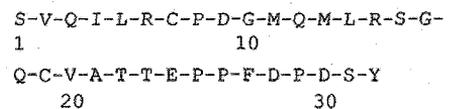


Fig. 2. Primary structure of HCP

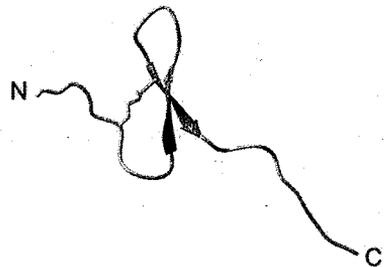


Fig. 3. NMR structure of HCP

ビッグディフェンシンのミセル相互作用と抗菌活性発現機構

河野隆英¹, 水口峰之², 相沢智康³, 出村誠³, 川畑俊一郎⁴, ○河野敬一³

¹ミネソタ大, ²富山大・薬, ³北大・理, ⁴九大・理

Big Defensin Changes Its N-Terminal Structure to Associate with the Target Membrane

Takahide Kouno¹, Mineyuki Mizuguchi², Tomoyasu Aizawa³, Makoto Demura³, Shun-ichiro Kawabata⁴, ○Keiichi Kawano³

¹*Dep Biochem Mol Biol & Biophys, Minnesota University, Minneapolis, USA.*

²*Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan.*

³*Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.*

⁴*Department of Biology, Kyushu University, Fukuoka, Japan.*

ビッグディフェンシンは 79 残基からなる抗菌ペプチドであり、N 端領域がグラム陽性菌に活性をもち、C 端領域がグラム陰性菌に活性を示す。C 端領域はヒトディフェンシンと同じ立体構造であったが、N 端領域は水溶液中で独自の構造を示した。一方、ミセル中では N 端領域は交換のため NMR 信号が観測できなかった。N 端のペプチドのみをミセル中で NMR 測定したところ、長い α -ヘリックスを形成していた。更に常磁性ラベルを用いてミセル中でのヘリックスの配向を検討し、グラム陽性菌に対するビッグディフェンシンの新しい活性発現機構を明らかにした。

We resolved the solution structure of big defensin and demonstrated that the C-terminal domain forms a β -sheet structure with three disulfide bonds just like the β -defensin structure, whereas the N-terminal domain adopts a unique globular conformation consisting of a parallel β -sheet and two α -helices (1). Intriguingly, circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) data indicated that the hydrophobic N-terminal domain undergoes a conformational change in a micellar environment, resulting in a disruption of the parallel β -sheet structure. However, the structure of big defensin bound to micelles remains to be resolved. In this study, we successfully determined the solution structure of the N-terminal fragment of big defensin in sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles and observed the association of the fragment peptide with the micelles using paramagnetic probes (2). These results provide a picture of how the N-terminal domain is used by big defensin to recognize the target cell membrane.

antimicrobial peptide, paramagnetic probe, micelle interaction

こうのたかひで, みずぐちみねゆき, あいざわともやす, でむらまこと, かわばたしゅんいちろう, ○かわのけいいち

To identify the interaction of N-terminal fragment of big defensin with SDS micelles, the effect of paramagnetic probes was estimated from two-dimensional TOCSY spectra with and without 16-Dox, Mn^{2+} ion, or Mn^{2+} and EDTA. EDTA chelates Mn^{2+} ion to form a $Mn(EDTA)^{2-}$ complex with a negative charge, thereby preventing electrostatic interactions between Mn^{2+} ions and the sulfate groups of SDS molecules. All residues were significantly affected by the addition of 16-Dox, and the signal intensity was decreased to 30% of the original level even in the cross-peak with the least attenuation. As expected, the pattern of the plot obtained by the addition of Mn^{2+} ion appears to have a complementary relationship to that obtained by the addition of 16-Dox.

In micellar systems, signal attenuation induced by 16-Dox or Mn^{2+} ion indicates that the corresponding amino acid is buried in the interior of the micelle or is exposed to solvent, respectively. In our study, the attenuation profile in the presence of 16-Dox or Mn^{2+} consistently showed that the N-terminal half of the α -helix and residues I3-I5 of big-N peptide contact SDS micelles, while the C-terminal half of the α -helix and residues A7 and T8 are exposed to solvent. Residues V13-V18, in particular, exhibited strong exclusion from Mn^{2+} ions, implying that this region is completely buried in the interior of the micelle and interacts with its hydrophobic core. Residues I3-I5 also exhibited a preference for micellar environments rather than the solvent. However, the signal attenuations of residues I3-I5 upon addition of Mn^{2+} ion were significantly smaller than those of residues V13-V18, and the cross-peaks derived from residues I3-I5 were hardly detected in the presence of Mn^{2+} ions alone. Thus, residues I3-I5 are most likely located in the micellar interface in which the sulfate groups of SDS molecules are most frequently found. Considering that the side chains of residues I3-I5 are arranged as a flat surface, it is likely that they face the hydrophobic core, whereas the backbone is located in the interface region. L20, and V21 are located on one face of the α -helix to form a surface favorable for making contacts with the hydrophobic core of the membrane. Taken together, the N-terminal half of the α -helix dips in the membrane interior through membrane preferring residues, whereas the C-terminal half is exposed to solvent (Figure 1).

(1) Kouno, T., et al., *Biochemistry* 47, 10611-10619 (2008)

(2) Kouno, T., et al., *Biochemistry* 48, 7629-7635 (2009)

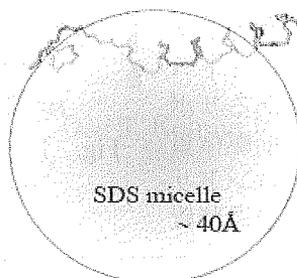


Figure 1 A model of the peptide penetrating into SDS micelle.

分子間SS結合を用いたTom20-プレ配列ペプチド複合体の安定化とその運動性

○泉桂星^{1,2}, 齊藤貴士², 神田大輔²

¹熊大・薬学部

²九大・生医研

Stabilization of Tom20-presequence peptide complexes by intermolecular disulfide bond, and investigation of their molecular motions

○Keisei Izumi^{1,2}, Takashi Saitoh², and Daisuke Kohda²

¹Faculty of pharmacy, Kumamoto University

²Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol as precursor proteins with a cleavable N-terminal presequences, and are imported into mitochondria. One of the subunits, Tom20, functions as a general protein import receptor by recognizing the presequences of proteins. It is difficult to obtain the structural information using NMR spectroscopy and X-ray crystallography due to the weak affinity of presequence peptides for Tom20.

In the previous study, we used the technique that tethered the ALDH presequence peptide onto Tom20 via an intermolecular disulfide bond by adding the linker region and a cysteine residue at the C-terminus of the peptide. In this study, we designed a peptide containing a homo-cysteine residue, which was linked to a Tom20 mutant by an intermolecular disulfide bond at the most suitable position. The result of ¹⁵N NMR relaxation analysis indicated that this complex was useful for the dynamic analysis of presequences in the bound state.

ミトコンドリアには独自のゲノムDNAが含まれているが、このミトコンドリアゲノムにコードされているタンパク質はごく少数であり、ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は核のゲノムにコードされている。これらのミトコンドリアタンパク質は細胞質にあるリボソームでプレ配列が付加された前駆体蛋白質として合成された後、ミトコンドリアの外膜及び内膜に存在する膜透過装置

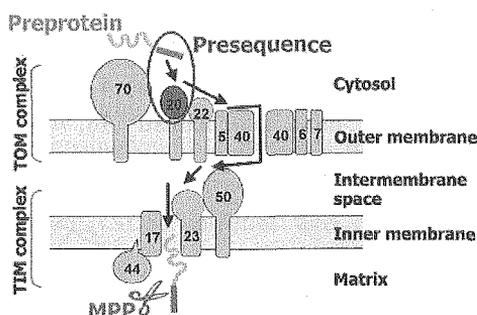


Fig. 1 Diagram of mitochondrial protein transport

キーワード：タンパク質-ペプチド相互作用、ジスルフィド結合、緩和時間解析
○いずみ けいせい、さいとう たかし、こうだ だいすけ

(タンパク質からなる超分子複合体でそれぞれTom及びTim複合体と呼ばれる)によってミトコンドリア・マトリクスへと輸送される (Fig.1)。このうちプレ配列を最初に認識する受容体がTom20である。プレ配列は15から70残基程度の長さであるがその種類は多種類存在し、Tom20はプレ配列中の5残基からなるコンセンサス配列 ($\phi\chi\chi\phi\phi$: ϕ は疎水性残基、 χ は任意のアミノ酸残基) を認識する。コンセンサス配列は配列の相同性が低く多種に及ぶため、Tom20は広い選択性を持たなくてはならない。我々はTom20によるプレ配列の認識メカニズム、特に広い選択性について分子構造を基盤とした理解を目指している。しかしTom20とプレ配列の相互作用は比較的弱い (K_d : μM オーダー) ので、そのままでは複合体の詳細な構造情報を得ることが難しい。そこで過去の研究では、ラットALDH由来プレ配列のC末端に最適な長さのリンカーとCys残基を付加したプレ配列ペプチド (GPRLSRLLSXAGC) を用いた。そして、ラットTom20とSS結合を形成させて複合体の安定化を試みた。この手法により、二つの異なる複合体 (XがAとY) を得た。この複合体のX線結晶解析とNMR緩和解析情報から「Tom20は複数の結合様式の間で速い平衡を利用してプレ配列を認識する」という認識モデルを提唱した¹。本研究ではさらに動的平衡運動の支点となっているアミノ酸 (Leu残基) の位置にホモシステイン (Homo-Cys) を導入したプレ配列 (Fig.2) とTom20との分子間SS結合による複合体の安定化を試みた。

プレ配列中のホモシステインとジスルフィド結合を形成させるため、ラットTom20のVal109をシステインに改変した (Tom20 C100S/V109C)。¹⁵N NMR 緩和

Ac-GPRLSRZLSYA-nh2 Z=Homo-Cys

Fig. 2 Design of the presequence peptide to form an intermolecular disulfide bond with Tom20

解析を行い分子の運動性を観測するために、Tom20 C100S/V109Cを¹⁵N標識し、Fig.2のプレ配列と複合体を形成させ、 T_1 、 T_2 、hetNOE測定を行った。複合体形成時の運動性についてModelFree解析した結果、分子間ジスルフィド結合によって解離が抑制された状態であるにもかかわらずTom20とプレ配列との接触面の一部にミリ秒時間尺度での運動が存在することと示唆された。よって、本研究で作製したTom20-プレ配列複合体は構造を基盤とした新たな解析に利用できると思われる。

1)Saitoh T, Igura M, Obita T, Ose T, Kojima R, Maenaka K, Endo T, Kohda D
EMBO J 26,4777-4787(2007)

(北海道大学大学院薬学研究院)

○小橋川 敬博、久米田 博之、叶 大輔、稲垣 冬彦

The NMR structure of the TC10- and Cdc42-interacting domain of CIP4

○Yoshihiro Kobashigawa, Hiroyuki Kumeta, Daisuke Kanoh, Fuyuhiko Inagaki

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Univ.)

Insulin stimulates glucose transport into striated (skeletal and cardiac) muscle and adipose tissue via the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. The vast majority of GLUT4 resides within the cell in the basal state. Activation of insulin receptors by insulin binding triggers the relocation of GLUT4 vesicles to the cell surface to enhance glucose uptake into the cells. CIP4 (Cdc42-interacting protein 4) regulates GLUT4 relocation via association with the activated Rho-family GTPase protein TC10. Here, we will show the solution structure of CIP4₃₃₂₋₄₂₅ and study the mode of interaction of CIP4₃₃₂₋₄₂₅ with both TC10 and Cdc42.

インスリンはグルコース輸送担体 GLUT4 を介して筋肉や脂肪組織へのグルコースの取り込みを誘導するペプチド性ホルモンである⁽¹⁾。GLUT4 は細胞表層と細胞質内の GLUT4 storage compartment を行き来し、Basal 状態では多くが細胞質内に存在する。インスリン刺激により細胞表層に存在する GLUT4 の割合が増え、細胞内へのグルコースの取り込み量が増加する⁽²⁾。CIP4(Cdc42-interacting protein 4)はこの過程の制御に関するタンパク質である⁽³⁾。

CIP4 は N 末端から FCH ドメイン、1st Coiled-Coil ドメイン、2nd Coiled-Coil ドメイン、SH3 ドメインにより構成される (Fig. 1)。2nd Coiled-Coil ドメインは GTPase である TC10⁽⁴⁾ および Cdc42 との結合に関り⁽⁵⁾、SH3 ドメインは Rab ファミリー GTPase の GTP/GDP nucleotide Exchange Factor (GEF) である Gapex-5 との結合に関する。Basal 状態では CIP4 は SH3 ドメインを介して Gapex-5 と結合し、細胞質内の Rab31 を活性化することで GLUT4 の細胞質への移行を促す (Fig. 2-a)。インスリン刺激により細胞膜に存在する TC10 が GTP 結合型に変換され活性化

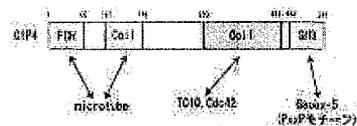


Fig.1. Schematic representation of the domain structure of CIP4.

キーワード : CIP4、GLUT4、insulin

○こばしがわ よしひろ、くめた ひろゆき、かのう だいすけ、いながき ふゆひこ

されると CIP4 は 2nd Coiled-Coil 領域を介して TC10 と結合し、細胞膜へと移行する。その際、CIP4 に SH3 を介して結合した Gapex-5 も細胞膜に移行することで Rab31 が不活性化され、GLUT4 の細胞質への移行が阻害される。これにより細胞表層の GLUT4 が増加し、Glucose が細胞内へ流入する⁽³⁾(Fig. 2-b)。また、この経路では細胞質へ移行した Gapex-5 を介して Rab5 が活性化され、それが Class III PI3K を活性化する⁽⁶⁾。Class III PI3K は macro autophagy の誘導に関ることが知られており、polyQ の除去に関ることが示されている⁽⁷⁾。そのため、CIP4 を介したインスリンシグナル伝達経路のハンチントン病を含む神経変性疾患との関りにも興味を持たれる。

本研究では CIP4 の TC10 および Cdc42 との結合機構に関する知見を得ることを目的として CIP4 の 2nd Coiled-Coil domain (CIP4₃₃₂₋₄₂₅) の溶液構造を決定した(Fig. 3)。その結果、CIP4₃₃₂₋₄₂₅ は逆平行の 2 本の α -helix からなる Coiled-Coil を形成していた。helix 間の相互作用面には I、L、V が多く存在しており、疎水性相互作用を形成していた。また、GTP 結合型の TC10 および Cdc42 との滴定実験を行ったところ、1 本目の helix の C 末端側、helix 間の loop、2 本目の helix の N 末端側に存在する残基の NMR 信号の消失が確認された。消失したピークは TC10 と Cdc42 で同一であり、これらの GTPase が CIP4₃₃₂₋₄₂₅ の同じ領域に結合することが示された。TC10 および Cdc42 と CIP4₃₃₂₋₄₂₅ の相互作用機構についても考察したので本会では報告する予定である。

References

- (1) Chang *et al.*, 2004 *Mol. Med.* **10**, 65-71.
- (2) Bryant *et al.*, 2002 *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 267-277.
- (3) Lodhi *et al.*, 2007 *Cell Metab.* **5**, 59-72.
- (4) Chang *et al.*, 2002 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12835-12840.
- (5) Aspenstrom. 1997 *Curr. Biol.* **7**, 479-487.
- (6) Lodhi *et al.*, 2008 *Mol. Biol. Cell.* **19**, 2718-2728.
- (7) Yamamoto *et al.*, 2006 *J. Cell Biol.* **172**, 719-731.

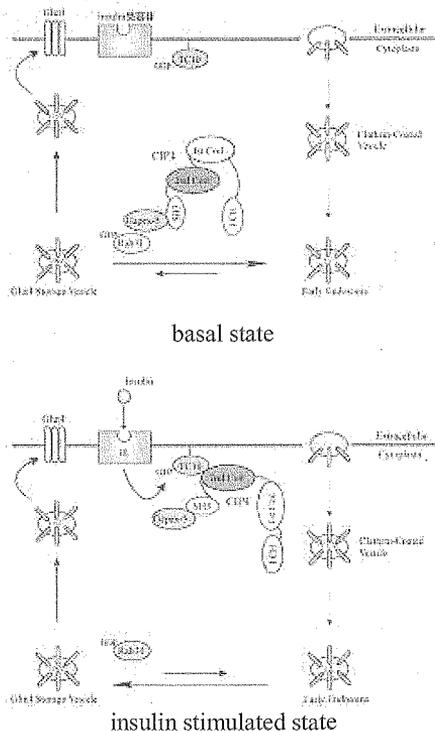


Fig.2. A schematic representation of the regulation mechanism of the translocation of Glut4.

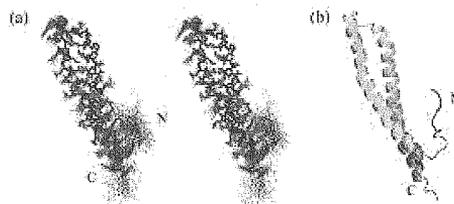


Fig. 3. Solution structure of CIP4₃₃₂₋₄₂₅. (a) Overlay of the ensemble of 20 final energy-minimized CYANA structures in stereo with heavy atoms from 339 to 421 are superimposed. The side chains are shown in blue. (b) Ribbon diagrams of the lowest energy structure. (c) Wheel analysis of the coiled-coil of CIP4₃₃₂₋₄₂₅.

呼吸鎖におけるシトクロム *c* とシトクロム *c* 酸化酵素 間電子伝達の機構解明

○野本直子¹、坂本光一¹、内田毅¹、伊藤(新澤)恭子²、吉川信也²、
石森浩一郎¹

¹北大・院理

²兵衛大院・生命理

Electron transfer mechanism between cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase

○ Naoko Nomoto¹, Koichi Sakamoto¹, Takeshi Uchida¹, Kyoko Shinzawa-Itoh²,
Shinya Yoshikawa² and Koichiro Ishimori¹

¹Faculty of Science, Hokkaido University.

²Department of Life Science, University of Hyogo.

Oxidative phosphorylation, an energy metabolism to produce ATP, is coupled with electron transfer chain carried out by a series of redox proteins. Cytochrome *c* oxidase (CcO), a mitochondrial membrane protein complex, accepts an electron from cytochrome *c* (Cyt *c*), a soluble protein with a *c*-type heme. The electron transfer from Cyt *c* to CcO is needed to be fast not to limit the overall rate of the metabolic pathway, therefore the binding constant for the complex formation is limited by high dissociation rate constant, necessary for a high turnover rate. On the other hands, the redox partners have to form a specific complex with the redox centers of the molecules in close approximation to fast electron transfer. In this study, to reveal the molecular mechanism of the fast electron transfer, we investigated the interaction mode of Cyt *c* and CcO.

【緒言】

細胞呼吸における酸化的リン酸化は、ミトコンドリア内膜上のタンパク質間の電子伝達を駆動することにより、生体に必須のエネルギーであるATPを合成する反応である。可溶性の電子キャリアータンパク質であるシトクロム *c* (Cyt *c*) から、ミトコンドリア内膜貫通タンパク質であるシトクロム

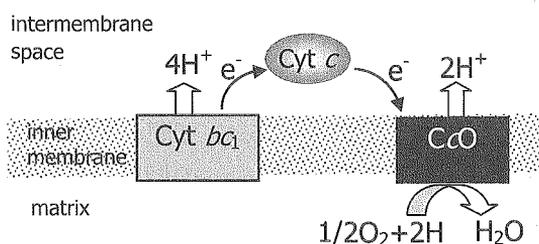


Fig.1 Schematic diagram of the electron transfer pathway around cytochrome *c* (Cyt *c*) in mitochondria.

cytochrome *c*, cytochrome *c* oxidase, electron transfer

○ のもとなおこ, さかもところいち, うちだたけし, いたう(しんざわ)きょうこ,
よしかわしんや, いしもりこういちろう

c 酸化酵素 (CcO) への電子伝達 (Fig.1) は、酸化的リン酸化の重要な制御点の1つである。CcO は酸化的リン酸化における唯一の不可逆反応を担い、その活性は還元型 Cyt *c* の供給量のみで制御されている。したがって、Cyt *c* から CcO への電子伝達は特異的かつ高効率に進行する必要がある。そこで、本研究においては、高い反応回転効率と特異性を両立する複合体形成機構を解明することを目的として、Cyt *c* と CcO の相互作用解析を行った。

【材料および方法】

安定同位体標識を施したヒト由来 Cyt *c* は、大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS を用いて大量発現させ、超音波破碎後可溶性画分より Hiprep SP 10/16 XL カラムを用いて SDS-PAGE にて単一バンドとなるまで精製した。CcO はウシ心筋から decyl-maltoside(DM) を用いて可溶化させ、酸性沈殿および硫酸沈殿を繰り返すことにより精製を行った。50 mM NaPi, pH 7.0, 0.1% DM, 1 mM DTT に溶解した、均一 [²H, ¹⁵N] 標識 Cyt *c* に対し、DM で可溶化した CcO を 1/10 倍量混合し、NMR サンプルとした。NMR 測定は、クライオプローブを装着した Avance 600 を用いて、測定温度 15 °C にて行った。

【結果】

特異性と反応回転効率を両立する Cyt *c*-CcO 間複合体形成の分子機構を解明するためには、結合界面の性質を調べる必要がある。本研究においては、CcO が分子量 400K の巨大な膜タンパク質であることを考慮し、転移交差飽和 (TCS) 実験により Cyt *c* 上の CcO との結合界面を同定することとした。Cyt *c* と CcO ミセルを混合したサンプルを調製し、TCS 実験を行った結果、Cyt *c* に対して DM のみを添加した対照実験の結果と比較して、A51, N54, K55 をはじめとする数残基において、ラジオ波照射に伴う特異的なシグナル強度減少が観測された。これらの残基を Cyt *c* の立体構造上にマッピングした結果、heme edge 近傍の Cyt *c* 分子表面に連続面を形成していた。

【考察】

TCS 実験により検出された結合界面残基は、heme edge 近傍の疎水性残基および塩基性残基から構成されていた。これまでに明らかとされている、Cyt *c* 上のシトクロム *bc*₁ 結合界面およびシトクロム *c* ペルオキシダーゼ結合界面も同様に heme cleft 近傍の疎水性および塩基性残基を含んでいるが、いずれも疎水性残基がよりヘム近傍に位置している。このことから、結合界面上の疎水性残基の役割として、疎水性相互作用による複合体の安定化に加えて、補欠分子族間の電子移動に適した疎水性環境を提供することが考えられる。一方、Cyt *c* の塩基性残基と CcO の酸性残基の相互作用が複合体形成に関与することがクロスリンク実験により示されている。この静電相互作用は、素早い会合もしくは複合体の配向決定に主要に寄与することが推測される。今後は、酸化型 Cyt *c* と CcO の相互作用解析を行い、還元型の結果と比較することにより、高い反応効率を可能とする複合体解離機構の解明を目指す。

膜タンパク質 Ifitm5 の立体構造研究；
 溶液 NMR 法による立体構造解析に向けた試料調製
 ○塚本 卓¹，李 香蘭²，花方 信孝²，出村 誠¹
¹ 北海道大学 大学院生命科学院
² 独立行政法人 物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合センター

Structural study of interferon-inducible transmembrane protein 5; sample preparation for solution-state NMR analysis

Takashi Tsukamoto¹, Li Xiang Lan², Nobutaka Hanagata², Makoto Demura¹

¹Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

²Nanotechnology Innovation Center, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan.

Interferon-inducible transmembrane protein 5 (Ifitm5) is a double transmembrane α -helical protein and specifically expresses in osteoblast cells of any species. In previous studies, it was cleared that the expression of Ifitm5 is independent of well-known transcription factors for osteoblast cell differentiation. Therefore, it is suggested that Ifitm5 is a novel factor for the bone morphogenetic. In this study, we challenged to figure out the dynamic structure of human Ifitm5 by solution-state NMR spectroscopy. We prepared the overexpression system using *E. coli* and ¹⁵N, ¹³C/¹⁵N stable-isotope labeled Ifitm5. Far-UV CD spectra showed that detergent-solubilized Ifitm5 forms α -helical conformation. In conclusion, we succeeded in obtaining Ifitm5 in native state. Further NMR analysis under solubilized system are in progress.

インターフェロンにより発現が誘導される膜タンパク質ファミリーとして、Ifitm が知られており、現在までに 7 種類の相同体が確認されている。これらはいずれも二回膜貫通型タンパク質で、一次配列が非常に類似した膜貫通ドメインと、多様性に富んだアミノ末端およびカルボキシ末端をもっている。これまでの Ifitm ファミリーに関する知見は、ノックアウト・RNAi などの in vivo・遺伝子レベルでの研究を中心に報告されており、単独の Ifitm タンパク質に注目した in vitro での詳細な研究は行われてこなかった。

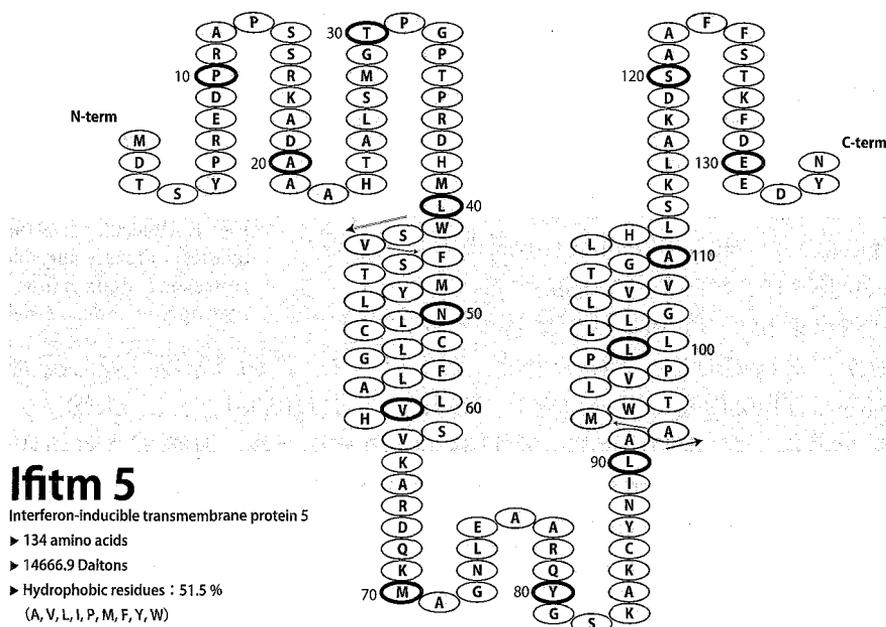
我々は、Ifitm タンパク質ファミリーのひとつである Ifitm5 に注目して研究を行ってきた。in vivo での研究より、Ifitm5 は骨芽細胞にのみ特異的に発現し、その発現にはインターフェロン、骨芽細胞の分化に重要な因子 Runx2/Cbfa1 および Osterix は関与しないことが明らかになった。すなわち、Ifitm5 は、骨芽細胞に特異的に発現

膜タンパク質，溶液 NMR

○つかもと たかし，り こうらん，はながた のぶたか，でむら まこと

して骨形成を促す、新規の膜タンパク質であることが示唆された。また、Ifitm5 は数種類のタンパク質と相互作用することが示唆されており、骨形成や骨に関する様々な疾患との関連が予想される。

そこで我々は、溶液 NMR 法を用いて、膜タンパク質 Ifitm5 のもつダイナミックな構造を解くことを目的とし、その第一段階として NMR 解析のための試料調製を行った。一般に、膜タンパク質の試料調製は困難であると言われている。しかしながら、我々は*大腸菌*を用いた大量発現系を構築し、1L 培養あたり約 47mg の Ifitm5 を得ることに成功した。また、MALDI-TOF マススペクトロメトリー、C 末端側 His tag をターゲットとしたウェスタンブロッティング、N 末端側のアミノ酸配列分析によって、Ifitm5 は全長でかつ*大腸菌*膜に発現していることを確認した。さらに、界面活性剤スクリーニングを行ったところ、双性イオン性の LDAO (N-Lauroyl-dimethyl amineoxide) が最も可溶化能に優れていた。LDAO 可溶化状態での遠紫外 CD を測定したところ、スペクトルは 222nm と 207nm に極値をもつ α ヘリックスのパターンを示した。K2D (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>) を用いた解析結果 (Fig.1) を考慮すると、本研究で構築した調製法によって天然状態の Ifitm5 を得ることに成功した。本会では、この発現系を用いて ^{15}N , $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体ラベル化試料を作成し、NMR 測定を行った結果も合わせて報告する予定である。



[Fig.1]

The amino acid sequence of Ifitm5. (SOSUI; <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

種々の DNA 塩基配列より形成される平行型四重鎖 DNA の立体構造解析

○中野佑亮¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 逸見光²
¹筑波大院数物, ²農研機構・食総研

Structural characterization of all-parallel G-quadruplex DNAs formed from a series of sequences

○Yusuke Nakano¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹ and Hikaru Hemmi²

¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba¹ and Natl. Food Res. Inst.²

A G-quadruplex DNA is composed of stacked G-quartets, each of which involves the planar association of four guanine bases. We have characterized the molecular structures of G-quadruplex DNAs formed from DNA sequences possessing various number of consecutive guanines such as d(TTGAGG), d(TTGAGGT), and d(TTGAGGG), in order to elucidate the effects of the sequence on the G-quadruplex DNA structure. Similarly to the G-quartet, adenine bases have been shown to be associated to form A-quartets in the G-quadruplex DNAs of the present DNA sequences. The alteration of the sequence was found to induce structural change of the A-quartet, which in turn influences the G-quadruplex DNA structure.

序論

平行型四重鎖 DNA は、高濃度のカチオン存在下において、グアニンが連続する配列をもつ DNA 4 分子の自己会合により形成される超分子である。四重鎖 DNA では、隣り合う DNA 鎖のグアニン 4 つが Hoogsteen 型塩基対により同一平面内で環状に連結した G-quartet (Fig. 1) が形成され、G-quartet が複数存在する場合には、それらの π 平面のスタッキングが四重鎖 DNA の立体構造の安定化に寄与している。さらに、四重鎖 DNA の 3' 末端に G-カルテットが存在する場合には、3' 末端の G-quartet 同士のスタッキングにより、四重鎖 DNA が二量体を形成すること、そして二量化により四重鎖 DNA の立体構造がより一層安定化することが明らかになっている。

本研究では、ヒトテロメアにおける繰り返し配列の基本単位である d(TTAGGG) をモチーフとして設計した d(TTGAGG) と、3' 末端にチミンやグアニンを追加した d(TTGAGGT), d(TTGAGGG) のそれぞれより形成される四重鎖 DNA の立体構造を NMR により解析し、G-quartet のスタッキングが四重鎖 DNA の立体構造に及ぼす影響を明らかにした。

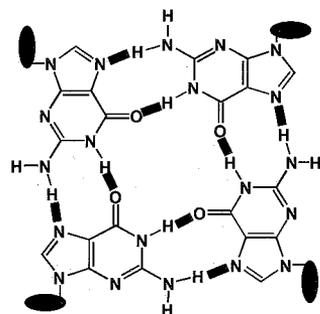


Fig. 1. Molecular structure of G-quartet. Ellipses and thick lines represent deoxyribose and hydrogen bonds, respectively.

Keywords: G-quartet, π - π stacking, G-Quadruplex DNA

○なかのゆうすけ, 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

結果・考察

d(TTAGGG)とd(TTGAGG)の ^1H NMRスペクトルで、塩基のCHとグアニンNH (G_{NH})のプロトンシグナルが観測される領域をFig. 2に示す。いずれのスペクトルでも10 - 12 ppmに3つの G_{NH} シグナルが観測され、それぞれのDNAで対称性の高い平行型四重鎖DNA ((d(TTAGGG)) $_4$, (d(TTGAGG)) $_4$)が形成されることが示された。また、(d(TTGAGG)) $_4$ のアデニンH2 (A4H2)に由来するシグナルが9.2 ppmに観測され、このシグナルの通常のシフト値に比べて約1.2 ppmの低磁場シフトを示した。この結果から、(d(TTGAGG)) $_4$ のアデニンは、隣接するG-quartetとのスタッキングによりA-quartet (Fig. 3)を形成することが示唆された。

次に、d(TTGAGGT)、d(TTGAGGG)で、3'末端への1塩基の追加によるA-quartetの構造に与える影響を解析した。(d(TTGAGGT)) $_4$ の ^1H NMRスペクトルでは、 G_{NH} シグナルとA4H2シグナルの分裂が観測された。NOESYによる解析の結果、分裂したそれぞれの G_{NH} シグナルの間で飽和移動によるクロスピークが観測され、対応するA4H2とNOEが観測されたことから、(d(TTGAGGT)) $_4$ にはA-quartetの構造に関して、相互変換する二つのコンフォメーションの存在が示された (Fig. 4)。また、(d(TTGAGGG)) $_4$ でもA-quartetに隣接するG3およびG5の G_{NH} シグナルが二組観測され (Fig. 5)、二つの異なるコンフォメーションの存在が示唆された。このように、A-quartetをもつ四重鎖DNAの構造は塩基配列に依存することが示された。

結論

四重鎖DNAでは、G-quartetとの π - π スタッキングによりA-quartetが安定化することが示された。また、A-quartetの構造は、DNA塩基配列に依存することが明らかになった。

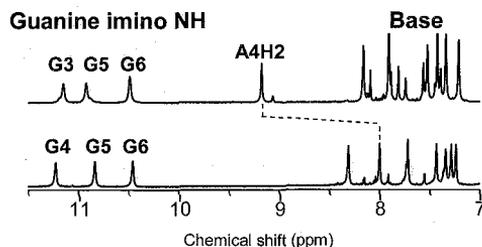


Fig. 2. ^1H NMR spectra of G-quadruplex DNAs formed from d(TTGAGG) (top) and d(TTAGGG) (bottom) at pH 6.80 and 25°C.

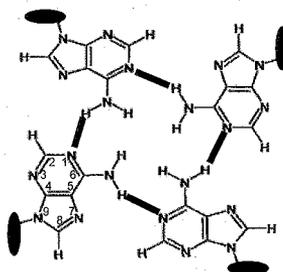


Fig. 3. Putative molecular structure of A-quartet. Ellipses and thick lines represent deoxyribose and hydrogen bonds, respectively.

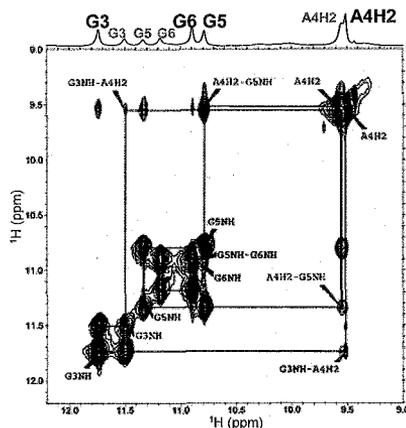


Fig. 4. Portions of ^1H NMR and NOESY spectra of (d(TTGAGGT)) $_4$ at pH 6.80 and 5°C.

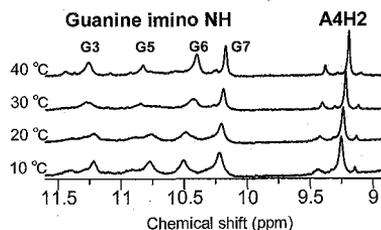


Fig. 5. Temperature dependence of ^1H NMR spectra of (d(TTGAGGG)) $_4$ at pH 6.80.

Structural characterization of a complex between heme and G-quadruplex DNA

○Kaori Saito¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹, and Hikaru Hemmi²
¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba and ²Natl. Food Res. Inst.

A single repeat sequence of the human telomere, d(TTAGGG), has been shown to form all parallel G-quadruplex DNA in the presence of K⁺, which spontaneously dimerizes through the stacking of the 3'-terminal G-quartets. We have previously demonstrated that heme, iron(III)-protoporphyrin IX complex, and G-quadruplex DNA assembled from d(TTAGGG) form a stable complex called "heme-DNA complex". In this study, we characterized the solution structure of the heme-DNA complex using ¹H NMR. Analysis of signal intensities yielded the stoichiometric ratio of 1:2 between heme and G-quadruplex DNA, and intermolecular NOEs between heme peripheral side chain and G6 protons were observed. These results revealed that heme is sandwiched between 3'-terminal G-quartets of two G-quadruplex DNAs.

序論

四重鎖DNAは、グアニン四量体 (G-カルテット、**Fig. 1**) により形成されるDNAの高次構造の一種である。私共はこれまでの研究において、ヘム (鉄-ポルフィリンIX錯体、**Fig. 2**) がDNA塩基配列d(TTAGGG)により形成される四重鎖に対して特異的に結合し、ヘム-DNA複合体を形成することを報告してきた¹⁻³。複合体におけるヘム鉄の配位構造は、特徴的なpH依存性“酸塩基平衡”を示し、中性pHにおいて三価・高スピン型錯体 ($S = 5/2$)、塩基性において低スピン型錯体 ($S = 1/2$) となる ($pK_a = 8.7$)。本研究では、常磁性の影響がより小さく、二次元NMRの測定が容易になる塩基性pHの条件下において、複合体の構造解析を¹H NMRにより行った。

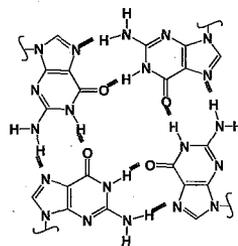


Fig. 1. Molecular structure of G-quartet.

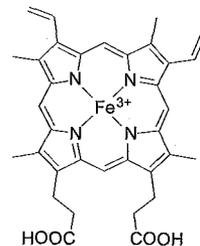


Fig. 2. Molecular structure of heme.

結果・考察

通常四重鎖DNAにおいて、¹H NMRのシグナルは0 - 12 ppmに観測される (**Fig. 3**)。 (d(TTAGGG))₄におけるDNA 4分子はすべて等価であり、~10 ppmより低磁場にシフト

キーワード：ヘム, 四重鎖DNA, 常磁性NMR

○さいとうかおり, 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

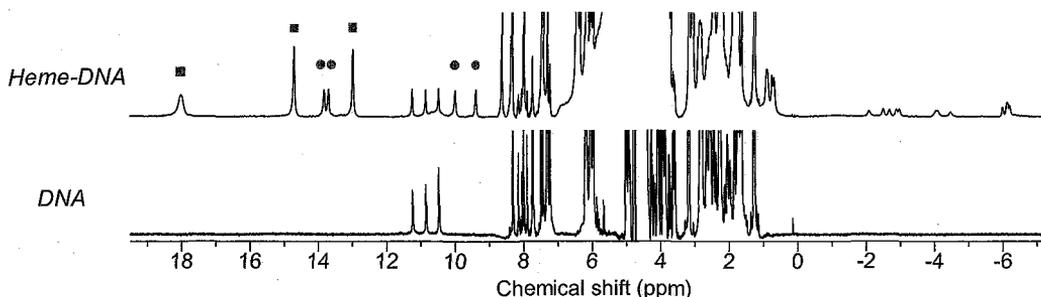


Fig. 3. ^1H NMR spectra of heme-DNA complex (top) and G-quadruplex DNA (bottom) in 90% $\text{D}_2\text{O}/10\%\text{H}_2\text{O}$, pH 9.7, at 298K. In the spectrum of heme-DNA complex, heme methyl and guanine imino proton signals are marked by filled circles and squares, respectively.

したシグナルは、各々のG-カルテット中で水素結合を形成したグアニンのイミノプロトンに由来する。一方、ヘム-DNA複合体では、シグナルが-6.4 - 18 ppmの広範囲に観測され (**Fig. 3**)、ヘム側鎖およびヘム近傍のDNAプロトンに由来するシグナルがヘム鉄の対電子の影響を受けて大きく常磁性シフトすることが反映されている。ヘム-DNA複合体のシグナル帰属はNOESY、DQF-COSYにより行い、ヘム側鎖プロトンシグナルの帰属を完了すると共に、ほとんど全てのDNAプロトンシグナルの帰属も得ることができた。

さらに、NOESYにおいては、ヘム-DNA複合体の立体構造決定に重要なヘムとDNAの分子間NOEも観測された。ヘムのメチルプロトンおよびビニルプロトンが四重鎖DNAの6番目の残基であるG6の塩基およびリボースのプロトンとNOEを示したことから (**Fig. 4**)、ヘムはDNAの3'末端側のG-カルテットにスタッキングしていることが示された。G6のイミノプロトンの選択的スピン-格子緩和時間 $^{\text{sol}}T_1$ は約20msと短く、ヘム鉄の対電子による常磁性緩和の影響を強く受けていることが明らかとなった。

また、9 - 18 ppmに分離良く観測された3つのG-カルテット由来のイミノプロトン、および4つのヘムメチルプロトンシグナルの強度比から、ヘム-DNA複合体におけるヘムと四重鎖DNAの化学量論は、約1:2であることが示された。

結論

ヘム-DNA複合体は、塩基性pHにおいて、2つの四重鎖DNAの3'末端にヘムが挟まれたサンドイッチ型構造であることが明らかになった。

References

1. T. Mikuma, N. Terui, Y. Yamamoto, and H. Hori, *Nucleic Acids Res. Suppl. No. 2*, **2002**, 285-286.
2. T. Mikuma, T. Ohya, N. Terui, Y. Yamamoto, and H. Hori, *Chem. Comm.*, **2003**, 14, 1708-1709.
3. T. Ohya, Y. Kato, H. Mita, and Y. Yamamoto, *Chem. Lett.*, **2006**, 35, 126-127.

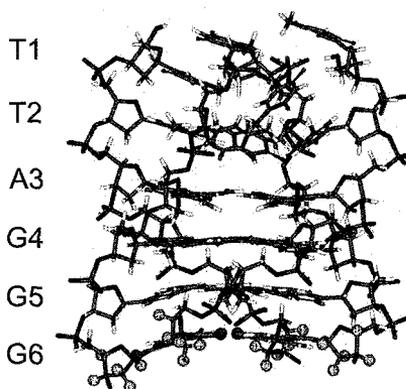


Fig. 4. Schematic drawing of G-quadruplex DNA. Base and ribose protons that exhibited intermolecular NOEs with heme peripheral side chain protons are represented by balls.

ミミズ由来R型レクチンC末端ドメインと糖との結合様式に関するNMR解析

○逸見 光¹, 久野 敦², 海野 幸子², 平林 淳²

¹農研機構・食総研

²産総研・糖鎖医工学研究センター

NMR analyses of the binding of sugar to the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm

○Hikaru Hemmi¹, Atsushi Kuno², Sachiko Unno², and Jun Hirabayashi²

¹National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Japan.

²Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan.

The C-terminal domain of an R-type 29-kDa lectin (EW29Ch) from the earthworm *Lumbricus terrestris* has two sugar-binding sites (α and γ). Our recent paper¹ showed that the Kd value of the α sugar-binding site were approximated to 0.01-0.07mM for lactose, whereas that of the γ sugar-binding site was 2.66mM for lactose. Although the crystal structure of the complex between EW29Ch and lactose was reported, it is still unclear why the α sugar-binding site binds to lactose more strongly. In the [¹³C,¹H]-HSQC spectra of ¹³C-labeled lactose upon the addition of non-label EW29Ch, mainly the NMR signals of the galactose residue of the lactose were broadened and shifted. These results agree well with those from the crystal structure of EW29Ch with lactose and the STD-NMR experiments of lactose with EW29Ch¹. Further, we are currently analyzing the NOEs between EW29Ch and lactose.

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²。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。また、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 (α 結合部位と γ 結合部位)が存在することがわかった³。さらに、我々は最近、EW29Chと各種糖との相互作用について、NMR滴定実験法を用いて解析を行い、 α 結合部位が γ 結合部位に比べて約100倍高い糖結合能をもつことを報告した¹。

レクチン, 糖, 相互作用

○へんみひかる, くのかつし, うんのさちこ, ひらばやしじゅん

今回、我々は、 ^{13}C 均一ラベルしたラクトースを用いて、非ラベル体EW29Chの添加による $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQCスペクトルでのNMRシグナルの変化を観察するとともに、分子間NOEの測定、さらに、 $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ラベルしたEW29Chに非ラベル体ラクトースを添加したサンプルを用いて分子間NOEの測定を行ったので、その結果について報告する。

[結果と考察]

今回、我々は、X線結晶構造解析で糖との複合体解析において、2つの糖結合部位 (α と γ) での糖との相互作用についてほとんど同じ相互作用を示すことが報告されているにも関わらず、NMR滴定実験において α 結合部位が γ 結合部位に比べラクトースに対して約100倍高い結合能を持つことから、 α 結合部位のラクトースとの相互作用を重点的に解析するため、 ^{13}C 均一ラベル体ラクトースに対して非ラベル体EW29Chを糖/タンパク質比が0.5~20なるようにサンプルを調製し、 $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQC、 ^{13}C -edited NOESY及び ^{13}C -edited TOCSYの測定を行った。その結果、ラクトースのグルコース残基由来のシグナルは、遊離の状態でのシグナルとほとんど変化が見られなかったが、ガラクトース残基由来のシグナルは、ブロードニング及びケミカルシフトの変化が見られた。さらに、ガラクトース残基由来のシグナルにおいては、EW29Chとの分子間NOEが観測された。従って、今回の結果より、ラクトースのガラクトース残基がEW29Chと主に相互作用することが分かり、X線結晶構造解析の結果と一致した。さらに、ラクトースとEW29Chとの分子間NOEの解析を行うために、 ^{15}N ラベルしたEW29Ch及び $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ でラベルしたEW29Chを用い、非ラベル体ラクトースを添加したサンプル（糖/タンパク質比が0.5~8）を用いて、 ^{15}N -edited NOESY及び ^{13}C -edited NOESYの測定を行った。 ^{13}C ラベル体ラクトースによる糖側からのNOE解析と、 ^{15}N ラベル体及び $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ラベル体EW29Chによるタンパク質側からのNOE解析により、糖-タンパク質間NOEの帰属を行った。これらの詳細な結果と、残余双極子カップリング値を用いて精密化した遊離の状態でのEW29Chの立体構造については当日報告する予定である。

References

1. Hemmi, H., Kuno, A., Ito, S., Suzuki, R., Hasegawa, T., and Hirabayashi, J. (2009) FEBS J. 276, 2095-2105.
2. Hirabayashi, J., Dutta, S. K., and Kasai, K. (1998) J. Biol. Chem. 273, 14450-14460.
3. Suzuki, R., Kuno, A., Hasegawa, T., Hirabayashi, J., Kasai, K., Momma, M., and Fujimoto, Z. (2009) Acta Crystallogr D 65, 49-57.

P012

イネクロモドメインタンパク質OsLHP1のNMR構造解析

○若生俊行, 鈴木倫太郎, 山崎俊正

(農業生物資源研究所 タンパク質機能研究ユニット)

NMR studies on OsLHP1, a chromodomain protein in rice.

○Toshiyuki WAKO, Rintaro SUZUKI, Toshimasa YAMAZAKI

(Protein Research Unit, National Institute of Agrobiological Science)

Epigenetic regulation for gene expression and silencing by histone modifications plays important roles in eukaryotes. Especially, methylation of histone H3 at K9 or K27 is essential for epigenetic silencing. The methylated H3 are recognized mainly by HP1 and Polycomb family proteins that contain chromodomain as binding site. Chromodomain is conserved in from yeast to higher organisms. In plant species, LHP1 which belongs to HP1 family in DNA sequence is likely to play a role as Polycomb, while detailed mechanism is unclear. In this study, we performed structural analysis of the chromodomain in rice LHP1 (OsLHP1-CD) by solution NMR spectroscopy, to reveal the detailed recognition mechanism of methylated histones. Backbone NMR resonance assignment has been achieved by analyzing 3D triple-resonance NMR spectra measured on $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled OsLHP1-CD. Side-chain resonance assignment, structure calculations and NMR titration analysis are in progress.

【序論】

真核生物においては、ヒストンの翻訳後修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御が重要な役割を果たしている。とりわけヒストンH3のK9およびK27のメチル化(H3K9me, H3K27me)による発現抑制が非常に注目されている。これらのメチル化ヒストンを認識する主要なタンパク質として、H3K9meに結合するHP1ファミリーおよびH3K27meに結合するPolycombファミリーが知られており、これらは認識ドメインとしてクロモドメインを有する。クロモドメインは約60残基からなり、真核生物に広く保存されている。植物ではPolycombファミリーとの相同配列は存在しないかわりに、HP1ファミリーと配列上の相同性をもつLHP1が、配列からの予想とは異なってPolycombと同様の特異性および機能を担っていることが推定されているが、詳細な結合様式については明らかとなっていない。そこで本研究ではイネのLHP1(OsLHP1)のクロモドメイン単体について、溶液NMRを用いた構造解析を行って立体構造を明らかにし、メチル化ヒストンペプチドとの結合特異性および相互作用メカニズムの解明を目指す。

クロモドメイン、メチル化ヒストン、イネ

○わこうとしゆき, すずきりんたろう, やまざきとしまさ

【方法】

イネLHP1のクロモドメイン(OsLHP1-CD, 59残基)を、大腸菌による大量発現系により ^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ にて標識し、常法により調製して測定試料とした。NMR測定はBruker DMX750を用い、283Kで行った。主鎖の帰属のために、HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO, HCACO, HBHACONHの各種三次元測定を行った。側鎖の帰属のために、C(CO)NH, HC(CO)NH, HCCH-TOCSY, ^{15}N -NOESY-HSQC, ^{13}C -NOESY-HSQC, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -separated NOESY-HSQCの各種三次元測定を行った。測定データの処理には、NMRpipeを、スペクトル解析にはSparkyを用いた。得られた主鎖の化学シフトデータを元に、RCIを用いてOsLHP1-CDの二次構造を解析した。

【結果・考察】

^{15}N -HSQCにおいて良好なスペクトルを得ており(Fig. 1)、これまでに主鎖の帰属を完了させた。化学シフトの値から二次構造を予測したところ、OsLHP1-CDには、N末端側から順に3つの β ストランド($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$)があり、C末端に1つの α -ヘリックスを持つことが推定された。この構造は既に解明されている*Drosophila*のHP1やPcなどのクロモドメインと類似しているが、 $\beta 3$ 前後のヘリックスは検出されていない。またC末端の α -ヘリックスの長さは、HP1と同様で、Pcより長いと予測され

ており、二次構造的も一次配列と同様にHP1に近いと考えられる。クロモドメイン(CD)がメチル化ヒストンに結合する際の重要な3つのaromatic residuesはOsLHP1においても保存されていることから、HP1やPcと類似した結合様式が期待される。これまでのところシロイヌナズナのAtLHP1-CDと同様に(Zhang *et al.* 2007)、CD単体ではH3K9meおよびH3K27meの双方への結合がNMRタイトレーションによって観察されており、特異性および認識機構についてさらに解析を進めている。現在、側鎖の帰属、立体構造解析、および結合解析を進行中である。

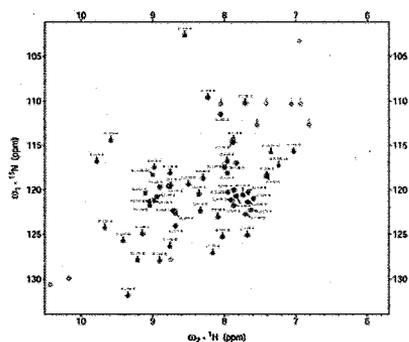


Fig. 1 ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of OsLHP1-CD

P013

幼若ホルモン結合タンパク質の構造機能解析

○鈴木倫太郎, 藤本瑞, 塩月孝博, 門間充, 多勢祥, 宮澤光博, 山崎俊正
農業生物資源研究所

Structure-function relationship of juvenile hormone binding protein

○Rintaro Suzuki, Zui Fujimoto, Takahiro Shiotsuki, Mitsuru Momma, Akira Tase, Mitsuhiro Miyazawa, and Toshimasa Yamazaki

National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.

The lipophilic juvenile hormone (JH) is a key hormone in the regulation of the insect life cycle and exists as a complex with JH binding protein (JHBP) in the haemolymph. Here, we present the NMR solution structure of the silkworm JHBP-JH III complex and the X-ray crystal structure of unliganded protein. JHBP has a long α 3-helix which is wrapped in a meandering β -sheet. JH III is completely buried in a deep binding pocket. In solution, the lid of the binding pocket of apo-JHBP is quite flexible and undergoes chemical exchange on the milli- to microsecond time-scale between multiple conformational states, including the “closed-lid” conformation observed for the complex and “open-lid” conformations suitable for JH binding.

非環状セスキテルペノイドである幼若ホルモン(JH)は昆虫の生活環の制御に関わる重要なホルモンである。多くの昆虫で JH は幼虫期の脱皮過程における変態を阻害する。それぞれの種の各幼生期に固有の大きさに達すると JH は幼虫体内から消失し、変態が進行することができるようになる。成虫においては、JH は卵形成などの性成熟、休眠、寿命(成虫期間の長さ)、移動行動などに関わる広範囲の作用を持つ。アラタ体で生合成され血リンパに分泌された JH は、高親和性の JH 結合タンパク質(hJHBP, 25 kDa)と結合し、標的細胞まで運搬される。JH は高脂溶性で不安定な分子であり、その輸送、保護、貯蔵を通じて hJHBP は昆虫の正常な発育に決定的に重要な役割を持つ。鱗翅目の血リンパでは JH の 99%以上が hJHBP と結合した形で存在するため、血リンパにおける JH の動態とは hJHBP-JH 複合体の動態に他ならない。今回我々はカイコ hJHBP および hJHBP-JH III 複合体の立体構造を明らかにしたので報告する。

hJHBP については X 線結晶構造解析により解像度 2.6 Å の構造を得ることができたが、hJHBP-JH III 複合体については結晶化はするものの、解析が困難であった。一方、hJHBP 単体の NMR スペクトルは複合体のスペクトルに比べてピークが 4 割ほど少なく、単体の解析はできなかったが複合体の解析は可能であった。そこで、複合体については NMR 法により構造解析を行った。計算に用いた 11742 個の距離拘束のうち、6 割強を ambiguous assignment とすることで、主鎖の RMSD が 0.32 Å とこのサイズのタンパク質としては精

幼若ホルモン結合タンパク質、ambiguous assignment

○すずきりんたろう, ふじもとずい, しおつきたかひろ, もんまみつる, たせあきら, みやざわみつひろ, やまざきとしまさ

密に構造を決めることができた。各ピークについてambiguous assignmentを採用するか否かは、可能性のあるそれぞれの帰属について $\Sigma(1/r^6)$ を求め、その総和に占める割合 $\Sigma(1/r^6)/\Sigma\Sigma(1/r^6)$ が10%以上であるような帰属が複数あることを目安とした。実際の判定はSparkyのExtensionの一つ、Assignment distancesを改変して上記の割合を表示する機能を追加することで行った。

得られたhJHBPの結晶構造およびhJHBP-JH III複合体の溶液構造はほぼ同じであり、筒状の β シートが長い $\alpha 3$ ヘリックスに巻きつく形になっていた(Fig. 1)。筒状の分子の両端にはそれぞれ短いヘリックス $\alpha 1$ と $\alpha 2$ が存在し、またどちらにもポケット様の表面が見られた。結晶構造では結晶化試薬の2-メチル-2,4-ペンタンジオール(MPD)がこれらのポケットに1分子ずつ結合していた。一方、溶液構造ではJH IIIは片方のポケットに、分子内部に埋もれた形で結合していた。この結合ポケットは疎水性が高かったが、hJHBP-JH III間の水素結合も2箇所で見られた。部位特異的の変異体の結合活性測定により、水素結合に関与する残基とJH IIIのエポキシ基周辺の疎水性残基は結合に対する寄与が大きいのが明らかになった。なお、JHとタンパク質の相互作用を示す立体構造としてはこの構造が初めてのものである。

一方、単体のNMRスペクトルで観測できなかった残基はJH III結合ポケット周辺に集中しており、また、結晶構造中でも該当する部分の温度因子は高かった。hJHBP-JH III複合体の溶液構造の20の計算結果間でのRMSDは分子全体にわたって比較的小さく、揺らぎの少ない構造であることが示唆されたが、溶液構造と結晶構造のRMSDを計算すると、両方で違いの大きい部分は結晶構造の温度因子が高い部分と一致していた。また、溶液構造ではJH III分子がMPDよりも大きいことに対応して結合ポケットも大きくなっており、これを取り巻く β シート部分が結晶構造とくらべて外側に広がる形になっていた。この構造の違いはそれほど大きくはないが、 β シート上で温度因子の高低の境目となる部分を蝶番とする開閉として解釈することができた。また、この境目は単体のNMRスペクトルで観測できる部分と観測できない部分の境目と一致していた。さらに、この境目周辺では β シートと $\alpha 3$ ヘリックスを結ぶジスルフィド結合および水素結合が一つずつ見られた。これらの結果から結合部位周辺は溶液中のhJHBP単体では運動性が高く、おそらく結晶構造に似た閉じた構造とJHの結合が可能なより大きく開いた構造を含む複数の状態間で、ミリ秒からマイクロ秒スケールでの揺らぎがあるものと考えられる。

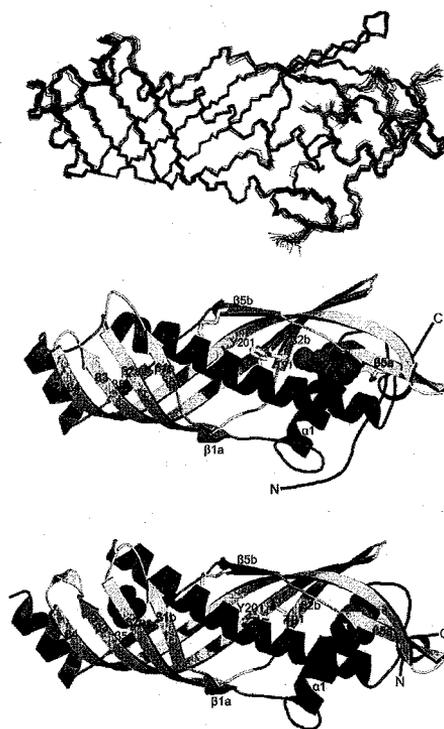


Fig. 1 Structure of silkworm hJHBP. The superimposed backbone atoms of the 20 NMR-derived structures of the hJHBP-JH III complex, the representative structure of the hJHBP-JH III complex, and the crystal structure of the hJHBP-MPD complex.

P014

NMR 緩和測定による低分子量 G タンパク質

*Nt*ARL8 の立体構造変化の解析

((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、相宏宇、石川雅之、加藤悦子

NMR Relaxation Analysis of Conformational Changes in Small G-Protein *Nt*ARL8

*National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS),
Plant-Microbe Interactions Research Unit*

○Hideyasu Okamura, Masaki Nishikiori, Hongyu Xiang,
Masayuki Ishikawa and 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. *Nicotiana tabacum* ADP-ribosylation factor-like protein 8 (*Nt*ARL8) is a host protein that associates with the tobacco mosaic virus replication complex. *Nt*ARL8 belongs to the ARF family of the small G proteins and functions as a molecular switch associated with nucleotide exchange. Knowledge about the dynamic mechanisms of conformational changes in *Nt*ARL8 would help to understand the role of *Nt*ARL8 on the virus replication complex. Here, we investigated conformational changes in *Nt*ARL8 by NMR relaxation analysis, including ZZ-exchange and ¹⁵N *R*₂ relaxation dispersion experiments.

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 8 (*Nt*ARL8)が同定された。我々はこの *Nt*ARL8 について立体構造決定を含めた解析を進めている (Fig.1)。*Nt*ARL8 は 20.5kDa の低分子量 G 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。これまでに多くの ARF ファミリー蛋白質で N 末の両親媒性 Helix 領域が、膜への局在に関与すると同時に自身の GTP,GDP への親和性に関与することが指摘されてきた。N 末端領域はヌクレオチド結合部位の反対側にあることから、アロステリック制御機構という観点からも興味深いと思われる。しかしながら、その詳細な機構についての解明は不十分なままである。そこで、我々は N 末端のヘリックス領域を含む Δ 7-*Nt*ARL8 (残基番号 8-184)とその領域を欠損した Δ 16-*Nt*ARL8 (残基番号 17-184)について NMR により解析を行った。

キーワード 低分子量 G タンパク質, *R*₂ 緩和分散法, ZZ-exchange 法

○おかむらひでやす, にしきおりまさき, しゃんほんいゆう, いしかわまさゆき, かつうえつこ

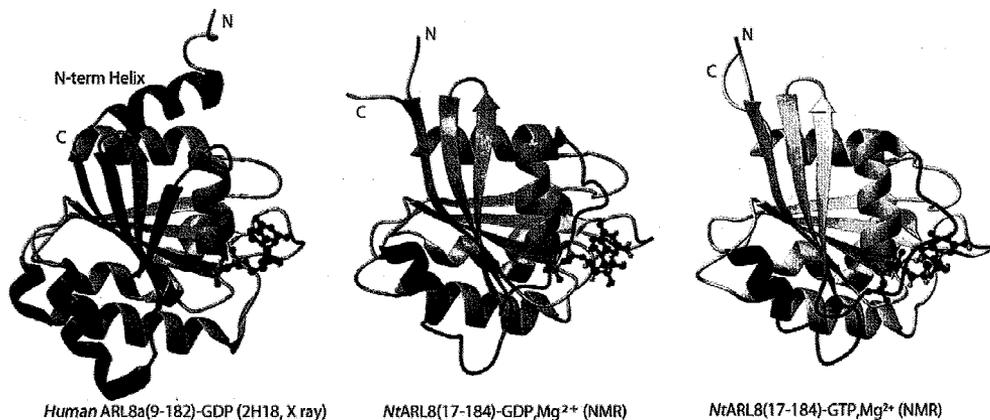


Fig.1 Crystal structure of *Human ARL8a(9-182)-GDP* (Atanassova, A. *et al.*) (GDP form) and solution structures of $\Delta 16$ -*NtARL8-GDP,Mg²⁺* (GTP-like form) and $\Delta 16$ -*NtARL8-GTP,Mg²⁺* (GTP form)

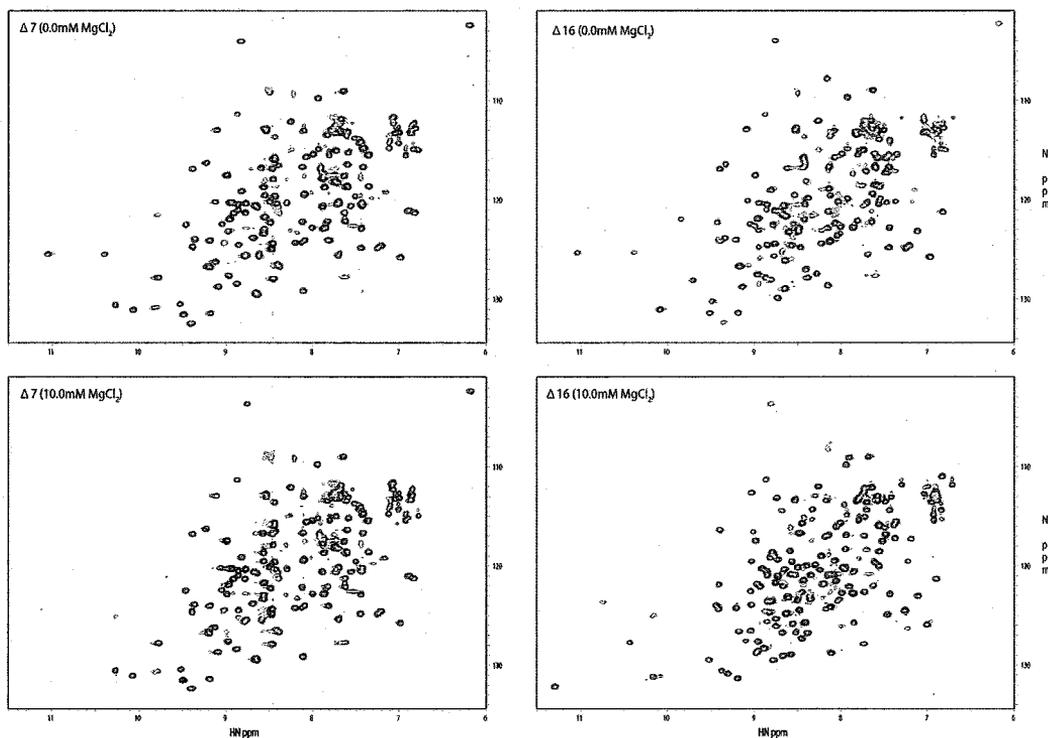


Fig.2 ¹H-¹⁵N HSQC spectra of $\Delta 7$ -*NtARL8* and $\Delta 16$ -*NtARL8* in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl with or without 10 mM MgCl₂.

大腸菌大量発現系から精製した直後では $\Delta 7$ -*NtARL8*はGDP型、 $\Delta 16$ -*NtARL8*はGTP型であった。このことからN末Helix領域の有無によりGDP-GTP親和性が変化していることが示唆された。さらにNMRもしくは等温滴定マイクロカロリーメトリ- (ITC)測定を用いて、それぞれのGDP複合体へGTPを滴下すると $\Delta 16$ -*NtARL8*は $\Delta 7$ -*NtARL8*と比較して反応が顕著に見られることから $\Delta 16$ -*NtARL8*はGDP→GTPへの変換が起りやすいことが確認できた。また、*NtARL8*はこれまでに解析

されてきた ARF ファミリータンパク質との比較から、GTP 型では構造中に Mg^{2+} を含むが GDP 型では Mg^{2+} を含まないことが予想された。そこで、 Mg^{2+} 非存在下で NMR スペクトルを測定すると両者はよく似たスペクトルを与え (Fig. 2)、典型的な GDP 型構造をしていると考えられた (Fig. 1 左)。しかし Mg^{2+} を滴定していくと両者に違いが見られ、 $\Delta 7$ -NtARL8 ではヌクレオチド結合領域のわずかな残基がシフトもしくは消失するのみなのに対して、 $\Delta 16$ -NtARL8 では slow-exchange time scale で大きくシグナルが変化することが分かった。そこで、このシグナル変化がほぼ飽和する 30 mM $MgCl_2$ 溶液中で立体構造解析を行った結果、新たに出現したシグナルは $\Delta 16$ -NtARL8 が GDP 複合体にも関わらず GTP-like な構造をとっていることに起因することが分かった (Fig. 1 中)。これらのように、N 末 Helix 領域の有無は NtARL8 の構造変換機能に対して重大な変化をもたらすことが確認できた。

そこで、始めに $\Delta 16$ -NtARL8 では 1 mM Mg^{2+} 存在下で GDP 型、GTP-like 型両方のシグナルが観測できるので、ZZ-exchange 法により解析を行った。その結果、両者の存在比は GDP:GTP-like = 0.62:0.38、変換速度は $k(\text{GDP} \rightarrow \text{GTP-like}) = 7.1 \pm 0.3 \text{ S}^{-1}$ 、 $k(\text{GTP-like} \rightarrow \text{GDP}) = 11.8 \pm 0.8 \text{ S}^{-1}$ と見積もられた (Fig. 3)。次に、 Mg^{2+} 非存在下では、ほぼ全ての残基で単独のシグナルを与えるが、S184 のみマイナーピークが観測された。さらに、このマイナーピーク的位置は Mg^{2+} 存在下での GTP-like 型のピーク的位置とほぼ同位置であった。これについて同様に ZZ-exchange 法で解析を行った結果、存在比は GDP:(GTP-like) = 0.91:0.09 で $k(\text{GDP} \rightarrow (\text{GTP-like})) = 8.4 \pm 1.2 \text{ S}^{-1}$ 、 $k((\text{GTP-like}) \rightarrow \text{GDP}) = 83.6 \pm 12.4 \text{ S}^{-1}$ であることがわかった (Fig. 3)。これらの結果は以下の様な可能性を示唆している。まず、 Mg^{2+} 添加により励起される GTP-like 型構造は Mg^{2+} 非存在下でも、既にわずかに存在している。すなわち N 末端 Helix の除去により GTP-like 構造があらかじめわずかに励起されている可能性がある。S184 は C 末端であり特別にシグナルがシャープなためにマイナーピークが観測できた可能性がある。そう仮定すると変換速度 $k(\text{GDP} \rightarrow \text{GTP-like})$ は Mg^{2+} 添加により速くなるのではなく、反対に、 $k(\text{GTP-like} \rightarrow \text{GDP})$ が遅くなっている。これについては Mg^{2+} は GDP 型構造に作用して GTP-like 型構造を誘起しているのではなく、あらかじめ存在する GTP-like 型構造に作用すると考えると説明できる。すなわち Mg^{2+} の効果は induced-fit ではなく、population-shift であると理解できる。これらのことを確かめるために我々は Mg^{2+} 非存在下で ^{15}N R_2 relaxation dispersion 実験を行った。結果は予想した通り、 $\Delta 7$ -NtARL8 ではほぼフラットで R_2 の dispersion が観測できなかったが、 $\Delta 16$ -NtARL8 では複数の残基で顕著な dispersion が観測できた (Fig. 4)。このように、 $\Delta 16$ -NtARL8 では N 末 Helix 領域の欠損により ms- μ s スケールの運動が誘起され、マイナーな構造が励起されていることが強く示唆された。反対に $\Delta 7$ -NtARL8 ではこのような運動は抑制されており、N 末のヘリックス領域は $\Delta 16$ -NtARL8 で見られたような Intrinsic な構造のゆらぎを抑えることにより、ヌクレオチド親和性を制御していることが強く示唆された。現在、この ^{15}N R_2 relaxation dispersion により得られるパラメーターを求めるために、さらなる解析を行っている。

$\Delta 16$ -NtARL8 では Mg^{2+} 非存在下でも GTP-like 構造を含む少なくともふたつの立体構造の存在が強く示唆されたため、それらの熱力学パラメーターを見積もるために ZZ-exchange 測定の温度可変実験を行った。その結果を Eyring Plot により解析したところ、GDP 型から GTP 様型への変換の活性化エンタルピー $-\Delta H^\ddagger(\text{GDP} \rightarrow \text{GTP-like})$ 、活性化エントロピー $-\Delta S^\ddagger(\text{GDP} \rightarrow \text{GTP-like})$ はそれぞれ $11.8 \pm 1.8 \text{ kcal/mol}$ 、 $-0.0146 \pm 0.0061 \text{ kcal/mol} \cdot \text{K}$ と、GTP-like 型から GDP 型への $\Delta H^\ddagger(\text{GTP-like} \rightarrow \text{GDP})$ 、 ΔS^\ddagger

(GTP-like \rightarrow GDP)はそれぞれ 20.6 ± 1.8 kcal/mol, 0.0193 ± 0.0063 kcal/mol \cdot K と見積もられた (Fig. 3)。従って、この構造変換のエンタルピー変化 ΔH は 8.78 ± 2.52 kcal/mol と見積もられる。これは ITC にて Mg $^{2+}$ 滴定実験により得られた ΔH とほぼ近い値であった。見積もられた熱力学パラメーターから GDP 型構造はエントロピー的に、GTP-like 型構造はエンタルピー的に有利な構造だといえる。GDP 型では NMR シグナルがブロード化している領域が $\Delta 7$ -N ϵ ARL8 と $\Delta 16$ -N ϵ ARL8 に共通して見られ、その領域の構造の揺らぎを示唆している。それに対して $\Delta 16$ -N ϵ ARL8 の GTP-like 型構造では GDP 型に比べ均一なシグナルを与える。これは得られた両構造の熱力学的特徴をよく反映していると考えられる。今後はこれらの解析の精密化とともに、得られた情報を基にウイルス複製複合体における N ϵ ARL8 の機能解明へ向けていきたい。

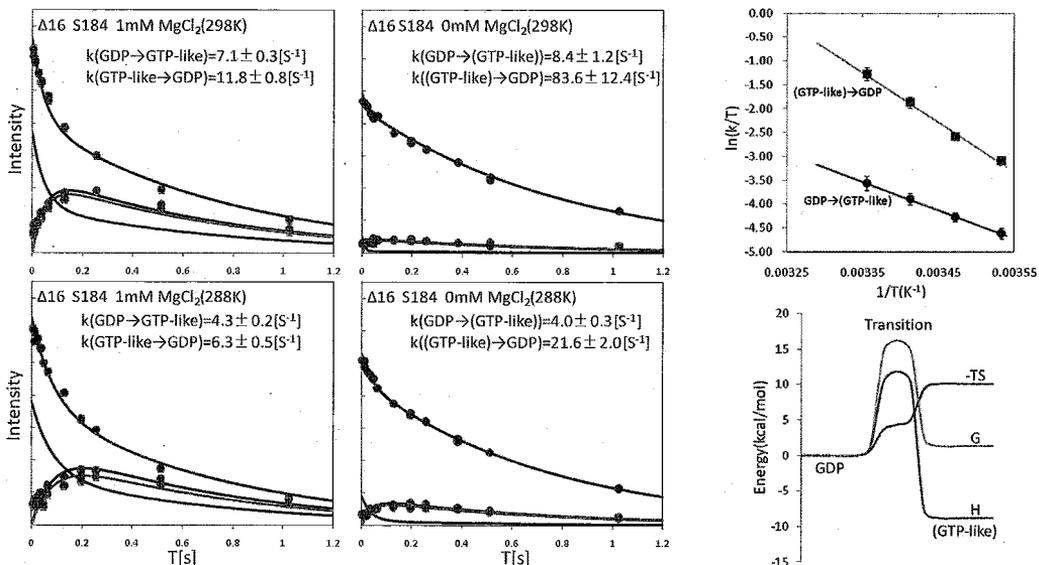


Fig. 3 ZZ-exchange peak intensity profiles for S184 of $\Delta 16$ -N ϵ ARL8 in 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100mM NaCl with or without 1mM MgCl $_2$, and Eyring plots and energy diagrams for $\Delta 16$ -N ϵ ARL8 conformational changes in the buffer solution without MgCl $_2$ at 298K.

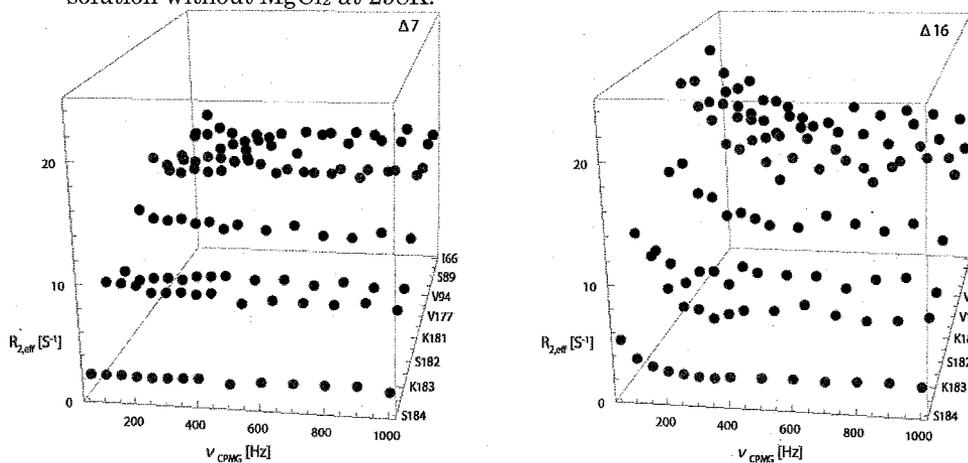


Fig. 4 ^{15}N R_2 relaxation dispersion profiles at 600 MHz ^1H Larmor frequency for representative residues of $\Delta 7$ -N ϵ ARL8 and $\Delta 16$ -N ϵ ARL8

P015

残余双極子相互作用を用いたタンパク質・DNA 複合体 立体構造の精密化

○山崎和彦^{1,2}、木川隆則^{2,3}、渡部暁²、山崎智子¹、井上真²、
関原明⁴、篠崎一雄⁴、横山茂之^{2,5}

¹産総研・年齢軸生命工学研究センター、²理研・生命分子システム基盤研究領域、
³東工大院・総合理工、⁴理研・植物科学研究センター、⁵東大院・理

Refinement of structure of protein-DNA complex using residual dipolar couplings

○Kazuhiko Yamasaki^{1,2}, Takanori Kigawa^{2,3}, Satoru Watanabe², Tomoko Yamasaki¹,
Makoto Inoue², Motoaki Seki⁴, Kazuo Shinozaki⁴, and Shigeyuki Yokoyama^{2,5}

¹Age Dimension Research Center, AIST, Tsukuba, Japan, ²RIKEN Systems and Structural
Biology Center, Yokohama, Japan, ³Interdisciplinary Graduate School of Science and
Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokoyama, Japan, ⁴RIKEN Plant Science Center,
Yokohama, Japan, ⁵Graduate School of Science, Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan

NOE-based structure determination of a protein-DNA complex tends to be inaccurate in the intermolecular contacting region, where the proton density is relatively low. To refine the structure, residual dipolar couplings of both the protein and DNA may be useful, which constrain the relative position of the two molecules. We applied this method to the complex of the plant-specific WRKY transcription factor DNA-binding domain and a recognition DNA, and labeled the DNA thymine bases as well as the protein with ¹⁵N isotope. A structure with RMSD of 1.4 Å for the all non-hydrogen atoms was obtained, which enabled us to understand the sequence recognition mechanism.

【目的】 NMR 法によるタンパク質・DNA 複合体の立体構造決定においては、X 線結晶解析法と比較し、特に接触面において構造が不正確になる傾向が否めない。これは、DNA の塩基やリン酸基との接触においては、Lys、Arg 残基の先端の ¹H シグナルを観測しづらい部分や、Asp、Glu、Ser、Thr 残基の酸素原子などが、静電的相互作用や水素結合に関与することが多く、その結果、観測可能な ¹H 間の近接が接触により誘起されにくいことが理由に挙げられる。近年、¹H-¹H NOE 主体の計算手法に、残余

残余双極子相互作用、タンパク質・DNA 複合体、安定同位体標識

○やまさきかずひこ、きがわたかのり、わたなべさとる、やまさきともこ、
いのうえまこと、せきもとあき、しのぎかずお、よこやましげゆき

双極子相互作用(residual dipolar coupling, RDC)を加えることにより、より精密な立体構造を得ることが行われ、一般的になりつつある。RDC による束縛は、NOE と比較して遠距離に効果をもたらす特性があり、複合体中の分子間の相対位置の精密化に資すると予想できる。私たちは、タンパク質に加えて、DNA の塩基を ^{15}N 標識し、N-H 基の RDC を測定することによって、より精密な立体構造決定を試みた。

適用した複合体は、主として病虫害応答に関与する植物特異的 WRKY ファミリー転写因子の亜鉛結合性 DNA 結合ドメイン (WRKY ドメイン) とその認識配列である W-box (TTTGACC) をもつ二重鎖 DNA である。私たちは、植物特異的転写因子群に対する構造プロテオミクス研究の一環として、この WRKY ドメインの β シートからなる立体構造を決定し、DNA 添加による化学シフト変化量の解析により、複合体のモデルを提案した (文献 1)。本研究では、複合体の立体構造を決定し、配列認識機構を明らかにすることを目的とし、RDC を併用した解析を行った。

【方法】 シロイヌナズナ AtWRKY4 タンパク質の C 末端側 WRKY ドメイン (Val399-Ala469) の ^{15}N 標識体を、無細胞合成系によって発現、調製した。 $[^{15}\text{N}]$ thymidine phosphoramidite (CIL) を用いた化学合成により、16mer 二重鎖 DNA (5'-CGCCTTTGACCAGCGC-3'/5'-GCGCTGGTCAAAGGCG-3'; 下線は W-box 配列) の 5 つのチミン(T)塩基の ^{15}N 標識を行った。タンパク質と DNA の 1:1 複合体を調製し、0.4-0.5 mM の濃度とした。DMX-750 (Bruker) の装置を用いて、IPAP(in-phase/antiphase)-HSQC (文献 2) を測定し、 ^1H - ^{15}N coupling 値を取得した。12mg/ml の Pfl ファージ(ASLA biotech)の添加によって alignment を誘起し、RDC 値を得た。これに加え、NOE や、タンパク質内の水素結合、DNA の base pair の平面性を維持するための constraints、亜鉛イオンに関する constraints 等を用いて CNS による構造計算を行った。計算は 3 段階に分け、1) タンパク質部分に対する random conformation を初期構造とする simulated annealing、2) B 型 DNA を共存させ、simulated annealing、3) タンパク質に亜鉛を導入し、さらに simulated annealing を行った。RDC の constraints は 1) のプロセスでは導入せず、2) のプロセス以降において導入した。Alignment tensor の axial component (D_a) と rhombic component (D_r) は、構造計算のエネルギー値を指標とした grid search 法 (文献 3) により決定した。NOE と RDC の violation を指標として、最終構造の選別を行った。RDC の計算値と実験値の比較などの解析は、自作の FORTRAN プログラムを用いて行った。

【結果・考察】 ^{15}N 標識した WRKY ドメインと ^{15}N 標識した T 塩基を含む二重鎖 DNA を 1:1 で混合し、IPAP-HSQC の測定を行った (Fig.1)。12mg/ml の Pfl phage の添加により、顕著なブロードニングが生じたが、5 個全ての T 塩基の N3-H3 ベクトルに関す

る RDC の値を得た。N3-H3 ベクトルは塩基対形成のための水素結合に関わり、塩基対平面上にある。タンパク質主鎖 N-H (88 個) やアルギニン側鎖 Nε-He (3 個) についても、RDC 値を得た。

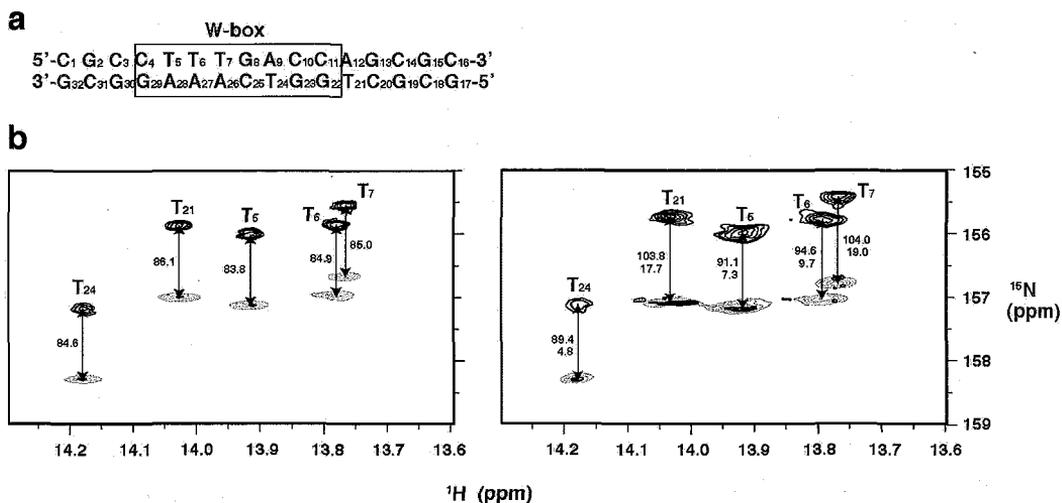


Fig. 1: IPAP-HSQC spectra of the WRKY-DNA complex. a) sequence of the double strand DNA used in the experiment, where the box indicate the putative recognition sequence of WRKY domains, W-box. b) IPAP-HSQC spectra in the DNA imide region, where the N3-H3 cross-peaks of the five labeled T bases are observed. Peaks in black and grey are from the two subspectra of IPAP-HSQC, after addition or subtraction. The sample for the spectra in the right panel contains 12mg/ml Pfl phage. Splitting values as well as RDCs (lower, in the right) in Hz are shown inside the spectra.

既に解析して得られている NOE や水素結合情報などと併せて、WRKY-DNA 複合体の立体構造を計算した (Fig.2)。収束度 (RMSD) は、タンパク質と、DNA のうちタンパク質と接触している 7 塩基対領域の非プロトン原子について、1.39 Å の値を示した。なお、構造計算を RDC なしで行った場合の収束度は 1.62 Å、またタンパク質の RDC のみで行った場合も 1.60 Å であり、DNA 部分の RDC が複合体構造の収束度に寄与することが示された。また、RDC の計算値と実験値の違いは平均 0.3Hz 程度であった。Alignment に関する z 軸、x 軸も、ensemble の各構造間で非常によく一致した。WRKY ドメインは 4 つのストランドからなる逆平行βシート構造であるが、最も N 末端に位置するβストランド (β1) が、DNA の major groove に沿うように入って塩基と接触することが明らかになった。この様式は、タンパク質の DNA 添加による化学シフト変化値の解析で得たモデル (文献 1) と基本的に一致しているが、DNA の軸とタンパク質のシートのなす角度が若干異なる。なお、このストランドは、WRKY ファ

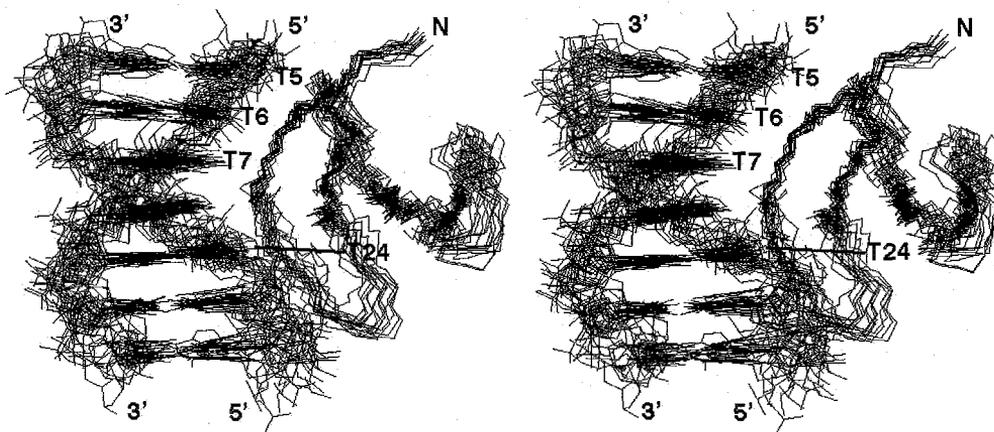


Fig. 2: Solution structure of WRKY-DNA complex. Structure ensemble shown in stereo, where T bases in this region are marked.

ミリーの名前の由来となっている、極めて保存性の高い Trp414-Arg415-Lys416-Tyr417-Gly418-Gln419-Lys420 (WRKYGQK) 配列を中心としている。

DNA の塩基部分とタンパク質の接触面においては、T 塩基のメチル基への接触が非常に多く観察された。W-box 中に含まれる 4 つの T 塩基のメチル基はいずれもタンパク質と接触しており、特に、T6 と T24 のメチル基が β 1 の主鎖と疎水性相互作用を形成している点特徴的である。すなわち、T6 のメチル基は Tyr416 の C α と、T24 のメチル基は Gly418 の C α と相互作用している。T24 はさらに、Tyr431 の芳香環などと広い範囲で接触をしている。

本研究では、これらの疎水性相互作用の重要性を検証するために、5 つの T 塩基をそれぞれ U に置換した (すなわちメチル基を除いた) DNA を合成し、表面プラズモン共鳴法による結合実験を行った。結合定数は、T6 と T24 を置換した場合、それぞれ、約 1/10、1/25 に低下した。T7 を置換した場合も約 1/2 に低下したが、T5 や T21 を置換した場合は低下がほとんど見られなかった。結合定数の低下の度合いは、本複合体モデル中の接触の度合いと、明らかに傾向が一致しており、複合体モデルの信頼性を裏付けるものと考えられる。

【参考文献】

1. Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S. *Plant Cell* 17, 944-956, 2005.
2. Ottiger, M., Delaglio, F., and Bax, A. *J. Magn. Reson.* 131, 373-378, 1998.
3. Clore, G. M., Gronenborn, A. M., and Tjandra, N. *J. Magn. Reson.* 131, 159-162, 1998.

長いRNAの構造解析をめざした部位特異的安定同位体標識

篠阿弥宇¹, 今井美咲¹, 伊谷野悠里¹, 斉藤裕之¹, 福田健治²,
○河合剛太¹

¹千葉工大・工・生命環境科学, ²大陽日酸・SI合成研

Site-specific stable-isotope labeling toward the structural analysis of larger RNA

Amiu Shino¹, Misaki Imai¹, Yuri Iyano¹, Hiroyuki Saito¹, Kenji Fukuda², ○Gota Kawai¹

¹Department of Life and Environmental Sciences, Chiba Institute of Technology, Japan.

²Tsukuba Laboratory SI., Taiyo Nippon Sanso Corporation, Japan.

RNA is now known to have variety of biological functions and, thus, structure of functional RNA domains must be analyzed. In order to challenge to RNA domains consists of more than 100 residues, methods for site-specific stable-isotope labeling of larger RNA is required.

In this presentation, we introduce two techniques for labeling of larger RNA by (1) chemical synthesis of RNA fragment with stable-isotopically labeled phosphoramidite unit, and (2) enzymatic ligation of labeled RNA fragments. 135nt RNAs corresponding to the tRNA-like structure located at the 3'-terminus of *Brome mosaic virus* genomic RNA were prepared by the combination of the two techniques and NMR spectra of those were measured. These techniques will increase the length of RNA to be analyzed by NMR.

序論

近年, ncRNAが生体内に数多く存在し, 遺伝子制御・細胞分化など多くの重要な機能を担っていることがわかってきた. また, 動物や植物に感染するウイルスでRNAゲノムをもつものも多く, これらに含まれる機能ドメインの構造を明らかにすることは重要である. しかし, これら機能ドメインは百残基を超える大きさであることが多く, NMRによるこれまでの手法では解析が難しい.

本研究では, 比較的長いRNA(数百残基)の構造と機能を解析するための技術を開発することをめざし, 標識アミダイトユニットを用いた標識RNAの化学合成およびRNA連結酵素による連結反応を利用して, 長いRNAを部位特異的に標識し, 構造情報を得ることをめざしている.

今回は, 植物ウイルスである*Brome mosaic virus* (BMV) のゲノムおよびサブゲノムRNAの3'末端に存在する約160残基からなる機能ドメインであるtRNA-like structure (TLS) を題材とした (Fig. 1).

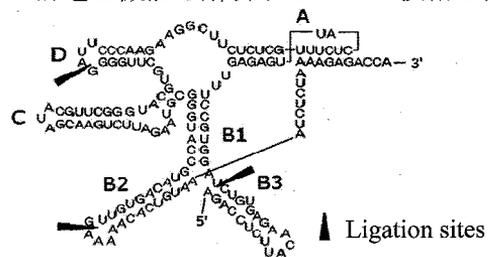


Fig. 1 Secondary structure of BMV TLS.

RNA, 安定同位体標識, 植物ウイルス

しのあみう, いまいみさき, いやのゆり, さいとうひろゆき, ふくだけんじ,
○かわいごうた

方法

RNA自動合成機Expedite 8909 (PerSeptive Biosystems) を用いてRNA断片を合成し、T4 RNA ligaseを用いて連結反応を行った。135残基RNAの転写合成は、BMV RNA4のクローンからPCR法によって鋳型DNAを合成し、AmpliScribe T7 (Epicentre) を用いて行った。BMV RNA4のcDNAクローンは三瀬和之博士(京都大学)より分譲された。

結果

Fig. 2は、TLSを調製するための連結反応のスキームを示している。今回は、最初の2段階までの合成を行った。Fig. 3は連結反応後の反応液を変性PAGEで分析した結果である。

1段階目の反応ではおよそ50%程度の連結が確認でき、2段階目ではさらに高い連結効率であることがわかる。連結反応を用いて合成したRNAと転写反応によって1段階で合成したRNAのイミノプロトンスペクトルはほぼ一致した。したがって、配列だけでなくコンホメーション的にも転写物と同一のRNAが得られていることが確かめられた。

Fig. 4は、135残基中の2残基のみを選択的に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識したRNAの $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ SQCスペクトルを示しており、2つのアデノシン残基に由来するH2およびH8のシグナルが観測されている。このRNAは、自動合成機によって部位特異的に2残基のみを標識したRNAを合成し、それを2段階目の反応に用いて調製したものである。このように、化学合成および連結反応を利用して、部位特異的に標識した長いRNAを調製し、そのNMRスペクトルを測定することができることを実証した。

考察

私たちはこれまでにHIV-1ゲノムRNAの二量体化開始部位由来の39残基RNA(二量体として78残基)の立体構造を決定したが、これはNMR法によって決定されたもっとも大きいRNAの一つである。本手法を活用することによって、さらに長いRNAの立体構造が解析できると期待している。

本研究は、JSTによる産学共同シーズイノベーション化事業および理化学研究所・先端研究施設共用イノベーション創出事業のサポートを受けています。

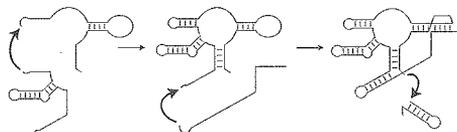


Fig. 2 Preparation of TLS by 3 step ligation.

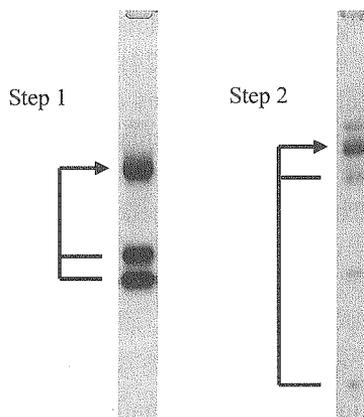


Fig. 3 Results of Ligation reaction.

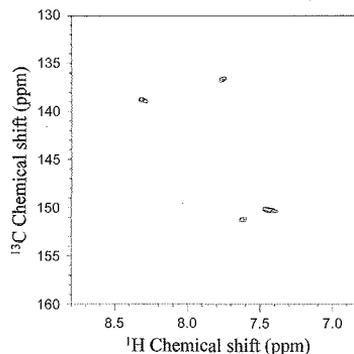


Fig. 4 $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ SQC spectrum of a 135 residues TLS prepared by ligation with a fragment having two [$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$]adenosine residues.

Structural analysis of the catalytic center of an artificial ligase ribozyme○Hirotsu Meya¹, Yoshiya Ikawa^{2,3}, Gota Kawai¹, Taiichi Sakamoto¹¹Department of Life and Environmental Sciences, Chiba Institute of Technology.²Department of Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, ³PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST).

An artificial ligase ribozyme consisted of a designed RNA scaffold and a selected active site has been obtained and biochemical studies revealed that the ribozyme requires Mg²⁺ ions. To investigate structure-function relationship of the ribozyme, we analyzed the tertiary structure of the catalytic core (L24) of the ribozyme and the interaction between L24 and metal ions. The calculated structures of L24 were converged well in the stem regions. To improve the convergence of the calculated structures of L24, we will introduce information from residual dipolar couplings into the structure calculation. It was suggested, by a titration experiment with Co(NH₃)₆³⁺, that metal ions bind to the internal loop.

序論

近年, 既知の RNA 構造体を組み合わせてモデリングした RNA 構造体に 30 残基のランダム配列を挿入し, *in vitro* selection 法によって ligation 反応を触媒する人工 ribozyme が作製された¹⁾ (Fig. 1). この ligase ribozyme の反応には, Mg²⁺ イオンが必要であることがわかっている²⁾. 本研究では, この ribozyme の触媒メカニズムを明らかにすることを目的とし, 活性中心を構成する 24 残基の RNA 断片 (L24) をデザインし, 立体構造の解析および金属イオン結合部位の解析を行った.

方法

[NMR スペクトルの測定および立体構造計算]

L24 を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に溶かし, 500 MHz および 600 MHz の NMR 分光計 (Bruker) を用いて, 283 K および 310 K において NMR スペクトルを測定した. 立体構造計算は, CNS を用い, Simulated Annealing 法で行った.

[Co(NH₃)₆³⁺を用いた金属イオン結合部位の解析]

L24 と hexamine cobalt (III) (Co(NH₃)₆³⁺) をモル比 1 : 1 になるように混合し, 軽水中において 2D HOHAHA スペクトル, 2D NOESY スペクトルを測定した.

ribozyme, ligase, 金属イオン

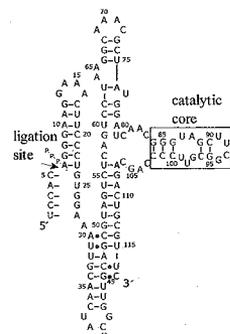


Fig. 1 Secondary structure of the ligase ribozyme.

○めやひろたつ, いかわよしや, かわいごうた, さかもとたいいち

結果および考察

[NMRスペクトルの測定および立体構造計算]

重水中で、2D NOESYスペクトルを測定し、NOEシグナルの帰属を行った。その結果、H2/H6/H8-H5/H1'領域のほぼすべてのNOEシグナルを帰属できた。しかし、他の領域では、内部ループに由来するシグナルが重なっていることがわかった。NOESYスペクトルから185個の距離情報を抽出した。また、HOHAHAスペクトルから7個のリボースパッキング情報を得た。さらに、すでに構造が明らかとなっているUUCGテトラループの二面角情報およびA型らせん等の情報を加えて立体構造計算を行った。その結果、上部ステム部分および末端ステム部分について、平均構造に対するr.m.s.d.を求めたところ、それぞれ1.24 Å, 1.74 Åであり、ほぼ収束していた。しかし、分子全体では収束しておらず、原因として、内部ループに由来するシグナルの重なりにより、NOE情報が少なくなったことが考えられる。今後は、内部ループに由来するNOEシグナルの重なりを解消するために、部分標識したL24を用いた内部ループのNOEシグナルの解析を行う。さらに、構造の精密化を行うため、残余双極子相互作用の情報を導入する。

[Co(NH₃)₆³⁺を用いた金属イオン結合部位の解析]

Mg(H₂O)₆²⁺とCo(NH₃)₆³⁺はほぼ同じ大きさで、RNAとCo(NH₃)₆³⁺の間で特徴的なNOEシグナルが観測されることから、金属イオン結合部位の解析には、Co(NH₃)₆³⁺を用いた。Co(NH₃)₆³⁺非存在下および存在下のHOHAHAスペクトルを比較した結果、多くのピリミジン残基のH5-H6の相関シグナルがシフトしており、特に、U6およびU17に由来するシグナルが大きくシフトしていた (Fig. 2)。Co(NH₃)₆³⁺存在下のNOESYスペクトルを帰属した結果、3.5 ppmのCo(NH₃)₆³⁺に由来するシグナルとG4およびG5のイミノプロトンシグナルの間にNOEシグナルが観測された (Fig. 3)。

H5-H6の相関シグナルのシフトおよびイミノプロトンとCo(NH₃)₆³⁺の間のNOEシグナルから、L24の金属イオン結合部位は、内部ループ周辺であることが示唆された (Fig. 4)。金属イオンが結合したことによる内部ループの構造の変化が、Ligase ribozymeの活性に関与しているかもしれないので、今後、金属イオン存在下で構造解析を試みる。

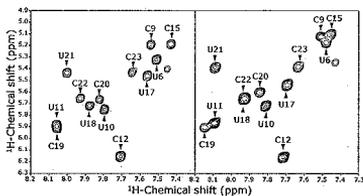


Fig. 2 2D HOHAHA spectra in the absence (left) and presence (right) of Co(NH₃)₆³⁺.

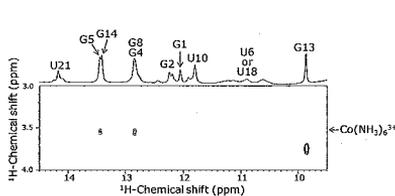


Fig. 3 2D NOESY spectrum in the presence of Co(NH₃)₆³⁺.

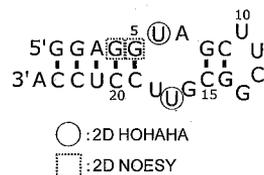


Fig. 4 Secondary structure of L24 and residues affected by Co(NH₃)₆³⁺.

- 1) Ikawa, Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13750-13755 (2004).
- 2) Horie, S. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 115-121 (2006).

In-cell NMR法を用いた生細胞内におけるプロテインG B1ドメインの高次構造解析

○花島 知美^{1,2}, 浜津 順平^{1,2}, 白川 昌宏^{2,3}, 三島 正規^{1,2}, 池谷 鉄平^{1,4}, Peter Güntert^{1,4}, 伊藤 隆^{1,2}
(¹首都大院・理工, ²CREST/JST, ³京大院・工, ⁴Frankfurt大・生物物理化学研究所)

Structure determination of protein G B1 domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy

○Tomomi Hanashima^{1,2}, Junpei Hamatsu^{1,2}, Masahiro Shirakawa^{2,3}, Masaki Mishima^{1,2}, Teppei Ikeya^{1,4}, Peter Güntert^{1,4}, and Yutaka Ito^{1,2}
(¹Dept. of Chem., Tokyo Metropolitan Univ., ²CREST/JST, ³Dept. of Eng., Univ. of Kyoto, ⁴Institute of Biophysical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance, J. W. Goethe-Univ. Frankfurt)

In-cell NMR spectroscopy yields multi-dimensional NMR spectra of macromolecules in living cells. We reported the first 3D protein structure calculated exclusively on the basis of information obtained in living cells.

In this presentation, as an another demonstration of our methodologies for protein structural analyses *in vivo*, we report in-cell NMR studies of *Streptococcus* protein G B1 domain overexpressed in *E. coli* cells. For backbone and side-chain resonance assignments, we measured and analysed the 3D triple-resonance NMR spectra. Rapid data collection using nonlinear sampling, combined with maximum entropy data processing, was the key for the spectral analyses of G B1. This method provided 3D NMR spectra of much higher quality than conventional spectra recorded in the same short measurement time. All backbone resonances of G B1 have been assigned exclusively from the data obtained in living *E. coli* cells. Side-chain analysis, collection of NOE-data distance restraints and three dimensional structure determination of G B1 in *E. coli* cells is in progress.

【序】 単離・精製した蛋白質の高次構造解析は、NMR や X 線結晶構造解析などにより日常的に行われているが、このような構造生物学的解析を、生細胞内環境で行うことは不可能であった。そのため、細胞内の蛋白質の構造やダイナミクスを高分解能で測定する in-cell NMR という手法が注目されている。わたしたちは既に in-cell NMR を用いて、世界で初めて生細胞内の蛋白質の高次構造解析に成功した[D. Sakakibara *et al. Nature* (2009)]. この研究において、大腸菌内で発現させた高度好熱菌 *Thermus*

In-cell NMR, 異種核多次元NMR, 立体構造

○はなしまともみ, はまつじゅんぺい, しらかわまさひろ, みしままさき, いけやてつぺい, ぺーたー ぎゅんたー, いたうゆたか

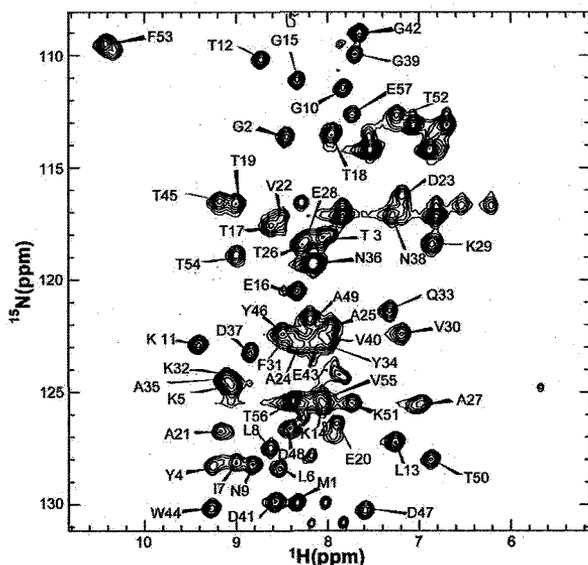
thermophilus HB8 由来蛋白質 TTHA1718(66a.a.)の高分解能な構造を得た。

本研究では、わたしたちの手法の次なる応用例として、*Streptococcus* protein GB1(57a.a.)をターゲット試料とし in-cell NMR による構造解析を試みた。異種核 3次元 NMR 測定を迅速に行うため、非線形サンプリング法を用いて測定を行い、最大エントロピー法でスペクトルを再構築することで、測定時間の短縮を図った。

【実験、結果および今後の展望】 ターゲット試料 GB1 を大腸菌発現系を用いて調製し in-cell NMR 測定を行った。蛋白質主鎖の帰属のため、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 均一標識試料を調製し、3種の3重共鳴3次元 NMR 測定 (HNCA, CBCA(CO)NH, HBHA(CBCACO)NH) を行った。非線形サンプリング法を用いて測定を行い、最大エントロピー法でスペクトルを再構築することで、短時間で良好なスペクトルを得ることに成功し、全ての主鎖シグナルの帰属が完了した(Figure)。蛋白質側鎖の帰属のため、さらに2種の3重共鳴3次元 NMR 測定 (CC(CO)NH, HCC(CO)NH)の測定を行った。

また、NOE 由来の高次構造情報の取得も試みた。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 ^{15}N -separated NOESY-HSQC, ^{13}C -separated NOESY-HSQC の測定に成功した。現在、さらなる側鎖の帰属と NOE 解析のための3次元 NMR 測定及び解析を行っており、高次構造決定を目指す。

Figure (a)



(b)

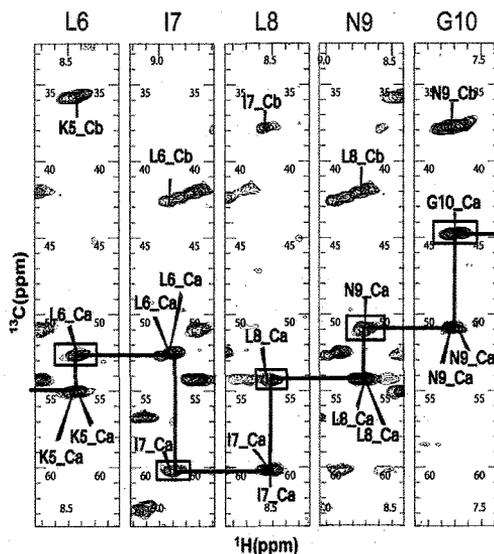


Figure:

(a) The ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled GB1 in *E.coli* cells. Cross peaks are labelled with their corresponding backbone assignments.

(b) Overlaid ^1H - ^{13}C cross-sections of the 3D HNCA and CBCA(CO)NH spectra corresponding to the ^{15}N frequencies of residues from Leu6 to Gly10. Sequential connectivities are represented by lines. Intraresidue correlations are indicated with boxes.

In-cell NMR による TTHA1718 蛋白質の生細胞内における分子動態解析

○浜津順平^{1,2}, 花島知美^{1,2}, 三島正規^{1,2}, 池谷鉄平³, Peter Güntert³,
白川昌宏^{2,4}, 伊藤隆^{1,2}

¹首都大・院理化, ²CREST/JST, ³フランクフルト大, ⁴京大・院工

Structural and dynamical studies of TTHA1718 protein in living cells by in-cell NMR spectroscopy

○Junpei Hamatsu^{1,2}, Tomomi Hanashima^{1,2}, Masaki Mishima^{1,2}, Teppei Ikeya³,
Peter Güntert³, Masahiro Shirakawa^{2,4}, and Yutaka Ito^{1,2}

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; ²CREST/JST; ³Institute of Biophysical Chemistry, J.W. Goethe-University Frankfurt, Germany; ⁴Graduate School of Engineering, Kyoto University

In-cell NMR has been used to detect various intracellular events such as conformational changes, dynamics and binding events in bacterial cells. Very recently, we reported the high resolution 3D structure of a putative heavy metal binding protein TTHA1718 from *Thermus Thermophilus* HB8 in living *E. coli* cells.

In this presentation, we report our recent studies of TTHA1718 focused on identifying the “in-cell” effects. NMR studies on the mutants that lack metal-binding activity suggested that interactions with metal ions in the *E. coli* cytosol may affect the conformation of the metal-binding region. Furthermore, we will discuss the effect of intracellular environment to protein dynamics based on the ¹⁵N relaxation parameter measured both *in vivo* and *in vitro*.

【序】 これまで In-cell NMR を利用した研究例として、大腸菌細胞内における蛋白質の構造変化やリガンドとの相互作用の解析などが報告されている^{1,2}。また、ヒト培養細胞へ膜透過性ペプチドを利用して目的蛋白質を導入し、NMR 測定を行う新たな手法を用いた研究例も報告されている³。当研究室ではごく最近、測定法の改良、および試料調製法の最適化を行うことで、大腸菌大量発現系を利用した in-cell NMR により高度高熱菌 *Thermus Thermophilus* HB8 由来の TTHA1718 蛋白質の生細胞内における立体構造決定に成功した⁴。

本研究では、細胞内環境が及ぼす蛋白質の立体構造、および動的性質への影響を解明するため、TTHA1718蛋白質をターゲットとし、大腸菌細胞内試料、および単離・精製試料中での立体構造の差異の検証、および蛋白質主鎖の¹⁵N核の緩和解析を試みた。

【実験、結果および今後の展望】 TTHA1718蛋白質は CXXC motif を持つことから重金属結合活性を持つと考えられている。TTHA1718蛋白質の大腸菌細胞内試料、および単離・精製試料から得られた、CXXC motif 近辺の残基由来のNMRシグナルから化学シフトの変化が確認され、立体構造においても CXXC motif の近辺にわずかな構造

In-cell NMR, 立体構造, ダイナミクス

○はまつじゅんぺい, はなしまともみ, みしままさき, いけやてっぺい,
ペーたーぎゅんたー, しらかわまさひろ, いとうゆたか

の差異が確認された。この構造の差異の要因を検証するため、CXXC motif の二つの Cys 残基を Ala, または Ser に組み換えた二つの二重変異体を作成し、大腸菌細胞内試料、および単離・精製試料で重金属イオン存在下、および非存在下での NMR 測定を行った。各試料から得られた NMR シグナルの解析を行った結果、二つの二重変異体からは野生型 TTHA1718 蛋白質に見られた化学シフト変化は見られず、生細胞内におけるわずかな構造の差異はこの蛋白質の金属結合活性が関与していることが示唆された。

^{15}N 核の緩和解析では、一般的には 2D ^1H - ^{15}N HSQC 測定を利用した T_1 , T_2 測定を行うが、測定に数時間必要とするため大腸菌細胞内試料では測定中の試料状態の経時変化が懸念される。そのため、Lys選択的 ^{15}N 標識試料を用い、1D ^1H - ^{15}N HSQC 測定を利用した T_1 , T_2 測定を行うことで、TTHA1718蛋白質の一部の動的性質の情報を得るとともに、大腸菌細胞内試料でも 2D ^1H - ^{15}N HSQC 測定を利用した T_1 , T_2 測定が適用可能であるかを検討した。単離・精製試料、および大腸菌細胞内試料から得られたデータを比較した結果、細胞内と細胞外でのTTHA1718蛋白質の回転相関時間には顕著な差があり(Figure1, Table1), 大腸菌細胞内試料の粘性の寄与に加え、いわゆる“Macromolecular crowding”からの動的性質への影響の可能性が伺われた。現在、均一に ^{15}N 標識した試料を用い、2D ^1H - ^{15}N HSQC 測定を利用した T_1 , T_2 測定を行い、細胞内におけるTTHA1718蛋白質の全領域での解析を行っており、その結果もあわせて報告する。

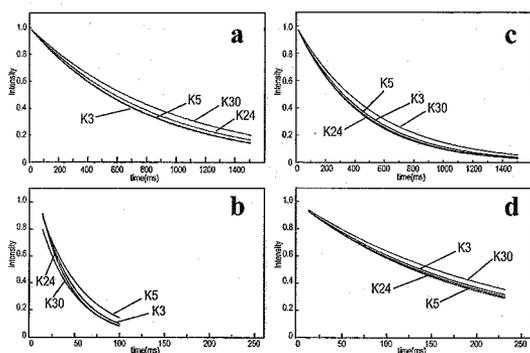


Figure 1: ^{15}N T_1 and T_2 data for the backbone amide ^{15}N nuclei of lysine residues of TTHA1718 in *E. coli* cells (a and b) and *in vitro* (c and d) are displayed with their single-exponential least-squares best-fit curves.

| Residue | Relaxation times (mean and s.d.) | | | |
|-------------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|
| | T_1 (ms), in-cell | T_1 (ms), <i>in vitro</i> | T_2 (ms), in-cell | T_2 (ms), <i>in vitro</i> |
| Lys3 | 835 ± 15 | 466 ± 3 | 44.3 ± 3.1 | 201 ± 2 |
| Lys5 | 767 ± 64 | 431 ± 26 | 47.8 ± 2.8 | 193 ± 1 |
| Lys20 | | 413 ± 3 | | 174 ± 1 |
| Lys20/Lys49 | 807 ± 18 | | 43.5 ± 1.2 | |
| Lys23 | | 433 ± 1 | | 184 ± 1 |
| Lys24 | 763 ± 42 | 429 ± 3 | 36.8 ± 2.2 | 187 ± 1 |
| Lys30 | 939 ± 76 | 525 ± 2 | 41.9 ± 5.2 | 223 ± 1 |
| Lys37 | | 424 ± 5 | | 191 ± 2 |
| Lys37/Lys61 | 946 ± 32 | | 52.2 ± 2.1 | |
| Lys49 | | 453 ± 1 | | 190 ± 1 |
| Lys61 | | 536 ± 7 | | 230 ± 2 |

Table 1: ^{15}N T_1 and T_2 relaxation times for backbone ^{15}N nuclei of lysine residues of TTHA1718 in *E. coli* cells and *in vitro*, at a spectrometer frequency of 600 MHz and a temperature of 310 K.

【参考文献】

- 1) Serber, Z. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2446–2447 (2001).
- 2) Dedmon, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12681–12684(2002).
- 3) Inomata, K. et al. *Nature*, 458, 106–109(2009).
- 4) Sakakibara, D. et al. *Nature*. 458, 102–105 (2009).

酸化ストレス防御に関わる転写コアクチベーター-MBF1と転写制御因子AP-1との複合体構造解析

○川崎久美子¹, 永井義崇¹, 広瀬進², 白川昌宏³, 伊藤隆¹, 三島正規¹

¹首都大・理工・分子物質化学

²国立遺伝学研究所・個体遺伝・形質遺伝

³京大・工・分子工

Structural studies of the complex of transcriptional coactivator MBF1 with transcriptional factor AP-1 related to oxidative stress

○Kumiko Kawasaki¹, Yoshitaka Nagai¹, Susumu Hirose², Masahiro Shirakawa³, Yutaka Ito¹, and Masaki Mishima¹

¹Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.

²Department of Developmental Genetics, National Institute of Genetics, Shizuoka, Japan.

³Graduate School of Engineering, University of Kyoto, Kyoto, Japan.

MBF1, a transcriptional coactivator, which bridges between the general transcriptional factors and the bZIP type transcriptional factors. It has been reported that MBF1 null *Drosophila* shows a remarkable phenotype under the oxidative stress, such as a shortened life span.

MBF1 prevents Cys229 of the transcriptional factor Jun from oxidation by interacting and covering with the basic region including the cysteine residue. To elucidate the mechanism transcriptional activation under oxidative stress by MBF1, we attempted to determine 3D structure of the MBF1/Jun/Fos/DNA AP1-site quaternary complex. To date, we have succeeded in the 3D structure determination of *Drosophila* MBF1 alone, and in forming the complex *in vitro*. We will present structural analysis of the complex by NMR

<序論>

MBF1 (Multiprotein Bridging Factor-1) は bZIP 型転写制御因子と基本転写因子 TBP (TATA-box Binding protein) の両者に結合し、転写コアクチベーターとして働くことが知られ、古細菌から真核生物まで進化的に保存される重要な因子である (Fig. 1)。また、最近の研究から MBF1 欠損のショウジョウバエは酸化ストレス環境下で短寿命になることが知られ、MBF1 が酸化ストレス防御に大きく関与していると考えられる。

分子レベルでは *Drosophila* MBF1 が、Jun, Fos から成る bZIP 型ヘテロダイマー転写因子 AP-1 の、Jun と相互作用することが明らかになっている。Jun の Cys229 が酸化されると Jun/Fos の DNA への結合活性が著しく減少することが知られているが、MBF1 は酸化還元状態に感受性の高いこの Cys229 が存在する Jun の塩基性領域と直接相互作用し、Jun の Cys229 の酸化を防止することで AP-1 site への結合活性を調節すると考えられている。

MBF1, 転写因子, 酸化ストレス

○かわさきくみこ, ながいよしたか, ひろせすすむ, しらかわまさひろ, いたうゆたか, みしままさき

本研究では MBF1 による酸化ストレス耐性の分子レベルでの詳細を明らかにするため、*Drosophila* MBF1/Jun/Fos/DNA AP-1 site の複合体の立体構造解析を目指し、現在までに MBF1 単体の NMR による立体構造解析に成功している。その結果、N 末端側約半分はフレキシブルで、C 末端側約半分にヘリックス構造が 4 本存在しており、DNA 結合タンパク質によくみられるヘリックス-ターン-ヘリックスに類似した構造をとっていることがわかっている(Fig. 2)。

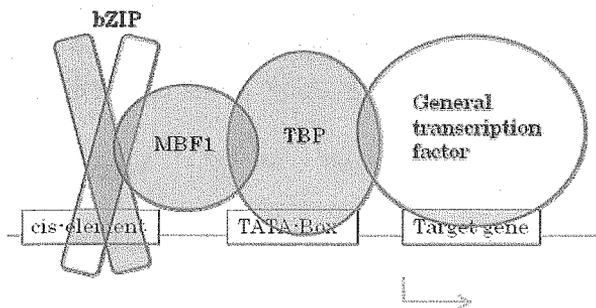


Fig. 1 Schematic representation of MBF1 in transactivation. MBF1 bridges between the general transcriptional factor TBP and the bZIP type transcriptional factors.

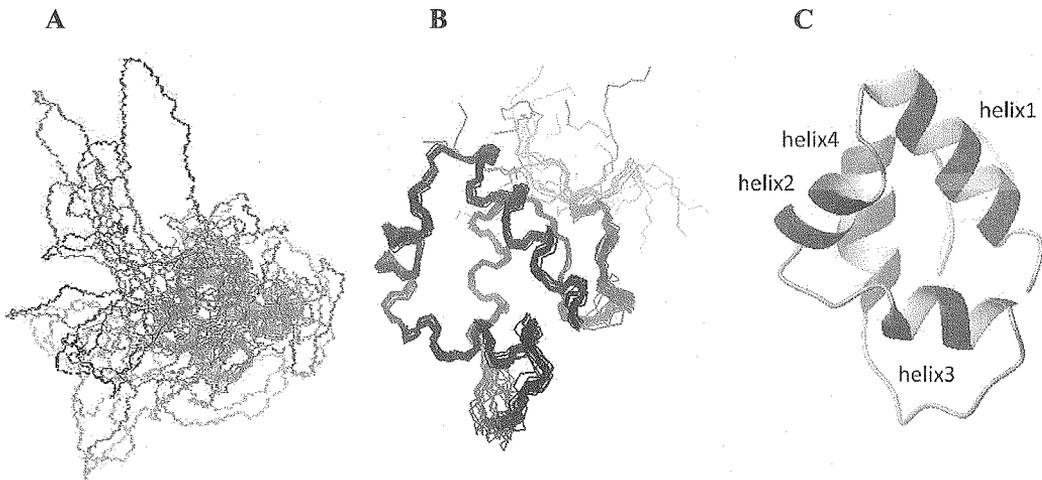


Fig. 2 MBF1 structures.

A. 20 ensemble structures of full length *Drosophila* MBF1. N-terminal part (1-72) does not adopt a well defined structure. B. 20 ensemble structures of *Drosophila* MBF1 (73-145). C. Ribbon model of the representative structure of *Drosophila* MBF1(73-145).

<実験>

1. GST タグ融合 Jun の発現・精製

当初 His タグ融合の Jun を発現・精製していたが、この方法で得た試料は濃度、純度ともに低かった。そこで、Jun を GST タグ融合に変えての発現・精製を行った。GST

タグ融合 Jun のプラスミドを作製、発現を確認し ^{15}N 標識 Jun の大量発現を行った。DEAE、GSH Sepharose に通し、GST タグを切断、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、GSH Sepharose にもう一度通し、タグとプロテアーゼの除去を行った。濃縮して NMR サンプルとし、HSQC 測定を行った。

2. Jun/Fos の共発現

GST タグ融合 Jun, His タグ融合 Fos がそれぞれ含まれるプラスミド DNA を形質転換した大腸菌を準備した。発現させた。Jun、Fos の両方が共発現していることを確認できたため、この菌体を用いて大量培養を行うこととした。bZIP 型タンパク質に関して、二量体形成時に Mg^{2+} が結合することが知られており、各精製段階でのバッファーにマグネシウムが常に過剰量存在する条件で精製を行うことで、タンパク質の安定化を図った。

3. Jun/Fos と AP-1 site, MBF1 との結合実験

Jun/Fos が結合する DNA AP-1 site を、GSH Sepharose カラム精製後に Jun/Fos 溶液に加え、Jun/Fos の DNA AP-1 site 結合部のフレキシブルな部分を結合させることで安定化することを試みた。

<結果・考察>

1. Jun の発現・精製方法の改善

Jun 単独の精製では、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果、カラムの排除体積の分画に Jun が溶出された。これは、Jun どうしの非特異的な結合により、凝集を起こしていたためと考えられる。HSQC 測定の結果得られたスペクトルでも、中央にピークが集まり、解析が困難なものであった。この測定のサンプルに DNA、Fos、MBF1 を添加して再び HSQC を測定したが、スペクトルに顕著な変化はなく、それぞれとの相互作用は確認できなかった。Jun 単独の試料は極めて不安定であることがわかったため、次のような、Jun の発現、精製方法の改善を行った。

Jun/Fos を共発現させ精製し、あらかじめ AP1-site を添加したのち、ゲル濾過クロマトグラフィーを行うと、それまで排除体積の分画にでていた Jun、Fos が、通常の方画に溶出されるようになった(推定分子量約 5 万)。よって、非特異的な結合が改善され、単分散状態の Jun/Fos/AP1-site を得ることに成功したと考えている。Jun/Fos/AP1-site 複合体の分子量は大きなものであるため、Jun/Fos を重水培地で培養・共発現させ、TROSY 法を用い測定を行ったところ、比較的分離のよいスペクトルを得ることができた(Fig.3)。

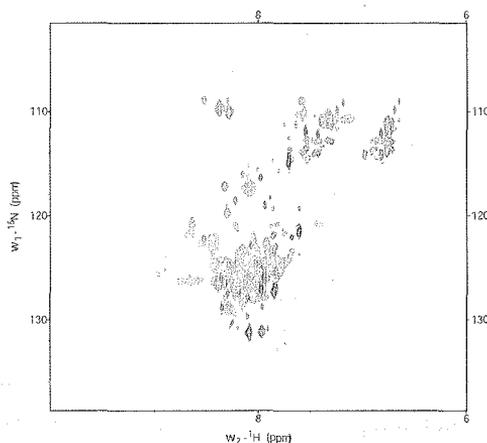


Fig. 3 TROSY spectrum
 $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ labeled Jun/Fos in complex with nonlabel AP-1 site, Mg^{2+} (5 mM)

2. AP1-site と Jun/Fos との相互作用

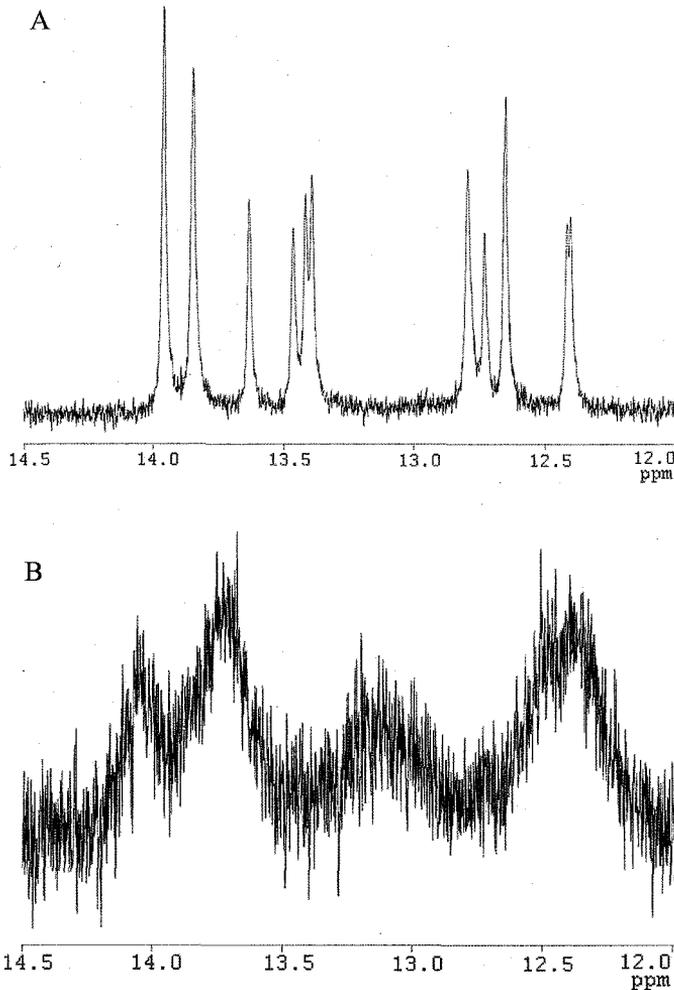


Fig. 4 ^1H spectra of imino region

A. AP-1 site alone B. Jun/Fos/AP1-site

Jun/FosのTROSYスペクトルに著しい改善がみられ、イミノ領域のスペクトルも改善した。この詳細は本討論会において議論する。

<今後の展望>

Jun、Fos、DNAの3者が結合し、NMRで解析可能なスペクトルを確認できたので、目的とするJun/Fos/CREとMBF1との複合体を形成させ、立体構造を明らかにしていく。現在までの予備的な実験から、Jun/Fos/AP1-site(CRE)とMBF1の相互作用は安定な強いものではなく、過渡的なものである可能性が高いので、分子間のParamagnetic Relaxation Enhancementの観測といった手法も用いて解析していきたい。

PREを用いたRho-kinase スプリットPHドメインの構造解析

佐藤明子¹, ○金場哲平¹, 寺脇慎一², 伊藤隆¹, 天野睦月³, 貝淵弘三³, 箱嶋敏雄², 三島正規¹

¹首都大院・理工

²奈良先端科学技術大学院・情報科学

³名古屋大・医学

Structural studies of split PH domain of Rho-kinase using paramagnetic relaxation enhancement

Akiko Sato¹, ○Tepei Kanaba¹, Shinichi Terawaki², Yutaka Ito¹, Mutsuki Amano³, Kozo Kaibuchi³, Toshio Hakoshima² and Masaki Mishima¹

¹Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

²Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology

³Graduate School of Medicine, Nagoya University

Rho-kinase, an effector of Rho small GTPase, plays a crucial role in regulation of cytoskeleton. Rho-kinase has the split PH domain consists of the PH subdomain and the C1 subdomain. Interestingly, the C1 subdomain is inserted in the middle of the PH subdomain. Although each tertiary structures of these subdomains were already reported⁽¹⁾, the structure of whole split PH domain is still unknown. Structure determination of the split PH domain including the orientation between the PH subdomain and the C1 subdomain is crucial for understanding its function. In this study, we report three dimensional structure of intact split PH domain using paramagnetic relaxation enhancement (PRE) and multidimensional NMR spectroscopy.

【序論】

Rho-kinase は細胞増殖因子などの信号を受けた低分子 G 蛋白質 Rho により活性化となり、その下流の細胞骨格系蛋白質をリン酸化する。このリン酸化により細胞分裂や神経突起の縮退などの重要な生命現象を制御している。Rho-kinase は N 末端にキナーゼドメイン、中央に Rho 結合領域を含むコイルドコイルドメイン、C 末端に PH ドメインを持つ。この PH ドメインは、その配列の途中にシステインに富む領域(C1 サブドメイン)が挿入されている独特なドメインであり、近年、スプリット PH ドメインと呼ばれるようになった。このスプリット PH ドメインはキナーゼドメインと相互作用し自己阻害することにより Rho-kinase の活性を制御している。またキナーゼドメインから解離した PH ドメインはリン脂質や細胞表層に存在する蛋白質と相互作用することで Rho-kinase の局在を決定していると考えられる。このようにスプリット PH ド

Rho-kinase, スプリットPHドメイン, 常磁性緩和効果

さとうあきこ, ○かなばてっぺい, てらわきしんいち, いたうゆたか, あまのむつき, かいぶちこうぞう, はこしまとしお, みしままさき

インは酵素活性制御、細胞内局在の決定という Rho-kinase の活性制御において非常に大きな役割を果たしている。現在までにスプリット PH ドメインの各サブドメインそれぞれの立体構造が決定されている⁽¹⁾。またスプリット PH ドメインは、2つのサブドメインが動的平衡状態にあり、揺らいだ立体構造を有していることが明らかとなっている。このような動的平衡状態にある分子については、従来法である X 線結晶構造解析や NOE を用いた立体構造決定は困難である。しかし Rho-kinase の活性制御には 2つのサブドメインが協同して機能していることが予想されるため、Rho-kinase の機能解明においてはサブドメイン間の配向を含めたスプリット PH ドメイン全体の立体構造決定が必要と考えられる。本研究ではスプリット PH ドメインによる Rho-kinase の活性制御の詳細な分子機構の解明を目的に、常磁性緩和効果(PRE)を、多次元 NMR により観測するという手法により各サブドメイン間の配向を含めたスプリット PH ドメイン全体の立体構造を決定した。

(1) Wen, W., et al. *J. Biol. Chem.*, 283(38), 26263-26273 (2008)

【実験】

大腸菌の発現系を用い、安定同位体標識をした Rho-kinase スプリット PH ドメイン (1151-1350, RhoK_{SPH}) を発現させた。RhoK_{SPH} は GST タグ融合の蛋白質として発現させた。GSH カラムを使用したアフィニティークロマトグラフィー、PreScission Protease によるタグの分離、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。RhoK_{SPH} について ¹H-¹⁵N HSQC、HNCACB、HN(CO)CACB、HNCA、HN(CO)CA、HN(CA)CO、HNCO を測定し、主鎖シグナルの帰属を行った。また、側鎖の帰属のため 3次元 C(CO)NH、H(CCO)NH、距離情報のため 4次元 ¹³C/¹⁵N separated NOESY を測定し、帰属を試みた。これらの測定では試料を重水素化することによりシグナル感度の上昇を図った。データプロセスには NMRPipe、スペクトルの解析には Sparky を用いた。

スプリット PH ドメインの全体構造を決定するため、スピンラベルによる PRE を観測した。スピンラベルは部位特異的に導入したシステインにラジカル試薬 PROXYL を付加させる方法を用いた。スピンラベルの位置を一箇所限定するため、ネイティブのシステインをセリンに置換したミュータントを作成する必要がある。RhoK_{SPH} には C1 サブドメインに存在する亜鉛結合モチーフと考えられるシステインの他に配位に関与しないシステインが 2個存在する。そのシステイン(C107、C150)をセリンに置換したミュータント C107SC150S を作成した。スペクトルの帰属のために ²H, ¹⁵N, ¹³C 標識をした RhoK_{SPH} C107SC150S について主鎖の帰属に必要な各種 3次元の測定を行い、主鎖の帰属を行った。次にラジカル試薬を付加させるために特定の残基をシステインに置換したミュータントを複数種類作成した (C150S, V49CC107SC150S, N123CC107SC150S、それぞれ 150C, 49C, 123C にラジカルが付加)。スピンラベルの位置は Wen らの決定した各サブドメインの立体構造を元に、表面露出度 30 パーセント以上であり、二次構造上に存在する残基を選択した。NMR サンプルに PROXYL を添加することでシステイン残基にラジカルを導入し、¹H-¹⁵N HSQC を測定した。更に基準

スペクトルを得るため、測定後の試料にアスコルビン酸を添加することでラジカルを除去し、同様の測定を行った。二つのスペクトルのシグナル強度の変化から、距離情報を取得し、この距離情報を用いて構造計算を行った。構造計算に用いたサブドメイン内の構造情報は、側鎖シグナルの帰属が現在解析中であるので、Wenらの構造情報をPDB (Protein Data Bank) より入手し、使用した (PDB ID : PHサブドメイン2ROV、C1サブドメイン2ROW)。

【結果】

RhoK_{SPH} C107SC150Sについて主鎖シグナルの帰属を完成させた。ミュータントのシグナルの帰属はRhoK_{SPH} C107SC150Sの帰属を元に2D ¹H-¹⁵N HSQCにより行った。スピララベル存在下でのシグナル強度(I_{PRE})とスピララベルを除去した後のシグナル強度(I_{ref})の比をとった(Fig.2)。それぞれのミュータントで異なったパターンのシグナルの消失、または強度の減少が見られた。これはスピララベルからの距離が近く、常磁性緩和効果を受けたものだと考えられる。強度比によって設けた距離制限情報と各サブドメインの構造情報をもとにCYANA ver 3.0により予備的な構造計算を行った。得られたスプリットPHドメインの立体構造をFig.2に示す。これは、2つのサブドメインが動的平衡状態にある中から過渡的にサブドメイン間に相互作用が生じている構造のうち、あるポピュレーションで存在する構造、あるいはそのそれらの平均構造が決定できたと考えられる。またAPBSを用いてこの構造の静電ポテンシャルを計算した(Fig.3)。これによりRho-kinaseのスプリットPHドメインには2つのサブドメインに渡って大きな正に帯電した分子表面が存在することが明らかとなった。

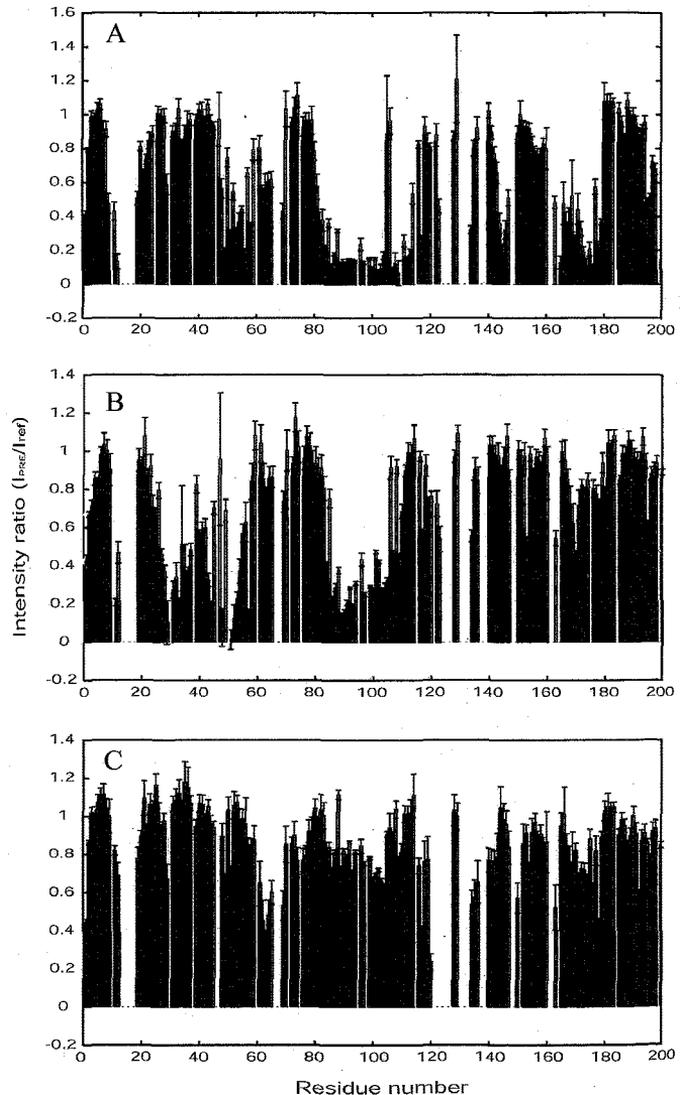


Fig.1 The plots of signal intensity ratio of Rho-kinase mutants.
(A)C150S, (B)V49CC107SC150S, (C)N123CC107SC150S with error bars.

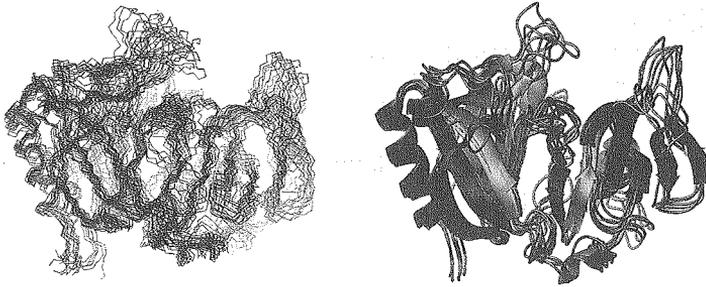


Fig.2 Structure of the split PH domain of Rho-kinase.
Best-fit superimposition of the final 20 simulated annealing structures (A) and final 10 ribbon models (B). Average backbone RMSD to the mean : 3.01 +/- 1.01 Å.

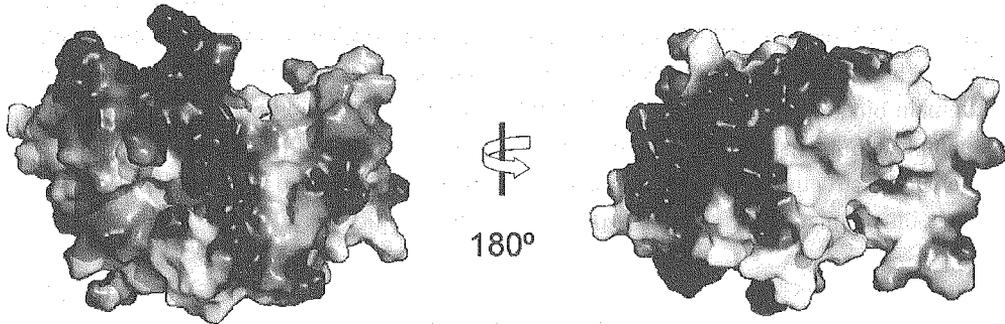


Fig.3 The electrostatic potentials mapped on the molecular surface of the split PH domain.
Molecular orientation of the left image is same as Fig. 2, and right image is 180° rotated. Positively charged regions are dark.

【考察】

構造計算によりスプリットPHドメインは、2つのサブドメインどうしが近づき、特徴的に正電荷を帯びた一つの大きなドメインのような立体構造をとっていることが明らかになった。この正に帯電した分子表面がスプリットPHドメインと他の分子との相互作用に関与している可能性があると考えられる。実際にスプリットPHドメインとの相互作用が報告されている蛋白質との結合実験を行った結果、両サブドメイン上の正に帯電する分子表面の領域で結合することを確認している。2つのサブドメインが平衡状態にある揺らいだ構造をもつ中でも、他の蛋白質との相互作用に都合のよい構造がすでにあるポピュレーションで存在する構造が存在することは、大変興味深い。

【展望】

今回決定したスプリットPHドメインの構造は十分に収束していない低分解能なものであった。今後はより多くのPRE実験を行い、距離制報を増やし、また最適化することにより、立体構造の精密化を目指す。また精密化した構造を元に、他の蛋白質や膜との相互作用と立体構造の関連についても議論していきたい。

溶液NMRによる転写抑制因子SHARP/SMRT複合体の立体構造及び機能解析

○三神すずか, 伊藤隆, 三島正規
 首都大・有機構造生物化学研

Structural and functional studies of transcriptional corepressor SHARP/SMRT complex by solution NMR

○Suzuka Mikami, Yutaka Ito, and Masaki Mishima

Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University.

SHARP is a component of transcriptional repression complex in Notch/RBP-_{JK} signaling pathway. SHARP recruits HDAC complex regulates transcription at the chromatin level. SHARP has three RRM domains at N-terminal part and the SPOC domain at C-terminal. The SPOC domain binds the C-terminal tail of SMRT. However, it was not reported the structure of this complex. In this study, we aimed to determine the structure of SPOC/SMRT complex and establish the structural basis for mechanism of transcriptional repression by SHARP. We will present biochemical and solution NMR study for the complex.

SHARPはspenタンパク質(多様なシグナル経路において重要な転写因子の発現を制御するタンパク質)のひとつであり、現在、Notch/RBP-_{JK}シグナル経路における転写抑制因子複合体の構成要素として認識されている。Notch/RBP-_{JK}シグナル経路は多細胞において進化上よく保存された経路であり、発生過程や幹細胞における細胞運命決定に関与している。

SHARPのSPOCドメイン(アミノ酸残基3496~3664)はSMRTのC末端(アミノ酸残基2492~2517)と複合体を形成する。SMRTはヒストン脱アセチル化酵素のHDACと複合体を形成しており、これと、クロマチン構造付近に局在するSHARPが結合することで、クロマチン構造レベルでの転写調節が行われていると考えられている。また、SHARPはRNA結合ドメインRRMsを有しており、ノンコーディングRNAとして唯一その転写活性化機能が知られるSRAと結合することが明らかになっている。このように、アクチベーター、コリプレッサーの両者に結合可能なSHARPの機能は転写調節において重要である。私たちはSHARPのSPOCドメインとSMRTに注目し、その複合体の立体構造及びその転写抑制の分子機構を明らかにすることを目的としている。

[実験]

大腸菌の大量発現系を用い、GSTタグ融合のSPOCドメインを発現・精製した。SPOCと化学合成したSMRTペプチド間の解離定数を求めるため、SPRを用いた結合実験を行った。SMRTペプチドはアミノ酸残基2492~2517までの25残基で、N末端がビオチン化されたものを使用した。得られた結果から、SPOCとSMRTの結合に最適な条件を検討し、この条件下で同発現系を用いて¹³C、¹⁵N同位体標識をしたSHARPと化学合成したSMRTペプチドの結合実験を行った。SHARP単体の状態とSMRTと複合体を形成した状態のそれぞれについて各種多次元NMR測定(HNCACB, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, HNCO)を行い、主鎖の帰属を行った。その帰属結果をもとに決定したSMRTとの結合に重要と考えられるアミノ酸残基をすでに報告されているSPOCドメインのX線結晶構造上にマッピング

転写抑制、クロマチン

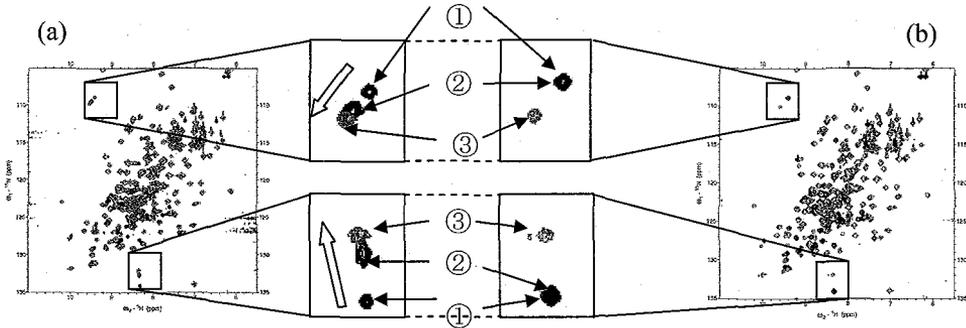
○みかみすずか、いとうゆたか、みしままさき

し、SPOCドメインのSMRT認識部位を特定した。

[結果・考察]

SPRを用いた実験により、SHARPと化学合成したSMRTペプチド間との解離定数を求めた。条件検討の結果、ある条件下では通常の1000倍近くの結合 (10^{-8} M) を示すことがわかった。実際に溶液NMRを用いた結合実験においても、通常の条件下ではSPOC単独の状態のスペクトルから複合体型のスペクトルへの変化がfast exchangeであったのに対し、特定の条件下ではslow exchangeになった。

Fig1



<Fig1> Comparison of ^{15}N - ^1H HSQC spectra. Observed chemical shift changes in fast exchange (a) and slow exchange (b). Three spectra are overlaid in both of panels (a) and (b). ①, ② and ③ correspond to SHARP:SMRT ratios, 1:0, 1:1 and 1:4, respectively.

またSPOC単独及び複合体を形成した状態の二つの主鎖の帰属結果をもとに、その化学シフト変化からSPOCにおけるSMRT結合に関与するアミノ酸残基を特定した。これらのアミノ酸残基をすでに報告されているSPOCドメインのX線結晶構造上にマッピングしたところSPOCドメインの $\beta 3$ がSMRTとの結合に寄与していることがわかった。この $\beta 3$ は結晶構造中でSPOCドメイン同士がパッキングしていた β ストランドに対応しており、 $\beta 3$ が分子間相互作用に使用されることを強く裏付ける結果であるといえる。

[今後の展望]

現在、化学合成したSMRTペプチド(8残基 ; 2510~2517)と複合体を形成したSHARPのSPOCドメイン(^{13}C , ^{15}N 標識したもの)について多次元NMR測定を行っており、複合体型のSHARPの立体構造解析を行っていく予定である。

また、同時に同位体標識したSMRT(2492~2517)を得るため、SMRT大量発現系の構築に取り組んでいる。精製が難しく、現在のところ発現・精製系の確立には至っていないが、今後条件検討を重ねていく予定である。

○吉浦 知絵¹、幸福 裕¹、上田 卓見¹、寺島 裕也^{2,3}、松島 綱治²、
嶋田 一夫^{1,4}

¹東大・院薬系、²東大・院医系、³エフェクター細胞研究所、

⁴産総研 バイオメディシナル情報研究センター

Structural analysis for the interaction between CCR5 and its ligands

○Chie Yoshiura¹, Yutaka Kofuku¹, Takumi Ueda¹, Yuya Terashima^{2,3}, Kouji Matsushima²,
and Ichio Shimada^{1,4}

¹Grad. Sch. Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. ²Grad. Sch. Med., the Univ. of

Tokyo, Tokyo, Japan. ³ECL, Inc., Tokyo, Japan. ⁴BIRC, AIST, Tokyo, Japan.

CC-chemokine receptor 5 (CCR5) belongs to the G protein coupled receptors (GPCRs) family. CCR5 plays important roles in inflammatory responses and its ligands are known as inhibitors of HIV infection. In this study, using a reconstituted HDL (rHDL) system, we have established a new sample preparation method for CCR5 with its functions, which is suitable for NMR analyses. By using this sample preparation method along with the transferred cross-saturation (TCS) method, we demonstrated that valine 63 of MIP-1 α and MIP-1 β , which were not investigated in previous mutational studies, are in close proximity to CCR5.

ケモカイン受容体CCR5 は、G タンパク質共役型受容体(GPCR) に属する膜タンパク質である。CCR5 とそのリガンド(MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) 間の相互作用は、G_i タンパク質へのシグナル伝達を介し、CCR5 を発現した白血球の遊走反応を誘起する。また、CCR5 はHIV-1 の共受容体であり、CCR5 のリガンドはHIV 感染に競合することが報告されている。このため、CCR5—リガンド間相互作用に関する構造生物学解析は、抗HIV 薬の開発において有用な知見を与えることが期待される。

しかし、CCR5 は発現量が少なく、可溶化状態において不安定である。このため、生物学的活性を保持した状態にてCCR5 を大量調製する手法は確立されておらず、構造生物学的解析は困難であった。

そこで本研究では、脂質二重膜再構成法の一つである再構成HDL (rHDL) を改良し、生物学的活性を保持したCCR5 の大量調製法の確立を目指した。さらに、rHDL に再構成したCCR5 とリガンド間相互作用に関する構造生物学的知見を得ることを目的とし、メチルプロトン検出型 TCS 実験を行った。CCR5 のリガンドである MIP-1 α およびMIP-1 β 分子上におけるCCR5 結合部位を同定することにより、CCR5 のリガンド認識機構の解明を目指した。

GPCR, 転移交差飽和法

○よしうら ちえ, こうふく ゆたか, うえだ たくみ, てらしま ゆうや, まつしま こうじ, しまだ いちお

【方法】 CCR5 は昆虫細胞発現系にて発現した。CCR5 を発現した細胞に対して超音波破碎およびシヨ糖密度勾配遠心を行い、CCR5 を含む細胞膜画分を得た。膜画分を 1 % n-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM) を含むバッファーにて可溶化し、その直後に rHDL への再構成を行った。得られた rHDL に対して、Ni アフィニティークロマトグラフィーおよび 1D4 抗体アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行い、CCR5-rHDL を得た。

メチルプロトン検出型 TCS 実験には、 $[u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}/(\text{Ile, Leu, Val})\text{-}^{13}\text{C}^1\text{H}_3]$ 標識 MIP-1α および MIP-1β を用いた。このリガンド 10 μM に対して CCR5-rHDL を約 1 μM 含む試料を調製した。測定温度を 10 °C とし、TCS 実験を行った。コントロール実験として、CCR5 を含まない rHDL を用いた TCS 実験を行った。

【結果】 (1) CCR5-rHDL の調製

上記の方法により、80 % 以上の純度で CCR5-rHDL を得たことを SDS-PAGE 解析により確認した。また、昆虫細胞 1L 培養から調製した rHDL に含まれる CCR5 の収量は、約 10 μg と見積もられた。

調製した CCR5-rHDL が、構造認識抗体 2D7 との結合活性を保持することを SPR 法により確認した。また、CCR5-rHDL の安定性を評価するため、2D7 結合量の経時変化を調べた。4 °C、24 時間後にも 85 % の 2D7 結合量が保持されることがわかった。

MIP-1β を用いたプルダウンアッセイを行い、調製した CCR5-rHDL がリガンド結合活性を保持していることを確認した。さらに、G タンパク質上の GDP-GTP 交換アッセイを行い、CCR5-rHDL がリガンド結合依存的に Gα サブユニットへのシグナル伝達を誘起することを確認した。

(2) メチル検出型 TCS 実験

MIP-1α を用いた TCS 実験では、V59 および V63 の Hγ シグナルにおいて、コントロール実験と比較して有意な強度減少が観測された (Fig.1, 2)。MIP-1β を用いた TCS 実験では、V25、V26、V63 の Hγ シグナルにおいて強度減少が観測された。

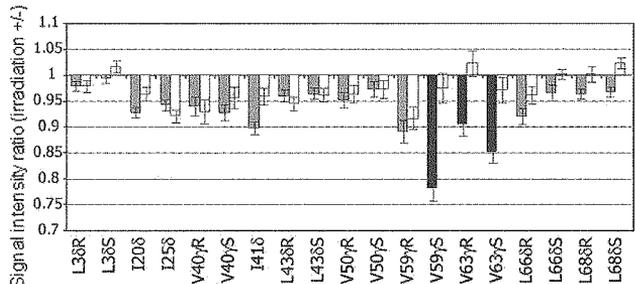


Fig. 1 Result of the TCS experiment of MIP-1α
 ■: the TCS experiment using CCR5-rHDL
 □: the control TCS experiment using empty-rHDL

【考察】 MIP-1β を用いた TCS 実験において V25、V26 にシグナル強度減少が観測されたことは、V25、V26 に近接する R22 への変異導入により CCR5 との親和性が低下するという報告と対応している。加えて、MIP-1α、MIP-1β とともに、変異導入が行われていない V63 近傍にもシグナル強度減少が観測された。MIP-1α、MIP-1β はともに CCR5 のリガンドであるが、生体内における機能には相違点がある。このため両者の受容体相互作用様式においても、共通点と相違点が存在する可能性が高い。本研究において明らかになった V63 において、MIP-1α と MIP-1β は、CCR5 に対する共通の相互作用様式を有すると考えた。

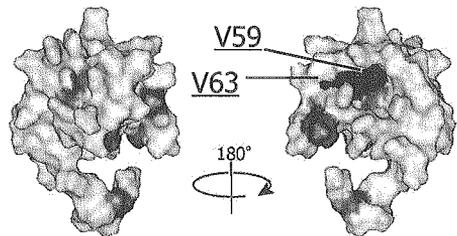


Fig. 2 Mapping of the residues affected by the irradiation on MIP-1α molecule
 ■: Residues affected by the irradiation
 □: Not affected by the irradiation

プラストシアニンと光合成明反応膜蛋白質の高効率電子輸送機構の構造生物学的解明

○古我征道¹, 小笠広起¹, 野本直子¹, 上田卓見¹, 嶋田一夫^{1, 2}

¹東京大学大学院薬学系研究科

²バイオメディシナル情報研究センター (BIRC)、産業技術総合研究所 (AIST)

Structural clarification of the efficient electron transfer mechanism between Plastocyanin and photosynthetic membrane proteins

○Masamichi Koga¹, Hiroki Ogasa¹, Naoko Nomoto¹, Takumi Ueda¹, and Ichio Shimada^{1, 2}

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

²Biomedical Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Plastocyanin (Pc) is a copper protein that donates an electron to Photosystem I (PSI) in photosynthesis. The oxidized Pc, which is formed after the electron donation, reportedly has a lower affinity for PSI than the reduced Pc. The rapid dissociation of the oxidized Pc from PSI results in an initiation of another reaction cycle in PSI, which enables the efficient electron transport. Here, we utilized the transferred cross-saturation (TCS) methods to identify the PSI binding interface of the cadmium-substituted Pc (Cd-Pc), which is a diamagnetic analog of the oxidized Pc. G10, S11 and L12 were not included in the PSI binding interface of the Cd-Pc, whereas they were included in that of the reduced Pc. We conclude that the difference is due to the increase of the mobility of L12 induced by the decrease of the distance between H87, which is in close proximity to L12, and the copper ion upon oxidation.

【目的】光合成明反応は、光のエネルギーをATPやNADPHといった化学エネルギーに変換する、植物の生命に必須な反応である。Plastocyanin (Pc) は可溶性銅結合蛋白質で、光合成明反応において、膜蛋白質複合体であるPhotosystem I (PSI) に電子を受け渡す。酸化型Pcは、還元型Pcに比べてPSIに対する親和性が10倍程度低いことが明らかになっている。このことは、反応後に生じる酸化型PcがPSIから素早く解離することで次のPc分子が迅速にPSIと結合することを可能とし、その結果全体として電子輸送反応が効率良く起こることを示している。これまでに当研究室では、転移交差飽和法 (TCS法) を用いて、還元型PcのPSIとの結合様式を解明した。しかし酸化型PcのPSI結合様式は不明であった。そこで本研究では、酸化型PcのPSIとの結合様式をNMRにより同定し、還元型PcのPSI結合様式と比較することにより、効率的電子輸送反応の機構を解明することを目的とした。

【方法】酸化型Pcにおける常磁性緩和増大効果を回避するため、反磁性の酸化型Pcアナログである、カドミウム置換体Pc (Cd-Pc) を調製した。Cd-Pcの主鎖NMRシグナルの連鎖帰属を行い、先行文献で報告されたCd-Pcのアミドプロトンの化学シフトと比

光合成, 転移交差飽和,

○こがまさみち, おがさひろき, のもとなおこ, うえだたくみ, しまだいちお

較することにより、立体構造を保持した状態のCd-Pcが単離されたことを確認した。 $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ 均一標識Cd-Pc 144 μM に対して非標識PSIミセル11 μM を混合したサンプルを調製し、転移交差飽和 (TCS) 実験を行った。

【結果と考察】TCS実験で有意な強度減少が観測された残基は、銅イオン近傍の hydrophobic patch および E59, E60 を含む acidic patch 上で連続面を形成していた (Fig. 1, Fig. 2(A))。したがって、この領域がCd-Pc上のPSI結合界面であると結論した。得られた結合界面を還元型Pc上のPSI結合界面と比較すると、Cd-Pc上の結合界面にはG10, S11, L12が含まれていない点が違っていた (Fig. 2(A), (B))。以上の結果および先行論文で報告されている非結合状態の還元型・酸化型Pcの立体構造の比較から、PSI親和性の減少による効率的電子輸送の機構を、次のように考察した。1. Pcが酸化型になると、銅イオンとH87が近接し、近傍のL12の運動性に変化が生じる。2. その結果、L12ならびに同一ループ上に位置するG10, S11を介したPSIとの相互作用が减弱し、電子移動後のPSIからの素早い解離が実現され、効率的電子輸送反応が起こる。現在、非結合状態の還元型Pc、酸化型PcおよびCd-Pcの構造およびダイナミクスの詳細な比較を行っている。

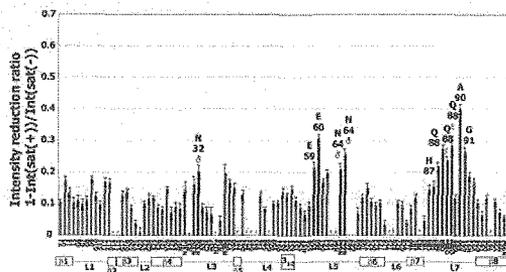


Fig.1 Plot of the peak intensity reduction of Cd-Pc in the TCS experiment with PSI

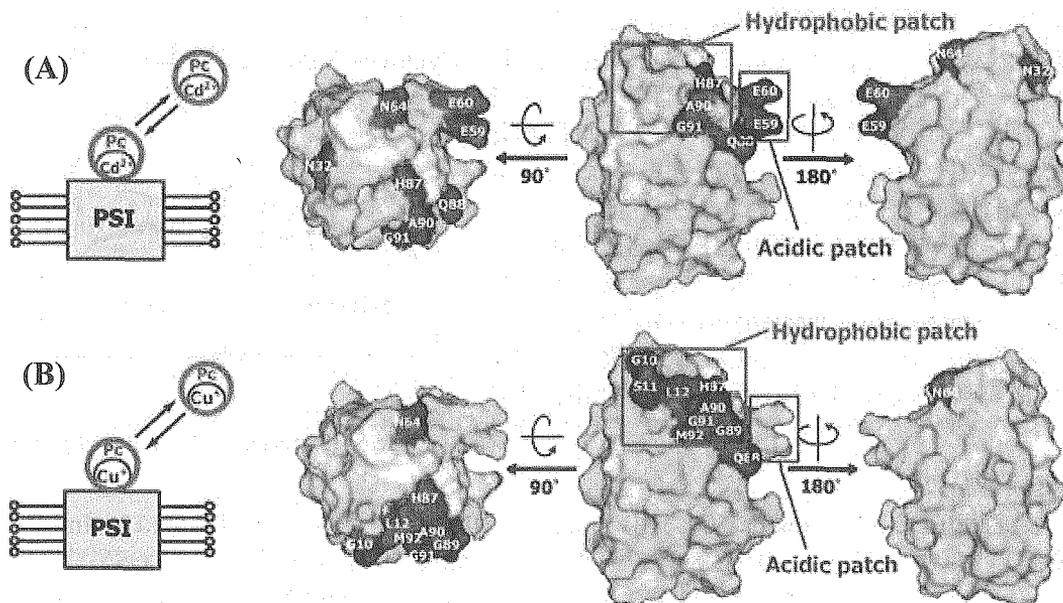


Fig.2 Mapping of the PSI binding interface residues of (A) Cd-Pc and (B) reduced Pc determined by TCS

Assigning carbon and proton signals of mono-3-amino-3-deoxy(2AS, 3AS)- α and β -CyD in D_2O

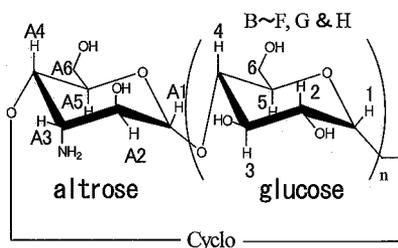
Takahashi Keiko, and ○Keita Andou

Tokyo Polytechnic University, Faculty of Engineering, Department of Life Science and Sustainable chemistry, Kanagawa, Japan.

Many modified cyclodextrins(CyDs) on secondary hydroxyl site have been reported. Since mono-3-amino-3-deoxy(2AS,3AS)-CyDs involve an altrose residue, molecular conformation should be different from that of native CyD. The measurements of proton and carbon resonance for mono-3-amino-3-deoxy(2AS, 3AS)- α , β , and γ -CyDs are performed. All chemical shifts of CyDs has been assigned.

[緒言]

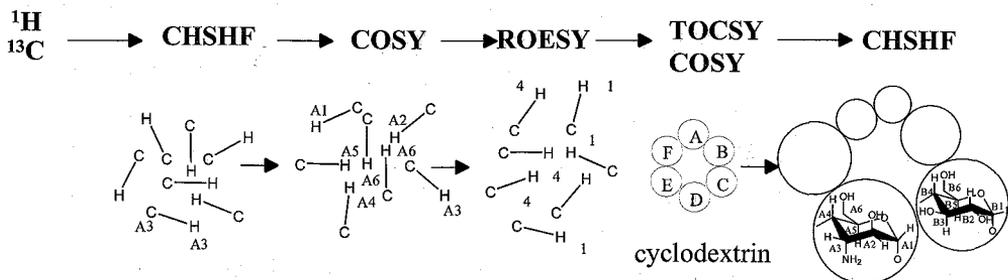
シクロデキストリン(CyD)はグルコースが6, 7および8個 α -1, 4グリコシド結合で環状に結合したオリゴ糖で、空洞の大きさの異なる α , β および γ -CyDがよく知られている。二級位水酸基にアミノ基を導入したmono-3-amino-3-deoxy(2AS, 3AS) α -, β -, および γ -CyD (3A- α , β および γ -CyD) は二級位修飾体の基幹化合物として注目されている¹⁾。これら二級位水酸基にアミノ基を導入したCyDは導入されたグルコースがアルトローズへと変換され、CyD空洞が歪み、アミノ基導入前のCyDよりNMRスペクトルは複雑になっている(Scheme 1)。当研究室では C_1 , C_4 炭素の化学シフト値とグリコシド結合二面角の相関性をCyDの α -1, 4グリコシド結合の推測に適用し、CyDの環立体構造について報告している²⁾。本研究では、NMRからCyD環構造を解析するための第一段階として3A-CyD化学シフトの ^1H , ^{13}C の全帰属を行い達成したので報告する。

Scheme 1. Structure of 3A- α , β , and γ -CyD

[実験と結果]

測定はJEOL NM-Lambda-500を用い、5 ϕ 管中30 $^{\circ}\text{C}$ にて行った。試料濃度は27.4mMである。 ^1H , ^{13}C に続き、2D CHSHFでアルトローズ3Aプロトンを確定し、COSYでアルトローズ1A, 2A, 4A, 5A, 6Aプロトンを確定した。続いてROESYにて α -1, 4結合の両端のプロトン(B4, F1)を確定し、同様の操作を繰り返しA~F環の全プロトンを確定した。
アミノデオキシ誘導体, シクロデキストリン, アルトローズ

たかはしけいこ、○あんどうけいた



Scheme 2. Strategy for assignment of modified CyD derivative.

γ -CyDについても同様に行った(Scheme 2)。構成元素の数が多く ROESY, TOCSYでは
 相関ピークの重複を避け、帰属を正確に行うためF1, F2-acquisitionパラメーターポ
 イントを同数としての測定が必要であった。

^1H および ^{13}C の全帰属をFig.1に示す。Scheme 2に示した方法は、他のオリゴ糖帰属
 にも応用でき、有用である。

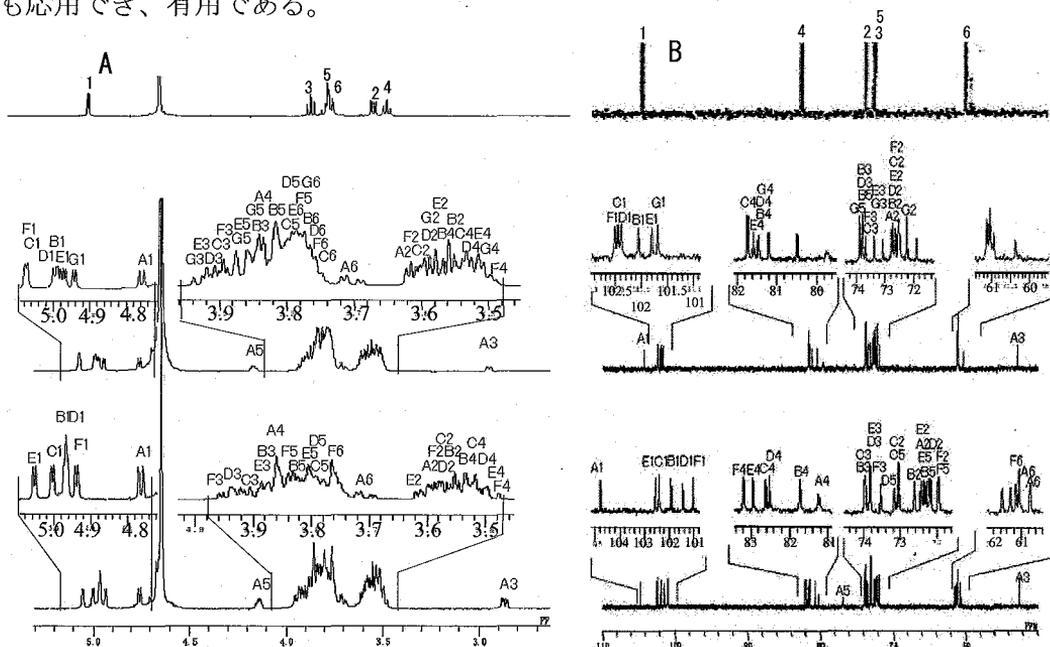


Fig.1. ^1H NMR (A) and ^{13}C NMR (B) spectra of mono-3-amino-3-deoxy(2AS,3AS) α -CyD (bottom) ,
 mono-3-amino-3-deoxy(2AS,3AS) β -CyD (middle) and β -CyD (top).

[参考文献]

- 1) Christopher J Easton, Stephen F Lincoln, "Modified Cyclodextrins" Imperial College Press, Singapore (1999).
- 2) Keiko, T.; *Bull. Chem. Soc., Jpn.*, **66**, 550-554 (1993).

ヒストンアセチルトランスフェラーゼEsa1のクロモドメインのNMRによる立体構造解析

○下條秀朗¹, 佐野徳彦², 森脇義仁¹, 奥田昌彦¹, 堀越正美², 西村善文¹

¹横浜市大・院生命ナノシステム

²東大・分生研・発生分化構造

Structural studies on the presumed chromodomain from a histone acetyltransferase, Esa1

○Hideaki Shimajo¹, Norihiko Sano², Yoshihito Moriwaki¹, Masahiko Okuda¹, Masami Horikoshi², and Yoshifumi Nishimura¹

¹Department of Supermolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.

²Laboratory of Developmental Biology, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Chromodomains are methylated histone binding modules which have been widely studied. Interestingly some chromodomains are reported to bind to RNA and/or DNA, although the molecular basis of their RNA/DNA interactions has not been solved. Essential Sas-related acetyltransferase 1 (Esa1) contains a presumed chromodomain. We initially determined the solution structure of the Esa1 presumed chromodomain and showed it to consist of a well folded structure containing a five stranded β barrel similar to the tudor domain and to have no RNA/DNA binding ability. Since its N-terminus forms a helical turn, we prepared an N-terminally extended version of the protein, which was surprisingly found to bind to poly(U) and to be critical for *in vivo* function. This extended protein contains an additional β -sheet which acts as a knot for the tudor domain. The knot does not globally change the core structure but induces a well defined loop in the tudor domain itself, which is responsible for RNA binding.

真核細胞において染色体 DNA はクロマチン構造をとっている。クロマチンの構成単位はヒストン H2A, H2B, H3, H4 が各二分子からなるヒストンオクタマーに 146 塩基対の DNA が 1.75 回転左巻きに巻きついたヌクレオソームコアである。基本転写因子や RNA ポリメラーゼがプロモーター上に結合して転写反応を開始するにはクロマチンリモデルリングが必要である。クロマチンリモデルリング因子には、ATP 依存的 SWI/SNF 様複合体とヒストンアセチル化酵素 (HAT) の 2 種類がある。これらの因子が協調的に働き RNA ポリメラーゼによる転写が促進される。

Solution structure

○しもじょうひであき, さのりひこ, もりわきよしひと, おくだまさひこ, ほりこしまさみ, にしむらよしふみ

ヒストンの修飾にはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO化、ADPリボース化が知られている。ヒストンのリジン残基をアセチル化するヒストンアセチル化酵素は、転写、DNA複製や修復、ヘテロクロマチン形成のような核内プロセスに関係している。配列相同性をもとに分類された p300/CBP、SRC、TAF1、ATF-2、GNAT、MYST ファミリーが知られ、それぞれ特異的にヒストンテールのリジン残基をアセチル化する。MYST ファミリーは様々な生物種で機能が多岐にわたっている。

Esa1 (Essential Sas-related Acetyltransferase 1) は *Saccharomyces cerevisiae* の NuA4 複合体の酵素サブユニットであり、H4/H2A ヒストンをアセチル化する。他のヒストンアセチル化酵素と異なり細胞周期進行に必要で、唯一酵母の生育に必須である。Esa1 には N 末側にクロモドメイン、C 末側に MYST-HAT ドメインがある。(Fig. 1) クロモドメインはメチル化されたヒストン結合モジュールとして広く知られている。しかし、*in vitro* や *in vivo* で RNA や DNA との結合が報告されているクロモドメインもある。これら RNA や DNA との結合能が生物学的に重要であることが知られているが、その結合メカニズムはまだ解明されていない。本研究では NMR を用いて

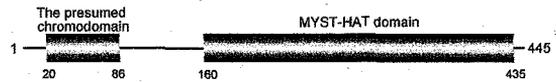


Fig. 1 Schematic representation of the Esa1

Esa1 クロモドメインの構造解析し、

構造に基づいて Esa1 クロモドメインの新たな知見を得ることを試みた。

酵母由来の Esa1 クロモドメインの大量培養・精製を行った。多次元多種核 NMR 法により、種々の測定により主鎖及び側鎖の帰属、構造計算を行った。また、DNA/RNA との結合実験を行った。

Esa1 クロモドメインとして予測された領域の構造解析を行った。その構造は 5 本の β ストランドからなる β バレル構造であった。このタンパク質の核酸結合実験では、RNA と DNA とともに結合が観測されなかった。先の構造解析の結果、N 末領域に何らかの特定の構造を取るのではないかと考えられたため、新たに N 末を伸ばした領域の構造解析を行った。その構造は β バレル構造に加え、新たに N 末と C 末それぞれの β ストランドによる β シートが形成された。さらに RNA に結合、また DNA に対し弱い結合が観測された。

Esa1 クロモドメインの構造は、SMN タンパク質の tudor ドメインに大変類似していたが、N 末と C 末それぞれの β ストランドによる β シートが新たに形成され tudor ドメインに knot 様構造が付加された新規な構造であった。この knot 様構造が RNA との結合に必要なが、結合部位ではなく、コアの構造を変化させずにコアに機能が誘起されたと考えられる。

○森脇義仁¹, 佐藤昌彦¹, 長土居有隆¹, 西村善文¹¹横浜市大・生命ナノシステム・生体超分子システム科学**The structural analysis of the nucleosome core by NMR spectroscopy**○Yoshihito Moriwaki¹, Masahiko Sato¹, Aritaka Nagadoi¹, Yoshifumi Nishimura¹¹Lab. of Struct. Biol., Grad. Sch. of Supermol. Biol, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.

In eukaryotic cells, DNA is stably stored in a highly ordered structure, chromatin. Its fundamental repeating structural unit is a nucleosome core, which is comprised of 147 bp of DNA and a histone octamer, consisting of two copies of histones, H2A, H2B, H3 and H4. Here, we try to clarify the structure of the H2A/H2B complex in solution by NMR; each molecular weight of H2A and H2B is about 14kDa. At first we prepared the recombinant H2A and H2B proteins in *E. coli* by labeling ¹⁵N or ¹⁵N and ¹³C, however the backbone assignments of the complex was very difficult. So now we try to prepare the SAIL-labeled H2A and H2B proteins by using cell-free method.

真核生物のクロマチン構造の単位であるヌクレオソームコアは約 147 塩基対の DNA と 4 種類のヒストン H2A、H2B、H3、H4 の 2 量体からなるヒストン 8 量体で形成されている。ヌクレオソームコア中のヒストンがアセチル化、脱アセチル化、メチル化など様々な修飾を受けることにより、遺伝子の発現は制御される。

X 線結晶構造解析によって、修飾されていないヒストンオクタマーと同じ 73 塩基対が回文配列の 146 または 147 塩基対からなる二重鎖 DNA で構成されたヌクレオソームコアおよび 147 塩基対が 4 回繰り返されたオリゴマーのヌクレオソームコアの立体構造が既に解かれている。しかし、ヌクレオソームコアの溶液中での詳細構造を解析することは、ヒストンタンパク質の修飾の場所・種類や二重鎖 DNA の配列の違いが構造にどのように影響を与えているかを解析し、遺伝子の発現制御を理解する上で必要不可欠である。

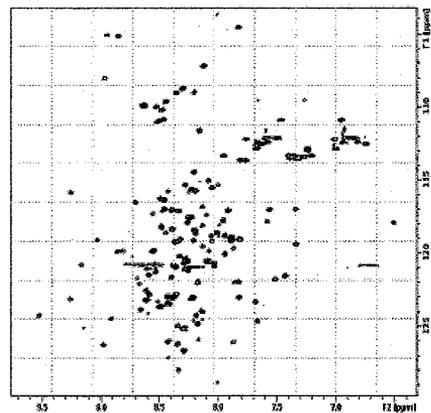


Figure 1. ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of the ¹⁵N-labeled H2A/nonlabeled H2B complex.

ヒストン, SAIL, NMR

○ もりわきよしひと, さとうまさひこ, ながどいありたか, にしむらよしふみ

我々は先ず H2A/H2B ヘテロ 2 量体の溶液中での詳細構造を決定し、遺伝子制御機構の理解へとつなげることを目的とした。大腸菌発現系では H2A と H2B は沈殿物に回収されたので、可溶化して H2A/H2B ヘテロ 2 量体を作製した。

Figure 1.に示すように、 ^{15}N -labeled H2A/nonlabeled H2B の ^1H - ^{15}N HSQC 測定に成功した。H2A/H2B 複合体は H2A、H2B どちらも大きさが約 14kDa であり、複合体では 28kDa になる。 ^{15}N 、 ^{13}C -labeled H2A/nonlabeled H2B を測定したが、現時点で骨格の帰属が困難であった。そこで SAIL 法によりラベル化したタンパクを用いて立体構造解析を行うことを試みた。SAIL アミノ酸を用いることにより、これまでよりも大きなサイズのタンパクの、側鎖を含む詳細な構造決定が可能である。側鎖の構造決定は、現在未解明である多くのヒストン修飾機構の解明に大きく貢献することが期待される。SAIL アミノ酸を用いるには、ラベル化効率を損なわないために cell-free によるタンパク合成が必須となるが、我々は大腸菌抽出液を用いた cell-free タンパク合成反応による H2A 及び H2B の大量合成に成功した(Figure 2.)。H2A/H2B 複合体の構造解析に成功した後は、H3/H4 ヘテロ 4 量体の構造決定、さらにはヒストン 8 量体を構築し翻訳後修飾部位の構造解析にも挑戦する予定である。

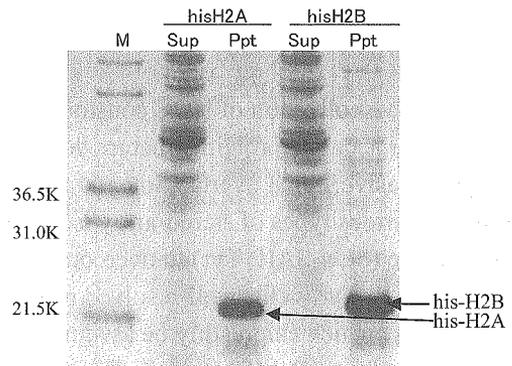


Figure 2. SDS-PAGE of his-tagged H2A and his-tagged H2B synthesized by cell-free reactions.

○武田光広¹, 甲斐荘正恒^{1, 2}¹名大院・理²首都大東京**NMR study of protein structure and dynamics by using SAIL aromatic amino acids**○Mitsuhiro Takeda¹, and Masatsune Kainosho^{1,2}¹ Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan.² Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Japan.

The extensive collection of NOE constraint data involving the aromatic ring signals is essential for accurate protein structure determination, although it is often hampered in practice by the pervasive signal overlapping and tight spin couplings for aromatic rings. We have prepared various types of stereo-array isotope labeled phenylalanines (δ -, ϵ - and ζ -SAIL Phe) and tyrosine (δ -, ϵ -SAIL Tyr) to overcome these problems. Each of the various types of SAIL Phe and SAIL Tyr yields well-resolved resonances for the δ -, ϵ - or ζ - $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ signals, respectively, which can readily be assigned by simple and robust pulse sequences. We demonstrate for the NMR analysis of an 18.2 kDa protein, *E. coli* peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase b (EPPIb) that the concomitant use of various types of SAIL-Phe and SAIL-Tyr would be effective in generating accurate protein structures.

蛋白質内部に含まれるフェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr) 残基の芳香族プロトンとその周囲のプロトンとの間には、蛋白質の構造決定において重要な拘束条件を与えるNOEが観測される。しかし、従来の均一 ^{13}C 、 ^{15}N 標識 (UL) 試料から得られる芳香族スペクトルは複雑なため解析が非常に難しい。我々が開発を進めている立体整列同位体標識 (Stereo-array isotope labeling; SAIL) 法は、高度に立体・位置選択的安定同位体標識を施した蛋白質試料を利用して、NMRスペクトルを簡略化する技術であり、現在も新しいNMR解析法の可能性を追求し、安定同位体標識パターンの思考錯誤を続けている。Phe、Tyr残基についてはこれまでに δ 、 ϵ 、 ζ -SAIL Phe および δ 、 ϵ -SAIL Pheを開発している (Fig. 1) (2, 3)。SAIL Phe、Tyrの芳香環の構造は、観測対象とする水素と炭素のみ ^1H - ^{13}C とし、他の水素、炭素を ^2H 、 ^{12}C とすることを原則としている。

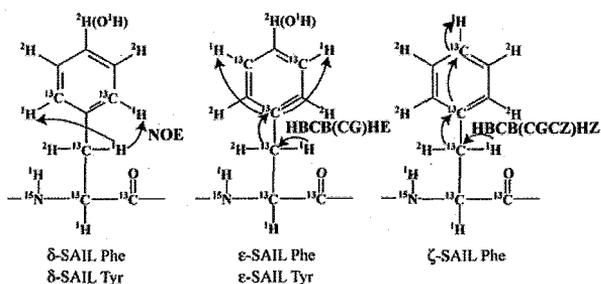


Fig. 1 Structures and assignment strategies of SAIL phenylalanine and tyrosine residues

SAIL法, 蛋白質, 芳香族アミノ酸

○たけだみつひろ, かいのしょうまさつね

これらSAIL Phe, Tyr残基は互いに観測対象が芳香環の δ 、 ϵ あるいは ζ 位かという点において異なるが、この観測位置の差が実際の構造解析にどのように影響してくるかという点は興味深い。我々は、この点を検証するため、まず δ -、 ϵ -あるいは ζ -SAIL Pheにより選択標識した大腸菌シストランスイソメラーゼ (EPPIb)を調製して得られる芳香族スペクトルを比較した。3種類のSAIL Phe標識体はいずれも、芳香環内のスピン結合、磁気双極子相互作用が除去されているため、UL Phe 標識体と比較して格段に簡略化された芳香族スペクトルを与えた (Fig. 2)。特筆すべき点は、 ζ -SAIL Phe 標識体においてはEPPIbに含まれる12残基のPheに対応したシグナルが全て観測されたのに対して、 δ -および ϵ -SAIL Phe標識体においては、Phe27、Phe110、Phe123の3残基のシグナルが著しく広幅化していた。この広幅化は同3残基の芳香環 C_{β} - C_{γ} 軸まわりの180度回転運動による化学交換の影響と考えられる。さらに、Phe、Tyr残基のみ標識パターンが異なる3種類の

SAIL-EPPIb 蛋白質を実際に調製して構造解析を行った。その結果、得られた20構造の主鎖RMSDを調べると、 δ -SAIL Pheと δ -SAIL Tyrを用いた場合1.01 Å、 ϵ -SAIL Pheと ϵ -SAIL Tyrを用いた場合0.79Å、 ζ -SAIL Pheと ϵ -SAIL Tyrの場合0.60 Åの値を示した。この差は、上述した、 δ -、 ϵ -SAIL Phe における芳香環回転運動の影響に加え、 H_{δ} 原子より、 H_{ϵ} 、 H_{ζ} 原子が遠位のNOE距離情報を多く与えることに起因する。また、これらのNOE距離制限は互いに補間性があり、3種類のSAIL-EPPIb 試料から得られたNOE距離情報を全て組み合わせると主鎖RMSD値が0.57 Åまでさらに上昇した。

以上の結果、NMR構造解析に用いる試料には、 ζ -SAIL Pheと ϵ -SAIL Tyrを用いるのが適切と考えられる (3)。また、 δ -、 ϵ -SAIL Pheおよび δ -SAIL Tyr から得られるNOE距離制限を追加することにより、さらに構造の精度を上昇出来る。

[謝辞] 本研究はターゲットタンパク研究プログラム (MEXT) および若手研究 (B) (21770110)の助成を受けて行われた。

[参考文献]

- 1) M. Kainosho, et al., (2006) *Nature* 440: 52-57.
- 2) T. Torizawa, et al., (2005) *J Am Chem Soc* 127: 12620-12626
- 3) M. Takeda, et al., (2009) *J Biomol. NMR* doi: 10.1007/s10858-009-9360-9

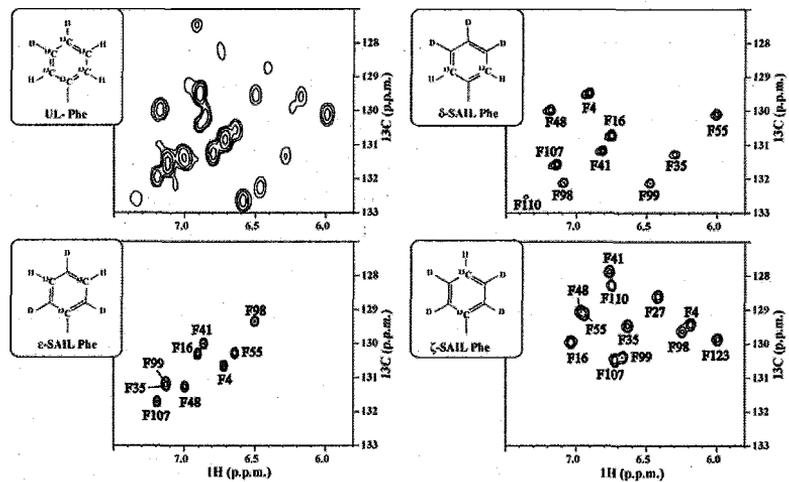


Fig. 2 NMR spectral comparisons of the aromatic regions of EPPIb's selectively labeled with the δ -、 ϵ -、and ζ -SAIL phenylalanines, to that of the uniformly ^{13}C -labeled EPPIb. (DRX600, 30°C)

Rap80ユビキチン結合モチーフによるLys63結合型ポリユビキチン鎖認識機構

○関山直孝¹、磯貝信¹、有吉真理子¹、朽尾豪人¹、白川昌宏¹
¹京大院工、

Structural analysis of Lys63-linked polyubiquitin recognition

○Naotaka Sekiyama¹, Shin Isogai¹, Mariko Ariyoshi¹, Hidehito Tochio¹,
 Masahiro Shirakawa¹

¹Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan

Lys63-linked polyubiquitin chains play an important role for DNA repair at the site of DNA double-strand breaks in human cells. Rap80 is known to recognize Lys63-linked polyubiquitin chains through its tandem ubiquitin interacting motifs (tandem UIMs) and recruit DNA repair machinery. In this study, we investigated the Lys63-linked polyubiquitin recognition mechanism using NMR spectroscopy. Based on solution NMR derived data such as chemical shift perturbations, paramagnetic relaxation enhancement and residual dipolar coupling, we built a structure model of the complex between tandem UIMs of Rap80 and Lys63-linked diubiquitin. The model reveals that the interaction mode between each pair of UIM and ubiquitin is identical to conventional UIM-ubiquitin complexes, and N-terminal UIM interacts with proximal ubiquitin and C-terminal UIM interacts with distal ubiquitin.

<序論> ユビキチンは酵母からヒトまで真核生物に高度に保存された蛋白質修飾タグである。ユビキチンは、自身の Lys48 や Lys63 を介してポリユビキチン鎖を形成し、その形成パターンにより異なる機能を発揮することが知られている。特に Lys63 結合型のポリユビキチンは DNA 二重鎖切断修復にも関与している。最近、Lys63 結合型ポリユビキチンの認識を行う蛋白質として Rap80 (Receptor-associated protein 80) が同定された^{1,2}。Rap80 は DNA 二重鎖切断が生じた部位に形成される Lys-63 結合型ポリユビキチンを認識し、様々な修復酵素をリクルートする蛋白質複合体形成の足場としての役割を担っていると考えられている。本研究では Rap80 による Lys-63 結合型ポリユビキチン認識機構を構造学的に解明することを目的とした。

<結果および考察> Rap80 には UIM (ubiquitin-interacting motif) と呼ばれるユビキチン結合モチーフが 2 個存在する (tandem UIMs)。この tandem UIMs とユビキチンおよびポリユビキチン鎖との結合実験を行ったところ、Rap80 の tandem UIMs はモノユビキチンや Lys48 結合型ポリユビキチン鎖には全く結合しないが、Lys63 結合型ジユビキチン鎖 (Lys63 結合型 Ub₂) には非常に強い親和性で結合することを見出した。Lys63 結合型 Ub₂ の Rap80 に対する相互作用表面を同定するため、NMR による化学シフト擾動法を行ったところ、Ub の Ile44 を中心とした疎水的な表面に集中していた。

Key words : Lys63-linked polyubiquitin, Rap80, DNA double-strand breaks

○せきやまなおたか, いそがいしん, ありよしまりこ, とちおひでひと,
 しらかわまさひろ

これは以前に報告されたユビキチンと UIM の相互作用表面と一致していた (Fig. 1)。

次に、tandem UIMs の Lys63 結合型 Ub₂ に対する配向を調べるために、スピララベルを用いた常磁性緩和効果の測定を行った。tandem UIMs の C 末端に存在する Cys 残基にスピララベル試薬 MTSL ((1-Oxyl-2, 2, 5,

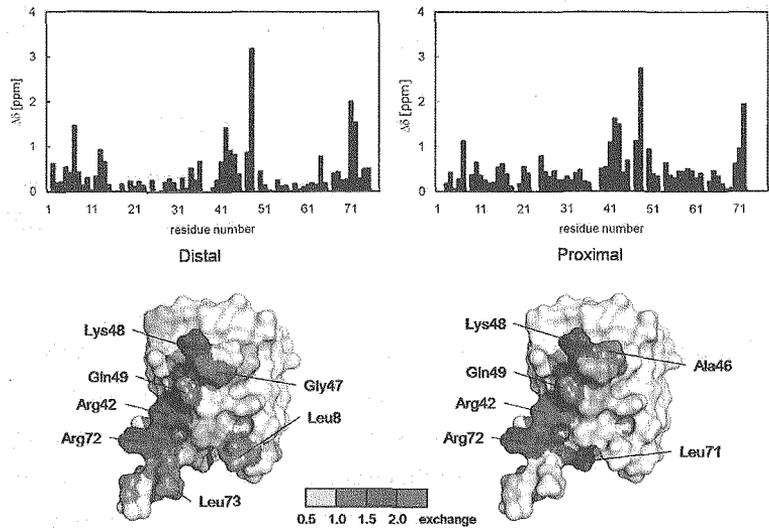


Fig. 1 Chemical Shift perturbation

5-Tetramethyl- Δ^3 -Pyrroline-3-Methyl) Methanethiosulfonate) を導入し、二つの Ub それぞれに安定同位体ラベルを導入した Lys63 結合型 Ub₂ を結合させた。スピララベルを導入したサンプルでは、遠位 (Distal) Ub において ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルのピーク強度が減少していた。これは tandem UIMs の C 末端が遠位 Ub の近傍に存在していることを示している。以上の結果から、N 末端側の UIM (UIM1) と近位 (Proximal) Ub、C 末端側の UIM (UIM2) と遠位 Ub で相互作用していることがわかった。

Lys63 結合型 Ub₂ の二つの Ub の配向を残余双極子相互作用により検証した。Ub に安定同位体ラベルを導入したサンプルを、4%ポリアクリルアミドゲルに浸漬させ NMR チューブに圧縮、充填した。このような分子配向条件下において、IPAP- ^1H - ^{15}N -HSQC により ^1H - ^{15}N 残余双極子相互作用を測定したところ、二つの Ub の UIM との相互作用表面は同一の方向にあることがわかった。以上の実験から得られた構造情報をもとに tandem UIMs と Lys63 結合型 Ub₂ の複合体構造のモデルを構築した (Fig. 2)。

現在は tandem UIMs、遠位 Ub、近位 Ub それぞれの NOE による距離制限をもとに tandem UIMs と Lys63 結合型 Ub₂ の複合体構造を計算しており、討論会ではその結果を含めて議論する。

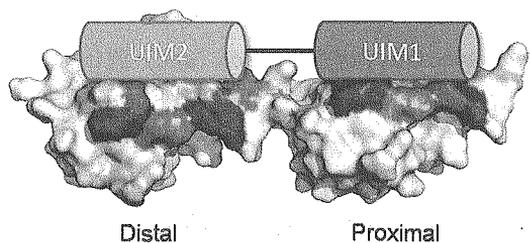


Fig. 2 The tandem UIMs-Lys63-linked Ub₂ complex structure model

- 1 Kim, H., Chen, J. & Yu, X. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science* **316**, 1202-1205 (2007).
- 2 Sobhian, B. *et al.* RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* **316**, 1198-1202 (2007).

腫瘍抑制因子 APC-SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ド

メインの複合体立体構造解析

○海江田修至¹、松井千幸²、清末優子³、池上貴久¹

¹大阪大学蛋白質研究所、²株式会社カン研究所、³理化学研究所発生・再生科学総合研究センター

Structural analysis of the complex between the APC-SAMP motif and the DDEF1-SH3 domain

○Shuji Kaieda¹, Chiyuki Matsui², Yuko Mimori-Kiyosue³, and Takahisa Ikegami¹

¹Institute for Protein Research, Osaka University, ²KAN Research Institute, Inc., ³RIKEN Center for Developmental Biology

The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor protein is a multifunctional protein with well-characterised 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 both the tumour suppressing and the developmental functions 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 APC. Interestingly, the SAMP motifs and the canonical SH3-binding sequence, PxxP motif, caused similar patterns of chemical shift perturbation in the resonances of the DDEF1-SH3 domain. To gain insight into the interaction between APC-SAMP motif and the DDEF1-SH3 domain, we determined the three-dimensional structure of the complex in solution.

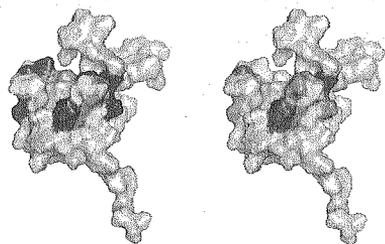
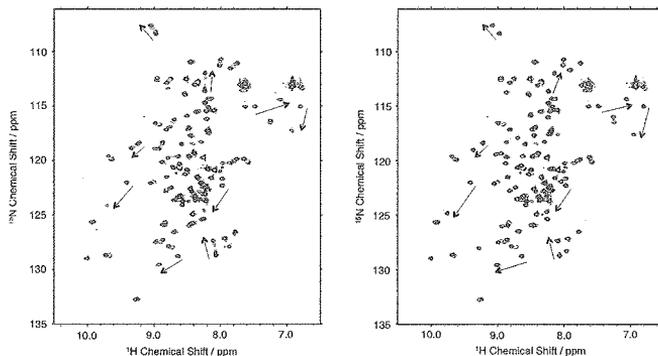
adenomatous polyposis coli (apc) 遺伝子は、遺伝性大腸癌の原因遺伝子の一つであり、遺伝性に限らず多くの大腸癌で変異が見られる。これらの変異の大多数は *apc* 遺伝子の中央付近で起こり、その結果、切断型変異体が発現される。変異によって切断を受ける APC 蛋白質の中央部位には、SAMP モチーフと呼ばれる繰り返し配列が3つ存在する。SAMP モチーフは APC の腫瘍抑制に重要な役割を担っており、APC 蛋白質の腫瘍抑制能には SAMP モチーフが少なくとも1つ必要であることが報告されている。APC の SAMP モチーフは、Axin との相互作用部位であるこ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

キーワード: 蛋白質間相互作用、蛋白質立体構造解析、蛋白質複合体

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

ながら、APC は Wnt シグナル伝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) 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、生理的に比較的強い相互作用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 DDEF1-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 の PxxP モチーフ (FAK-SII) 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-SII の DDEF1-SH3 ドメイン上での相互作用部位を調べた結果、興味深い事に、二つの異なる配列が同じ部位に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。そこで、我々のグループは、溶液中で APC-SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ドメインの複合体立体構造解析を行った。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。また、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、複合体構造から、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。

→ Fig 1. Overlaid 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectra of $[U\text{-}^{15}\text{N}]$ -DDEF1-SH3 with 0 (purple), 0.25 (blue), 0.5 (cyan), 1.0 (green), 1.5 (yellow), and 2.0 (red) equivalent amounts of the FLAG-SAMP#1 (left) or the FLAG-FAK-SII (right) peptide.



← Fig 2. 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 $[^{15}\text{N}]$ -DDEF1-SH3 on the 3D structure of human Intersectin2-SH3 (PDB coordinate: 1UDL), which shows the highest sequence similarity to DDEF1-SH3 in the Protein Data Bank. Residues are coloured according to the scale of the chemical shift changes.

RNA 2 本鎖における中心部と末端部の GA-AG ミスマッチ塩基対 の溶液構造の研究

○天野まゆみ (大阪大学蛋白質研究所)

Solution structure of the terminal and internal GA-AG mismatches in RNA duplexes

Institute for Protein Research, Osaka University

Mayumi Amano

The solution structure of the terminal and internal tandem GA mismatches with the closing GC base pair in RNA duplexes were studied by H-NMR. The terminal tandem GA mismatches form the sheared conformation, while the internal tandem GA mismatches form both the sheared and Watson-Crick conformations. Stability of the sheared tandem GA base pairs depends on the closing base pair. The sheared conformation with CG base pair 5' adjacent to the tandem GA mismatches is more stable than that with GC base pair. The solution structure of the internal tandem GA mismatches with the closing UA base pair was also studied by H-NMR. The internal tandem GA mismatches form the sheared conformation at low temperature and unpaired conformation at high temperature. It suggests that in RNA duplexes, the unpaired G is stabilized by the close A base, but not by the close G base.

序) GA-AG塩基対は、2つの構造、Watson-Crickとsheared 塩基対を形成することが報告されている。その構造は隣りの塩基対に依存し、5'隣りがCG 塩基対の時、Watson-Crick塩基対を、GC塩基対の時、sheared 塩基対を形成する。しかしながら、今回、GA-AG塩基対を含むオリゴマーを合成し、NMR解析した結果、ステムの中心に存在するGA-AG塩基対は両方の構造を形成することがわかった。又、隣りがUA塩基対も同様に解析したが、CG塩基対とは違った構造を形成する。

実験) 図1) に示す GA-AG 塩基対がステムの中心と端にあるそれぞれ2つずつオリゴマーを合成し、0.1M NaCl, 1mM EDTA, 3mM sodium cacodylate, 10%D₂O, pH 6.5 溶液に溶かし、ブルーカーDRX 600NMR 1D, 2D-NOESY スペクトルを測定した。

キーワード : GA-AG ミスマッチ塩基対、sheared構造, Watson-Crick構造

○あまのまゆみ

結果)

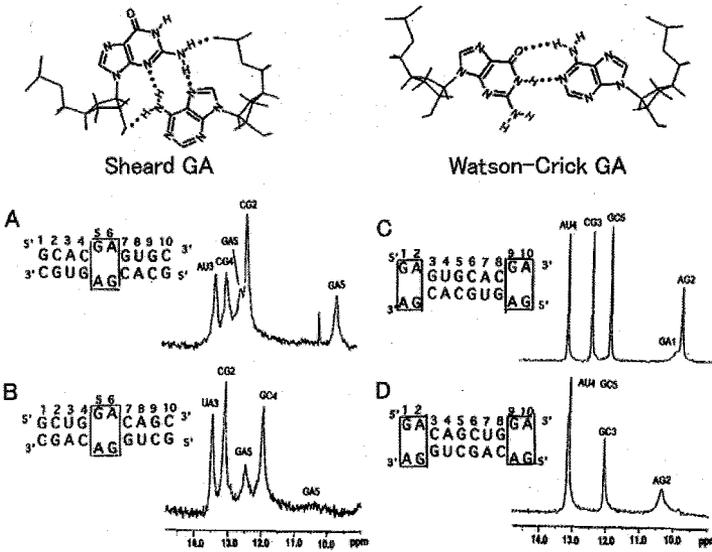


Figure 1. NMR spectra for the imino proton region of RNA oligomers with the internal or terminal tandem GA base pairs and the assignment

sequential NOEにより、それぞれのイミノプロトンを帰属した。10ppm付近のシグナルはsheared GA塩基対由来のイミノプロトンである。末端部のGA-AG塩基対はsheared構造のみを形成するが、中心部のGA-AG塩基対はsheared構造以外に12.5 ppmにWatson-Crick由来のイミノプロトンが観

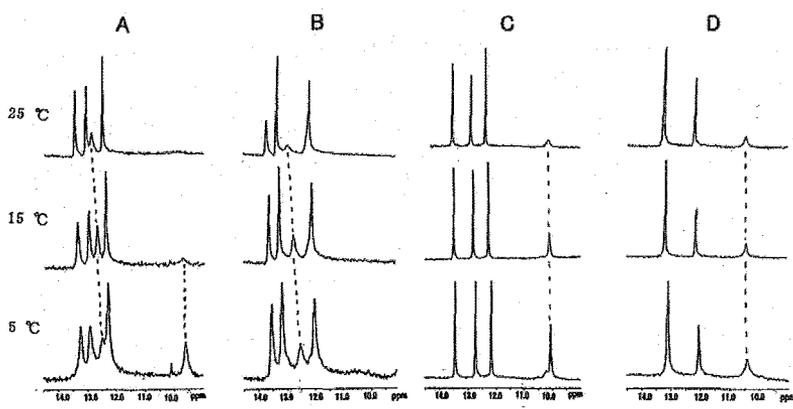


Figure 2. The imino protons as a function of temperature

測される。しかし、sheared GA塩基対の安定性は隣りの塩基対に依存し、5'隣りがGCの時は不安定で非常にブロードである。図2にイミノプロトンの温度変化をしめすが、低温5°Cでsheared構造は安定に形成し、
 温度の上昇と共に、10ppmのピークは減少し、12.5ppmのWatson-Crick構造のピークが増加し、25°Cでは、Watson-Crick構造のピークのみが観測される。図3にaromatic C-H regionの2D-NOESYスペクトルを示す。オリゴマーA, B共、30°CではWatson-Crick由来の、低温(10°Cと5°C)ではsheared構造由来のsequentialのNOEを示す。この様に明らかに、ステム中のGA-AG塩基対は隣の塩基対がCG, GC共に2つの構造を形成する。

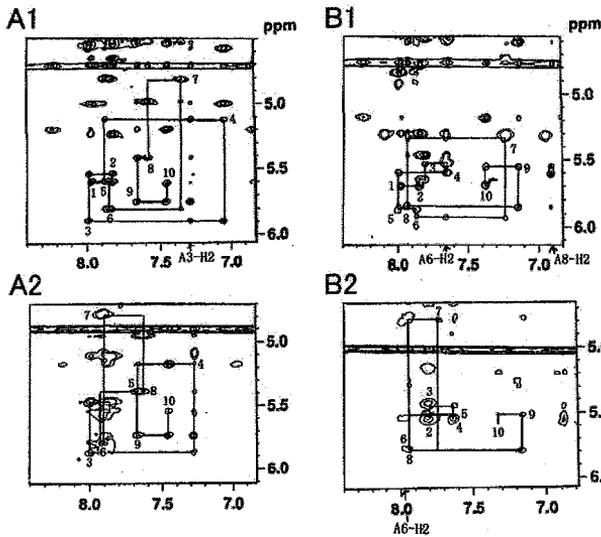


Figure 3. The 800 ms mixing time 2D NOESY spectra of the H8/H2/H6 to H1'/H5 region of (rGCACGAGUGC)₂: A1 (at 30°C) and A2 (at 10°C), and (rGCGUGACAGC)₂: B1 (at 30°C) and B2 (at 5°C).

5'隣りがUA塩基対でステム中心部のGA-AG塩基対も同様にNMRで解析した。図4にそのオリゴマーのイミノプロトンのスペクトルとその帰属をしめす。5°C

では9.7ppmにsheared GA-AG 由来のシグナルが観測される。温度上昇に伴い、15°Cで消失し、さらに温度の上昇すると0.2 ppm低磁場シフトした新たなピークが現れる。それと共に、GA-AG 塩基対の隣りのUA6 塩基対のピークが、0.6 ppm高磁場にシフトして現れた。これは、GA-AG 塩基対の構造の変化がUA6塩基対のchemical shiftに影響したものと思われる。この様に隣がUA塩基対でステムの中心部にあるGA-AG塩基対も2つ構造を形成するが、低温ではsheared 構造であり、高温ではWatson-Crick構造ではなく、塩基対を形成していない構造であることがわかった。図5にC-H 領域の2D-NOESYスペクトルを示すが、30°Cで8と9の塩基間でNOEをしめなさい。このことから、図6に示す様に、隣がUA塩基対であるGA-AG塩基対は塩基対を形成してなく、そのG塩基は2つのA塩基に挟まれている。Watson-Crick GA塩基対はそのstrand間が通常のAU,GC塩基対よりも広く、その形成は、糖リン酸バックボーンに

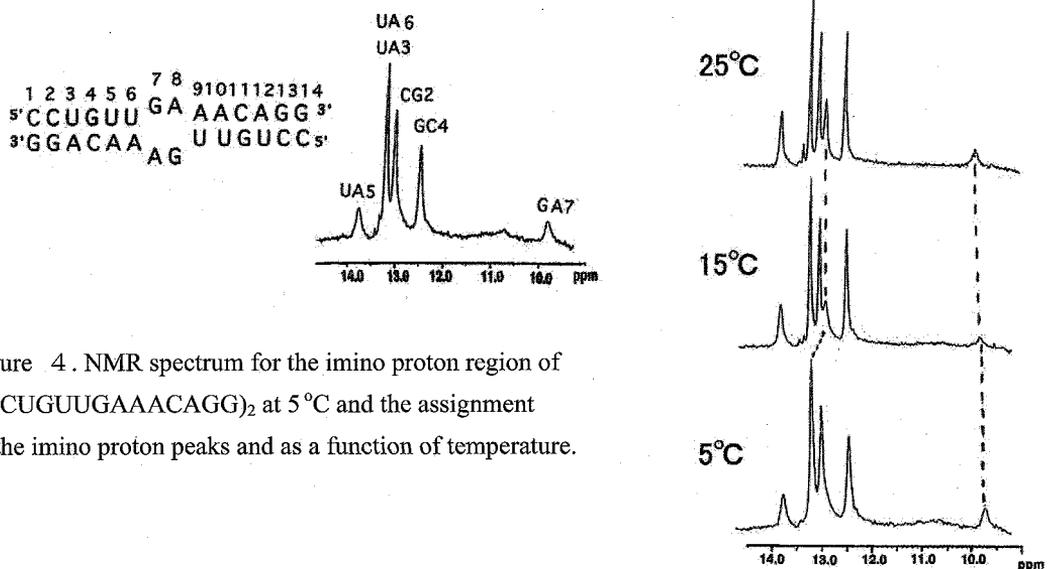


Figure 4. NMR spectrum for the imino proton region of (rCCUGUUGAAACAGG)₂ at 5°C and the assignment of the imino proton peaks and as a function of temperature.

ストレスを与える。しかし、Gイミノプロトンは親水性であり、疎水性である塩基対領域では、水素結合をしないと不安定であるが、隣りがUA塩基対の場合は、水素結合をしなくても、安定に存在できる。この様にGのNHは、親水性で塩基対を形成しなければ、ループアウトしやすいことがわかった。今まではGA-AG 塩基対はステム中では1つの構造しか形成しないと考えられていたが、2つの構造を形成することが初めて明らかになった。そして、その構造は隣接する塩基対に依存することがわかった。

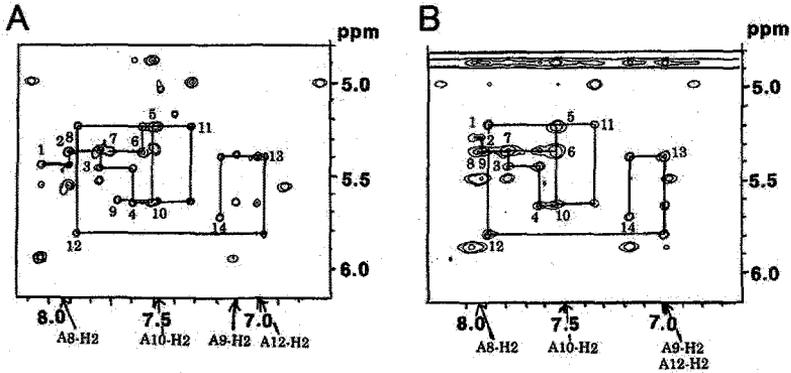


Figure 5 . The 800 ms mixing time 2D-NOESY spectra of the H8/H2/H6 to H1'/H5 region of (rCCUGUUGAAA CAGG)₂: A (at 30°C) and B (at 10°C).

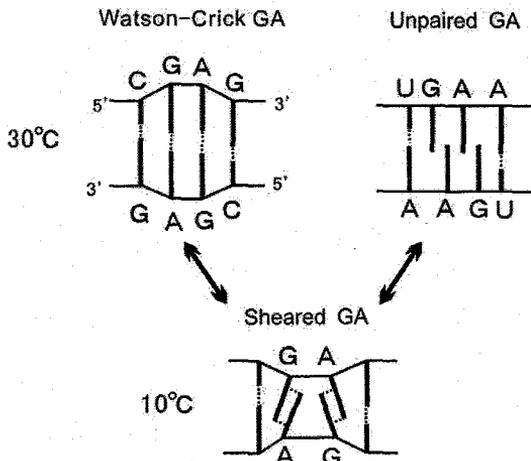


Figure 6 . Schematic model of kinetics of conformational change of the internal tandem GA mismatches with the closing UA or CG base pairs.

緑色蛍光蛋白質GFPの自己会合とその抑制変異体の NMR解析

○小佐見謙一,古板恭子,児嶋長次郎
奈良先端大・バイオ

NMR analysis of self-association of green fluorescent protein GFP

○Kenichi Kosami, Kyoko Furuita and Chojiro Kojima

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

NMR analysis of the green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea Victoria* is not easy because of its self-association character. In crystal, GFP is dimmer and three amino acids A206, L221 and F223 exist on the dimerization interface. The self-association of YFP has been suppressed by mutations of these residues. In this study, we have tried to suppress the self-association of GFP and examined self-association of several GFPs by NMR. Finally we obtained self-association suppressed GFP mutants.

[緒言]

オワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白質 GFP は、蛋白質や細胞の蛍光標識として使われるなど分子生物学の様々な研究で用いられている。現在、開発されている新しい蛍光タンパク質の多くはオワンクラゲ由来の GFP にランダムなアミノ酸置換を導入し、目的の機能を持つ変異体を探し出すことで得られている。我々は溶液 NMR を用い、pH や温度、塩強度など複数の条件下での GFP の各残基周辺の局所的な構造や化学環境の動的な変化を観察し、化学シフト変化の大きいアミノ酸残基にアミノ酸置換をすることで効果的な改変 GFP の開発につながると考えた。しかし、溶液 NMR を用いた GFP の解析では GFP の自己会合が問題となる。GFP は蛋白質濃度が高い場合に自己会合することが知られており、溶液中では単量体と二量体の混ざった状態で存在している。そのため NMR を用いた GFP の研究にはまず、高濃度において二量体を形成しない完全単量体化した GFP の作成が必要である。本研究では、NMR 研究に基づいた新しい蛍光タンパク質の開発を目指し、まず単量体化した GFP の作成を試みた。溶液 NMR により、以下5種類の GFP、[(1)蛋白質の蛍光ラベルとして古くから使われているオワンクラゲ *Aequorea Victoria* 由来の AvGFP、(2)その改変型 GFP として AvGFP の 35 倍の蛍光強度を持つ EGFP (AvGFP (F64L/S65T))、(3)AvGFP の 18 倍の蛍光強度を持つ GFPuv (AvGFP (F99S/M153T/V163A))、(4)AvGFP の変異体であり細胞内 pH インジケータとして使用される pHluorin、(5)オワンクラゲ *Aequorea coerulea* に由来する AcGFP]の溶液中での自己会合の有無を解析した。また、これらの GFP の自己会合抑制変異体をデザインし、NMR で解析を行った。

キーワード ; GFP, 自己会合

○ こさみけんいち, ふるいたきょうこ, こじまちょうじろう

[方法]

本研究では、目的 DNA 断片を pCold-GST ベクターに組み込んだプラスミドを大腸菌に導入し、GFP を ^{15}N 、 ^{13}C で均一に標識して大量発現させ精製し実験に用いた。NMR 測定には AVANCE 500, 800 (Bruker Biospin) を用いた。GFP の自己会合性は、 ^{15}N 標識した GFP を用いて高濃度(1 mM または 0.8 mM)と低濃度(0.1 mM)の蛋白質質量で ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、濃度依存的な化学シフト変化により評価した。主鎖の帰属は非線形サンプリング法で測定した HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CB, HN(COCA)CB を用いて行った。

[結果と考察]

高濃度と低濃度で ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した結果、5 種の GFP 全てにおいて濃度依存的な化学シフト変化が見られた (Fig.1)。このことは全ての GFP が濃度依存的な自己会合性を持つことを示している。YFP の A206 を K に置換した変異体では自己会合が抑制されることから、GFP の自己会合を抑制するため AvGFP, GFPuv, EGFP, 及び pHluorin の A206K 変異体、AcGFP の A207K 変異体を作成した。高濃度と低濃度で ^1H - ^{15}N HSQC 測定をしたところ GFPuv, EGFP, pHluorin の変異体では、変異導入前と比べ濃度依存的な化学シフト変化が抑制された (Fig.2)。従って GFPuv, EGFP, pHluorin では A206K 変異により自己会合が抑えられたと考えられる。

A206K 変異により自己会合が抑えられた GFPuv, EGFP, pHluorin のうち GFPuv, pHluorin で主鎖の帰属を試みた。pHluorin(A206K)では良好なスペクトルは得られなかった。良好なスペクトルが得られた GFPuv(A206K)については 238 残基中 54 残基を帰属した。しかし、GFP はピークの重なりが激しいため帰属が困難であり、さらに帰属を進めるために、GFP を N 末端側 1-154 と C 末端側 155-238 のふたつに分割し、片方を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 同位体ラベル標識、他方をノンラベルで精製し、北海道大学の小橋川らが開発した SortaseA による Protein Ligation 法を用い、主鎖の帰属を進めている。

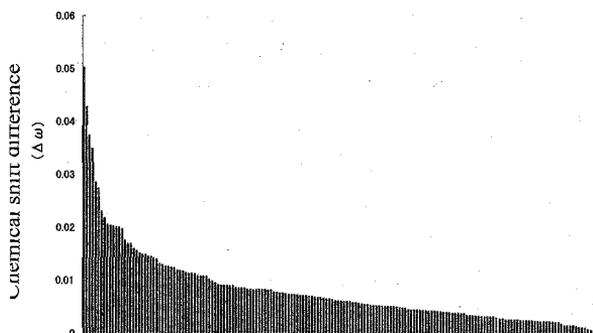


Fig. 1 Chemical shift differences of backbone amide groups between 0.1 mM and 1 mM. GFPuv (wild-type)

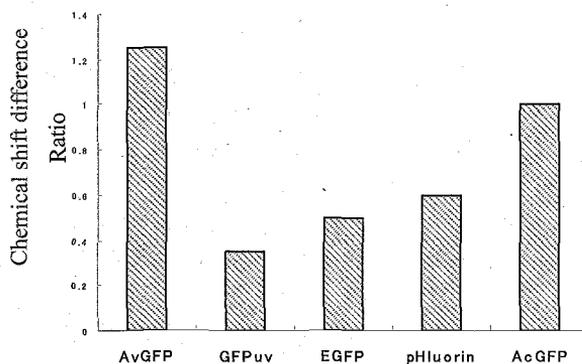


Fig. 2 Chemical shift differences ratios of mutant to wild-type for each GFP. Chemical shift differences of backbone amide groups are calculated between 0.1 and 1 mM GFPs.

NMRによるヌクレオソームシャペロンタンパク質 HMGB2のドメイン相対配向解析

○上脇隼一¹, 森内 寛², 楯 直子², 楯 真一¹
(¹広島大院・理, ²武蔵野大・薬)

Domain orientation analysis of nucleosome chaperon protein HMGB2 by NMR

○Jun-ichi Uewaki¹, Hiroshi Moriuchi², Naoko Utsunomiya-Tate², and Shin-ichi Tate¹
¹ Dept. Mathematical and Life Sciences, School of Science, Hiroshima University,
² Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University

HMGB2 protein has two DNA binding domains that are linked by ten-residue-long linker. The comparison of the ¹H-¹⁵N HSQC spectra between the isolated domains and the linked domains has suggested the linker exclusively contacts the N-terminal domain; some signals in the spectrum of the isolated N-terminal domain have changed their spectral positions in the spectrum for the protein comprising of two linked domains, while the C-terminal domain did not show any spectral changes. This may implicate that the inter-domain linker, which is actually an intrinsically unstructured element, should define the relative domain orientation through the linker – N-terminal domain contact. This prompted us to explore the precise orientation of the two domains in HMGB2 in solution, which orientation may presumably have biological significance in the sequence non-specific but structure specific features of the HMGB2-DNA interaction. For this purpose, we employed DIORITE and lanthanide labeling methods. The details in the experimentally determined overall structure of HMGB2 will be reported.

タンパク質は、ドメインの再配向などを伴う大きな分子形態変化を伴ってその独自の機能を発現する。そのため、タンパク質の機能制御機構を研究するためにはドメインの相対配向を明らかにすることが必要不可欠である。本発表では、L字型の立体構造を持つHMGドメイン2つからなるヌクレオソーム形成因子であるHMGB2タンパク質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タンパク質は全長で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, domain orientation, HMG

うえわき じゅんいち、もりうち ひろし、たて なおこ、たて しんいち

HMGB2タンパク質は、2つのHMGboxが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HMGbox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HMGbox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の解析を行った。さらに、DIORITE解析から得られたドメイン相対配向を確認すると同時に、ドメイン間の距離情報を得るため、ランタニドイオン標識を用いてpseudo contact shift(PCS)の解析を行った。

【実験・結果】

空間的な異方性もつように圧縮したアクリルアミドゲルを用いて、HMGB2を磁場に対して弱く配向させることで、DIORITE解析に必要なTROSYスペクトル上での変化量を観測した。観測値から個々のドメインの磁場に対する配向テンソルを決定し、それに基づいて2つのドメインの相対配向を決定した。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.1に示す相対配向が妥当と考えられた。この相対配向では、HMGB2を構成する2つのドメインがDNA結合ループを同じ側に持つような相対配向になっており、DNAと相互作用するには有利な構造を持つことが考えられる。

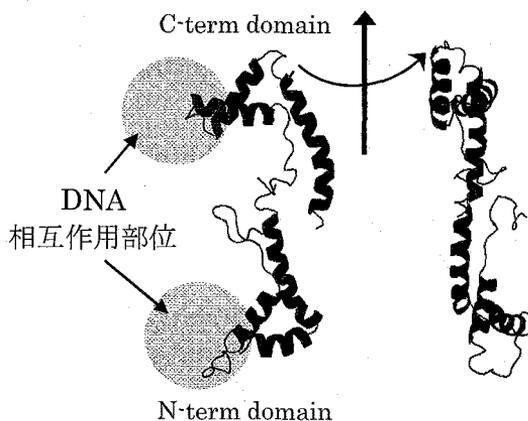


Fig.1: Possible relative orientation of the domains in HMGB2.

DIORITE解析からは、ドメイン間の距離情報を得ることができないため、ランタニドイオンによるPCSおよび緩和誘導効果 (paramagnetic relaxation enhancement, PRE) からドメイン間距離情報を得ることを試みた。HMGB2のN末端部にランタニドイオン結合配列を導入し(Fig.2)、効果の異なるランタニドイオン La^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Er^{3+} 、 Ce^{3+} により標識した。ランタニドイオンの種類に応じた明瞭なPCS、PREが観測された。観測されたデータに基づいて、DIORITE解析から決定されたドメイン配向情報と併せて、HMGB2中の2つのドメインの相対配向とダイナミクスについて議論する。



Fig.2: PCS sample of HMGB2.

DIORITE法を用いた高分子量タンパク質の ドメイン再配向解析

○岸本浩一¹、田中利好²、河野俊之²、楯 真一¹

¹広島大院・理・数理分子

²三菱化学生命研

Domain reorientation analysis of high-molecular-weight protein by DIORITE

○Hirokazu Kishimoto¹, Rikou Tanaka², Toshiyuki Kohno², and Shin-ichi Tate¹

¹Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University

²Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences

We have been developing a new approach for determining the alignment tensor for a weakly aligned protein solely based on the orientation-induced TROSY shift changes, which is named as DIORITE. This approach can expand the domain orientation analysis of proteins to higher molecular weight. We report the domain orientation analysis of mRNA capping enzyme (38kDa) by using DIORITE. The conventional RDC-based 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. The DIORITE analysis has shown that the apo-form of the protein is different from the open-form crystal structure. In addition to the angular information based on DIORITE analysis, distance information from PRE experiments will be incorporated to refine the apo-form structure of CE in solution.

我々は新規NMR構造解析技術であるDIORITE法の開発と応用研究を進めてきている。本研究で対象とするmRNA capping enzyme (以下CE)は、GTP共存下でopen型、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)。そこで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

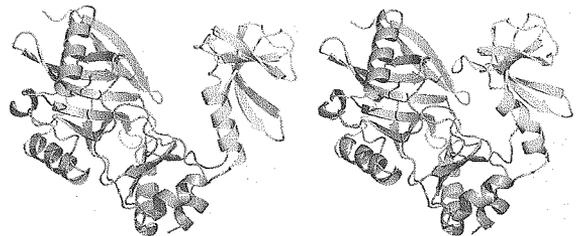


Fig.1 Two crystal structures of CE : open state (left) and close state (right) (PDB : 1CKM)

きく、溶解度が低いうえ熱的にも不安定であるため、RDCを用いた従来のNMR法ではドメイン配向解析を行うことができなかった。²H/¹⁵N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、それに基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。このDIORITE法を用いたapo型のCEのドメイン相対配向は、結晶構造から予測されていたopen型構造とは大きく異なるものであった。今発表では、DIORITE法から

Keywords : deuterium label, CSA, domain orientation

○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

得られたドメイン相対配向角情報に加え、緩和誘導法などを用いて2つのドメイン間距離情報を得ることでCEのapo型構造の精密化を行う予定である。

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)。

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。Apo 型の 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を昨年の本討論会で発表した。

今回は、DIORITE 法から決定したドメイン間相対配向に加え、ドメイン間距離情報を加えることで、CE の apo 型構造を決定することを試みた。C 末端部にランタニドタグを導入した CE、および CE 中に3か所ある Cys のうち1つのみを残す変異体を作成した。ランタニドイオンによる緩和誘導効果 (PRE)、擬接触シフト (pseudo contact shift, PCS) を用いてドメイン間距離情報を得ることを試みた。また、cys 変異体では nitroxide 標識を行い、NO ラジカルによる PRE 効果からドメイン間距離の取得を試みた。

ランタニドイオンを利用する方法では、ランタニドイオン導入時に激しくタンパク質が沈殿してしまい、十分な感度での解析ができなかった。nitroxide 標識では、0.3 mM 程度の濃度の標識試料を調製することができたので現在、MTSL 標識試料を用いてドメイン間距離情報の取得を試みている。発表では、試料調製の詳細とともに MTSL 実験の結果を合わせて報告する。

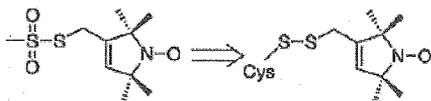


Fig.3 Chemical structure of the spin label reagent MTSL.

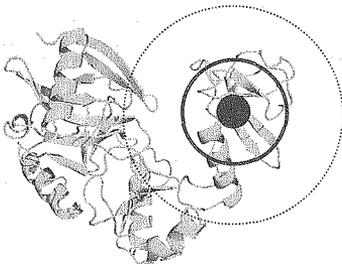


Fig.4 PRE effect expected for CE(open state) .

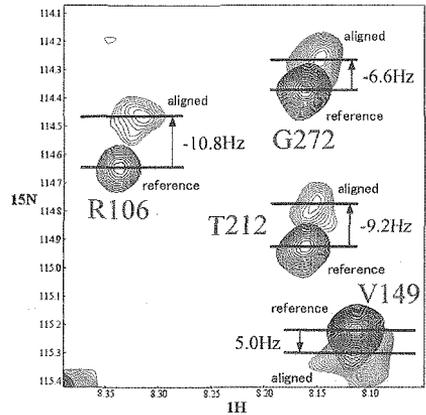


Fig.2 Trosy shift changes for CE in compressed and uncompressed gel.

変異体 CE 中に1つ残した Cys282 へ MTSL を結合させた試料を用いてドメイン間距離情報を得る (Figs. 3, 4)。参照用データの取得には、定法に従いアスコルビン酸を加え NO ラジカルを消去したサンプルを用いる。二つのスペクトルのピーク強度比からスピンラベルを導入した OB ドメインと NT ドメインの間の距離情報を取得する。解析の結果得られるドメイン間距離情報と DIORITE 解析から得られるドメイン間の配向角情報に基づいて apo 型 CE の全体構造を決定する予定である。

沖縄モズクから抽出した高分子フコイダンの構造

○オジェイルFエゾモ¹、モハメドSムスタク¹、堀江迪喜¹、高橋和也¹、川本仁志²、三木康成²、木村隆之²、飯塚舜介¹

¹鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻

²(株)海産物のきむらや

NMR studies of the structure of high molecular weight native fucoidan from the brown seaweed (*Cladosiphon okamuranus*)

Ojeiru F. Ezomo¹, Mohammed S. Mustak¹, Yuki Horie¹, Kazuya Takahashi¹, Hitoshi Kawamoto², Yasunari Miki², Takayuki Kimura², Shunsuke Meshitsuka¹

¹Tottori University Graduate School of Medical Science, Yonago, 683-8503

²Marine Products Kimuraya Co., Sakaiminato, 684-0072.

フコイダンは、抗菌・抗ウイルス作用があることが知られている。また、抗がん作用があることも報告されている。さらに、健康維持のためのサプリメントとしての効果も期待されている。沖縄モズクから、なるべく手を加えないで抽出したフコイダンは、クロマトグラフで単一バンドを示す分子量約 300,000 Da の高分子物質である。低分子化したフコイダンの構造に関する報告は数多くあるが、天然高分子の構造に関する報告は見当たらない。そこで、乾燥粉末天然フコイダンを溶解した水溶液のNMRを測定した。TOCSY, COSY, NOESY などの2次元NMRから推定される天然フコイダンの構造を報告する。

It has been reported that fucoidan has functions of anti-bacteria and anti-virus effects. Also, recently it has been reported that fucoidan reveals the effects on cancer therapy. In addition, fucoidan is expected as a material to maintain a healthy condition as a food supplement. Fucoidan extracted from Okinawa mozuku (*Cladosiphon okamuranus*) revealed a single band in chromatography of about 300,000 Da molecular weight. The structure of native high molecular weight fucoidan was estimated from 2D-NMR spectra such as TOCSY, COSY and NOESY.

fucoidan, 2D-NMR, brown algae

○オジェイルFエゾモ¹、モハメドSムスタク¹、ほりえゆうき¹、たかはしかずや¹、かわもとひとし²、みきやすなり²、きむらたかゆき²、めしつかしゅんすけ¹

Fucoidans are one kind of polysaccharides found in brown algae. They usually contain large proportions of L-fucose and sulfates and also small proportions of galactose, mannose, xylose and uronic acids moieties have also been observed in various fucoidans. Recently fucoidans have been extracted, analyzed and studied from several types' brown algae due to their promising biological activities and therapeutic applications. The several reports have shown that fucoidans extracted from different kind of brown algae exhibit several biological activities such as anti-tumor, anti-coagulant, contraceptive, anti-inflammatory, anti-HIV and inducing apoptosis. The present study is focused on the fucoidan isolated from *Cladosiphon okamuranus* (*C. okamuranus*) edible brown algae which is commercially cultured around the Okinawa Island, Japan. Interestingly, in addition to many biological functions of fucoidans, isolated from *C. okamuranus*, it can also block the adhesion of the *helicobacter pylori* to human gastric cell line and can also induce macrophage activation. However, studies have shown that the biological activities of fucoidans are depending on their structure and sulfation content.

In spite of many studies attempting to determine the fine structure of fucoidans isolated from *C. okamuranus*, there are still no satisfactory regular structure has been described. In the previous studies it is reported that the structure of fucoidan from *C. okamuranus* has linear polysaccharides backbone built up of (1→3) linked α -L-fucopyrunose residue with single branches (D-glucuronate) at 2 position of sixth fucose residue. However the structural heterogeneity of fucoidan from *C. okamuranus* with respect to linkage, branching point and position of acetyl and sulfate groups are still not determined in its native form. Therefore, the purpose of the present study is to investigate the regular structure of fucoidan in native form of about 300,000 Da molecular weight isolated from *C. okamuranus* using high field 2D NMR spectroscopy. The present study shows that the assignment of the signals in the spectra such as COSY, TOCSY, NOESY and also ^{13}C -NMR. The regular structure of fucoidan from *C. okamuranus* and the composition of substituents and their terminal residues are reported to be different from earlier studies.

TICAM-1およびTICAM-2 TIRドメインの溶液構造
榎園能章¹ ○久米田博之¹ 堀内正隆¹ 小椋賢治¹ 瀬谷司²
稲垣冬彦¹
¹北海道大学 薬学部 構造生物学研究室
²北海道大学大学院 医学研究科免疫学分野

Solution Structures of TICAM-1 and TICAM-2 TIR Domain.

Yoshiaki Enokizono¹, ○Hiroyuki Kumeta¹, Masataka Horiuchi¹, Kenji Ogura¹,
Tsukasa Seya², and Fuyuhiko Inagaki¹

¹Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

²Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

Toll / interleukin-1 receptor (TIR) domain is a key mediator in the Toll-like receptor (TLR) signaling. TIR containing adaptor protein-1 (TICAM-1) is established as the adaptor controlling both TLR3- and TLR4-mediated IFN production signal. TICAM-2 functions as a bridging adaptor, which plays TICAM-1-recruiting to TLR4. The homo- and hetero-oligomerization of the TIR domains of these receptors and adaptors brings about the activation of NF- κ B and IRF-3, which regulate the synthesis of pro-inflammatory cytokines and IFN- β , respectively. Here, we solved the solution structures of homo-oligomerization deletion variant of TIR domain of TICAM-1 and TICAM-2, and will discuss the TIR-TIR interaction of the TLRs and TICAMs.

Toll / interleukin-1 receptor (TIR)ドメインは自然免疫応答である Toll-like receptor (TLR)シグナルにおいて重要な役割を担っている。膜外領域で病原体由来刺激を受けた TLR は、ホモまたはヘテロ二量体を形成し細胞内領域にある TIR ドメインが近づくことで活性化する。活性化した TLR の TIR ドメインは細胞内アダプター分子の TIR ドメインとヘテロオリゴマーを形成し、下流へとシグナルを伝達する。

TIR ドメインを含む細胞内アダプター分子には、Myeloid differentiation primary response gene88 (MyD88), MyD88 adaptor-like (Mal または TIRAP), TIR containing adaptor molecule-1 (TICAM-1 または TRIF)および 2 (TICAM-2 または TRAM), と sterile α -motif and HEAT/armadillo repeats (SARM)の5種がある。TIR ドメインの立体構造はレセプターでは TLR1, TLR2, TLR10, IL-1RAPL について解かれており、アダプターでは MyD88 のみが解かれている。

TICAM-1はTLR3および4の下流に存在し、MyD88系とは独立にインターフェロン産生に寄与する。TICAM-2はTLR4からTICAM-1へのシグナルを仲介する。シグナルを

キーワード : TICAM-1, TICAM-2, TIRドメイン

えのきぞの よしあき, ○くめた ひろゆき, ほりうち まさたか, おぐら けんじ, せやつかさ, いながき ふゆひこ

受けたTICAM-1はTIRドメイン以外の領域を介して下流のNAP1 / TBK1 / IKKε複合体, TRAF6およびRIP1へと伝達する. 上流のレセプターからTICAM-1までのTLRシグナル伝達において, 各タンパク質に存在するTIRドメイン同士の相互作用が非常に重要であることが明らかになっている.

本発表では, TICAM-1-TIRおよびTICAM-2-TIRの溶液構造, ならびにTIRドメイン間の相互作用に関する考察について報告する.

[結果・考察] TICAM-1のTIRドメインは完全に不溶性であり, TICAM-2のTIRドメインは高濃度域において自己会合体を形成するため, どちらも野生株における立体構造解析が困難であった. そこで, TIRドメインにおいてoligomer形成またはシグナル伝達に重要であると報告されているBB-loop領域にアミノ酸置換を導入することにより, 自己会合体形成を抑制した変異体を得た. 作製された変異体は $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQCスペクトルで良好な信号の分散/強度を示し, NMR測定濃度においても単量体であることが示唆された. この変異体を用いて各種NMR測定による帰属およびCYANAを用いた立体構造決定を行った(下図).

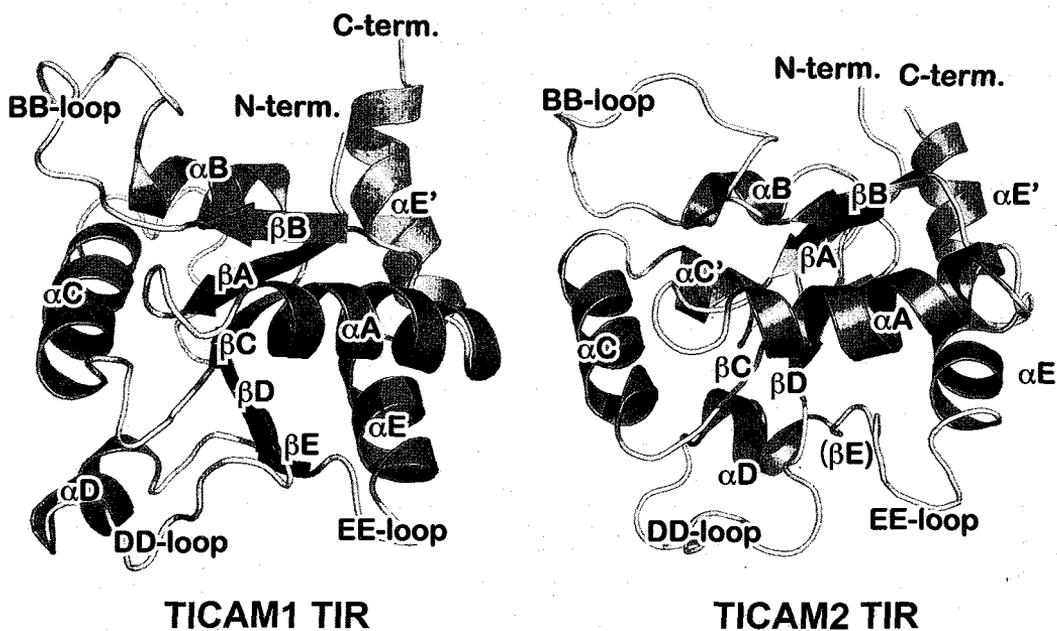


Fig. Solution structures of TICAM1- and TICAM2-TIR domain

TICAM-1およびTICAM-2のTIRドメインの立体構造は, MyD88 TIRやレセプターTIRと同様に $\alpha/\beta/\alpha$ の三層からなるflavodoxin-like foldを有していた. 変異箇所周辺であるBB-loop領域は, フレキシブルな構造を有しており, またMyD88 TIRと同様に $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQC上で信号帰属が困難であった. 静電ポテンシャルを分子表面にマッピングしたところ, TICAM-1には, 他のTIRドメインには見られない αE , $\alpha\text{E}'$ ヘリックスによって形成される広い塩基性面が存在していた. 現在, この領域を中心に他のTIRドメインとの相互作用に重要な部位を探索中である.

NMRに基づくケモカイン受容体 CCR2 と制御因子 フロントとの相互作用解析

○江崎 芳¹, 菌田 晃弘¹, 吉永 壮佐¹, 嶋田 一夫²,
寺島 裕也^{3,4}, 遠田 悦子³, 松島 綱治³, 寺沢 宏明¹
¹熊大・院・医薬, ²東大・院・薬, ³東大・院・医, ⁴ECI

NMR analyses of interaction between chemokine receptor CCR2 and its regulator FROUNT

○Kaori Esaki¹, Akihiro Sonoda¹, Sosuke Yoshinaga¹, Ichio Shimada², Yuya Terashima^{3,4},
Etsuko Toda³, Kouji Matsushima³ and Hiroaki Terasawa¹

¹Grad. Sch. Med. and Pharm. Sci., Kumamoto Univ., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. Tokyo,

³Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo, ⁴ECI, Inc.

Chemokine receptor CCR2 belongs to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs) and mediates chemokine signaling. The C-terminus of CCR2 is exposed to the intracellular space. Its membrane-proximal region (CCR2 Pro-C) is necessary for chemokine signaling. We found that FROUNT activates the signaling through binding to the CCR2 pro-C on the cytoplasmic side. FROUNT is expected as a new target for anti-inflammatory therapies. Elucidation of the interaction between CCR2 and FROUNT would contribute to understanding mechanisms of GPCR regulation and the drug discovery.

We revealed that the CCR2 Pro-C forms α -helix with DPC micelles. Cross saturation and transferred cross saturation experiments showed that the hydrophobic residues of CCR2 Pro-C interact with both membrane and FROUNT.

【背景】

炎症免疫反応における白血球の遊走応答は、炎症部で産生されたケモカインが、細胞膜上のGタンパク質共役受容体 (GPCR) に認識されることで引き起こされる。CCR2はこのようなケモカイン受容体の一つとして知られている。CCR2のC末端は、細胞内に露出しており、その細胞膜近傍領域

(Pro-C) は細胞遊走活性に必須である。我々は、ケモカインの存在下でCCR2のPro-Cに結合し、白血球の遊走シグナルを制御する細胞内因子フロントを同定した(1)(Fig 1)。フロントは、既知のGPCR制御タンパク質と相同性を持っておらず、フロントを介した新規GPCR制御機構の存在が明らかとなった。本研究は、CCR2—フロント間相互作用を介した白血球の遊走応答シグナル伝達機構を、構造生物学的に解明することを目的とする。本研究によって、ケモカイン受容体と細胞内制御タンパク質の相互作用が原子レベルで明らかになり、GPCRに共通する新規の制御機構の解明、さらには慢性炎症性疾患に対する新しい作用機序をもつ薬の開発へとつながることが期待される。

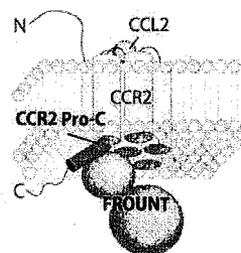


Figure 1. The model of CCR2—FROUNT complex.

フロント, ケモカイン受容体, Gタンパク質共役受容体

○えさきかおり, そのだあきひろ, よしながそうすけ, しまだいちお,
てらしまゆうや, とおだえつこ, まつしまこうじ, てらさわひろあき

【方法】

CCR2 Pro-C及び全長フロントタンパク質は、大腸菌の発現系および各種クロマトグラフィーを用いて調製した。NMRシグナルの帰属は、HNCACB, HN(CO)CACB, H(CCO)NH, HCCH-TOCSY によって行った。立体構造決定は、¹³C edited NOESYおよび¹⁵N edited NOESYを用いて行った。スペクトル解析には、NMRPipe, Oliviaを使用した。主鎖二面角情報は、TALOSによって見積もった。

【結果と考察】

CCR2 Pro-C領域の16アミノ酸残基からなるペプチドが、全長 FROUNT と相互作用することを表面プラズモン共鳴法により明らかにした(未発表)。また、CCR2 Pro-Cの各種NMRスペクトルを測定し、化学シフトに基づく二次構造解析を行ったところ、CCR2 Pro-Cは、ランダムコイルと α -ヘリックス構造の平衡状態にあることがわかった。さらにその平衡が、DPCミセルを加えることによって α -ヘリックス構造へと偏ることを明らかにした。DPCミセル存在下で立体構造決定を行い、CCR2 Pro-Cが α -ヘリックス構造をとることを示した。フロント結合時のCCR2 Pro-Cの構造解析は、フロントとの結合状態の立体構造を反映するtrNOEスペクトルを用いることとした。フロント存在下でCCR2 Pro-Cの¹⁵N edited NOESYを測定したところ、フロント非存在下では見られない多くのNOEが観察された。このことから、CCR2 Pro-Cは全長フロントと複合体を形成することで、立体構造を形成することが示唆された。現在、立体構造解析を進行中である。

次に、CCR2 Pro-Cがどのアミノ酸残基で膜と相互作用しているかを調べるため、交差飽和法(2)による解析を行った。その結果、 α -ヘリックスの片側に位置する疎水性アミノ酸残基が、膜との相互作用面に存在することがわかった。さらに、CCR2 Pro-Cと全長フロントとの相互作用について、転移交差飽和法(2)を用いて解析した。その結果、フロントとの相互作用に重要なアミノ酸残基は、 α -ヘリックスの片側に位置する疎水性アミノ酸であり、膜との相互作用部位と重なっていることがわかった。

CCR2 Pro-Cは、一次構造上、膜貫通ドメインの直下に存在する。DPCミセル存在下で α -ヘリックスを形成したことから、CCR2 Pro-Cは、生体内においても細胞膜と相互作用して α -ヘリックス構造をとることが強く示唆された。また、CCR2 Pro-C上のフロント結合部位と膜結合部位が共通していることが明らかとなった。CCR2のリガンドであるCCL2の刺激に伴って、フロントは細胞表面でCCR2と共局在することを我々は明らかにしている(1)。以上の知見から、CCL2がCCR2に結合することで、受容体の構造変化が起こり、Pro-Cの配向が変化してフロントが結合し、その結果、下流のシグナルの活性化がおこるといふ仮説が考えられた。

【参考文献】

- (1) Terashima, Y. *et al.*, *Nat Immunol* 6 (8), 827-835 (2005).
- (2) Shimada, I., *Methods Enzymol* 394, 483-506 (2005).

ケモカインのシグナル伝達を制御する細胞内因子 FROUNT の構造生物学的研究

○藪田 晃弘¹, 江崎 芳¹, 吉永 壮佐¹, 嶋田 一夫²,
寺島 裕也^{3,4}, 遠田 悦子³, 松島 綱治³, 寺沢 宏明¹
¹熊大・院・医薬, ²東大・院・薬, ³東大・院・医, ⁴ECI

Structural analyses of FROUNT: a cytoplasmic mediator of chemokine signaling

○Akihiro Sonoda¹, Kaori Esaki¹, Sosuke Yoshinaga¹, Ichio Shimada², Yuya Terashima^{3,4},
Etsuko Toda³, Kouji Matsushima³, Hiroaki Terasawa¹

¹Grad. Sch. Med. and Pharm. Sci., Kumamoto Univ., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. Tokyo,

³Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo, ⁴ECI, Inc.

Immune cells such as monocytes and macrophages migrate to the inflamed site during inflammation. The migration is induced by binding of chemokines to chemokine receptors. We identified a novel cytoplasmic protein FROUNT that mediates chemokine signaling by the interaction between its C-terminal domain (FNT-C) and the C-terminal region of CCR2 (Pro-C). The purpose of this study is elucidation of the binding mode of FNT-C with CCR2 Pro-C and development of therapeutic agents for chronic inflammatory diseases. We report here the NMR analyses of the interactions between FNT-C and CCR2 Pro-C. The CCR2 binding site of FNT-C and the amino acid residues involved in binding will be discussed.

【背景・目的】

生体で炎症が起きると、炎症部位からケモカインが放出される。単球やマクロファージといった免疫細胞は、ケモカインを認識し、炎症部位に移動・集積する。この免疫細胞の移動・集積は、細胞膜上の G 蛋白質共役型受容体であるケモカイン受容体に、ケモカインが結合することによって引き起こされる。我々は、ケモカイン受容体である CCR2 の C 末端細胞膜近傍領域 (Pro-C) に細胞質側から結合し、CCR2 を介したシグナル伝達を制御する新規な細胞内因子 FROUNT を見出した¹。また、FROUNT の CCR2 結合領域は、FROUNT の C 末端領域 (FNT-C) であることを明らかにした¹。本研究は、(1) FNT-C と CCR2 との結合様式を解明し、免疫細胞の遊走におけるシグナル伝達機構を原子レベルで明らかにすること、(2) 得られた知見に基づいて、

キーワード：ケモカイン受容体，フロント，シグナル伝達

著者ふりがな：○そのだあきひろ，えさきかおり，よしながそうすけ，しまだいちお，てらしまゆうや，とおだえつこ，まつしまこうじ，てらさわひろあき

FROUNT を標的とする慢性炎症性疾患治療薬を開発することを目的とする。

【実験】

大腸菌による発現系を用いて、均一¹⁵N 標識または、²H¹⁵N, ²H¹³C¹⁵N 標識 FNT-C を大量発現した。グルタチオンセファロースクロマトグラフィーによる粗精製の後、トロンビンで GST タグを切断し、イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行った。得られた安定同位体標識 FNT-C を用いて、¹H-¹⁵N HSQC および各種三重共鳴 NMR 測定を行い、主鎖由来 NMR シグナルの帰属を行った。スペクトル解析には、NMRPipe, Olivia を使用した。CCR2 Pro-C の発現には大腸菌の系を用いた。精製にはニッケルアフィニティークロマトグラフィーを用いた。

【結果と考察】

FNT-C の構造ドメインを同定するために、長さが異なる 11 種類の均一¹⁵N 標識 FNT-C を調製し、NMR 測定および解析を行った。その結果、良好なシグナルの分散を示すスペクトルを与える構造ドメイン (FNT-CB) を同定した。FNT-CB が、CCR2 上の FROUNT 結合領域 (Pro-C) に対する親和性を保持していることを、表面プラズモン法を用いて明らかにした。

¹⁵N 標識 FNT-CB の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを解析した結果、一部のシグナル強度にばらつきが見られた。そこで、溶液条件および測定条件の検討を行い、スペクトルの改善を図った。さらに、FNT-CB の重水素化を行った結果、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルは改善され、シグナル強度が均一で良好な NMR スペクトルが得られた。この条件で、各種三重共鳴 NMR 測定および解析を行い、FNT-CB の主鎖 NMR シグナルの帰属を進めた。また、6 種類のアミノ酸選択標識体 (¹⁵N Cys, ¹⁵N His, ¹⁵N Ile, ¹⁵N Lys, ¹⁵N Met, ¹⁵N Thr) を調製し、同様に NMR 測定・解析を行った。以上の NMR 解析に基づいて、帰属を行った。

次に、FNT-CB 上の CCR2 Pro-C との相互作用部位を同定するために、²H¹⁵N 標識 FNT-CB に、非標識の CCR2 Pro-C を滴定して NMR 測定・解析を行った。その結果、滴定後にシグナル強度の減少するピークが観測された。疎水性アミノ酸残基由来のシグナルにおいて減少が顕著であり、CCR2 Pro-C との相互作用には疎水性相互作用が強く関与することが示唆された。FNT-CB の化学シフトに基づく二次構造予測より、CCR2 Pro-C との相互作用に関与するアミノ酸残基は、C 末端近傍に位置する α -ヘリックス上に存在し、疎水性パッチを形成していると考えられた。

以上の結果から得られた FROUNT 側の知見と、CCR2 Pro-C 側の NMR 解析に基づく結果 (江崎ら、本年会発表) をあわせて、FNT-CB と CCR2 Pro-C との結合様式について議論する。

【参考文献】

- (1) Terashima Y. et al., *Nature Immunology*, **6**, 827 - 835 (2005)

○吉永 壮佐¹, 佐藤 徹², 平金 真¹, はが 紗智子²,
木本 裕子², 嶋田 一夫³, 東原 和成², 寺沢 宏明¹

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

Structural and functional analyses of a male-mice-specific pheromone ESP1.

○Sosuke Yoshinaga¹, Toru Sato², Makoto Hirakane¹, Sachiko Haga², Hiroko Kimoto²,
Ichio Shimada³, Kazushige Touhara², and Hiroaki Terasawa¹

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

Pheromones are perceived by a vomeronasal organ (VNO) and vomeronasal sensory neurons (VSNs) in many mammals. We previously identified a male-specific peptide ESP1 secreted into tear fluid of mice. ESP1 is received by its own receptor V2Rp5 expressed in female's VNO. ESP1 turned out to be a member of a new multigene family which is supposed to convey information on sex, strain, and species in rodents. The aim of this study is to elucidate mechanisms underlying the pheromone-reception system on the ESP family. We report here the three-dimensional structure and the V2Rp5-binding sites of ESP1, based on solution NMR analyses and mutational effects on the VSNs-stimulating activity. Structural informations of ESP1 give a way to elucidate specific ligand-receptor recognition mechanism on the ESP family.

【背景・目的】

多くの哺乳動物において、フェロモンは、鼻腔下部の鋤鼻器官、鋤鼻神経系を介して感知される。既知のフェロモンのほとんどは、尿や汗に含まれる揮発性の低分子であるが、我々は、オスマウスの涙から、メスマウスの鋤鼻神経系を活性化する不揮発性のペプチド、ESP1 (exocrine-gland-secreting peptide 1) を同定した¹⁾。また、ESP1の受容体が、鋤鼻器官に発現するGタンパク質共役型受容体V2Rp5 (vomeronasal type 2 receptor p5) であることを明らかにした²⁾。さらに、ESP1の相同性遺伝子を、マウスに38種類、ラットに10種類見出し、これらが、齧歯類の性・系統・種の情報を伝達する分子群 (ESPファミリー) である可能性を示してきた³⁾。

(キーワード) ペプチド, 分子認識, GPCR

(著者ふりがな) ○よしながそうすけ, さとうとおる, ひらかねまこと, はがさちこ,
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、溶液 NMR 法を用いて 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、ESP ファミリーによって媒介される、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。

【方法】

大腸菌の大量発現系において、安定同位体標識した栄養源を含む M9 最少培地を用いることで、ESP1 の安定同位体標識体を得た。ニッケルアフィニティークロマトグラフィーによる粗精製に用いたポリヒスチジンタグは、トロンピン処理にて ESP1 から分離した。さらに、ニッケルアフィニティー、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ない、ESP1 の精製品を得た。NMR スペクトルの解析には Olivia, ESP1 の立体構造計算には CYANA を用いた。また、ESP1 の鋤鼻神経系活性化能は、神経細胞における c-Fos タンパク質の発現誘導を指標に測定した。

【結果・考察】

^{15}N および $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 標識 ESP1 について、各種の多核多次元相関 NMR スペクトルの測定および解析を行ない、各原子核由来の NMR 信号の帰属を完了した。帰属結果と $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE の解析から、ESP1 は、N 末端に 30 残基程度のランダムコイル領域を含むことを明らかにした。ランダムコイル領域を欠失した変異体は、鋤鼻神経系活性化能を保持していた。そのため、C 末端側の立体構造をもつ 55 残基からなる領域が活性部位を含むことが分かった。 ^{15}N および ^{13}C -NOESY スペクトルから得られる ^1H 間の距離情報と、HNHA スペクトルおよび化学シフト値から得られる主鎖二面角の情報をもとに ESP1 の立体構造決定を行ない、3本のヘリックスを含むことを明らかにした。

得られた ESP1 の立体構造情報を利用し、電荷分布に着目して調製した変異体について鋤鼻神経系活性化能を調べた結果、複数のアルギニン残基からなる正電荷に帯びた領域が活性に必須であることが分かった。これらのアルギニン残基は、ESP ファミリーの中でも ESP1 に特徴があるため、受容体結合の特異性を担う残基と考えられる。

以上の溶液 NMR 解析、ならびに変異体解析の結果に基づき、ESP1 の立体構造と機能について議論する。

本結果は、ESP ファミリーの立体構造、および、受容体結合の特異性を担う残基を初めて明らかにしたものであり、齧歯類の個体数を制御する化合物の設計等への応用・展開が期待される。

【参考文献】

- 1) Kimoto H. *et al.*, *Nature*, **437**, 898-901 (2005)
- 2) Haga S. *et al.*, *Pure and Applied Chemistry*, **79**, 775-783 (2007)
- 3) Kimoto H. *et al.*, *Current Biology*, **17**, 1879-1884 (2007)

CYANAを用いた二量体タンパク質の三次元構造解析

○濱田季之^{1,2,3}, Yi-Jan Lin¹, 黒崎千智^{1,3}, 小柴生造^{1,3}, 小林直宏¹, 井上真^{1,3}, 木川隆則^{1,3,4}, 林文晶^{1,3}, 武藤裕^{1,3}, 大橋若奈¹, 佐藤真奈美^{1,3}, 赤坂領吾^{1,3}, 新野睦子^{1,3}, 寺田貴帆^{1,3}, 白水美香子^{1,3}, 好田真由美^{1,3}, 田中昭子^{1,3}, 林崎良英¹, 横山茂之^{1,3,5}, 廣田洋¹, Peter Güntert^{1,6}

¹理研GSC, ²鹿児島大院理工, ³理研SSBC, ⁴東工大・院総理工, ⁵東大院理, ⁶J. W. Goethe 大学

Solution structures of the UBA domains of Cbl-b and c-Cbl and reliability of CYANA structure calculations for homodimeric proteins

○Toshiyuki Hamada^{1,2,3}, Yi-Jan Lin¹, Chisato Kurosaki^{1,3}, Seizo Koshihara^{1,3}, Naohiro Kobayashi¹, Makoto Inoue^{1,3}, Takanori Kigawa^{1,3,4}, Fumiaki Hayashi^{1,3}, Yutaka Muto^{1,3}, Wakana Ohashi¹, Manami Sato^{1,3}, Ryogo Akasaka^{1,3}, Mutsuko Kukimoto-Niino^{1,3}, Takaho Terada^{1,3}, Mikako Shirouzu^{1,3}, Mayumi Yoshida^{1,3}, Akiko Tanaka^{1,3}, Yoshihide Hayashizaki¹, Shigeyuki Yokoyama^{1,3,5}, Hiroshi Hirota¹, and Peter Güntert^{1,6}

¹RIKEN Genomic Sciences Center, Yokohama, Japan.

²Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

³RIKEN Systems and Structural Biology Center(SSBC), Yokohama, Japan.

⁴Int. Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan.

⁵Graduate School of Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

⁶Institute of Biophysical Chemistry and Biomolecular Magnetic Resonance Center, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany.

c-Cbl and Cbl-b are ubiquitously expressed in a variety of mammalian cells and regulate signal transduction pathways in the E3 ubiquitin-ligation process. Dimerization of the C-terminal UBA domain in both Cbl proteins is essential for their ubiquitin-binding and signal transduction functions. In this presentation, we show the first structural analysis of the homo-dimeric structures of the mammalian UBA_c and UBA_b domains by multi-dimensional NMR experiments and CYANA structure calculations. NMR structures of UBA_c dimers (PDB ID: 2D9S) were in excellent agreement with a subsequently published corresponding crystal structure (PDB ID: 2O09), indicating the high reliability of our approach for the structure determination of homodimeric proteins.

CYANA, homo-dimer, UBA domain

○ はまだとしゆき, Yi-Jan Lin, くろさきちさと、こしばせいぞう、こばやしなおひろ、いのうえまこと、きがわたかのり、はやしふみあき、むとうゆたか、おおはしわかな、さとうまなみ、あかさかりようご、くきもと-いのむつこ、てらだたかほ、しろうずみかこ、よしだまゆみ、たなかあきこ、はやしざきよしひで、よこやましげゆき、ひろたひろし、Peter Güntert

ユビキチン-プロテアソーム経路 (Ubiquitin-proteasome systems; UPS) は、タンパク質のユビキチン化/脱ユビキチン化のサイクルにおいて、タンパク質分解、DNA修復、シグナル伝達、エンドサイトーシス、タンパク質輸送などの重要な役割を果たしている。このUPSのサイクルを調節しているタンパク質ファミリーの中にE3 ubiquitin ligase (活性化されたtyrosine kinaseをユビキチン化し、分解へと導く酵素群) の一種、Cblタンパク質ファミリーがある。Cblタンパク質の中で、伝播因子として働くタンパク質がCbl-bであり、一方、その逆の制御因子の中心的な役割を果たしているのがc-Cblである。

これらCbl-bとc-Cblは、Cblタンパク質の中で、唯一C末端にUBA domainを持つ。c-Cblは、そのUBA domain (UBA_c) を介して、自身とhomo-dimerを形成することが知られており、ポリユビキチン鎖やユビキチン化タンパク質との相互作用は、極めて弱い。一方、Cbl-bのUBA domain (UBA_b) は、UBA_cと非常に高いsequence homology (85 % similarity) を有しているにもかかわらず、UBA_cと対照的に、monomerとして存在し、ubiquitin化タンパク質やpoly-ubiquitinとやや強い相互作用を示すことが報告されている。全長タンパク質の生物機能 (つまり、E3 ligaseの正と負の調節因子) と合わせて、対照的な性質を持つ2つのUBA domainsの構造機能解析を行うことは、c-CblとCbl-bの作用メカニズムの解明に大きく寄与するのみならず、UPSの調節機構を明らかにする上で非常に重要である。

そこで、今回、高等動物由来c-CblとCbl-bのUBA domain (UBA_cとUBA_b) について、¹³C、¹⁵N-標識化体を調製後、Filtered NOESY を含めた各種NMR測定を行い、dimerCYANA構造計算を用いて三次元構造を決定した。

得られたUBA_cのNMR構造 (PDB ID:2D9S) は、この構造より後にPDB登録されたX線結晶構造 (PDB ID:2009) とほぼ一致していた。このことは、本研究で用いたdimer構造決定に関する一連の手法が高い信憑性を持つことを示している。また、UBA_bのNMR構造 (PDB ID:2D06) は、X線結晶構造 (PDB ID:200A) と一致しなかった。その理由および二量体タンパク質用のCYANA構造計算法の詳細は、本討論会にて示す。

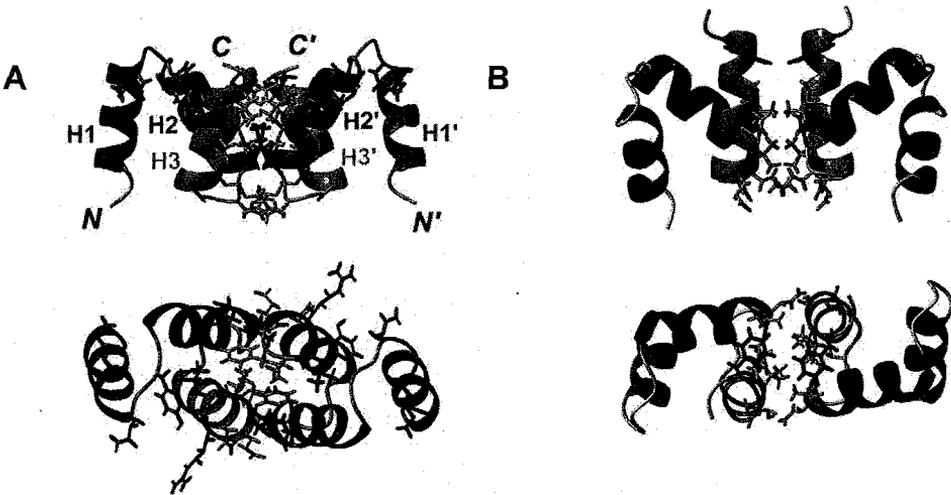


Figure 1. Two orthogonal views of a ribbon representation of one conformer of the NMR structures of the UBA_c (A) and UBA_b dimers (B).

膜タンパク質ハロロドプシンの多次元固体NMR法による構造解析

樋口真理花¹, 江川文子², 田巻初¹, 神谷昌克¹,
相沢智康¹, 河野敬一³, 藤原敏道², 〇出村誠¹

¹北大院・先端生命

²阪大・蛋白研

³北大院・理

Structural Analysis of Membrane Protein Halorhodopsin by Solid State NMR

Marika Higuchi¹, Ayako Egawa², Hajime Tamaki¹, Masakatsu Kamiya¹, Tomoyasu Aizawa¹,
Keiichi Kawano³, Toshimichi Fujiwara², and 〇Makoto Demura¹

¹Faculty of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

²Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

³Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

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. In this presentation, we introduce multi-dimensional magic angle spinning solid state NMR of uniformly and selectively ¹³C and ¹⁵N labeled HR, which is reconstituted with lipid, for the assignments and structural analysis.

膜タンパク質・脂質複合体の機能と構造解析は生命分子科学や創薬研究のターゲットタンパク質として重要である。我々は7回膜貫通型ヘリックス構造ファミリーである古細菌*Natronomonas pharaonis*由来のハロロドプシン（以下NpHR）の機能・構造解析のための大腸菌大量発現系の確立に成功した。NpHRは光エネルギーを利用してCl⁻を細胞外側から取り込むアニオンポンプである。このCl⁻ポンプ機能には細胞外ループが重要な役割を果たしていることが予想されているが、その詳細なメカニズムはまだ解明されていない。そこで本研究では、膜タンパク質ハロロドプシンのCl⁻輸送活性への細胞外ループ領域の構造変化の寄与を固体NMRで解明することを目的とした。NpHRの固体NMR分光法による構造解析に向けた安定同位体ラベルサンプルの調製法と脂質膜再構成法を最適化し、最新の多次元固体NMR測定・解析に取り組んだ。Cl⁻取り込みに関わる細胞外ループ領域の化学シフト変化について詳細に考察した。

Membrane Protein, Light-driven anion pump, Lipid reconstitution

ひぐちまりか, えがわあやこ, たまきはじめ, 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, 〇でむらまこと

実験

NpHR の ^{13}C , ^{15}N 均一二重またはリバースラベル化は M9 最少培地を用いて大腸菌発現系で行なった。D 化 DMPC と NpHR で脂質再構成を行なった。多次元固体 NMR 測定は、500MHz、600MHz、700MHz 固体 MAS NMR 装置を用いた。二次元固体 NMR 測定は、膜貫通の immobile 領域と膜表面の mobile 領域をそれぞれターゲットとした測定を行なった。特に mobile 領域では注目する細胞外ループの Cl⁻ 結合に伴う構造変化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測定した。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) の計算を行なうことで二次構造を評価した。

結果と考察

本研究で作製した NpHR 安定同位体サンプルは大腸菌発現系の培養条件を最適化することにより、 ^{13}C , ^{15}N 均一二重ラベルでは培地 1L 当たり約 11mg、リバースラベルでは約 17mg、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 均一三重ラベルでは約 8mg の収率で大腸菌膜から“活性型”として高収量に得られた。また脂質再構成条件を詳細に検討することで NpHR の二次元結晶化に成功した。これにより膜タンパク質 NpHR が固体 NMR 測定用試料として均一となるのでスペクトル分解能の向上が期待でき、複雑な多次元固体 NMR 測定への応用が可能となった。

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 NpHR の多次元 NMR 信号の検出を行い、帰属作業の簡略化に適用できるか検討した。

膜貫通の immobile 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二次元 ^{13}C - ^{13}C スピン拡散測定を行った。7TM タンパク質は α ヘリックス構造由来の信号の重なりが多いため均一ラベルではピークの分離が難しいが、膜貫通領域に多数存在する疎水性アミノ酸のうち V, L, F, Y のラベル率を下げたリバースラベルサンプルによって帰属を効率化した。一方、膜表面の mobile 領域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二次元 ^1H - ^{13}C FLOPSY 測定を行った。これらのアミノ酸レベルでの帰属結果から CSI を計算したところ、immobile 領域では α ヘリックス構造、mobile 領域では凡そランダムコイル構造を示し、運動性の違いを利用した NMR 信号の検出が適切に行なわれていることがわかった。更に mobile 領域ではコンフォメーション変化に Cl⁻ 依存性があることが示唆された。これらの変化をより詳細に検討するために HNCOCA 測定を行い、FLOPSY と組み合わせることで残基レベルの帰属を行った。その結果、膜表面領域の約 63% にあたる 71 残基の主鎖の帰属に成功し、CSI から Cl⁻ 依存による化学シフトの変化は特に細胞外ループの 100 番目の His 近傍で大きいことがわかった。これらの結果は、Cl⁻ の取り込み機能に His100 近傍の構造変化が関与している可能性が示唆された。

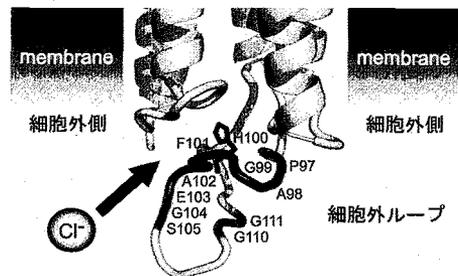


Fig. 1 Chemical shift perturbation in the BC loop of NpHR by adding Cl⁻

ポリアミノ酸-金属イオン錯体の固体 NMR

北大院工 ○平沖敏文、藤江正樹

Solid state NMR studies on Poly(amino acid)-Metal ion complexes

○Toshifumi Hiraoki and Masaki Fujie

Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, 060-8628

The structures of poly(D-glutamic acid)(PGA) and poly(L-aspartic acid) (PAA) complexes with various metal ions in solid state were characterized by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. Most of complexes show the α -helical conformation as judged from the chemical shift values of the main-chain carbons. The chemical shift value of the carboxylate carbons of PGA- and PAA-metal complexes depends on the ionic radius of the metal ion used, suggesting the contribution of the δ_{22} component of the chemical shift anisotropy for the carboxylate carbon resonance.

ポリグルタミン酸 (PGA) とポリアスパラギン酸 (PAA) は様々な金属イオンと錯体を形成する。二価金属イオンと PGA との錯体は、固体状態で主鎖構造は用いる金属イオンに依存して様々な二次構造をとる。¹⁾ 側鎖カルボキシル炭素の化学シフト値は金属イオン半径と原子価数に依存して変化することが分かった。本研究では、PGA 金属イオン錯体と側鎖メチレン基が 1 つ少ない PAA の金属イオン錯体を固体 ^{13}C -NMR により調べ、PGA 錯体と比較検討した。又、PGA 錯体の側鎖カルボキシル基炭素の化学シフト異方性を測定し、金属イオン半径との関係を調べた。

高分子金属イオン錯体は NaPGA、NaPAA 水溶液に目的の金属塩を加えて調整した。 ^{13}C -CPMAS NMR 測定は室温、75MHz で行った。

Fig. 1 に PGA と 5 種の金属イオン錯体の ^{13}C -CPMAS スペクトルを示す。主鎖 C、 C_α 、 C_β の化学シフト値は 176、56、26ppm であり、いずれの錯体も α -ヘリックス構造を示す。これは、コイル状態の NaPGA は二価金属イオンを結合すると α -ヘリックスにコンフォメーション変化することを示している。さらに側鎖 C_δ の化学シフト値は Fig.4 に示すように金属イオン半径に依存して変化した。

C_α シグナルには右肩が観測され、この化学シフト値はコイル状態を示す。線形分離して求めた α -ヘリックス含量は金属イオン半径の増加にともない、90 から 70% に減少した。

PGA-三価金属イオン錯体の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。これらの錯

key word : poly(amino acid), metal ion complex, solid NMR

○ひらおき としふみ、ふじえ まさき

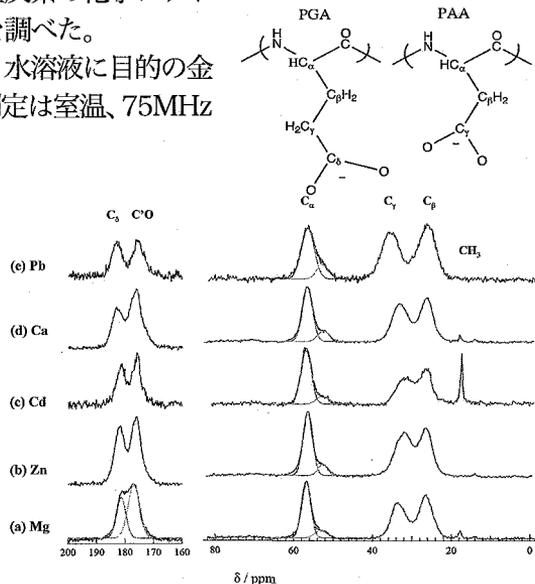


Fig. 1 ^{13}C -CPMAS NMR spectra of PGA-divalent ion complexes.

体の C、C α 、C β の化学シフト値は二価金属錯体と同様であり、 α -ヘリックス構造であることを示す。C α シグナルには肩が観測され、コイル構造の存在を示す。波形分離して求めた α -ヘリックス含量は 65~70% で、金属イオン半径に依存してわずかに増加した。この傾向は二価金属錯体とは異なる。C δ の化学シフト値は Fig. 4 に示すように金属イオン半径依存性を示し、その変化量 (3.8 ppm/Å) は二価金属錯体 (6.3 ppm/Å) に比べ小さい。ここで Y と La-PGA の C δ は数 ppm の常磁性シフトを示した。

Fig. 3 に PAA 金属錯体の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す。NaPAA では 173, 52, 39 ppm に C、C α 、C β がそれぞれ観測され、主鎖構造が α -ヘリックスであることを示す。PAA 金属錯体では C と C γ のシグナルが重なっているため、波形分離して化学シフト値を求めた。MgPAA、CaPAA、PbPAA の C、C α 、C β の化学シフト値は PAA-Na の値とほぼ等しく、PAA-二価金属錯体も α -ヘリックス構造であることを示している。

PAA の C γ の化学シフトの金属イオン半径依存性を Fig. 4 に示す。金属イオン半径が大きくなると、PAA の化学シフト値は PGA と同様に増加するが、その変化量 (2.2 ppm/Å) は PGA より小さい。

カルボキシル炭素の化学シフト値の金属イオン半径依存性を検討するため、Herzfeld-Berger 法より PGA の C δ の化学シフト異方性を求めた。 δ_{22} 成分は Fig. 5 に示すように δ_{is0} と同様なイオン半径依存性 (5.5 ppm/Å) を示すが、 $\delta_{11} + \delta_{33}$ はほぼ一定であった。 δ_{22} の方向はカルボキシル基面内で C δ -金属イオン軸方向に垂直であると予想され、金属イオン半径の増加によりこの方向の C δ の電子密度が減少することを示唆している。

1) H. D. Keith, et al, *Biopolymers*, 7, 775(1969).

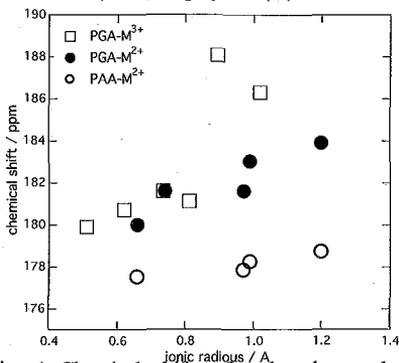


Fig. 4 Chemical shifts of carboxylate carbons against ionic radius.

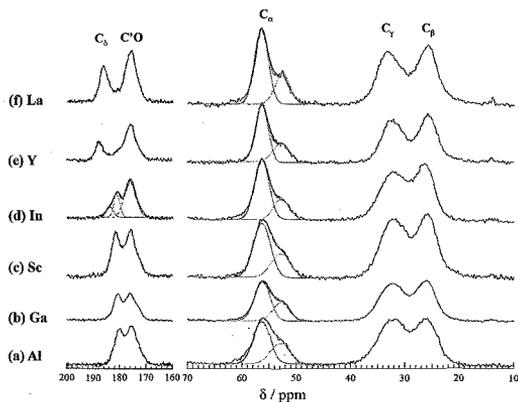


Fig. 2 ^{13}C -CPMAS NMR spectra of PGA-trivalent ion complexes.

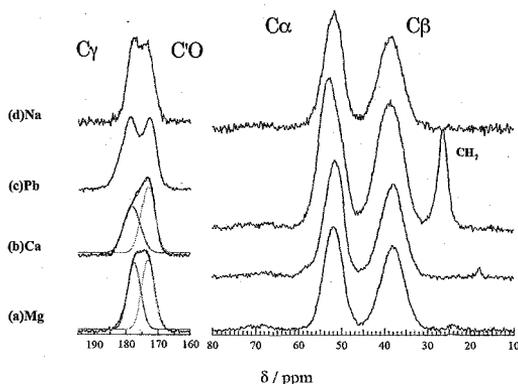


Fig. 3 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of PAA-metal complexes.

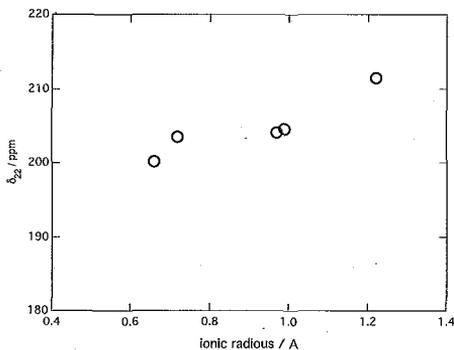


Fig. 5 δ_{22} component of C δ of PGA complexes against ionic radius.

固体多核 NMR によるポリ(L-リジン)-リン酸水素錯体の研究

○永井圭祐, 平沖敏文
北大院工

Solid state multi nuclear NMR studies on poly(L-lysine) - hydrogenphosphate complex

○Keisuke Nagai and Toshifumi Hiraoki

Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo

The conformation of poly(L-lysine) - hydrogenphosphate complex in solid state was characterized by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. The complex formed the α -helical as well as the random coil conformations as judged from the chemical shift values of the main chain carbon resonances. HETCOR spectra showed the fast spin diffusion. Chemical-shift-anisotropy parameters of the phosphate were obtained from ^{31}P CP/MAS NMR spectroscopy. δ_{11} and δ_{22} values of the complex were different from those of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, while δ_{iso} and δ_{33} values of the complex were close to those of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

【序論】 Keithらは、ポリLリジン(PLL)の側鎖に HPO_4^{2-} が結合した PLL- HPO_4 錯体の固体構造が α -helix構造であると、X線回折・電子線回折で明らかにした。⁽¹⁾ 本研究では、固体 ^{13}C CP/MAS NMRとFT-IRにより PLL- HPO_4 の二次構造を調べ、 ^{13}C - ^1H dipolar HETCOR測定により、スピン拡散について調べることで構造をさらに検討した。側鎖末端の構造を検討する為、固体 ^{31}P CP/MAS NMR測定を行った。Herzfeld- Berger法により求め、 HPO_4^{2-} の化学シフト異方性パラメーターを求めた。

【実験】 PLL-HBrと12倍量の Na_2HPO_4 イオンからなる水溶液を室温で混ぜ沈殿を得た。20%エタノールを加えて洗い数回遠心分離し凍結乾燥させて、PLL- HPO_4 を得た。固体 ^{13}C CP/MAS、 ^{31}P CP/MAS測定は、共鳴周波数がそれぞれ75.5MHz、121.5MHzで行った。HETCOR測定は分子科学研究所の ^{13}C 共鳴周波数が231.5 MHzであるECA-920で行った。

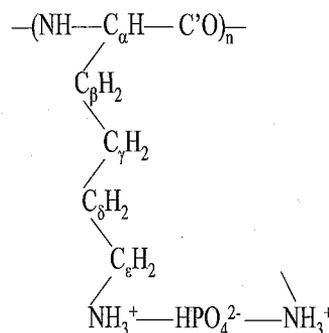


Fig.1 Schematic model of PLL- HPO_4 complex.

Poly(L-lysine) ^{13}C NMR conformation

○ながい けいすけ, ひらおき としふみ

【結果・考察】(1) 固体 ^{13}C CP/MAS

Fig.1に ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを示した。PLL-HBrのC'O、 C_α 、 C_β シグナルは171.5、52.5、27.5ppmに現れ、文献値との比較から主に β シート構造を取る。(2) C'O、 C_α シグナルは非対称な線形でありランダムコイル構造も存在する。波形分離から β シート含量は60%とわかった。PLL-HPO $_4$ のC'O、 C_α 、 C_β シグナルは177、58.2/54.8、23.6ppmに現れ、 α ヘリックス構造を取る。 C_α シグナルはダブルレットでありランダムコイル構造も存在する。波形分離から α ヘリックス含量は54%とわかった。これはHPO $_4^{2-}$ が結合することで主鎖の2次構造が β シート/ランダムコイルから α ヘリックス/ランダムコイルへ変化することを示している。

(2) ^{13}C - ^1H HETCOR

PLL-HPO $_4$ のHETCORスペクトルをFig.3に示した。 ^1H 軸側では H_α だけが、他のシグナルとはっきり区別出来た。Mixing Time(MT)=100 μs では、直接結合している C_α - H_α 、 C_β 、 δ 、 γ - H 側鎖シグナルや C_α -NH/NH $_3$ シグナルが見られた。MT=500 μs では、2~3結合離れているC'O-H側鎖、C'O-H α や C_β 、 δ 、 γ -NH/NH $_3$ や C_α -H側鎖シグナルが新たに見られた。MT=1msでは、 C_α -NH/NH $_3$ シグナルの長距離相関が新たに見られた。

(3) 固体 ^{31}P CP/MAS

Na $_2$ HPO $_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ とPLL-HPO $_4$ の化学シフト異方性パラメーターを求めた。リン系化合物では、 δ_{11} に近い方向の結合距離が最も長く、 δ_{33} に近い方向の結合距離が最も短いという性質がある。(3) これを用いてHPO $_4^{2-}$ の δ_{33} がP=O結合方向に近いと考え、テンソル軸方向を推定した。

References

- (1) H. D. Keith, et al, Biopolymers, 7, 775 (1969).
- (2) H. R. Kricheldorf, et al, Macromolecules, 16, 615 (1983).
- (3) C.A.McDowell, et al, J. Mag. Res. 78, 498 (1988).

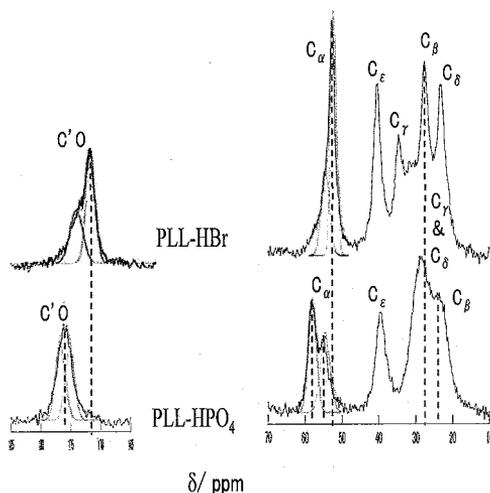


Fig.2 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of PLL-HBr and PLL-HPO $_4$.

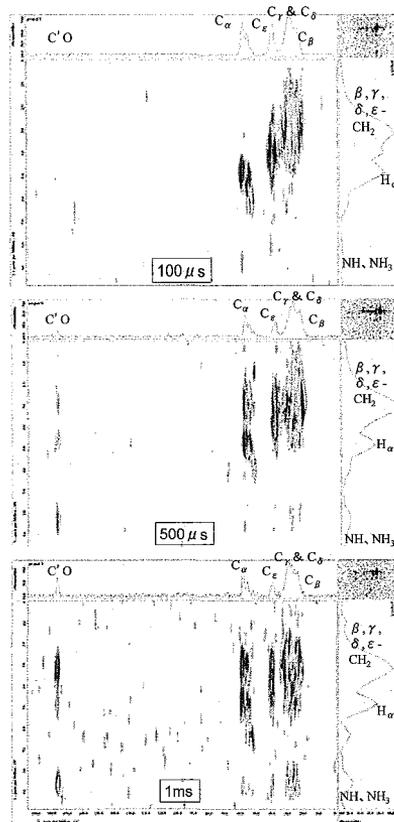


Fig.3 ^{13}C - ^1H HETCOR spectra of PLL-HPO $_4$ at various mixing time.

スズメバチのシルクの延伸配向挙動に関する 固体 NMR 解析

亀田 恒徳 (農業生物資源研究所)

Drawing of silk of the hornet (*Vespa xanthoptera*) using by solid-state NMR Tsunenori Kameda

National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Hornet silk obtained from the cocoons of yellow hornet (*Vespa simillima*, Vespinae, Vespidae) in their native state have an α -helix with coiled-coil structure and a β -sheet. When hornet silk gel films (HSGFs) are formed by pressing and drying the hornet silk hydrogel, the structure of the silk fibers in the native cocoon is restored. Wet HSGFs are flexible and can be uniaxially drawn with a draw ratio of 2. In order to clarify the deformation mechanism during uniaxial drawing, changes occurring in the conformation and molecular orientation of the films during drawing are examined by solid-state ^{13}C and ^{15}N NMR. The results show that during wet drawing, molecular orientation proceeds preferentially over α - β transformation. Furthermore, molecular orientation of the α -helix proceeds preferentially over that of the β -sheet.

【緒言】 スズメバチの幼虫は蛹になる過程で巢中の巢穴にフタ状のマユを作る。このマユはホーネットシルク(HS)と呼ばれる繊維状タンパク質から構成され、そのタンパク質の構造は α -helixを主体としている¹。さらに一部の α -helix分子鎖同士がロープのように絡み合っ Coiled-coil構造を形成しており^{2,3}、従来知られてきた β -sheet構造を主体とするクモやカイコのシルクとは異なっていることが最近の研究から分かってきた^{4,6}。我々は、Coiled-coil構造の存在が、水を含んでいる状態での延伸(Wet延伸)において、分子鎖の配向効率を向上させ、少ない延伸倍率で高い力学物性を引出すことを可能にすると考えている。本研究では、HSフィルムの延伸に伴う構造変化を固体NMRによって解析し、Coiled-coil構造を有するタンパク質素材の延伸における配向挙動と力学物性への影響について明らかにすることを目的とする。

【実験】 茨城県および栃木県内で駆除されたキイロスズメバチの巢からマユを採取して、9M LiBr水溶液に溶解し、溶け残った不純物を除去した後、透析し、その過程で形成したHSゲルを平板状に圧縮乾燥してフィルム(HSゲルフィルム⁷)を作製した。ゲル中のシルク濃度は1wt%とした。ゲルフィルムの延伸は、フィルムを幅1-2mmの短冊状に切出して一軸延伸した。固体NMR測定はVarian infinity 300(独)森林総合研究所)を用いた。Slow-MAS測定、Static測定、および含水試料の測定は7.5mmf CP-MASプローブを用い、その他の ^{13}C および ^{15}N CP-MAS測定は4mmf CP-MASプローブを用いて行った。

【結果および考察】 HSゲルフィルムはWet延伸すると2倍まで均一に延伸できた。2倍に延伸した後定長下で乾燥したフィルムの力学物性値は、過去に報告されたタンパク質フィルムのそれを上回っていた。こうした優れた物性値が比較的小さい延伸倍率で得られた理由は、延伸過程でCoiled-coil構造領域が効率的に配向したためであると推察された。これを検証するために、Wet延伸で得られた延伸倍率の異なるHSゲルフィルムについて広角X線回折(WAXD)測定を行ったところ、 α -helixと β -sheetが混在し、 α -helixの一部がCoiled-coil構造を形成していることが確認された。さらに、2倍延伸フィルムには、配向した α -helixと β -sheet

スズメバチシルク、ゲルフィルム、配向
かめだ つねのり

成分の他に、ほとんど無配向の β -sheet 成分が存在していることが分かった。また、 ^{13}C CP-MAS 測定からは、Ala の一部は延伸によって α -helix から β -sheet へ転移するが、Ser のコンホメーションはほとんど変化しないことが分かった。 ^{13}C CP-MAS 測定から得られる Ala および Ser のピークは、それぞれ、HS の Ala リッチおよび Ser リッチ領域の構造を主に反映しているものと考えられる。このことから、Ala リッチ領域では α -helix(一部 Coiled-coil 構造)が形成され、それが延伸によって効率的に配向し、さらにその一部が配向 β -sheet に転移したものと解釈された。一方、Ser リッチ領域は、延伸前から β -sheet が形成され、延伸の影響をほとんど受けず、延伸前の無配向 β -sheet の状態が延伸後も残り、それが低配向 β -sheet として観測されたと考えられた。

これらの解釈の妥当性を検証するため、2倍延伸試料の Ala および Ser に由来する ^{13}C CP/MAS 固体 NMR スペクトルについてスピニングサイドバンド(SSB)に着目した解析を行った。HS ゲルフィルムを2倍に延伸し、その延伸軸を固体 NMR の試料管回転軸と平行に揃えた状態と、揃えずに完全ランダムにした状態で ^{13}C CP/MAS スペクトルを観測して比較した。一般に、延伸軸に対して分子鎖が無配向の場合には、いずれの状態も同一のスペクトルを与えるが、分子鎖が配向している場合には、等方平均化学シフトピークに対する SSB ピークの強度が配向の程度に依存して変化する。Fig. 1 には、Ala と Ser のカルボニル炭素の等方平均化学シフトピークに対して高磁場(+)および低磁場(-)側に現れる一次の SSB について、2倍延伸試料の延伸軸を試料回転軸に揃えなかった場合(ランダム)に対する、揃えた場合のピーク強度の減少率(%)を、スピニング周波数に対してプロットした。この図から、Ala(α -helix)および Ala(β -sheet)と比べて、Ser(β -sheet)の減少率が小さいことがわかる。この結果は、2倍延伸フィルム中において、Ala が存在する α -helix および β -sheet は共に高配向状態にあり、一方、Ser が存在する β -sheet は低配向状態にあることを示唆しており、前述の解釈を支持するものである。以上の結果から、HS ゲルフィルムの Wet 延伸において、 α -helix (一部 Coiled-coil 構造)を形成している Ala リッチ領域は、 β -sheet を形成している Ser リッチ領域よりも優先的に配向することが明らかになった。さらに、固体 NMR によるダイナミクス解析や HS ゲルフィルムを重水中に浸漬することによる ^{13}C および ^{15}N CP-MAS スペクトルの線形変化などの解析結果を併せて考察することにより、Coiled-coil 構造領域の延伸効率が高くなる理由として、Coiled-coil 構造の周辺に水分子が集まり、さらに、Coiled-coil 構造の剛直性も加わることにより、延伸方向への方向転換が容易にできるためと結論した。

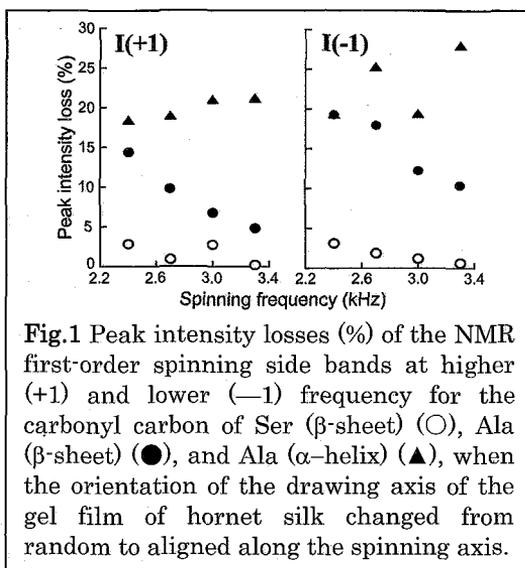


Fig.1 Peak intensity losses (%) of the NMR first-order spinning side bands at higher (+1) and lower (-1) frequency for the carbonyl carbon of Ser (β -sheet) (○), Ala (β -sheet) (●), and Ala (α -helix) (▲), when the orientation of the drawing axis of the gel film of hornet silk changed from random to aligned along the spinning axis.

【参考文献】 1. Kameda et al., *Z.Naturforschung. C.*, **60**, 906 (2005). 2. Kameda et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **44**, 64 (2009). 3. Sezutsu et al., *Biosci.Biotech. & Biochem.*, **71**, 2725 (2007). 4. Kameda et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 2895 (2007). 5. Kameda et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 1353 (2007). 6. Kameda et al., *Comp. Biochem. Phys. B*, **151**, 221 (2008). 7. Teramoto et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2**, 3189 (2008).

The processing mechanism of *B. mori* silk and its application○Yu Suzuki¹, J. T. Gerig² and Tetsuo Asakura¹¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan²Department of Chemistry, UC Santa Barbara, California, USA.

The fiber formation mechanism of silk fibroin in *B. mori* silkworm has been revealed via the conformational change of the silk fibroin between before spinning (Silk I) and after spinning (Silk II). Especially, Silk I was repeated type II β -turn structure in aqueous solution which is a key structure for producing the silk fiber with extremely high strength. In order to mimic this Silk I structure, fluorinated alcohols have been used as solvent because regenerated silk fibroin in the concentrated aqueous solution takes only random coil structure and loose-helical structure like Silk I has been observed in the fluorinated alcohols. In this presentation, we will study the solution structure of the sequential peptide which is a model for the crystalline part of *B. mori* silk fibroin, in the fluorinated alcohols such as hexafluoroisopropanol and hexafluoroacetone by solution NMR. The solute-solvent interactions are also examined by ¹H-¹⁹F intermolecular NOE.

【緒言】

家蚕絹は、蚕体内では水溶液として存在するが、独自の繊維化機構を経て高強度な繊維となる。このダイナミックな物性の変化は、主として絹フィブロインの立体構造の変化によって、もたらされる。そのため、この繊維化機構を理解するためには、繊維化前後の絹フィブロインの立体構造の解明が不可欠であった。我々は、¹³C/¹⁵N 化学シフト値や REDOR、2D スピン拡散などの各種固体 NMR 手法等を駆使して、繊維化前の構造である Silk I 型はタイプ II 型の β -turn の繰り返し構造であることを明らかにしてきた。¹ また、この繊維化前の特異な構造からスタートし、吐糸管内部の圧糸部を通過する際の“ズリ”と八の字を描く蚕頭部の動きによる延伸力を受け²、繊維化後 (Silk II) には、分子間構造の異なる 2 種類の逆平行 β -sheet 構造とゆがんだ β -turn 構造の混在型となり、高強度な絹繊維となることが明らかとなった。³

これらの研究から、Silk I の構造が高強度の絹繊維の形成に極めて重要であることが示されてきた。実際、カイコ体内の液状絹と同濃度の 30% 再生絹水溶液はランダム構造であり、その再生絹糸は極めて弱い。一方、絹がゆるいヘリックス構造を形成するフッ素系溶媒、HFIP や HFA に溶解すると、得られる再生絹糸は天然の絹糸と同程度の力学強度を有する。⁴ そこで、本研究では、HFIP と HFA 中の絹結晶部モデルペプチドの構造と、ペプチド-溶媒間の相互作用の詳細を溶液 NMR により検討した。

家蚕絹・繊維化・モデルペプチド

○すずきゆう, ジョン・ゲーリック, あさくらてつお

【実験】

家蚕絹結晶部モデルペプチド(AGSGAG)₂-NH₂は Pi Proteomics 社(Huntsville, AL)から購入した。溶媒は HFIP-d₁₁((CF₃)₂CDOH)と HFA·3H₂O を用いた。NMR 測定は Varian INOVA 500MHz、H/F probe を用い、25℃、ペプチド濃度 30mM で行った。構造決定のため、TOCSY、NOESY、ROESY 測定を行い、解析は SPARKY、構造計算は DYANA を用いた。ペプチドーフッ化アルコール間の相互作用解析は、¹H-¹⁹F intermolecular NOE 測定を行い、交差緩和係数(σ_{HF})を求めた。拡散係数は bipolar double stimulated echo pulsed field gradient 測定により求めた。

【結果・考察】

HFIP、HFA のどちらの溶媒中でも、ほぼ全長にわたり H_{αN}(i, i+1)、H_{NN}(i, i+1)のクロスピークが観測され、(AGSGAG)₂ は、ゆらぎは大きいものの、ターンを含むコンパクトな構造を形成していることが示された(Figure 1)。HFIP 中の方が、少し伸びた構造であった。

また、ペプチドーフッ化アルコール相互作用解析では、¹H-¹⁹F NOE スペクトルにおいて、ペプチド由来のすべてのピークが HFIP 中ではポジティブであるのに対し、HFA 中ではネガティブであった(Figure 2)。⁵ 溶媒の粘性や分子半径等の条件を考慮に入れてペプチド-溶媒分子間に特異的な相互作用がない場合の交差緩和係数σ_{calc}を求め、¹H-¹⁹F NOE スペクトルから求めた実測値σ_{obs}と比較すると、HFIP は σ_{calc} と σ_{obs} が同程度の値であった。一方、HFA では σ_{calc} がほぼすべての ¹H でポジティブなのに対し、σ_{obs} はすべてネガティブであり、ペプチド-HFA 分子間の強い相互作用が示唆された。HFA 絹溶液から作成された再生絹糸の力学強度は、HFIP 絹溶液の 60%程度であり、絹フィブロインの溶液構造の違いに加え、溶媒との相互作用の強さが再生絹糸の物性に影響を与えていると考えられる。

【謝辞】本研究は一部、生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業(平成 20-22 年度)ならびに科学研究費基盤研究S(平成 18-22 年度)によって行われた。

【参考文献】

1. T. Asakura *et al*, *Macromolecules* **38** 739 (2005)
2. M. Moriya *et al*, *Polymer* **49** 952 (2008)
3. T. Asakura *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* **124** 8794 (2002)
4. S. W. Ha *et al*, *Biomacromolecules* **7** 18 (2006)
5. C. Chatterjee *et al*, *Biochemistry* **45** 14665 (2006)

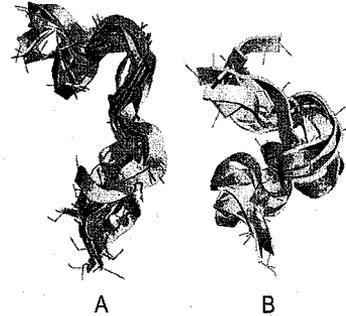


Figure 1: Superimposed ten structures of (AGSGAG)₂ in HFIP (A) and seven structures of (AGSGAG)₂ in HFA (B) consistent with the available intramolecular ¹H-¹H NOE/ROEs data

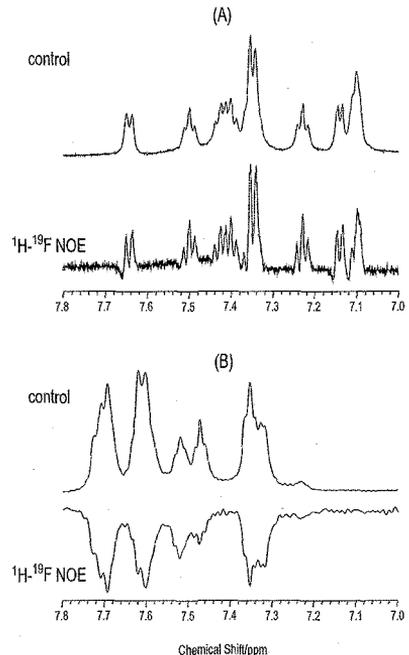


Figure 2: Low field ¹H-¹⁹F intermolecular NOE spectra of (AGSGAG)₂ in HFIP (A) and in HFA (B). Upper spectrum in each set is the observed 1D ¹H spectrum and lower spectrum is the ¹H-¹⁹F NOE spectrum at a mixing time of 500ms for HFIP system and 300ms for HFA system, respectively.

○吉田愛¹, 神谷昌克², 出村誠², 朝倉哲郎¹¹農工大院・工²北大院・生命科学**Production and NMR analysis of silk-like proteins containing the cell adhesive sequence**○Ai YOSHIDA¹, Masakatsu KAMIYA², Makoto DEMURA², and Tetsuo ASAKURA¹¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology.²Graduate School of Advanced Life Science, Hokkaido University.

Basic cellular events such as cell adhesion and cell migration depend heavily on the ligand recognition exercised by integrins through a RGD tripeptide sequence of the ligand. Silk-like proteins which consist of alternative sequences of main sequences from *Antheraea perni* silk fibroin and the sequence TGRGDSPA in fibronectin with high cell adhesion ability were produced by *E.coli*. To determine specificity and affinity of RGD motif-containing integrin-ligands, structural environment of the motif is also important. In order to develop a structural plat form for design of silk-based biomaterials, solution state and solid state NMR analysis of the model peptides containing both silk fibroin sequences and TGRGDSPA were performed. Also, production of the ¹³C, ¹⁵N-uniform labeled silk-like protein is continuously advanced to make comparative study between conformations and function of these proteins.

【緒言】

細胞の接着や増殖において最も重要であるインテグリン-リガンド結合の多くは Arg-Gly-Asp (RGD) 配列によって認識される。このリガンド認識の特異性と高親和性はリガンドの一次配列だけでなく、構造環境にも起因する。高い相同性を有するタンパク質である、フィブロネクチンとテネイシンはRGD配列の存在するループの長さや運動性によって、結合するインテグリンの種類や結合の強さが異なることが報告されている[1]。また、インテグリンの種類に合わせてRGD配列の構造環境を最適化することで、アンタゴニストとして優れたペプチドを *de novo* 設計する試みも行われている[2]。

我々は、機械的強度や生体適合性に優れ、高い形状加工性を持つ絹タンパク質の一次配列と機能性配列を組み合わせることで、絹の機能性向上を目的とした絹様タンパク質の設計・生産を行ってきた[3]。一方、野蚕の一種である *A. perni* の絹フィブロインはアラニン連鎖とRGD配列を有し、細胞接着性が高いことが知られている[4]。

今回、新たにアラニン連鎖配列およびフィブロネクチン由来のRGD配列、水溶性付加とカルシウム結合のポイントとなるグルタミン酸連鎖配列を導入した絹様タンパク質の設計を行い、硬組織用絹様材料の創製を目的とした。本発表では、モデルペプチドを用いてpH変化による絹配列部分の構造変化がRGD配列の構造環境にどのような影響を与えるのかについて、溶液および固体NMRを用いて検討した。

Silk fibroin, RGD, Peptide and Protein

○ よしだあい, 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溶液および固体NMR構造解析

各種ペプチドならびに安定同位体ラベルペプチドの合成をF-moc固相法にて行った。

Table 1. Several model peptides synthesized by solid-phase method.

| | | |
|-----|--|------------------------------------|
| (a) | EE(A) ₁₂ EETGRGDSPAEE(A) ₁₂ EE | <i>A. perni</i> silk fibroin + RGD |
| (b) | AGS(GAGAGS) ₂ GGTGRGDSPAGG(GAGAGS) ₂ GAG | <i>B. mori</i> silk fibroin + RGD |
| (c) | (TSTGRGDSPAS) ₃ | (RGD) ₃ |

ペプチド(a)について、H₂OまたはD₂O中でCDおよび溶液NMR測定を行った。構造を比較するために、ペプチド(b), (c)についても同様の測定を行った。pH調整はNaOHのみで行い、所定のpHに調整後、凍結乾燥した試料を固体NMR測定に用いた。CD測定はJASCO J-805、溶液NMR測定はJEOL ECA-400またはBruker DRX500、固体NMR測定はBruker AVANCE-400を用いて行った。

2. 新規絹様タンパク質の設計と生産

ペプチド(a)の構造に基づいて、新規絹様タンパク質のDNA配列を設計し、大腸菌による発現を進めている。E2A12E2FN(5); [EE(A)₁₂EETGRGDSPA]₅

【結果と考察】

pH変化に伴うGlu残基側鎖の荷電状態の変化が、ドライビングフォースとなり、Ala連鎖部位の構造に大きく影響することが懸念される。ペプチド(a)の各pHにおけるCDスペクトルをFigure 1に示した。222 nmと208 nm近くに極小値を持つことから、pH3.6およびpH5.2では α -helix構造が主であることが分かる。しかしpHが上がるにつれて、しだいにrandom coil構造の割合が増加する。

一方、ペプチド(a)をpH3.0およびpH10.6に調整後、凍結乾燥させた試料の¹³C CP/MASスペクトルをFigure 2に示した。構造依存性の高いAla C _{β} はpH3.0では15.1ppm、pH10.6では15.9ppmにピークを示し、C _{α} およびC _{γ} はほとんど変化しない。従って、固体状態ではいずれもGlu側鎖の解離状態によらず、Ala連鎖部位は α -helix構造を持つことが分かる。

今後、RGD部位の局所構造についての解析を進め、機能との相関について異なるRGD構造環境を持つペプチド(b)や(c)と比較する予定である。また、新規絹様タンパク質のNMR構造解析および高分子量化による材料化を目指す。尚、本研究は一部、生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業(平成20-22年度)ならびに科学研究費基盤研究S(平成18-22年度)によって行われた。

【参考文献】

- [1] Carr, P.A., et al., Structure, 1997. 5(7): p. 949-959.
- [2] DiCara, D., et al., J. Biol. Chem., 2007. 282(13): p. 9657-9665.
- [3] Mingying, Y., et al., J. Biomed. Mater. Res., 2008. 84(2): p.353-363.
- [4] Minoura, N., et al., Biochem. Bioph. Res. Co., 1995. 208(2): p. 511-516.

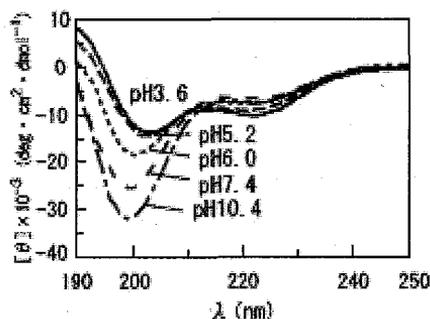


Figure 1. CD spectra of the model peptide (a) (0.02% w/v in H₂O).

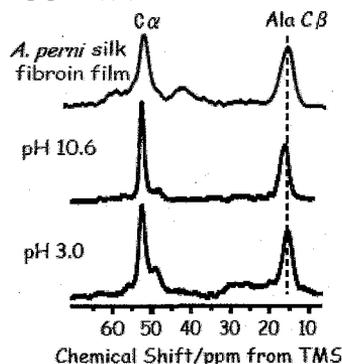


Figure 2. ¹³C CP/MAS NMR spectra of *A. perni* silk fibroin and model peptide (a).

油系ゲル化剤パルミチン酸デキストリンの物性研究

○長島敏雄¹、鈴木拳直²、小池秀明²、月岡大輔²、木川隆則^{1,3}、
横山茂之^{1,4}、林文晶¹

¹理研・生命分子システム、²千葉製粉株式会社、

³東工大院・総理工、⁴東大院・理

A characterization of the molecular interaction of a gelation agent for oil, dextrin palmitate

○Toshio Nagashima¹, Takanao Suzuki², Hideaki Koike², Daisuke Tsukioka²,

Takanori Kigawa^{1,3}, Shigeyuki Yokoyama^{1,4}, Fumiaki Hayashi¹

¹RIKEN SSBC, ²Chiba Flour Milling Co.,LTD., ³Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineer, Tokyo Institute of Technology, ⁴Graduate School of Science, University of Tokyo

To investigate the molecular property of a gelation agent for oil, dextrin palmitate (DP), which is used as a base material in cosmetic products and medicines, we applied solid-state NMR to the various state of DP. We observed two kinds of peaks from alkyl chain of palmitate in gel and solid NMR spectra and furthermore the temperature-dependent migration between the peaks. Additionally, this dependence was similar to that of DP gel hardness. However, this temperature-dependent manner did not appear on the peaks from dextrin main chain. These results suggest the gel formation is induced by the crystallization and/or the re-orientation of the alkyl chain of palmitate. We will discuss the roll of the alkyl chain and hydroxyl group of DP on gel formation in more detail by NMR.

【序】パルミチン酸デキストリン(DP)は、油系ゲル化剤として、乳液やクリームなどの化粧品の安定化や使用感の向上、油脂の結晶化抑制、顔料の分散安定化に用いられている。DPはデンプンを加水分解して得られたデキストリンにパルミチン酸クロライドを反応させ得られたもので、グルコースひとつに対して最大3個のエステル化が起こる。今回は液状油脂のゲル化に注目し、ゲル形成の構造的メカニズムを明らかにすることを目的している。ゲル形成にはゲル化剤によるマトリックス構造の形成が必要不可欠であるが、DPによるゲル化のメカニズムはわかっていない。本研究では、DP間の分子間相互作用を固体NMRを用いて明らかにした。

【実験】今回用いたDPはエステル置換度が2程度のもので、グルコース上に平均1つの水酸基が残っており、平均分子量は15k程度である。まず、10%DPの流動パラフィン溶液は、硬

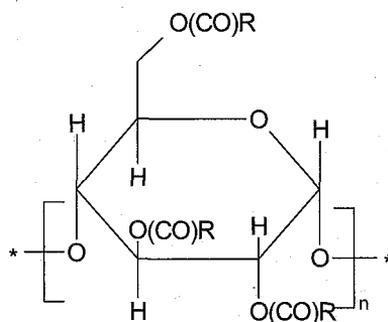


Fig 1. Structure of dextrin palmitate, in which R is alkyl chain (C15).

ゲル、デキストリン脂肪酸エステル、結晶化

○ながしまとしお、すずきたかなお、こいけひであき、つきおかだいすけ、きがわたかのり、よこやましげゆき、はやしふみあき

いゲルを形成した。2%の重クロロホルム溶液は、粘性変化が見られない溶液状態を保っていた。JEOL ECA-700 NMRとDoty 4mm MASプローブ、およびJEOL CMX-400 NMRとChemagnetics 4mm MASプローブを用いて溶液、ゲル、粉末の ^{13}C NMR測定を行った。溶液およびゲルの測定には、PCTFE製の内部試料管をMASローター内に入れて行った。またVarian Inova 600 NMRを用いて溶液の測定を行い、シグナルを帰属した。

【結果と考察】 Fig2に示すように、4~5kHzMASによるCP/MAS NMRスペクトルでは、ゲル中に大量に含まれる流動パラフィンの信号の寄与は小さく、ゲルと粉末でアルキル鎖領域が酷似したパターンをとることがわかった。また、同じ条件で測定した2%DP重クロロホルム溶液のCP/MAS NMRスペクトルとは明らかに異なる結果になった。これらの結果から、ゲル状態にあるDPは粉末に近い状態にあると考えられる。溶液のスペクトルとは異なり、C4-C13のメチレン鎖の部分に低磁場シフトした成分が現れた。C14はC4-C13に重なって解析できないが、同様のシフトはアルキル鎖先端のC15、C16でも見られる。アルキル鎖付け根のC2、C3にはこのような顕著なスペクトル変化が見られなかった。低磁場シフトしている32ppm付近の幅広のシグナルはゲルや粉末にしか見られず、ゲルの形成に密接に関係していると考えられる。

次にゲルに似たスペクトルが得られた粉末で温度依存性を ^{13}C NMRスペクトルを用いて調べた(Fig3)。4~66°Cの間ではデキストリン骨格には大きなスペクトル変化が見られなかったが、アルキル鎖領域で温度上昇と共に30ppm付近の信号が増大し、32ppm付近のシグナルが減少した。47°C程度まで変化していくこの過程は、粘弾性測定によるゲル強度測定の結果とも一致する。したがって、ゲル強度の変化にはアルキル鎖の状態変化が関連していると推察される。どちらのシグナルにおいても、十分なCP/MAS NMRスペクトルが観測できているので、どちらも分子運動が制限された状態であると考えられる。NMRでこのようにポピュレーション移動する現象はアルキル鎖間相互作用の変化が原因と考えられ、これまでの報告から32ppmが結晶状態で、30ppmが非晶状態と推定できる[1]。ゲルのマトリクス構造そのものの直接的なデータは得られていないものの、デキストリンの水酸基の水素結合ではなく、C4以降のアルキル鎖の結晶化がマトリクス形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

[1] Kitamaru, R et al., *Macromolecules*, **1986**, 19, 636.

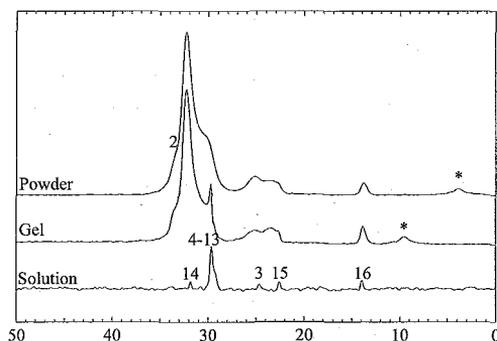


Fig 2. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of alkyl chain region of DP in state of solution, gel, and powder at room temperature. Astarisks indicate spinning side band, and the numbers on peaks correspond to carbon on alkyl chain.

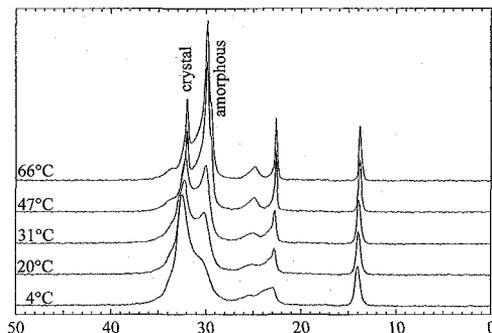


Fig 3. Temperature dependence of ^{13}C NMR spectra of alkyl chain region of DP powder under MAS.

固体¹³C NMRを用いた光照射によるppR-pHtrIIの細胞質表面部位の相互作用変化の観測

○近藤 隆博¹、川村 出¹、西尾 拓道¹、加茂 直樹²、内藤 晶¹

¹横浜国立大学大学院工学府

²松山大学薬学部

Change of interaction in cytoplasmic surface region of ppR with pHtrII in the complex formation as studied by solid-state NMR under photo illumination

Takahiro Kondo ¹, Izuru Kawamura ¹, Takudo Nisio ¹, Naoki Kamo ², Akira Naito ¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University; College of Pharmaceutical

²Sciences, Matsuyama University

Pharaonis phoborhodopsin (ppR) is a negative phototaxis receptor from *Natronomonas pharaonis* and forms a complex with its cognate transducer pHtrII. To understand molecular mechanism of negative phototaxis, it is important to observe the interactional changes of ppR with pHtrII during complex formation and photo activation processes. In this study, interaction of ppR with pHtrII in the cytoplasmic side was examined using solid-state NMR under photo illumination. [1-¹³C] Ser and [3-¹³C] Ala-labeled ppR and there complexes with pHtrII(1-159) were prepared to investigate the interaction between ppR and pHtrII. As a result we observed changes of NMR signal intensity which was related to the interactional changes of cytoplasmic region with pHtrII. We will discuss these spectral changes to understand the molecular mechanism of the signal transfer in the process of negative phototaxis.

概要

Pharaonis phoborhodopsin (ppR)は高度好塩好アルカリ性菌中に存在する膜タンパク質で、7本の膜貫通αヘリックスからなるレチナールタンパク質である。また、*pharaonis* Halobacterial transducer II (pHtrII)と複合体を形成することで細菌が負の走光性を示すための光受容体となる。そして、この信号伝達のメカニズムを理解するためには、ppRが光を受けた時の細胞質側でのタンパク質間相互作用の変化を観測することが重要である。

そこで本研究では細胞質側での相互作用変化を調べるための検出プローブとして細胞質表面部位に局在しているSerとタンパク質全体に多く存在するAlaを同位体標識した[1-¹³C]Ser、[3-¹³C]Ala標識ppRを用い、標識部位の光照射固体¹³C NMR測定を行った。またこの結果、わずかながらppRとpHtrIIの相互作用に関わるNMR信号変化を観測できた。この細胞質側での相互作用変化から信号伝達機構について考察する。

Solid-state NMR, membrane protein, Solid-state NMR under photo illumination

○こんどうたかひろ、かわむらいずる、にしおたくどう、かもなおき、ないとうあきら

実験方法

野生型ppR-ヒスチジンタグ発現プラスミドを導入した大腸菌をM9培地で培養し、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Ser}$ で同位体標識したppRを発現させた。また野生型pHtrII-ヒスチジンタグ発現プラスミドを導入した大腸菌をLB培地で培養することで、野生型pHtrII(1-159)を発現させた。発現されたppRとpHtrIIは遠心分離により集菌し、超音波によって破碎、Ni-NTAカラムによる精製を行った。発現タンパク質の確認には吸収スペクトルとSDS-PAGEを用いた。次にEggPCにppR : pHtrII : EggPC = 1 : 1 : 50のモル比で再構成した試料を調製し、それぞれNMR測定用buffer(pH7.0)で懸濁し、NMR試料管に詰めて密閉した。 ^{13}C NMRの測定は ^1H 共鳴周波数を398.1MHz、 ^{13}C 共鳴周波数を100.1MHz、測定温度を20°Cに設定し、測定感度を向上させる交差分極 (CP)、異種核間の双極子相互作用を消去する双極子デカップリング (DD) 及び、化学シフト異方性を消去するMAS法(4kHz)を組み合わせることで分解能を向上させた。NMR試料管への光照射はプローブの上方から光ファイバーを挿入し、光ファイバーでフタをした試料管の上から照射した。この方法により高速回転中での光照射が可能になった。これらの装置を用いて暗順応状態と明順応状態で、それぞれNMR測定を行った。明順応状態では帯域通過フィルターで450~600nmの光をppRに照射することで光活性化状態 (M中間体) を捕捉した。

結果と考察

Fig.1に $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -ppR/pHtrIIのDD-MAS ^{13}C NMRスペクトルを載せた。円内がppRの細胞質表面部位にあるC末端領域に帰属されている信号である。この結果、光を照射することでC末端領域の信号強度が増えているので、この部分の運動性が上がっていることが示唆された。

以前当研究室では光励起信号伝達状態に対応するD75Nで測定したところ、C末端の運動量が増加することを観測した⁽¹⁾。さらにpHtrII同士の相互作用が増加することが分かった。本実験では、実際に光照射を行い、M中間体が捕捉できたと考えられるので、ppRは光活性化状態(M中間体)でもpHtrIIとの相互作用が細胞質表面部位において弱まることが示唆された。このレチナールの光異性化に伴うppRとpHtrIIとの相互作用変化がppRの信号伝達のメカニズムの一端を担っていると考えられる。

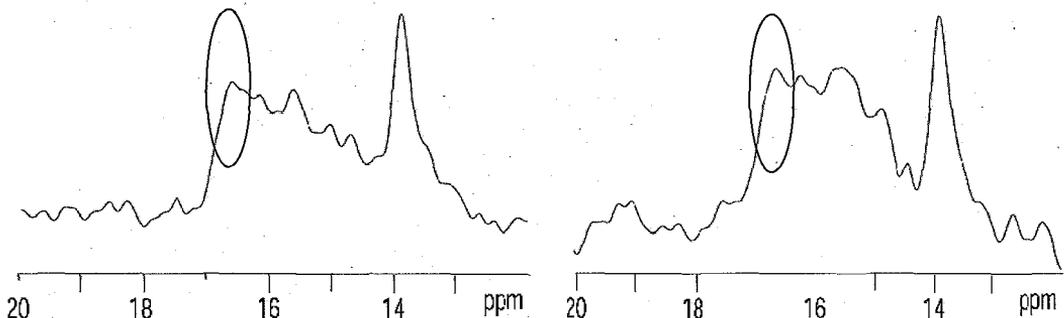


Fig.1 $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -ppR/pHtrII DD-MAS ^{13}C NMR spectra
C-terminal tip region (in circle), Left : Dark state, Right : Light state

参考文献

(1) I.Kawamura et al. *Photochem. Photobiol.* (2008) 84,921-930.

固体NMRとTEMによるヒトカルシトニンのアミロイド様線維形成機構とその阻害効果の解析

○渡邊 (伊藤) ひかり¹、上平美弥²、近藤正志³、佐藤道夫³、中越雅道³、内藤晶¹

¹横浜国大 工学府、²東北大・多元研、³横浜国大・機器分析評価センター

Analyses of amyloid fibrillation mechanism and its inhibition effect of hCT as studied by ¹³C solid-state NMR and TEM

○Hikari Watanabe(Itoh)¹, Miya Kamihira², Masasi Konndou³, Michio Sato³, Masamichi Nakakoshi³, and Akira Naito¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University

²Institute of Multidisciplinary Research Tohoku University

³Instrumental Analysis Center, Yokohama National University

Human calcitonin (hCT) is known as forming amyloid fibril in concentrated aqueous solution. We have shown that the fibrillation mechanism of hCT can be analyzed by the two step autocatalytic reaction mechanism. In this study, we investigated inhibition effect in the fibrillation of hCT. First, we investigated inhibition effect on a variety of solvent in fibrillation. The morphology of hCT in the initial step of fibrillation in HEPES aqueous solution was examined by means of TEM. It was revealed that the fibrillation rate became very slow and consequently spherical intermediate appeared. In addition, ¹³C NMR experiments were performed on the fibrillations of hCT mutants in HEPES aqueous solution. The ¹³C NMR signals showed that structural transition of hCT mutants from random coil to β -sheet and random coil near C-terminal regions appeared during fibrillation. These results suggest that HEPES aqueous solution pronouncedly inhibit the fibrillation in case of hCT mutant.

アミロイド線維形成はアルツハイマー病やパーキンソン病などで知られるアミロイド病の直接的な原因とされており、この線維形成機構や線維形成阻害機構を解明することは、線維形成が起こる全般的な病気（アミロイド病）の治療法や予防法の開発の手がかりになる。アミロイド線維は結晶を形成せず、沈殿物を形成するため、X線回折法や溶液NMRを用いることは適さない。よって、我々はアミロイド線維に対して、固体NMRを使用することで、線維構造に関する詳細な情報の提供を示してきた。

本実験で使用するヒトカルシトニン (hCT) は骨粗鬆症、Paget病及び高カルシウム血症の治療薬として以前使用されていたペプチドであったが、水溶液中で容易にアミロイド様線維を形成することが確認されたため、治療薬として使用されなくなっている。これまでの結果、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形成することを報告した。

固体NMR、アミロイド線維、アミロイド線維阻害

○わたなべ (いとう) ひかり、かみひらみや、こんどうまさし、さとうみちお、なかこしまさみち、ないとうあきら

本研究では、溶媒による線維形成阻害効果と、線維の促進因子となるアミノ酸の特定するため、hCT変異体による線維形成阻害機構について、固体NMRを用いて解析し、検証した。

【実験】Wt-hCT・hCT変異体 (F19L-hCTとF16L-hCT) は、Fmoc基を導入した¹³C標識したアミノ酸を用いて、固相法により化学合成を行い、脱保護、逆相HPLCにより精製し、目的の試料を得た。次に、hCT変異体 (F19L-hCTとF16L-hCT) は、20mM リン酸緩衝液 (pH7.4) に、15mM 酢酸水溶液 (pH3.3) に溶かし、Wt-hCTとF19L-hCTは、20mM HEPES水溶液 (pH5.3) に溶かすことで線維形成を開始し、その経時変化を固体NMR及びTEMにより測定した。固体NMR測定では、モノマー成分の観測に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するDD-MAS法を用い、線維成分の観測に交差分離とデカップリングを組み合わせたCP-MAS法を用いて、同じ試料に対し、交互に線維形成過程を測定した。

【結果と考察】

1. 電子顕微鏡による線維形成の観察

hCT の線維形成は①核形成 (モノマーがミセルを形成し、そのミセルが構造転移を起こし、 β -sheet からなる核を形成する過程) と②線維成長 (線維の核にモノマーが会合し、線維が伸長していく過程) の律速段階をもつ 2 段階自己触媒反応機構 (Fig.1) で起こることを我々の研究では提唱している。

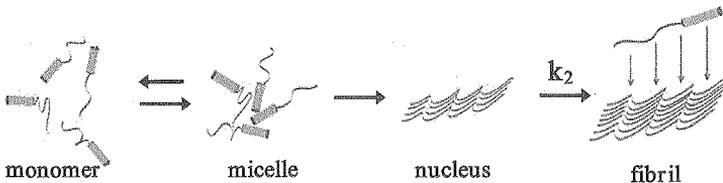


Fig.1 The mechanism of fibrillation

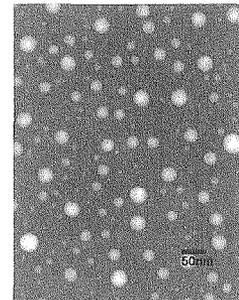


Fig.2 Wt-hCT image in the initial step of fibrillation in HEPES aqueous solution

この線維形成機構において、hCT のそれぞれの状態を明確に確認できるような溶媒を確定するため、様々な溶媒で線維化を試した。この結果、線維化が中性の場合に比べて遅い酢酸水溶液 (pH3.3) よりも、さらに線維化が遅い HEPES 水溶液 (pH5.3) を溶媒に決定した。この HEPES 水溶液での線維化において、透過型電子顕微鏡 (TEM) を使用することで、Wt-hCT の中間体 (核) および中間体 (核) から線維が伸びて成長する様子が観測された。Fig.2 では、一面に様々な大きさの球状の中間体 (核)、(直径 10.8[nm]~40.3[nm]) が多数存在していた。これにより、様々な大きさのミセルが中間体 (核) に構造転移を起こしたと考えられる。

2. 線維の構造解析

それぞれの溶媒下で Wt-hCT の線維化と hCT 変異体の線維化を行い、DD-MAS 法及びCP-MAS 法により観察したモノマーおよび線維の二次構造情報を Table 1 に示す。

Table 1. ^{13}C chemical shifts of hCT and its mutants (ppm from TMS) and their assignments

| Sample | | Gly10 C=O | Ala26 CH ₃ |
|--------------------------|------------|--|--|
| Condition: pH3.3 (酢酸) | | | |
| hCT | Monomer(a) | 171.8 (α -helix) | 16.9 (random coil) |
| | Fibril(b) | 169.9 (β -sheet) | 19.3 (β -sheet), 21.3 (β -sheet) |
| F19L-hCT | Monomer(a) | 171.9 (α -helix) | 16.9 (random coil) |
| | Fibril(b) | 170.0 (β -sheet) | 19.1 (β -sheet), 17.0 (random coil) |
| F16L-hCT | Monomer(a) | 171.9 (α -helix) | 16.9 (random coil) |
| | Fibril(b) | 169.6 (β -sheet), 170.6 (random coil) | 19.3 (β -sheet), 18.0 (random coil) |
| Condition: pH5.3 (HEPES) | | | |
| F19L-hCT | Monomer(a) | 171.8 (α -helix) | 16.9 (random coil) |
| | Fibril(b) | 169.6 (β -sheet) | 19.1 (β -sheet), 17.0 (random coil) |
| Condition: pH7.4 (リン酸) | | | |
| hCT | Monomer(a) | 171.8 (α -helix) | 16.9 (random coil) |
| F19L-hCT | Monomer(a) | 171.8 (α -helix) | 16.9 (random coil) |
| F16L-hCT | Monomer(a) | 171.8 (α -helix) | 16.9 (random coil) |

(a) DD-MAS, (b) CP-MAS

モノマー成分では、溶媒や変異体に関係なくペプチドの分子中央部では α -helix 構造、C 末端では random coil 構造を示していた。これは、線維形成前のペプチドの状態は溶媒や芳香族の数に影響を受けず、同一の構造を取っていることが分かる。次に、pH3.3 下で hCT 変異体 (F19L-hCT, F16L-hCT) の C 末端は random coil 構造から線維化後に β -sheet 構造と random coil 構造の混在状態へと構造変化が起こった。Wt-hCT と比較すると、芳香環を一つ失うことで構造上、比較的柔らかい線維が形成したと考えられる。

また、F19L-hCT において、pH3.3 下と pH5.3 下を比較すると、構造上の変化は見られなかったため、溶媒によって構造が変化するのではないことが明らかになった。

3. 線維形成機構における反応速度解析

hCT の線維形成は二段階自己触媒反応機構 (Fig.1) を基にして解析した。核形成反応と線維成長反応からなる反応機構において、核形成反応の速度定数 k_1 、と線維成長反応の速度定数 k_2 を決定した。

hCT 変異体 (F19L-hCT) においては、線維成長の経時変化に着目した。まず、CP-MAS の NMR スペクトル信号 (Fig.3) は線維が β -sheet であることを示した。この線維成長の強度変化をプロットする (Fig.4) と、一定時間後、線維成分が成長し始めたことから、二段階自己触媒反応機構で線維化が起こることが分かった。この機構で反応速度解

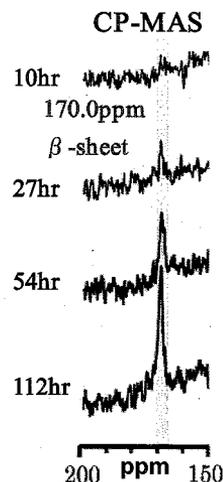


Fig.3 ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{10}$, F19L-hCT at CP-MAS in the time course of fibril formation

析を行い、速度定数を導き出した。各条件下における速度定数を Table 2 に示す。

Table 2 Kinetics parameters for fibril formation of Wt-hCT, F19L-hCT and F16L-hCT

| | pH 7.4 | | pH 3.3 | |
|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | $k_1 [s^{-1}]$ | $k_2 [s^{-1}M^{-1}]$ | $k_1 [s^{-1}]$ | $k_2 [s^{-1}M^{-1}]$ |
| 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} |

Table 2 より Wt-hCT と比較して、hCT 変異体の k_1 では、ほぼ一定値であるのに対し、 k_2 は中性水溶液中で 100 倍、酸性水溶液中で約 4 倍、値が小さくなり、線維成長反応が遅くなった。これにより、線維成長段階に芳香族アミノ酸が阻害効果を及ぼすことが示唆された。その理由として、F19L、F16L-hCT では、ベンゼン環同士の π - π stacking (疎水性相互作用) が 1 つなくなり、 β -sheet 構造を形成する安定化エネルギーが減少するため、大きな線維阻害の効果が現われたと考えられる。

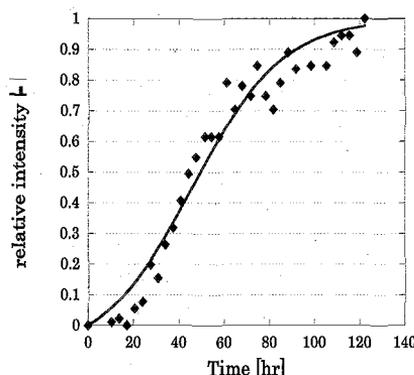


Fig.4 Time course of ^{13}C NMR signal intensity at CP-MAS [1- ^{13}C]Gly 10

4. 溶媒による線維形成阻害

Wt-hCT の線維化において、溶媒による阻害効果を検討した。最初に、電子顕微鏡にて同じ濃度の下で、酢酸水溶液下での線維化と HEPES 水溶液下での線維化を観察した。細い線維が確認され始めた時間を比較すると、酢酸水溶液では 2 日目で確認されたことに対し、HEPES 水溶液では 7 週間で確認した。このことから、HEPES 水溶液は線形成を阻害して、反応速度が格段に遅くなったと考えられる。

次に、hCT 変異体 (F19L-hCT) の線維化においても溶媒による阻害効果を検討するため、同様な実験を試みた。固体 NMR を用いて、線維形成過程を定量的に解析した。線維成分を測定する CP-MAS 法の NMR スペクトル信号が伸長し始めた時間を比較すると、酢酸水溶液では Fig.3 で示すように線維形成が線維化開始 27 時間後で確認された。これに対し、HEPES 水溶液では、11 日後に CP-MAS の NMR スペクトル信号を確認することができた。以上から、Wt-hCT だけではなく、hCT 変異体でも HEPES 水溶液は線維形成阻害効果があることが判明した。

【結論】 ヒトカルシトニンにおいて F19 および F16 は線維を安定化するため、線維成長速度を促進することが分かった。線維形成を阻害する溶媒を検討した結果、HEPES は強い線維形成阻害効果を示すことが分かった。この HEPES 溶媒を用いて、線維形成過程を観測したところ球状の中間体の存在が明らかになった。

NMR を用いたリン脂質膜中における緑茶カテキン類の 相互作用部位の解析

○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
¹静岡県大院・生活健, ²信州大・農, ³横浜国大院・工

Analysis of the interaction between tea catechins and phospholipid membranes as determined by NMR spectroscopy

○Yoshinori Uekusa¹, Miya Kamihira¹, Osamu Sugimoto¹, Ken-ichi Tanji¹, Kozo Nakamura², Takeshi Ishii¹, Shigenori Kumazawa¹, Akira Naito³, and Tsutomu Nakayama¹

¹Department of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

²Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University

³Graduate School of Engineering, Yokohama National University

We have clarified that a beneficial green tea component, epicatechin gallate (ECg), strongly interacts with the surface of phospholipid bilayers by solution and solid-state NMR measurements. In this study, we examined the location of ECg in phospholipid membranes using ¹³C labeled ECg ([¹³C]-ECg) and various NMR techniques. The results of ¹H-¹³C heteronuclear NOE experiments demonstrated that the carbonyl carbon of [¹³C]-ECg locates near the phospholipid's γ protons. Using the ¹³C-³¹P REDOR measurements, we determined the accurate interatomic distance between the carbonyl carbon of [¹³C]-ECg and the phosphorus of phospholipids to be 5.3 ± 0.1 Å. Furthermore, we also measured the distance between the carbonyl carbon and the γ carbons of phospholipids with/without ECg. These results provide insights into the interaction mechanism of tea catechins with lipid membranes.

【序論】 茶カテキン類はポリフェノール類の一種であり、抗酸化作用や抗菌作用等の生理機能を有することが報告されているが、機能発現メカニズムの詳細については解明されていない。我々はこれらの生理機能を発揮するためには、第一段階として生体膜である脂質二重層への相互作用が重要であると考えており、溶液及び固体 NMR を用いてカテキン類とリン脂質膜との相互作用解析を進めてきた。その結果、この相互作用に関与する部位の特定 (カテキン類: B 環, galloyl 基, リン脂質分子: γ 位) に成功し、さらにカテキン類の一種である epicatechin gallate (ECg) はリン脂質膜中で膜法線まわりの回転運動を行っていることを明らかにした。本研究では、溶液 NMR による ¹H-¹³C 異種核 NOE 相関測定と固体 NMR の ¹³C-³¹P REDOR 法を用いて、モデルリン脂質膜 (バイセル, 多重膜リポソーム (MLV)) 中における ECg の相互作用に

キーワード: カテキン, 異種核 NOE, 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

重要な galloyl 基の存在位置をより明確に決定することを目的とした。

【実験方法】 ECg のカルボニル炭素を安定同位体ラベルした ^{13}C -ECg を化学合成によって得た。これを DMPC と DHPC で構成されるバイセルに再構成させて、溶液 NMR (JEOL JNM- α 400) にて ^1H - ^{13}C 異種核 NOE 相関測定を行った。また、 ^{13}C -ECg を DMPC から成る MLV に再構成させて水和試料を作製し、急速凍結・凍結乾燥により粉末にした後、 ^{13}C - ^{31}P REDOR 測定を行った。REDOR 測定は Chemagnetics CMX infinity-400 NMR 分光器を用いて、xy-4 compensation pulse 法によって測定した。

【結果と考察】 溶液 NMR 測定の結果、リン脂質分子 γ 位の水素からラベル部位である ^{13}C -ECg の galloyl 基のカルボニル炭素に対して異種核 NOE が観測された (Fig. 1)。一方、リン脂質分子の α 及び β 位水素と ^{13}C -ECg との相関は観測されなかった。この結果は、先行研究の NOESY 測定により得られた相互作用部位の知見を強く支持しており、カテキン類はリン脂質膜表面付近と相互作用することを確証した。固体 NMR の ^{13}C - ^{31}P REDOR 測定においては、 ^{13}C -ECg のカルボニル炭素の信号強度が顕著に減衰し、この減衰比を理論曲線にフィッティングさせて ^{13}C -ECg のラベル ^{13}C 原子とリン脂質分子のリン原子との分子間 ^{13}C - ^{31}P 原子間距離を算出した (Fig. 2)。その結果、原子間距離は $5.3 \pm 0.1 \text{ \AA}$ であった。第 47 回 NMR 討論会においても REDOR 法による原子間距離の測定結果を報告したが、今回は REDOR パルス系列の $\pi(^{31}\text{P})$ パルス幅を注意深く検討したことで、より精密な原子間距離の測定に成功した。さらに、リン脂質分子の γ 位とリン原子との分子内原子間距離を ECg 存在下/非存在下で比較したが、相互作用の有無による違いは確認できなかった。この結果から、カテキン類は生体膜表面付近と相互作用するが、膜構造は大きく変化しないことが明らかになった。

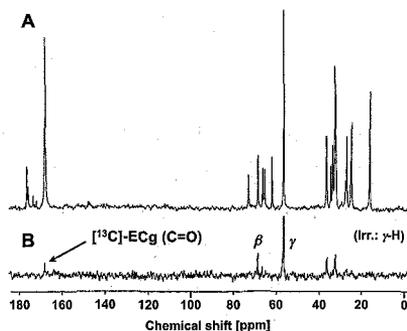


Fig. 1. ^{13}C NMR (A) and ^1H - ^{13}C heteronuclear NOE (B) spectra of ^{13}C -ECg interacting with bicelles.

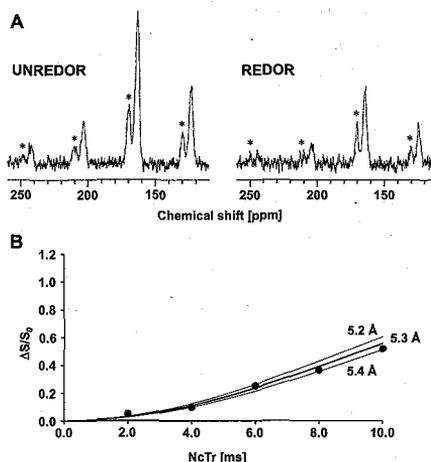


Fig. 2. ^{13}C - ^{31}P REDOR spectra of ^{13}C -ECg (C=O) in MLV (MAS: 4000 Hz, NcTr: 10 ms) (A) and theoretical curve fitting to the REDOR data (B). The asterisk mark is the signal from phospholipids.

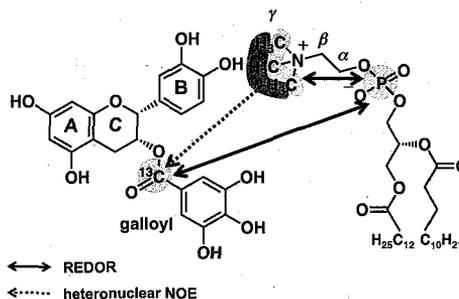


Fig. 3. The schematic representation of correlations between ^{13}C -ECg and phospholipid obtained by ^1H - ^{13}C heteronuclear NOE and ^{13}C - ^{31}P REDOR experiments.

固体NMRとCOMPASS法を用いたH⁺-ATP合成酵素 subunit c-ringの構造解析

○戸所泰人¹, 田中健太郎¹, 湯面郁子¹, 岩崎郁¹, 小林将俊¹,
鈴木俊治^{2,3}, 吉田賢右^{2,3}, 藤原敏道¹, 阿久津秀雄¹

¹阪大・蛋白研, ²東工大・資源研, ³JST・ICORP・ATP合成制御

Structural analysis of H⁺-ATP synthase subunit c-ring by Solid-state NMR and COMPASS method

○Yasuto Todokoro¹, Kentaro Tanaka¹, Ikuko Yumen¹, Iku Iwasaki¹, Masatoshi Kobayashi¹,
Toshiharu Suzuki^{2,3}, Masasuke Yoshida^{2,3}, Toshimichi Fujiwara¹, Hideo Akutsu¹

¹IPR, Osaka Univ., Japan, ²CRL, Tokyo Inst. of Tech., Japan, ³ATP-synthesis regulation project, ICORP, JST, Japan

A rotary motor ATP synthase is located in bacterial plasma membranes, thylakoid membranes of chloroplasts, and mitochondrial inner membranes. F-type ATP synthase from a *thermophilic Bacillus* PS3 (TF₀F₁-ATP synthase) is one of them. TF₀ subunit c (TF₀c) consists of 72 amino acids, and forms an oligomeric ring, which acts as a proton motor. The proton-transfer mechanism has not been resolved, because whole structure of c-ring is not determined. Thus, we are trying to analyze the three dimensional structure of the TF₀c-ring reconstituted into liposomes for clarification of the proton-transfer mechanism. C^α (90%), and CO, NH (80%) signals could be sequentially assigned by COMPASS method using a series of selectively labeled amino acids. The chemical shifts suggest that major parts of the TF₀c-ring in liposomes take on α-helices, similarly to the monomer structure in organic solution.

生物のエネルギーキャリアーであるATPは、生物のエネルギー代謝の中心的役割を果たしている。このATPを合成しているのがATP合成酵素であり、真核生物ではミトコンドリア内膜に、バクテリアでは細胞膜に存在する。ATP合成酵素は、生体膜を介した水素の電気化学的ポテンシャルを利用して、ADPとリン酸からATPを合成する。バクテリアでは、主にα₃β₃γδ_εという5種類9個のサブユニットからなる膜表在性のF₁とab₂c₁₀₋₁₄という3種類13個から17個のサブユニットで構成される膜内在性F₀から構成され、サブユニットcは複数集まってring構造を形成している。本研究では、好熱菌PS3由来ATP合成酵素F₀のサブユニット c-ring (以下TF₀c-ring) に注目した。c-ringは、生物種によってring構造を構成するオリゴマーの数が異なるが、プロトン輸送によるringの回転は共通している。近年、溶液NMRにより有機溶媒中でのモノマーの立体構造が決定され、プロトン輸送における構造変化に関して2つのモデルが提案されているが、ring全体の構造がいまだ明らかになっていない。そのため、回転メカニズムはいまだ解明されていない。そこで、回転メカニズム解明に向けて、生体内の環境

Solid-state NMR, membrane protein, sequential assignment

○とどころやすと, たなかけんたろう, ゆめんいくこ, いわさきいく, こばやしまさとし, すずきとしはる, よしだまさすけ, ふじわらとしみち, あくつひでお

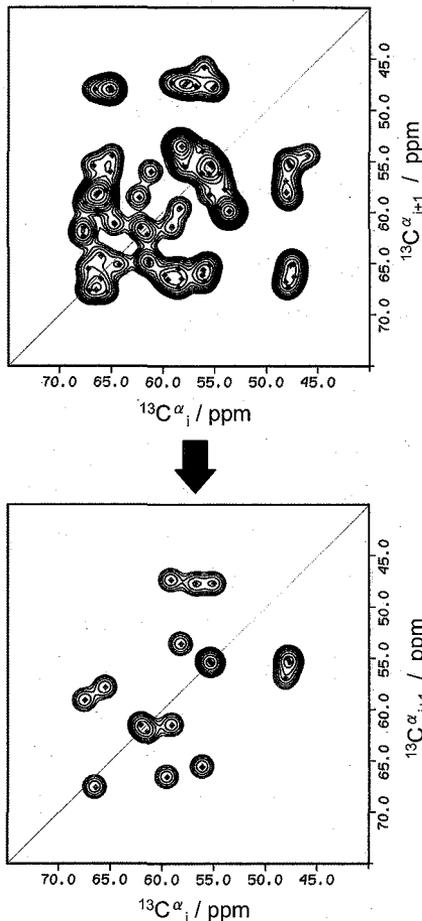


Fig. 1 Model spectra of $^{13}\text{C}_{i+1}^{\alpha} - ^{13}\text{C}_i^{\alpha}$ correlation are plotted from chemical shifts of monomer. (a) ^{13}C , ^{15}N uniformly labeled TF_0c and (b) reverse labeled TF_0c (ΔV , L, I, R, H)

成した。

これらの試料について、それぞれ残基内 $2\text{D } ^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ 、 $2\text{D } ^{15}\text{N} - ^{13}\text{C}^{\alpha}$ 、残基間 $2\text{D } ^{13}\text{C}_{i+1}^{\alpha} - ^{13}\text{C}_i^{\alpha}$ 、 $2\text{D } ^{15}\text{N}_{i+1} - ^{13}\text{C}_i^{\alpha}$ を測定した。Fig. 1 に溶液 NMR から得られた TF_0c モノマーの化学シフト値を利用して、残基間 $2\text{D } ^{13}\text{C}_{i+1}^{\alpha} - ^{13}\text{C}_i^{\alpha}$ のモデルスペクトルを示した。大幅にシグナルの重なり合いが改善し、解析可能なスペクトルとなっている。COMPASS 法を用いて、その他に 2 種類のサンプルのスペクトルを得ることで、残基配列に沿った帰属をすることができる。今回の場合、 C^{α} は約 90%、 CO 、 NH は約 80% を配列特異的に帰属ができた。これらの化学シフト値とスペクトルを用いた脂質二重膜中での TF_0c -ring の構造解析について報告する。

に近い状態での ring 構造を解析するために、 ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体標識した TF_0c -ring を精製し、人工脂質膜に再構成した活性のある構造を固体 NMR により解析している。

固体 NMR は溶液 NMR にくらべ分解能が悪いことが、蛋白質の構造解析に広く使われない要因の一つである。そこで、分解能を向上させるために、COMPASS (COMPensated Patch Assignments by Selevtively labeled Samples) 法を開発し、 TF_0c -ring の主鎖のほとんどを配列特異的に帰属した。COMPASS 法は経験的にシグナルが分散し、アミノ酸配列で帰属がつながるように、数種類の選択ラベルサンプルをデザインし、それらを相補的に用いて、配列特異的に帰属できる方法である。

選択標識したサンプルの作成にはリバースラベル法を用い、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識培地に標識していないアミノ酸を多量に加えることで、特定のアミノ酸を標識しないサンプルを作成した。この方法で ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体標識を薄めた試料を 3 種類作成した。リバースラベル法により ^{13}C 、 ^{15}N 標識を行う利点は、培地に標識していないアミノ酸を加えるだけなので、大量発現系に大きな変更がいらず、比較的容易に ^{13}C 、 ^{15}N 選択標識サンプルを作成することができる。界面活性剤を用いてインタクトな TF_0c -ring を精製し、DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) でできた脂質二重膜に再構成する方法はすでに確立されていたので、それを用い ^{13}C 、 ^{15}N 標識アミノ酸の異なる 3 種類のサンプルを作

脂質膜界面における PH ドメインの構造および機能の解析

○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 創薬研究センター)

A study of structure and function of the PH domain induced at the membrane interface.

○Naomi Tokuda¹, Hitoshi Yagisawa¹, Yasuhisa Fukui², Satoru Tuzi¹(¹Grad. Schl. Life Sci., Univ. Hyogo, ²Hoshi Univ.)

The PH domain is frequently found in the proteins included in the important cellular functions such as the cellular signal transduction and cytoskeletal organization. One of the well known functions of the PH domain is to regulate membrane localization of the protein with stereospecific recognition of the phosphoinositide headgroups. In this study, we investigated structural alterations of the switch associated protein-70 (SWAP-70) PH domain induced at the membrane surface by using the solid-state NMR spectroscopy. The solid-state ¹³C NMR spectra of the membrane associated SWAP-70 PH domain revealed that a conformational transition of the C-terminal α -helix to a random coil is induced at the membrane surface. Since C-terminal α -helix involves nuclear localization signal (NLS), the conformational transition would expose NLS and subsequently facilitate translocation of the SWAP-70 to the nucleus.

【序論】PH ドメインは細胞内情報伝達に関与する蛋白質中に数多く見出されており、7本の β ストランドからなる β サンドイッチ構造、およびC末端の α ヘリックスを構造モチーフとするドメインである。主要な機能として、イノシトールリン脂質頭部への結合を介する、膜表在性蛋白質の膜への局在の制御が知られている。本研究では、固体 NMR 分光法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観測し、その脂質膜結合機能を詳細に解析することを目的としている。ここでは、PIP₃頭部を認識し、選択的に結合する SWAP-70 PH ドメインについて、固体 ¹³C NMR による解析を行った。脂質膜上における SWAP-70 PH ドメインの構造変化と蛋白質機能への関与について報告する。

【実験】大腸菌発現系を用い、[3-¹³C]Ala および[1-¹³C]Val 安定同位体標識を導入した GST 融合ヒト由来 SWAP-70 PH ドメインの発現を行った。

キーワード：固体 NMR、PH ドメイン、脂質二重膜

著者：○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

GST 融合蛋白質は、アフィニティーレジンを用いて単離した後、thrombin 切断により GST を除去し、イオン交換カラムを用いて精製した。得られた PH ドメインは、D-*myo*-phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) を含む脂質二重膜懸濁液、又は PIP₃ の頭部にあたる水溶性の低分子 D-*myo*-inositol 1,3,4,5-tetraphosphate (IP₄) にそれぞれ結合させた後、濃縮し、測定試料とした。得られた水和状態のサンプルは、固体 NMR 測定用試料管に密封し、測定に用いた。固体 ¹³C NMR 測定は DD-MAS 法および CP-MAS 法を用いて Chemagnetics CMX Infinity-400 (¹³C: 100.6 MHz) により 25 °C で行った。

【結果と考察】SWAP-70 PH ドメインの立体構造モデル中に、¹³C 標識部位を示した (Fig. 1)。Fig. 2 A, B に DD-MAS 法により測定された、IP₄ および POPC/PIP₃ ベシクル共存下における [3-¹³C]Ala 標識 SWAP-70 PH ドメインの固体 ¹³C NMR スペクトルを示す。Fig. 1 に示すように、Ala300 は C 末端の αヘリックス中に、Ala288 は αヘリックスの N 末端に隣接する β7 ストランドの C 末端に存在する。Fig. 2A の 18.5 ppm および 15.9 ppm の信号は、二次構造と化学シフトの対応により、それぞれ Ala288 および Ala300 に帰属できる。POPC/PIP₃ ベシクル中の PIP₃ に結合した状態 (Fig. 2B) では、ランダムコイルの化学シフト値

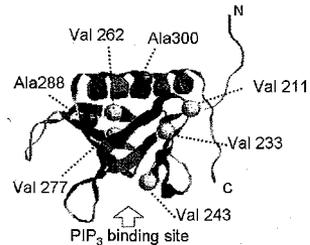


Fig. 1 Three-dimensional model structure of SWAP-70 PH domain in solution. The positions of alanine and valine residues are indicated. (Li, H et al. PDB ID: 2DN6)

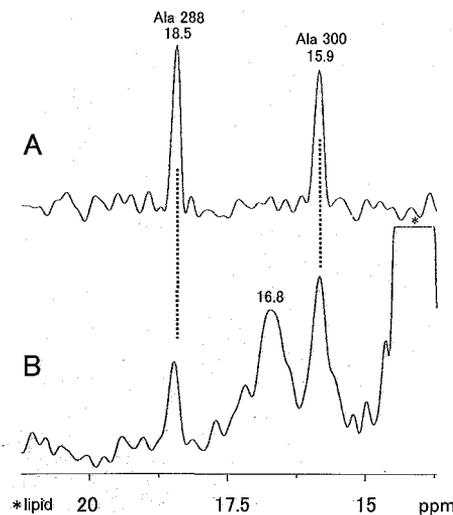


Fig. 2 DD-MAS NMR spectra of the [3-¹³C]Ala labeled SWAP-70 PH domain forming complex with IP₄ in solution (A), and with PIP₃ embedded in the vesicle (POPC : PIP₃ = 95:5) (B).

に近い 16.8 ppm に新たな信号が観測された。この信号は、αヘリックス構造と比べて CP 効率が低いことから、運動性が高く、二次構造を持たないランダムコイル状構造に由来すると考えられる。これらの点から、SWAP-70 PH ドメイン C 末端の αヘリックス構造は、脂質膜結合によりランダムコイルへと転移すると考えられる。一方、βストランドおよびループ中に含まれる Val 残基のカルボニル炭素の信号は SWAP-70 PH ドメインの βサンドイッチ骨格が、脂質膜界面においても保たれていることを示した。脂質膜との相互作用による、C 末端の αヘリックス構造からランダムコイルへの転移は、αヘリックス中に含まれる核移行シグナル (NLS) を溶液中へと露出させ、SWAP-70 の細胞膜から核への移行を促進すると考えられる。

1mmφ高速 MAS プローブによる新たな固体 NMR 法の可能性

○ 山内一夫¹, 西山裕介², 石井佳誉³, 朝倉哲郎¹, 樋岡克哉²
¹東京農工大学, ²日本電子, ³イリノイ大学

Solid State NMR of High Speed 1mm Probehead and Its Application

Kazuo Yamauchi¹, Yusuke Nishiyama², Yoshitaka Ishii³, Tetsuo Asakura¹, Katsuya Hioka²

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.

²JEOL Ltd., Tokyo, Japan.

³Department of Chemistry, University of Illinois, IL, U.S.A.

The probehead is developed for high-resolution solid state NMR observation with high speed spinning of the samples. The probehead is composed with stator for 1mmφ. rotor and it span over 70kHz and it has the capability of observation with sub-micro gram sample. As the result, spectra obtained by this probehead are high resolution and high sensitivity. Here, we introduce some applications using this probehead with 800MHz instrument including basic specification of it and also the potentiality for new applications specially using high speed spinning and high field NMR for solid state NMR.

緒言

近年の固体 NMR 測定において、高感度化と高分解能化は非常に重要な課題である。NMR の高感度化は外部磁場の高磁場化を始めさまざまな方法が行われているが、装置やサンプルの観点から汎用的に微量物質を感度よく測定する方法として我々はマイクロコイル NMR プローブを用いてきた。特に微量でも高感度・高分解能で観測可能な固体 NMR 用の microMAS プローブは検出限界の飛躍的な向上を実現してきている¹⁾²⁾。これにより今まで観測が事実上不可能であったミリグラム以下の試料であっても観測が可能となった。

一方、マイクロコイルを用いる方法は高感度化のみならずサンプルチューブの小型化が実現でき、これはサンプルチューブを高速回転すること可能となる。これにより固体 NMR に障害になるプロトン-プロトンの双極子相互作用の除去、常磁性物質による広幅化の軽減など直接的な高分解能化が期待できる。また、マイクロコイルを用いているために回路の効率化ができてきている。そのためにプロトン照射(デカップル)をする際に従来よりも弱いパワーで十分なデカップリングが可能となり高分解能化が実現できる。

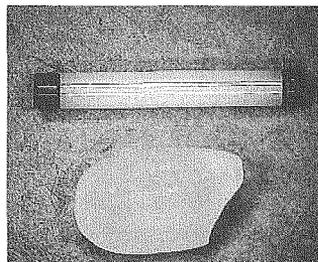


Fig.1 1mmφ rotor for high speed MAS and rice grain.

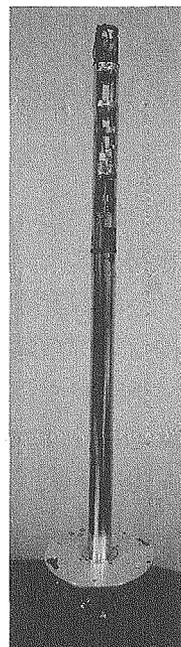


Fig.2 1mm MAS probehead for 800 MHz instrument

solids state NMR, MAS, high speed spinning

やまうちかずお、にしやまゆうすけ、いしいよしたか、あさくらてつお、ひおかかつや

Fig.1 に 1mm ローターを示す。サンプルチューブの材質は以前製作しているものと同じくジルコニアの本体及び vespel のキャップで製作した。サンプルチューブの長さを 9.5mm から 7.4mm と短くしたことにより高速回転を目指し、さらに高速回転に対応できるスピナーモジュールを製作した。

測定・プローブ評価

今回、プローブは Fig.2 に示す¹H 周波数 800MHz、¹³C 周波数 201MHz のナローボアデュアルチューンのプローブを製作し利用した。測定は市販 800MHz 溶液 NMR 装置のマグネットと分光器を用いた。回転制御は分光器と別に本グループで開発したコントローラおよびプログラムを用いて測定を行った。

・高速回転

回転は従来の MAS 操作と同様にプログラムにより bearing と driving の空気を制御することにより、70kHz 以上の安定した回転が実現できた。Fig.3 に 10~70kHz で回転させた L-alanine の ¹H-MAS スペクトルを示す。¹H-¹H の非常に強い双極子相互作用により線形が広幅化していたものが高速回転することにより先鋭化し、スペクトルピークの感度上昇が実現できることがわかった。

・デカップルと CP 法

4mm φ の従来のサンプルチューブを用い 20kHz 程度の MAS 回転下で測定を行う場合、溶液の NMR 用のアンプを用いたデカップルでは帯域が不十分であり固体スペクトルは十分に高分解能化できなかった。しかしながら、今回開発したプローブを用いることにより高速回転下ラジオ波照射デカップリングは非常に弱いもので十分である。Fig.4 に実際の¹³C CP/MAS スペクトルを示す。50kHz で MAS 回転を行っているために、双極子相互作用は弱くなり、そのためにデカップルは 10kHz でも十分高分解能スペクトルが得られていることがわかる。

発表においては、高速回転下におけるハートマンハーン条件など、応用測定を視野に入れた解決しなければならない問題点の提起、さらに高速回転の NMR により得られる新たな情報の可能性について議論する予定である。

謝辞

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

参考文献

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

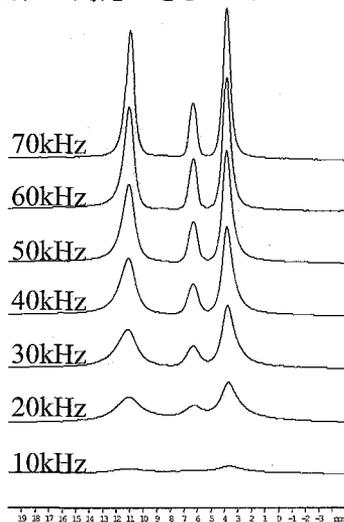


Fig.3 ¹H MAS spectra of L-alanine by changing spinning speed

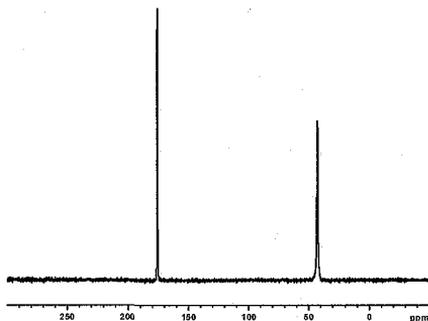


Fig.4 ¹³C CP/MAS spectrum of glycine by 50kHz MAS spinning speed with 10kHz decoupling field

1 mm超高速MASプローブの開発

○遠藤由宇生¹, 根本貴宏¹, 蜂谷健一¹, 西山裕介¹, 下池田勇一¹,
山内一夫², 樋岡克哉¹

¹日本電子

²東京農工大学

Development of 1 mm Ultra High Speed MAS Probe

○Yuki Endo¹, Takahiro Nemoto¹, Kenichi Hachitani¹, Yusuke Nishiyama¹,
Yuichi Shimoikeda¹, Kazuo Yamauchi², and Katsuya Hioka¹

¹JEOL Ltd., Tokyo, Japan.

²Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.

In solid state NMR, it is strongly required to develop high speed MAS probes in order to improve the resolution and the sensitivity with mass-limited samples. However, the development has not been advanced so well due to various mechanical problems.

Therefore, the authors have established a high speed spinning system enough to solve them. Then, we have developed a 1 mm ultra high speed MAS probe. As a result, the MAS speed over 70,000 Hz has been achieved in practical NMR measurements.

In this presentation, we mainly discuss the precise mechanical processing of the sample tube and the gas bearing in the spinner module.

固体NMR測定の高分解能高感度化において、サンプルチューブの小型化、MASの高速化は、重要な課題である。一般に、固体NMR測定には数十～数百 μL (mg)のサンプル量が要求される。そのため、サンプルチューブの小型化による量感度の向上が、強く望まれている[1]。同時に、サンプルチューブの小型化に伴うMASの高速化は、固体NMR測定の更なる進展に不可欠である。例えば、常磁性物質の線幅はMAS速度に敏感であり、MASの高速化が高分解能化に威力を発揮する。また、一般的な¹Hデカップリングの¹³C測定では、MASの高速化により、ローパワーデカップリングが有効になる[1]。それにより、いままで測定困難であった、温度に敏感な生態系試料などの測定に対して、新たな展望が期待される。

現在のところ、外径1 mm程度のサンプルチューブを用いた超高速MASに関して、いくつか報告されているが[2]、まだ実用には困難が多い。特に、キャップのタービン部には μm オーダーの超精密加工が要求され、これは一般的な機械加工の範疇を大きく超えている。我々は、超高速MASプローブの実用化を目的とし、これらの問題に対して機械工学的観点からのアプローチを行っている。そこで今回、70,000 Hzを超える1 mm超高速MASプローブの開発を行った。

(キーワード3つ) MASローター, 高速MAS, MASプローブ

○えんどうゆうき, ねもとたかひろ, はちたにけんいち, にしまゆうすけ, しもいけだゆういち, やまうちかずお, ひおかかつや

Fig. 1に、開発したサンプルチューブと比較のための1円玉を示す。寸法は、外径1 mm、キャップを含めた全長7.4 mm、サンプルボリューム0.8 μ Lである。キャップの材質はVespel、スリーブの材質はジルコニアである。特にキャップの材質は、強度と軽量化を考慮しての選択である。安定した超高速回転を実現する上で、他の樹脂を使用することは難しい。また、キャップのタービン部に関しては、超精密加工技術により、直径1 mmの円柱に5枚の羽根を作成した。

Fig. 2に、開発したプローブに搭載されたスピナーモジュールを示す。H観測時のバックグラウンドを考慮し、スピナーモジュールの材質には、PCTFEを採用した。Fig. 3は軸受とタービンノズルの配置を模式的に示したものであり、気体軸受は静圧型である。ラジアル方向に2カ所、スラスト方向に1カ所の軸受を配置し、サンプルチューブを支持している。気体の経路は、一般的に見られるBearingとDriveがそれぞれ独立している形式を採用した。また、駆動するにあたって複雑な操作が発生しないよう、設計に留意した。駆動方式は、円周方向からエアジェットを当てる衝動型を採用している。

Fig. 4に、実際の駆動から得られた回転速度とDrive圧力の関係を示す。70,000 Hzを超える回転速度を確認した。開発したプローブは、NMR評価を実施中である。

謝辞

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

参考文献

- [1] K. Yamauchi and T. Asakura, Chem. Lett. 35, 426 (2006).
- [2] A. Samoson, T. Tuhern and Z. Gan, Solid State Nucl. Magn. Reson. 20, 130 (2001).

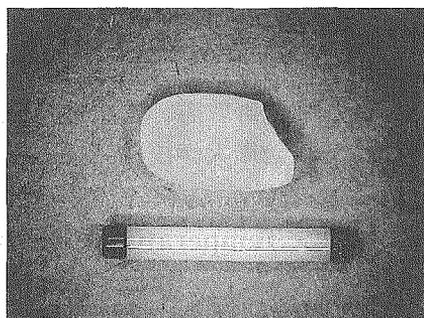


Fig. 1 Sample tube compared with a rice

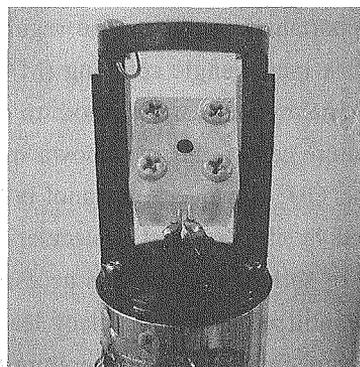


Fig. 2 Spinner module

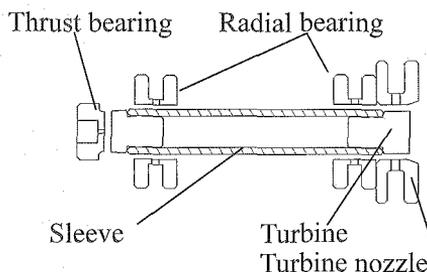


Fig. 3 Arrangement of the bearing and the turbine nozzle

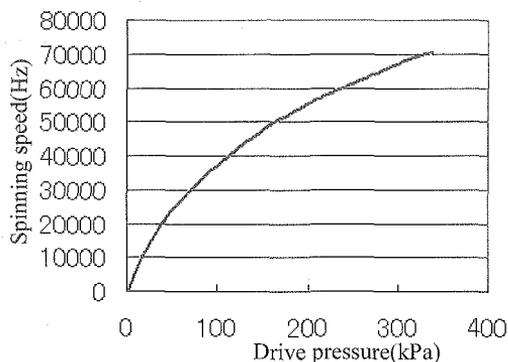


Fig. 4 Relation of the spinning speed and the drive pressure

高速 MAS 下における試料管内部の温度分布についての考察

浅野敦志、○北村成史、田中千香子、黒津卓三
防衛大学校 応用科学群 応用化学科

**Temperature distribution map of inside of rotor
under fast MAS using ^{207}Pb signal**

Atsushi Asano, Masashi Kitamura, Chikako Tanaka, Takuzo Kurotsu
Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Japan

It is important to calibrate the regulated temperature for the solid state NMR experiment under fast magic-angle spinning (MAS). Previously, we calibrate the regulated temperature under MAS by methanol method¹ to elucidate the molecular motion of rubbers,² because the temperature can be directly known from the chemical shift difference between ^1H signals of CH_3 and OH . However, methanol is liquid so that the temperature distribution in a rotor is averaged by its very fast molecular motion and migration. For investigation of molecular motion of solid polymers, it is necessary to know the correct temperature distribution inside of rotor utilized. ^{207}Pb signal of lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) has widely used to calibrate the temperature for variable-temperature (VT) MAS experiments.^{3,4} On the other hand, there is some ambiguity to calibrate temperature directly even though temperature dependence of chemical shift change is very large. In this study, we investigate the temperature distribution using both $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and methanol methods at both various temperatures and MAS rates.

温度可変実験は分子運動の解析など重要な知見を得るためには必要不可欠であるが、MAS 中の試料が感じる温度は、VT ガス（または Bearing ガス）とローター外壁との摩擦熱により上昇するため、制御しているガス温度とは異なる。したがって MAS 法を併用する固体 NMR 測定において、温度校正は重要である。また試料が感じている温度は場所により一様ではないことも知られている³。本研究では、実際にどの程度の温度差が生じているかを検討し、ローター内部と温度分布を視覚化することを目的とした。また、実際に市販の温度制御装置の応答性についても考察した。

温度校正ならびにローター内部の位置による温度分布を検討するため、硝酸鉛 ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、和光純薬、特級) の ^{207}Pb の信号を観測した。 ^{207}Pb 信号は温度に鋭敏であり、化学シフト値が温度に依存して幅広く変化することが知られている^{3,4}。しかし、化学シフト値から直接温度を計算するためには、0 ppm 基準が何°Cなのか知る必要がある。我々は Takahasi ら⁴の研究を参考に 29°C の信号を 0 ppm 基準とすることとした。

Keywords : 高速 MAS, 温度分布, ^{207}Pb スペクトル

著者ふりがな : あさのあつし、きたむらまさし、たなかちかこ、くろつたくぞう

3.2mmφローターの場合では、MAS速度が6 kHzで30°Cに温度を制御した場合にメタノール信号から計算される温度が29°Cであったので、この条件下の²⁰⁷Pb信号の位置を0 ppmとした。ローター内部の試料位置でどのように温度が異なるかPb(NO₃)₂を約2mm厚で中央(center)、Driveチップ側(bottom)、ローター上部側(top)にそれぞれ封入し、MAS速度を変化させて5°C刻みで温度を制御して²⁰⁷Pbの信号を観測した。図1にはローター内部全体にPb(NO₃)₂を封入した場合(a)、top(b)、center(c)、bottom(d)の²⁰⁷Pb MASスペクトルを示した。MAS速度は6 kHz、温度は30°Cで制御している。(b)～(d)のローター内の空間にはテフロンスペーサーを入れた。図1からローター内部の上中下では温度が異なり、化学シフト値ならびに線幅が異なることがわかる。さらに全体の信号は、これら3つの信号の足し合わせとして観測されている。線幅が広く観測されるtopとbottomの場合、シムの影響も考慮する必要があるが、温度分布の影響が大きいと考えられる。温度を上げるかMAS速度を速くしていくと、全体のスペクトルは、上中下の3つの信号との化学シフト値のずれが大きくなり、そのままの合成では再現できなくなる。これはテフロンと試料との熱伝導の違いによるものと考えられた。

図2には、横軸にローターの試料封入部の長さを(中央を0とした)、縦軸をMAS速度にとった温度分布図を示した。VTガス温度は30°Cに制御してある。温度分布は3ヶ所から得られる信号の化学シフト値と、線幅から求めた。図2からわかるように、MAS速度が速くなると温度が高くなるのは当たり前であるが、さらにローター内の温度分布がMAS速度に依存して大きくなる。MAS速度が25 kHzの場合、中央と上下との温度差は最大6°Cであった。

参考文献

- 1: van Geet, A.L., *Anal. Chem.*, **42**, 679-680 (1970).
- 2: A. Asano *et al.*, *IRC'08 proceedings*, 1118-1135 (2008).
- 3: A. Bielecki, D.P. Burum, *J. Magn. Reson. A*, **116**, 215-220 (1995).
- 4: T. Takahashi, *et al.*, *Solid State Nuc. Magn. Reson.*, **15**, 119-123 (1999)

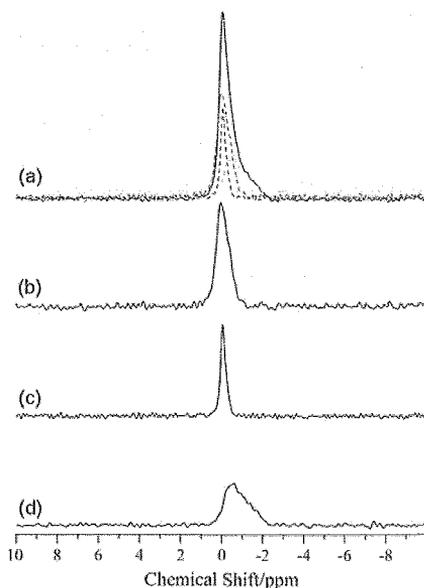


Figure 1. Position dependence of ²⁰⁷Pb MAS NMR spectra of Pb(NO₃)₂ at 30°C and MAS = 6 kHz: (a) whole, (b) top, (c) center, and (d) bottom in 3.2mmφ rotor. The sample height of (b) to (d) is ca. 2 mm.

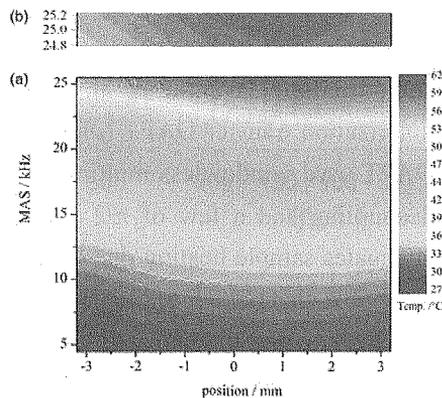


Figure 2. Temperature distribution map for 3.2mmφ rotor regulated at 30°C: (a) full and (b) expanded map at MAS = 25 ± 0.2 kHz.

配向試料のためのオフセット依存性を改善した

固体NMR分極移動法の開発

○ 西村 勝之
分子科学研究所

**“Carrier frequency offset insensitive polarization transfer
for oriented solid.”**

○Katsuyuki Nishimura
Institute for Molecular Science,

An efficient heteronuclear polarization transfer for static oriented sample is presented. The developed technique is based on the dipolar-INEPT like technique of DAPT. However the one refocuses carrier frequency offset for ^1H nuclei sufficiently within windowless refocused multiple-pulses in addition to the refocusing of those for observed nuclei during dipolar polarization transfer. Insensitivity of ^1H carrier frequency offset and improvements of polarization transfer efficiency of developed technique were verified from the comparison to DAPT, practically.

Introduction: Jayanthi et al. proposed dipolar INEPT like technique for heteronuclear polarization transfer DAPT (*dipolar assisted polarization transfer*)¹⁾ for oriented solid. The DAPT used windowless multiple-pulse (MP) only for ^1H nuclei for ^1H homonuclear dipolar decoupling and a few of $\pi/2$ and π pulses are applied to observed nuclei. This approach attenuates sample heating due to RF irradiation effectively compared to the techniques based on double channel RF irradiations such as cross polarization (CP).

However, unfortunately, DAPT shows poor performance practically due to rack of refocusing mechanism of ^1H carrier frequency offset. Thus signal intensities of observed nuclei vary depending on the carrier frequency offset for dipolar coupled ^1H nuclei. In this study, the author implement such mechanism into DAPT based on newly developed refocused windowless multiple-pulse and trim pulse, improvement of polarization transfer efficiency was achieved. We shall refer to developed method to as REDAPT as an acronym of *refocused dipolar assisted polarization transfer*.

固体NMR、分極移動、開発

○ にしむら かつゆき

Results and Discussion: All experiments were carried out on Varian INOVA 400 spectrometer equipped with JEOL narrow bore 6 mm MAS probe at static mode. 5CB liquid crystalline solvent was used to assess the performances of those techniques. Figure 1 shows the pulse sequences for DAPT and REDAPT. BLEW48- is the newly developed ^1H homonuclear dipolar decoupling sequence which induces same form of average Hamiltonian for chemical shift anisotropy and heteronuclear dipolar interaction with opposite signs respect to those for BLEW48. Combination of BLEW48+/- refocuses ^1H carrier frequency offset. Furthermore, by using BLEW48 instead of BLEW12 for MP, theoretically, 20 % of signal gain can be obtained over DAPT due to the relative orientation of ^1H magnetization respect to the effective field of MP. Figure 2 (a) and (b) show ^{13}C -NMR spectra obtained from DAPT and REDAPT, respectively. Figure 2 (c) and (d) show carrier frequency offset dependence for DAPT and REDAPT, respectively. REDAPT improves ^1H carrier frequency offset dependence sufficiently.

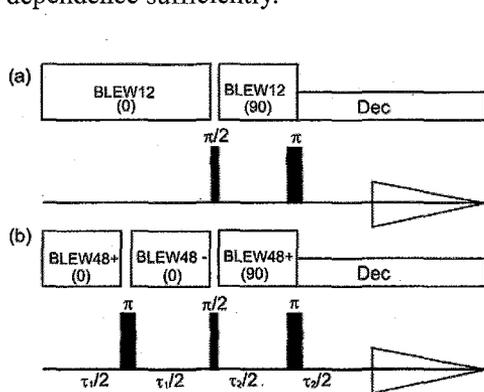


Figure 1 Pulse sequences for ^1H -X heteronuclear polarization transfer techniques of (a) DAPT and (b) newly developed REDAPT, respectively. Brackets under MPs indicate phase of MP. BLEW48+/- indicate MP sequence induce same form of AH for chemical shift anisotropy and heteronuclear dipolar interaction at opposite signs.

<References>

1) S. Jayanthi et al. *Chem. Phys. Lett.* 2007, 439,407-411

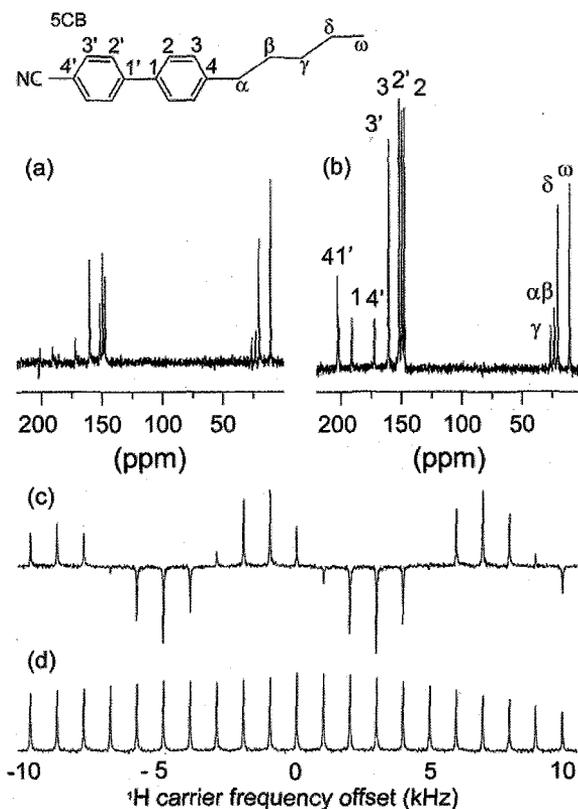


Figure 2 ^{13}C -NMR spectra of 5CB obtained by (a) DAPT and (b) REDAPT, respectively. Plot of site 3 signal of 5CB respect to ^1H carrier frequency offsets at mixing time of 264 μs acquired by (c) DAPT and (d) REDAPT, respectively.

固体¹³C CPMAS NMR擬似的クロマトグラフ法

○ 西山裕介¹, Michael H. Frey², Sseziwa Mukasa², 内海博明¹

¹ 日本電子株式会社 NM事業ユニット, ² JEOL USA Inc.

¹³C Solid-State NMR Chromatography by Magic Angle Spinning ¹H T₁ Relaxation Ordered Spectroscopy

○ Yusuke Nishiyama¹, Michael H. Frey², Sseziwa Mukasa², Hiroaki Utsumi¹

¹ NM Business Unit, JEOL Ltd., ² JEOL USA Inc.

A practical method to separate ¹³C NMR spectra of solid mixtures is introduced. The ¹H longitudinal (T₁) relaxation time is used to separate the overlapping ¹³C spectra of solid mixtures via an inverse Laplace transform of the relaxation dimension. The resulting 2D spectrum contains separate ¹³C spectra for each component of the mixture that are identical to ¹³C spectra of the isolated materials. The separation is based on the equalization of ¹H T₁ values in a single domain by rapid ¹H spin diffusion and on the ¹H T₁ value differences between different domains. The method is demonstrated on a commercial drug containing several compounds.

はじめに

ここでは、固体混合物のNMRスペクトルを構成物ごとに分離する手法を提案する。¹HのT₁緩和時間により混合物の¹³Cスペクトルを分離できることが知られている[1]。この手法は、1)¹H-¹H間のスピン拡散により¹HのT₁がドメイン内で均一になること、2)異なるドメイン間では¹HのT₁が異なる値になることを利用している。しかしながら、非常に長い測定時間が要求され実用的に使うには問題があった。ここでは、緩和時間解析に逆ラプラス変換(ILT)を利用することにより測定時間を一桁短縮するRelaxation Ordered Spectroscopy (ROSY)法を提案する。

NMR 測定

測定は一般的な¹³C観測の¹H T₁時間測定である(図1)。saturation recoveryを用いることによりT₁の値に関わらず短時間での繰り返し測定が可能となる。また有効に¹H拡散を行うために中程度の試料回転(<15kHz)を用い、スピニングサイドバンドはcogwheel phase cycled

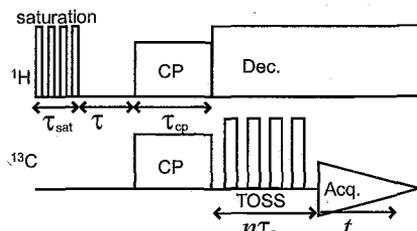


Fig1. Pulse scheme used for the ROSY experiments.

¹³C CPMAS, 混合物, 固体NMR

○にしやまゆうすけ, Michael H. Frey, Sseziwa Mukasa, うつみひろあき

TOSSにより消去した[2]。NICPにより効率のよい磁化移動を実現した[3]。

解析

従来法では τ の間隔に均等なサンプリング間隔しか許されないDECRAという線形解析を利用していた。緩和時間測定には均等なサンプリング間隔は非効率であり、logスケールのサンプリング間隔が望ましい。解析にILTを用いることにより任意のサンプリング間隔が利用可能となり、2～4倍の測定時間の短縮が可能となる。

NMR信号 $S(t, \tau)$ は以下のように表記できる。

$$S(t, \tau) = \int \int d\nu dT_1 I(\nu, T_1) \exp(i\nu t) [1 - \exp(-\tau/T_1)], \quad (1)$$

ILTは指数関数 $\exp(-\tau/T_1)$ に適用することにより T_1 の位置にピークを与えるので、 $S(t, \infty) - S(t, \tau)$ の t 次元へのFourier変換に引き続き τ 次元にILTを行うことでROSYスペクトル $I(\nu, T_1)$ が得られる。

結果

市販の鎮痛薬のROSY測定結果を図2に示す。 ^1H の T_1 緩和時間次元に3つのピークが現れた。 $T_1 = 94\text{s}$ 付近の信号はacetaminophen、 $T_1 = 7.4\text{s}$ はethenzamideの信号であり、単離したサンプルの ^{13}C CPMASスペクトルとよい一致を示した。 $T_1 = 2.2\text{s}$ 付近には、賦形剤のデンプンや糖の信号が現れた。従来法では570時間の測定時間が必要であったが、ROSY法により50時間に短縮することができた。本試料は T_1 が長いいため長い測定時間が必要であるが、 $T_1 = 5\text{s}$ 程度の試料では数時間での測定が可能である。当日は試料回転が ^1H の T_1 に与える影響、ドメインサイズについても議論を行う。

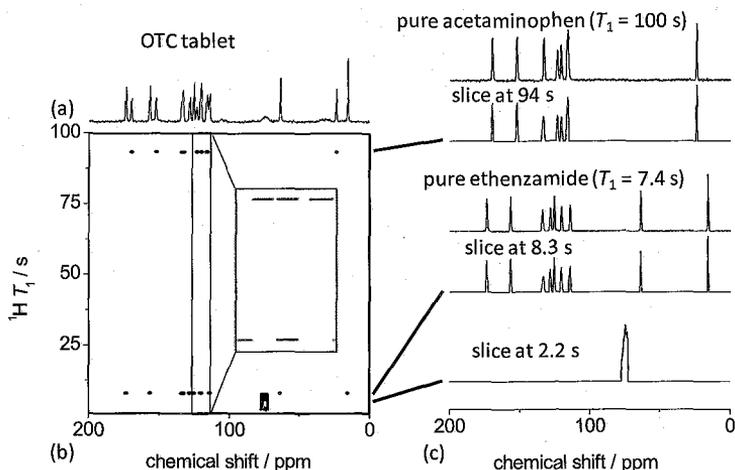


Figure 2. ^{13}C spectra of an OTC drug and two pure materials, ethenzamide and acetaminophen, at 15 kHz MAS. (a) ^{13}C CPMAS and (b) ROSY spectra of the OTC drug. 18 spectra were recorded with $\tau = 0.1$ to 400 s for the ROSY spectrum. An expansion from 115 to 126 ppm is superimposed on the ROSY spectrum. (c) ^{13}C CPMAS and ROSY slices.

参考文献

- [1] N. Zumbulyadis, et Al., J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 11554.
- [2] N. Ivchenko, et al., J. Magn. Reson. 164 (2003) 286.
- [3] W.K. Peng, et al., Chem. Phys. Lett. 417 (2006) 58.

固体NMRプローブにおける マジック角の微小角度精密調整法

○水野 敬、樋岡克哉(日本電子(株))、
竹腰清乃理(京都大学大学院理学研究科)

Infinitesimal adjustment of magic-angle in solid-state NMR
Takashi Mizuno,¹ Katsuya Hioka¹ and K. Takegoshi²
(¹JEOL Ltd., ²Graduate School of Science, Kyoto University)

An infinitesimal adjustment system of magic-angle in solid-state NMR has been developed by a simm coil wounded at the most outer layer of a probe, not mechanically. This coil was designed as a Helmholtz shape with the flat wire for taking account of optimizing the spectral resolution, packing, thermal conduction and durability in a continuously current flowing mode. It was confirmed by NMR observation of KBr that the angle could be adjusted using a prototype of the simm coil which was fitted with a commercial 300 MHz WB probe.

■はじめに 固体NMRにおいてマジック角回転法(MAS)は、内部相互作用の空間部分のうち、外部磁場と試料回転軸との為す角度 θ に関する $P_2(\cos\theta)$ に依存した項を消去することにより、高分解能NMRを可能ならしめる手法として定着している。従来、固体NMRプローブにおけるマジック角の調整は、単純な接合機構などを用いた手動の機械操作によって行われてきた。

四極子核(^{17}O , ^{27}Al etc.)の固体高分解能NMRでは、比較的大きな四極子相互作用(数100kHz~数MHz)のために、マジック角のわずかな誤差によってもスペクトル分解能が悪くなる。たとえば我々が実施した天然存在比の ^2H MAS-NMRでは、 $\pm 0.03^\circ$ の偏差まで合わせこむ必要があった^[1]。また、四極子核の高分解能NMR法として注目されるSTMAS法では、 ^{27}Al で、 $\pm 0.008^\circ$ 以内の誤差範囲が要求された例もある^[2]。これを既存の角度調整機構によって手作業でルーチンの的に達成することは、非常な困難を伴う。そこで、我々は、機械的な動作によらず、高精度かつ高再現的なマジック角の精密調整を容易に可能にすることができる「シムコイル」を考案した。この「シムコイル」は、Figure 1に示すように、試料空間における外部静磁場方向(以下、Z方向という)に対して、垂直な方向(以下、Y方向という)にごく小さい均一な静磁場を発生するためのものである。トータルの静磁場はZ方向とY方向の合成によって与えられるから、「シムコイル」に電流を流すことで、外部磁場全体をZ方向からわずかに傾け、マジック角を調整することができる。

我々はこの「シムコイル」を、ヘルムホルツコイル(鞍型コイルのペア)形状で仕様を検討した。外部磁場強度が7[T]の場合、角度を 0.05° 傾けるのに必要なY方向の磁場は約60[gauss]で

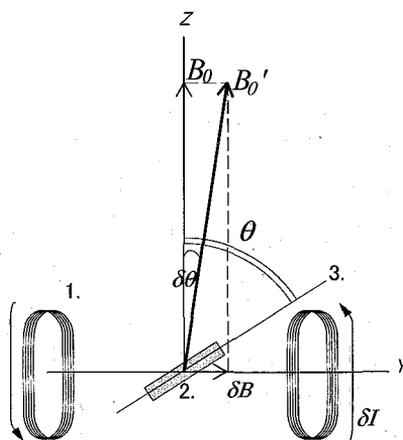


Figure 1: Z方向の静磁場 B_0 下で均一磁場コイル(1.)に電流 δI を流してy軸方向に磁場 δB を作ったとき、このとき、回転試料(2.)の感じる磁場は合成ベクトル B'_0 に相当し、試料回転軸(3.)と全外部磁場との為す角度は $\theta - \delta\theta$ となる。

1

Key Words: MAS, infinitesimal adustment, solid-state NMR
○みずの たかし、ひおか かつや、たけごし きよのり

ある。この磁場強度は、ヘルムホルツコイルをワイドボア・プローブの最外周に設置したとき、丸線直径1mmで約100ターンのコイルに4.4[A]の電流を流すことに相当する。ここで我々は、このコイルを断面形状が矩形状の「平角線」によって作ることを提案した（特許出願中）。平角線は、通常よく用いられる「丸線」と比較して、線と線の間空隙が無く、稠密性に優れることから——(1)設置空間あたりの磁場強度を大きくでき、(2)熱伝導性・堅牢性に優れ、(3)単一層で巻けることからコイル形状が理想形に近似し、スペクトル分解能への影響を少なくできる——といった長所を有し、多数ターンの鞍型コイルに適用するに相応であると考えた。

■実験・結果 実証試験機として、Doty社のワイドボア 300 MHz 二重共鳴 H-X MAS プローブに対して適合した、マジック角調整シムコイルおよびボピンを設計した(Figure 2)。このシムコイルを装着したプローブにおいて、KBrを試料としてシムコイルに流すDC電流を変化させながら ^{79}Br NMRを測定した(Figure 3)。シムコイルに流れる電流を変化させることにより、センターバンドおよびサイドバンド強度が連続的に変化し、試料回転軸の角度変化に対応することが確認された。

■むすびに 平角線ヘルムホルツコイルによって、固体NMRにおけるマジック角をDC電流により微小制御できることを実験的に示すことができた。本シムコイルは、アタッチメントとして、全ての固体高分解能NMRプローブに対して取り付けて、マジック角の精密調整を容易化・オートメーション化することができる。また、試料系の周囲に特殊な実験環境（真空、極低温、高温、高圧、特殊雰囲気… etc.

）を設定された特殊プローブ（たとえば、クライオコイルMAS^[3]においては、試料管と検出コイルの間に断熱真空層の壁を挿入するため、試料管の角度はプローブ筐体に対して固定されることが望ましい）において、非-機械的にマジック角の精密制御を担保するシステムとしても機能する。

謝辞 本研究は、CREST/JST(平成17年度採択)により財政的に支援された。平角線の提供および巻線作業について、三菱電線工業(株)機器部品事業部 MEXCEL 部および浦谷エンジニアリング(株)に感謝する。

参考文献: [1] T. Mizuno et al., J. Am. Chem. Soc., 128 (2006) 9683-9686.; [2] C. Huguenard et al., J. Magn. Reson. 156 (2002) 131-137.; [3] T. Mizuno et al., Rev. Sci. Instrum. 79 (2008) 044706.

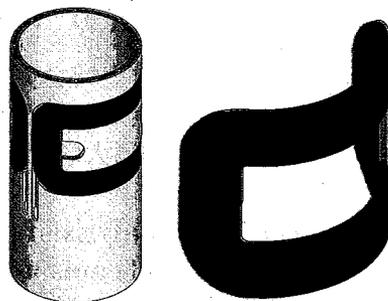


Figure 2: (左) 実証試験機のシムコイルおよびボピンの模式図。(右) シムコイルの片側(平角線鞍型コイル)の拡大図。平角線寸法: 厚さ 0.3 mm, 幅 2.8 mm, 絶縁被覆厚み 0.03 mm。コイル寸法: 半径 33±2.8 mm, 高さ 45.2±16 mm, 巻数 48。

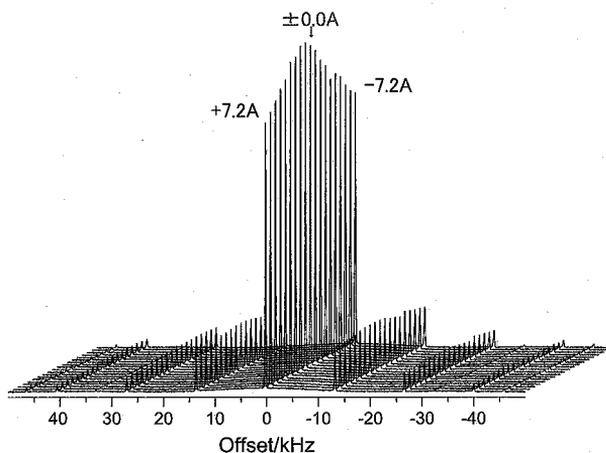


Figure 3: 実証試験機による 1-pulse ^{79}Br NMR スペクトル。外部磁場 7.05[T]。シムコイルに流す電流を+7.2A~-7.2Aまで0.8A刻みで変化し、それぞれについて16回積算した。電流変化0.8Aあたり角度変化0.085°と推定される。

SASS 法による

PBLA の ^{13}C 化学シフト異方性の測定と二次構造の評価○神原孝之¹、水野敬²、竹腰清乃理¹、莊司顯³¹京都大学大学院理学研究科、²日本電子(株)、³群馬大学大学院工学研究科**Conformational analysis of poly(β -benzyl L-aspartate) by ^{13}C chemical shift anisotropies**○Takayuki Kamihara¹, Takashi Mizuno², Kiyonori Takegoshi¹, and Akira Shoji³¹Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan, ²JEOL Ltd.,³Graduate School of Engineering, Gunma University, Gunma, Japan

Poly(β -benzyl L-aspartate) (PBLA) is a unique polypeptide undergoing irreversible transformation of its conformation in the solid-state by heat treatment. In order to study origin of its unique property, we measured ^{13}C chemical shift anisotropy (CSA) of the peptide carbon in PBLA by the high-speed Switching-Angle Sample-Spinning (SASS) technique and made comparison with CSAs of similar polypeptides. We observe a low-frequency shift of the δ_{22} value in the peptide carbon of α_{R} -helix PBLA, which indicates weaker intramolecular hydrogen bond in its α_{R} form. We conclude this suggests its structural instability and thereby its unique property regarding to the conformational transformation.

ポリペプチドである poly(β -benzyl L-aspartate) (PBLA) は、固体状態で加熱によってその二次構造が不可逆的に転移することが知られている^[1]。このような転移は他のポリペプチドには見られない。我々は PBLA 固有の転移を引き起こす原因を明らかにするため、化学シフト異方性 (CSA; chemical shift anisotropy) を測定し、類似ペプチドのものと比較した。化学シフト異方性は、原子核の周りの電子雲による外部磁場の遮蔽に関する情報を含んでおり、3つの主値 (δ_{11} 、 δ_{22} 、 δ_{33}) で特徴づけられる回転楕円体様の広がりを持っていると近似できる。特にペプチド炭素の δ_{22} の方向はほぼ C=O 結合の方向を向いていることが知られ、その構造に重要な水素結合に関する情報を含んでいる。化学シフト異方性の情報を得るためには、Switching-Angle Sample-Spinning (SASS) 法^[2]を適用した。

今回用いた 2次元高速 SASS 法では、試料回転角を 1次元目に off-magic angle に、2次元目に magic angle に置いて実験を行った。こうして得られた 2次元スペクトルでは、1次元目に off-magic angle でスケーリングされた CSA パウダーパターンが、

キーワード: poly(β -benzyl L-aspartate)、化学シフト異方性、二次構造

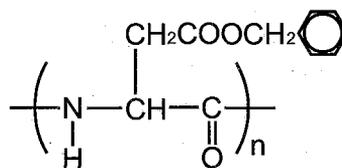


Fig.1 Structure of PBLA

○かみはらたかゆき、みずのたかし、たけごしきよのり、しょうじあきら

2次元目に magic angle での先鋭なスペクトルがそれぞれ得られる。各サンプルに対して得られたスペクトルから C=O 炭素のパウダーパターンを取り出し、最小二乗フィッティングを行うことで化学シフト異方性の値を決定した。

測定したサンプルは、PBLA の α_R -helix、 α_L -helix、類似のポリペプチド poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG) の α_R -helix である。得られた2次元 SASS スペクトルのペプチド炭素の部分拡大したもの、それを t_1 軸方向にスライスして得られたパウダーパターンをフィッティングしたものを Fig. 2 に示す。

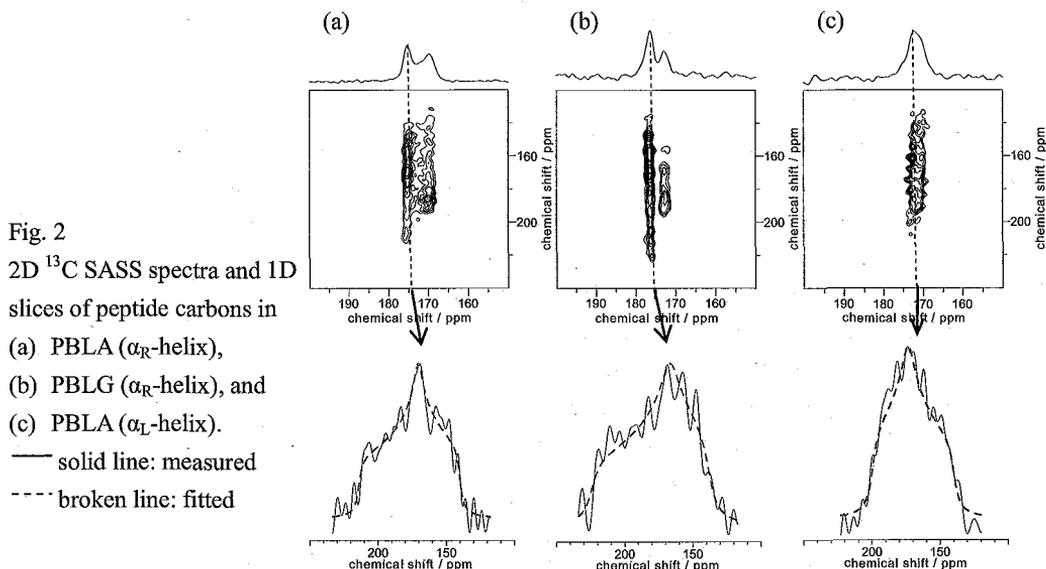


Fig. 2
2D ^{13}C SASS spectra and 1D slices of peptide carbons in
(a) PBLA (α_R -helix),
(b) PBLG (α_R -helix), and
(c) PBLA (α_L -helix).
— solid line: measured
- - - broken line: fitted

| | | δ_{11} | δ_{22} | δ_{33} | δ_{iso} |
|-------------------|--------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| α_R -helix | (PBLA) | 245.5 | 183.7 | 95.0 | 175.3 |
| | (PBLG) | 255.8 | 196.9 | 76.4 | 176.4 |
| α_L -helix | (PBLA) | 233.0 | 166.0 | 113.7 | 172.3 |

Table 1. Principal values of ^{13}C CSA

ここから得られた CSA の値 (Table 1) を比較すると、PBLA の α_R -helix における δ_{22} の値は、PBLG のものより低周波数側に大きくシフトしている。ポリペプチドにおいては、水素結合距離が大きくなるほど δ_{22} の値は小さくなることが知られている^[3]。また、 α_L -helix という構造は α_R -helix よりも水素結合が弱いため不安定とされている。実際にその δ_{22} の値は α_R のものより小さい。これらのことから、PBLA の α_R -helix は他のポリペプチドの α_R -helix よりも弱い水素結合をしていると考えた。したがって、PBLA の α_R -helix 構造の不安定性や特異な構造転移はその弱い水素結合に起因するのではないかと考えられる。

- References: [1] T. Akieda, et al., *Macromolecules* **32**, 5794 (1992)
[2] T. Terao, et al., *Chem. Phys. Lett.* **107**, 145 (1984)
[3] T. Kameda, et al., *J. Mol. Struct.* **384**, 17 (1996)

硬い架橋のバイラジカルを使った動的核分極 (DNP)

○松木陽^{1,2,6}, Thorsten Maly¹, Olivier Ouari³, Hakim Karoui⁵, Francois Le Moigne⁵, Egon Rizzato⁵, Sevdalina Lyubenova⁴, Judith Herzfeld², Thomas Prisner⁴, Paul Tordo³, Robert G. Griffin¹

¹マサチューセッツ工科大学・フランスシビターマグネット研

²ブランダイス大学・化学科

³エクスマルセイユ大学・化学科

⁴フランクフルト大学・化学-薬学科

⁵プロバンス大学

⁶(現)阪大・蛋白研

Dynamic Nuclear Polarization using a Rigid Biradical

○Yoh Matsuki^{1,2,6}, Thorsten Maly¹, Olivier Ouari³, Hakim Karoui⁵, Francois Le Moigne⁵, Egon Rizzato⁵, Sevdalina Lyubenova⁴, Judith Herzfeld², Thomas Prisner⁴, Paul Tordo³, Robert G. Griffin¹

¹ Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, USA

² Brandeis University, Massachusetts, USA

³ University of Aix-Marseille I and III, Marseille, France

⁴ University of Frankfurt, Frankfurt, Germany

⁵ University of Provence, Marseille, France

⁶ (present address) Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka Japan

In an effort optimizing the efficiency of dynamic nuclear polarization (DNP) in high magnetic field conditions, we rationally designed, synthesized and tested a novel TEMPO-based biradical polarizing agent, called bis-TEMPO-bisketal (bTbk). A rigid spiro tether connects two 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) moieties in the new biradical (see structure) with superior performance in dynamic nuclear polarization. The ¹H DNP enhancement observed in a ¹³C spectrum of an organic compound after cross-polarization (CP) was $\epsilon \sim 250$, and by a factor about 1.4 times larger

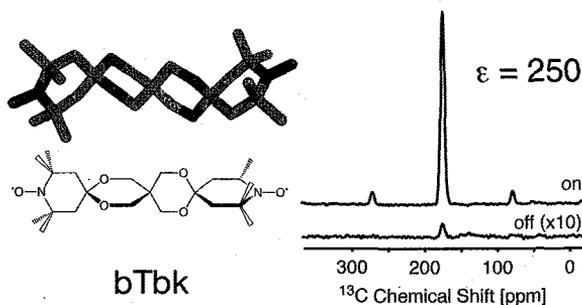


Fig. 1 Crystal structure of a new biradical bTbk, and NMR signal of ¹³C-labeled urea observed after CP with and without microwave irradiation.

Biradical, Dynamic Nuclear Polarization, Solid-State NMR

○まつきよう、とーすてんまりー、おりびえうあり、はきむかるい、ふらんそわるも
わーにゆ、いごんりざと、せふだりーなりゆべの一ば、じゅでいすへるつふえると、
とますぷりしゆな一、ろばーとぐりふいん

than that using TOTAPOL, a previously described TEMPO-based biradical with a flexible tether.

DNPを使ったNMR信号増幅の効率を上げる一つのアプローチとして、試料中に分散した電子源であるラジカル分子の化学構造を理知的に設計することがあげられる。生体試料の高分解能測定のために必要な高磁場条件ではラジカル分子としてTEMPOが便利である。高磁場条件で重要になる電子・核間の分極移動機構“cross effect”がよく働くからである。このCross effectには二つの重要な条件が存在する。すなわち、i)分極移動に関与する二電子間の双極子結合が大きい事、ii)その二電子の共鳴周波数差が核のラーモア周波数と一致することである。2004年、TEMPO二分子を化学的につないだバイラジカル(TOTAPOL)が、DNPによるNMR信号増幅因子を従来の単量体TEMPOで得られる40から170程度にまで向上する事が見いだされた。これは上記の条件i)を、空間的に二電子を近づけて固定する事で実現したものである。我々は条件ii)も同時に満たすように、二電子の g -テンソルの相対向きが上記周波数マッチングの条件を満たすような配向で固定される様に、二つのTEMPO分子を堅いスピロ架橋で繋いだ、新しいバイラジカルbis-TEMPO-bisketal (bTbk)を設計、合成した。このラジカルを使った140GHz/212MHzにおける動的核分極(DNP)法で、NMRの感度向上は250倍を観測、これまで最も効率の良かったバイラジカルTOTAPOLによるものより約1.4倍高かった。[1]

Reference:

[1] Y. Matsuki, T. Maly, O. Ouari, H. Karoui, F. Le Moigne, E. Rizzato, S. Lyubenova, J. Herzfeld, T. Prisner, P. Tordo, and R. G. Griffin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 4996-5000 (2009)

14Tでの高磁場DNPによる固体NMRの高感度化

○植田啓介¹, 松木陽¹, 高橋大樹¹, 出原敏孝², 小川勇², 戸田充²,
藤原敏道¹

¹阪大・蛋白質、²福井大・遠赤外領域開発研究センター

Sensitivity Enhancement of Solid-State NMR by High-Field Dynamic Nuclear Polarization at 14T

○Keisuke Ueda¹, Yoh Matsuki¹, Hiroki Takahashi¹, Toshitaka Idehara², Isamu Ogawa², Mitsuru Toda², Toshimichi Fujiwara¹

¹ *Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*, ² *Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, Fukui, Japan.*

Dynamic nuclear polarization (DNP) is the method for improving the sensitivity of NMR through the transfer of the magnetization from electrons to nuclei. We have developed instrumentation for high-field DNP-NMR. For the high field DNP experiments, we used a gyrotron as a source of high-power (50 W) and high frequency (394 GHz) microwaves, and a solid state NMR probe modified for microwave irradiation of the sample at low temperatures. At 600 MHz proton frequency, over ten-fold signal enhancement by DNP was observed at 90 K for the ¹³C resonance of glucose in deuterated glass matrix after cross-polarization from ¹H. At lower temperature, sensitivity should be improved further.

NMRの測定対象の分子が大きくなるにつれて、対象分子数は減少し感度が低下する。したがって、感度の向上により、構造解析可能な分子の大きさの上限や解析精度が上がることになる。巨大な電子スピン分極を核スピンの移動し、NMRの感度を向上させる方法として、動的核分極 (DNP: Dynamic Nuclear Polarization) 法がある。固体でのDNPとは、まずESRを引き起こす周波数をもつ大きなパワーの電磁波を、極低温の対象物に照射し、電子スピンを飽和近くまで励起する。すると、室温核スピンより5000倍以上の大きさを持つ電子スピンの分極が核スピンの移動し、核スピンの磁化が格段に大きくなる。その結果、NMR信号が大きくなる現象である。この分極が移動する際、電子スピンと核スピン間の相互作用であるフェルミ接触相互作用や双極子相互作用が利用される。この感度向上の原理は、オーバーハウザー効果や固体効果などが古くから知られている。DNPは50年以上もの歴史があるが、近年、ジャイロトロンなどDNPに必要な高出力なサブミリ波光源が発展し、高磁場でのDNP実験が可能になってきた。

現在の進んだ高分解能多次元固体NMR法とDNPを組み合わせるためには、極低温高磁場でDNPを実験することが不可欠である。しかし、高磁場ではDNPが低下することが理論的に予想されている。これまで、高磁場DNPの実験的研究は、MITのGriffinらによる先進的な研究があるだけである。私たちは、DNPを行う静磁場としては、世界的にも最高の磁場強度のもとで行う装置を独自に開発した。この装置によりDNP-NMR実験を行い、高磁場で感度最適化を行う方法を検討したので報告する。

DNP、オーバーハウザー、ジャイロトロン、ビラジカル

○うえだけいすけ、まつきよう、たかはしひろき、いではらとしたか、おがわいさむ、とだみつる、ふじわらとしみち

【装置】高磁場DNP実験におけるサブミリ波光源としてジャイロトロンを使用するのは、ガンダイオード等の半導体や後進行波管では出力が不足するためである。高分解能固体DNP-NMRのために、発振出力と周波数について安定性の高いDNP用ジャイロトロンFU-CW IIを製作した。このジャイロトロンは、 ^1H 共鳴周波数600MHzの固体NMRについて感度を向上させることができる394GHzの周波数のサブミリ波を、二次高調波としてTE₀₆モード、50Wの出力で発振する。約2mの真空管であるジャイロトロンを稼働するために、Heフリー8T超伝導磁石、冷却水循環装置(5kW)、ターボ真空ポンプ、電子銃陽極・陰極・ヒーターにそれぞれに高圧電源装置(最大30kV)を設置した。静磁場掃引は、14T高分解能ワイドボア磁石の主コイル電流を変化させて行った。また、サブミリ波周波数及び出力計測システムを自作した。ジャイロトロンから発振したサブミリ波は、準光学系を用いずに導波管伝送系を経て、DNP-NMRプローブのマジック角試料回転ローターにある試料に、約3W照射できるようにした。試料検出部分は、ラジオ波による核磁化の励起と検出のために最適化した。このプローブは、断熱性を改善し、導波管を挿入するなど既製MASプローブを改造して製作した。試料はサブミリ波透過性の高いサファイアのローターに封入した。また、低温実験のため、液体窒素消費量の少ない中空系膜を用いた極低温窒素ガス製造システムを作った。

【実験】最初に静磁場強度に依存したDNP効率を測定した。正と負のDNPピークの間隔がほぼ ^1H のゼーマン分裂に相当することから、DNPは電子スピン間結合によるクロス効果により生じていると考えられた。

最高のDNP効率を得る実験では、 ^{13}C グルコースを測定対象とし、DNPを引き起こすラジカルとしてピラジカルTOTAPOL¹⁾を使用した。溶媒として、低温下でガラスマトリクスを形成させるために、グリセリン、重水、水をそれぞれ60:30:10の重量比で調製した。90Kの低温下で測定しながら、

ビーム電流160mA、陰極電圧15.5kVのサブミリ波を照射したところ、10倍以上の感度向上が見られた (Fig. 1)。より大きなDNPを引き起こすために、サブミリ波の出力をビーム電流350mA、陰極電圧15.8kVに上げたところ、意外な事に、感度は4倍程度しか向上しなかった。これは、試料やローターなどがサブミリ波のエネルギーを吸収し、10K程度が上昇したためDNP効率が下がったと考えられる。つまり、高磁場ではニトロキシラジカルの大きなgテンソル異方性のために、熱運動による電子スピン緩和が極端に速くなるのである。したがって、これまで最高磁場であった9T程度でのDNPに比べて、より高い磁場14Tでは、DNP効率を良くするために試料の温度をさらに低く保つなどの処置が必要であると考えられた。この高磁場DNP効率を改善するために、極低温Heガスを用いること、gテンソルの小さいラジカルを用いること、ピラジカルの2つのgテンソルの相対配向をクロス効果DNPに最適化することなどを検討している。

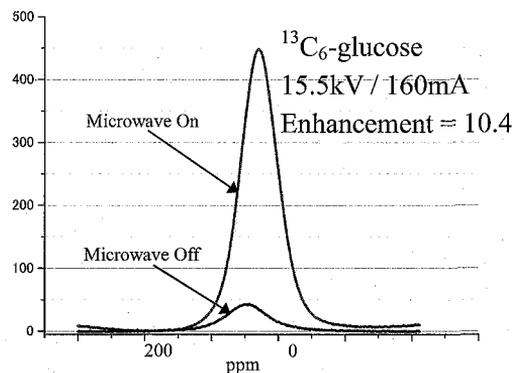


Fig.1 DNP/Solid-State NMR at 394GHz/600MHz

1) C. Song, K. Hu, C. Joo, T. Swager, R. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 11385.

光励起三重項 DNP による室温での p-terphenyl 結晶におけるプロトンの高偏極化

(阪大院基) ○根来 誠, 立石 健一郎, 香川 晃徳, 北川 勝浩

High proton polarization at room temperature with p-terphenyl crystal by DNP using photoexcited triplets

○ Makoto Negoro, Kenichiro Tateishi, Akinori Kagawa, and Masahiro Kitagawa
Graduate School of Engineering Science, Osaka University

Abstract: In this work, we have obtained high ^1H polarization of 0.11 in a single crystal of 0.1mol% pentacene-doped p-terphenyl using Dynamic Nuclear Polarization with photoexcited triplets (triplet-DNP). The polarization is achieved in 10 minutes at room temperature and in 0.4 T. In triplet-DNP, the polarization of 0.11 is the highest at room temperature and the time required for obtaining the polarization of order 0.1 is the shortest in the undeuterated sample.

NMR 分光という観測手法は感度が非常に低いのが欠点で、現在、それを補うための手段として動的核偏極 (DNP; Dynamic Nuclear Polarization) の研究が盛んに行われている [1]. DNP とは電子スピンの偏極率を ESR 周波数近くのマイクロ波照射によって、超微細結合を通して核スピんに伝えることで感度を向上する手法である。He 温度以下、ESR 周波数がサブテラヘルツ領域にかかる磁場下で DNP を行うことで、0.1 のオーダーの核スピン偏極を得ることが出来る。普通、DNP を行うときは観測したい試料にフリーラジカルをドーブするのであるが、フリーラジカルの代わりに光励起電子を持つ分子をドーブし、その光励起電子で DNP を行うという方法もあり、これを triplet-DNP と呼ぶ。ペンタセンのような分子は光励起三重項電子スピン状態を持ち、その占有数分布が温度、磁場に関係なく非常に大きく偏るということが知られている。それゆえ、ペンタセンを用いた triplet-DNP では従来の DNP より比較的扱いやすい低磁場、高温度の環境で核スピン系を 0.1 のオーダーの偏極率まで高めることが出来る。

我々の研究室では NMR を用いた量子計算の研究を行っている。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、0.1 のオーダーの偏極率を持った核スピンを量子ビット (qubit) として用いる必要がある [2]。我々は triplet-DNP によって高偏極化させた核スピン系で NMR 量子計算実験を行うことを目指している。このアプローチは 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 DNP により高偏極化させるアプローチに比べて [3]、デコヒーレンス (スピン緩和) が少ないという点で優れている

Key Word: DNP, triplet-DNP, 量子計算

ねごろまこと, たていしけんいちろう, かがわあきのり, きたがわまさひろ

と考えられる。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められないのである。

武田らによって triplet-DNP のためのパルスシーケンスの中で最も効率的と言われている ICP シーケンスを 50 Hz で繰り返し行い、0.018 mol%ペンタセンを少量ドープしたナフタレンの ^1H 偏極が 100 K, 0.3 T 下で 0.7 まで向上できることが報告されている [4]。この時の偏極のビルドアップカーブの時定数は約 2 時間であり、高偏極化には非常に時間がかかっていた。

本研究では、ホスト分子を p-terphenyl に代えることで短時間で高偏極化が可能であることを示す。p-terphenyl はナフタレンに比べてペンタセンをより多くドープすることができ、偏極の高速化が期待できる。マイクロ波強度、スイープ磁場パラメータ、レーザーパラメータを最適化し、0.1 mol%ペンタセンをドープした p-terphenyl 単結晶中の ^1H 偏極が室温、0.4 T 下で 10 分で 0.11 まで向上できることを示した。 ^1H 偏極率の時間変化を図 1 に示す。ICP シーケンスは 50 Hz で繰り返した。ビルドアップカーブの時定数は約 2 分で、高偏極化にかかる時間がナフタレンに比べて大幅に短縮されている。0.11 という偏極率は室温で行われた triplet-DNP 実験で得られた最も高い偏極率で、このビルドアップの早さは部分的重水素化されていないサンプルで行われたものなかでは最も早いものである。

発表では、様々なパラメータで行った実験の結果を紹介し、偏極の高速化について詳しく議論する。

本研究に関して、多大なるご支援、ご助言を頂いた京都大学の武田和行先生に感謝いたします。また、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。

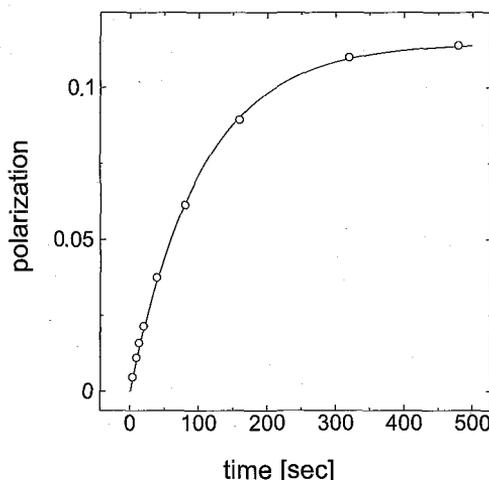


図 1: Buildup curve of the ^1H polarization in a single crystal of 0.1 mol% pentacene doped p-terphenyl. The ICP sequence was repeated at a rate of 50 Hz in 0.4 T and at room temperature.

References

- [1] T. Maly *et al.*, J. Chem. Phys. **128**, 05221 (2008).
- [2] S. L. Braunstein *et al.*, Phys. Rev. Lett. **83**, 1054 (1999).
- [3] H. J. Cho *et al.*, J. Magn. Res. **187**, 242 (2007).
- [4] K. Takeda, "Triplet State Dynamic Nuclear Polarization" VDM Verlag, (2009).

マイクロコイルMASによる極微量の薄膜リチウムイオン電池材料の解析

○野田泰斗¹, 武田和行², 河村純一³, 前川英己¹

¹東北大・工学研究科

²京大・理学研究科

³東北大・多元物質研究所

Micro Amount NMR of Thin-film Lithium-ion Battery Materials Using of Microcoil MAS

○Yasuto Noda¹, Kazuyuki Takeda², Junichi Kawamura³, and Hideki Maekawa¹

¹Graduate School of Engineering, Tohoku University, Sendai, Japan.

² Graduate Scholl of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

³Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, Sendai, Japan.

Thin-film lithium-ion batteries are lightweight and have properties including high energy density, feasibility to built-on semiconductor devices. For the improving the properties, the precise analysis of cathode materials are desired. Although MAS NMR is powerful tool to investigate local structure and electron state in cathode materials, the less S/N prevented analysis due to micro amount of the samples. Microcoil MAS is a key method to investigate precisely such micro amount samples.

半導体を用いた電子機器は幅広く普及し、携帯電話やノートPCといったモバイル機器の小型・軽量化や長時間駆動などの機能や特性の向上が望まれている。リチウムイオン電池は高エネルギー密度を有し、モバイル機器の電源として最も採用されている。電子機器性能の向上の要求に伴い、その電源であるリチウムイオン電池の更なる軽量化や高安全性、高機能化が求められている。現在普及しているリチウムイオン電池は発火につながる有機電解液が用いられているが、この電解液を固体電解質に置き換えた全固体電池は従来の電池と比較して漏液や自己放電がなく、高信頼性と有する魅力的な電源である。全固体電池の中でも薄膜リチウムイオン電池は比較的任意の基板上に電池を薄膜技術のみで作製できるため他の機能素子との複合化が可能になる。薄膜リチウムイオン電池用電極材料に必要とされる性能は、良好な電子伝導性と電極中のLiイオンの拡散能が大きいことである。リチウムイオン電池のサイクル特性やパワー特性、容量の向上のためには正極材料のリチウムイオンの拡散経路や格納サイトと密接な関係があるLiの局所構造を評価することが必要であると考えられる。

⁷Li NMRは電子スピンまたは非局在化電子の存在に極めて敏感である。そのため、電極材料に用いられている層間化合物の局所構造を緻密に評価することが可能である。しかし、薄膜リチウムイオン電池では正極材料が1 mg以下と極微量しか得られず、従来のMAS NMR法では評価することが困難である。近年、ソレノイドマイクロコイルを

マイクロコイルMAS, リチウムイオン電池, 極微量固体NMR

○のだ やすと, たけだ かずゆき, かわむら じゅんいち, まえかわ ひでき

用いて微量試料を高感度に測定可能なMAS NMR法が開発された[2]。マイクロコイルを用いたNMRは微量試料に対し大きなフィリングファクタと巨大な有効磁場強度が実現でき微量試料を高感度で測定可能となる。今回はマイクロコイルを組み込んだプローブを自作し、リチウムイオン電池の正極材料である LiCoO_2 と LiMn_2O_4 を ^7Li MAS NMRにより評価することを目的とした。

薄膜試料はパルスレーザーアブレーション法 (Pulsed Laser Deposition; PLD) により作製された。薄膜形状は1 cm x 1 cm x 400 nmである。質量はバルク LiCoO_2 の密度 5.05 g/cm^3 からおよそ0.2 mgと求められる。マイクロコイルプローブは0.05 mmの銅線を20回巻いた内径0.8 mmのソレノイドコイルとコンデンサから自作した。この予稿では、作製したマイクロコイルプローブにより実際の薄膜正極材料と同じ質量の粉末正極材料を予備実験として測定した結果を掲載する。試料は内径0.4 mm、外径0.5 mmの石英キャピラリーに充填した。静磁場強度は7 Tである。

作製したマイクロコイルMASプローブのラジオ波強度の入力パワーに対する依存性をFig. 1に示す。小さな入力パワーで大きな有効磁場が得られている。この作製したマイクロコイルで測定した LiCoO_2 の ^7Li MAS NMR をFig. 2に示す。MASの回転速度は8 kHzであり、スピニングサイドバンドをアスタリスクで示した。

討論会当日は現在取り組んでいる実際に薄膜リチウム電池の正極材料の測定結果とローターの中にマイクロコイルを組み込み、コイルごとMASをして測定した結果も合わせて報告したい。

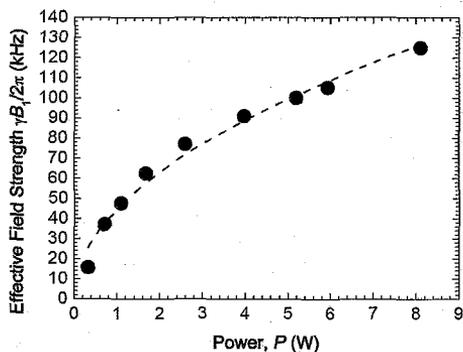


Fig. 1 Effective field dependence on rf-power obtained by nutation experiments of ^7Li in solid LiCl .

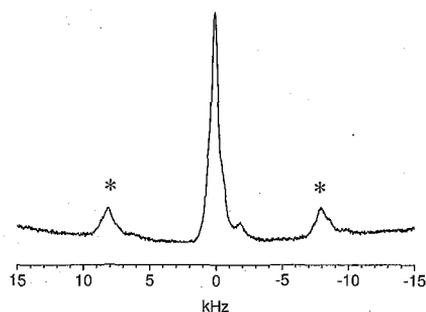


Fig. 2. ^7Li NMR spectrum of LiCoO_2 particles of $10 \mu\text{s}$ in diameter measured by single pulse sequence. The MAS frequency is 8 kHz and the acquisition time is 10,000.

【参考文献】

- [1] C. P. Grey and N. Dupr, Chem. Rev. 104, 4493 (2004).
 [2] H. Janssen et al., J. Am. Chem. Soc. 128, 8722 (2006), D. Sakellariou et al., Nature 447, 694 (2007).

固体高分解能NMRによるナノ粒子表面の修飾有機分子の結合状態とハイブリッド試料の構造解析

○相馬洋之, 千葉亮, 林繁信

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

Bonding states of organic molecules modifying the surface of nano-particles and structures of hybrid materials studied by high-resolution solid-state NMR

○Hiroyuki Souma, Ryo Chiba, Shigenobu Hayashi

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

It is important that the surface of nano-particles is modified by chemical species having high affinity with the matrix in order to disperse nano-particles uniformly in the matrix. And solid-state nuclear magnetic resonance (SSNMR) is a powerful technique to characterize the modified surface of nano-particles. In the present study, we have synthesized titania (TiO_2) nano-particles modified by propylphosphonic acid (PPA) and decylphosphonic acid (DPA), and have demonstrated that SSNMR can detect the bonding between the surface of the nano-particles and the surface-modified reagent. And we proved that SSNMR is very useful to characterize the modified surface of nano-particles.

【序論】

ナノ粒子をマトリックス中に均一に分散させるためには、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 とのハイブリッド試料を、調製時間や温度、さらに調製方法を変えて調製した。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とそれらの構造を ^{31}P 、 ^{13}C CPMAS NMR法、 ^1H SPMAS法により調べた。測定には、Bruker MSL400分光計、Bruker ASX400分光計(共鳴周波数 ^{31}P : 161.98MHz、 ^{13}C : 100.62MHz、 ^1H : 400.13MHz)を用いた。さらに、調製したハイブリッド試料の構造を解析するために、Rigaku MiniFlexを用い、X線粉末回折測定を行った。

【結果・考察】

Figure 1aに表面修飾剤としてデシルホスホン酸(DPA)を用いたハイブリッド試料(DPA/TiO_2)の ^{31}P CPMAS NMRスペクトルを示す。Sample A~Cは、それぞれ調製条件の異なる試料である。

このスペクトルより、Sample Aにおいて9.4ppm、7.4ppmのシグナルが他と比べて大

○そうまひろゆき、ちばりょう、はやししげのぶ

きいことがわかった。このシグナルは、表面修飾剤の酸素原子が全て二酸化チタンナノ粒子と共有結合した3座配位に由来するシグナルである[1]。Sample Aは、3日間オイルバスを用いて均一に100°Cで加熱して調製した試料であり、表面修飾剤にプロピルホスホン酸(PPA)を用いた場合も、同様の調製を行った試料の³¹P CPMAS NMRスペクトルにおいて、同様の傾向があった。これより、均一に長時間加熱することが3座配位の増加につながるということが明らかとなった。

Figure 1bに各ハイブリッド試料DPA/TiO₂の¹³C CPMAS NMRスペクトルを示す。ここで注目すべき点として、Sample Aでのみ観測された35ppm付近のシグナルと、13、

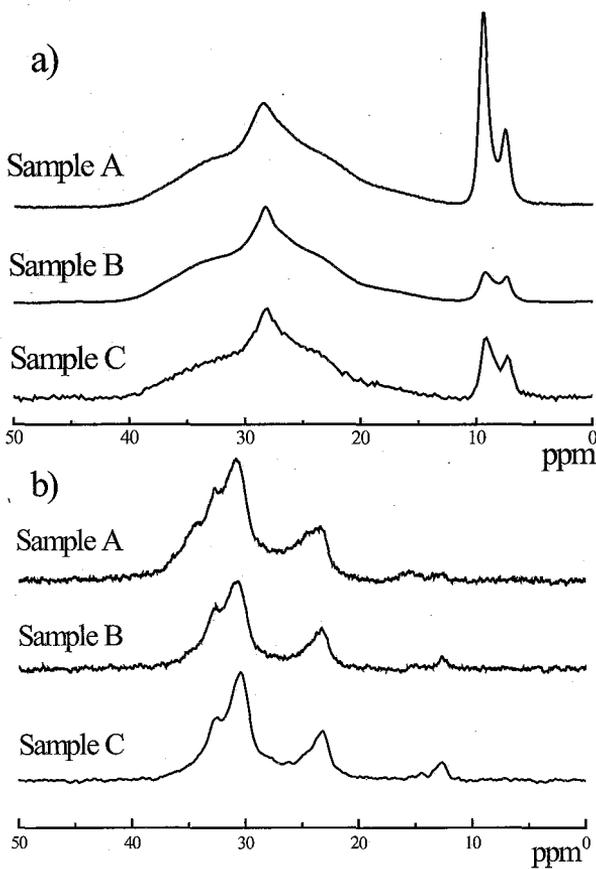


Figure 1.

a) ³¹P CPMAS NMR spectra of DPA/TiO₂.

b) ¹³C CPMAS NMR spectra of DPA/TiO₂.

Sample A : 3 days at 100°C (an oil bath)

Sample B : 1 days at 100°C (an oil bath)

Sample C : 3 days at 100°C (a mantle heater)

【引用文献】

[1] G. Guerrero, P. H. Mutin and A. Vioux, *Chem. Mater.*, **12**, 1268-1272 (2000).

[2] I. Ando, T. Yamanobe, S. Akiyama and T. Komoto, *Solid State Commun.*, **62**, 785-788 (1987).

[3] S. Hayashi, *J. Phys. Chem.*, **99**, 7120-7129 (1995).

15ppm付近のシグナルが挙げられる。DPAのCH₂鎖は、各スペクトルの30.4ppmのシグナルに帰属されるが、Sample Aにおける35ppmのシグナルは、このCH₂鎖のシグナルがシフトしたものであると考えられる。鎖がトランス型になった場合、このようなシフトを示すことが以前の研究で明らかになっており[2]、ここでもSample AのCH₂鎖がトランス型となることが予測される。さらに13、15ppmのシグナルは末端CH₃に帰属されるが、Sample Aのみ明確に分かれている。CH₃基は構造上込み入った空間に入ると高周波数シフトを生じることが明らかになっている[3]。これらの結果から、この試料には層状構造となった部分が含まれることが予測される。X線粉末回折測定の結果でも、この予測を支持する結果が得られた。

このように、固体NMRを用いて、ハイブリッド試料の表面修飾剤の結合状態や、その構造を明らかにした。

本研究は、NEDO超ハイブリッド材料技術開発プロジェクトの支援を受けて行われたものである。

液晶CBOOAと混合系液晶CBOOA/HBABにおける分子間相互作用の比較

○萩原祥子¹, 谷本登¹, 藤森裕基¹

¹日大院・総合基

Study of inter-molecular interactions in CBOOA/HBAB mixture by high-resolution ¹³C NMR.

○Shoko HAGIWARA¹, Noboru TANIMOTO¹, and Hiroki FUJIMORI¹

¹ Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University.

4-octyloxy-*N*-(4-cyanobenzylidene)aniline (CBOOA) has the thermotropic phase sequence, isotropic (I) – nematic (N) – smectic Ad (S_{Ad}) – crystal (C), on lowering the temperature at atmospheric pressure. When CBOOA is mixed with *N*-*p*-hexyloxybenzylidene-*p*-aminobenzonitrile (HBAB), which has the similar molecular structure to CBOOA but the different phase sequence, reentrant nematic (RN) phase is appeared at atmospheric pressure. To understand the molecular dynamics and the inter-molecular interactions in the liquid crystalline phases, the ¹³C high-resolution NMR experiments were carried out for CBOOA, HBAB, and CBOOA/HBAB mixture.

【緒言】液晶相は分子構造及び分子間相互作用が密接に関与し合って形成される、液体と結晶の中間状態である。4-octyloxy-*N*-(4-cyanobenzylidene)aniline (CBOOA, Fig. 1(a))は、大気圧下で分子配列、配向が共に無秩序で分子が自由な運動を行う等方性液体(Isotropic, I)相、分子配向に一軸性の秩序をもつネマチック(Nematic, N)相、分子配向秩序と共に一次元の周期性をもつスメクチック(Smectic Ad, S_{Ad})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(Crystal, C)相へと相転移する。これに比べ、CBOOAと似た分子構造を有する*N*-*p*-hexyloxybenzylidene-*p*-aminobenzonitrile (HBAB, Fig. 1(b))は高温側からI-N-Cと相転移する。これらの物質の比較からは、構造上の僅かな差異が液晶相形成に与える影響に関する知見が得られることが期待される。また、これら二種類の液晶物質の混合物は大気圧下において、I-N-S_{Ad}-N-Cの相転移系列をもつことが知られている[1]。低温で再び現われるN相はリエントラントネマチック(Reentrant Nematic, RN)相と呼ばれる。このような系では、分子の自己集合のわずかな違いが相の出現を支配していると考えられる。そこで、本研究では液晶相形成過程の解明に対し、分子構造による効果、及び混合系における分子間相互作用の変化による効果の両面からアプローチすることを目的としている。この様に、流動性の高い液晶におけるメゾスコピック構造を研究する際には、NMRによる測定が非常に有益となる。今回は、CBOOA、HBAB、および混合系液晶CBOOA/HBABに対し、各炭素核におけるスピン-格子緩和時間(T_1)の測定を行い、比較した。

Liquid-crystal, High-resolution NMR, Relaxation time

○はぎわらしょうこ, たにもとのぼる, ふじもりひろき

【実験】CBOOA及びHBABは宮島らにより合成された試料[2]を使用した。混合系液晶はCBOOAにモル分率0.09のHBABを混合させた試料、CBOOA_{0.91}HBAB_{0.09}を用いた。¹³C NMR測定にはJEOL製EX-270を使用し、大気圧下において磁場中で配向させた静止試料に対して温度範囲326~388 K、共鳴周波数67.94 MHzで行った。各炭素核における T_1 は $\pi - \tau - \pi/2$ パルス系列を用いた反転回復法により測定した。

【結果・考察】Fig. 2は、CBOOA, HBAB, およびCBOOA_{0.91}HBAB_{0.09}の液晶相における¹³C NMRスペクトルを示す。Fig. 3, 4は、C(8), C(10), C(11)およびC(1)における T_1 温度依存性を示す。各試料のほとんどの炭素核における T_1 は、液晶相でほぼ連続的な温度依存性を示し、また、多くの場合対応する炭素核同士の T_1 は、ほぼ一致することが明らかとなった。しかし、分子末端シアノ基C(1)における T_1 温度依存性は試料間で異なる傾向を示した。比較の結果、本液晶系では混合による分子間相互作用への影響は分子構造の差異によるものと同様に[3]分子末端シアノ基に顕著に現われるということが明らかとなった。

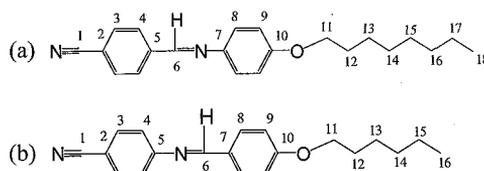


Fig. 1. Molecular structures of CBOOA (a) and HBAB (b) and numbering of carbon atoms.

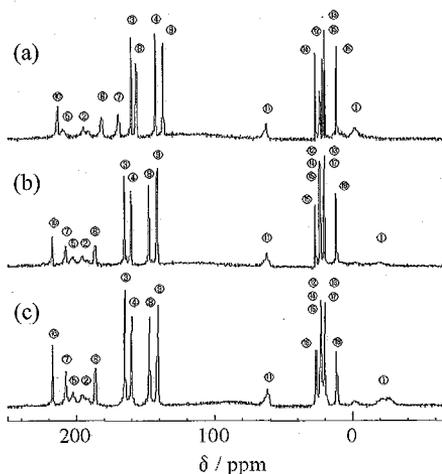


Fig. 2. ¹³C-decoupled ¹³C NMR spectra of HBAB (a), CBOOA_{0.91}HBAB_{0.09} (b), and CBOOA (c) in liquid-crystalline phases. Numbers indicate the results of line assignment.

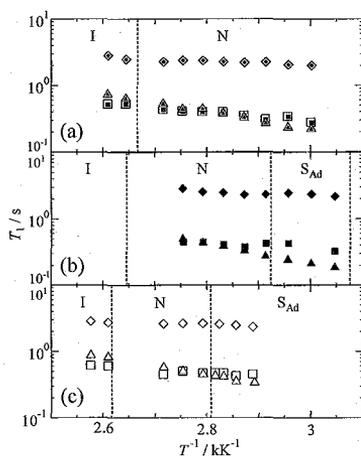


Fig. 3. Temperature dependencies of T_1 of typical carbons, C(8), C(10), and C(11), for HBAB (a), CBOOA_{0.91}HBAB_{0.09} (b), and CBOOA (c). The triangle, diamond and square marks represent the results of C(8), C(10), and C(11), respectively. The dotted lines represent the transition temperatures.

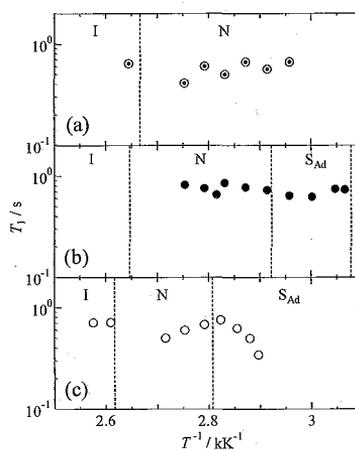


Fig. 4. Temperature dependencies of T_1 of C(1) for HBAB (a), CBOOA_{0.91}HBAB_{0.09} (b), and CBOOA (c). The dotted lines represent the transition temperatures.

[1] P. E. Cladis, *Phys. Rev. Lett.* **35**, 48 (1975).

[2] S. Miyajima, T. Enomoto, T. Kusanagi, and T. Chiba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 1679 (1991).

[3] S. Hagiwara, Y. Iwama, and H. Fujimori, *Complex Systems*, 725 (2008).

固体NMRを用いた不飽和脂質を含有する バイセルに関する研究

○上釜 奈緒子¹、辻 暁²、西村 勝之¹

¹分子科学研究所, ²兵庫県立大学

Properties of Bicelle Composed of Un-, and Saturated Phosphatidylcholine Revealed by Solid State NMR Spectroscopy

○Naoko Uekama¹, Satoru Tuzi², and Katsuyuki Nishimura¹

¹Institute for Molecular Science, ²University of Hyogo

In this study, we report development of new bicelle composed of un-, and saturated lipids together with phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂). That possesses planer lipid bilayer as same as conventional bicelle, but can be magnetically aligned at room temperature stably. The orientational property of developed bicelle was assessed by using ³¹P-NMR. Rearrangements of lipids in bicelle were observed by differential interference microscope at various temperatures.

Introduction: Conventional bicelle prepared from the hydrated mixture of saturated lipids possessing short and long acyl-chains at proper composition forms planer lipid bilayer and can be magnetically aligned under static magnetic field from 30 to 40 °C. Triba et al., proposed a bicelle prepared by mixture of saturated lipid 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and unsaturated lipid 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) for long acyl chain lipids, and 1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC) for short acyl chain lipid, respectively, in order to achieve magnetic alignment at temperature lower than that of conventional bicelle¹⁾. In the following we refer above bicelle to as POPC/DMPC/DHPC-bicelle.

Experimental: POPC/DMPC/DHPC-bicelle was prepared with q value of 3.0 as described in ref (1). Our developed bicelle consists of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) in addition to above lipids at proper molar ratio. We refer new bicelle to as PIP₂/POPC/DMPC/DHPC-bicelle. Similarly, PIP₂/POPC/DMPC/DHPC- bicelle was prepared with q value of 3.0. Orientational property of developed bicelle was compared to that for POPC/DMPC/DHPC-bicelle based on ³¹P-NMR. All of NMR experiments were carried out using Varian INOVA 400 spectrometer equipped with JEOL 6 mm o.d. narrow bore MAS

固体 NMR バイセル

○ うえかま なおこ、つじ さとる、にしむら かつゆき

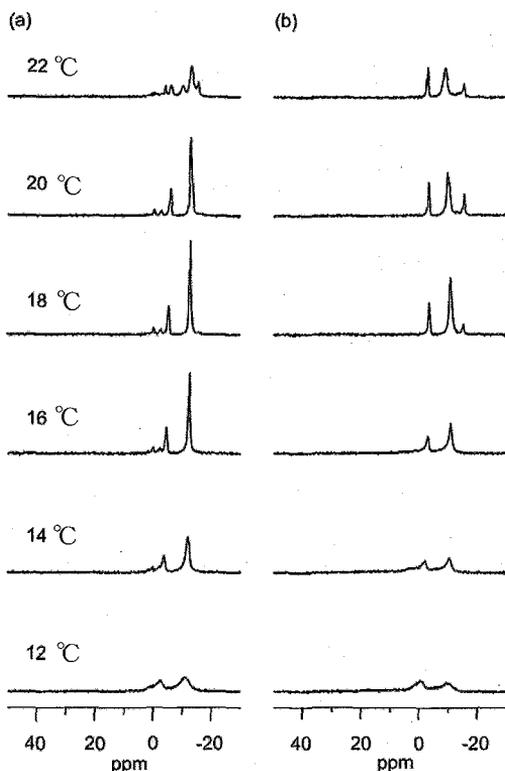


Fig. 1 ^{31}P -NMR spectra of (a) $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle and (b) $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle from 12 to 22 °C.

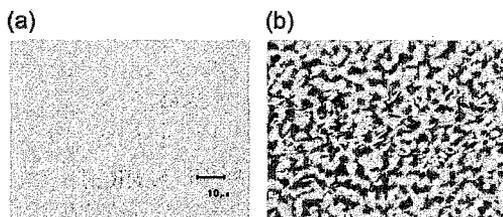


Fig. 2 Differential interference microscope pictures of (a) $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle and (b) $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle at 16 °C.

two bicelles were significantly different, even though those were prepared by same q value.

We have successfully developed bicelle which can be magnetically aligned stably at room temperature. The developed bicelle may be useful for structural characterization of membrane proteins.

References

- (1) Triba MN, Devaux PF, Warschawski DE, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1357.

probe at static mode. Temperature was increased from 0 to 30 °C.

Results and Discussions: Figure 1 shows the comparison of ^{31}P -NMR spectra for (a) $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle and (b) $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle. The peaks around -3 and -11 ppm are originated from DHPC and POPC/DMPC mixture, respectively. The peak around -15.5 ppm is δ_{\perp} edge of axially symmetric powder pattern of ^{31}P chemical shift anisotropy from multi lamella vesicles (MLVs). As shown in Figure 1 (a), $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle was magnetically aligned stably from 14 to 20 °C. In contrast, $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle was magnetically aligned only at 16 °C. At 18 °C, δ_{\perp} edge of axially symmetric powder pattern of ^{31}P chemical shift anisotropy from MLVs was appeared.

Differential interference microscope pictures of (a) $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle and (b) POPC/DMPC -bicelle at 16 °C are shown in Figure 2. No visible size objects were observed for $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle at 16 °C, in contrast to observation of visible size of bicelle for $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle. This result indicates that the size of those

固体NMRによるシルセスキオキサンを骨格とする エポキシ樹脂の構造解析

○前田史郎¹, 黄前真吾¹, 清水裕太¹, 村上吉昭²
¹福井大院工, ²日東シンコー

Characterization of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes by solid NMR

○Shiro Maeda¹, Shingo Oumae¹, Yuta Shimizu¹, Yoshiaki Murakami²

¹Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Fukui, 910-8507, Japan. ²Nitto Shinko Corp., Sakai, Fukui, 910-0381, Japan

Characterization of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes [1] was done by using ¹³C and ²⁹Si solid-state high resolution NMR measurements. ¹³C and ²⁹Si spin-lattice relaxation times and ¹³C depolarization time constants of [1] were measured with Torchia's T1CP pulse sequence and Wu's depolarization pulse sequence, respectively. ²⁹Si DD/MAS spectrum of [1] was curve fitted to four peaks.

[はじめに] シルセスキオキサンは、一般式(RSiO_{3/2})_nで示される化合物であり、三官能性シランを加水分解・重縮合反応することにより得られる、このシルセスキオキサンには、ランダム構造、梯子状構造、かご状構造等がある。これらの化合物をビルディングブロックとして得られるポリマーは、高い機械的強度、高い耐熱性を有する等の利点が報告されており、高機能材料として期待が寄せられている。シルセスキオキサンを骨格とするエポキシ樹脂硬化物の固体¹³Cおよび²⁹Si NMR測定を行って分子構造解析を行った。

[実験] シルセスキオキサン骨格エポキシ樹脂硬化物の試料作製は次の通りである：アルコキシシラン化合物とビスフェノールA型エポキシ樹脂とを加熱縮合させる。反応生成物としてアルコールおよび水が発生する。重合樹脂としてはシルセスキオキサン骨格を含有するエポキシ樹脂が得られる。固体¹³Cおよび²⁹Si NMR測定は、Chemagnetics CMX Infinity 300を用いて75.56MHzと59.69MHzで測定した。化学シフトは外部基準値を用い、¹³Cはヘキサメチルベンゼンのメチル炭素をTMSから17.35ppm,²⁹SiはポリジメチルシランをTMSから-34.1ppmとした。

Table 1. ¹³C Chemical shifts, depolarization time constants, T_d , and relaxation times, T_1^C of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes.

| Peak Number | 1,1' | 2 | 3 | 3' | 4 | 5 | 5' | 6 | 7 | 8 | 8' | 9 | 10 | 11 |
|--------------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Chemical shift/ppm | 157 | 144 | 130 | 130 | 115 | 72 | 72 | 51 | 41 | 31 | 31 | 23 | 17 | 8 |
| $T_d/\mu\text{s}$ | 600, 590 | 540 | 490 | 71 | 81 | 38 | 38 | 270 | 400 | 240 | 60 | 76 | 180 | 60 |
| T_1/s | 11, 22 | 11 | 30 | 5.0 | 4.4 | 0.7 | 6.6 | 4.3 | 4.1 | 9.9 | 0.3 | 0.7 | 5.7 | 0.8 |

シルセスキオキサン, エポキシ樹脂, 固体NMR

○まえだしろう, おうまえしんご, しみずゆうた, むらかみよしあき

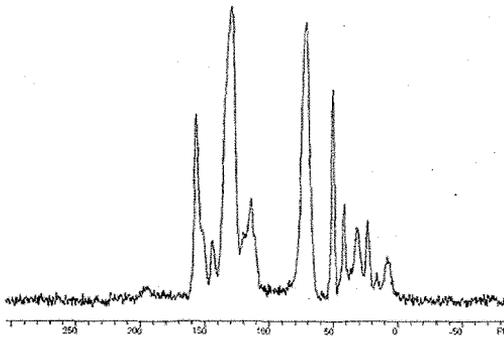


Figure 1. ^{13}C CP/MAS-TOSS spectrum of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes.

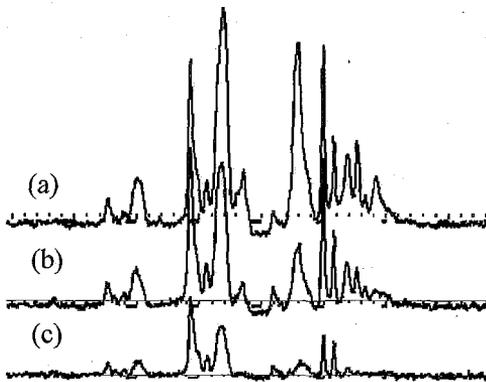


Figure 2. ^{13}C CP/MAS depolarization spectra of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes: depolarization times are a) $40\mu\text{s}$, b) $100\mu\text{s}$, and c) $400\mu\text{s}$, respectively.

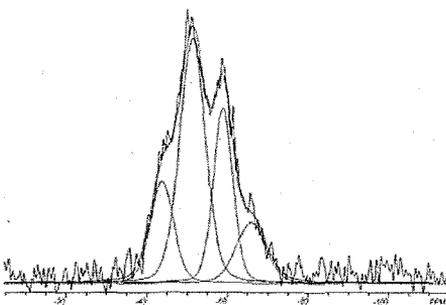


Figure 3. ^{29}Si DD/MAS spectrum of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes.

90° パルス幅は $5\mu\text{s}$, ^{13}C CP/MAS測定のコ
ンタクトタイムは 1.5ms , 待ち時間は 1s , 試
料回転数は 5kHz であった. 試料管外径は
 5mm で, セラミックス製CP/MASプローブ
を用いた. ^{29}Si DD/MASスペクトルは待ち
時間 360s で 1600 回積算した. Wuらの脱分
極パルスシーケンスならびにTorchiaの
T1CPシーケンスを用いて, 脱分極時定数
 T_d ならびに, ^{13}C および ^{29}Si スピン格子緩和
時間 T_1 の測定を行った.

[結果と議論] 図1に ^{13}C CP/MAS-TOSS
スペクトルを示す. 表1に ^{13}C 化学シフト,
脱分極時定数, 緩和時間を示す. 重なって
いるピークは脱分極時定数および緩和時
間の違いを利用して分離して帰属した. 図
2(a), (b), および(c)は, それぞれ脱分極時
間が $40\mu\text{s}$, $100\mu\text{s}$, および $400\mu\text{s}$ の脱分極ス
ペクトルである. 図1にない低磁場側およ
び中央付近のピークはスピニングサイド
バンドである.

^{29}Si DD/MASスペクトルを図3に示す.
スペクトルは -43ppm , -50ppm , -59ppm ,
および -66ppm の4つのピークに波形分離
できた. これらのピークは, それぞれ,
 T^0 サイト $\text{RSi}(\text{OR})_3$, T^1 サイト
 $\text{RSi}(\text{OSi})(\text{OR})_2$, T^2 サイト $\text{RSi}(\text{OSi})_2(\text{OR})$,
および T^3 サイト $\text{RSi}(\text{OSi})_3$ に帰属した. ^{29}Si
スピン格子緩和時間は, それぞれ 23s , 42s ,
 66s , および 26s , 面積比率は 17% , 45% , 24% ,
および 13% である. エポキシ樹脂硬化物の
固体NMR測定結果と硬化前の液体状態の
エポキシ樹脂の ^{13}C および ^{29}Si NMR測定結
果と合わせて, 硬化機構およびシルセスキ
オキサン骨格の分子構造の詳細も発表する
予定である.

固体 NMR を用いた新規水素貯蔵材料 $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ の 局所構造解析

○ 小野泰輔¹、下田景士²、坪田雅己²、小島健一³、
市川貴之²、小島由継²

1. 広大先端研、2. 広大先進セ、3. 広大総科研

Systematic study on local structure of novel hydrogen storage material $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ by solid state NMR

Taisuke Ono¹, Keiji Shimoda², Masami Tsubota²,
Ken-ichi Kojima³, Takayuki Ichikawa², Yoshitsugu Kojima²

1. The Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University

2. Institute for Advanced Materials Research, Hiroshima University

3. The Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

Novel metal aluminum amides $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ ($M = \text{Li}, \text{Na}, \text{K}, \text{Mg}, \text{and Ca}; x = 1, 2$) were synthesized by ball milling method under liquid ammonia. Thermogravimetry and mass spectroscopy (TG/MS), synchrotron radiation X-ray powder diffraction (SR-XRD), and ^{27}Al MAS and 3QMAS NMR experiments have been performed in order to investigate the thermal decomposition and structural properties. ^{27}Al MAS spectra showed that $\text{Al}(\text{NH}_2)_4^-$ units actually existed in $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$. We found the correlation between decomposition temperature and the ^{27}Al isotropic chemical shift in 3QMAS spectra.

《序論》

今日、地球温暖化を促進しかつ枯渇が迫っている化石燃料に代わる新エネルギーの開発が急がれている。中でも水素と電力をベースとしたクリーンなエネルギー社会の構築が注目を集めている。水素エネルギー活用の実現化を考える上で、軽量・高容量かつ容易に水素を取り出せる水素貯蔵材料の開発が極めて重要な課題となり、近年、軽元素を用いた水素

Key words: Hydrogen Storage Material; ^{27}Al 3QMAS NMR

おの たいすけ、しもだ けいじ、つぼた まさみ、こじま けんいち、
いちかわ たかゆき、こじま よしつぐ

貯蔵材料の開発が盛んに行われている。そのような中、我々は有望な材料として $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ ($M = \text{Li, Na, K, Mg, Ca; } x = 1, 2$)系水素貯蔵材料に着目した。 $M = \text{Li}$ の場合、5.1 質量%もの多量のアンモニアを吸蔵/放出し、LiH とのミリング複合化処理により、6.1 質量%という多量の水素を 130°C という低温で放出することが報告されている[1]。それ故、高容量水素貯蔵材料として実用化が期待される材料である。そこで我々の研究グループは、さらなる水素放出温度の低温化を目指して、 $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ の系統的な研究に取り組んだ。

《実験》

$M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ は、出発物質(Al粉末、水素化物、アラネート、金属粉末)を液体アンモニア中で4~10時間ボールミリング処理して作製した。 ^{27}Al MAS 測定及び 3QMAS 測定は JEOL ECA600 (14.1 T)を使用して行われた。測定は 15kHz の MAS 回転で行った。参照試料には、 AlCl_3 1M 水溶液を用いた。

《結果と考察》

Fig.1は、過去に報告された $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の構造モデル[2]であり、Alを中心に NH_2^- イオンが四面体配位している。本研究にて作製した $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の回折パターンは、この構造モデルと一致する。熱分析結果では、同族元素内では原子番号が大きくなるにつれアンモニア放出温度(分解温度)が低温化している。そこで、我々は ^{27}Al MAS 及び 3QMAS NMRを用いて $\text{Al}(\text{NH}_2)_4^-$ 錯イオンの中核となるAl原子の化学状態を観察した。Fig.2は $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の ^{27}Al 3QMASスペクトルである。3QMASから得られた化学シフト値と分解温度に相関が見られた。詳細は他の結果と併せて、ポスター上にて議論する。

[1] R. Janot *et al.*, J. Phys. Chem. C 111 (2007) 2335-2340.

[2] H. Jacobs *et al.*, Z. Anorg. Allg. Chem. 581 (1985) 125-139.

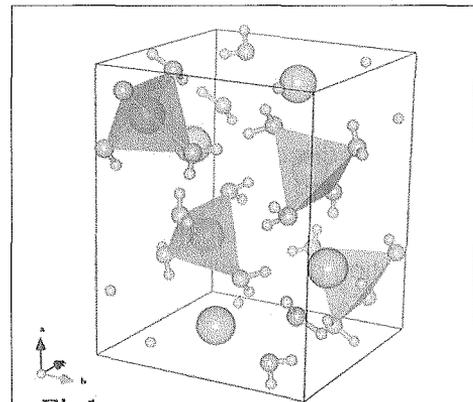


Fig1.
Structure model of $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$

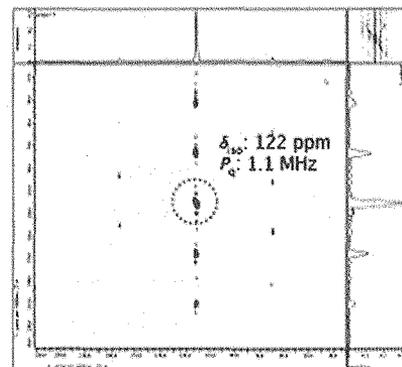


Fig2.
3QMAS spectra of $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$

高圧水素ガスシール用ゴム材料中に溶解した水素の固体NMRによる解析

○藤原 広匡⁽¹⁾, 山辺 純一郎^(1,2), 西村 伸^(1,3)

- 1) 産業技術総合研究所(AIST)
水素材料先端科学研究センター (HYDROGENIUS)
- 2) 九州大学大学院工学研究院水素エネルギー国際研究センター
- 3) 九州大学大学院工学研究院機械工学部門

Evaluation of Hydrogen Dissolved in Rubber for High Pressure Hydrogen Sealing using Solid state NMR

○Hirofumi Fujiwara¹, Junichiro Yamabe^{1,2} and Shin Nishimura^{1,3}

1 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Research Center for Hydrogen Industrial Use and Storage (HYDROGENIUS)

2 International Research Center for Hydrogen Energy, Kyushu University

3 Department of Mechanical Engineering in Faculty of Engineering, Kyushu University

Rubber materials for high-pressure hydrogen gas sealing are repeatedly exposed to hydrogen gas. Hydrogen gas dissolves in rubber in high-pressure hydrogen gas. The dissolved hydrogen in rubber causes blister fracture, which starts from inner bubbles emerged during hydrogen desorption. In this study, we evaluate content and state of the dissolved hydrogen in NBR after 100MPa hydrogen gas exposure, using solid state NMR, aiming to clarify the mechanism of the fracture. As a result, two types of hydrogen with different chemical shifts were determined by NMR spectra. Examination of the relaxation time clarified the significant difference of the mobility of the two types of hydrogen.

【緒言】燃料電池システムなどに用いられる高圧水素ガス貯蔵容器シール用ゴム材料の設計指針を確立する目的で、高圧水素ガスのゴム材料への影響評価を進めている。高圧水素ガス曝露によりゴム材料にはブリスタと呼ばれる破壊現象が生じるが、これは、ゴム中に溶解した水素の脱離過程において発生した気泡が進展することで起こる現象²⁾であることを既に報告した。破壊現象にはゴム材料の化学構造変化を伴わないことを NMR, IR, ラマン測定により確認した¹⁾。高圧水素曝露による破壊のメカニズムの解明に際しては、曝露時にゴム中に溶解した水素の状態把握と定量が不可欠である。本研究では NBR(アクリロニトリルブタジエンゴム)を用い 100MPa 圧力条件にて水素ガス曝露に供した試験片の固体 NMR 測定を行う事でゴム中に溶解した水素の状態と濃度評価を行った。

【実験】実験には原料ゴムである NBR(日本ゼオン Nipol 1042)に硫黄 1.5phr および加硫促進剤を配合した試験片を用いた。ジルコニア製固体 NMR 測定用 φ7mm ローターに円柱試験片を充填したサンプルを 100MPa・30℃・65 時間の条件にて水素曝露に供し、超伝導固体 NMR 装置 CMX-300(日本電子(株))を用い、シリコンゴム(0ppm)を基準物質として ¹H ケミカルシフトを観測した。残存水素量は同条件にて曝露した試験片を TDA:昇温脱離分析装置 JSH-201 (Jサイエンス社製)にて別途測定した。また、水素ガスを NMR 管に封管し、重く

Hydrogen GAS, Solid state NMR, Fuel cell

○ふじわらひろただ, やまべじゅんいちろう, にしむらしん

ロホルムを外部ロック試薬として超伝導 NMR ECP-400(日本電子(株))にて測定した。

【結果・考察】Fig. 1 に曝露後ゴム中に水素ガスが溶解した状態の試験片について MAS 速度 3,000Hz で固体 ^1H NMR 測定を行った結果を水素ガスのスペクトルと合わせて示す。曝露後 1 時間経過した試験片には 2.2ppm と 5.5ppm をピークトップとする NBR 由来のスペクトルの他、未曝露の NBR では観測されない 4.49 ppm[A] (半値幅:

148Hz)と 4.8 ppm[B] (47Hz)に 2 種類のピークが発現した。一方、水素ガスのスペクトルは約 7.3 ppm 付近に観測されたことから、[A] [B]は測定中に試験片から脱離した水素ガス由来のスペクトルでないことが示唆される。NMR スペクトルの経時変化を測定した結果、[A] [B]は時間の経過とともに減少し 30 時間後消滅した。30 時間後のスペクトルは未曝露 NBR 試験片のスペクトルと一致することが確認され、試験片中の残存水素量は TDA により 0wt・ppm であることが確認された。NBR の分子構造は水素曝露の影響を受けないこと

ことから[A] [B]を水素分子と仮定した場合の濃度をスペクトルの波形分離によって NBR の面積比率を基に算出した。別途 TDA により NMR 測定温度と同条件下で測定した試験片中の残存水素濃度との関係を Fig. 2 に示す。[A]と[B]の合計水素量は TDA 測定による水素脱離挙動と一致した。TDA 測定により観測されるガスは水素分子であることが確認されているため、[A] [B]はゴム試験片中に溶解している水素分子であることが確認された。よって、ゴム中に溶解した水素ガスは、ケミカルシフトと半値幅が異なることから分子運動性の異なる 2 種類の水素分子で存在していることが示唆された。

1) 第 58 回高分子討論会 2R-15 藤原広匡 山辺純一郎 西村伸。

2) J. Yamabe, S. Nishimura, Int. J. Hydrogen Energy, 34, 1997 (2009)。

【謝辞】ゴム試験片を作製いただきました高石工業(株)に感謝します。本研究成果の一部は、NEDO 技術開発機構の水素材料先端科学基礎研究事業(平成 18 年度～平成 24 年度)の一環として行ったものである。

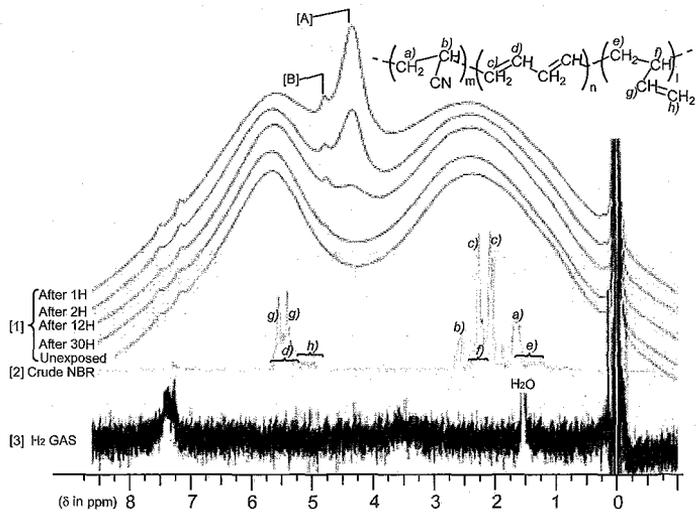


Fig. 1 ^1H NMR spectra of NBR during hydrogen elimination

[1] Time-series of Solid state NMR spectra of NBR, [2] Liquid phase NMR spectra of crude NBR in CDCl_3 , [3] Solution State NMR spectra of H_2 Gas

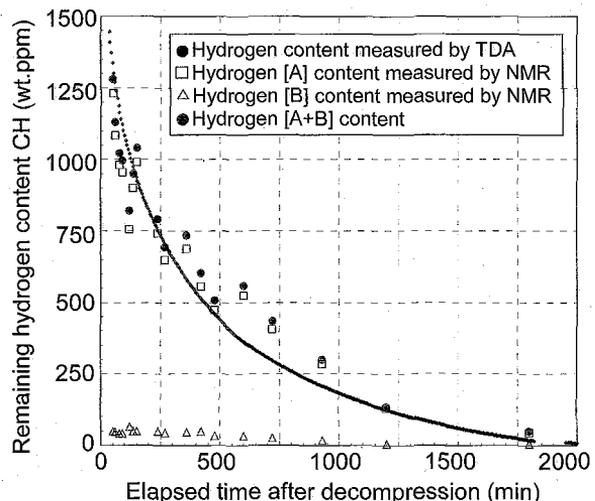


Fig.2 Variation of hydrogen measured by TDA and NMR

CsHSO₄-シリカナノ粒子複合材料における水素結合と プロトン拡散

○治村 圭子, 林 繁信

産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

Hydrogen bonds and proton dynamics in hybrid materials of CsHSO₄-silica nanoparticle prepared by mechanical milling

○Keiko Jimura and Shigenobu Hayashi

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

In inorganic solid acid salts such as cesium hydrogen sulfate CsHSO₄, tetrahedral AO₄ (A = S, P) anions form hydrogen-bond networks. It is well known that a high proton conductivity is observed at temperatures higher than 100°C. Proton dynamics is closely related with rotation of AO₄ tetrahedral ions, and proton transport takes place through the hydrogen bond networks. The proton transport phenomenon is expected to be changed or improved, if the hydrogen-bond states are changed or controlled. In the present work, we have synthesized hybrid materials of CsHSO₄ and silica nanoparticle by use of mechanical milling, and have studied the hydrogen-bond states and the proton dynamics by ¹H solid-state NMR.

【序】 CsHSO₄に代表される無機固体酸塩では、AO₄型の四面体イオン (A = S, P) が水素結合のネットワークを形成しており、100°C以上の温度において高いプロトン伝導性を示すことが知られている。プロトンの拡散は四面体イオンの回転と密接に関係しており、プロトンは水素結合ネットワークを移動する。水素結合の状態を変化させることにより、プロトンの拡散挙動が大きく変化することが期待できる。本研究では、CsHSO₄ とシリカナノ粒子とをメカニカルミリングで複合化した試料について、その水素結合状態と水素拡散挙動を ¹H NMR を用いて調べたので報告する。

【実験】 CsHSO₄ とシリカナノ粒子をメカニカルミリングで複合化して調製した。ジルコニア製粉砕ジャーに CsHSO₄ とシリカナノ粒子を所定量秤取り、遊星型ボールミルで2時間ミリングした。調製中に材料が吸湿した可能性があるため、複合化した試料を室温減圧下で乾燥した。複合材料 xSiO₂-(1-x)CsHSO₄ の組成は mol 比率 : x = 0~0.95 とした。¹H MAS NMR 測定には、Bruker MSL400 (共鳴周波数 400.13MHz) を用いた。

【結果・考察】 組成比の異なる複合材料の ¹H MAS NMR スペクトルを Fig.1 に示す。x = 0 の材料では 12.4 ppm にシグナルが観測された。これは bulk CsHSO₄ (phase III)

固体 NMR、水素結合、無機固体酸塩

○じむら けいこ、はやし しげのぶ

に帰属される。シリカナノ粒子を加えずに調製した複合材料にはメカニカルミリングの影響がないことを示している。一方、 $x > 0$ の材料では 11 ppm ~ 3 ppm 付近までシグナルが広がっており、11 ppm、8~6 ppm、3~5 ppm に三種類のピークが確認された。後者二つのシグナルは、11 ppm のピークよりも線幅がブロードであった。Bulk CsHSO₄ (phase II) の化学シフトが 11.2 ppm であることから、11 ppm のピークは、CsHSO₄ (phase II) like 部分に帰属される。5~3 ppm のピークは、シリカナノ粒子の OH 基に帰属される。8~6 ppm のピークは、CsHSO₄ 領域とシリカ領域の境界部分に帰属される。これらの結果から、複合材料の水素結合状態は明らかに bulk CsHSO₄ と異なる。水素結合の状態が変化したことから、プロトンの拡散挙動も大きく変化していると期待される。

複合材料 $x = 0.8$ の ¹H MAS NMR スペクトルの温度依存性を Fig. 2 に示す。温度上昇に伴う各ピークの水素量変化は観測されなかった。すなわち、3 種類のプロトンが別々に存在していることを示した。一方、温度上昇に伴い、11 ppm のピークでは線幅がブロードになり、8~6 ppm のピークでは線幅がシャープになった。この結果は、CsHSO₄ (phase II) like 部分と複合材料境界部分のプロトンが運動していることを示しているが、その運動モードが異なることを示唆している。

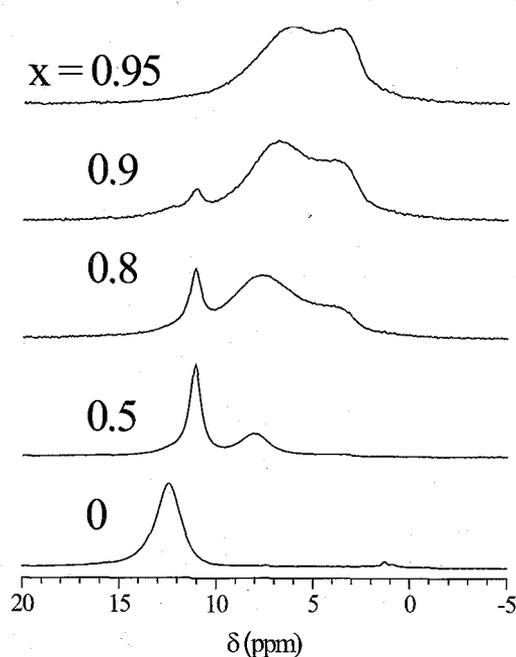


Fig. 1 ¹H MAS NMR spectra of hybrid materials, $x\text{SiO}_2-(1-x)\text{CsHSO}_4$, $x = 0-0.95$. The spin rates were 10.0 kHz.

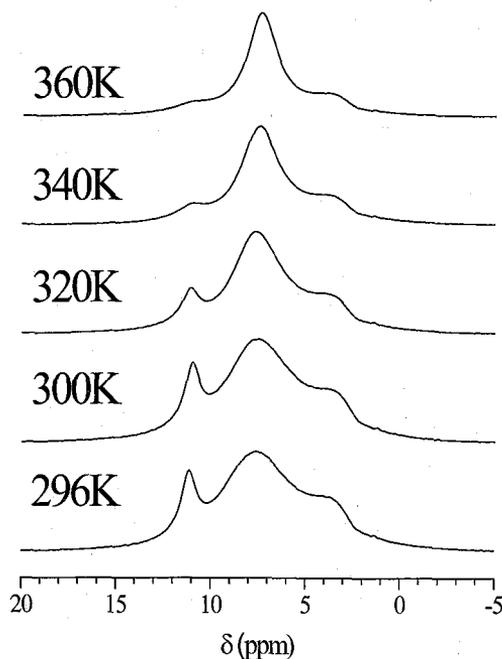


Fig. 2 ¹H MAS NMR spectra of hybrid materials, $x\text{SiO}_2-(1-x)\text{CsHSO}_4$, $x = 0.8$. The spin rates were 8.0 kHz. The temperature was 296~360K.

ゼオライトに吸着したジクロロメタンの観測

○小島 奈津子, 林 繁信

産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

NMR observation of dichloromethane adsorbed on zeolites

○Natsuko Kojima and Shigenobu Hayashi

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

Dichloromethane is one of organic solvents, which can well dissolve organic substances. The solvent has been used when a solid substance was adsorbed on an adsorbent. Everyone believes that dichloromethane is easily removed by evacuation at room temperature. However, we find out that some zeolites do not release dichloromethane under vacuum. In the present work, we study the adsorption state of dichloromethane molecules by means of solid-state NMR.

〈緒言〉

ジクロロメタンは有機溶媒の1つであり、有機固体物質をよく溶解するため、ゼオライトなどの吸着物質へ有機固体物質を吸着させるときの溶媒としてよく用いられてきた。吸着させた後に室温で真空排気することにより、ジクロロメタンは容易に除去できると従来考えられてきた。ところが、ゼオライトの一種であるモルデナイトでは、吸着したジクロロメタンが真空排気によって完全には脱離しないことを¹³C, ¹H MAS NMR の観測によって見出した。本研究では、固体NMRを用いてジクロロメタン分子の吸着状態について検討したので報告する。

〈実験〉

モルデナイトは、触媒学会参照触媒委員会から提供されたJRC-Z-HM10, -15, -20を用いた。酸点の影響を検討するためにH型モルデナイトとした。合成時におけるSiO₂/Al₂O₃のモル比が各々、10, 15, 20となっている。残留しているNH₄⁺イオンを除くためにあらかじめ535℃で焼成をした。比較のために、H型YゼオライトであるJRC-Z-HY5.6も用いた。空气中、400℃で乾燥後、バイアル瓶に入れ密閉した。その後、既知量のCH₂Cl₂をマイクロシリンジで加えた。その状態で、3日間放置した後、ロータリーポンプで真空引きして吸着していないCH₂Cl₂を除去した。これらの操作は窒素ガス雰囲気下で行い、MASローターへの試料の充填も窒素ガス雰囲気下で行った。

¹³C, ¹H magic-angle-spinning (MAS) NMR はBruker MSL-400 (共鳴周波数: ¹³C 100.61 MHz, ¹H 400.13MHz) を用いて室温で測定した。Bruker MAS プローブヘッドで、外径4.0mmのジルコニアローターを使用し、パルス系列は通常のシングルパルスを使用した。¹³C測定では¹Hデカップリングを行った。¹³C, ¹Hのスペクトルは、100%テトラメチルシラン(TMS)を基準として表示した。

 固体NMR, ゼオライト, 吸着

○こじまなつこ, はやししげのぶ

〈結果と考察〉

ゼオライトに CH_2Cl_2 を吸着させ真空排気した後測定した ^1H MAS NMRスペクトルを図1に示した。HM10, HM15, HM20では、5.4 ppmにシャープなシグナルが観測された。モルデナイトでは他に、1.8 ppmと8.9 ppmに比較的シャープなシグナルがあり、さらに、5 ppm付近を中心とした非常にブロードなシグナルが観測された。1.8 ppmは孤立したSi-OH、8.9 ppmは水素結合したSi-OH \cdots O-Si、5 ppmのブロードなシグナルはブレンステッド酸点Si-OH-Alに帰属され、いずれも CH_2Cl_2 を吸着させる前から存在していたシグナルである。一方、5.4 ppmのシグナルは、 CH_2Cl_2 (100%)の化学シフト値5.443 ppmと一致しており、真空排気した後も残留した吸着 CH_2Cl_2 分子に帰属される。ブレンステッド酸点の量がHM10 > HM15 > HM20であることを考えると、5.4 ppmのシグナル強度から吸着 CH_2Cl_2 分子量はHM10 > HM15 > HM20の順となる。

一方、HYでは、4.7 ppmを中心とした比較的ブロードなシグナルのみ観測された。このシグナルはブレンステッド酸点Si-OH-Alに帰属される。吸着 CH_2Cl_2 分子に由来するシグナルは観測されなかった。

水が吸着していても5 ppm付近にシグナルを示すので、 ^{13}C MAS NMRスペクトルを測定して、吸着 CH_2Cl_2 分子の有無を確認した。図2に、 ^{13}C MAS NMRスペクトルを示した。HM10, HM15, HM20いずれも54 ppmにシグナルが観測された。 CH_2Cl_2 (100%)の化学シフト値54.548 ppmと一致しており、吸着 CH_2Cl_2 分子の存在が確認できた。一方、HYではシグナルが全く観測されず、真空排気により CH_2Cl_2 がすべて無くなったことが確認された。

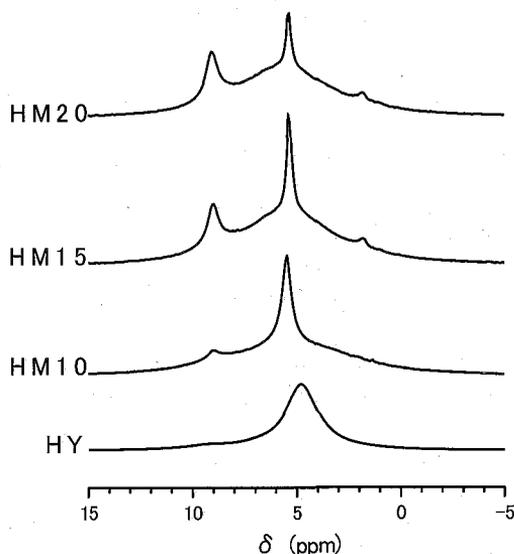


Figure 1. ^1H MAS NMR spectra of H-type mordenites and HY after CH_2Cl_2 adsorption followed by evacuation.

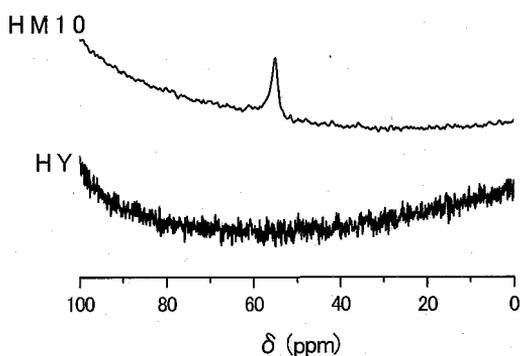


Figure 2. ^{13}C MAS NMR spectra of HM10 and HY after CH_2Cl_2 adsorption followed by evacuation.

^{11}B - ^{11}B 2次元MAS NMRによる ボロシリケートガラスの構造解析

○村上美和¹, 清水禎¹, 丹所正孝¹, 赤井智子², 矢澤哲夫³
物質・材料研究機構¹, 産業技術総合研究所²,
兵庫県立大学³

^{11}B - ^{11}B 2D MAS NMR studies on borosilicate glass

○M. Murakami¹, T. Shimizu¹, M. Tansho¹, Tomoko Akai², Tetsuo Yazawa³
¹National Institute for Materials Science,
²National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,
³University of Hyogo

To study micro-structure of Na_2O - B_2O_3 - SiO_2 - Al_2O_3 glass, which is a starting material for preparing porous glass, ^{29}Si , ^{23}Na , ^{27}Al , and ^{11}B one-dimensional (1D) magic-angle spinning (MAS) spectra and result of two-dimensional (2D) ^{11}B - ^{11}B homonuclear correlation experiment under MAS are examined at 21.8 T. We conclude that two of the four peaks observed for ^{11}B are assigned to borate rings, which we assign to as the main components in the boron-rich phase to be removed by acid leaching.

Phase separation of alkali borosilicate glass is the most important process in preparing porous glass.^{1,2} So far numerous studies on the phase separation using various spectroscopic means such as X-ray, Raman, and NMR have been done. In this work, we report our recent results using high-resolution one- and two-dimensional NMR experiment on Al-added borosilicate glass.

In Figure 1, we compare ^{29}Si , ^{23}Na , ^{27}Al , and ^{11}B one-dimensional (1D) MAS spectra. Except for the ^{11}B spectrum, the spectra consist of a broad characterless peak. For ^{29}Si , its chemical shift value indicates most of Si exists as tetrahedrally coordinated Si. Similarly most of Al is assigned to tetrahedral one. The observed simple spectrum for ^{23}Na is an expected one because Na exists as a positive ion near the four coordinated Al/B in the glass matrix. On the other hand, ^{11}B exhibits at least two groups of signals. From their chemical shift values, the signal at around 0 ppm is ascribed to the tetrahedrally coordinated boron and those at 10-20 ppm are the trigonally coordinated one.

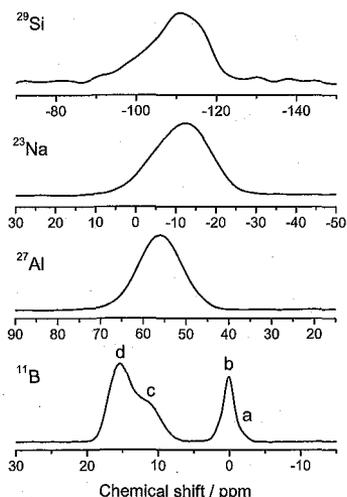


Figure 1. ^{29}Si , ^{23}Na , ^{27}Al , and ^{11}B MAS spectra of Al_2O_3 -added sodium borosilicate glass. ^{29}Si spectrum was taken at 11.7 T and the other spectra were taken at 21.8 T.

固体NMR、無機ガラス構造、二次元相関NMR

○むらかみみわ, しみずただし, たんしょまさたか, あかいともこ, やざわてつお

So far, it has been proposed that there are mainly four ^{11}B signals in a MAS spectrum of alkali-borosilicate glass; (a) tetrahedral boron surrounded by $-\text{O}-\text{Si}-$ (hereafter, $\text{B}(4,0\text{B})$), (b) tetrahedral boron with one of the four coordination is to $-\text{O}-\text{B}-$ ($\text{B}(4,1\text{B})$), (c) trigonal boron in a ring structure ($\text{B}(3,\text{r})$), and (d) trigonal boron in a non-ring structure ($\text{B}(3,\text{nr})$).³ Indeed the observed 1D MAS spectrum follow the assignment; the letter-a to -d in Figure 1 are drawn following the abovementioned assignment. The question is then what is the ring/non-ring boron? How they are related/connected with each other and/or with the tetrahedral borons? To answer these questions, we undertook two-dimensional (2D) $^{11}\text{B}-^{11}\text{B}$ homonuclear correlation experiment using the conventional three 90° pulses sequence (Figure 2).⁴

Figure 3 is the observed 2D $^{11}\text{B}-^{11}\text{B}$ homonuclear correlation spectrum with a mixing time of 2 s. Strong cross peaks are observed between peak-b and peak-d, indicating the existence of a local structure of $-\text{B}(4,1\text{B})-\text{O}-\text{B}(3,\text{r})-$. The large intensity of the cross peak also indicates that most of $\text{B}(4,1\text{B})$ and $\text{B}(3,\text{r})$ forms such local structure. This leads us to conclude that these borons exist as borate structures (Figure 4a) in the borosilicate glass. $\text{B}(3,\text{r})$ is also included in the boroxol ring (Figure 4b).

In the poster, we shall also present lineshape analysis of the ^{11}B lineshape taking the second-order quadrupolar interaction into account.

References

- (1) Yazawa, T. *Key Eng. Mater.* **1996**, *15*, 125.
- (2) Yazawa, T. *Porous Ceram. Mater.* **1996**, *115*, 125-146.
- (3) Du, L. S.; Stebbins, J. F. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3913-3921.
- (4) Jeener, J.; Meier, B.H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546.

Acknowledgement

This work was also supported in part by Grant-in-Aid for Science Research (C) (Grant No. 21550028) from the Japan Society for the Promotion of Science.

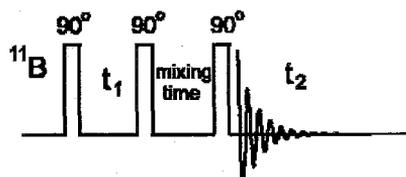


Figure 2. Pulse sequence for 2D homonuclear correlation experiment.

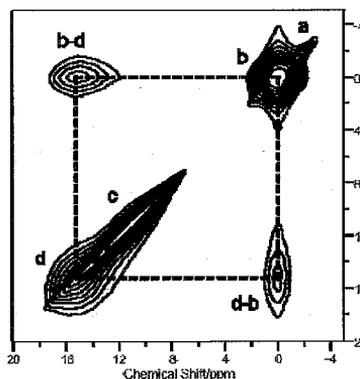


Figure 3. Observed 2D $^{11}\text{B}-^{11}\text{B}$ homonuclear correlation spectrum with a mixing time of 2 s.

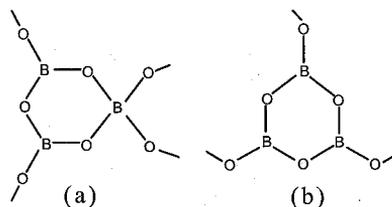


Figure 4. Two examples for ring structures. (a) triborate and (b) boroxol.

バナジウム重水素化物の相構造および重水素の存在状態

○鈴木 陽、林 繁信

産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

Phase structures and states of deuterium in vanadium deuterides

○You Suzuki, Shigenobu Hayashi

Research institute of instrumentation frontier, National institute of advanced industrial science and technology (AIST)

Vanadium (V) metal can absorb a large amount of hydrogen to the extent of a hydrogen-to-metal atomic ratio of 2. The structures and phase diagrams of vanadium hydrides have extensively been studied so far, including vanadium deuterides. The crystal structure and deuterium site are dependent on the D concentration, and there are three phases denoted α_D , β_D and α'_D in the VD_x system ($0 < x < 1$) at room temperature. The phase diagram around $x = 0.5$ is complex because of the presence of α_D , β_D and α'_D phases. Nuclear magnetic resonance (NMR) is useful to study deuterium and vanadium in metal deuterides. In the present work, we have studied the phase structure and deuterium site in the VD_x system ($0.4 \leq x \leq 0.6$) at room temperature using 2H MAS NMR and ^{51}V NMR.

[序] バナジウム金属は重水素ガスと反応し、安定な重水素化物を形成する。室温付近においてバナジウム重水素化物(VD_x)は重水素濃度の増加につれて α_D 相, β_D 相, α'_D 相の 3 つの相を持つことが知られている。これらの相においてバナジウムが形成する格子の構造はそれぞれ体心立方、体心正方、体心立方であり、重水素が吸蔵されるサイトは 4 配位、6 配位、4 配位である。室温付近において α_D 相, β_D 相, α'_D 相の 3 つの相が存在するため、 VD_x は $0.4 \leq x \leq 0.6$ において複雑な相図を示す。固体 NMR は水素や重水素などを直接観測することができ、局所構造や水素の運動性に関する情報を得ることのできる有用な方法である。本研究では、バナジウム重水素化物における相構造や重水素のサイト、運動性について 2H および ^{51}V NMR スペクトルを測定して調べたので報告する。

[実験] 試料はバナジウム金属の粉末と重水素ガスを反応させて合成し、重水素含有量は吸蔵された重水素ガスの体積から決定した。 2H および ^{51}V NMR の測定には Bruker ASX400 (共鳴周波数 2H 61.42 MHz, ^{51}V 105MHz) を用いた。 ^{51}V NMR スペクトルは静止試料について四極エコー法を用い測定した。 ^{51}V は非常に Knight シフトが大きく非常に広い線幅を持つことから、観測周波数を変え複数回測定し、その包絡線を計算することで ^{51}V NMR スペクトルの正しい線形を得た。 2H NMR スペクトルの測定は、試料を外径 2.5 mm のジルコニアローターに充填し、マジック角回転(MAS)を 15 kHz で行った。通常のシングルパルス法で測定を行った。また、選択的反転回復法 ($\pi/2 - \tau - \pi/2 - T_d - \pi/2$) を用いて、 2H シグナル間の相互作用の有無を調べた。

 金属水素化物 (Metal hydrides), ^{51}V NMR, 2H NMR

○すずき よう, はやし しのぶ

[結果と考察] Fig. 1に ^{51}V NMRスペクトルを示す。それぞれのスペクトルを数本のピークに波形分離し、それぞれのピークを α_{D} 相、 β_{D} 相、 α'_{D} 相に帰属した。 $\text{VD}_{0.40}$ では5250 ppmおよび6260 ppmの2つのピークが存在し、重水素含有量からそれぞれ α_{D} 相、 β_{D} 相のピークであると考えられる。 $\text{VD}_{0.50}$ では α_{D} 相に相当する5390 ppmのピークが減少し、6470 ppmの β_{D} 相のピークが増加した。また、6670 ppmに α'_{D} 相ピークが存在した。 $\text{VD}_{0.57}$ では6760 ppmの α'_{D} 相のピークが大部分を占めており、6470 ppmに少量の β 相のピークが観測された。それぞれのスペクトルについて α_{D} 相、 β_{D} 相、 α'_{D} 相の割合をTable 1に示す。

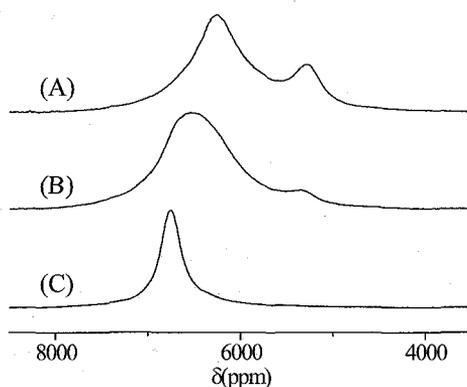


Fig. 1. ^{51}V NMR spectra of VD_x , referenced to the signal of VOCl_3 . (A) $x = 0.40$, (B) $x = 0.50$, and (C) $x = 0.57$.

Table 1. The fraction of each phase in VD_x ($0.4 \leq x \leq 0.6$) at room temperature.

| | α_{D} | β_{D} | α'_{D} |
|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| $\text{VD}_{0.40}$ | 0.20 | 0.80 | — |
| $\text{VD}_{0.50}$ | 0.09 | 0.82 | 0.09 |
| $\text{VD}_{0.57}$ | — | 0.17 | 0.83 |

$\text{VD}_{0.50}$ の ^2H MAS NMRスペクトルをFig. 2に示す。 $\text{VD}_{0.50}$ では-44 ppmと-36 ppmに β_{D} 相と α'_{D} 相のピークが存在した。 β_{D} 相のピークは線幅が広く複数のスピニングサイドバンドを持つのにに対し、 α'_{D} 相のピークは線幅が狭くスピニングサイドバンドを持たない。これは、2つの相における重水素の運動性の違いを表わしている。-44 ppmと-36 ppmのシグナルが同じ相内の異なるサイトに存在する重水素である可能性もあるため、2つのシグナル間で重水素の交換もしくはスピン拡散が起こっているかを選択的反転回復法の測定によって調べた。中央のピークでは-44 ppmと-36 ppmのピーク間が8 ppmと近接しているため選択的反転を行うことが難しい。そこで、-44 ppmのピークにのみ観測されているスピニングサイドバンドを反転するように τ を調整した。また、反転後の遅延時間 T_d はMASの回転周期に同調するように調整した。その結果、-44 ppmのピークではスピン-格子緩和時間に比べ早い磁化の回復が観測された。これは、拡散運動によって選択的反転で生じた磁化が移動したことを示している。-36 ppmのピークでは磁化の回復に大きな変化は認められなかった。このことから、-44 ppmと-36 ppmのシグナル間で重水素の交換もしくはスピン拡散は観測されず、異なる相と帰属することが妥当である。

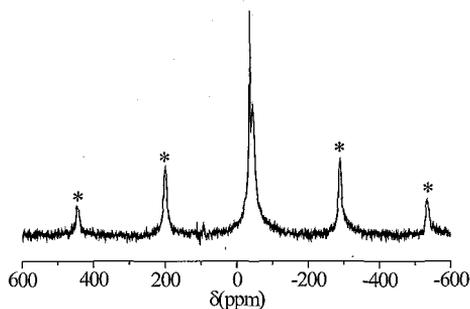


Fig. 2. A ^2H MAS NMR spectrum of $\text{VD}_{0.50}$, referenced to the signal of D_2O . The marks * indicate spinning side bands.

[謝辞] 本研究はNEDO水素貯蔵材料先端基盤研究事業(HYDRO☆STAR)の下で行われた。

固体 NMR 法による含フッ素化合物/ シクロデキストリン包接錯体の構造解析

○小糸祐介¹, 龍野宏人¹, 山田和彦¹, 安藤慎治¹

¹東工大院理工

Structural Analysis of Fluoro-containing Compounds/ β -cyclodextrin Inclusion Complexes by Solid-state NMR

Yusuke Koito¹, Hiroto Tatsuno¹, Kazuhiko Yamada¹, Shinji Ando¹

¹Department of Chemistry & Materials Science, Tokyo Institute of Technology

The conformational changes of fluoro-containing compound (HFE)/ β -CD inclusion complex (IC) were investigated at elevated temperatures by solid-state ¹⁹F MAS NMR. The broad ¹⁹F peaks of HFE/ β -CD were shifted to higher frequencies by 2~4 ppm compared to those of the neat condition. Thermal gravimetric analysis of the ICs showed little weight loss below the decomposition temp. of β -CD (300°C) which is much higher than the b.p. of HFE (131°C). The NMR spectral shapes and peak intensities of the ICs were dramatically changed at high-temperature region. In particular, a new peak assignable to the terminal -CF₃ appeared on the high frequency side above 140°C, though it was gradually returned to the lower frequency side after 50 h. The structural transition between the meta-stable state at 150°C and the original state at 20°C is reversible to some extent.

(緒言)シクロデキストリン(CD)は疎水性の空孔に多様な化合物を包接し、包接錯体(Inclusion Complex: IC)を形成することが可能であり、ゲスト分子の耐熱性向上や揮発性抑制などに効果的である [2]。例えば、CD に包接された多くのゲスト化合物は、単体の沸点では蒸発せず、CD の熱分解温度である 300°C 付近まで形態が維持される[3]。このような現象にはホスト-ゲスト間に働く強い相互作用が関与していると考えられることから、室温/高温領域におけるゲスト分子の構造・運動性変化を固体 ¹⁹F MAS NMR により解析した。

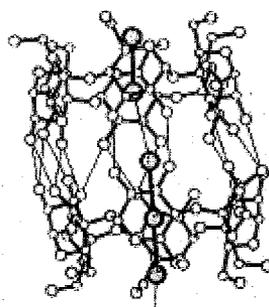


Fig.1 Schematic structure of CD complex [1].

β -cyclodextrin, Solid-state NMR, Inclusion complex

○こいとゆうすけ, たつのひろと, やまだかずひこ, あんどうしんじ

(実験) 本研究ではゲスト分子としてハイドロフルオロエーテル(HFE;住友 3M (NOVEC7600))を用いた。 β -CD の飽和水溶液にゲスト分子を滴下後、72h 強制的に攪拌し生じた白色沈殿を洗浄して β -CD・IC 試料とした。元素分析(C/F 分率)の結果から HFE/ β -CD・IC はホスト:ゲスト=2:1 の IC を形成していることが示された。

(結果・考察) 温度可変固体 ^{19}F MAS NMR を用いて室温～高温状態におけるゲスト分子の構造・運動性を選択的に観察した結果、 120°C 以下ではスペクトルに大きな変化は生じなかったが、 140°C において高周波数側に新たな信号が観察された (Fig.3)。この信号は末端 $-\text{CF}_3$ (2)に起因すると考えられ、加熱過程による HFE 両末端 $-\text{CF}_3$ 基の挙動が異なることが確認された。われわれは $\text{C}_9\text{F}_{20}/\beta\text{-CD}\cdot\text{IC}$ における C_9F_{20} ゲストの一部が 80°C で β -CD 空孔外に露出することを見出している[4]。ホスト-ゲスト間に働く拘束力がゲスト分子の形態に応じて異なるため昇温過程の構造変化に差が生じたと推測される。

さらに熱処理後の HFE/ β -CD・IC の経時変化を固体 ^{19}F MAS NMR により観察したところ、昇温時に顕著な変化を示した $-\text{CF}_3$ (2)の信号が、再び低周波数の信号 $-\text{CF}_3$ (2')に移行する過程が確認された。高温での構造は準安定状態であり、徐々に最安定な初期状態に近付いたと考えられ、この過程には十時間～数日かかることから、ゲストはホストから比較的強い拘束力を受けていると推定される。熱処理前後で見られる $-\text{CF}_3$ (2)の化学シフト変化の理由については検討中だが、ゲスト分子のコンホメーション変化に由来すると考えられる。

[1] K.Harata, *Chem.Rev.*, **98**, 1803 (1998).

[2] D.Mentzafos, I.M.Mavridis, G.Le Bas, G.Tsoucais, *Acta. Crystallor. Sect. B*, **47**, 746(1991)

[3] E.J. Wang, Z.X. Lian, J. Cai, *Carbohydr. Res.*, **342**, 767 (2007).

[4] H. Tatsuno, S. Ando, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 25751 (2006).

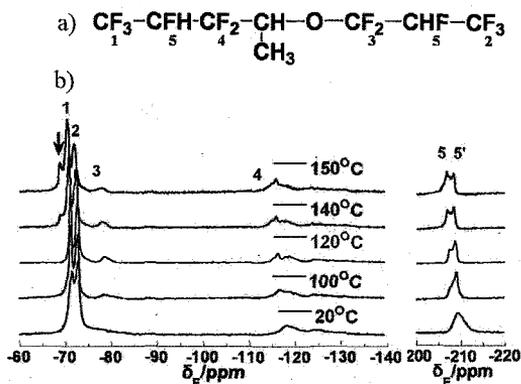


Fig2. a) Molecular structure of HFE, and b) variable temperature ^{19}F MAS NMR spectra of HFE/ β -CD IC.

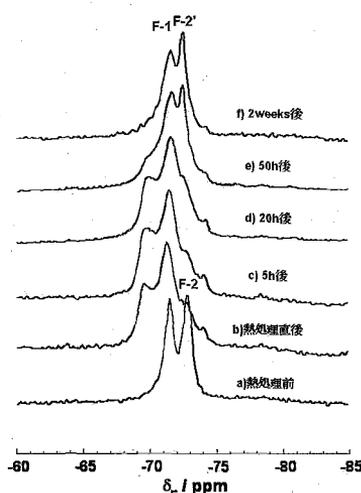


Fig. 3 ^{19}F MAS NMR spectra of HFE/ β -CD IC at various conditions; a) initial state, b) 5h c) 20h d) 50h, and e) 2weeks after annealing at 140°C .

CAST/CNMRシステムと合成による天然有機化合物の
構造訂正○越野広雪¹, 叶 躍奇¹, 高橋俊哉¹, 佐藤寛子²¹独立行政法人理化学研究所²国立情報学研究所**Structural Revision of Natural Products by Synthesis and Application of the CAST/CNMR System**○Hiroyuki Koshino¹, Yue Qi Ye¹, Shunya Takahashi¹, and Hiroko Satoh²¹RIKEN, Wako, Japan.²National Institute of Informatics, Tokyo, Japan.

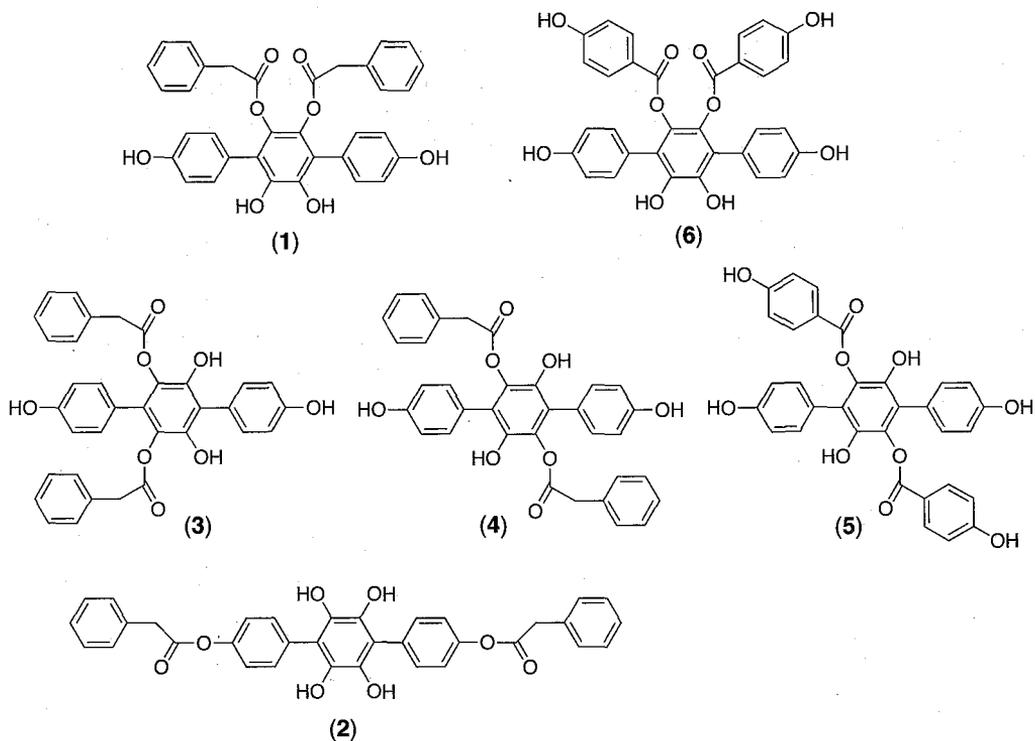
We report structural revision of a series of p-terphenyl natural products by synthesis and NMR study with the help of a CAST/CNMR system, a program code for ¹³C-NMR chemical shift prediction using a chemical shift-structure database. We synthesized the originally proposed structure of thelephantin G and its NMR data did not match with that of reported. Based on the NMR data, we could propose the revised structure for thelephantin G, and its structure was confirmed by total synthesis. Besides, the structures of thelephantins A-F, J, and N, thelephorin A, and curtisian M-Q with p-hydroquinone diesters like ganbajunin E are suspected to be wrong, and p-hydroquinone diester substitutions in the most of these p-terphenyls are supposed to correct to a catechol type ortho diesters like thelephantin G.

CAST/CNMRシステムは独自に開発したCASTコードを利用した立体化学を的確に考慮できることを特徴とするデータベースに基づいた¹³C-NMR化学シフト精密予測システムである¹⁻⁶。データベースに登録されるデータの質は予測データに影響を与えるので、十分に評価して登録しているが、その過程で帰属あるいは構造の間違いがしばしば見つかっており⁷、これまでにモデル化合物の合成研究およびNMRデータの解析による一連の構造訂正も報告してきた⁸。高度に酸化されたp-テルフェニル骨格を有する天然有機化合物はキノコなどの代謝産物として数多く報告されているが^{9,10}、最近我々が構造決定したvialinin A(1)に関しても、その合成研究によって構造を確認すると同時に、アシル基の置換位置に関する異性体であるganbajunin C(2)の提案構造が間違いであることを明らかにした¹¹。Vialinin Aの異性体であるganbajunin D(3)およびE(4)はアシル基が容易に転移するために分離困難な混合物として存在するが、それらのNMRデータを比較した結果、置換基の位置の決定は¹³C-NMRの化学シフト値の比較により充分可能であることを見いだした。さらに、ganbajunin Eのアシル基がp-ヒドロキシ安息香酸になっている構造が提案されていたthelephantin Gの提案構造(5)はvialinin Aと同じようにアシル基がパラ位ではなくオルト位に置換している構造(6)に訂正されることを化学合成によって証明した¹²。さらに、合成化学的に構造確認した化合物のNMRデータに基づき、報告されている同族体、thelephantin A-F, J, N¹³⁻¹⁵,

CAST/CNMR, p-テルフェニル, 構造訂正

○こしのひろゆき, ようやくき, たかはししゅんや, さとうひろこ

thelephorin A¹⁶, curtisian M-Q¹⁷などのNMRデータに関しても, CAST/CNMRシステムを利用して構造決定に関する再評価を行った結果, 多くのp-ヒドロキノン型の化合物はvialinin Aと同様なカテコール型である事が示唆された¹².



参考文献

- 1) H. Satoh et al, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, *40*, 622-630.
- 2) H. Satoh et al, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 1106-1112.
- 3) H. Satoh et al, *J. Comput. Aided Chem.* **2002**, *3*, 48-55.
- 4) H. Satoh et al, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4539-4547.
- 5) H. Satoh et al, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7431-7437.
- 6) S. Koichi et al, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 1734-1746.
- 7) H. Koshino et al, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4623-4626
- 8) S. Takahashi et al, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4578-4581.
- 9) C. Xie et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 2326-2332.
- 10) C. Xie et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5424-5426.
- 11) Y. Q. Ye et al, *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 4131-4134.
- 12) Y. Q. Ye et al, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4642-4645.
- 13) D. N. Quang et al, *Phytochemistry* **2003**, *62*, 109-113.
- 14) D. N. Quang et al, *Phytochemistry* **2003**, *63*, 919-924.
- 15) D. N. Quang et al, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1179-1184.
- 16) S. Taukamoto et al, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1103-1105.
- 17) D. N. Quang et al, *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1064-1067.

P077

スルホン酸基を有するブロック共重合体中の水の拡散特性

○大窪貴洋, タベルニエ ブルーノ, 貴傳名甲, 大平昭博
産総研・FC-Cubic

Diffusion behavior of water in sulfonated block copolymers

○Takahiro Ohkubo, Tavernier Bruno, Koh Kidena and Akihiro Ohira

Polymer Electrolyte Fuel Cell Cutting-Edge Research Center, Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo, Japan.

The longitudinal and transverse relaxation time and diffusion order 2D ^1H NMR spectra of water in sulfonated block copolymer for fuel cells were estimated by use of inverse laplace treatment (CONTIN method). The water with different state around sulfonated acid group or not, which correspond to slow and fast diffusion coefficients, can be identified from 2D NMR spectra.

緒言

燃料電池を構成する要素の中で、電解質膜は、プロトンや水を透過させる機能を持ち、高いプロトン電導性が求められている。プロトン伝導は、水チャンネルと呼ばれる高分子中の親水部を介して起こることから、その中での水の動的特性や水チャンネルのモルフォロジーに関する研究が、これまで多数報告されている。近年、新しい材料開発の試みとして疎水鎖と親水鎖によるブロック化により水チャンネルの高次構造を制御したブロックコポリマー開発が行われている。これらブロックコポリマーの構造は、散乱実験によってキャラクターゼーションされるが、プロトン伝導の担い手となる水そのものの解析についてはほとんど行われていない。そこで本研究では、高いプロトン伝導性を示す代表的なブロックコポリマー

poly(styrenesulfonate-methylbutylne) (PSS-PMB)を対象とし、水のキャラクターゼーションのために緩和と拡散を利用した ^1H NMR により解析を行ったので報告する。

実験

Polymer Source から購入した PSS-PMB を THF により融かし、溶媒キャスト法により厚さ $50\mu\text{m}$ の膜を作成した。得られた膜を真空下 40°C にて脱水処理を行い、 $4\text{mm} \times 5\text{mm}$ の短冊状にカットし NMR 管に充填した。含水は、膜の入った NMR 管のまま調湿チャンバーにて $50\%RH(40^\circ\text{C})$ の条件で行い、NMR 測定中の含水率変化を抑制するために、NMR 管の膜以外のデッドボリュームをテフロンロッドで塞いだ。

NMR 測定は、ECA500(11.7T)で行った。測定は、Inversion-recovery (IR)、Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)による T_1 , T_2 測定および Bipolar-gradient-pulse pair

拡散、ブロック共重合体、モルフォロジー

○おおくぼ たかひろ, たべるにえ ぶる一の, きでな こう, おおひら あきひろ

longitudinal eddy current delay(BPPLED)による拡散測定を行った。本研究では、CONTIN法を組み込んだ自作プログラムにより逆ラプラス処理を行い、周波数ドメイン(横軸)と T_1 , T_2 および拡散ドメイン(縦軸)による2次元スペクトルを得た。

結果

T_1 , T_2 そして拡散係数を縦軸にした2次元スペクトルを図2に示す。ケミカルシフトの注意は、払っていない。まず T_1 order のスペクトルにおいて、低磁場側(3.6kHz)に2つの縦緩和時間 420ms および 39ms を中心に持つピーク(A1, A2)が観測された。また

幅広の高磁場側のピーク(C)中心は、430s の縦緩和時間であった。低磁場側ピークの2つの縦緩和時間は、横緩和時間のスペクトルでも観測され、ピーク中心は、それぞれ 6.7ms および 0.19ms であった。また、高磁場側ピーク(C)の中心は、3.1ms である。低磁場側へのシフトは、主に SO_3H との交換によるシフトと考えられ、2種の緩和時間については、NMR のタイムスケールで交換できない空隙に存在する水と考えられる。また、各ピーク中心の T_2/T_1 比を計算すると、A1:0.016, A2:0.0049, C:0.0072 であった。緩和時間のタイムスケールと比較して、 $\text{SO}_3\text{H}-\text{H}_2\text{O}$ の早い交換を仮定すると、 T_2/T_1 の比が小さい A2 および C ピークに相当するプロトンは、高分子表面での吸着により長い滞留時間を有している水由来と考えられる。拡散オーダーのスペクトルは、低磁場側から 1.4×10^{-11} , 1.3×10^{-12} および $1.0 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ をピーク中心に持つピークが観測された。緩和時間で観測された A2 ピークは、短い T_2 のため、拡散オーダーの測定では、観測できていないと考えられる。A ピークは、 10^{-11} オーダの拡散係数を有しており、スルホン酸基周りの親水部に存在し水チャンネル内を拡散している水と考えられる。一方、高磁場側のピークは、 10^{-12} オーダの拡散係数であり、高分子内の疎水部に存在する水が自由に拡散できないため、 10^{-12} オーダの遅い拡散係数を有していると考えられる。

以上、緩和時間と拡散係数を利用した2次元スペクトルにより、複数の水を識別し、プロトン伝導に関係する運動性を評価することが可能であった。発表では、 T_1 - T_2 および T_1 -D の結果についても報告する予定である。

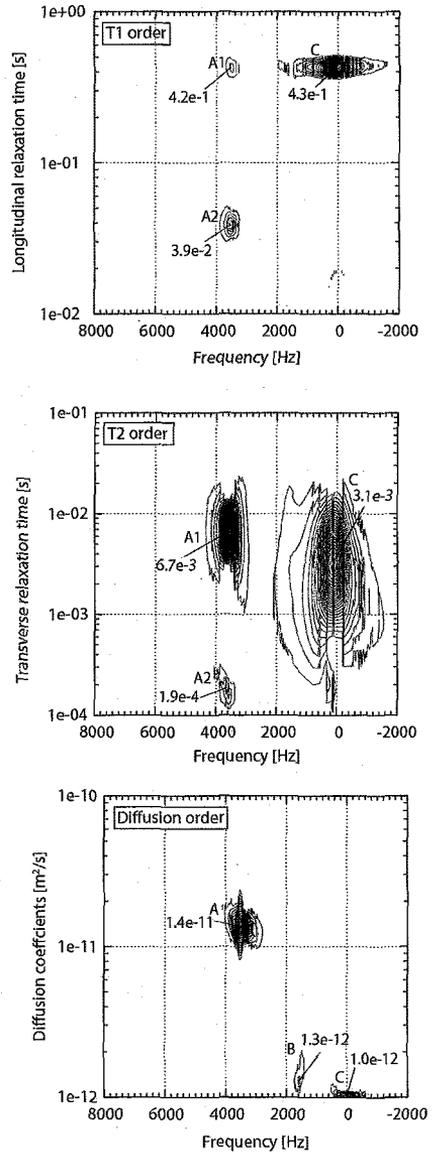


Fig. 2 Longitudinal, transverse relaxation time and diffusion order 2D NMR spectra of water in PSS-PMB

カルシウムアルミノシリケートの ^{27}Al NMR —融体構造の温度依存性—

○金橋康二¹, Jonathan F. Stebbins²

¹新日鐵先端研

²スタンフォード大学

Temperature Effects on Melt Structure of Calcium Aluminosilicates by using ^{27}Al NMR

○Koji Kanehashi¹, Jonathan F. Stebbins²

¹Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation

²Dept. of Geological and Environmental Sciences, Stanford University

Structural changes with increasing temperature are important to understand the correlation with macroscopic properties such as viscous flow of most aluminosilicate melts, but remain much less well characterized in general. In this study, we determine temperature effects on melt structure of calcium aluminosilicates experimentally by investigating glass samples prepared with varying cooling rates and in situ methods. The content of five-coordinated aluminum increases with cooling rates and thus with fictive temperature, which is agreement with in situ high temperature NMR data. Five-coordinated aluminum is considered the intermediate of configurational changes of MO_4 (M=Si, Al) tetrahedra.

スラグやパウダーの高温熔融状態での構造の温度依存性を明らかにすることは、粘性等の高温物性を理解するために重要である。その方法として、(1) 冷却速度を変化させて作成したガラスの構造を調べる、(2) in situ な手法で融体の構造を調べる、の2通りが考えられる。今回、我々はNMRを用い、 $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ 系の試料におけるAlの融体構造の温度依存性について検討した[1]。

実験で用いたサンプルをTable 1に示す。所定の組成比となるように酸化物を混合し、熔融、急冷させた (Water quench)。仮想温度 (T_f) を変化させるために、徐冷 (Slow cooled) および超急冷 (Fast quench) させた試料を作成した。

ガラスの1D ^{27}Al MAS NMRの測定には、Varian Unity/Inova分光計 (18.8 T) を用いた。試料回転周波数は20 kHzとし、フリップ角は固体に対して 30° に設定した。 ^{27}Al 3QMAS NMRの測定には、Varian Unity/Inova分光計

^{27}Al NMR, カルシウムアルミノシリケート, ガラス・融体

○かねはしこうじ, じよなさん・えふ・すてびんず

(14.1 T) を用い、shifted-echoパルスシーケンスを採用した。高温in situ ^{27}Al NMRの測定条件は、既報[2]に従った。 ^{27}Al NMRの化学シフト基準は、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 水溶液を 0 ppmとした。

Table 1 Nominal & analyzed compositions, estimated quench rates, and calculated fictive temperatures of CAS glasses

| Sample | | Nominal composition (mol %) | | | Analyzed composition (mol %) | | | Cooling rate (K/s) | Tf (K) |
|----------|--------------|-----------------------------|----------------|------|------------------------------|----------------|------|-----------------------------|---------------|
| | | Al_2O_3 | SiO_2 | CaO | Al_2O_3 | SiO_2 | CaO | | |
| CAS25.50 | Slow cooled | 25 | 50 | 25 | 25.4 | 49.6 | 25.0 | $1 \pm 0.03 \times 10^{-1}$ | 1110 ± 5 |
| | Fast quench | 25 | 50 | 25 | 25.3 | 50.1 | 24.6 | $2 \pm 1 \times 10^4$ | 1260 ± 20 |
| CAS10.60 | Slow cooled | 10 | 60 | 30 | 10.1 | 60.3 | 29.6 | $1 \pm 0.03 \times 10^{-1}$ | 1060 ± 5 |
| | Fast quench | 10 | 60 | 30 | 10.1 | 60.3 | 29.6 | $8 \pm 4 \times 10^3$ | 1290 ± 20 |
| CAS13.44 | Slow cooled | 12.5 | 44.4 | 43.1 | 12.6 | 44.5 | 42.9 | $1 \pm 0.03 \times 10^{-1}$ | 1065 ± 5 |
| | Water quench | 12.5 | 44.4 | 43.1 | - | - | - | $1 \pm 0.5 \times 10^2$ | 1105 ± 10 |
| | Fast quench | 12.5 | 44.4 | 43.1 | 12.7 | 44.4 | 42.9 | $10 \pm 5 \times 10^4$ | 1140 ± 20 |

CAS13.44ガラスの ^{27}Al MASスペクトルをFig. 1に示す。メインの4配位型 Al ($^{[4]}\text{Al}$) の他に、低周波数側に5配位型 ($^{[5]}\text{Al}$) に相当するピークを観測され、冷却速度が増加、すなわち T_f が増加するに従い、 $^{[5]}\text{Al}$ の存在比率が増加した。また、 $^{[4]}\text{Al}$ のピークがやや広幅となっていることから、温度上昇に伴い、AlおよびSiの配列の無秩序化が進んでいると推測される。

Fig. 2に $^{[5]}\text{Al}$ の存在比率の温度依存性を示す。 $^{[4]}\text{Al} \leftrightarrow ^{[5]}\text{Al}$ の単純な反応を考えた場合、 ΔH と活量係数が一定だとすれば $\log_{10}([^{5}\text{Al}]/[^{4}\text{Al}])$ と $1/T$ との間には直線関係が得られるはずである。CAS13.44においては、 1400°C における熔融状態において、化学シフト値および熱膨張の効果を考慮すると、24 %程度の $^{[5]}\text{Al}$ の存在が見積もられ、その値はガラス試料から得られたFig. 2中の直線を外挿した値と比較的近い値を示した。一方、Siの配位数は T_f が上昇しても変化しないことから、分子の再配列に必要なイオン間の結合・切断がAl周辺で容易に起こりやすくなっていると考えられる。以上の結果から、 $^{[5]}\text{Al}$ の存在は分子の流動が起こる際の中間体として存在しており、温度が上昇するに従い、その存在量が増加するため、粘性が低下していくと考えられる。

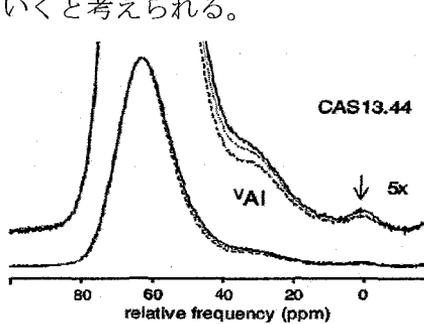


Fig.1 ^{27}Al MAS NMR spectra for CAS13.44. Solid line: fast quench, dotted line: water quench, dashed line: slow cooled.

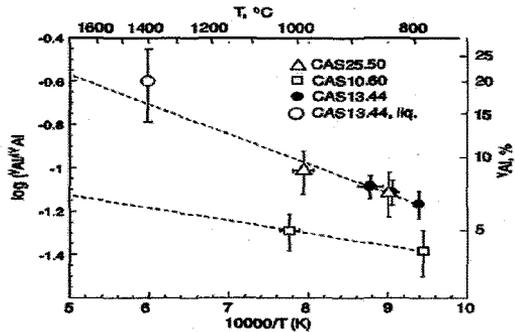


Fig.2 Relationship between the \log_{10} of the $^{[5]}\text{Al}/^{[4]}\text{Al}$ ratio and inverse temperature for the glass and/or melt samples.

文献

- [1] J. F. Stebbins, E. V. Dubinsky, K. Kanehashi, K. E. Kelsey: *Geochim. Cosmochim. Acta*, **72** (2008), 910.
 [2] K. Kanehashi, J. F. Stebbins: *J. Non-Cryst. Solids*, **353** (2007), 4001.

Chemical structure analysis of trace amount of boron in coals

○Takafumi Takahashi, Koji Kanehashi

¹Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation, Shintomi20-1, Futtsu, Japan

Chemical structure analysis of trace amounts of boron (60ppm~120ppm in mass) in coals has been performed by ^{11}B MAS and STMAS. As a result, three structures with isotropic chemical shift (δ_{iso}) of approximately 1ppm, 7ppm, and 14ppm are clearly distinguished. All sites are characterized by quite small quadrupolar products ($P_Q < 0.5\text{MHz}$). These results indicate that boron in coals mainly occurs as four coordinate organo-complexes although the previous studies using solid state NMR suggest that boron occurs as three coordinate species in gangue minerals such as tourmaline and illite. Furthermore, we have proposed structures for the organo-boron complexes which are supported by ^{11}B - ^1H CPMAS experiments.

【緒言】高感度化はNMRにおける大きな課題の一つである。昨年、我々は、四極子核に対する高感度測定法(STMAS)の開発に、日本で初めて成功したことを報告した。今回、この技術をより実用性のあるものに発展させるため、実用材料の一つである石炭へ展開した。

石炭火力発電においては、石炭燃焼後、幾つかの種類のアッシュが生成する。このうち、電気集塵器によって回収される飛灰(フライアッシュ)には、環境負荷元素の1つホウ素が濃集する。ホウ素に対しては、近年、土壌汚染に関する法律、水質汚濁防止法等で、厳しい排出規制が設けられており、適切な溶出防止策が必要とされている。そのため、ホウ素の挙動を包括的に理解することが必要であり、その一環として、燃焼前のホウ素の化学的存在形態を解明することが必要とされている。元素選択性を有する固体NMRは、ホウ素含有相の構造解析を行ううえで有効である。例えば、Kuwabara [1]らは、石炭の ^{11}B MAS NMR スペクトルを取得し、ホウ素の多くは、無機物質(トルマリン、イライト)中に含まれるとした。しかしながら、この場合、観測核の ^{11}B (スピン $I=3/2$)は四極子核であり、一次元スペクトルのみでは、帰属を誤る可能性が高い。ところが、従来のMQMAS法では、微量なホウ素を分析することは困難であった。そこで、より高感度なSTMASによりホウ素の化学的存在形態をより詳細に検討した。

【実験】石炭は、ホウ素濃度 60~120ppm、炭素濃度 70~80%の普遍的に見出される炭種を準備した。試料は、粒子表面に吸着したホウ素の影響を排除するため、マンニトール水溶液(2wt%)で洗浄し、60°Cで乾燥した。NMR スペクトル測定は、JEOL ECA-700(16.4T)、3.2mm用 STMAS プロブを用いて行った。測定中の回転周波数は、MAS コントローラによって $20\text{kHz} \pm 0.003\text{kHz}$ に制御した。STMAS スペクトル測定

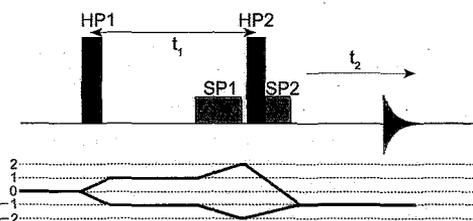


Fig.1. DQF-SPAM pulse sequence for STMAS experiments. The time of t_1 and t_2 was set to 1.6ms and 10.2ms, respectively.

Key words: 微量、ホウ素、STMAS

○たかはし たかふみ、かねはし こうじ

では、試料管の底部約 1/3 に硫酸ナトリウム(Na_2SO_4)、中心部に測定用試料をつめた。 ^{23}Na -STMAS スペクトルを用いて、マジック角を $54.736^\circ \pm 0.002^\circ$ に調整した後、プローブの交換作業を行うことなく、実試料の測定に移行した。実測定において、繰り返し時間は 1 秒とし、 ^{11}B -MAS スペクトルは 18° パルス、 ^{11}B -STMAS スペクトルは、DQF-SPAM パルスシーケンス(Fig.1)を用いて測定した。

【結果および考察】石炭の ^{11}B MAS スペクトルを Fig.2 に示す。この図に示すように、今回測定した石炭は共通して 3 つのサイトを示しており、化学シフトは、0 ppm ~ 15 ppm の広範囲に分布している。これらの特徴は、先行研究[2]で報告された MAS スペクトルの特徴と一致する。そこで、真の化学シフトおよび核四極子結合定数を評価するため、STMAS スペクトルを測定した。その結果、Fig.3 に示すように、3 つのサイトが区別でき、いずれも小さい四極子結合定数を示した(Table 1)。このうち、サイト c は、明らかに 4 配位であり、この帰属は従来のものと一致する。また、残りの 2 つのサイト (a,b) についても、我々は 4 配位に帰属したが、これは従来の解釈とは異なる。4 配位に帰属した理由として、これらのサイト (a,b) の小さい核四極子相互作用は、4 配位構造でのみ説明可能だからである。さらに、化学シフトを考慮することで、4 配位構造の中でも無機化合物型ではなく、有機分子を配位子に持った有機物型であると結論付け、Fig.4 に示す構造を提案した。石炭のマセラル研究では、ホウ素濃度が植物の木質部由来の部分で高いことが報告されており、有機分子型を支持している。また、今回の観測結果は、ホウ素が脈石中ではなく、石炭の炭素骨格中に存在することを示しており、燃焼初期段階でホウ素が放出されることを示唆している。

Table 1. Isotropic chemical shifts δ_{iso} (ppm) and quadrupolar products P_Q (MHz) estimated for three boron sites.

| a | | b | | c | |
|-----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
| δ_{iso} | C_Q | δ_{iso} | C_Q | δ_{iso} | C_Q |
| 0.9 | 0.8 | 8.0 | 0.8 | 15 | 0.7 |

【結言】STMAS を含め固体 NMR を駆使することで、石炭中の微量ホウ素が主に有機型 4 配位構造として存在することを明らかとなった。今後、従来観測不可能であった低濃度元素への STMAS の展開が期待される。

【参考文献】(1) Takahashi *et al.* (2008) *J. Magn. Reson.* **198**:228-235. (2) Kuwabara *et al.* (2007) *J. Jpn. Inst. Energy* **86**:455-461

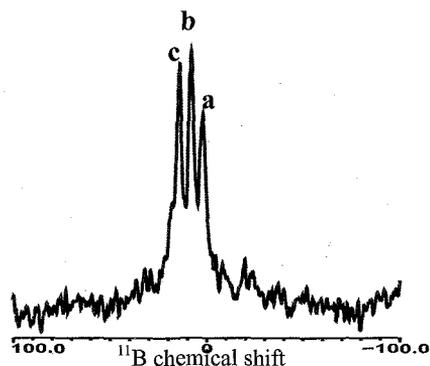


Fig.2. A typical ^{11}B MAS spectrum of coal.

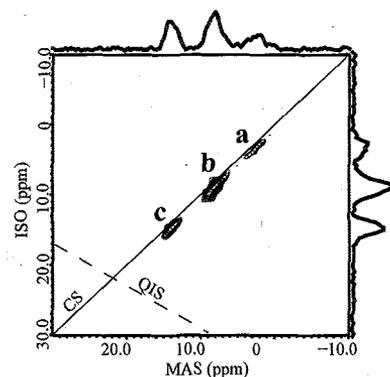


Fig.3. ^{11}B STMAS spectra of coal cited in figure 1.

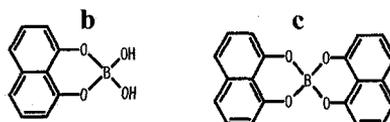


Fig.4. Structures proposed for boron sites (b, c).

高磁場⁴³Ca固体NMRによるカルシウムハイドロシリケートの構造解析

○橋本康博¹, 名雪三依¹, 松野信也¹, 松井久仁雄², 丹所正孝³, 清水禎³

¹旭化成(株)

²旭化成建材(株)

³(独)物質・材料研究機構

Natural-abundance ⁴³Ca solid state NMR study of calcium hydrosilicate

○Yasuhiro Hashimoto¹, Mie Nayuki¹, Shinya Matsuno¹, Kunio Matsui², Masataka Tansho³, Tadashi Shimizu³

¹Asahi kasei Corporation, Shizuoka, Japan.

²Asahi Kasei Construction Materials, Ibaraki, Japan.

³National Institute for Material Science, Ibaraki, Japan.

Tobermorite, a naturally present hydrated calcium silicate, is also hydrothermally produced. Taking advantages of the strength and stability, it is widely used as a binder in cement and concrete materials. However, when used in the construction materials, the crystal structure is gradually altered over a few decades leading to deterioration of the material strength. This may be due to a reaction of the calcium with CO₂ in the air to produce CaCO₃. To investigate the details of the degradation mechanism that still remains unknown, structure analysis means are required. In particular, information of the calcium, aluminum, and boron structure arrangement should be desired. Here we present the application of an ultra-high field 21.8T NMR to obtain natural-abundance solid-state ⁴³Ca, ²⁷Al, and ¹¹B NMR spectrum. Detailed structure information obtained will also be discussed.

【概要】トバモライト(Ca₅Si₆O₁₇・5H₂O)は、Fig.1に示すような、CaOとSiO₂層からなる板状結晶カルシウムハイドロシリケートである。4面体SiO₂の一部のSiがAlで置換されたり、SiO₂層にCa²⁺(H₂O)_nが存在したり、またあるいは、微量にBを含む場合がある。水熱合成により得られ、軽量気泡コンクリート(ALC)などの建築材料の主成分として使用され、高強度、耐

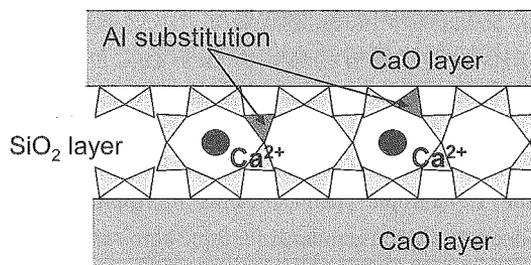


Fig.1 Tobermorite structure.

久性、耐火性、耐水性など優れた性質を有する。さらなる耐久性を目指すときの問題は、トバモライト中のカルシウムが大気中の二酸化炭素と反応して炭酸カルシウムを生成する劣化(炭酸化劣化)である。一方、トバモライトは天然にも産することが知られており、その産状から合成品に比べて炭酸化が起こりにくいと予想される。天然品

カルシウムハイドロシリケート、トバモライト、⁴³CaNMR

○はしもとやすひろ、なゆきみえ、まつのしんや、まついくにお、たんしょまさたか、しみずただし

と合成品の違い、そして炭酸劣化機構を解明することが重要であり、そのために、炭酸化に直接関係するとくにカルシウムの状態評価法が重要である。今回我々は超高磁場21.8T NMR装置で、天然存在比での ^{43}Ca 固体NMR法を試み、さらには ^{27}Al 、および ^{11}B 固体NMR法もあわせて構造情報取得を試みた。

【実験】 ^{43}Ca 、 ^{27}Al 、 ^{11}B 固体NMR測定は、JEOL ECA930 (21.8T) 装置で行った。 ^{43}Ca は1次元single pulse法(積算時間:約50hr、繰返し待ち時間:0.5sec)を、 ^{11}B と ^{27}Al は、さらに3QMAS測定を行った。試料は同位体標識を行わず天然存在比のまま測定を行った。

【結果】Fig.2に、水熱合成品とその炭酸劣化促進試験品の ^{43}Ca 固体NMRスペクトルを示した。 ^{43}Ca は、四極子核で、低周波数核であり、さらには天然存在比が非常に低い(0.135%)が、今回天然存在比のまま良好なスペクトルを得ることができた。今後、天然品、あるいは種々促進劣化品の比較により、炭酸化メカニズム機構解明への貢献が期待できる。

Fig.3に天然トバモライト(千葉県南房総市平久里産)と水熱合成品の ^{27}Al 固体NMRスペクトルを示した。参考のため、9.4T NMR装置(Bruker Biospin DSX400)で測定したデータと比較した。9.4T装置で得られたスペクトルでは4配位Alにショルダーが観測され、両試料の違いはそのショルダーピーク強度比の違いが認められるのみであるが、21.8Tでの測定により、このショルダーピークが明瞭に分離し、さらには天然品と合成品でその化学状態が異なることが明らかになった。発表では、その詳細構造について言及する。

【謝辞】NMR測定に関し多大なご尽力を頂いた日本電子 出口様に感謝いたします。

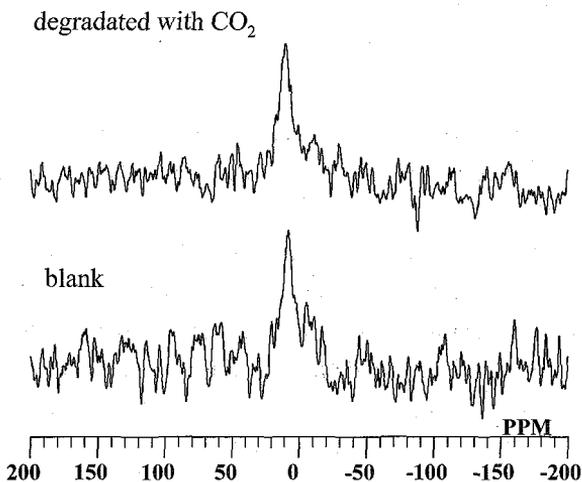


Fig.2 ^{43}Ca solid-state NMR spectrum of synthesized tobermorite.

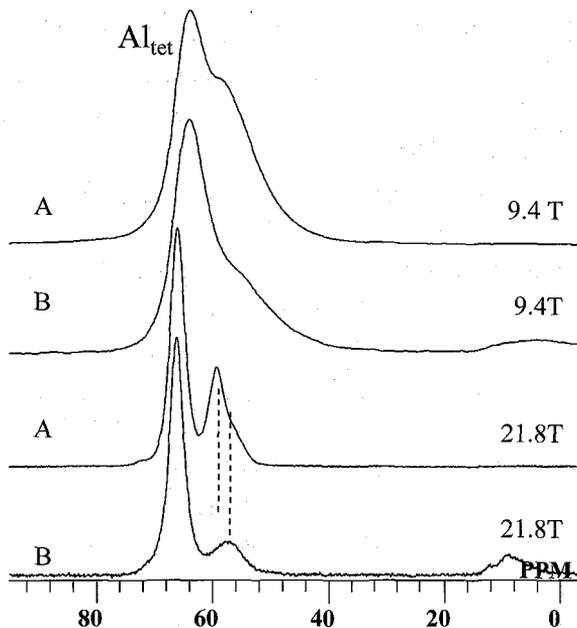


Fig.3 ^{27}Al solid-state NMR spectrum of (A): natural Heguri, and (B):synthesized tobermorite.

P081 混合原子価モリブデン (V, VI) ポリ酸の固体 ^{95}Mo NMR

○飯島隆広¹, 西村勝之¹, 山瀬利博², 丹所正孝³, 清水 禎³

(分子研¹, 東工大², 物材機構³)

Solid state ^{95}Mo NMR of mixed valence polyoxomolybdates(V, VI)

T. Iijima¹, K. Nishimura¹, T. Yamase², M. Tansho³, T. Shimizu³

Institute for Molecular Science¹, Tokyo Institute of Technology², National Institute for Materials Science³

We report solid state NMR of ^{95}Mo NMR of Mo^{V} , $\text{Mo}^{\text{V,VI}}$ and Mo^{VI} species in mixed valence polyoxomolybdates(V, VI) with localized or delocalized d^1 electrons. ^{95}Mo MAS NMR spectra for diamagnetic crystals of $[\text{Me}_3\text{NH}]_6[\text{H}_2\text{Mo}_{12}^{\text{V}}\text{O}_{28}(\text{OH})_{12}(\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3)_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**) and $[\text{NMe}_4]_2[\text{NH}_4]_8[(\text{Mo}_6^{\text{VI}}\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_{23})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**2**) were measured under moderate (9.4 T) and ultrahigh (21.8 T) magnetic fields. Parameters about chemical shift and quadrupole interactions were obtained by simulation of the observed spectra and relativistic density functional theory (DFT) calculations. The isotropic and anisotropic chemical shifts of sites of Mo^{V} in **1** and $\text{Mo}^{\text{V,VI}}$ in **2**, respectively, exhibited absolute values quite larger than those of other Mo^{VI} sites.

【緒言】 近年、NMR用超電導磁石の到達磁場が上昇し、強磁場固体高分解能NMRの測定が可能になってきている。特に半整数スピンの四極子核では、強磁場化により核四極相互作用の二次のシフトが小さくなるためスペクトルの高分解能化が起こり、平衡磁化の増大による感度向上とあまって、これまで困難とされていた核種を用いたNMR構造解析が行えるようになってきている。実際、近年強磁場NMRによる ^{95}Mo 等のいわゆるlow- γ の核の基礎研究が活発になっている。

^{95}Mo NMRはモリブデンの酸化数(Mo^0 - Mo^{VI})により分類できる。溶液NMRでは全ての整数酸化数について ^{95}Mo NMRが報告されており、特に Mo^0 , Mo^{II} , Mo^{VI} の ^{95}Mo NMRは配位化学や反応性の研究で多用されている。一方、固体NMRの研究は多くなく、これまで酸化物や錯体分子の Mo^0 , Mo^{IV} , Mo^{VI} や金属状態の Mo について ^{95}Mo NMR測定が報告されている。

本研究では、混合原子価モリブデン(V, VI)ポリ酸の Mo^{V} , $\text{Mo}^{\text{V,VI}}$, Mo^{VI} の固体 ^{95}Mo NMRを報告する。 Mo^{V} は、 ϵ -Kegginアニオンやリング、チューブ、ボール状のナノサイズのポリ酸などに多く含まれているが、これまで二核または三核錯体について溶液 ^{95}Mo NMRが測定されているのみである。本研究で対象としたのは局在化及び非局在化した d^1 電子を有する反磁性のポリ酸 $[\text{Me}_3\text{NH}]_6[\text{H}_2\text{Mo}_{12}^{\text{V}}\text{O}_{28}(\text{OH})_{12}(\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3)_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**)及び

^{95}Mo , 混合原子価, DFT

○いじま たかひろ、にしむら かつゆき、やませ としひろ、たんしょ まさたか、しみず ただし

$[\text{NMe}_4]_2[\text{NH}_4]_8[(\text{Mo}^{\text{VI}}\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_{23})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**2**) である。9.4 T 及び 21.8 T の強磁場で固体 ^{95}Mo MAS NMR スペクトルを測定し、得られたスペクトルのシミュレーションや相対論的 DFT 計算から局所構造や電子構造を考察した。

【実験】 9.4 T での ^{95}Mo 固体 NMR は Varian Inova 400 分光器を用い、共鳴周波数 26.060 MHz で測定した。21.8 T では JEOL ECA 930 分光器を利用し共鳴周波数 60.572 MHz で ^{95}Mo 固体 NMR 測定を行った。測定は 16 kHz の MAS 及びエコー法で行った。スペクトル・シミュレーションは自作のプログラムを用いて行った。NMR パラメータの DFT 計算は、VWN + BP の汎関数及び triple- ζ レベルの Slater 型基底関数を用い、ADF 2008.01 で行った。

【結果と考察】 Figs. 1(i-a) および 1(ii-a) にそれぞれ、9.4, 21.8 T の磁場で測定した**2**の実測 ^{95}Mo MAS NMR スペクトルを示す。9.4 T のスペクトルは、二次の核四極相互作用や複数のスペクトル成分の重なりのため非常にブロードであったが、21.8 T で測定を行うことによりかなり分解されたスペクトルが得られた。4つの Mo サイトを考慮することにより、これらのスペクトルをシミュレーションできた。その結果を Fig. 1(b) に、また構成成分を Figs. 1(c)-1(f) に示す。

DFT 計算からも 4 つの異なる Mo サイト ($\text{Mo}^{\text{VI}}(1)$, $\text{Mo}^{\text{VI}}(2)$, $\text{Mo}^{\text{VI}}(3)$, $\text{Mo}^{\text{V,VI}}(4)$) の NMR パラメータが得られた。 $[(\text{Mo}_6^{\text{VI}}\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_{23})_2]^{10-}$ ($\{\text{Mo}_{14}\}$) は、 $[\text{Mo}_7^{\text{VI}}\text{O}_{24}]^{6-}$ ($\{\text{Mo}_7\}$) の脱水二量化による光還元種であり、注入された 2 つの電子は μ -oxo 酸素原子を介してつながっている分子中央の 4 つの MoO_6 八面体に非局在化していると考えられている。4 つのサイトのうち $\text{Mo}^{\text{V,VI}}(4)$ がこの中央の 4 つの MoO_6 八面体の Mo であった。 $\text{Mo}^{\text{V,VI}}(4)$ は、光還元前の $\{\text{Mo}_7\}$ では $\text{Mo}^{\text{VI}}(1)$ に相当するが、NMR パラメータは $\text{Mo}^{\text{VI}}(1)$ とは大きく異なっていた。特に等方化学シフトは $\text{Mo}^{\text{VI}}(1)$ では 56 ppm であるのに対し、 $\text{Mo}^{\text{V,VI}}(4)$ は 730 ppm であった。

一方、**1** では d^1 電子は $\text{Mo}^{\text{V}}\text{-Mo}^{\text{V}}$ 結合により局在化している。NMR スペクトルや DFT の結果より、 Mo^{V} と Mo^{VI} の 2 種類の Mo サイトが確認され、 Mo^{V} のサイトの化学シフト異方性の絶対値は極めて大きいことが分かった (-990 ppm)。

1, **2** とも、HOMO を含む高エネルギーの占有軌道は、 Mo^{V} または $\text{Mo}^{\text{V,VI}}$ の 4d 軌道であり、低エネルギーの仮想軌道にもこれらの 4d 軌道が多く含まれていた。大きな化学シフトはこれらの分子軌道間の磁気双極子許容遷移に伴う常磁性項の寄与により生じており、 d^1 電子の局在性にかかわらず、 ^{95}Mo 核は Mo^{V} を含む固体ポリ酸の分子や電子の構造を調べる良いプローブとなることが分かった。

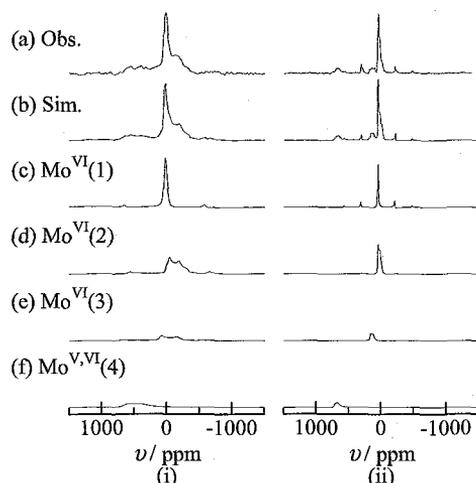


Fig. 1: ^{95}Mo MAS NMR spectra of **2** under (i) 9.4 and (ii) 21.8 T. (a) and (b) show the observed and simulated spectra, respectively. (c-f) denote spectral components constituting the spectrum in (b).

○吉水広明¹・岡澤誠裕¹・奥村祐生¹・傘俊人¹

¹名古屋工業大学・大学院・工学研究科

NMR Characterizations of Gas Diffusion Properties of Polymers

○Hiroaki Yoachimizu¹, Masahiro Okazawa¹, Yuki Okumura¹, Toshihito Karakasa¹

¹ Graduate School of Materials Engineering, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan.

To clarify the gas diffusion behaviors in polymers is important in order to get fine high-performance gas-separation membranes. In this study, the diffusion behaviors of some polymers were investigated by means of various NMR techniques including PFG method. Only single diffusion coefficient of the gas in polyphenylene oxide (PPO) was observed by PFG NMR experiments within several tens ms order, indicating that the averaged value was measured for relatively long observation time. However, the half-width of NMR peak of the gas in PPO decreased with increasing the relaxation-decay time of the order of ms. From these findings, it was pointed out the distribution of gas diffusion in very short time scale. On the other hand, the gas transport properties of crystalline phase of poly(4-methyl-1-pentene) (PMP), and the magnetically oriented structure of liquid crystalline aromatic polyester with n-alkyl side chain (B-C14) membranes were also investigated by some NMR measurements. From the results, the gas transport properties in crystalline phase of PMP, should be explained by free volume fraction and local molecular motions. And the anisotropic diffusion properties of B-C14 have been successfully measured by NMR method.

[緒言] ガスバリア膜や気体分離膜等へ応用できる優れた高分子膜材料を創製する上で、膜材中の気体拡散挙動を詳細に知ることは重要であり、拡散係数の測定方法を検討することもまた大事である。拡散係数測定の従来法には、気体透過や収着実験で得られる平衡値へ到達するまでの経時変化データをFickの拡散方程式で解析して得る方法などが挙げられるが、ガラス状高分子ではこれらの方法は適用できず、その算出は容易ではない。一方、磁場勾配パルス(PFG) NMR法は、拡散分子そのものの並進拡散移動をNMR信号強度の変化に変換し、このデータ解析から自己拡散係数を直接決定する方法であり、拡散特性の複雑な系において有効な一手段である。また、拡散現象に異方性がある場合、従来法では膜試料を作り分ける必要があり、時としてこれがかかなりの困難を伴う。NMR法では同一試料でも気体拡散の異方性の検討が可能であるので、本研究では種々の高分子材料中の気体拡散挙動について、PFG NMR法を適用するとともに、¹²⁹Xe NMR化学シフト値やスペクトル線幅からの検討も試みた。

[実験] ポリ(2,6-ジメチル-1,4-フェニレンオキサイド)(PPO: T_g≒220°C)、及びポリ(4-メチル-1-ペンテン)(PMP)、ピロメリット酸のジアルキルエステル(炭素数14)とビフェノールよりなる全芳香族ポリエステル(B-C14)を試料に用いた。各種気体の自己拡散係数を従来法並びに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(T₂)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。

気体のNMR, 気体輸送特性, 気体拡散係数

○よしみずひろあき, おかざわまさひろ, おくむらゆうき, からかさとしひと

【結果・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相関付けられるので、系の極微小空隙サイズを検討できる。Fickの拡散方程式で完全記述できる液体及びゴム状高分子の系では、系中に溶け込んだ気体の拡散性は系の自由体積の大小で一義的に説明される。従って、Xeの拡散係数は、それが系の自由体積分率と強い相関関係にある ^{129}Xe NMR化学シフト値から見積もれる(Figure 1)。一方、Fickの拡散方程式が適用できないガラス状高分子系では、両者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 2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。横軸は磁場勾配パルスの印加時間 $\delta=1.2\text{ms}$, 拡散時間 $\Delta=400\text{ms}$ の測定条件下で、磁場勾配パルス強度 g を0~1000G/cmまで変化させたときの拡散パラメータであり、このプロットの勾配から自己拡散係数が求まる。Figure 2は単一指教減衰なので、この測定条件下における拡散成分は1成分でしか観察されない。これは、部分不動態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。自己拡散係数が圧力(=濃度)依存性を示すことから支持される。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態化モデルで説明されるのなら、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、その分率は圧力とともに増える。したがって、PPO中を拡散するXeは少なくとも400msの間にHenryと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されず、これが分率に従い増加したと解釈される。一方、スペクトル線幅(FWHM)も濃度依存を示し、そ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。即ち、NMRスペクトルはFIDと呼ばれる時間減衰信号をフーリエ変換して得られるが、本研究で得たFIDは最短でも10数ms間は信号が明瞭に観測されていたので、この時間内で平均化されるほどに両サイト間を速く交換していると仮定すれば、FWHMの濃度依存性が良く説明できた。一方、 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FWHMは減少した(Figure 3)。これは T_2 成分に分布があることを意味しており、数百 μs 以下の拡散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。

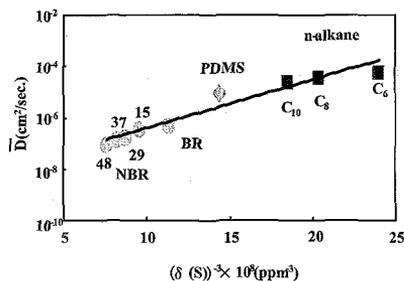


Figure 1 Diffusion coefficient of Xe vs. reciprocal of cubic root of ^{129}Xe NMR chemical shift δ (s).

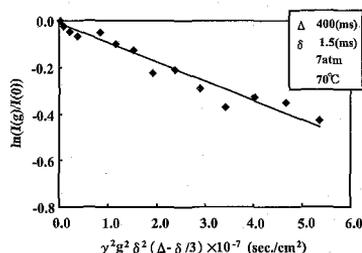


Figure 2 The plots of $\ln [I(g)/I(0)]$ against $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ for the ^{129}Xe in PPO at 70 °C

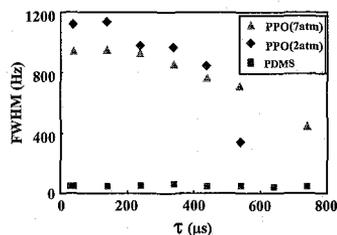


Figure 3 ^{129}Xe NMR peak width of ^{129}Xe in samples against relaxation time at various pressure.

次に、結晶性高分子であるポリ4-メチル-1-ペンテン(PMP)の検討結果について述べる。PMPの結晶形態のひとつである結晶形態I型は7/2ヘリックス構造をとり、正方晶を形成する。このとき嵩高い側鎖を持つことによるパッキングの悪さから結晶相にヘリックス軸に沿った直径約4Åのシリンダー状の空孔ができ、結晶相でも気体分子の収着・拡散・透過が起こりえるという特異的な性質を持つ。本研究では、収着実験並びにNMR法によってPMP膜中の拡散挙動や結晶部の微細構造をより詳しく観察し、結晶相における気体輸送特性の解明の第一歩とした。PMPは、溶融プレス後、急冷又は徐冷して、結晶化度の異なる試料を調製した。得られたサンプルをPMP34, PMP80とする(数字は結晶化度(%)を表す)。各サンプルにおいて室温及び-50°Cまでの低温における気体収着測定をQCM法によって行った。ペネトラントにはXeを用いた。更に各温度にて ^{129}Xe NMR法によって空孔サイズを評価した。X線回折測定より、いずれのPMPも結晶形態I型であると確認された。Xe収着測定の結果より、室温における各サンプルへの収着量等温線はHenry型、低温では二元収着型を示した。またXe NMR法にて得られたスペクトルをFigure 4に示す。-50°Cにおいてはピークの分裂が見られた。これは、収着したXeの結晶相と非晶相の2つの収着サイト間での移動が観測スケールよりも遅くなったためと考えられる。さらに空孔サイズは温度が低下するにつれて大きくなることが分かった。また、 ^1H NMR法によって、25および100°Cにおける各試料中に溶け込んだメタンガスの T_2 を算出した。結果をTable 1に示す。結晶化度が低いほど、また温度が高温のものほど T_2 は長くなった。この結果からも結晶相よりも非晶相の方がペネトラント分子は拡散しやすいということが確認できた。この一因としてペネトラント分子は非晶相中においては3方向に拡散できるのに対し、結晶相では螺旋軸に沿った1方向にしか拡散できないためと考えられる。また膜中の CH_4 のピーク線幅を緩和減衰時間 τ に対してプロットしたところ、いずれの温度、結晶化度においても線幅は τ によらず一定であった。これはペネトラント分子の結晶、非晶間の交換速度が今回の観測スケールである5msよりも十分速いためであると考えられる。

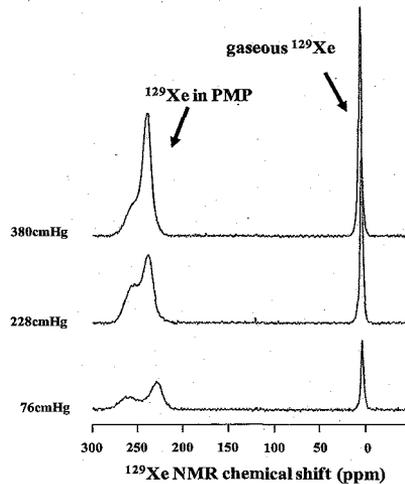


Figure 4 ^{129}Xe NMR spectra of PMP80 at -50°C.

Table 1 T_2 value of CH_4 for PMP at various crystallinity and temperature

| Temperature (°C) | T_2 (ms) | |
|------------------|------------|-------|
| | PMP34 | PMP83 |
| 21 | 2.14 | 2.07 |
| 100 | 2.56 | 2.38 |

最後に、アルキル側鎖を有する液晶性全芳香族ポリエステルB-C14(14は側鎖アルキル側鎖の炭素数)の結果について述べる。B-C14は、1,4-ジアルキルエステルと4,4'-ビフェノールからなり、サーモトロピック液晶性を示す。B-Cnは剛直な芳香族主鎖が並列して板状に凝集し、柔軟なアルキル側鎖部と1分子レベルで交互に配列した層状構造をとる。この構造的特徴を用いることで、物質の選択的な透過、分離を可能とするスマートメンブレンの一提案になると考えている。これまでの研究から、B-Cnの層状構造において比較的小さな各種気体では、側鎖層のみに収着、拡散すること、および、B-Cnは外部磁場を印加すると層状構造が磁場方向に平行配向することが確認されている。本研究では磁場による層状構造の配向条件、並びに配向構造の詳細を調べ、この配向膜の気体輸送特性を拡散係数測定から評価した。はじめにDSC測定を行い、磁場印加の際の温度条件を決定した。熔融プレス法で製膜したB-C14を125°Cに保ち、9.4Tの強さで13時間磁場を印加した。また比較用サンプルに、磁場を印加していない磁場無印加サンプルを用意した。配向の確認はWAXD測定と固体¹³C NMR測定を行って確認した。配向が気体輸送特性に及ぼす影響を検討するため、25°Cでメタン収着測定を重量法により行った。また、拡散の異方性を検討するために、¹H PFG NMR測定を行った。磁場配向するにはある程度の流動性が必要であるため、磁場印加の際の温度条件を、DSC測定の結果より液晶状態であると確認された125°Cとした。WAXD測定の結果、層状構造が膜面に対し垂直な方向に配向していることを確認した。また固体¹³C NMR測定の結果からも同様な結果が得られた。メタン収着測定の結果をTable 2に示す。配向による溶解度係数の変化は見られないが、拡散係数では配向膜で大きな値が得られた。このことから磁場配向による拡散性の向上が確認された。また、¹H PFG NMR測定の結果、磁場勾配パルス照射方向によって異なる拡散係数が得られたことから拡散の異方性を確認することができた。

Table 2 Diffusion and solubility coefficients of CH₄ in B-C14 samples at 25°C and 15.2 cmHg

| sample | $\bar{D} \times 10^8$ (cm ² /sec.) | $S \times 10^2$ (cm ³ STP/cm ³ _{polym.} cmHg) |
|---------------------------|--|---|
| under magnetic field | 21 | 2.4 |
| without magnetic field | 7.5 | 2.4 |

○小林将俊¹, 小森佳彦¹, 藤原敏道²¹住友ゴム工業・研究開発本部²阪大・蛋白研**A study of rubber structure by high-field and high-speed MAS ^1H NMR**○Masatoshi Kobayashi¹, Yoshihiko Komori¹ and Toshimichi Fujiwara²¹R&D HQ, Sumitomo Rubber Industries, Kobe, Japan.²Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Japan.

Solid-state NMR studies for structural analysis of cross-linking point of rubber have been performed with ^{13}C observation because ^1H spectra of rubber are broad and featureless. We performed ^1H NMR experiments under ultra high-field with fast magic-angle spinning to obtain high-resolution ^1H spectra and successfully observed the ^1H signals assigned to cross-linking point in a short experimental time.

Ultra high-field NMR is valuable tool for the structural analysis of soft materials like rubber.

【背景と目的】

タイヤを始めとするゴム材料の物性発現には、ナノレベル、分子レベルの構造制御が必要である。ゴムは高分子を硫黄などで架橋して作られ、その架橋構造はゴムの力学物性や耐久性に重要である。

これまでゴムの架橋構造解析は固体 ^{13}C MAS NMRが主であった。本来 ^1H 信号は ^{13}C 信号に比べ400倍感度が良く、高分解能 ^1H スペクトルが得られれば、短時間で架橋構造情報が得られる。しかし溶媒に不溶な一般のゴムに対して ^1H NMR測定は架橋構造解析に有効な役割を果たしてきたとは言えなかった。それは、溶媒に不溶な架橋ゴムは分子運動が束縛されており、主に ^1H - ^1H の双極子-双極子相互作用により、スペクトルがブロードニングし、架橋に由来する微小な信号が観測しづらくなるからである。これらを克服する手法として、超高磁場NMRの利用による化学シフトの分離と、高速MASによる双極子相互作用の低減が挙げられる。

これらの背景をもとに、700MHzあるいは920MHzの高磁場NMRと高速MASの組み合わせによる ^1H MAS NMR測定を行い、架橋に由来する信号を高い分解能で得ることを目的とした。

【実験】

試料はポリイソプレンに架橋剤である硫黄、加硫促進剤、促進助剤を加え、練りプロセスにより均一に分散させた後、150°Cでプレス加硫したゴムシートである。固体 ^1H MAS NMR測定は超高磁場(21.6T)の920MHz NMR分光器(JEOL ECA920)、および700MHz NMR分光器(Varian Infinity-plus 700)を用いた。MAS周波数は、試料管(ローター)外径4.0mm ϕ および2.5mm ϕ について、それぞれ14-17kHz、25kHzで測定を行った。積算回数は256回で、20分程度で一つのスペクトルを得た。

ゴム, 高磁場固体NMR, 高速MAS

○こばやしまさとし, こもりよしひこ, ふじわらとしみち

【結果】

図1に920MHz NMRによるMAS 17kHz条件下での¹H MAS NMRスペクトルを示した。ポリイソプレン由来のメチル、メチレン、メチンの水素が強い強度で観測された。920 MHz NMRの¹Hスペクトルは400-500MHz NMRのスペクトルに比べ、高い分解能であった。またMAS速度依存性を調べたところ、12kHzよりも17kHzで若干分解能は向上していた。以上より、¹Hスペクトルの線幅の原因として、化学シフトの分散と双極子相互作用の両方が考えられた。ゴムはNMRから見ると液体と固体の中間の性質を持ち、高磁場で高速MASを実施することで、分解能の高い¹H NMRスペクトルが得られる。

モデル化合物の溶液NMR解析より架橋に由来する信号の化学シフトがわかっており¹⁾、これに対応する信号が加硫ゴムにおいても観測された(図1スペクトル上の矢印で示した)。これらの信号強度は加硫反応時間により変化した。このうち3.5、4.05ppmの信号強度は異なる化学構造に由来する架橋点であるが、加硫時間に対してピークの出現の仕方が異なった。ピーク分離により強度を見積もったところ、架橋構造によりその生成速度が異なることがわかった。

これは¹H核観測による高い感度と、高い分解能を有する超高磁場固体NMRにより可能になったものである。

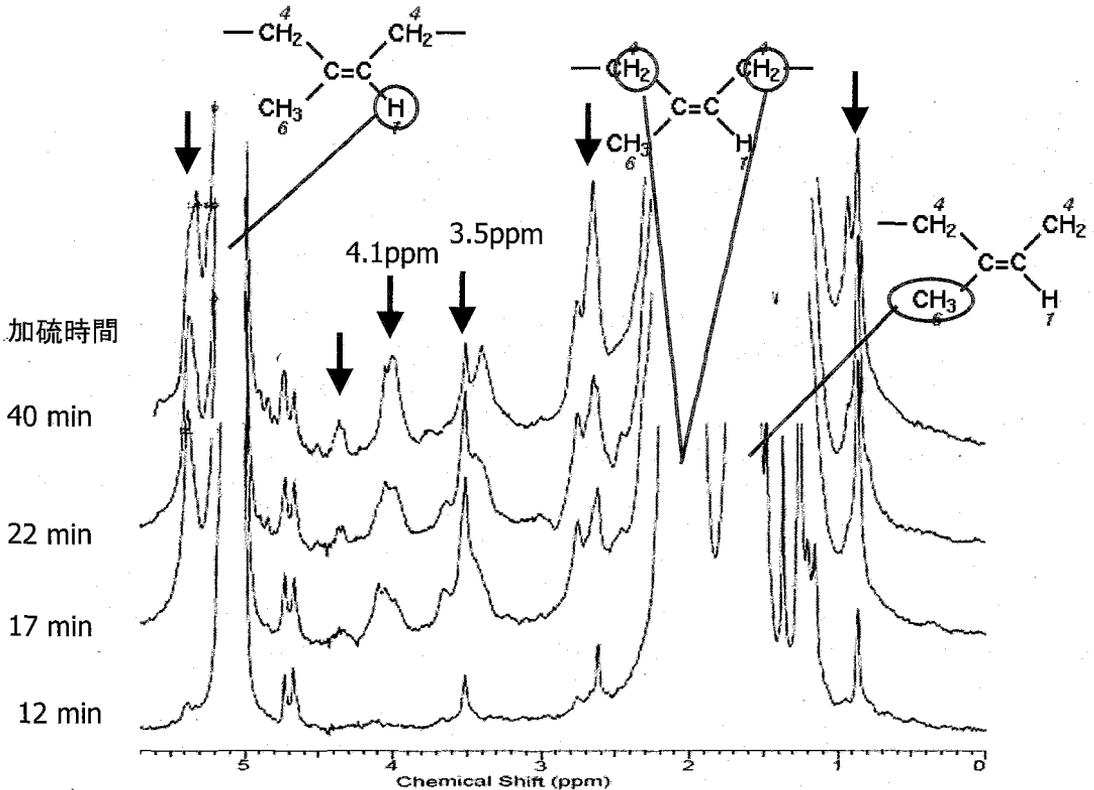


Fig. 1. ¹H NMR spectra of poly(isoprene) rubber depending on cure time observed at ultra high-field (21.6T) with 17kHz MAS. Arrows indicate signals due to cross-linking, the assignment of which is based on solution NMR study of model compound¹⁾.

【文献】

1) Y. Komori, R. Tokimune and M. Sugiura, Paper 104A presented at the 172nd Technical meeting of the Rubber Division of American Chemical Society, Cleveland, OH, October 16-18, 2007.

**^{129}Xe NMR によるゼオライトの吸着特性評価。
銀ゼオライトについて**

佐治修吾、河田陽子、今井宏彦、木村敦臣、○藤原英明
大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻

Adsorption profiles of Silber Zeolite studied by ^{129}Xe NMR

Shugo Saji, Yoko Kawata, Hirohiko Imai, Atuomi Kimura, ○Hideaki Fujiwara
Division of Health Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University

The ^{129}Xe NMR adsorption isotherms were measured with a silver zeolite and analyzed based on the Dubinin-Radushkevich equation. The signal intensity isotherms were measured and analyzed simultaneously with the chemical shift isotherms. The pressure range changed was between 0.01 and 1.5 atm, and hence adsorption profiles at lower pressure, weak adsorption, may be reflected in the results. The silver zeolite showed strong adsorption energy and smaller adsorption area compared to a potassium zeolite, which may be interpreted to reflect larger Si/Al ratio and smaller ionic radius of Ag.

背景

銀ゼオライトは原子力産業で放射性ヨウ素の吸着回収や大気中微粒子の除去に使用される特徴あるゼオライトである。このゼオライトに含まれる銀の役割を明らかにすべく、 ^{129}Xe NMR による吸着実験を行った。基本手法はこれまで報告してきた我々の開発した方法を利用した（第 47 回 NMR 討論会、要旨集 p.296）。¹⁾

実験

銀ゼオライトとして HALOSORB-II を選び（株）東ソー製、銀を含まない通常のゼオライト HALOSORB-I と比較した。Si/Al 比は前者が 21、後者は 5.1 である。前処理として NMR サンプルチューブ(10φ)に詰め、 10^{-5} torr 以下の高真空下で、室温で 10 分間脱気した後、393 K まで $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 程度の速度でゆっくりと温度を上昇させ、393 K に達したところでそのまま 5 時間保持した。その後室温まで戻し、空気にさらすことなくマグネット内にセットした。Xe 供給システムを用いてサンプルチューブに Xe ガスを所定圧まで供給し、圧力が一定になるまで 1～2 分待った後に NMR を測定した。

測定に用いた NMR 装置は Varian Unity-INOVA (9.4 T) である。 ^{129}Xe の周波数は 110.6 MHz である。Xe ガス圧を 0.01 から 1.5 気圧の範囲で変え ^{129}Xe 化学シフトと信号強度（ピーク面積）の圧力依存性を測定した（測定温度は 298K）。

結果・考察

^{129}Xe 化学シフトと信号強度の測定結果と解析結果をまとめて図 1 に示した。吸着等温線の形から、HALOSORB-II の方が吸着が強いことが認められる（図 1）。

キーワード： ^{129}Xe NMR、ゼオライト、吸着

著者ふりがな：さじ しゅうご、かわた ようこ、いまい ひろひこ
きむら あつおみ、ふじわら ひであき

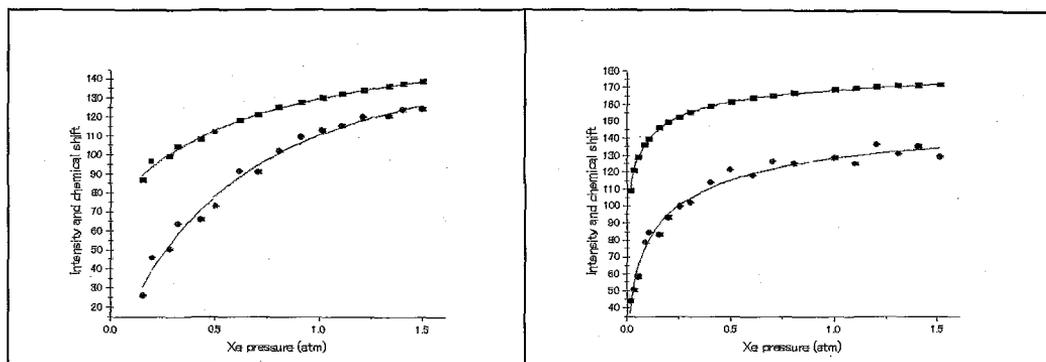


Fig.1 Observed and simulated ^{129}Xe NMR chemical shift(■, upper curve) and signal intensity(●, lower curve) for the samples of HALOSORB-I(left) and HALOSORB-II(right).

表1 HALOSORB-I及びHALOSORB-IIのDR解析(298K)

| | sample | HALOSORB-I (K型) | HALOSORB-II (Ag型) |
|--|----------------------------|------------------|-------------------|
| Data Source: Signal Intensity and Chemical Shift | q_{st} kJ/mol | 18.98 ± 0.56 | 25.74 ± 1.12 |
| | P_{eq} atm | 3.64 ± 1.10 | 6.11 ± 3.35 |
| | δs ppm | 74.44 ± 6.84 | 83.41 ± 6.53 |
| | W_{a0} (S.I.) g/g | 0.193 | 0.075 |
| | SA(S.I.) m ² /g | 205 | 80 |
| | W_{a0} (C.S.) g/g | 0.196 | 0.076 |
| | SA(C.S.) m ² /g | 209 | 81 |

W_{a0} : 細孔が満たされた時の全細孔容積(S.I.は信号強度から導かれる値、C.S.は化学シフトデータから導かれる値)

SA: 吸着表面積、 P_{eq} : 見かけの飽和蒸気圧、 q_{st} : 等比体積吸着熱 ($\Delta H_v + \beta E_0$)
 ΔH_v : Xeの沸点における蒸発エンタルピー (12.6kJ/mol)、 βE_0 : 有効吸着ポテンシャルエネルギー、 δs : 圧力ゼロへの外挿化学シフト

図1の測定データをDubininRadushkevich(DR)式に基づいて解析した結果を図1の中の曲線で示し、得られた数値を表1にまとめた。ここでは、前回同様、化学シフトと信号強度を別々に解析すると結果の乖離が問題となり、両者の同時解析でのみ妥当な値が得られることを確かめた。表1の値では、 q_{st} がAg型では約6kJ/molだけ大きく、Ag型の方が吸着が強いことを確認した。これは、Si/Al比が大きくなり表面の疎水性が上がるとXeの吸着エネルギーが下がると言う前回の傾向と同じであった。吸着表面積は吸着エネルギーと逆の傾向を示す点も前回と同様であったが、銀ゼオライトの吸着表面積の減少は顕著であった。これは細孔入口付近でAgの吸着が強く、それ以上の吸着を阻害する効果を示唆した。より高压での同様な吸着特性の比較がこれらの点を明らかにする上で非常に興味を持たれる。²⁾

文献

- 1) Y.Kawata, Y.Adachi, S.Haga, J.Fukutomi, H.Imai, A.Kimura and H.Fujiwara, *Anal.Sci.*, (2007) 23, 1397-1402.
- 2) 佐治修吾, 修士論文 (大阪大学, 2009年3月).

P085 水素貯蔵材料 $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の熱分解における構造変化：
固体 NMR による評価

小野泰輔, ○下田景士, 坪田雅己, 小島健一, 市川貴之, 小島由継
広島大先進機能物質研究センター

Structural changes on hydrogen storage material $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ by thermal decomposition: NMR study

Taisuke Ono, ○Keiji Shimoda, Masami Tsubota, Ken-ichi Kojima, Takayuki Ichikawa,
Yoshitugu Kojima.
IAMR, Hiroshima University, Japan.

A composite of $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ and LiH releases H_2 gas of 6.1 wt% below 130 °C. Here, we have investigated the thermal decomposition of the hydrogen storage material $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ by using thermogravimetry-mass spectroscopy (TG-MS), synchrotron X-ray diffraction (XRD), ^6Li , ^{15}N , ^{27}Al MAS, and ^{27}Al 3QMAS NMR techniques.

The XRD and ^{27}Al MAS NMR spectra indicated that $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ decomposed into amorphous phase with NH_3 desorption above 135 °C. The present study contradicts the decomposition path proposed previously, based on the multinuclear solid state NMR that clarified the detailed local structure of the amorphous phase.

導入

地球温暖化を促進し、かつ枯渇が迫っている化石燃料の代替として、水素と電力をベースとしたクリーンなエネルギー社会の構築が今日注目されている。水素エネルギー活用の実現化を考える上で、軽量・高容量かつ容易に水素を取り出せる水素貯蔵材料の開発が重要な課題となる。そのため近年では、軽元素を用いた水素貯蔵材料の開発が盛んに行われているが、大半の材料は水素放出温度が 200°C 以上であるか、水素貯蔵容量が 5 wt% 以下であり実用化の条件を満たしていない。

リチウムアルミニウムアミド ($\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$) は、リチウム水素化物 (LiH) との複合化によって 130°C という低温で 6.1 wt% という多量の水素を放出し、高容量水素貯蔵材料として実用化が期待される材料である。一方、 $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ 単体での熱分解機構は分解過程で非晶質化するため未だ不明であり、幾つかの反応モデルが提案されている[1-3]。そこで我々は $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の反応機構解明への第一歩として、固体 NMR を用いて分解過程での構造変化を調査し、提案されている反応モデルの検証を行った。

実験

市販の粉末 LiH (99.5 %, シグマ・アルドリッチ) と粉末 Al (99.9 %, レアメタリック) を秤量し、1:1 のモル比で混合した。これらを、ジルコニアボール (ϕ 8 mm) と共にクロム鋼製リング容器に入れて密閉後、ドライアイスエタノールを用いて冷却しながらアンモニアガス圧をかけて、液体アンモニアを導入した。その後、振動型リング装置で 8 時間のリング処理を施した後に、1 週間保持することで試料を作製した。

Keywords: ^6Li , ^{15}N , ^{27}Al , 3QMAS, hydrogen storage material

おのたいすけ, ○しもだけいじ, つぼたまさみ, こじまけんいち, いちかわたかゆき, こじまよしつぐ

熱重量及び昇温脱離質量数分析(TG-MS)は空気非接触環境下で行った。X線回折はキャピラリーに封入した熱処理試料(75–300°C)を用いて SPring-8 (BL02B2 ライン)にて行われた。

$^{6,7}\text{Li}$, ^{27}Al MAS NMR 測定は JNM-ECA600 (14.1 T)で行われた。 ^{15}N , ^{27}Al MAS 及び ^{27}Al 3QMAS 測定は物質材料研究機構所有の JNM-ECA930 (21.8 T)で行われた。全ての測定は 15 kHz で MAS 回転させて行った。

結果と考察

$\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ は 135°C 以上で熱分解し、 NH_3 ガスを放出する。300°C まで昇温した際の重量減少は 39.1 wt% となった。RT から 105°C までの X 線回折パターンに変化が見られなかったが、120°C 以上で回折ピークの消失が観察された。このことは、 NH_3 の放出に伴ってアモルファス化することを示しており、既報の反応モデルに現れる AlN , LiNH_2 , Li_3AlN_2 等の結晶回折ピークは検出されなかった。従って、NMR を用いてアモルファス相の解析を試みた。

熱処理した $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ 試料の ^{27}Al MAS スペクトルを Fig.1 に示す。120°C までは 121 ppm 付近のシグナルに大きな変化は見られない。しかし、135°C においては、114 ppm 付近に新たなシグナルの出現が見られた。150°C においては、RT から存在していた 121 ppm 付近のシグナルが消失し、115 ppm のシグナルのみになっている。150°C 以上では、徐々にブロードニングしながら高磁場側にシフトし、300°C においては約 113 ppm という値をとった。上述の分解反応モデルで提案されている AlN , Li_3AlN_2 の化学シフトは 112 ppm 及び 114 ppm であり、 ^{27}Al MAS スペクトルでは AlN あるいは Li_3AlN_2 状アモルファス物質の有無ははっきりしない。一方、 ^6Li MAS スペクトルから、分解過程における Li 局所構造は Li_3AlN_2 の Li とは異なると結論付けられた。 $^{6,7}\text{Li}$, ^{15}N MAS 及び ^{27}Al 3QMAS スペクトルの結果及び考察はポスター紙上にて発表する。

本研究は NEDO の助成下で行われている。930 MHz マグネット使用許可に関して、物質材料研究機構の清水・丹所両先生に感謝します。

参照

- [1] Rouxel&Brec (1966), *C.R. Acad. Sci. Paris C* **262**, 1071.
- [2] Jacobs&Jänichen (1985), *Anorg. Allg. Chem.* **531**, 125.
- [3] Janot (2007), *J. Phys. Chem. C* **111**, 2335.

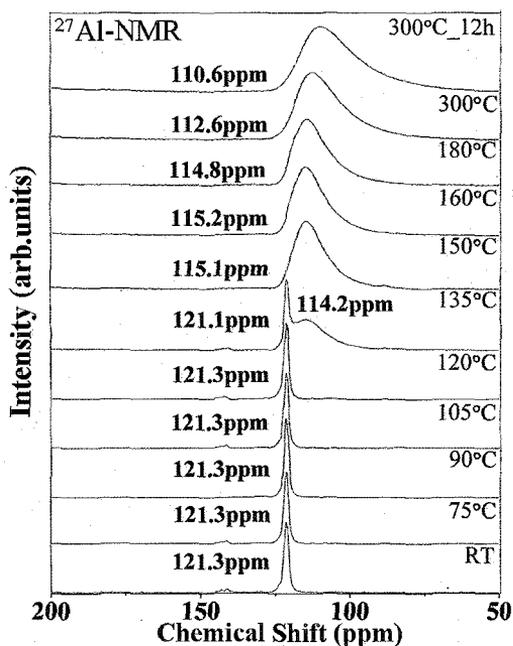


Fig.1 ^{27}Al MAS spectra of $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ recovered from different temperatures at 14.1 T.

P086 高圧リフォールディングによるタンパク質立体構造解析試料の調製法

○小椋賢治, 斎尾智英, 小橋川敬博, 稲垣冬彦
(北大院薬)

Hydrostatic pressure refolding from inclusion bodies for protein structural study

Kenji Ogura, Tomohide Saio, Yoshihiro Kobashigawa, and Fuyuhiko Inagaki

Grad. Sch. Pharm. Sci., Hokkaido University

Recently, it has been reported that overexpressed protein forming inclusion bodies in *E. coli* expression systems are solubilized and refolded by hydrostatic pressure. The aim of this study is to prove the pressure-refolding very effective for structural biology by NMR analysis. Inclusion bodies containing the following overexpressed protein: MOE2 Zn-finger, ZIP PB1, and mTOR FRB were solubilized by max. 250 MPa hydrostatic pressure for 16 h. The solubilized protein samples were purified by affinity and size-exclusion chromatography. NMR-based structural analysis showed that the solubilized proteins formed the same folding with the samples from soluble fractions.

【序論】大腸菌発現系において封入体を形成したタンパク質を可溶化するためには、尿素などの変性剤による巻き戻しおよびアルギニン添加が広く用いられている。最近、静水圧によりタンパク質が可溶化できることが示されているが(1)、立体構造解析に応用されたのは一例のみである(2)。本研究の目的は、静水圧により封入体から可溶化したタンパク質の立体構造を NMR により解析することにより、立体構造研究のための試料調製法としての本手法の有用性およびその至適条件を提示することである。

【実験】Histag-GB1 融合タンパク質 (MOE2 tandem Zn-finger ドメインおよび mTOR FRB ドメイン) および GST 融合タンパク質 (ZIP PB1 ドメイン) を含む封入体を各種緩衝液に懸濁し、Barofold 社 M150 型圧力装置を用いて最大 250 MPa, 16 時間、室温にて静水圧を加え、可溶化した。加圧後試料を遠心した上清を各種クロマトグラフィーにより目的タンパク質を精製し、NMR スペクトルを測定、立体構造を評価・解析した。

圧力, リフォールディング, タンパク質立体構造解析

○おぐらけんじ, さいおともひで, こばしがわよしひろ, いながきふゆひこ

【結果】 Histag 融合 MOE2 tandem Zn-finger ドメインは、全量が不溶性画分として発現した。封入体を各種緩衝液に懸濁し、200 MPa で 16 h 加圧したところ、50 μ M ZnSO₄ および 20 μ M β -メルカプトエタノールを含む pH8 の緩衝液条件にてもっとも可溶化された。Ni-NTA 樹脂アフィニティー精製ののち、融合タグ切除およびゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製試料を得た。三重共鳴多次元 NMR 法により本試料の立体構造を決定し、他の C2H2 型 Zn-finger と類似の立体構造を形成していることを確認した。

GST 融合 ZIP PB1 ドメインは、可溶性と不溶性の発現割合がほぼ等量であった。不溶性画分は、10 mM DTT を含む pH8 の緩衝液条件にてもっとも可溶化された。Glutathione-Sepharose 4B 樹脂アフィニティー精製ののち、融合タグ切除およびゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製試料を得た。NMR 測定をおこない、可溶性画分由来の精製試料の NMR スペクトルと比較したところ、両スペクトルは一致したため、圧力により可溶化した ZIP PB1 ドメインは正しい立体構造を有していることを確認した。

Histag-GB1 融合 mTOR FRB ドメインは、全量が不溶性画分として発現した。不溶性画分は、20 μ M β -メルカプトエタノールを含む pH8 の緩衝液条件にてもっとも可溶化された。Ni-NTA 樹脂アフィニティー精製ののち、融合タグ切除およびゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製試料を得た。NMR 測定をおこない、高次構造の存在を確認した。本ドメインの認識標的物質である rapamycin を滴定した際の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの摂動により、標的結合部位を同定した。その部位は文献データと一致したので、本タンパク質が天然状態と同じ標的認識機能を有していることが確認された。

【結論】 静水圧により可溶化したタンパク質は、NMR スペクトル測定および立体構造解析により、天然状態と同じ立体構造を保持していることが確認された。本手法は、構造生物学のための試料調製法として有効であり、特に GST 融合タンパク質についてはこれまで有効な可溶化法が提案されておらず、本手法の意義は大きいと考えられる。

【文献】

- (1) Qoronfle MW, Hesterberg LK, Seefeldt MB, Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. *Protein Expr Purif.* 2007 Oct;55(2):209-24.
- (2) Shieh HS, Mathis KJ, Williams JM, Hills RL, Wiese JF, Benson TE, Kiefer JR, Marino MH, Carroll JN, Leone JW, Malfait AM, Arner EC, Tortorella MD, Tomasselli A, High resolution crystal structure of the catalytic domain of ADAMTS-5 (aggrecanase-2). *J Biol Chem.* 2008 Jan 18;283(3):1501-7.

NMRを利用して有機化合物を定量する場合の解析条件が 定量値に与える影響に関する考察

○三浦亨¹、齋藤剛¹、井原俊英¹、小池昌義¹、前田恒昭¹、杉本直樹²、
多田敦子²、西村哲治²、有福和紀³、末松孝子³、山田裕子⁴、
吉田雄一⁴

¹ (独) 産業技術総合研究所 計測標準研究部門、² 国立医薬品食品衛生研究所、³ 日本電子株式会社、⁴ 和光純薬工業株式会社

Determination of NMR process parameter sets which give accurate results in quantitation of organic compounds

○Toru MIURA¹, Takeshi SAITO¹, Toshihide IHARA¹, Masayoshi Koike¹, Tsuneaki MAEDA¹, Naoki SUGIMOTO², Atsuko TADA², Tetsuji NISHIMURA², Kazunori ARIFUKU³, Takako SUEMATSU³, Yuuko YAMADA⁴, Yuuichi YOSHIDA⁴

¹National Metrology Institute of Japan, AIST, ²National Institute of Health Sciences, ³JEOL Ltd., ⁴Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Abstract

Quantification using NMR is one of the attractive methods for purity determination of organic compounds. We have determined parameter sets for spectral acquisition and their associated uncertainties for the quantification. Here, determination of process parameters, phase correction, baseline correction, and peak integration range, is discussed. We found that manually phase corrected data did not give much influence on the purity. Baseline correction was important for our data because of the back ground broad peak. Baseline correction influenced the peak area and its range of integration. Peak areas with baseline corrected properly became constant as integrating range reached as wide as ¹³C satellite peaks; while the area kept increasing when baseline was not constructed by the correction. For accurate purity determination, area integrations needed to be wider than the ¹³C satellite positions.

【緒言】

有機化合物の定量にはクロマトグラフ法が利用されることが多い。この手法で正確かつ精密（以下、精確）な定量値を得るためには、測定対象と同一の化合物を標準として検量線を作成することが必要となるが、すべての標準が整備されているわけではないという問題を抱えている。一方、¹H NMRによる定量法は、原理的にピーク面積が、共鳴している核の数に比例することから、異なる化学シフトにピークをもつ別の化学物質（内標準物質）を標準として用いることで目的の化学物質の量を測ることが可能な方法であり¹⁾、一つの標準で、多くの化合物に対して定量値を得ることが期待され

キーワード：定量NMR, 化学純度, 計量標準

著者ふりがな：○みうらとおる、さいとうたけし、いはらとしひで、こいけまさよし、
まえだつねあき、すぎもとなおき、ただあつこ、にしむらてつじ、ありふくかずのり、す
えまつたかこ、やまだゆうこ、よしだゆういち

る。そこで、演者らはクロマトグラフ法に匹敵する2~3%程度の不確かさ(ばらつき)での定量を目標に設定し、測定条件および解析条件の最適化を行っている。これまでの検討で、測定条件における最適化を行い、定量値に影響を与える要因を確認したことから²⁾、今回は解析条件における最適化を試みた。

【方法】

Table 1に最適化を行った測定条件と現在の解析条件を示した。解析に利用したスペクトルのシグナル-ノイズ比は、ノイズ範囲を1 ppmとした場合、各ピークの信号強度に依存するが、概ね1000から70 000の範囲であった。解析条件で今回は、ベースライン補正 (baseline correction)、位相補正 (phase correction)、積分区間 (integration) がピーク面積およびそのばらつきに与える影響について、数値的に評価を行った。NMR測定はVARIAN社製 ^{Unity} INOVA 600Aで行い、得られたデータを主にACD社 ACD/SpecManagerで解析した。試料には和光純薬農薬標準品を用いた。また、内標準物質には14BTMSbd4 (1,4-bis(trimethylsilyl) benzene-*d*₄) などを用いた。試料及び内標準物質をdichloromethane-*d*₂などで溶液としたものを試料溶液とした。

Table 1. Typical NMR measurement and process parameter sets used in this work.

| Measurement conditions | | Process conditions | |
|------------------------|--------------------------------------|---------------------|--------|
| nucleus | ¹ H (599.90 MHz) | window function | off |
| spectral width | 59970.02 Hz | phase correction | manual |
| acquisition time | 4 s | baseline correction | on |
| number of transients | 32 | integration | manual |
| pulse width | 11 us ($\pi/2$) | | |
| decouple | ¹³ C (acquisition period) | | |
| relaxation delay | 60 s | | |
| temperature | 25 °C | | |

【結果・考察】

・ 位相補正の影響

マニュアルで位相補正を行い最適と判断した位相を基準に、0次項と1次項を一定間隔で変化させたときの位相の変化が、ピーク面積(絶対値)に与える影響を、得られたスペクトルにおける複数のピークについて調べた。

0次項および1次項ともに基準から $\pm 3^\circ$ の範囲では、得られたピーク面積の相対標準偏差は0.5%以下となった。Figure 1(b)に示したように、位相の1次項が約 2° ずれた場合には位相補正が正しく行われていないが、このような場合でもピーク面積には大きな影響を与えないことが分かった。さらに、基準からの位相のずれが 10° になると、2%を超えるピーク面積への影響が見られた。

一方、位相条件がランダムに設定されたスペクトルに対して、マニュアルで繰り返し10回の位相補正を行った場合の再現性は0次項および1次項ともに 1° 以下であった。したがって、マニュアルで位相補正を行った場合、ピーク面積への影響は0.5%以下であることが確かめられた。さらに、自動位相補正ではフーリエ変換後の位相条件が異なる場合でも同じスペクトルに対しては全く同じ位相を与えたが、スペクトルによっては目視で明らかな位相のずれがある場合が見られた。したがって、自動位相補正

を行う場合は、得られるピーク面積への影響について十分に確認する必要があると思われる。

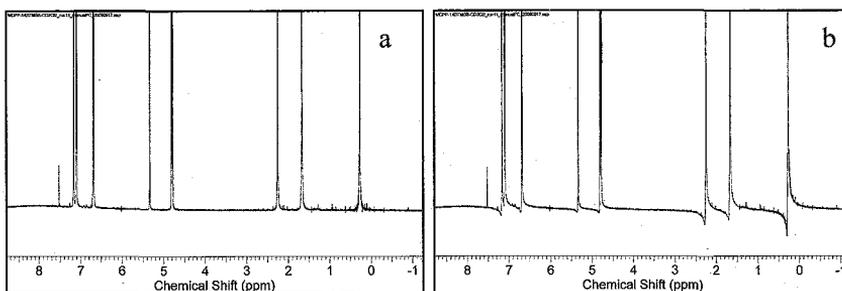


Figure 1. ^1H NMR spectra of MCPP. The phase setting of the spectrum a) was manually optimized, while first order term in spectrum b) was off by 2° .

・ ベースライン補正の影響

ベースライン補正前後のスペクトルをFigure 2に示した。測定においては定量性確保の観点からオーディオフィルターがフラットな帯域を確保するため、測定スペクトル幅を約100 ppmと非常に広くとっている。ベースライン補正をしなかった場合 (Figure 2(a)) は、バックグラウンドの影響 (ベースラインのゆがみ) が非常に大きかった。これが測定対象ピークの面積に影響を及ぼしている可能性が高いと考えられるので、Figure 2に示した補正条件で以下の評価を行った。まず、同じ試料について繰り返し測定を行った場合の同一ピークについてピーク面積の繰り返し性を評価した。その結果、面積のばらつき大きさは、ベースライン補正の有無によらず変化しなかった。

一方、同じスペクトル内の複数ピークについて相対面積比を比較したところ、ベースライン補正をした場合の方が、しない場合に比べてピーク面積比が ^1H 数に比例することが確認された。これはベースライン補正によるバックグラウンド除去の効果と考えられ、相対面積比に関してはベースライン補正の有効性が確認された。

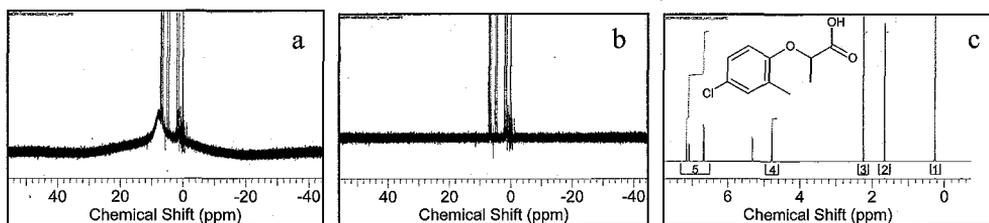


Figure 2. ^1H NMR spectra of MCPP; (a) baseline correction was not applied, (b) baseline correction was applied by Spectrum Averaging (box half width = 200, noise factor = 2) of ACD/SpecManager, and (c) expansion of the spectrum (b) between -1 ppm and 7.5 ppm, structure of MCPP, and area numbers which are shown above the chemical shift scale.

・ 積分区間の影響

積分区間に関しては、マニュアルで位相補正しベースライン補正をしたスペクトルについて検討を行った。積分区間の設定方法として、ここでは ^{13}C サテライトピークまでの区間を積分することを基準とし、これによって得たピーク面積を1に規格化し

て相対的に評価した。Figure 3に示した例のように、基準とした積分区間を中心に10 Hzずつずらして積分を行い、得られたピーク面積をプロットした結果をFigure 4に示した。ここでのPeak番号はFigure 2 (c) に示した積分区間に対応し、Peak 1は基準物質である14BTMSBd4の信号である。なお本評価に用いたスペクトルは ^{13}C デカップルを行っているので、 ^{13}C サテライトピークは現れない。

ピーク面積は積分区間を拡大するとともに徐々に増加し、ピーク4、5に関しては基準よりも広い区間でほぼ平衡化した。しかし、ピーク1、2、3については平衡化することなく積分区間が広がるほど増加する傾向が続いた。両者の差はベースライン補正が原因であった。すなわち、前者はベースライン補正により近傍のベースラインがよりフラットになったため、ピーク面積がほぼ一定になったのに対して、後者はピークが比較的込み入った部分であるために、今回利用した補正条件では、これらのピークの近傍については補正が適切に行われていなかった。一方、基準とした積分区間よりも狭い場合は、いずれのピークにおいても明らかに面積を過小評価しているため、 ^{13}C サテライトの内側の領域では精確なピーク面積を得られないことが判った。

現時点で積分区間の最適条件を示すのは困難だが、基準の外側30 Hzで積分することで、得られる面積のばらつきは比較的小さくなり、その不確かさは0.2%と見積もられた。

【まとめ】

これまで解析条件に関する不確かさは数値化されていなかったが、解析条件の中で大きな不確かさ要因と考えられるものについて、その評価方法と不確かさをある程度確認することができた。引き続き検討を行い、より精確な定量値が得られるように解析条件の最適化を進め、発表時には、本要旨記載事項についてさらに詳細に報告する。

【参考文献】

- 1) T. Ihara, T. Saito, and N. Sugimoto, *Synthesiology* 2 (2009) 12-22.
- 2) T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura, and T. Maeda, *Metrologia* 41 (2004) 213-218.

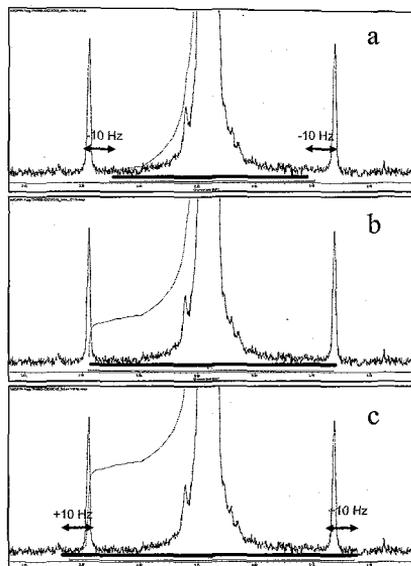


Figure 3. Schematic illustration of integration intervals used in this work; (a) -10 Hz, (b) standard interval, and (c) +10Hz.

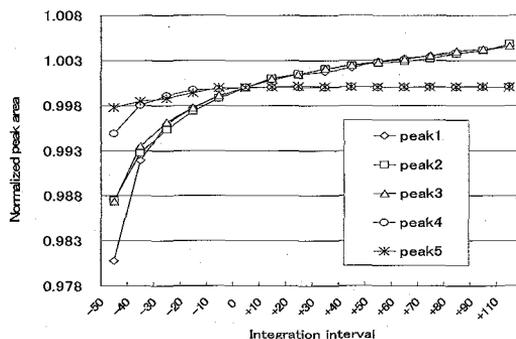


Figure 4. Relationship between peak area and its interval of integration. Peaks 1 through 5 corresponded to the intervals of areas indicated in Figure 2.

マウス由来乳がん細胞における超偏極¹³Cピルビン酸の代謝解析と薬剤添加による影響の観測

○阿部 孝政¹, 久保 均², 原田 雅史², 前沢 博³, 西谷 弘⁴

¹オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社 MRI/Biotool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

³徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 放射線理工学分野

⁴徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 放射線科学分野

Metabolic Analysis of Hyperpolarized ¹³C-Labeled Pyruvate on Mouse Mammary Cancer Cell and Observation of Drug Induced Changes

○Takamasa Abe¹, Hitoshi Kubo², Masafumi Harada², Hiroshi Maezawa³ and Hiromu Nishitani⁴

¹MRI/Biotools Division, Oxford Instruments KK, Tokyo, Japan.

²Department of Medical Imaging, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.

³Department of Radiation Physics, Engineering and Biology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.

⁴Department of Radiology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.

The application of nuclear magnetic resonance (NMR) for metabolic analysis has been limited by the intrinsically low sensitivity of ¹³C nuclei. Recently, dynamic nuclear polarization (DNP), which is a technique for increasing NMR signal intensity, has been shown to enable to detect *in vivo* metabolism and pathological process^{1), 2)}. In this study, hyperpolarized 1-¹³C pyruvate was utilized as a metabolic tracer to monitor metabolism on mouse mammary cancer cell cultivated in the RPMI1640 medium with/without glucose, and 5-fluorouracil (5FU) was added to the culture medium to investigate the drug effect for metabolism. The conversion of pyruvate to lactate, alanine and bicarbonate was observed with high signal-to-noise ratio in acquired spectra. From the results of calculated kP/cell, kL/cell and AUC(Lac/Pyr), it was confirmed that 5FU affect the cell metabolism.

1. はじめに

近年、生体機能や代謝解析に核磁気共鳴法が用いられるようになってきたが、短時間での代謝変化を検出する場合には感度の問題から¹Hや³¹Pといった核に限られている。¹³Cおよび¹⁵N核は広範囲な化学シフトを持つためシグナル分離がよく、代謝物の同定が容易であることからその応用が期待されているものの、感度が低く短時間で情報を得ることは難しい。そこで、動的核偏極 (DNP) の手法を用いて¹³C核の感

hyperpolarization, dynamic nuclear polarization, DNP

○あべたかまさ, くぼひとし, はらだまさふみ, まえざわひろし, にしたにひろむ

度を劇的に改善することにより、生体内の機能を直接的に観測しようとする試みがいくつか報告され^{1), 2)}、注目を集めている。我々は¹³Cピルビン酸をトレーサーとしてグルコースの有無が異なる2種類の培養液で培養したマウス由来乳がん細胞における代謝変化を検出することを試みた。さらに、抗がん剤の1種である5-fluorouracil (5FU)の添加による代謝への影響を観察したので報告する。

2. 実験方法

1-¹³Cピルビン酸 2.6mg を 50 μ l D₂O/Glycerol=3:2 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)を添加した。核偏極装置には HyperSense[®](Oxford Instruments 製)を用い、試料を 3.35 T の静磁場下で 1.4 K に冷却して 70 分間の偏極を行った。対象細胞はマウス由来 FM3A 乳がん細胞で、RPMI1640 培地およびそこからグルコースのみ抜いたもので 48 時間培養した。5FU は 2 μ M を測定 22 時間前に加え、さらに 200 μ M を測定 1 時間前に添加した。測定直前に培養細胞を遠心分離して濃縮しておき、PBS に 0.01 % EDTA 添加した溶液 3 ml で偏極試料を溶解した後、直ちにそれらを混合して NMR 測定を行った。NMR 装置は Bruker DRX600、5 mm ϕ のブロードバンドプローブを用い、プロトンデカップリングを併用した 15 度パルスにより 1 秒間隔、4 回積算の測定を 120 秒間経過するまで行った。得られたスペクトルのピルビン酸およびその代謝物である乳酸のシグナル強度を 2 状態モデルでフィットし³⁾、細胞あたりのピルビン酸及び乳酸の反応速度定数(kP/cell, kL/cell)、曲線下面積の乳酸/ピルビン酸比(AUC(Lac/Pyr))を求めた。また、NMR 測定後に測定サンプルの一部を取り出してトリパンブルー染色後、顕微鏡下での観察により細胞数および細胞生存率を調べた。

3. 実験結果と考察

培地のグルコースの有無、そして 5FU 添加の有無によって、得られるスペクトルに差異が確認された。そして算出した kP/cell、kL/cell および AUC(Lac/Pyr)から以下の点が明らかとなった。1. グルコース含有培地に比してグルコース無添加培地では kP, kL が有意に高い。2. 5FU を添加した場合は kP, kL が有意に低い。3. グルコース無添加培地では 5FU 投与時の kP 低下の度合いがグルコース含有培地に比して大きく、また kL 上昇の度合いが小さい。これらの結果から、DNA 合成阻害剤である 5FU はがん細胞において糖代謝にも影響を及ぼすことが確認され、特に低栄養下において与える効果が大きいことが示唆された。

参考文献

- 1) Golman K. *et al.*, *PNAS*, 103, 30, 11270-11275 (2006)
- 2) F. A. Gallagher, *et al.*, *Nature*, 453(7197), 940-943 (2008)
- 3) Day SE, *et al.*, *Nature Medicine*, 13(11), 1382-87 (2007)

Self-Diffusion of Ions in a Confined Nanostructure: NMR Assessment of Ionic Conduction in a Thermotropic Ionic Liquid Crystal

○Anton E. Frise^{1,2}, Takahiro Ichikawa¹, Masafumi Yoshio¹, Hiroyuki Ohno³, Sergey V. Dvinskikh², Istvan Furo², and Takashi Kato¹

¹*Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan*

²*Division of Physical Chemistry, Department of Chemistry, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden*

³*Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan.*

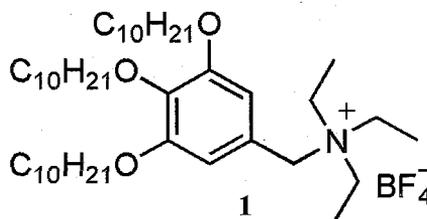
Abstract

Detailed investigation of molecular mobility in nanostructured ion-conductive materials is essential for understanding their dynamic functions. For this purpose we have determined the distinct self-diffusion coefficients of anions and cations in an ion-conductive material that exhibits a thermotropic bicontinuous cubic liquid-crystalline phase by Pulsed-Field-Gradient Nuclear Magnetic Resonance (PFG-NMR) spectroscopy. The results show that dissociating cations and anions in the nanostructured liquid-crystalline phase form ion pairs and clusters in the isotropic phase.

Introduction

Ionic interactions can be utilized for the self-assembly and phase segregation of amphiphilic molecules to achieve new functional liquid-crystalline soft materials [1]. We have previously reported that an ionic liquid based on a fan-shaped ammonium salt (Fig. 1) exhibits a bicontinuous cubic (Cub_{bi}) liquid-crystalline phase [2]. The self-organized material forms a continuous network of ion nano-channels that promote efficient ion conduction. The material shows a steep decrease in ion conductivity at the Cub_{bi} to isotropic phase transition, presumably due to a collapse of the ion channel network [2].

In this study, the diffusion coefficients of ions in ionic liquid crystal **1** were measured by NMR spectroscopy to investigate the dynamic properties of the material. Compound **1** melts to the Cub_{bi} phase at 42°C and shows a phase transition from Cub_{bi} to isotropic (disordered) liquid at 82°C. Pulsed-Field-Gradient (PFG) NMR was employed to determine the diffusion coefficients of both cation and anion over a temperature interval encompassing both Cub_{bi} and isotropic phases. The self-diffusion coefficients were determined by ¹H- and ¹⁹F-NMR for the cations and anions, respectively.



Crystal 42 Cub_{bi} 82 Isotropic

Fig.1 Fan-shaped ammonium salt exhibiting a bicontinuous cubic liquid-crystalline phase.

Experimental

The measurements were performed on a Bruker DMX200 spectrometer equipped with a 10 mm pulsed field gradient probe with 9.6 T/m maximum gradient. The temperature at the sample position was carefully measured with an external thermocouple for both proton and

fluorine radiofrequency inserts. The stimulated-echo pulse sequence was employed and the self-diffusion coefficients were obtained by fitting the echo attenuations to the Stejskal-Tanner equation [3]. A typical echo attenuation is shown in Fig. 2. The nominal values for all diffusion coefficients were calibrated towards the diffusion of water at 298 K [4].

Results

In Table 1, typical values for the diffusion coefficients of cation and anion in both phases are shown. In the Cub_{bi} phase we have found that the anion diffusion is approximately twice as fast as the cation diffusion, while in the isotropic phase the difference in diffusion coefficients between cation and anion is insignificant. Thus, the NMR results suggest that dissociating cations and anions in the liquid-crystalline phase form ion clusters in the isotropic phase, leading to the reduction in the ionic conductivity.

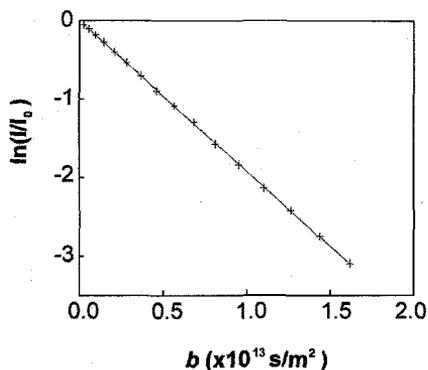


Fig. 2 Normalized signal amplitudes of a stimulated echo decay vs. the Stejskal-Tanner factor, $b = (\gamma g \delta)^2 (\Delta - \delta/3)$, for the anion in the bicontinuous cubic liquid-crystalline phase (66 °C). The solid line is a linear fit with an adjusted R^2 -value higher than 0.9999.

Table 1. Examples of diffusion coefficients in the ion-conductive material.

| | Diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$) | |
|-----------------------------------|---|------------------------|
| | Cation | Anion |
| 60°C (Cub_{bi}) | 4.63×10^{-14} | 1.15×10^{-13} |
| 90°C (Iso) | 2.39×10^{-12} | 2.29×10^{-12} |

Acknowledgements

A.E.F acknowledges financial support from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) and the Swedish Foundation for International Cooperation in Research and Higher Education (STINT). This work was partially supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (No. 19205017; T.K.) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS).

References

1. T. Kato, *Science*, 2002, 295, 2414-2418; T. Kato, N. Mizoshita, K. Kishimoto, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 45, 38-68; M. Yoshio, T. Kagata, K. Hoshino, T. Mukai, H. Ohno and T. Kato, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 5570-5577.
2. T. Ichikawa, M. Yoshio, A. Hamasaki, T. Mukai, H. Ohno, and T. Kato, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 10662-10663.
3. E. O. Stejskal and J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.*, 1965, 42, 288-292.
4. R. Mills, *J. Phys. Chem.*, 1973, 77, 685-688.

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, 澁澤庸一², 田代 充³

Application of WET sequence for the detection of the ligand signals resonating close to water
resonating close to water

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 Yoichi Shibusawa^b and Mitsuru Tashiro^c

An efficient pulse sequence for observing the ligand signals resonating close to the water signal has been developed by incorporating the WET technique into the saturation transfer difference pulse sequence. Although several pulse sequences have been developed for observing a ligand binding with a protein receptor, the ligand signals resonating close to the water were undetectable owing to the interference of the huge water signal in the samples containing 95% ¹H₂O. On the point of sample preparation, it is preferable to avoid the solvent exchange in the protein samples. In the proposed pulse sequence, a WET sequence is incorporated for the selective suppression of the water resonance. The efficient water suppression and the clear observation of the bound ligand signals close to the water have been demonstrated using the lysozyme-glucose complex.

はじめに

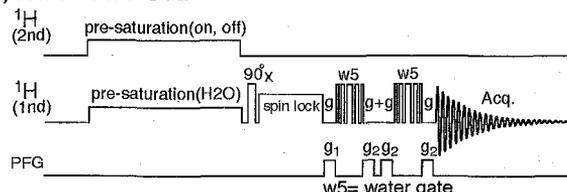
レセプターと結合するリガンドを観測する方法として、STD 法が使われている¹⁾。そして、その変法として Water-LOGSY 法が報告された^{2), 3), 4)}。これらの方法はともにレセプターを飽和させ、レセプターと結合しているリガンドを検出する。通常は軽水溶液では、観測段階で如何に水シグナルを消去するかが問題であった。この方法の一つとして、hard pulse による Water Gate 法が使われるようになった⁵⁾。この hard pulse の Water Gate

法は設定も測定も容易であることが特徴であるが、励起範囲が広く、水近傍のシグナルを消去してしまうという欠点を有している。水近傍の STD シグナルを観測する目的で Water Gate 法に対して presaturation 法を検討し、presaturation の一種 WET 法⁶⁾と z-filter の応用した WET-STD 法が良好な結果を得ることが判明したので報告する。

パルス系列

Fig.1 に WET-STD のパルス系列を示す。

(a) Water-Gate-STD



(b) WET-STD

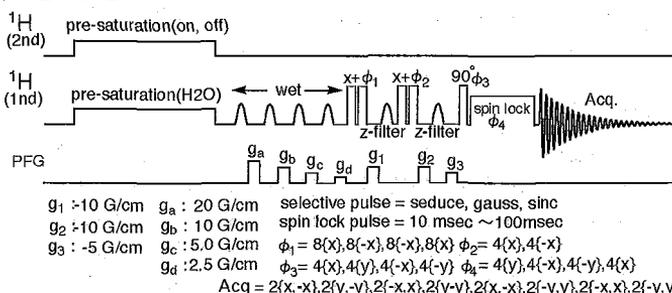


Fig.1 Pulse sequence of STD

STD, Water LOGSY

○ふりはたかずお、しもたかはら(たしろ) さくらこ、しぶさわよういち、たしろみつる

この方法は WET-NOESY pulse⁶⁾をもとにして、presaturation の WET-STD 法にしたものである。1D-NMR の水消去法としては、presaturation-NOESY 法が有効であることは知られている。この方法は巨大な水シグナルを presaturation 法で飽和し、残る水シグナルは差スペクトル (NOESY) で消去することにある。しかし、実際は水シグナルの消去は不十分である。そこで、更に水の消去を高めるために、WET-NOESY 法を検討し、z-filter を更に追加した。また、z-filter

には FG pulse と selective 90 pulse を導入し、z-filter の効率を高めた。この FG pulse と selective pulse は更に水シグナルを saturation するのもである。また、水消しが不十分な場合は、必要に応じては WET pulse の手前に presaturation をも入れる。Selective pulse としては選択性が高く pulse 中の短い seduce90 を使用した。この水消し 1D-NMR を STD 法に応用した。結合の弱い STD シグナルを観測する場合は T₂ フィルター (spin lock) は欠かせない。STD 法はリガンドのアルファティック領域の照射と被照射のスペクトルを交互に差スペクトルとして積算する。

Fig. 2 には 1D-NMR による水 saturation の profile、(a) Water Gate、(b) WET-STD (square90)、(c) WET-STD (seduce90) を示す。

Water gate 法 (a) では観測中心の 500Hz から 800Hz z が off resonance となり、広い範囲にわたり、シグナルは観測されないことを示す。これに対して、square pulse (10msec) (b) を使用した WET-1D-NMR では、観測中心 120Hz ぐらいを saturation した profile を示すが、square pulse 特有の sidelobe が生じ、シグナルの選択性を落としている。一方、seduce90

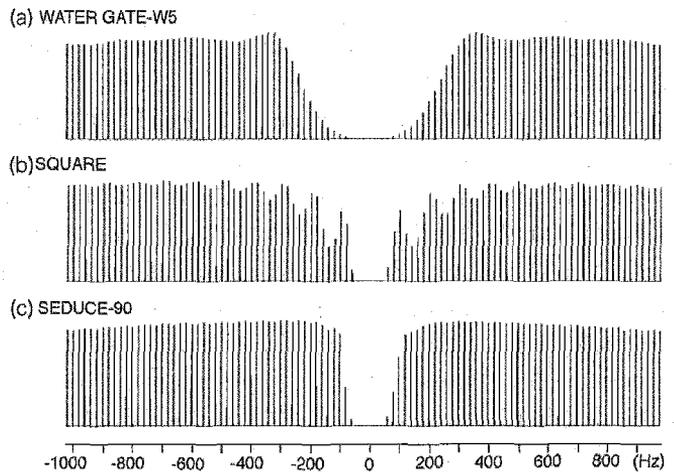


Fig.2 Experimental excitation profiles for solvent suppression pulses

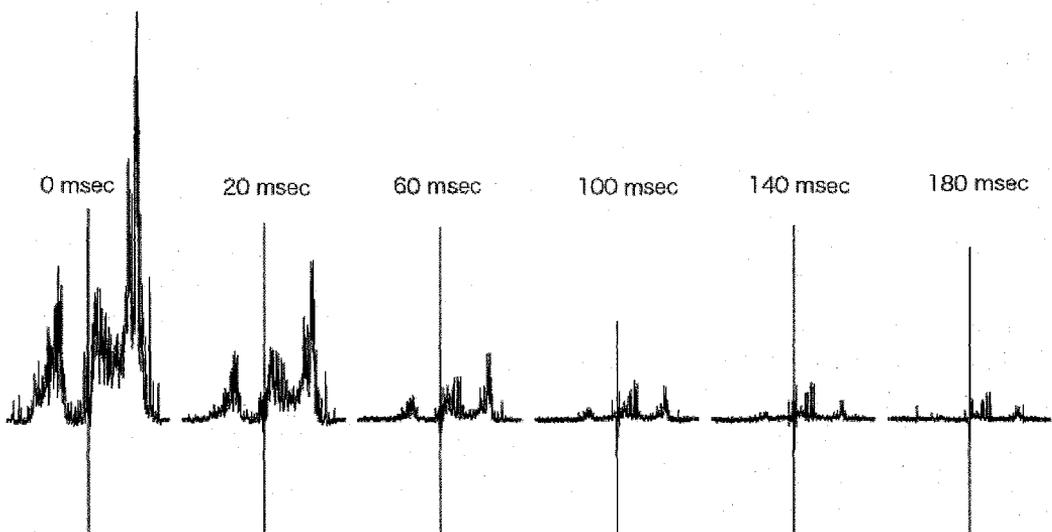


Fig.3 Effects of spin lock in WET-STD experiments
The entire spectrum is displayed (-2ppm~11 ppm)

pulse (18msec) (c) の場合は、saturation 領域は square pulse と同じであるが、シグナルの切り込みが鋭い profile となり、選択性が高いことを示す。磁場強度は (b) $\gamma H_1/2\pi = 25.0\text{ Hz}$ と (c) $\gamma H_1/2\pi = 31.5\text{ Hz}$ である。このように、seduce を使用した WET-STD の 1D-NMR の方が水シグナルを saturation し、水近傍のシグナルを観測するには有利であることがわかる。Seduce pulse の他には、gauss pulse や sinc pulse でも良い結果が得られた。

Fig. 3 は Lysozyme (0.4 mM) と glucose (10 mM) の混合物サンプルで、WET-STD 法における T_2 -filter の効果を検討したスペクトルである。Lysozyme のメチル基領域を照射した。 T_2 -filter は 0 msec, 20 msec, 60 msec, 100 msec と可変して測定した。0 msec (T_2 -filter なし) の時は saturation された Lysozyme シグナルが観測され、目的の Glucose のシグナルを観測することができない。 T_2 -filter を 60 msec, 100 msec と長く入れることにより Lysozyme のシグナルは減衰し、 T_2 -filter=100 msec の時、Lysozyme のシグナルは、ほぼ 1/10 まで減衰し Glucose のシグナルを観測した。このように、結合の弱い STD シグナルを観測するには長い T_2 -filter が必要になってくる。

Fig. 4 は Lysozyme と glucose の混合物において、水近傍の STD シグナルの観測について検討した。(a) Water Gate STD, (b) presaturation-STD, (c) presaturation WET-STD のスペクトルを示す。ともに T -filter=100 msec を用いて、lysozyme のシグナルを消去している。

(a) は STD-Water Gate のスペクトルである。軽水が消去されていると共に、その近傍の glucose の 1 位の $H\alpha$, $H\beta$ のプロトンシグナルも消去している。(b) は presaturation-STD 法、(c) は presaturation-WET-STD スペクトルである。(b) では Glucose の $H1\alpha$ のプロトンはつぶれ明確ではないが、水近傍の $H1\beta$ のプロトンの観測ができた。一方、(c) においては、Glucose の $H1\alpha$ $H1\beta$ のプロトンシグナルを共に観測した。水近傍のシグナルを観測するには水シグナルを如何に低く抑えることができるかがポイントとなるが、このように、presaturation-WET-STD 法は、近傍のシグナルの観測には有効であることが示された。

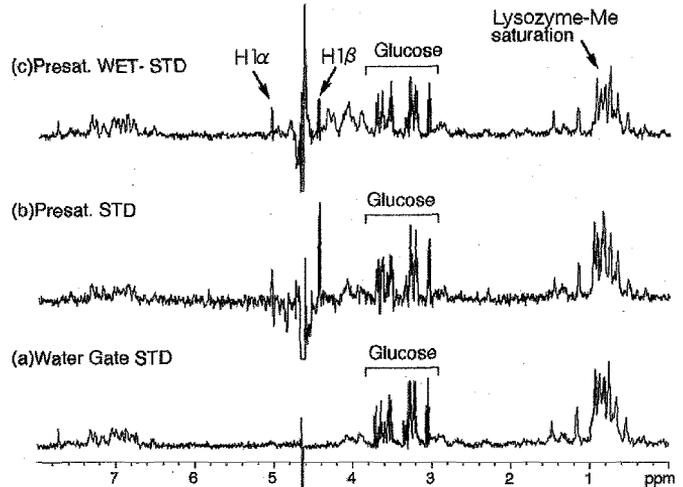


Fig.4 STD-spectra of Lysozyme-Glucose complex (0.8ppm saturation)

Water LOGSY 法について

Fig. 5 は、STD と Water LOGSY の感度を比較したスペクトルである。STD と同じような結果を得る方法として、Water LOGSY 法がある。Water LOGSY 法と STD 法において、感度に違いがあるか検討した。サンプルは、Human

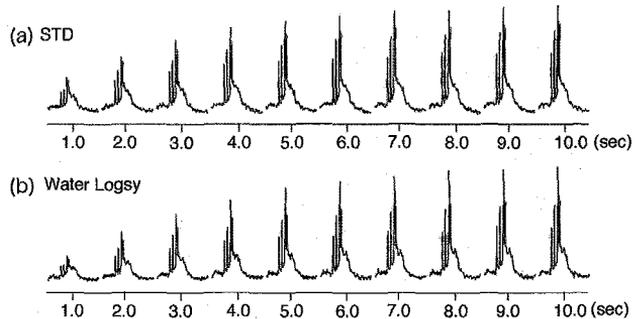


Fig.5 STD and Water LOGSY spectra for Tryptophan as functions of HSA saturation time

Serum Albumin (HSA) 0.1 mM と Tryptophan 2 mM の complex、(10%D₂O pH7.2) を使用した。Pulse 系列は Water Gate-STD (T_2 -filter なし) を使用し、STD の場合はメチル基領域を、Water LOGSY の場合は軽水シグナルをそれぞれ照射し、照射時間の依存性を検討した。(Dalvit らの transient タイプの WaterLOGSY pulse^{2), 3)} は使用しない。) 観測したシグナルは HSA に結合した Tryptophan のシグナルである。

このスペクトルからは STD 法においても Water LOGSY 法においても、感度の違いは見いだせなかった。また、照射時間は長いほど感度は向上することがわかった。

Fig. 6 において、Lysozyme と Glucose の混合物の (a) STD スペクトルと (b) Water LOGSY スペクトルを示す。Water Logsy の pulse 系列として WET-STD の pulse を使用した。この pulse を Water Logsy 法として使用する場合は presaturation は使用できない。この場合、短時間で軽水を saturation する WET pulse は非常に有効であった。軽水の照射と被照射のスペクトルを交互に差スペクトルとして積算した。このスペクトルでは STD のスペクトルとは異なり、Glucose の signal は位相が反転したスペクトルを与える。しかも、signal 強度も強い。Water LOGSY 法の一つの特徴として、タンパクに結合したシグナルと結合しないシグナルにおいて、位相が逆転するために、結合しているかいないかの判別が容易にできることが特徴であった。しかし、この Lysozyme と Glucose のサンプルのように、(a) STD 測定 (spin lock=100ms) では Lysozyme と Glucose の弱い結合があることを示すことができたのに対して、(b) Water LOGSY 法では Glucose シグナルが位相反転を示した。これは水と Glucose と結合関係が強く観測され、Lysozyme と Glucose との弱い結合関係を示すことができない。

まとめ

軽水中でのレセプターと結合するリガンドを観測する方法として、Water LOGSY 法よりは Water Gate-STD 法の方が測定は容易である。しかし、軽水近傍のシグナルをターゲットにした場合は Water Gate-STD 法では測定は困難になる。軽水近傍のシグナルをターゲットにした場合は軽水の消去が重要になる。その一つの解決法として、WET-STD 法が良いデータを与えることが判明した。

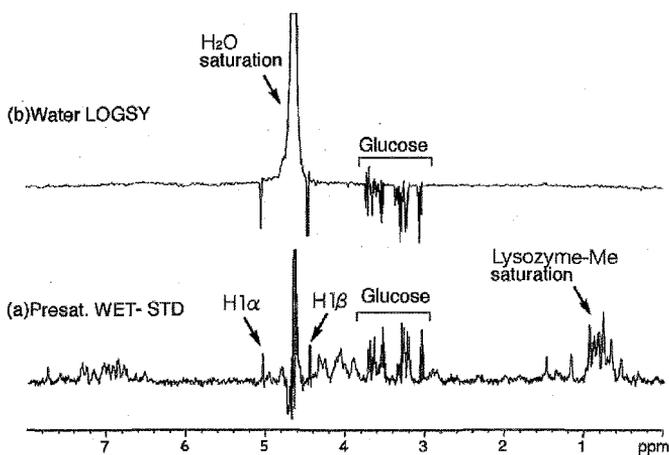


Fig.6 STD and Water LOGSY spectra of Lysozyme-Glucose complex

- 1). M. Mayer, B. Meyer, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 6108.
- 2). C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tato, M. Veronesi, A. Vulpetti, M. Sundstrom, J. Biomol. NMR 2000, 18, 65.
- 3). C. Dalvit, G. P. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, B. J. Stockman, J. Biomol. NMR 2001, 21, 349.
- 4). K. Furihata, S. Simotakahara and M. Tashiro, Magn. Reson. Chem. 2008, 46, 799-802
- 5). M. Liu, X. Mao, C. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, J. Magn. Reson. 1998, 132, 125.
- 6). S. H. Smallcombe, S. L. Patt and P. A. Keifer, J. Mag. Reson 1995, A 117, 295-303

Brevibacillus choshinensis 分泌発現系を用いた
アミノ酸選択的安定同位体標識試料作成

○谷生道一、楠英樹、田中利好、田中剛史、河野俊之
三菱化学生命科学研究所 (MITILS)

**Amino acid selective isotope labeling of proteins secreted by
Brevibacillus choshinensis for NMR study**

○Michikazu Tanio, Hideki Kusunoki, Rikou Tanaka, Takeshi Tanaka, and Toshiyuki Kohno
Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)

The gram-positive bacterium *Brevibacillus choshinensis* has been used to produce recombinant proteins with disulfide bonds. Here we established the amino acid-type selective isotope labeling method using by the *B. choshinensis* expression system. The analyses of ^1H - ^{15}N HSQC NMR spectra of the recombinant proteins with a ^{15}N -labeled amino acid demonstrated that Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, His, Lys, Met and Val are suitable for selective labeling, although acidic and aromatic amino acids are not suitable. The ^{15}N labeling for Gly, Ile, Leu, Ser and Thr resulted in scrambling to specific amino acids. These results indicated that the *B. choshinensis* expression system is an alternative tool for amino acid-type selective labeling of proteins, especially secretory proteins, for NMR analyses.

【序】NMRによるタンパク質の構造機能研究に於いて、安定同位体標識試料の作成は必要不可欠な技術である。特にアミノ酸選択的標識は、均一標識の場合では複雑に信号が重なり合うスペクトルをより単純化し、帰属の簡略化のみならず、局所構造とダイナミクスに関する情報も得られやすくなるなど、様々な利点がある。我々はこれまで、グラム陽性菌の *Brevibacillus choshinensis* 分泌発現系を用いた、細胞質および分泌性タンパク質の ^{15}N 均一標識法を確立し、本発現系が特にジスルフィド (SS) 結合を有する分泌性タンパク質の NMR 研究に有用であることを示してきた¹⁾。本研究では、この発現系を用いたアミノ酸選択的標識法の確立、および実際の分泌性タンパク質への応用を目的とした²⁾。

【方法】アミノ酸選択的標識法確立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り、既に NMR 信号の帰属が成されている 12-kDa ヒト FK506 結合タンパク質 (FKBP) を採用した。SS 結合を有する分泌タンパク質の例としてヒト M-フィコリン異物認識ドメイン (FD1, 26.8 kDa; Fig.1A) を採用した。発現ベクターおよび宿主は、それぞれ pNCMO2 および *B. choshinensis* HPD31-SP3 株 (タカラバイオ) を用いた。エレクトロポレーション法によって得られた形質転換体は、 ^{15}N 標識アミノ酸 (100 mg/L) を添加した非標識 C.H.L 培地 (クロレラ工業、Pro を除く 19 種類を調製) にて 1-5 日間培養し、培地中に分泌された目的試料を、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、 ^1H - ^{15}N HSQC NMR 測定を行った²⁾。

Brevibacillus choshinensis, secretion, isotope labeling, recombinant protein

○たにお みちかず、くすのき ひでき、たなか りこう、たなか たけし、こうの としゆき

【結果と考察】 ^{15}N アミノ酸標識FKBPの ^1H - ^{15}N HSQC NMRスペクトルにおける、各アミノ酸残基の平均信号強度比を解析した結果、*B. choshinensis*では9種類のアミノ酸 (Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, His, Lys, Met, Val) で選択的標識が可能であることが分かった (Table 1)²⁾。一方、酸性および芳香族アミノ酸は、ほぼ全てのアミノ酸へ代謝され、Gly, Ile, Leu, SerおよびThrは、それぞれ特定のアミノ酸へ代謝されることが明らかとなった²⁾。

同様の方法で、FD1のアミノ酸選択的標識を試みたが、標識アミノ酸のみを添加したC.H.L.培地ではFD1の発現が極めて低かった。そこで、低代謝である9種類のアミノ酸のうち、Cysを除く8種類をそれぞれ100 mg/Lとなるように添加したC.H.L.培地 (C.H.L.aa) を用いたところ、FD1の発現量が上昇した (2-5.5 mg/1 L培養)。この結果を基に、目的アミノ酸のみを ^{15}N 標識した、あるいは ^{15}N 標識Cysを添加したC.H.L.aa培地を用いることにより、9種類のアミノ酸選択的標識FD1の調製、およびそれらの ^1H - ^{15}N HSQC NMRスペクトルの取得に成功した (Fig.1)²⁾。

*B. choshinensis*分泌発現系は、大腸菌発現系と同程度の操作技術および実験設備があれば、比較的容易に導入できるため、今後、特にSS結合を有する分泌性タンパク質のNMR研究に大きく貢献するものと期待される。

Table 1 Amino acid scrambling in *B. choshinensis*²⁾

| [α - ^{15}N] Amino acid | Mainly scrambling to | Scrambling rate (%) |
|---|----------------------|---------------------|
| Ala | — | < 20 |
| Arg | — | < 35 |
| Asn | — | < 30 |
| Asp | almost all | — |
| Cys | — | < 18 |
| Gln | — | < 61 |
| Glu | almost all | — |
| Gly | Cys, Ser, Trp | — |
| His | — | < 25 |
| Ile | Leu, Val | — |
| Leu | Ile, Val | — |
| Lys | — | < 26 |
| Met | — | < 16 |
| Phe | almost all | — |
| Ser | Cys, Gly, Trp | — |
| Thr | Cys, Gly, Ser, Trp | — |
| Trp ^a | almost all | — |
| Tyr | almost all | — |
| Val | — | < 23 |

^a[α , ϵ - ^{15}N]Trp

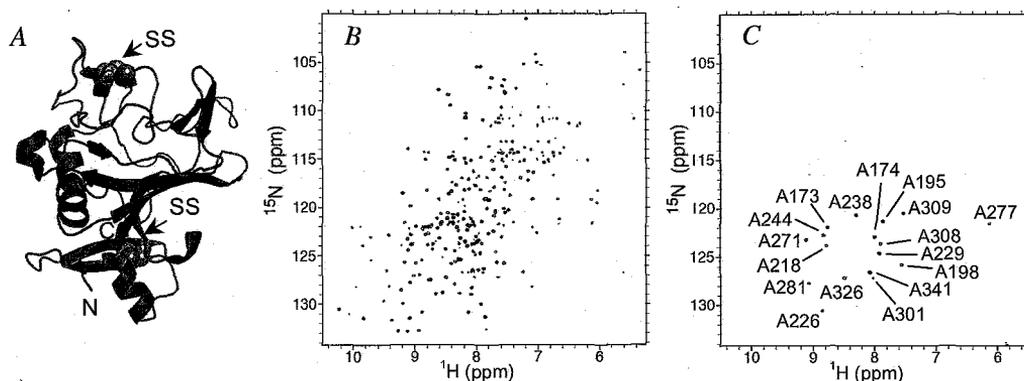


Fig. 1. Crystal structure of FD1 (A, PDB ID 2D39)³⁾ and the ^1H - ^{15}N HSQC spectra of uniformly ^{15}N (B) and ^{15}N -Ala (C) labeled FD1 (F127S/L128S monomer mutant)²⁾.

- 【参考文献】 1) Tanio *et al.*, (2008) *Anal. Biochem.* **373**, 164-166.
 2) Tanio *et al.*, (2009) *Anal. Biochem.* **386**, 156-160.
 3) Tanio *et al.*, (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 3889-3895.

4 塩基コドンを利用したメチオニン番号特異的 安定同位体標識方法

○岡田潔^{1,2}, 米山桃子^{1,3}, 田中利好¹, 田中剛史¹, 河野俊之¹

¹ (株) 三菱生命研, ² 現・東農大・応生,

³ 現・奈良先端大・バイオ

Stable isotope labeling of specific methionine residue in protein by four-base codon method for NMR study.

○Kiyoshi Okada^{1,2}, Momoko Yoneyama^{1,3}, Rikou Tanaka¹,

Takeshi Tanaka¹, Toshiyuki Kohno¹

¹ MITILS, ² TUA · Department of Bioscience,

³ NAIST · Graduate School of Biological Sciences

The determination of protein structure is important for understanding functional expression of protein and drug development. NMR spectroscopy and X-ray crystallography methods are used to determine protein structures. Particularly, NMR spectroscopy is promptly analyzed in protein-protein and protein-compound interaction analyses. However, a problem of NMR spectroscopy is that high concentrations and purity of protein are needed. Moreover, higher molecular weight proteins cannot be analyzed by NMR spectroscopy. The purpose of this study is to solve these problems with residue-specific stable isotope labeling using four-base codon method.

【背景】タンパク質の立体構造を知ることは、そのタンパク質がどのように機能発現しているかを原子レベルで深く理解する上でも、さらには、その理解をもとに疾患関連タンパク質の機能を制御する薬剤の効率的な設計を行う上でも極めて重要である。タンパク質の立体構造を明らかにする手法には、NMR法とX線結晶構造解析があり、特にNMR法はタンパク質-タンパク質やタンパク質-低分子化合物の相互作用解析を迅速に行うことができる。しかし、このような解析を行うには高純度・高濃度の試料が必要である。また、解析可能なタンパク質の分子量にも上限がある。本研究の目的は、これらの問題を解決するために、リボサイム(1)と4塩基コドン法(2)を用いてタンパク質のアミノ酸番号特異的な安定同位体標識方法の開発を行うことである。

4塩基コドン法, 安定同位体標識法, 無細胞合成系

○おかだきよし, よねやまももこ, たなかりこう, たなかたけし, こうのとしゆき

【方法】本研究では、標準試料として大腸菌無細胞合成系で合成でき、安定なヒト由来のFK506結合タンパク質 (FKBP) を用いた。FKBP 中のメチオニンをアミノ酸番号特異的に標識するため、一ヶ所ずつメチオニンコドン (AUG) を4塩基コドン (CGGG) に置換した3種類のプラスミドを作成した (Fig. 1)。また、リボザイムを用いたアミノアシル化を行い Methyl-¹³C-Met-tRNA^{accg} を作成した。そして、作成したプラスミドと Methyl-¹³C-Met-tRNA^{accg} を用いて、大腸菌無細胞合成系の RTS システムで標識 FKBP (Wt, M29, M49, M66) を合成した。標識 FKBP を TALON Metal Affinity Resin により精製し、NMR 測定を行った。

【結果および考察】標識 FKBP を合成し精製した結果、Wt は 240 μg、M29 は 15 μg、M49 は 2 μg、M66 は 21 μg 得られた。標識 FKBP の ¹H-¹³C HSQC スペクトルを測定した結果、Wt では3つのシグナルが観測され、M29、M49 および M66 では、それぞれ一つだけシグナルが観測された (Fig. 2)。Wt のシグナルに M29、M49 および M66 のシグナルを重ねたところ全て重なり FKBP のメチオニンのメチル基の帰属が行うことが出来た。以上の結果から FKBP のメチオニンをアミノ酸番号特異的に標識することに成功した。

Wildtype FKBP (Wt)

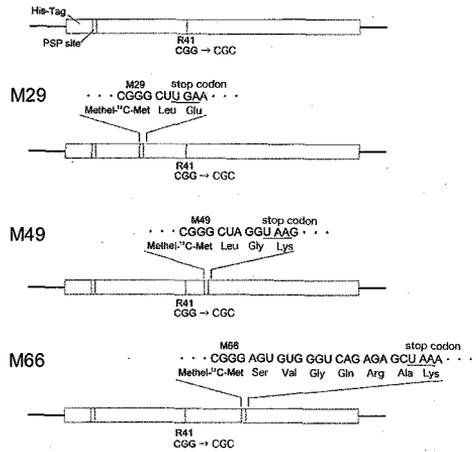


Fig. 1. Nucleotide and amino acid sequences of FKBP containing four-base codon CGGG.

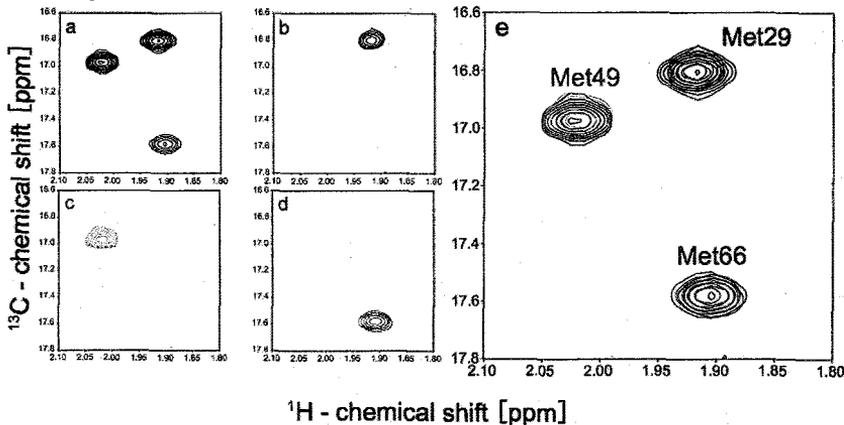


Fig. 2. ¹H-¹³C HSQC spectrum of labeled FKBP: (a) Wt, (b) M29, (c) M49 and (d) M66.

(e) Assignment of methyl groups of methionine at FKBP.

- 【参考文献】 (1) Hohsaka, T. et al. *J. am. chem. soc.* **1996**, 118, 9778-9779.
 (2) Murakami, H. et al. *Nature Methods* **2006**, 3, 357-359.

網羅的代謝物アノテーションサーバーSpinAssign を用いた NMR メタボロミクス入門

○近山英輔¹、坪井裕理²、長濱淳子¹、関山恭代¹、菊地淳^{1,3,4}

¹理研PSC、²理研ASI、³横浜市院生命、⁴名大院生命農

Introduction to NMR Metabolomics with SpinAssign: A Comprehensive Metabolite Annotation Server

Eisuke Chikayama¹, Yuuri Tsuboi², Junko Nagahama¹, Yasuyo Sekiyama¹, Jun Kikuchi^{1,3,4}

¹RIKEN PSC, ²RIEKN ASI, ³Graduate School of Bionano., Yokohama City University,

⁴Graduate School of Bioagri. Sci., Nagoya University

NMR-based Metabolomics has become a practical and analytical methodology for discovering novel genes, biomarkers, metabolic phenotypes, and dynamical cell behaviors in organisms. Recently we devised and implemented a statistical index, SpinAssign *p*-value, in NMR-based metabolomics for large-scale metabolite annotation and provided information to the public. We will tutor introductory cases of NMR-based metabolomics by SpinAssign.

<はじめに> 近年NMRメタボロミクスの医学・生物学分野での応用事例が増えてきた。しかしそのほとんどは¹H NMRスペクトルを基本としたプロファイリング解析であり、候補代謝物の網羅的なアノテーションをせずにスペクトルのパターンで結果を議論することが多い。一方、我々の開発した代謝物アノテーションサーバーSpinAssignはNMRによる候補代謝物の網羅的アノテーションを極めて簡易に行なうことのできるウェブシステムである。現在 270 代謝物以上の¹³C-HSQC由来の化学シフトがデータベース化され、試料の¹³C-HSQCスペクトルを計測したユーザーはここにアクセスし自身のスペクトルからピックアップしたHSQCピークをクエリーとして与えるだけで容易に候補代謝物の網羅的アノテーションを得ることができる。最近我々はこのSpinAssignに*p*-value計算という機能を付加した。この方法によって今まで100以上の代謝物の同時アノテーションが不可能であったものが200代謝物以上の同時アノテーションを可能にするまで改良することができた。この方法は公共利用可能であり、NMR試料さえ用意すれば容易に誰でもNMRメタボロミクス研究を行なうことができる。今回我々は身の周りにある飲料をNMR試料に用いSpinAssignを使うNMRメタボロミクスの研究例について易しく解説する。

<簡単 NMR メタボロミクス入門>

1. リン酸カリウムバッファー溶液 350 μ L と計測する飲料 150 μ L を混合しNMR管に移す。
2. 1D ¹H (water gate) と 2D ¹³C-HSQC スペクトルを計測する。
3. ¹³C-HSQC スペクトルからDSS以外のピークをピックアップし、1 ピークを 1 行で¹H<tab>¹³Cの順でテキストファイルとして保存する。
4. SpinAssign (http://prime.psc.riken.jp/?action=nmr_search) にアクセスしテキストファイルからピークを貼り付け[do SpinAssign]ボタンを押す。

キーワード: メタボロミクス、メタボローム、ウェブ

○ちかやまえいすけ、つぼいゆうり、ながはまじゅんこ、せきやまやすよ、きくちじゅん

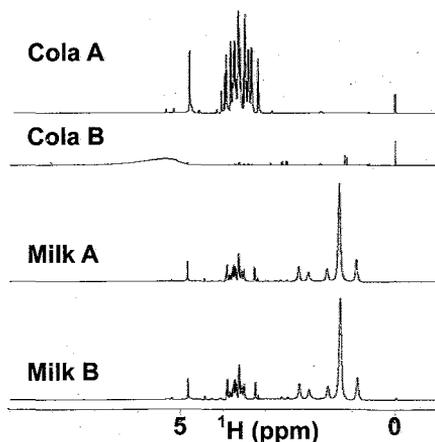
<結果と考察>

この要旨ではコーラA、コーラB、牛乳A、牛乳Bの結果の概要について記す。年会ではより味覚の多様性を網羅した飲料の計測と、ここでは記述しない主成分分析などの統計解析の結果を発表する予定である。1D ^1H では牛乳では脂質と糖が出ており牛乳間の差はほとんどないことがわかり、コーラAはほとんど糖分であり、コーラBでは 1.12-1.18 / 2.51-2.67 ppmに特徴的なピークが出ているが特に糖分はコーラAに比べ低濃度であることがわかった (Fig. 1)。 ^{13}C -HSQCでも牛乳A、B間で差は全く見られなかった。コーラAとコーラBではパターンが異なった。SpinAssignのアノテーション結果ではコーラAでは果糖/ぶどう糖など、コーラBではPropane-1,2-diol/ethanol/citrateが候補代謝物としてアノテーションされた (Fig. 1)。コーラAは通常タイプであるがコーラBはカロリーゼロタイプであり、低濃度にかかわらず味覚上十分な甘さであった。これは人工甘味料により低い閾値濃度で味覚受容体システムが反応することの結果であると考えられる。牛乳ではクレアチンなどがアノテートされたが現状のデータベースには候補は多くヒットするものの信頼性の高そうな代謝物は存在しなかった。牛乳A、B間でスペクトル上では全く差がなかったが牛乳-コーラ間ではスペクトルは著しく異なった。これは牛乳とコーラという味覚のおよそ違うものはNMRスペクトルでも異なり、がしかし発表者の食味で牛乳A、B間の差異は認識できたことから、($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ スペクトルで直接検出できない塩味と酸味は無視するとすれば)NMRで検出できる程の高濃度物質は味覚上で「牛乳」というくくりを決定していることを示唆している。味覚受容体システムが濃度の低い基質よりも高い基質に反応するように設計される場合は物理化学的に無理のない自然な結果であると考えられる。しかし味覚の閾値濃度は個人差もある程多様性があり、牛乳A、B間の味覚差や人工甘味料では果糖ぶどう糖などに比べ少ない閾値濃度で反応することなどは低濃度閾値を持つ味覚受容体システムの帰結であろう。味覚は舌の受容体システムから脳への非線形的合成電気信号であると考えられるが、どのような基質閾値濃度の非線形的組み合わせにどのような味覚で反応するかという生物の進化/適応/学習による味覚の遺伝子-受容体システム/神経ネットワークシステム変遷の一側面がこのようにNMRスペクトルからも見て取れることは大変興味深い。

<方法>

[リン酸カリウムバッファの調整] KH_2PO_4 水溶液(1 M, 1.15 mL), K_2HPO_4 水溶液(1 M, 1.85 mL), 重水(D_2O , 27.0 mL), 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) (6.5 mg)を混合し 30 mLのバッファ溶液を作成した(100 mM, pH 7.0, 1.0 mM DSS)。

[NMRスペクトルの計測] クライオシステム付きBruker Avance II 700 MHzを用いた。water gate (p3919gp)と ^{13}C -HSQC (hsqcetgp)を 298 Kで計測。 ^{13}C -HSQCはスペクトル幅 20/140 ppm、中心 4.7 付近/60 ppm、ポイント数 1024/344、4 スキャン/ポイントで計測。



| ANNOTATION | | | | | | |
|------------|---|------|------------|--------------------|-----------------------|---------------------------|
| No. | METABOLITE | ATOM | DETECT | $\delta^1\text{H}$ | $\delta^{13}\text{C}$ | p-value [5%] 10^{64} |
| 1 | (2R)-2-Hydroxy-3-(phosphonoxy)-propanal | | 2/7(28.6%) | 0.001 | -0.016 | 0.69 |
| 2 | Acetyl-CoA | | 1/23(4.3%) | 0.004 | -0.004 | 0.077 |
| 3 | Citrate | | 2/2(100%) | -0.003 | -0.152 | 1.8e-24 |
| 4 | Ethanol | | 2/2(100%) | 0.006 | -0.256 | 3.9e-10 |
| 5 | L-Allothreonine | | 1/3(33.3%) | 0.01 | -0.195 | 4e-27 |
| 6 | L-Rhamnose | | 1/10(10%) | 0.01 | -0.195 | 1.6e-21 |
| 7 | Propane-1,2-diol | | 4/4(100%) | 0.009 | -0.226 | 3.7e-25 |
| 8 | S-Adenosyl-L-methionine | | 1/26(3.8%) | 0.006 | -0.043 | 5.8e-119 |
| | | | | 0.008 | -0.156 | 5.9e-125 |
| | | | | 0.015 | -0.092 | 0.00068 |
| | | | | 0.014 | -0.084 | 3.8e-15 |
| | | | | 0.014 | -0.084 | 1.6e-15 |
| | | | | 0.022 | -0.124 | 6.7e-17 |
| | | | | | | 7e-10 |

Figure 1. 1D ^1H NMR spectra (left) and annotations with SpinAssign for Cola B (right).

¹³C 標識生体サンプルを用いた比較メタボローム解析と植物抽出過程における代謝物プロファイリング

○関山恭代¹、近山英輔¹、菊地淳^{1,2,3}

1) 理研・PSC, 2) 横浜市院・生命, 3) 名古屋大院・生命農

Comparative metabolome analysis using ¹³C-labeled organisms and profiling plant metabolites throughout extraction processes

Yasuyo Sekiyama¹, Eisuke Chikayama¹, Jun Kikuchi^{1,2,3}

¹RIKEN Plant Science Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 235-0045, Japan.

² Graduate School of Nanobiosciences, Yokohama City University, 1-7-29 Suehirocho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan.

³ Graduate School of Bioagricultural Sciences and School of Agricultural Sciences, Nagoya University, 1 Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, 464-8601, Japan.

NMR techniques can provide structure-based information on a global pool of metabolites, not only in isotropic solvent extracts, but also in heterogeneous samples, such as intact tissues or extraction residues containing insoluble materials. At first, we describe the evaluation of extraction solvents that can be applicable for NMR-based metabolomics of a wide range of organisms and their application to comparative metabolome analysis using ¹³C-labeled plants, animals and microorganisms. In metabolomic analyses, care should be exercised as to which metabolites are extracted from the sample and which remain in the residue. The second, we tried to visualize changes in plant metabolite profiles throughout a series of repeated extraction process using a combined solution-state and HR-MAS NMR approach. In addition to the metabolite profile, we will discuss a relationship between metabolite structure and behavior throughout the repeated extraction process.

[背景]

我々は、安定同位体標識技術および、異種核多次元 NMR 法をメタボローム研究に展開し、分子構造レベルでの代謝動態の解析を目指している [1-3]。これらの方法論を、単一の生物種の評価のみならず、生態系の中での物質動態・循環過程の解析に展開すべく、検討を行なっている (Figure 1)。本会では、代謝物の一斉解析において鍵となる「抽出」に焦点を当て、(1)多様な生物種に適用可能な抽出溶媒の検討と比較メタボローム解析への応用、(2)植物資源の有効活用を視野に入れた、抽出プロセスを体系的に評価する方法としての NMR メタボロミクスの適用について議論する。

キーワード：NMR、¹³C 標識、メタボローム

○せきやま やすよ、ちかやま えいすけ、きくちじゅん

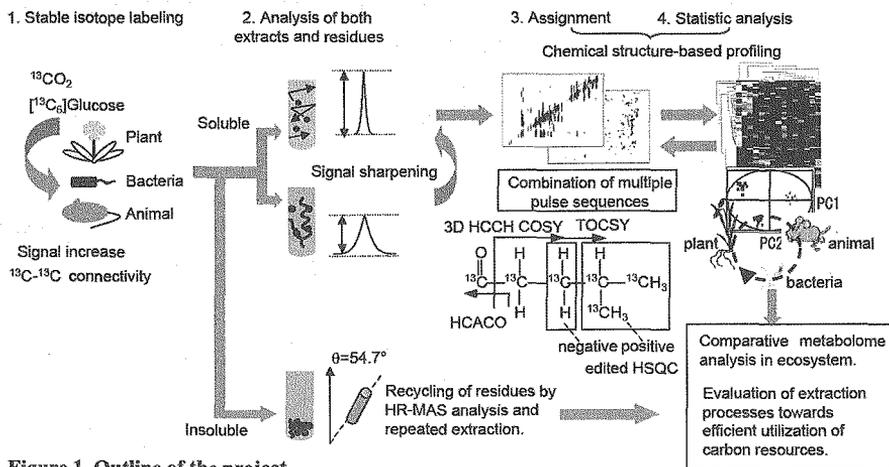


Figure 1. Outline of the project

[^{13}C 標識生体サンプルを用いた比較メタボローム解析]

生態系の中での物質の動態と循環は、一次生産者、消費者、分解者などのさまざまな機能群によって担われている。これらを比較し、物質動態を体系的に解析するためには、多様な生物種に適用可能な抽出溶媒の検討が必要である。我々は、NMR法を用いた比較メタボローム解析を行なうために一連の抽出溶媒を検討し、重メタノール(MeOD)系溶媒がシグナルの先鋭化および相関シグナルの増加に有効である事を報告した[4]。そこで今回は、比較メタボローム解析への展開の一例として、 ^{13}C 標識植物(シロイヌナズナ、ポプラ)、動物(マウス肝)、昆虫(カイコ)、微生物(光合成細菌、大腸菌)サンプルを MeOD 系溶媒で抽出し、代謝物プロファイリングを行なった。本会では、その詳細を報告する。

[植物抽出過程における代謝物プロファイリング]

メタボローム解析における抽出の問題は複雑であり、代謝物の広範に渡る物理化学的性質や全体の濃度バランスを考慮する必要がある。抽出される成分、抽出操作に伴う成分組成の変化、抽出残渣に残る成分を体系的に評価する事は、生理学的観点から代謝の考察を行なう場合だけでなく、生体を資源として捉え、有効利用するという観点からも重要である。我々がフォーカスする NMR 法では、誘導體化や分離精製を伴わない抽出物の直接計測が可能であり、また高速マジック角回転(HR-MAS)法による残渣の非侵襲計測により、成分全体を損なわずに解析する事が可能である。今回は、最も多様な代謝物を有すると言われる植物を対象とし、モデル植物である ^{13}C 標識シロイヌナズナを用いて、抽出操作に伴う成分の組成変化と残渣成分の評価を行なったので報告する[5]。

- References - [1] Chikayama, E. *et al.*, *PLoS ONE* 3, e3805 (2008)., [2] Kikuchi, J. and Hirayama, T. *Method. Mol. Biol.* 358, 273-286 (2007), [3] Sekiyama, Y. and Kikuchi, J. *Phytochemistry* 68, 2320-2329 (2007), [4] Sekiyama, Y. *et al.* The 45th Annual Meeting of the NMR Society Japan (2006), [5] Sekiyama, Y. *et al.* *submitted.*

P095

SAIL法による蛋白質のTrp環シグナルの効率的帰属

○宮ノ入洋平¹, 武田光広¹, 寺内勉^{2,3}, 小野明^{2,3}, 甲斐荘正恒^{1,2}

¹名大院・理・構造生物学研究センター

²首都大東京・戦略研究センター

³SAILテクノロジーズ(株)

Facile assignment of the Trp ring signals in a protein by the SAIL method

○Yohei Miyanoiri¹, Mitsuhiro Takeda¹, Tsutomu Terauchi^{2,3}, Akira Mei Ono^{2,3} and Masatsune Kainosho^{1,2}

¹*Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University.*

²*Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University.*

³*SAIL Technologies*

We are currently exploring further optimizations of the isotope-labeling patterns for various stereo-array isotope-labeled (SAIL) amino acids, in order to establish a method for the robust NMR signal assignment and automated structural determination for large proteins and their complexes, which are somewhat difficult to handle even with the original SAIL method. For example, we recently showed that the combined use of various types of SAIL-Phe/Tyr allowed us to determine a protein structure more accurately (Takeda *et al.*, JBNMR, 2009, DOI 10.1007/s10858-009-9360-9). In this presentation, we introduce a new SAIL-Trp, which has an optimal labeling pattern for the most efficient observation and assignment of the ring signals, as revealed for the six Trp residues of a DNA binding domain of c-Myb (Myb-R2R3).

[序]

芳香族アミノ酸(Phe, Tyr, Trp)は疎水性コア領域に存在し、蛋白質の立体構造の形成・維持に大きな役割を果たすだけでなく、分子表面や内部において様々な相互作用を通じて蛋白質の機能発現に深く関わっている重要な残基である。我々は従来の均一標識試料を用いたNMR解析法では盲点となってきたPhe/Tyr残基の芳香環シグナルの観測と帰属、及びそれらに由来するNMR構造情報の取得がSAIL法により迅速、且つ高感度に可能となり、更にそれらの構造決定への有用性を明らかにしている。Trp残基に関してもSAIL法を適用し、それらの環シグナルのNMR情報を得ていたものの、最適な標識パターンに関しては様々な試行錯誤が必要であった。本研究では、より高分子量の蛋白質にも適用可能な高感度な芳香環シグナルの帰属を目的に改良したSAIL-Trpを用いて、簡便且つ有効な帰属手法の開発を行った。検証に用いたモデル蛋白質としては、6残のTrpを持つc-Myb蛋白質DNA結合ドメイン(Myb-R2R3)を用い、遊離状態、及びDNA結合状態におけるインドール環シグナルの帰属を試みた。

SAIL法, 芳香環シグナル, NMR帰属法

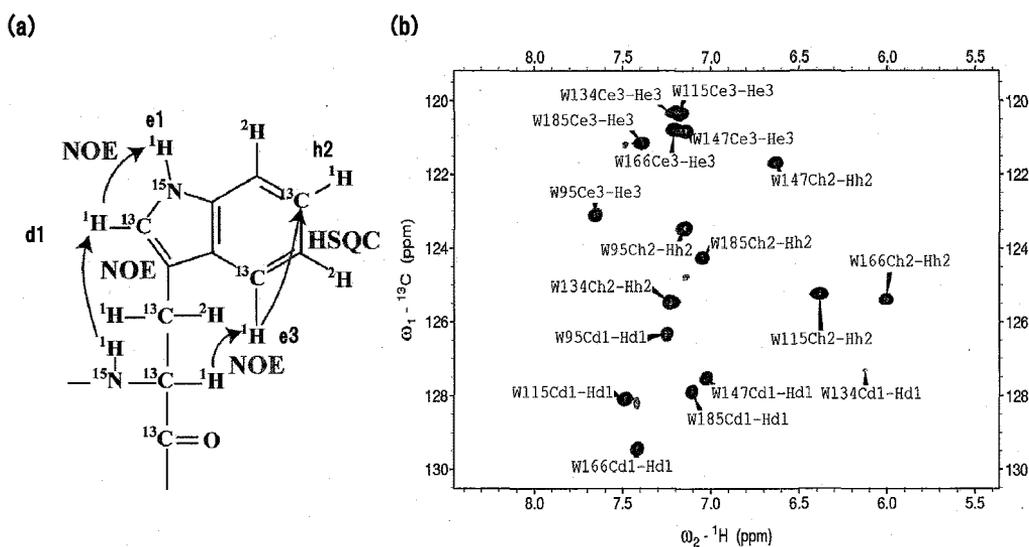
○ みやのいり ようへい, たけだ みつひろ, てらうち つとむ, おの あきら, かいのしょう まさつね

[方法]

Fig.(a)に示したSAIL-Trpを最少培地 1Lあたり5mg加えることにより、選択的SAIL-Trp標識したMyb-R2R3を調製した。0.6 mM の精製試料を用いて、 ^{15}N NOESY-HSQC, ^{15}N TOCSY-HSQC, ^{13}C NOESY-HSQC 及び ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを測定した。NMR測定はBruker 500, 600,及び800MHz装置を使用した。インドール環シグナルについて、 H_{e3} は $\text{H}_a, \text{H}_{b2}$ とのNOEにより帰属した。 H_{d1} は H_N 若しくは H_{b2} とのNOEにより帰属した。 H_{e1} は H_{d1} とのNOE、 H_{b2} に関しては C_{e3} とのスピン結合により帰属した。

[結果と考察]

Myb-R2R3の6残基のTrpが含まれており、均一標識法によってはそれらの環シグナルの完全帰属は不可能である。一方、新たに合成したSAIL-Trpでは、NOESY,HSQC実験によって、Trpの標識部位シグナルの完全帰属が容易に達成できた{Fig.(b)}。



(a) Chemical structure of SAIL-Trp. The arrows indicate the assignment pathways.

(b) The ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of Myb-R2R3 labeled with SAIL-Trp.

Myb-R2R3の結晶構造中では、Trp115(W115)、Trp166(W166)、及びTrp134(W134)の環シグナルは近接するHis残基やTrp残基による環電流の影響を大きく受ける事が予想される。このことは、W115とW166の H_{b2} シグナル及びW134の H_{d1} シグナルが他のTrp残基のシグナルと比較して、大きく高磁場シフトを示す事実と一致する。これらのシグナルは、標的DNAを加えることにより、大きな化学シフト変化を示すことから、DNAとの相互作用に関与している事が示された。

[謝辞] 本研究内容の一部は文科省ターゲットタンパク研究プログラムにおけるSAIL法技術開発の一環として、横浜市大西村教授の協力を得て行われた。

利用したタンパク質試料の調製

○竹内 誠¹, 玉井 淳史², 森 正之^{2,3}, 大木 進野^{1,3}
(北陸先端大学院大¹, 石川県立大², JST先端計測³)

A protein sample preparation with suspension-cultured plant cells and an inducible virus vectors

○Makoto Takeuchi¹, Atsushi Tamai², Masashi Mori^{2,3}, Shin-ya Ohki^{1,3}
(JAIST¹, Ishikawa Pref. Univ.², and JST-SENTAN³)

We have reported that our new protein expression system, the suspension cultured plant cells infected with an inducible virus vector system, can prepare ¹⁵N-labeled proteins. As the next step, we show that the system can also be employed for some other types of labeling. First, we achieved ¹³C-labeling by using ¹³C-labeled sucrose as a sole source of carbon in the medium. The expressed sample, BPTI, showed excellent triple-resonance NMR data. Second, ²H-labeling and a. a. selective-labeling were examined. In addition, we examined the ability of glycosilation on the target sample. These results clearly indicate that this system has a great potential for protein NMR.

<はじめに>

広く普及している大腸菌や酵母を利用した発現系では目的タンパク質が発現されない、あるいは、封入体でタンパク質を得ることはできるが巻き戻しが困難である、といった場合も多い。例えば、細胞に対して毒性を持つようなタンパク質試料は無細胞系を使用して作製できることもある。このように試料調製の代替策を準備しておくことは、研究の可能性を広げることに繋がる。

我々は植物細胞を用いた新規なNMR試料調製方法を開発中である。前回のNMR討論会では、植物細胞と誘導可能なウイルスベクターを使用した独自のタンパク質発現系の提案と、4種類の¹⁵N標識タンパク質試料の調製例を紹介した(参考文献 1)。既に報告したように、この発現系はSS結合を有するタンパク質を可溶化状態で正しい折れたたみ構造で発現できる等、幾つかの利点を持っている。

今回、我々は本手法のさらなる発展として¹³C標識、重水素標識、幾つかのアミノ酸タイプの選択標識を試みた。また、糖鎖修飾の可能性についても検討した。以上の結果について報告する。

キーワード：植物細胞, ウイルスベクター, 安定同位体標識

発表者指名：○たけうち まこと, たまい あつし, もり まさし, おおき しんや

<実験>

目的タンパク質をコードしている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タバコ培養細胞 (BY-2) に取り込ませた (参考文献 2)。各種標識方法をテストするためにBPTIを発現させた。また、糖鎖付加の確認にはAFP1を発現させた。

培地の窒素・炭素源は1.9g/L KNO_3 、および1.65g/L NH_4NO_3 、シュクロース (3% (w/v)) である。 ^{15}N 標識のためには標識 KNO_3 を NH_4NO_3 利用し、 ^{13}C 標識のためには標識シュクロースを用いた。

それぞれの標識タンパク質の精製は既に報告されている方法に従った。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で処理/表示した。

<結果と考察>

^{13}C シュクロースを炭素源として ^{13}C , ^{15}N 二重標識BPTIを作製した。質量分析と各種NMR測定の結果、炭素部位の ^{13}C 標識率は94~95%程度であることがわかった。

重水やアミノ酸は、どちらも培地中の濃度がある程度以上高くなると植物細胞の成長やタンパク質発現を阻害することが確認された。これらの濃度を最適化して標識BPTIを得ることができた。標識されているか否かは質量分析で確認した。

また、糖鎖付加アミノ酸配列を持つ野生型AFP1とその部分に変異を入れたAFP1をそれぞれ発現させた。NMR測定と質量分析により修飾の確認ができた。本手法は糖鎖付加されたタンパク質試料を作製する能力を持つことが示された。

<参考文献>

- (1) Ohki S, Dohi K, Tamai A, Takeuchi M, Mori M. (2008) *Journal of Biomolecular NMR* **42**, 271-277.
- (2) Dohi, K., Nishikori, M. Tamai, A. Ishiwaka, M., Meshi, T., and Mori, M. (2006) *Archives of Virology* **151**, 1075-1084.

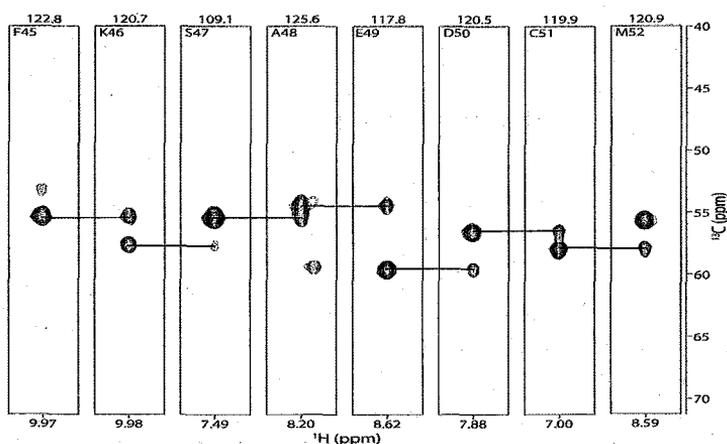


Fig. 1. Strip plot of HNCA of (^{13}C , ^{15}N)-labeled BPTI prepared by the BY-2 system.

多重共鳴NMRを用いた生体における集積コリンおよびグルコース代謝物の選択的計測

○五十嵐 龍治, 朽尾 豪人, 水澤 圭吾, 上平 晃聖, 山東 信介,
青山 安宏, 白川 昌宏
京都大学大学院工学研究科

Selective measurement of choline accumulation and glucose metabolites in cells and organs using multi-resonance NMR

○Ryuji Igarashi, Hidehito Tochio, Keigo Mizusawa, Kosei Uehira, Shinsuke Sando,
Yasuhiro Aoyama and Masahiro Shirakawa
Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.

NMR is one of the most suitable methods to visualize in vivo localization of biomolecules without damaging the organisms. However, molecular specific imaging in biological organisms with NMR/MRI is difficult because NMR signals of target molecules suffer from higher background signals from coexisting molecules. In this study, we employ heteronuclear multiple-resonance NMR techniques to take advantages of their molecular identification ability. A stable-isotope-labeled choline or D-glucose was injected into tumor-bearing mouse, the organs were surgically collected and the homogenized extracts were subjected to NMR measurements. We found that triple-resonance NMR enabled observation of accumulated cholines and lactates, known markers of tumor metabolism, in organ homogenates in a highly molecular specific manner.

1. 序論

細胞内や生物個体内に存在する生体分子の化学反応や構造変化を原子レベルでその場観察するためには低侵襲性と高分解能を兼ね備えた手法を用いなければならない。磁気共鳴法はこれらの特徴を持つ数少ない分光法のひとつであり、磁気モーメントを有する核スピンや不対電子が存在する化合物について多くの情報を与える。しかし、生体内のような混合物系の場合、例えば、一般に有機化合物の同定で用いられる¹H NMR スペクトルは複雑なものとなる。従って、磁気共鳴法の生体系への適用においては、必要な情報を選択的にスペクトルに反映させるための方法論が重要となる。

本研究において、我々は特定の分子構造を持つ生体分子のみを選択的に計測する手法として、一定の核間移動を経験したコヒーレンスのみを選択的に検出する多重共鳴NMR法を採用し、生体内に存在する低分子に応用して生体の機能情報を抽出する手法の開発を行なった。計測対象としては、臨床における癌診断への応用を想定して、腫瘍において代謝が亢進するとされるコリンおよびグルコースを選択し、これらを¹³Cおよび¹⁵Nで安定同位体標識したもの (Fig. 1) について細胞や臓器への蓄積および代謝を観察した。

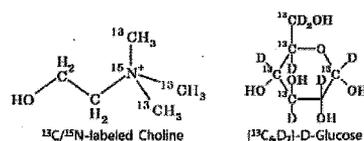


Figure 1 Structural formula of the ¹³C/¹⁵N-choline and ¹³C/²H-D-glucose.

分子イメージング, 腫瘍, 多重共鳴

○いがらし りゅうじ, とちお ひでひと, みずさわ けいご, うえひら こうせい, さんどう しんすけ, あおやま やすひろ, しらかわ まさひろ

2. 実験

腫瘍マウスを用いた計測実験においては、メスのBALB/cCrSlcマウス（体重15 g）を使用した。マウスに対する腫瘍の移植は測定の9日前、 4.0×10^6 個のcolon 26細胞を左後肢に皮下接種することにより行った。24時間絶食させた後、尾静脈注射により0.4 mgの $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -コリンまたは45 mgの $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-グルコースを投与し、投与1時間後にジエチルエーテル麻酔下で安楽死させ、癌組織、200 μL の血液、肝臓、腎臓、心臓を回収、重さを計量してTissueLyser (Qiagen) を用いて500 μL の10 % トリクロロ酢酸で破碎した。30分氷上でインキュベーションした後、破碎物を12,000 rpmで5分間、 4°C 下で遠心沈降して抽出液を回収した。抽出液は凍結乾燥した後に700 μL の D_2O を加え、更に13,200 rpmで30分遠心沈降した後、上清をNMRで測定した。NMR測定はすべて5 mm TCIクライオプローブを装着したAvance 700 (Bruker) にて298 K下で行った。測定データのプロセッシングと解析はTopspin 1.3 (Bruker) で行った。

3. 結果と考察

まず、培養細胞およびマウス生体内におけるコリンの蓄積を計測する実験を行った。この結果、酵母細胞やHeLa細胞において、蓄積した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ コリンを ^1H - ^{13}C - ^{15}N 三重共鳴NMRを用いることで選択的に検出することができた。また、ラベル化コリンを尾静脈投与した胆がんマウスから抽出した癌組織抽出物についても同手法によりコリンの選択的検出が可能であることを確認できた (Fig. 2)。

また $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-グルコースを胆がんマウスに尾静脈注入し、抽出した臓器についての測定も行った (Fig. 3)。 $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-グルコースは非交換性のプロトンを持たないため ^1H NMR によって検出されないが、その代謝産物は生体内の水或いは他の物質由来の非交換性プロトンを持つ可能性がある。更にその中には ^1H - ^{13}C - ^{13}C の構造を持つ化合物も存在する。例えばグルコースから解糖系を経て生成するピルビン酸、嫌気呼吸によりピルビン酸が乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) で還元されて生成する乳酸、あるいはピルビン酸がアラニントランスアミナーゼ (ALT) により生成するアラニンなどがこれに相当する。この様に $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-グルコースから生成する乳酸は代謝経路での重水素→プロトン化によって初めて検出されるので OFF-ON プローブとして機能することが期待できる。癌組織抽出物では、通常の1D ^1H NMR ではグルコース代謝物のピークを分離できないほど込み入ったスペクトルを与えた。これに対して ^1H - ^{13}C 二重共鳴による測定では、代謝物のピークを分離可能なスペクトルが得られた。更に ^1H - ^{13}C - ^{13}C 三重共鳴により測定を行ったところ、いずれの臓器でも乳酸 (4.28 ppm) およびアラニン (3.04 ppm) 由来のピークのみが極めて高い選択性で検出された。

以上の結果から、三重共鳴法により、腫瘍に蓄積するコリンおよび乳酸といったバイオマーカーがNMRにより選択的に検出がされる可能性が示された。

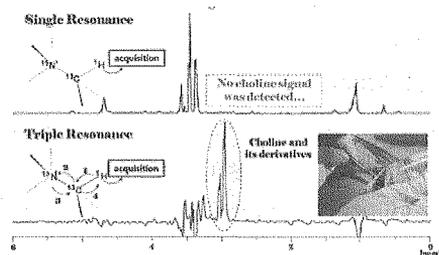


Figure 2 Single- and triple-resonance NMR spectra of tumor homogenate collected from a tumor-bearing mouse injected with $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -choline.

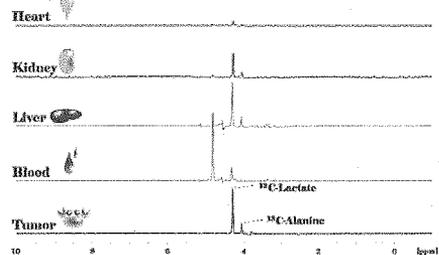


Figure 3 Triple-resonance spectra of organ homogenates collected from a tumor-bearing mouse injected with $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-glucose.

○林 ころこ、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

Protein expression using cold-shock vector with soluble protein tag and its application for NMR

○ Kokoro Hayashi and Chojiro Kojima

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

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). We reported the development of the pCold I-GST vector which combined pCold I vector with glutathione S-sepharose (GST) (Hayashi and Kojima, *Protein Exp. Purif.* 2008). Here, we developed the expression vector which combined pCold I vector with another three protein tag, maltose binding protein (MBP), protein G B1 domain (GB1) and thioredoxin (Trx). Additionally, we show the C-terminal tag which inhibits the protein degradation.

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 GST や 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。これまでに我々は pCold I ベクターと GST タグを組み合わせた発現ベクター、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、我々は GST 以外の可溶性タグと pCold I ベクターを組み合わせたベクターを構築し、発現検討

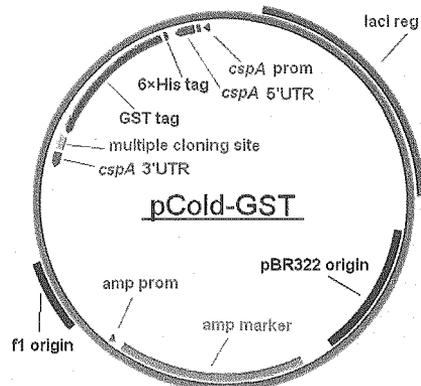


Fig. 1 Structure of pCold-GST vector.

キーワード：大腸菌大量発現系、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

を行った。また、発現段階で分解を受けやすいペプチドの調製において有用な C 末端タグについて報告する。

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。本研究では pCold I の His タグ配列とマルチクローニングサイトの間には *MBP*、*Trx*、*GB1* 遺伝子を導入したベクター、pCold-MBP、pCold-Trx、pCold-GB1 を作成した。これらのベクターは pCold-GST 同様、N 末端に His タグと可溶性タグ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、目的物と可溶性タグの間には極めて特異性の高い HRV3C protease の切断サイトを導入したため、タグの切断が容易である。

タンパク質の発現精製と NMR 実験

pCold-GST は、当研究室において高等動植物をはじめとする様々な生物種由来のタンパク質発現に適用しており、これまでに適用した 85 種類中、79 種類のタンパク質を可溶性画分に発現させることに成功している。Fig.1 は pCold-GST ベクターによって可溶性画分への発現量が顕著に増大した植物由来タンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルであり、pCold-GST を用いて調製可能になったタンパク質が立体構造を保持していることを示している。

昨年の NMR 討論会において、我々は C 末端に His タグを付加した発現系を用いて分解を受けやすいペプチドの発現精製例を示した。しかし、これは分解産物との分離に有用であるが分解抑制はできない。今回、C 末端にプロリン残基を付加することで、発現段階分解を抑制することができ、収率を上げることに成功した(Fig.2)。

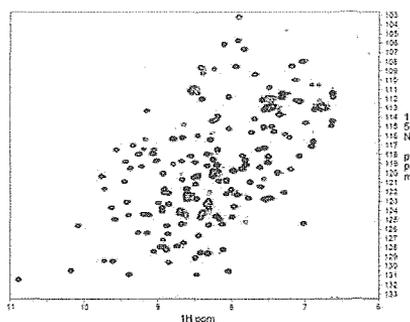


Fig.1 ^1H - ^{15}N HSQC spectra of plant protein (170 a.a.)

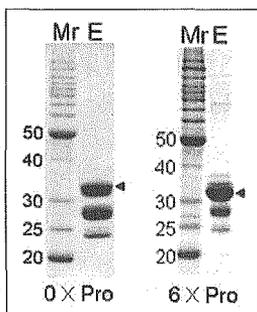


Fig. 2 Protein expression and purification of GST-tagged Tsr with or without C-terminal poly-proline residue. Black arrow indicates the molecular weight of target protein.

まとめ

pCold-GST ベクターは高い確率で可溶性画分への発現を可能にしており、これを利用して調製可能となったタンパク質（植物由来）は、良好な NMR シグナルを与えたことから、立体構造解析のためのサンプル調製に利用できると考えられる。また、C 末端へのプロリン残基の付加は発現段階での C 末端からの分解抑制に効果が見られた。発表では、種々の可溶性タグを用いた発現系の比較なども合わせて議論する。

データベースを利用したNMR主鎖シグナル自動帰属と立体構造解析

○小林直宏¹、阿久津秀雄¹、藤原敏道¹

¹阪大蛋白研

Automated assignment of NMR signals and structure analysis using structure and chemical shift databases

○Naohiro Kobayashi¹, Hideo Akutsu¹ and Toshimichi Fujiwara¹

¹Institute for Protein Research, Osaka University, Suita 565-0871, Japan.

The number of protein structures deposited in the PDB are now reaching 60,000, many of which for the last half decade has been accelerated by the comprehensive analysis for protein structures by structural genomics. This enables us to obtain a homologue structure of the target with high sequence identity much easier than it used to be. On the other hand, the recent developments of solution NMR techniques have successfully improved the cost and time of the experiment and analysis for study on a small protein, however, the assignment works are still intricate even if using the information of coordinate and chemical shift data of the homologue protein. In this study, we have developed a highly automated assignment system for NMR main-chain and C β signals which can incorporate information of known structure or assignments derived from database such as PDB and BMRB.

【序論】データベースにおけるタンパク質の立体構造情報は近年の構造プロテオミクスなどの貢献により加速度的に増え続け、2009年9月の時点で遂に6万件を超えようとしている。これにより配列相同性の高いホモログの立体構造が得られる機会は以前に比べ格段に増したと言える。一方でNMR主鎖シグナル帰属データは相互作用解析、動的性質の解析といった研究への応用が可能であるため極めて有用性が高い情報であるが、シグナル帰属は類縁タンパク質の情報を利用したとしても未だに煩雑な操作を多く含む手間のかかる作業である。また類縁タンパク質のシグナル帰属情報や立体構造情報の利用はデータ解析に役立つばかりか結果の妥当性を評価することにも有効であるがその反面、方針を誤ると恣意的な結果を与える危険な側面もある。本研究では既存の立体構造あるいはNMR化学シフトデータを用いたNMRシグナル帰属の自動化を行うプログラムシステムの開発を行い、帰属されたシグナルの化学シフトデータを用いたモデリングにより、安全で精度の高い立体構造の解析手法の実現を目的とした。

【方法】完全自動NMRシグナル帰属システム "assign_robot" は主としてC言語により記述され、LAMなどのMPIにより高速な並列計算が実行可能である。このプログラムは3次元主鎖帰属用3重共鳴スペクトル、HNCO, HNCACB, CBCA(CO)NHスペクトルより自動的に最適なthresholdを決定し、シグナルを自動検出する。検出されたシグナルをHN-¹⁵N 相関によるクラスタリングを行い、スペクトルの磁化移

Automated assignment, database, PDB, BMRB

○こばやしなおひろ、あくつひでお、ふじわらとしみち

動グラフに従ってスピンスystemを帰属する。既に本討論会2007年度大会(札幌1L5)において発表したペナルティ関数を用いた帰属確率行列アニーリング法を用いて、配列特異的な連鎖帰属を実行した。帰属に際して約30%程度の配列相同性を持つホモログをModeller9 ver.6を用いてモデリングした後、SPARTA ver. 2008.07.22を用いて化学シフトを予測し、残基タイプの保存性や溶媒露出度を考慮してペナルティ関数に取り込ませた。自動帰属の結果を検証するための化学シフト情報はBMRBよりダウンロードした。帰属された主鎖シグナルの化学シフトを元に更にTALOSによる主鎖二面角を推定し、それを制限情報として与えたModeller計算を行った。これらの計算にはQuadCore CPUを搭載した標準的なLinux-PCを利用した。

【結果と考察】計算対象として選んだ118残基長の α/β タンパク質(AB118)、および219残基長の α -ヘリックスタンパク質(A219)の結果を表1に示す。

表1 AB118, A219に対するNMR主鎖自動帰属結果と立体構造モデルの決定精度

| Target | PDB | Template ^a | Assign ^b | CPU time ^c | RMSD ^d |
|--------|------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|
| AB118 | 1IV5 | 1FAO(31%) | 94% (100%) | 30min | 1.4Å (1.5Å) |
| A219 | 2EE4 | 1TX4 (31%) | 94% (98%) | 300min | 2.0 Å (2.2Å) |

a: TemplateのPDBID と配列相同性(括弧内)。templateとのalignmentについては、溶媒露出度と配列保存性を考慮し、疎水コア内部の保存残基とその前後1残基を2次構造に関してのみ実行し、modellerによる立体構造モデリングを行った。得られたベストスコアの立体構造からSPARTAによる化学シフト予測を行い、60%程度の限定的な予測化学シフトテーブルを得た。 **b:** アニーリング計算には予測化学シフトテーブルを考慮させたペナルティ関数を用いた。また連鎖帰属に際してはCO($i-1$), C α (i), C α ($i-1$), C β ($i-1$)のシグナル情報を利用した。各サイクルにおけるアニーリング計算により出現確率が80%を超える残基の帰属を確定する方法を用い、6サイクルの計算を行った。表に帰属の達成率と正解率(括弧内)を示す。 **c:** 自動帰属は LAM ver.7.1.4によりCore i7の4コアを用いて並列実行した。 **d:** RMSDは目標立体構造の2次構造部位、主鎖原子C', N α , C α に対する値、括弧内はmodellerのみよる結果である。

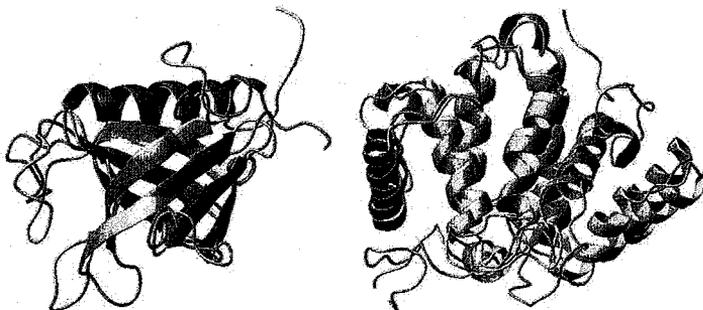


図1 Modellerにより予測された構造(dark gray)と正解構造(light gray)との比較。A: AB118, B:A219

表1に示すようにC β (i)のような連鎖帰属に重要なシグナル情報が欠損しても高い精度で実行できることが示された。またモデリングされた立体構造(図1)もホモロジーモデリングのみで予測されるより僅かではあるが改善が見られ、タンパク質の分子生物学的機能推定などに充分利用できるレベルであることが示された。また30%ホモログの立体構造と化学シフトデータを用いることで、NOEベースで決定された立体構造の正当性についても評価可能であることを示すことが出来た。

リジン¹³Cメチル化法を用いたユビキチン側鎖のNMR解析

○服部良一, 大木出, 古板恭子, 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

NMR Analysis of Ubiquitin Side Chain Using ¹³C-Methylation of Lysine

○Yoshikazu Hattori, Izuru Ohki, Kyoko Furuita and Chojiro Kojima

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

NMR has a great advantage for studying protein structure, dynamics and interaction with other biomolecules. However, NMR analysis of big molecules is not easy. Methyl probes based on methyl-TROSY are recently known to be effective to investigate macromolecular complexes. Thus efficient method to introduce methyl groups is required to be developed. In this study, we analyzed ¹³C-methylated lysine side chain of ubiquitin and assigned the correlation spectrum. Moreover, titration of yeast ubiquitin hydrolase suggests that the detection of ¹³C-methylated lysine is available for elucidating protein-protein interactions.

[序論] NMRはタンパク質の相互作用解析の手段として広く用いられているが、培養系での同位体の均一ラベルによる解析は、分子量制限により応用範囲が限られている。これまで高分子量タンパク質の解析法として、トロント大のLewis E. Kayらによる、ロイシンなどの疎水性残基のメチル基を¹³Cラベルして用いるメチルTROSY法が知られているが、本研究では塩基性アミノ酸であるリジン側鎖をメチル化する手法 (Figure 1) を用いた。

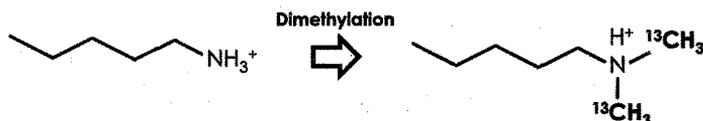


Figure 1. Methylation of lysine side chain

近年、比較のおだやかなリジンのメチル化法が考案され、結晶構造解析分野で多用されているが、NMRにおいては、古くはリジン残基のpKaの決定などの解析手法として用いられていたものの、最近ではリジンのメチル化を用いた報告はほとんどない。そのため、新しいリジンのメチル化法を用いたNMRによるタンパク質解析手法の開発を目的とした。本研究では、ユビキチン (8.6 kDa, 以下Ub) をリジンのメチル化により¹³Cラベルし、その化学的性質を解析した。また、酵母ユビキチン加水分解酵素 (26 kDa, 以下YUH) とのタイトレーション実験を行い、相互作用解析における妥当性を検証した。

[方法] Ubの¹⁵Nおよび¹⁵N/¹³Cラベル体、Ub (K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K48R, K63R) の¹⁵Nラベル体、およびYUHのノンラベル体を大腸菌の大量発現系で調製した。

リジン, タンパク質化学修飾, 分子内相互作用

○はっとりよしかず, おおきいずる, ふるいたきょうこ, こじまちょうじろう

メチル化反応にはborane-dimethylamine complexと ^{13}C -formaldehydeを用い、残留試薬はゲル濾過クロマトグラフィーで除去した。

NMR測定はAVANCE 500, 800 (Bruker Biospin) を用いて、 ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HSQCによる主鎖アミド基と側鎖メチル基の検出、非線形HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACBによる主鎖の帰属を行った。データ解析にはNMRPipeとSparkyを用いた。主鎖アミド基の化学シフト変化は $\Delta\delta = [\Delta\delta_{\text{H}}^2 + (\Delta\delta_{\text{N}}/5)^2]^{1/2}$ より求めた。

[結果と考察] メチル化Ub変異体の ^1H - ^{13}C HSQC測定により帰属を行った (Figure 2)。結晶構造との対応から、それぞれの化学シフトは静電的環境を鋭敏に反映していることがわかった。その中で、側鎖アミノ基が酸性アミノ酸側鎖と水素結合をつくるK11とK27は、シグナルが二分裂していた。pHを高くすると分裂が抑えられることから、脱プロトン化により結合が弱まり、メチル基の回転が自由になると考えられる。また、メチル化前後の ^1H - ^{15}N HSQCに差が見られたため、三次元NMR測定による主鎖の帰属を行い、化学シフト変化を解析した (Figure 3)。大きな変化を示したのは、Ubの内部に埋もれているK27の周辺残基であった。

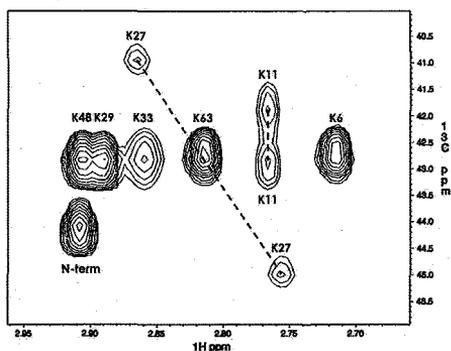


Figure 2. ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of ^{13}C -methylated Ub (0.1 mM, pH 6.8, 303 K)

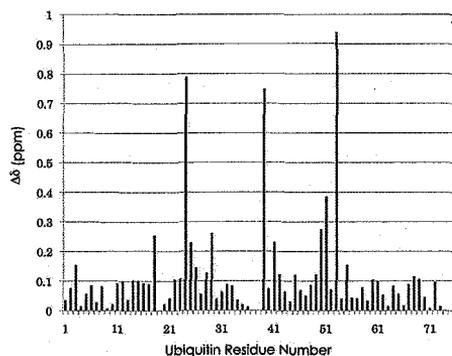


Figure 3. Chemical shift perturbations of backbone amide groups caused by lysine methylation

メチル化Ubに対するYUHのタイトレーション実験 (Figure 4, 5) では、特異的な化学シフト変化を示す残基があった。これらは、Ub-YUH複合体の結晶構造中で相互作用面付近に存在しており、すでに報告されているNMRを用いた相互作用解析の結果とも矛盾しなかった。このように、タンパク質複合体の解析において、NMRを用いたメチル化リジンの検出は有効であることがわかった。

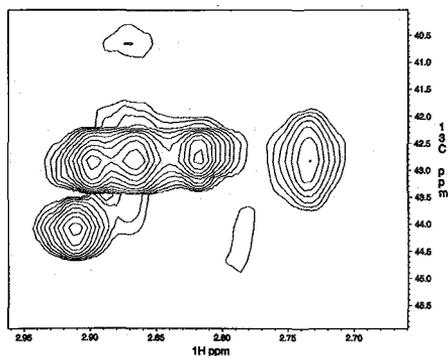


Figure 4. ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of ^{13}C -methylated Ub with equal molar YUH

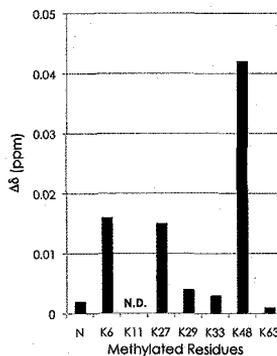


Figure 5. Chemical shift perturbations of methyl protons caused by YUH addition

NMRと質量分析を用いた高精度メタボリック・プロファイリング法

○藤村 由紀¹, 三浦 大典¹, 梶井 聡子², 須永 絵理⁵, 根本 直^{1,3,5},
高橋 勝利^{1,3,5}, 割石 博之^{1,3,4}

¹九大・レドックスナビ,²九大・生資環,⁴九大・バイオアーク,
⁴九大・農学研究院,⁵産総研

High-Precision Metabolic Profiling with NMR and Mass Spectrometry

○Yoshinori Fujimura¹, Daisuke Miura¹, Satoko Kakoi², Eri Sunaga³, Tadashi Nemoto^{1,3,4},
Katsutoshi Takahashi^{1,3,4}, and Hiroyuki Wariishi^{1,4,5}

¹Innovation Center for Medical Redox Navigation, ²Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, ³Bio-Architecture Center, ⁴Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan; ⁵National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba & Odaiba, Japan.

Metabolic profiling (MP) is a powerful methodology to discover novel biomarkers as an indicator metabolite of a biological state. The identification of chemical structure of metabolites is a key strategy for functional and applied studies in pharmaceutical research or clinical diagnosis. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and mass spectrometry (MS) are often used as analytical platform for MP. However, determination of chemical structure of candidate biomarkers from an independent data of NMR or MS is very difficult because each data shows only a partial structure or molecular weight information of metabolites, respectively. In the present study, we examined a possibility of the integration of NMR- and MS-based MP to develop a novel strategy for detecting many metabolites and reducing the number of candidate biomarker metabolites as well as identifying the chemical structure of unknown metabolites.

近年、サンプル調製が容易であり、比較的高感度かつ定量性に優れている NMR を用いたメタボリック・プロファイリング (MP) が注目を集めている。この手法は、混合物試料を多変量統計解析により各サンプル群を識別するには極めて有効な解析法であり、病理診断や毒性評価とともにバイオマーカー探索などに汎用されているが、バイオマーカー候補として見出されるピークは化合物の部分構造のみを示す場合が多い。一方、質量分析を用いた MP も行われているが、見出されるピークは化合物の分子量を示し、そこから化合物の構造が決定出来ることは極めてまれである。

バイオマーカーの高精度スクリーニングのためには、できるだけ多くの代謝物を検出する一方で、マーカー候補を精度よく絞り込む戦略的な方法論の開発が必要不可欠である。そこで本研究では、NMR 情報と MS の精密質量および MS/MS 情報を相補的に利用した、新たなバイオマーカー同定戦略の可能性について検討した。

Metabolic profiling, NMR, MS

○ふじむらよしのり, みうらだいすけ, かこいさとこ, すながえり, ねもとただし,
たかはしかつとし, わりいしひろゆき

【方法】

高血圧自然発症ラット SHR (健常ラット WKY; 13 週齢雌) の夜間蓄積尿を測定対象として、複数の分析プラットフォームを用いた解析、すなわち、 $^1\text{H-NMR}$ 分析ならびにエレクトロスプレーイオン化法を用いた高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (ESI-LC-MS) およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化法を用いたフーリエ変換イオンサイクロトン共鳴質量分析計 (MALDI-FT-ICR-MS) を用いた質量分析 (ネガティブイオンモード) を行った。なお、 $^1\text{H-NMR}$ 分析 (ECA-800: JEOL) は Presaturation 法により行った。また ESI-LC-MS 分析 (LCMS-IT-TOF: 島津製作所) は、分離モードの異なる逆相 (RP) および親水性相互作用 (HILIC) カラムを用いて行った。MALDI-FT-ICR-MS 分析 (APEX Q94e: ブルカー・ダルトニクス) には、9-aminoacridine をマトリックスとして用いた。各種測定によって得られたデータは、NMR ケミカルシフト情報: ppm/area あるいは MS 分子量情報: $m/z/intensity$ からなるマトリックスデータへと変換し、SIMCA-P+ (Umetrics) を用いた多変量統計解析 (主成分分析 PCA および判別分析 OPLS-DA) に供した。

【結果および考察】

個々の分析プラットフォームで特徴的な代謝物とともに、異なるプラットフォーム間でオーバーラップする代謝物がいくつも存在することが明らかとなった。このことは、幅広い代謝物の検出や信頼性の高いバイオマーカー候補の絞り込みを行うために多元的分析法が役立つ可能性を示している。そこで、各種プラットフォームで得られた WKY と SHR の代謝物ピークプロファイルが多変量統計解析により比較検討した。その結果、PCA 解析では、いずれの分析プラットフォームにおいても WKY と SHR で異なるクラスターの形成が認められ、高血圧症の発症によって尿中の代謝物プロファイルが変化することが示唆された。そこで、このような 2 群間の相違に寄与する代謝物、すなわち、疾病バイオマーカー候補を明らかにするため、OPLS-DA 解析を行った。得られたローディングデータの S-plot 分析により、2 群間の相違に寄与する代謝物ピークがいくつも観察された。そこで、これらの代謝物ピークのうち、異種プラットフォーム間 [MALDI vs ESI (RP+HILIC)] でオーバーラップするピークを選択することで、絞り込みを行い、さらに、該当するピークの MS/MS 情報および FT-ICR-MS による超高精度の精密質量情報と NMR ケミカルシフトによる部分構造情報を合わせたデータベース照合により、該当ピークの化学構造を容易に同定することができた。

以上の結果から、NMR と MS を組合せた多元的 MP 法は、バイオマーカー候補となりうる代謝物情報をより高精度に把握するだけでなく、生体試料のメタボローム解析に必要な不可欠な標品非依存的な代謝物同定に資する極めて有用な基盤技術となりうることを示された。

血管径の変化によるガドリニウム造影剤濃度推定誤差の検討

○中村和浩¹, 近藤靖¹, 水沢重則¹, 曾雌泰央², 陳国躍², 木下俊文¹

¹秋田県立脳血管研究センター

²秋田県立大学・システム科学技術学部

Estimation error of gadolinium tracer concentration relating to blood vessel diameter

○Kazuhiro Nakamura¹, Yasushi Kondoh¹, Shigenori Mizusawa¹, Yasufumi Soshi², Guoyue Chen², Toshibumi Kinoshita¹

¹Akita Research Institute for Brain and Blood Vessels, Akita, Japan.

²Faculty of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University, Akita, Japan.

Cerebral blood flow (CBF) in rat ischemic tissue is not properly estimated using dynamic susceptibility contrast (DSC) technique. An assumption of proportional constant between signal intensity and tracer concentration should be different between normal and ischemic tissue. We simulated the NMR signal reduction of DSC technique using the vessel model including different vessel diameter with reasonable physiological condition. The results suppose the proportional constant in the ischemic tissue is increased according to the vessel diameter distribution.

1. はじめに

我々はガドリニウム(Gd)造影剤を用いた動的磁化率コントラスト(DSC)法および、持続的スピンラベリング(CASL)法によりラット脳虚血領域での脳血流量(CBF)推定値を比較検討してきた。この結果、正常血流量から50%以上のCBF低下領域においてDSC法とCASL法で相対的血流低下量が異なることを報告してきた[1, 2]。DSC法では、MRI信号強度の変化(ΔR_2^*)が組織の造影剤濃度に比例するという関係を利用する。この比例定数は一般に定数と考えられるが、プロトンの拡散距離を考慮すると、血管径や血管密度によってその比例係数は異なることが知られている[3]。我々は、この比例係数の変化について、シミュレーションモデルを用いて検討することにした。シミュレーションモデルではFig. 1に示すように、血管を模擬した磁化率の異なる円柱を一定範囲内にランダムに配置する。実際の生体モデルに近づけるため、血管径分布を正規分布させてランダムに配置した血管モデルについても合わせて検討した。

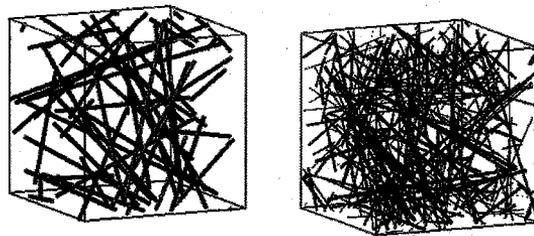


Fig. 1 Blood vessel distribution model. The model with same vessel radius (left) and different distributed radius (right) are shown.

脳血流量計測、Gd造影剤、磁化率効果

○ なかむらかずひろ, こんどうやすし, みずさわしげのり, そしやすふみ, ちんこくやく, きのしたとしふみ

2. 方法

プロトンの拡散距離を考慮したうえで、造影剤の磁気遮蔽効果を計算し、造影剤濃度と信号強度の関係をモデル論的に計算する手法が知られている[3]。我々はこの手法を参考にした。シミュレーションモデルは、Matlab (Mathwork社, USA) で作成し、アルゴリズムの確認をおこなった後、計算処理速度を考慮し、C言語でプログラムを作成した。水素原子核は、時間 Δt 毎にx, y, z各方向に、平均0, 標準偏差 $\sqrt{D\Delta t}$ でランダムに移動する。Dは拡散係数である。個々の磁気じょう乱体が水素原子核に及ぼす磁界変化の総和から、水素原子核移動先の磁界を求め、磁界変化量から位相変化量を計算し、個々の水素原子核の位相変化量は100msまで計算した。また、水素原子核40000個の位相変化を求め、平均値を計算した。測定される信号強度は、位相変化量に基づき計算され、この信号強度変化から勾配磁場法とSpin Echo法を用いた信号強度変化である ΔR_2^* と ΔR_2 をそれぞれ求めた。また、磁気じょう乱体の半径を変化させてシミュレーションモデル実験をおこなうことで、血管径増大に伴う信号変化を模擬した。

3. 結果・考察

血管径分布を正規分布させてランダムに配置した血管モデルについて検討した結果、その平均血管径で考えれば、単一血管径からなるモデルとほぼ同等のシミュレーション結果であった。血管径を増大させ、信号減推量を模擬した結果をFig. 2に示す。この図は、血管の数を増加させ、脳血液量を増加させた場合に比べて、血管の数は同数で血管径が増大した場合に信号減推量がどの程度大きくなるかを示している。血管径がおよそ2倍になると信号変化は単純な体積増加に比べて1.5倍程度信号減衰量が大きくなった。磁気じょう乱体である血管が増加すれば、信号強度は減衰するが、同じ脳血液量の増加であっても、配置される脳血管径が異なることで、信号減推量が異なることを示している。このことは、造影剤濃度に変換する比例定数が血管径の分布で見かけ上異なることを意味する。虚血領域で観察される脳血液量の増大は、血管の配置は変わらず、それぞれの血管径が増大するためだと考えるのが生理学的には妥当であり、この条件下では脳虚血領域で血管径が増大していることにより比例定数が増加し、DSC法では虚血領域で脳血流量の過大評価されることが説明できたと考えられる。

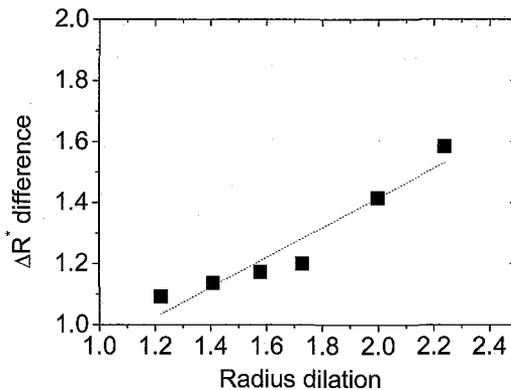


Fig. 2 Simulation result of NMR signal reduction ratio with different radius dilation.

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] Boxerman et al., MRM, 34 (1995), 555-566

マジックエコー DANTE 法による自己再結像スライス 選択

○増本秀史¹、橋本雄幸²、松井茂¹

¹筑波大学大学院数理物質科学研究科

²横浜創英短期大学情報学科

Self-refocused slice selection by the magic echo DANTE method

○H. Masumoto¹, T. Hashimoto² and S. Matsui¹

¹ Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki

² Department of Information Technology, Yokohama Soei Junior College,
Yokohama, Kanagawa

The method of slice selection proposed for solid-state MRI by combining DANTE selective excitation with magic-echo (ME) line narrowing requires a rephasing period 0.58 times the DANTE excitation period. The added rephasing period results in a significant loss of sensitivity due to transverse relaxation. To solve the sensitivity problem, we make use of the self-refocusing effect of the 270° Gaussian-shaped soft pulse by introducing a 270° flipping Gaussian modulation to the ME DANTE method. This eliminates the rephasing period. The utility of the improved method is demonstrated by experiments performed on test samples of adamantane and polycarbonate.

【導入】我々は液体用スライス選択法 DANTE と line narrowing のための Magic Echo を組み合わせた、固体 MRI 用スライス選択法 Magic Echo DANTE 法（以下、ME-DANTE）を開発した[1]。この方法では、液体で通常用いられる sinc 関数状に変調した RF によるスライス選択法と同様に、スライス選択に必要な磁場勾配の影響で RF 磁場による DANTE 励起時間内に横磁化の位相に Dephasing が生じる。これを補正するために Rephasing が不可欠であり、励起時間の約半分程度の時間が必要となる。しかし、核磁化の横緩和時間が短い固体においては Rephasing 時間での信号減衰が致命的になりかねない。そこで我々は、Emsley らによって 270° Gaussian パルスの自己再結像効果を用いた選択励起法の報告に注目した[2]。ME-DANTE に 270° Gaussian の自己再結像効果を組み込むことで、Rephasing 時間をゼロにすることを試みた。

【シーケンスとシミュレーション】270° Gaussian を ME-DANTE に組み込んだシーケンスを Fig. 1 に示す。一般に、ガウス関数は半値幅を決定すると一意的にその形状が決まる。我々はまず Bloch 方程式に基づいたシミュレーションを行い、最後の DANTE RF

slice selection; MRI; self-refocused

○ますもとひでふみ, はしもとたけゆき, まついしげる

パルス印加終了時刻においてRephasingが最適となるようなガウス関数変調を探索した。シミュレーションはサンプルチューブ内の水を想定して行い、用いたシーケンスはFig. 1からME (TREV-8)を取り除いたものである。 $\tau_D = 120\mu\text{s}$ として、横緩和時間はスライス形状の正確な確認のため無限大としている。

【結果と考察】シミュレーションにより得られたスライス形状を Fig. 2 に示す。比較のため DANTE RF パルスを 90° Gaussian 変調し、Rephasing 時間を有限に取った従来法での結果も示してある。従来法に比べて若干 side lobe があるが、 270° Gaussian 変調の場合でも十分なスライス選択ができることがわかる。

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】 1. S. Matsui, H. Masumoto and T. Hashimoto, *J. Magn. Reson.* 186, 238-242 (2007)

2. L. Emsley and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* 82, 211-221 (1989)

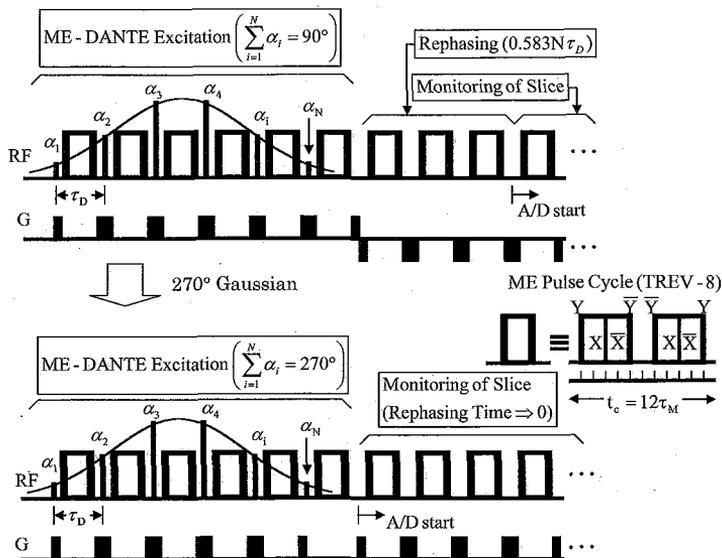


Fig. 1. Pulse sequences for the conventional (upper) and self-refocused (lower) ME DANTE method of slice selection

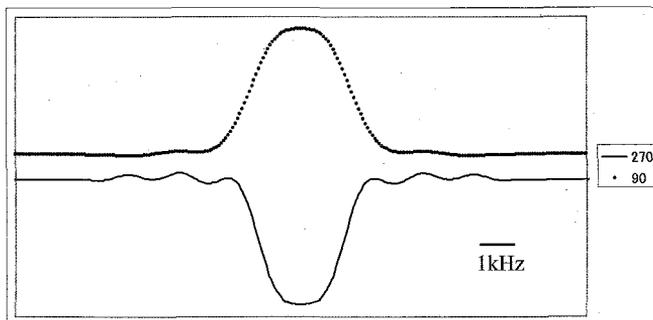


Fig. 2. Simulation results of the DANTE using the 270° and 90° flipping Gaussian modulations

P105 フェリチン水溶液およびゲル試料における水の横緩和速度

○高屋 展宏、渡邊 英宏、三森 文行
国立環境研究所

Transverse relaxation rate of the water in ferritin solution and agarose gel

○Nobuhiro Takaya, Hidehiro Watanabe, Fumiyuki Mitsumori

National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki, Japan

We recently reported that the apparent transverse relaxation rate ($R_2^\dagger = 1/T_2^\dagger$) of the tissue water in human brain is well explained with a linear combination of relaxations due to ferritin iron ([Fe]) and the macromolecular mass fraction ($f_M = 1 - \text{water fraction}$). In this study, we attempted to make a simple model system where the same relaxation analysis is applicable. The model system was constructed by adding various amounts of agarose to a ferritin solution and gelling it. Relaxation rate of the gel appears to be analyzed in the same way as human brain. It allows us to analyze the relaxation mechanism in a wider range of B_0 .

【はじめに】

我々はヒト脳in vivo測定により、脳組織水の横緩和速度が組織内に含まれるフェリチン鉄([Fe])と高分子量分画(f_M)によって概ね決定されていることを示した[1,2]。この報告では、モデル系としてフェリチン水溶液とアガロースゲル中の T_2 緩和時間の測定を行いin vivo測定で用いた横緩和速度が鉄濃度と高分子量分画の線形和で説明できるとする提案 $R_2^\dagger = \alpha [Fe] + \beta f_M + \gamma$ (定数項) をin vitroで再現できるか否か検討する。

【方法】

水溶液の試料は精製したウマのフェリチンを[Fe]値で0~60mg/100mgになるように濃度を変えて調製した。また、水の運動速度を制限するためにアガロースを0.5, 1.0, 1.5%になるように加えてゲル化させた試料も調製した。 T_2 測定はCPMG法を用い室温で1.9, 4.7, 9.4, 11.7, 14.1, 18.8Tの6種類の異なる磁場強度で測定を行った。

1.9, 4.7TはVARIAN社製の横型イメージング装置、9.4, 14.1TはVARIAN社製の縦型NMR装置、11.7, 18.8Tは日本電子社製の縦型NMR装置を用いた。シークエンスの条件は $90^\circ, 180^\circ$ パルスに270ms, 540msのsquare pulseを用いてエコースペーシングは2msで統一した。

【結果と考察】

フェリチン水溶液の横緩和速度 (R_2) は [Fe]に比例して直線的に増大し (図1)、その比例係数 (k_2) は観測磁場強度に依存して直線的に増大した。この結果はin vivo脳の状況を再現している。一方、アガロースゲルにおいて[Fe]を変化させた場合も R_2 はこれに比例して増大した。 k_2 値は水溶液の場合と同様、観測磁場強度に依存して直

フェリチン、横緩和機構、鉄

○ たかや のぶひろ、わたなべ ひでひろ、みつもり ふみゆき

線的に増大した。測定で得られた R_2 を $R_2 = \alpha [\text{Fe}] + \beta f_{\text{agarose}} + \gamma$ (f_{agarose} : アガロース濃度(%)) の式で重回帰分析した結果、鉄の寄与する項の係数 α とアガロースの寄与する項の係数 β が得られた(表1)。 γ の値は鉄、アガロースの項が共に0の場合、すなわち、鉄、アガロースゲルが共に含まれていないサンプルの R_2 の実測値を用いた。すべての磁場強度において、重決定 r は非常に高く、この結果より $[\text{Fe}]$ とアガロース濃度は独立して直線的に R_2 に寄与していることが示された。すなわち、このモデル系ではin vivo測定における R_2^{\dagger} が $[\text{Fe}]$ と f_M 双方に直線的に依存するモデル $R_2^{\dagger} = \alpha [\text{Fe}] + \beta f_M + \gamma$ と同様の解析が可能であることを示す。さらに重回帰分析により得られた係数 α を磁場強度に対してプロットすると直線的に増大していることが分かる。これは超常磁性を示すフェリチン鉄の緩和特性を示している(図2)。これらの結果より、今回作成したモデル系による測定は、ヒト脳組織水の横緩和速度の機構解明の一助になると考える。

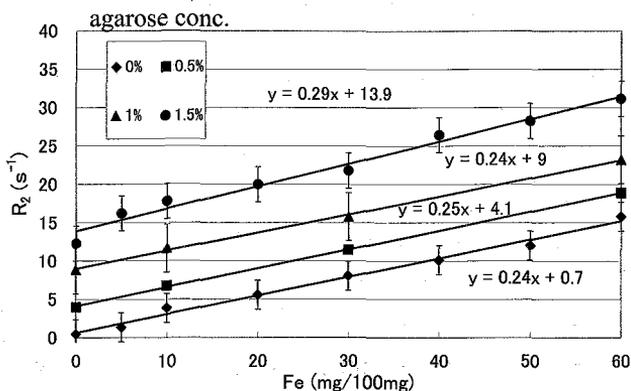


Fig.1. R_2 values of water as a function of the ferritin iron concentration ($[\text{Fe}]$) in ferritin solution and agarose gels (0.5 ~ 1.5%).

| B_0 | 1.9 T | 4.7 T | 9.4 T | 11.7 T | 14.1 T | 18.8 T |
|-------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| α | 0.101 ± 0.002 | 0.248 ± 0.002 | 0.442 ± 0.01 | 0.548 ± 0.008 | 0.706 ± 0.014 | 0.832 ± 0.018 |
| β | 8.92 ± 0.15 | 9.37 ± 0.07 | 10.6 ± 0.36 | 10.1 ± 0.29 | 10.9 ± 0.47 | 11.6 ± 0.62 |
| γ | 0.350 | 0.430 | 0.380 | 0.420 | 0.305 | 0.42 |
| correlation coefficient | 0.996 | 0.992 | 0.983 | 0.992 | 0.988 | 0.967 |

Table 1. Parameters of α and β obtained with a multiple regression analysis on the observed R_2 values at various B_0 strengths in ferritin solution and gels. γ is obtained with a buffer solution containing no ferritin nor agarose.

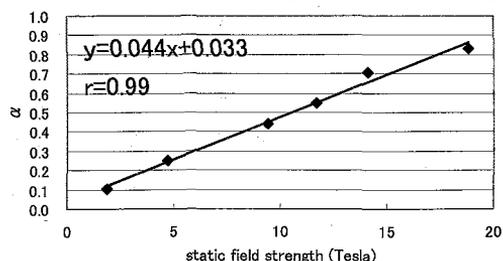


Fig.2. Linear relationship observed α and B_0 .

【参考文献】

[1] Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Garwood M: Magn. Reson. Med.,58, 1054 (2007)
 [2] Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N: Magn. Reson. Med., in press (2009)

高磁場環境対応の高性能非磁性薬液注入装置の開発

○平川慶子¹, 森川秀行², 村木秀樹², 佐藤格夫⁴, 小池薫³, 増野智彦⁴, 大野曜吉¹

¹日本医科大学 NMR 研究施設

² (株) ユニフローズ

³京都大学 初期診療・救急医学

⁴日本医科大学 救急医学

Injection system especially designed for clinical and analytical use in a high magnetic field strength above 7 tesla

Keiko Hirakawa¹, Hideyuki Mori², Hideki Muraki², Norio Sato⁴, Kaoru Koike³, Tomohiko Masusno⁴ and Youkichi Ohno¹

¹NMR laboratory, Nippon Medical School

²Uniflows Co. Ltd.

³Department of Primary Care & Emergency Medicine, Kyoto University³⁾

⁴Department of Emergency and Critical Care Medicine, Nippon Medical School⁴⁾

We have succeeded in development with MR injection system designed for use in all MR Scanner field strengths up to and beyond 7T. Our device uses The new device enables to control the pump hydropneumatically with an improved space-saving design. The device has proven reliability and high performance enough to clinical practice.

【背景】MRI 診断は、医療技術として、今日広く臨床応用されている。特に、脳症、髄膜炎、脳梗塞等の脳 MRI の有用性は極めて高く、急性症状が強く、迅速な確定診断が必要とされる小児の高熱性の疾患においても、有用性が高いとされている。3T 以上の高磁場装置の導入も急速に拡がり、測定技術・画像解析法の進歩、優れた造影剤の開発に伴って、迅速・高情報量かつ高画質の画像測定が日常的に行われるようになってきた。

しかしながら、MRI 装置の設置環境は強磁界空間であるために、医療現場での画像測定実施においては、磁場の乱れによる性能低下および安全確保の観点から磁性体の持ち込みは厳禁である。また、MRI の検出信号に悪影響を及ぼす電気ノイズの発生の可能性がある電気製品も高画質の画像測定には不適である。

シリンジポンプ, 非磁性

○ひらかわけいこ, もりかわひでゆき, むらきひでき, さとうのりお, こいけかおる, ますのともひこ, おおのようきち

このため、医療現場で広く使われている輸液ポンプ・シリンジポンプといった薬液注入装置は、磁性体を含み、磁気モーターが使用されているために、MRI 室への持ち込みが禁止されている。MRI 室対応の装置もすでに開発はされているが、高精度・安価、操作性・メンテナンスのすべてを満たす製品はない。実際には、治療の都合上持続的な薬剤投与が必要な症例も多く、撮像中の体動による画像の乱れが懸念される小児においては、撮像中の鎮静剤持続投与が必要になる場合もある。一般の医療施設では、不本意ながら MRI 適用外となってしまう患者が多いのが現状である。以上の背景から、3T 以上の高磁場の MRI 装置内でも安心して使用できる、汎用性の高い高性能の非磁性薬液注入装置が必要であると考え、新たに医療現場で実用可能な高磁場 MRI 装置対応のシリンジポンプを開発した。

【開発の経緯】高磁場 MRI 室用シリンジポンプとして開発すべき要素は①非磁性であること②電気ノイズを発生しないこと③高精度の速度・液量制御が可能であること④安全性・操作性・メンテナンスにすぐれた仕様を実現できること⑤小型・安価であることであると考え、NMR 技術者・臨床医・輸液ポンプ開発に実績のある企業との共同研究を行った。

【装置の概要】強磁場空間である MRI 装置あるいは周辺には磁性体や電気製品を一切使用しないことが必須と考え、MRI 室内には非磁性体の薬液注入用シリンジおよびシリンジ駆動用複動型液圧シリンダからなる①シリンジ部を設置し、MRI 室外（非磁場環境）に動力側液圧シリンダ・動力発生用モーターおよびコントローラーからなる②動力部を設置することとした。①および②の両シリンダ間は、非磁性液を充填後、外部から密閉した非磁性配管でつなぎ、ハイドロニューマチックなコントロールが可能な装置を試作した。小動物用 7T MRI 装置内で、高磁場環境内で問題なく高精度の動作が確認できた。この結果、少ない構成要素を用いて、小型・安価かつ操作性に優れ、シンプルで高精度の仕様が可能なポンプの製品化が可能となった。

【考察】我々が開発した装置は MRI 室に設置するシリンジ部が完全に非磁性であり、電気部品を全く用いておらず、7 テスラ以上の高磁場 MRI 装置内への設置も可能なことが確認できた。①小型・操作性・安全性の観点から、患者・医療従事者および装置の安全と利便性が確保される。②磁場・電場の乱れがないために、高画質の画像測定が期待できる。③シリンジ部を患者近くに設置できるために、薬液の浪費を防ぐことができる等の利点があり、医療従事者の負担の軽減、MRI 装置稼働率の向上、高磁場 MRI 画像診断患者の適用拡大等による医療の質向上が期待できる。

本技術は、高磁場 MRI 装置を用いた動物実験研究や高分解能 NMR 装置におけるシリンジポンプによる液体持続注入（合成反応・酵素反応等のリアルタイム NMR 観測等）への応用等も可能であり、これまで、強磁場空間ゆえに不可能であった実験研究への応用が実現できると考えている。

— 透析治療の患者血漿と廃液の解析

○藤原正子¹、安藤一郎^{1,2}、根本直²、竹内和久^{1,3}、今井潤¹¹東北大・薬 ²産総研・バイオメディシナルセンター³(医)宏人会中央クリニック**Clinical Application of ¹H-NMR Metabolomics to Hemodialysis**○Masako Fujiwara¹, Itiro Ando^{1,2}, Tadashi Nemoto², Kazuhisa Takeuchi^{1,3}, Yutaka Imai¹¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan.² Biomedical Information Research Center, AIST, Tsukuba, Japan.³CKD Center, Koujinkai Central Hemodialysis Clinic, Sendai, Japan

Plasma from patients of pre- and post- hemodialysis together with their waste-fluid during dialysis treatment were collected and measured by 600 MHz NMR spectroscopy. Spectral patterns of plasma between pre- and post- dialysis were clearly discriminated together with significant fluctuations in the level of low-molecular-weight metabolites. Several metabolites such as lactate and alanine have decreased with the different ratio from that of creatinine, which suggested endogenous generation during treatment. Spectral quantitation of these metabolites in plasma with high density of proteins was attempted to monitoring dialysis treatment.

＜はじめに＞ 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把握し解析する。昨年本会で慢性腎臓病とその進行した病態である血液透析を行う患者への応用を報告した。透析患者血漿のスペクトルのPCA解析の結果、治療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。今回は、これら代謝物の変動量を求め、透析による内在的代謝の変化を解析する。これによって病態把握や治療のモニターや管理の新たな指標を探索する。

＜対象＞透析患者の透析直前と直後の血液と治療中の廃液を病院から収集した。

＜方法＞血漿は200 μLに生理食塩水400 μLで薄め、廃液はそのまま600 μL、各々D₂O、TSP-d₄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。スペクトル処理および解析にはALICE 2 for metabolome (JEOL Ltd.)を用いた。各代謝物はスペクトルのピーク積分値を求めることで定量したが、TSPが多量のアルブミンに吸着するため、TSPは定量の内部標準にはならない。蟻酸カルシウムを定量の標準として添加することで正確な定量を行った。

＜結果＞透析中のラクテートの増加は予期せぬものであり、元の透析液にも含まれないため、体内からの供給が考えられる。その他にアラニン、バリンなどさらに蟻酸も、クレアチニンとは違う見掛けの透析率を持つことがわかった。似たような分子量の低分子の透析効率が違うことは従来報告がない。透析廃液も時間を追って測定したところ、廃液にも人によってはラクテートなどが増加しており、病態との関連が示唆される。

キーワード：メタボロミクス、パターン認識、血液透析

○ふじわらまさこ、あんどういちろう、ねもとただし、たけうちかずひさ、いまいゆたか

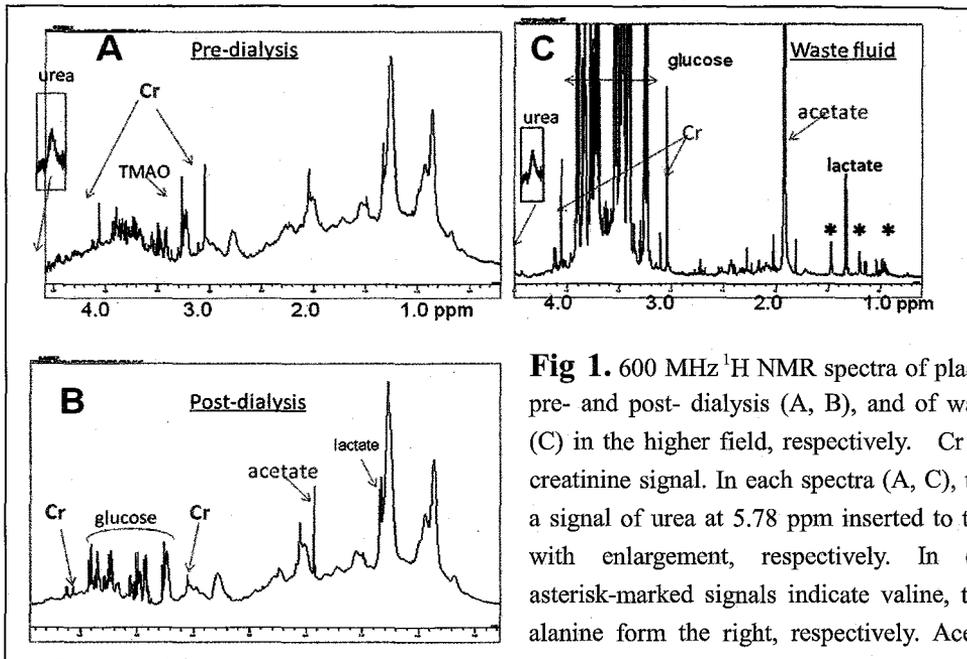


Fig 1. 600 MHz ^1H NMR spectra of plasma from pre- and post-dialysis (A, B), and of waste fluid (C) in the higher field, respectively. Cr indicates creatinine signal. In each spectra (A, C), there was a signal of urea at 5.78 ppm inserted to the figure with enlargement, respectively. In (C), the asterisk-marked signals indicate valine, threonine, alanine from the right, respectively. Acetate was included in the dialysate buffer.

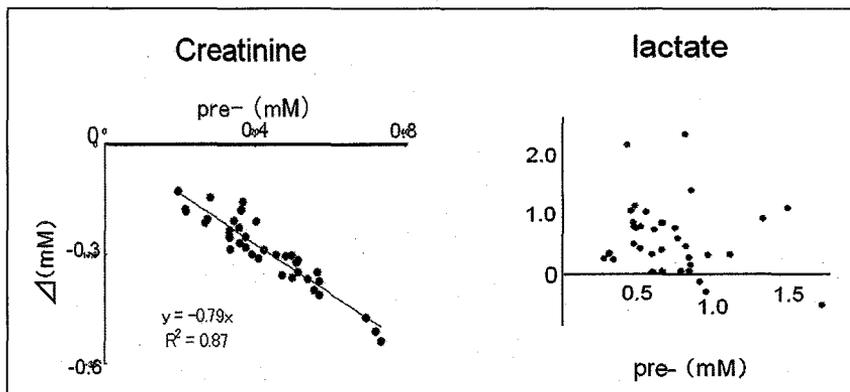


Fig.2 Correlation of the concentration between pre- and difference Δ of 37 subjects in mM, respectively. $\Delta = \text{post} - \text{pre}$, While creatinine was cleared by dialysis, lactate level elevated in post-dialysis plasma.

参考文献

- Masako Fujiwara *et al.* Pattern Recognition Analysis for ^1H NMR Spectra of Plasma from Hemodialysis Patients. 2009, *Ana. Bioana. Chem.* 394, 1655-1660
- Itiro Ando *et al.* A study of the use of formate as concentration standard for ^1H NMR metabolomics of plasma. 2009, *J. Toxicol. Sci.* in press.
- 藤原正子他 「NMR メタボロミクスの医療への応用—生活習慣病・慢性腎臓病を標的にして」 遺伝子医学 MOOK16号 “メタボロミクスと最新分子バイオマーカー研究—その探索技術と臨床・創薬応用研究の最前線” 2009.11 メディカル・ドゥ刊

Protein NMR measurements by newly Configured NMR with Superconducting Split-Magnet and Solenoidal RF Coil

○Hideki Tanaka¹, Manabu Hasegawa¹, Michiya Okada¹, Takamitsu Kohzuma² and Hitoshi Kitaguchi³

¹Hitachi Research Laboratory, Hitachi Ltd., Hitachi, Japan.

²Ibaraki University, Mito, Japan.

³National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan.

Theoretically, solenoidal RF coils have higher NMR sensitivity than saddle RF coils. And we have experimentally shown this effectiveness with 0.1% E.B. by developing a newly configured NMR. In protein NMR measurements, salt and buffer cause dielectric losses and decrease sensitivity. So, we compared sensitivities of protein NMR between conventional 700 MHz NMR system and our 600 MHz NMR system. In the results, sensitivities of our system have 1.6 times higher than that of conventional system.

NMRの測定感度において、ソレノイド型RFコイルはサドル型RFコイルよりも優れていることが知られている⁽¹⁾。近年ではその高感度を活かし、固体NMRの測定にソレノイド型RFコイルが用いられている。一方溶液NMRにおいては、静磁場用電磁石の超電導化以降、ソレノイド型RFコイルの用途は限られてきた。これに対し、我々はスプリット型超電導磁石を有する新方式NMRを開発し、溶液NMRにおける高感度化の実証を行ってきた⁽²⁾。

Fig.1 に新方式NMRの断面図を示す。試験管は、超電導磁石の隙間から鉛直方向に装填される。静磁場は水平方向、RF磁場は鉛直方向である。従来形式では困難であったソレノイド型RFコイルへの試験管装填を、超電導磁石を左右に分割することで容易とした。これまでに300MHz機と600MHz機を作製し、標準試料(0.1% E.B.)を用いて新方式NMRの優位性を示した⁽³⁾。

タンパク質NMR測定では、誘電損失により測定感度が低下することが知られている。誘電損失は、試料中の塩・バッファと、RFコイルが作る電界分布に依存する。

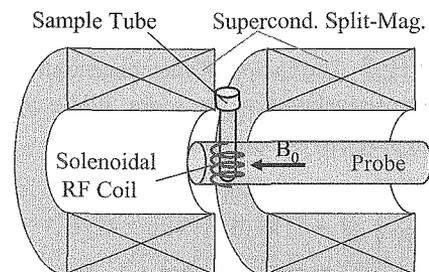


Fig. 1 Schematic diagram of newly configured NMR with solenoidal RF coil

新方式NMR, スプリット型超電導磁石, ソレノイド型RFコイル

○たなかひでき, はせがわまなぶ, おかだみちや, こうづまたかみつ, きたぐちひとし

そこで、タンパク質NMR測定における新方式NMRの感度優位性を実証するために、塩・バッファーを含む試料で、従来方式との感度比較を行った。

Table1 にサンプル条件を示す。バッファー濃度、塩濃度はタンパク質測定で用いられている一般的な濃度を採用した。Fig. 2(a)に試験管の外観を示す。誘電損失は試料体積にも依存するため、試料領域の高さを変更しつつ、感度比較を行った。Fig. 2(b)に、信号強度の定義を示す。信号強度はアノメリックプロトン信号を対象とし、そのスペクトル高さ S_{peak} とスペクトル面積 S_{area} を評価した。一般的に試料高さを10mm以下に設定すると、静磁場均一度調整(シム)が困難となり、感度評価が不正確になる。しかし、スペクトル面積を感度指標とすることで、シムの影響を排除し、システムを持つ感度ポテンシャルを比較することが可能となる。ノイズ強度は帯域100Hzでの標準偏差を用いた。なお、ノイズ強度比較を正確に行うため、スペクトル表示時の周波数分解能は0.12Hzで共通とした。以上の条件において、新方式600MHzと従来方式700MHz機の感度比較をそれぞれの低温プローブを用いて行った。

Fig. 3に測定結果を示す。縦軸はスペクトル面積を信号強度とした場合のS/N比、横軸はサンプル領域高さである。新方式600MHz機は、従来方式700MHz機と比べ、1.6倍程度高い測定感度を有することが明らかとなった。

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。

- (1) D. I. Hoult and R. E. Recharts, J. Magn. Resonance 24, 71(1976)
- (2) 新方式NMR用スプリット方式超電導磁石の開発 岡田, 北口 第46回NMR討論会 講演要旨集 P82 (2007)
- (3) 新方式NMR用低温プローブの開発(2) 一木, 川崎, 福田, 山本, 岡田, 北口 第47回NMR討論会 講演要旨集 P390 (2008)

新方式NMR, スプリット型超電導磁石, ソレノイド型RFコイル

○たなかひでき, はせがわまなぶ, おかだみちや, こうづまたかみつ, きたぐちひとし

Table 1 Sample condition

| | |
|----------------------------|------|
| Sucrose / D ₂ O | 10mM |
| Phosphate buffer | 20mM |
| NaCl | 50mM |

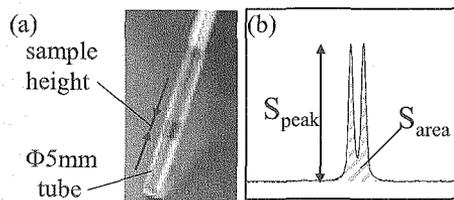


Fig. 2 (a) Appearance of sample tube with various sample height. (b) Anomeric proton signal and definitions of S_{peak} and S_{area} .

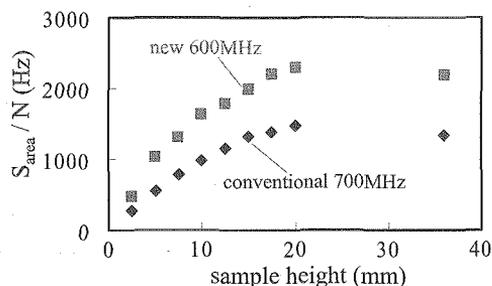


Fig. 3 Sensitivity competition at various sample height

Line-Shape Prediction by Integrating Simulations of the Radio-Frequency Electromagnetic Field and the Static Magnetic Field

○Minseok Park¹, Michiya Okada¹, and Hitoshi Kitaguchi²

¹Hitachi Research Laboratory, Hitachi Ltd., Hitachi, Japan.

²National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan.

Line-shape is of great importance in most NMR experiments. Acquiring good line-shape needs extremely carefully fabricated RF coil, because the magnetization of the coil dominates the B_0 inhomogeneity in most of the practical magnets. Many efforts have been devoted to the engineering of the coil magnetism, and achieved linewidth approaching 1 ppb in casual probes. However, a cryogenic probe still yields rather broad spectrum. Computer simulation may accelerate the design of the magnetism of the cryogenic probe.

In this presentation, we introduce a novel technique to calculate not only the B_0 distribution in a sample but also the line-shape of the spectrum. The technique combines the B_0 distribution with the B_1 distribution obtained by RF field simulation. The technique was applied to designing a solenoidal RF coil for a cryogenic probe of a novel 600 MHz system.

磁場分布はline-shapeに決定的な影響を与えるため、試料周辺に配置するRFコイル等の磁性設計はプローブ開発において極めて重要である。従来、プローブの磁性設計には、各部品の形状と磁化率から試料中の磁場分布を計算する静磁場解析法が用いられてきた[1]。しかし、磁場分布がline-shapeに影響を与える度合いは、その場所の感度分布に比例する。例えば、感度が0の位置における磁場分布は、line-shapeに何ら影響も与えない。従って、プローブの磁性設計は、磁場分布と感度分布を同時に考慮しなければならない。感度分布を考慮することは、試料周囲の構造が複雑な場合、特に重要である。例えば、低温プローブは、室温の試料からわずか数mm離れたRFコイルを20K以下に冷却するために、試料の周りに非常に複雑な構造を持つ。

我々は感度分布と静磁場分布を用いてスペクトルのline-shapeを予測する方法を開発して、600MHzの新方式NMR装置に挿入する低温プローブの設計に適用した。新方式NMR装置は、図1の如く超電導磁石を左右に分割して、高感度のソレノイド型RFコイルを用いることを最大の特長とする。ソレノイド型RFコイルを用いる上でのひとつの難点は、図1のように B_0 磁場と試料

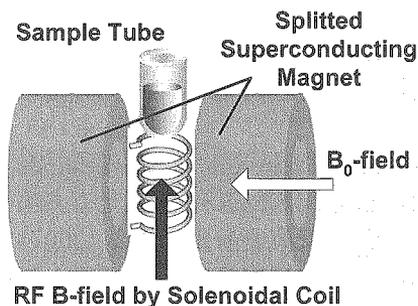


Fig. 1 Key concept of the novel NMR system

○ぱくみんそく, おかだみちや, きたぐちひとし

料管が直交するため、RFコイルの磁化が試料中に不整磁場を作り易いことであった。

本研究では、この難点を解決するため、RFコイルが作る不整磁場の分布と感度分布を解析で求めた。不整磁場の分布は独自開発した静磁場解析プログラムを用いて、感度分布はComputer Simulation Technology社のMicrowave Studio™を用いて、各々求めた。RFコイルの形状モデルは、解析効率と結果の整合性を得るために、および両方の解析で共通のモデルを用いた。

図2に求めた試料中の感度および不整磁場の分布を示す。試料の高さ方向の座標はRFコイルの高さで規格化し、試料の径方向の座標は試料の半径で規格化した。設計の一例として、形状の異なる2つのRFコイルにおけるline-shapeの計算結果を図3に示す。

本研究の解析方法は、図3の如くline-shapeまで考慮したRFコイルの設計を可能にする。解析による設計は、低温プローブのように実験準備に長時間を要するプローブを開発する際に特に有効であり、本研究では解析により開発期間を約1/40に短縮した。

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。

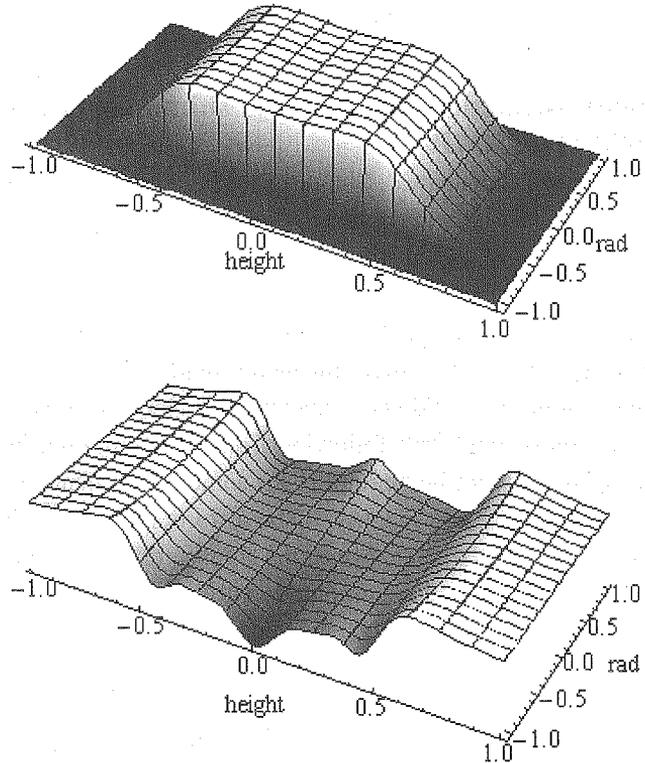


Fig. 2 Distributions of (a) sensitivity and (b) B_0 inhomogeneity in the sample. Height unit is the RF coil height, and radius unit is the sample radius.

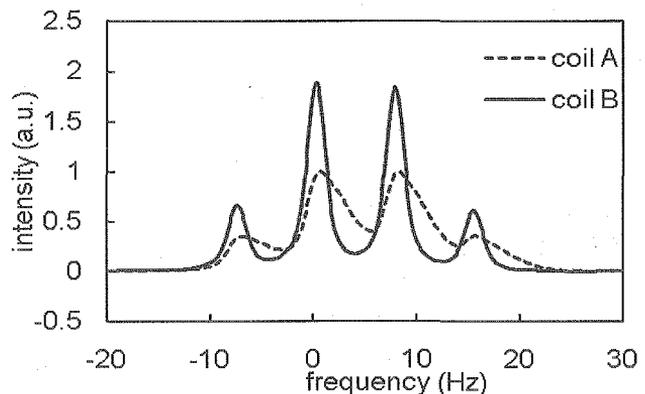


Fig. 3 Predicted line-shapes of CH_2 quartet of ethylbenzene.

(1) F. Doty et al. Magnetism in High-Resolution NMR Probe Design. I: General Methods, Concept Magnetic Res. 10, 133-156 (1998)

○品川秀行¹、大木 忍¹、藤戸輝昭²、清水 禎¹¹物質・材料研究機構²(株)プローブ工房**Field distortion caused by shimming in superconducting magnet for solid-state NMR**○Hideyuki Shinagawa¹, Shinobu Ohki¹, Teruaki Fujito² and Tadashi Shimizu¹¹National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan.²Probe Laboratory Inc., Tsukuba, Japan.

Field distortion induced by shimming through a coupling of the shim-coil and the magnet was investigated for the high magnetic field (1H - 930 MHz) superconducting magnet for high-resolution solid-state nuclear magnetic resonance (NMR). We found the field distortion or field drift following from the shimming, in which the shim setting was largely changed, may not be negligible for some experiments to obtain high resolution spectra using the superconducting magnet. The distortions have a relatively large time constant up to one week. Such a large change in the shim setting would occasionally happen after changing the probe. The method to computationally compensate such distortion in the magnetic field with an active shimming will be presented.

一般に核磁気共鳴 (NMR) 用超伝導磁石の磁場の安定度や均一度はシムコイルを用いて調整される。このとき、シムコイルによって形成される磁場は超伝導コイルと相互作用しており、測定空間の磁場は、シムコイルの発生する磁場の値の履歴に対応して、時間に依存した複雑な変動を示す。例えば、Fig. 1は、1H-930MHz超強磁場固体NMR用超伝導磁石において、シムの設定値を大きく変化したときの測定空間における磁場の値を時間の関数として測定した結果を示すものである。時刻 t_1 において -100 ppm の階段関数状の、また、時刻 t_2 において $50 \text{ ppm} \times 15 \text{ 分間}$ のパルス状の摂動磁場が与えられている。図に示されるように、摂動磁場が与えられるとそれに引き続

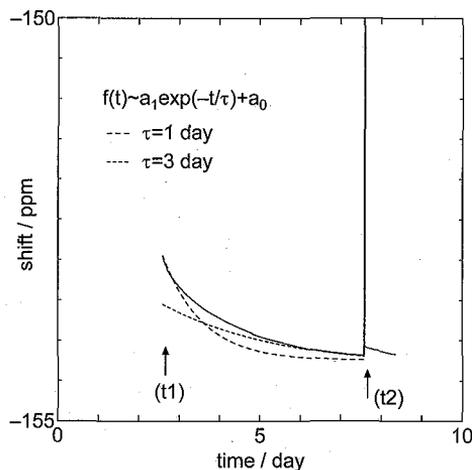


Figure 1. The magnetic field as a function of time on the field perturbations for high field NMR superconducting magnet.

Superconducting magnet, Field distortion, Shimming

○しながわひでゆき、おおきしのぶ、ふじとてるあき、しみずただし

き、緩慢な磁場の変動が観測される。磁場が安定するまでには、一週間以上の長時間を要することもある。図中の点線は、緩和時間 $\tau = 1$ および 3 日に設定した場合の指数関数による緩和曲線を示すが、磁場の変動はこのような単純な緩和曲線では近似できない。

溶液試料の NMR 測定のときは、重水素核等の溶媒の NMR 信号を用いた NMR 磁場ロックを行うのが一般的であるので、このような変動の影響は自動的に補償されおり、明示的には現れない。ところが、固体 NMR 測定においては、NMR 磁場ロックの使用は一般的ではないので、何らかの対策が求められる。ここで問題としている磁場の揺動は超伝導磁石の磁場が大きいほどより顕著に現れる。本講演では、このようなシムの設定に起因する磁場の揺動とその補償方法について論ずる。

固体 NMR 測定においては、測定する核種や測定方法に依存して、プローブの変更がしばしば行われるが、多くの場合、プローブの変更はシム設定の大幅な変更を伴うので、前述のような磁場の揺動がしばしば重畳して引き起こされることになる。このような系に対して、我々は、ある時刻においてそれ以前に為された総てのシムの設定を反映した補償関数により、シムコイルを動的に駆動することによって、磁場の揺動を補償する方法を提案する。システムの概略は Fig. 2 のブロック図に示されている。シムの状態は常に制御装置の監視下に置かれ、シムの設定の履歴は逐次記録される。補償関数 $g(t)$ は、記録されたシム設定の履歴に依存する関数であり、その値は時々刻々と算出され、シムコイルの駆動に用いられる。これにより、前述の磁場揺動は概ね 0.01 ppm 以下に抑えることができることがわかった。

本方法は磁場の Z_0 以外の成分にも同様に適用できるので、グラジエントパルスを用いた実験等で、パルス磁場の影響で一定時間信号の線形が劣化するような場合において、磁場の均一度を補償する用途にも応用できるものと期待される。

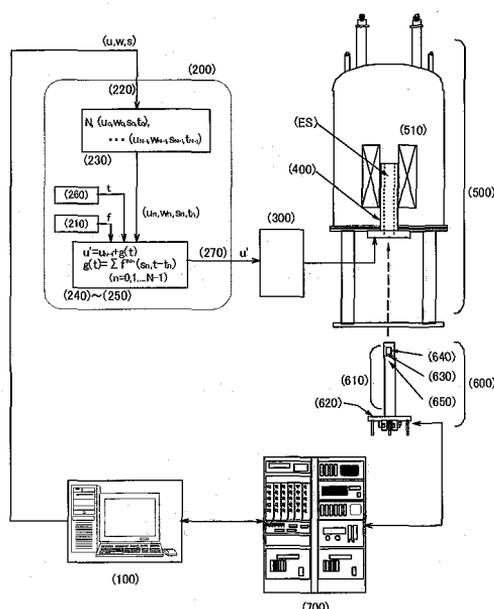


Figure 2. A block diagram of the system.

(100) Overall controller, (200) The shim controller, (210) Elemental function provider, (220) Shim setting receiver, (230) Shim setting recorder, (240) Compensation value calculator, (250) Accumulator, (260) Time base, (270) Transmitter, (300) Shim-coil drive, (400) Shim-coil, (500) Superconducting magnet for high resolution NMR, (510) Superconducting magnet, (600) NMR probe, (610) Tube body, (620) Flange, (630) Base of the resonator, (640) RF-Coil, (650) Tuning circuit, (700) NMR spectrometer, (ES) Field center, t: Time, u: Shim set value (e.g. Z_0), u': Shim compensated value, w: Type of the setting (e.g. Step-function), s: Size of the setting (e.g. $Z_{0n}-Z_{0n-1}$), N: Number of shim-setting, $f^w(s,t)$: Elemental Compensating function, $g(t)$: Compensating function

小型超電導バルク磁石を用いたマイクロコイルNMR

○仲村高志¹, 室洋一¹, 越野広雪¹, 藤戸輝昭², 寺尾武彦³¹理研・物質構造解析チーム²プローブ工房³京大

Micro coil NMR using compact superconducting bulk magnet

○ Takashi Nakamura¹, Yoichi Muro¹, Hiroyuki Koshino¹, Teruaki Fujito²
and Takehiko Terao³¹Molecular Characterization Team, RIKEN, Saitama, Japan.²PROBE Laboratory Inc., Tokyo, Japan., ³Kyoto University, Kyoto, Japan.

We developed new type of superconducting magnet using bulk superconductor. This magnet was designed for NMR application. It maintains magnetic field strength 4.7T and consists of a piece of three SmBaCuO and four EuBaCuO and has 20mm inner diameter room temperature bore. Temperature of bulk superconductor has kept in 40K below T_c using a pulse tube refrigerator. The area of NMR signal detection is too small, because size of magnet was very limited. Therefore, we must present more effective signal detection methods for this magnet. Magic Angle Coil and sample Spinning (MACS) is a powerful application for limited quantity sample. We build a MACS probe and detected signal of 400nl ethanol sample.

【序論】 高温超電導体を用いた小型無冷媒磁石でのNMR応用技術を開発することを目的に開発を行ってきた。この磁石は磁場を形成する材料に高温超電導材(RE-Ba-Cu-O: RE 希土類元素、 $T_c=90K$)の超電導バルクを用い、小型の冷凍機の伝導冷却により 90K 以下の温度で超電導状態を保つことが出来る。したがって現時点では、高温超電導体による唯一の永久電流モードで安定な磁場を形成する磁石である。今回は、この超電導バルク体を用いた小型無冷媒磁石を 4.7T (¹H 共鳴周波数 200MHz) に着磁し、その磁石でマイクロコイルによるワイヤレス検出にて NMR 信号検出を試みている。これは、市販されている NMR 用超電導磁石は直径 200mm 以上のコイルで磁場を形成するのに対し、バルク磁石は直径 60mm なので NMR の観測の為に必要な均一磁場の大きさが比例して小さくなる短所を補う為である。最近ではマイクロコイルを用いた高感度検出の応用が数多く紹介されており、小さな均一磁場領域でも可能な、この磁石に最適な応用技術として評価を行った。

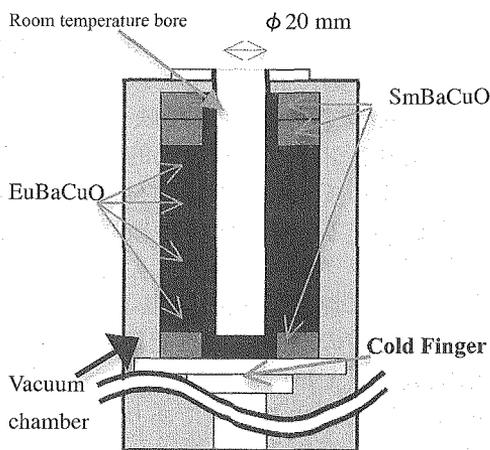


Fig. 1 Design of superconducting magnet

高温超電導, 超電導バルク磁石, 高感度・高分解能検出

○ なかむらたかし, むろよういち, こしのひろゆき, ふじとてるあき, てらおたけひこ

【実験】 熔融法 (melt-growth) で作成した直径 60mm のディスク上のバルク体の中心に 28mm の穴をあけ、樹脂含浸法により強度を向上させた超電導材を作製する。このバルク体を 7 組 (上段 2 つ下段 1 つ 10mm 厚の SmBaCuO、中段の上一段が 10mm 厚その他は 20mm の EuBaCuO) 2 種類の超伝導バルク材料を同軸上に積み重ねて 100mm 厚の超電導体を形成した。これにより現在の超伝導磁石とほぼ同様の構造を持つ室温ボア空間 (内径 20mm) の磁石を設計した (Fig. 1)。

バルク体は均一な静磁場を形成する為に NMR 用の超伝導磁石を用いて 4.7T に静磁場着磁した。結果、 ^1H 共鳴周波数 200.4MHz に信号を観測、安定した静磁場 4.7T を得た。次に検出系として、ワイヤレス検出を行う為のプローブを作製した。Fig. 2 に示すようにマジック角に設定した軸上で回転する直径 0.5mm のキャピラリ上に直径 0.04mm のホルマル線によるマイクロコイルと 0.5X0.5X1.0mm のチップコンデンサによる同調回路を形成し、そのマイクロコイルと誘導カップリングする直径 6mm のソレノイドコイルを通常の NMR 装置と同様のチューニング回路とした。ワイヤレスマイクロコイルの同調回路はコイル 8 ターン、チップコンデンサ容量 27pF で同調を確認した。マイクロコイルと通常と同調回路がカップリングした状態での 90° パルス幅は $8\mu\text{sec}$ で、ニートのエチルアルコール約 400nl を 4 回積算で S/N 比 6.75 が得られた。

【考察】 小型無冷媒磁石でワイヤレスのマイクロコイルによる高感度検出を試みた。マイクロコイルによる微量サンプルの信号の検出は出来たが、試料のポジションや磁場補正による磁場均一度が十分でない (今回の実験では分解能は半値幅が 1ppm(200Hz) 程度あるため、マイクロコイル自身が試料に近いことによって生じる磁場の不均一の問題をマジック角回転で消去するという、当初我々が考えていた試みが十分に検証出来ていない。発表までに検証を進めたいと考えている。分解能の向上により、感度は非常に高くなることが予測されるので、試料のサンプリングの問題があるにせよ、微量サンプルの高感度検出の良い応用として、小型無冷媒磁石の有用性も示せた。

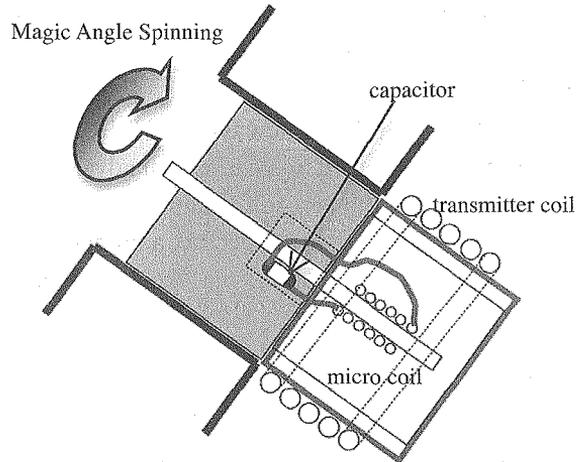


Fig. 2 Design of probe using magic angle coil and sample spinning system

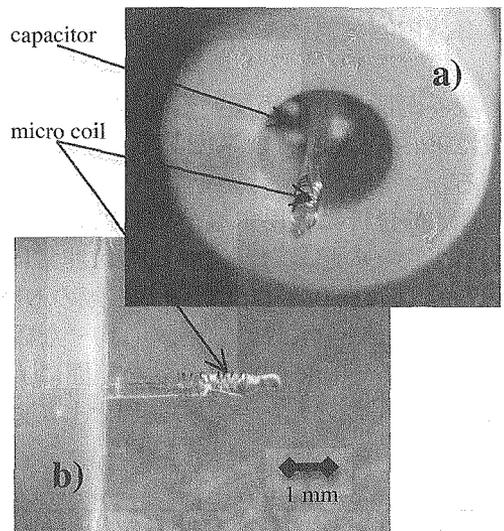


Fig. 3 Photograph of micro coil
a) bottom view b) side view

○室洋一, 仲村高志, 越野広雪
理化学研究所 物質構造解析チーム

Field Map Analysis of Superconducting Bulk Magnet using NMR signal

○Yoichi Muro, Takashi Nakamura and Hiroyuki Koshino

Molecular Characterization Team, RIKEN, Wako, Saitama, Japan.

We have proposed a new type of NMR system with a superconducting bulk magnet. This system is expected to have several advantages over a conventional NMR apparatus, such that no liquid helium is required and a very compact total design is realizable. In order to achieve a more high-resolution spectral, a number of attempts have been performed.

In this presentation, we show field map analysis of our magnet by observing NMR signals.

1. はじめに

NMR 現象の発見以来これまでの間、NMR 分光装置が画期的な発展を遂げてきたことは周知のとおりである。様々な分野の技術革新がその発展に寄与してきたわけであるが、この関係は今後も続いていくと期待される。我々は、高温超電導バルク材料の進歩に注目し NMR 用磁石に応用することによって、既存の装置と比べて圧倒的に小型で経済的な装置構成の実現可能性を示した [1]。

現在、より実用的な NMR スペクトルを得るための種々の手法の開発に取り組んでいる。本発表は、その一連の試みの一つである。

2. 内容

我々が開発を進めている超電導バルク体を用いた磁石の模式図を Fig. 1 に示す。組成は Eu - Ba - Cu - O 系であり、サイズは直径 60 mm × 高さ 120 mm、磁場は 4.7 T である。

NMR 分析に利用するための磁石では高安定な磁場強度と均一な磁場分布が必要である。我々の超電導バルク磁石は非常に安定した磁場強度を示すが、バルクの直径が 60 mm と現在使用されている市販の NMR 用超電導磁石のコイル系 (200 mm 以上) に比較して非常に小さいため、均一な磁場空間が市販のものより限定された空間となる。これを NMR 観測に有効な範囲に広げるためには、この磁石専用の磁場補正が必要となる。このため、その基礎として超電導バルク磁石の磁場分布解析を試みた。

超電導バルク磁石, 磁場分布解析

○むろよういち, なかむらたかし, こしのひろゆき

3. 実験と結果

超電導バルク磁石のボア径は 20 mm (以前の発表では 10 mm) であり、この内部の磁場分布を見積もるために、Fig. 2 のような簡易プローブを製作 (コイル径: 0.5 mm、コイル長: 2 mm) し エタノールの ^1H 測定を行うことによって、その共鳴周波数をプロットした。結果の一例を Fig. 3 に示す。z 軸方向の測定間隔が 2 mm と粗く詳細な議論はまだできないが、室温ボア底面からの高さが 75 mm 付近が最も均一度が高いことがわかる。今後、この付近のより詳細なデータを収集し、磁場補正の方法を検討する予定である。詳細は当日報告する。

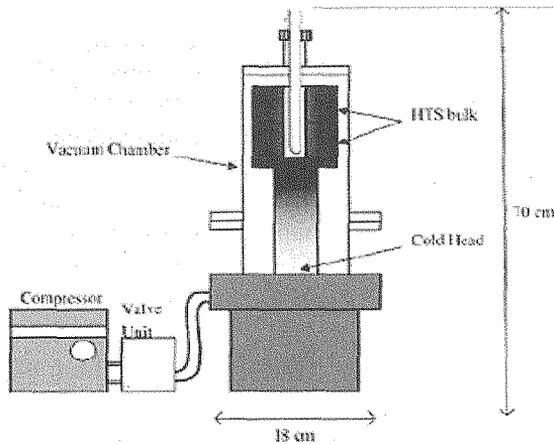


Fig. 1 Schematic diagram of the bulk magnet

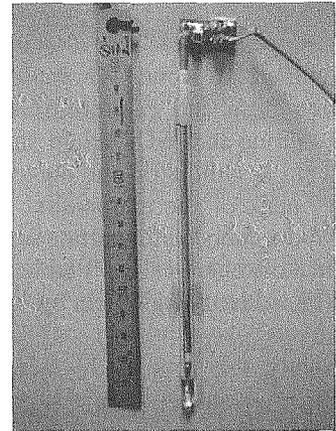


Fig. 2 Photograph of the probe used for the measurement

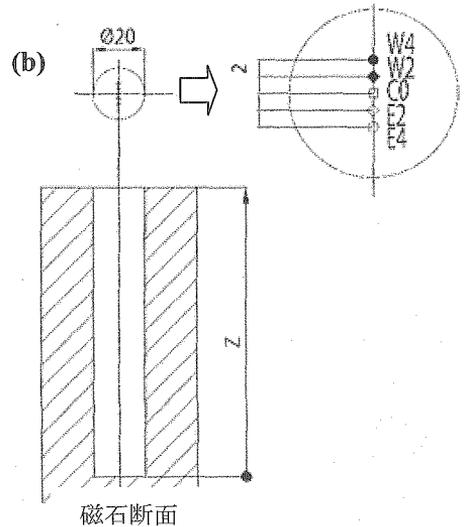
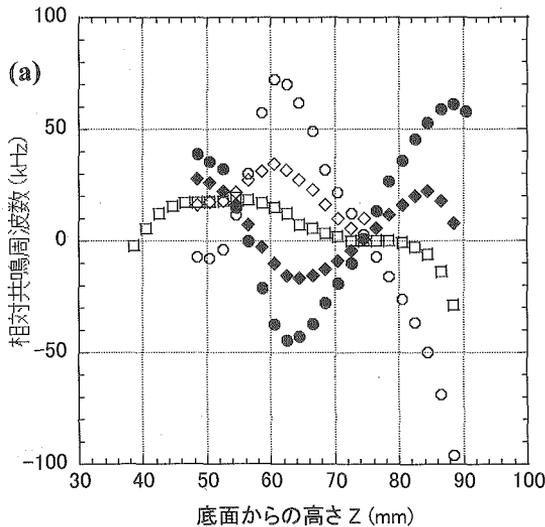


Fig. 3 An example of the magnetic field distribution (a) at the points shown in (b), represented as resonance frequency of ^1H of ethanol

[1] T. Nakamura et al., Concepts in Magnetic Resonance 31B(2) 65–70 (2007)

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^{1,2}, 高橋 雅人^{1,2}, 斎藤 雄太^{1,3},

佐藤 直樹^{1,2}, 高尾 智明³, ○前田 秀明^{1,2}

Development of ^{33}S Cryogenic probe

¹RIKEN, ²Yokohama City Univ., ³Sophia Univ.

Fumio Hobo^{1,2}, Masato Takahashi^{1,2}, Yuta Saito³,

Naoki Sato^{1,2}, 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. We applied the ^{33}S cryogenic probe to biological samples such as a scallop flesh and chondroitin-sulfate A derived from whale cartilages. Both SO_4^{2-} ion or $-\text{SO}_4^{2-}$ group and $-\text{SO}_3^-$ group showed a notable NMR peak, as the surrounding electric field gradient is symmetric and the quadrupole effect is weak; e.g. the mantle of the scallop showed SO_4^{2-} peak of the extrapallial fluid and $-\text{SO}_3^-$ group peak of taurine; chondroitin-sulfate A showed a chondroitin-sulfate unsaturated disaccharide $-\text{SO}_3^-$ group peak. It is suggested that if we make a chemical shift table for biological molecules with SO_3^- group and SO_4^{2-} group, we will be able to assign them by ^{33}S NMR spectroscopy.

1. 序

硫黄は主要な生体構成元素であり、含硫アミノ酸や硫酸化多糖などの生体高分子に様々な機能を付加する特徴も持つ。その重要性にもかかわらず、硫黄 NMR は、その極めて低い感度から生物学研究への利用が困難な状況にある。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($Q=-6.4 \times 10^{-30} \text{ m}^2$)を持ち、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。そのため ^{33}S NMR 計測の高感度化は重要な技術的課題である。

タウリンの生理機能に関する研究は現象レベルのものが少なくないが、これは生体中のタウリン計測の難しさが大きな原因である。例えば ^1H NMR による in-vivo タウリン計測は有効な解析手段の一つだが、無数の代謝物のシグナルオーバーラップにより解析が難しくなる問題がある。この問題の解決手段として、in-vivo ^{33}S NMR による方法が Musio と Sciacovelli により考案されている。しかし、通常のブロードバンドプローブを用いた ^{33}S NMR では感度が不十分であり、タウリンの場合では 5 mM 程度が検出限界となる。例えば人に含まれるタウリンの場合その濃度は低く(血液: $159 \pm 19 \mu\text{M}$, 尿: $778.9 \pm 71 \mu\text{M}$)、従来の装置では計測は不可能である。

本研究の目的は、従来に比べて 1 桁高い感度を実現できる ^{33}S NMR 低温プローブの開発を行い、 ^{33}S NMR による計測の適用範囲を大幅に拡張して、 ^{33}S NMR に基づく新しい生体 NMR 計測の世界を切り開くことである。

開発した低温プローブの特徴は、①冷凍機による冷却プローブとしてはこれまでになく低い共鳴周波数をもつこと、②RF(radio frequency)コイル温度がこれまでより低いことである。この様な実験室低温プローブによる NMR 計測を可能にするために、

キーワード: ^{33}S NMR spectroscopy, Cryogenic probe technology,

Signal-to-noise ratio

ほぼふみお、たかはしまさと、さいとうゆうた、さとうなおき、たかおともあき、まえだひであき

独自に RF コイルの設計技術と冷却技術を開発した。また、 ^{33}S のような低周波核では低温プローブでもサンプルの損失が小さいので、大口径のサンプル管としてサンプル量を増やし、感度を向上させた。開発したプローブを用いて、これまで計測が難しかった生体試料（ホタテ貝の組織やコンドロイチン硫酸 A）の計測を実施し、低温プローブによる ^{33}S NMR への適用性を評価した。最後に、 ^{33}S NMR の生物学に対する適用法や考え方を提示した。

2. 実験方法

11.75 テスラ超伝導マグネット用 (^1H で 500 MHz) の ^{33}S 溶液 NMR 低温プローブを開発した (Fig.1(a))。冷却システムは当研究室で独自に開発したもので、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る。JT バルブを僅かに開けるとバルブを通ったヘリウムが膨張するのでヘリウム温度が 4.7K に下がる。一方、バルブを十分開くと膨張しなくなり 17K になる。ヘリウムは NMR プローブ内部の冷却ステージを冷却する。このステージに RF コイルが固定され、熱伝導で冷却される。

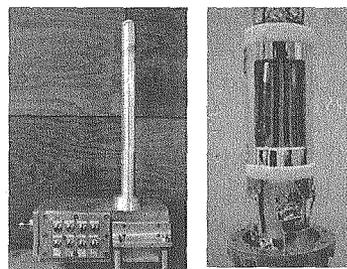


Fig. 1. ^{33}S cryogenic probe: (a) outer appearance and (b) RF circuit unit.

Fig.1(b)に示す ^{33}S NMR シグナルを検出する RF ユニット (=RF コイル+共振回路) を制作し、低温プローブ内部の冷却ステージに固定した。プローブは 10 mm タイプであり、約 3 ml のサンプルを挿入できる。RF ユニットは ^{33}S (38.36 MHz) コイルと ^2H (76.5 MHz) コイル (磁場-周波数ロック用) の 2 つの RF コイルが直交する向きで同軸になる構造とした。共振回路は干渉を避けるために独立しており、 B_1 均一度を向上させるためにバランス型回路を採用した。

内側の ^{33}S 用コイルはサファイア管にテフロン熱収縮チューブで固定した。本研究で新たに考案した超音波半田を用いる独自の方法でサファイアと RF コイルの銅板を接続し、接触熱抵抗を減らして冷却性能を高めた。銅板の端部はアルミ基板とアルミ管にインジウムを挟み込む形でネジ止めした。この方法により RF コイル設計の自由度を向上させると共に、RF コイル温度を 9 K まで冷却することが可能になった。

共振回路のチューニング、マッチングの静電容量は、RF コイルの内部抵抗とインダクタンスに依存する。低温プローブでは、室温から低温に冷却する過程で内部抵抗が急激に変化する。このとき RF コイルは、自己共振周波数が計測周波数より大きくなる範囲で、インダクタンスを十分大きく設計することで、より小さいコンデンサーでマッチング、チューニングの調整が可能になる。この理由から、3 回巻き (内径 14.9mm) の RF コイルを採用した。 ^{33}S の縦緩和時間は十分短いので、スピンスピンカップリングの効果は無視できる。このため、 ^1H デカップリングパルスは照射しない (^1H コイルは設置していない)。低温プローブは室温のプリアンプに接続されている。アンプの熱ノイズが比較的大きい (NF: 1.6dB) ので、プローブの感度はこれに制約されている。現在、熱ノイズの少ない低温アンプに変更するための開発を進めている。 ^{33}S NMR 計測は 500 MHz NMR 分光器 (DMX 500, Bruker Spectrospin) で実施した。各 NMR 計測の 90° パルス幅は 45~60 μs に設定した。

3. 研究結果

3-1) 低温プローブの性能評価

20 mM タウリン水溶液により感度計測試験を行った。結果を室温 5 mm ブロード

バンドプローブ(Bruker, VSP500)と比較した。 ^{33}S 低温プローブと市販5 mmブロードバンドプローブ(Bruker, VSP500)の感度を比較してFig.2に示す。低温プローブで従来プローブの5.6倍の感度上昇を得たことが明らかである。この結果、生体試料計測に必要な濃度である1 mM以下のタウリンで ^{33}S NMR計測が可能になった。

次に、1 M硫酸ナトリウム水溶液を用いてRF磁場(B_1 磁場)均一度試験を行った(Fig.3)。これは 810° パルスと 90° パルス照射から得られたシグナル強度の比から、 B_1 磁場の均一度や生成効率を見積もる方法である。その結果 $810^\circ/90^\circ$ で82%の B_1 磁場均一度を得た。市販5 mmブロードバンドプローブの均一度は66%であり、従来品より優れた B_1 磁場均一度を実現できた。

両試験の結果から、RFコイルの形状とインダクタンスが適正であり、また正常なマッチングとバランスにより共振回路がよく機能していることが明らかになった。また、本プローブを用いることで、通常プローブの5.6倍の ^{33}S NMR感度を実現できることが明らかになった。

3-2) 生体試料の ^{33}S NMR計測

開発した ^{33}S 低温プローブを生体試料に適応した。1番目の生体試料としてホタテ貝の外殻膜、中腸線、貝柱、比較用の海水を計測した(Fig.4)。ホタテ貝の試料は、それぞれの組織を切り出し水洗いした後、重水に入れ計測した。また比較のため海水試料は、海水:重水=9:1に調整し計測した。ホタテ貝の組織は共に-6.6 ppm付近にシグナルを示した。これらは、Fig.2よりタウリンのシグナルと帰属できる。また、海水は2.65 g/kgの SO_4^{2-} を含むが、Fig.4(d)の0 ppmシグナルはこの硫酸イオンである。

Fig.4で特徴的なのは、外殻膜で硫酸イオン(0 ppm)シグナルを観測できることである。外殻膜は貝殻を形成する器官であり、硫酸イオンを含む様々なイオンや有機基質を含む外殻膜外液を分泌することで CaCO_3 結晶を作り出す。その結晶構造は多様であり形成メカニズムは明らかではない。ここでは、外殻膜上皮細胞内の硫酸イオンを検知できたのではないかと考えている。今後の実験解析により貝形成のメカニズム解明に繋がる知見が得られるものと期待している。

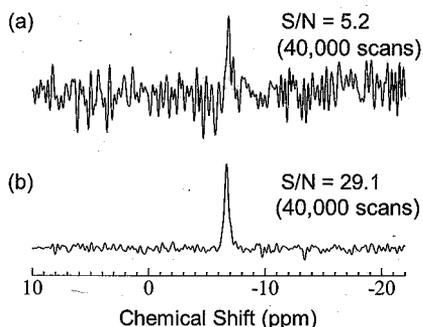


Fig.2. ^{33}S NMR spectra for 20 mM taurine solutions: (a) conventional broadband probe and (b) cryogenic probe.

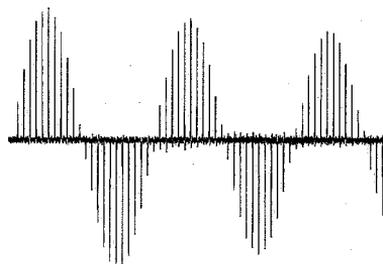


Fig.3. Results of the B_1 homogeneity experiments. $810^\circ/90^\circ$ ratio = 82%.

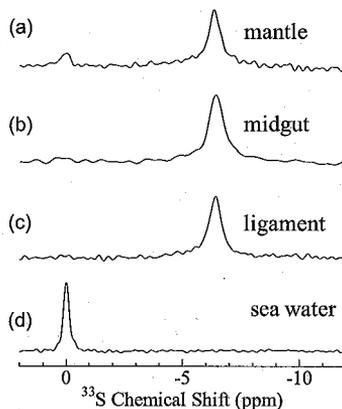


Fig.4. ^{33}S NMR spectra for (a) mantle, (b) midgut, (c) ligament of scallop and (d) sea water.

2 番目の生体試料として、コンドロイチン硫酸 A の酵素 (コンドロイチナーゼ ACII) 分解試料について ^{33}S NMR を計測した (Fig.5)。酵素分解試料は次の手順で用意した。1 試料当たり、二糖硫酸換算で $400 \mu\text{mol}$ のコンドロイチン硫酸 A を含む試料溶液を 4 ml ($400 \mu\text{l}$ の 0.4 M 緩衝酢酸溶液-pH6.0、 $400 \mu\text{l}$ の 0.4 M 酢酸ナトリウム水溶液、 $400 \mu\text{l}$ の 0.1% ウシ血清アルブミン水溶液、純水を含む) を作成した。3 つの試料溶液には 1 U の酵素を加え、 37°C でそれぞれ $40, 100, 400$ 分間反応させ、5 分間煮沸した。酵素を加えてない試料についても煮沸処理し、作成した試料溶液 2.7 ml に重水 $300 \mu\text{l}$ を加えた。Fig.5 にそれぞれの試料の ^{33}S NMR 計測結果を示す。酵素を加えない試料では、 ^{33}S シグナルが現れなかった (Fig.5(a))。一方、酵素を加えた試料では、硫酸基の化学シフト (0 ppm) に相当するピークが現れ (Fig.5(b)) た。ピークは酵素反応時間に応じて強度を増した。この結果は、コンドロイチン硫酸が、酵素分解で二糖硫酸基に分解される過程を検知できたと考えている。ピークが遊離硫酸イオン由来である可能性もあるので、今後、この点につき更に研究を進める。本計測では、信号強度が微弱であり低温プローブにより初めて計測が可能になった。

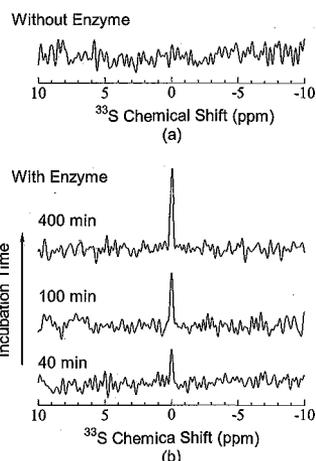


Fig.5. ^{33}S NMR spectra for the chondroitin sulfate A samples (a) without, (b) with the chondroitinase-ACII Arthro degradation.

4. 検討

生体試料の ^{33}S NMR はほとんど例がなく、 ^{33}S NMR 計測が切り開く世界 (どのように適用できるのか) の全貌は明らかになっていない。本低温プローブ開発により、有力なツールを構築できた。

^{33}S は四極子核であり緩和が速いため NMR 信号が小さくなる欠点があるが、本研究の低温プローブの利用により、 SO_3^- や SO_4^{2-} など核の周囲の電場の空間的な対称性の高い遊離基や置換基をもつ分子では、十分明確な信号を取得できることが明らかになった。本研究では、 SO_3^- としてタウリン、 SO_4^{2-} としてコンドロイチン硫酸を示したが、それ以外の類似の構造を持つ重要な生体分子についても化学シフトや線幅の弁別が十分可能であり、この面で今後大きな発展性がある。多種類の分子の化学シフトの有意な分離のためには、高磁場 NMR の適用も非常に有効である。一方、メチオンやシステインなどのアミノ酸や、それらを含むタンパク質の中に含まれる ^{33}S などの計測では、核の周りの電場の対象性が悪く四極子緩和が大きいので、低温プローブでも有意な信号を得ていない。更なるプローブ感度の向上や装置の高磁場化によりこの種の分子の NMR を計測できれば、 ^{33}S 計測の有効性が更に広がると考えている。

参考文献

- 1) F. Hobo, M. Takahashi, and H. Maeda; ^{33}S NMR cryogenic probe for taurine detection. *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 036106(3) **2009**.
This paper was selected in "Virtual Journal of Biological Physics Research, *17(7)*, **2009**".
- 2) 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.

異種核相関実験における 二次元NMRスペクトルの共分散処理

○福地 将志、武田 和行、竹腰 清乃理
京都大学大学院理学研究科、CREST/JST

An extension of the covariance method to heteronuclear correlation experiments

○Masashi Fukuchi, Kazuyuki Takeda, and K. Takegoshi
Graduate school of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.
Japan Science and Technology Agency, CREST, Tokyo, Japan.

In this work, we apply the direct covariance method [1,2], originally used to analyze two-dimensional (2D) homonuclear correlation experiment, to 2D heteronuclear correlation (HETCOR) experiment. In contrast to 2D Fourier transform (2D-FT) NMR, the covariance technique requires less sampling points in the indirect dimension, thus enabling us to save spectrometer time. In fact, we show a factor of 32 reduction.

Recently, covariance NMR spectroscopy, an alternative way to process 2D free induction decay (FID) data in homonuclear correlation experiments, has been introduced in liquids [1] and in solids [2]. In this method, spin correlations are directly showed in terms of a covariance matrix of a series of one-dimensional (1D) spectra. In the conventional 2D-FT NMR, insufficient evolution time makes ripples on cross-sections along the indirect dimension. Therefore, lengthy sampling in the indirect dimension is required, leading to a long experimental time. In the covariance approach, however, insufficient evolution time doesn't induce the ripples along the indirect dimension. The covariance method, thus, requires less sampling points along the indirect dimension, thereby reducing spectrometer time in homonuclear correlation spectra. It is worthy to point out here that the covariance technique does not require any previous information of the positions and linewidths of the resonances. So far, the covariance approach has only been applied in homonuclear correlation experiment. In this work, we applied the covariance method to HETCOR experiments.

Schematic pulse schemes of 2D HETCOR experiments are described in Figure 1, where (a) represents a conventional one and (b) is

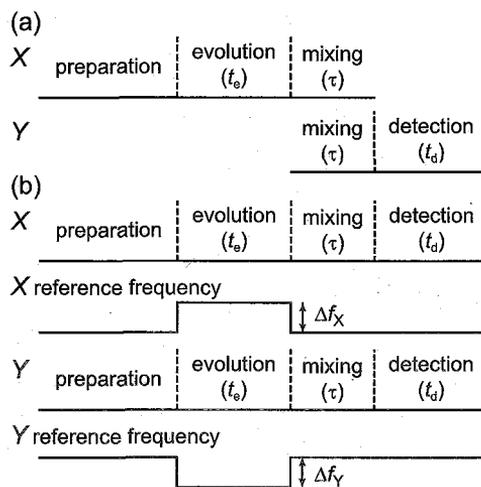


Fig. 1. Pulse schemes of 2D HETCOR experiments. (a) and (b) is the conventional one and the present one for the covariance method.

共分散、HETCOR、二次元NMR

○ふくち まさし、たけだ かずゆき、たけごし きよのり

that used in the present work. In contrast to the conventional scheme (Fig. 1a), the scheme for the covariance technique (Fig. 1b) obtains two FIDs from X and Y channels for each evolution time (t_e). These two FIDs maybe acquired at the same time by a dual-receiver system. In this work, as we have not yet built a dual-receiver system, we used the single-receiver system. Hence, we had to do the same experiment twice for a given t_e to obtain two FIDs from X and Y channels. One notable difference among Fig. 1a and b is that we applied a shift of the X and Y reference frequencies in the evolution period (Δf_X and Δf_Y). The switching of the reference frequency in t_e is required in order to avoid spectral overlapping of the X and the $Y F_1$ spectra in the combined spectra.

The two 2D FID data matrixes thus obtained are a $N_e \times N_{dX}$ matrix for X ($s_X(t_e, t_{dX})$) and a $N_e \times N_{dY}$ matrix for Y ($s_Y(t_e, t_{dY})$), where N_e is the sampling point along the indirect dimension and N_{dX} and N_{dY} are those along the direct dimension for X and for Y , respectively. After 1D-FT, phase correction, and apodization, we have two series of 1D processed 2D spectrum $S_X(t_e, \omega_{dX})$ and $S_Y(t_e, \omega_{dY})$, which are combined into one $N_e \times (N_{dX} + N_{dY})$ matrix, $S(t_e, \omega_d)$. This combined 2D matrix $S(t_e, \omega_d)$, then, is computed according to

$$C(\omega_1, \omega_2) = \int S(t_e, \omega_1) S(t_e, \omega_2) dt_e \quad (1)$$

in the same manner as the covariance method in homonuclear correlation experiment.

In Figure 2, the pulse sequence used in this study is shown. We applied a ^1H - ^{13}C - ^{15}N triple resonance experiment to obtain ^{13}C - ^{15}N heteronuclear correlations in solid-state through ^1H - ^1H spin diffusion [3] in the mixing time. Here, recoupling among ^{13}C - ^{13}C / ^{15}N - ^{15}N also occurs during the mixing time. Hence, this experiment also produced ^{13}C - ^{13}C / ^{15}N - ^{15}N homonuclear correlation spectra. Figure 3 shows ^{13}C and ^{15}N spectra of N-acetyl [1,2- ^{13}C , ^{15}N] DL-valine (NAV) [4]. To avoid spectral overlap in the indirect dimension, the reference frequencies of ^{13}C and ^{15}N channels in the evolution period were switched up +8 kHz and down -13 kHz. Otherwise, the ^{15}N peak at offset = 0.4 kHz and the two ^{13}C signals at -4.6 and 7.3 kHz are plotted in the same range and may be confusing.

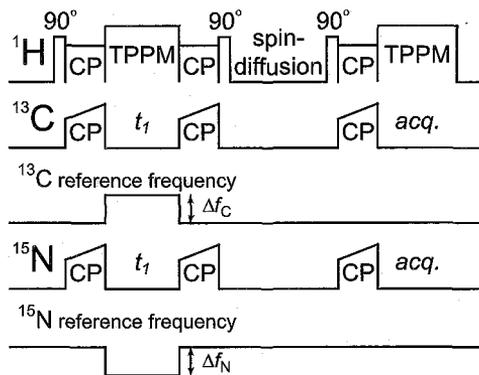


Fig. 2. Pulse sequence used in this study. The ^{13}C and ^{15}N magnetizations are correlated with each other through ^1H - ^1H spin diffusion, thus realizing CHHN, NHHC, CHHC, and NHHN correlation by this experiment.

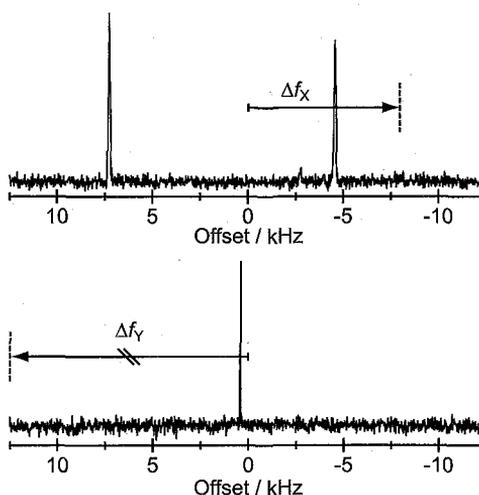


Fig. 3. 1D ^{13}C and ^{15}N spectra of NAV. The reference shift in the 2D covariance experiment (Fig. 1b) is indicated as arrows.

All experiments were performed on a 400 MHz OPENCORE NMR spectrometer [5] operating at 400.24, 100.65, and 40.56 MHz for ^1H , ^{13}C , and ^{15}N nuclei, respectively. A 5 mm triple-resonance Doty MAS probe was used at room temperature. 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 ≈ 62.5 kHz to be 180° and $\pm 7.5^\circ$, respectively. The contact time for CP was 1.6 ms and the MAS frequency were 10 kHz. The ^{13}C and ^{15}N chemical shifts were calibrated in ppm by taking the chemical shift of solid adamantane as an external standard and NAV as an internal standard, respectively. For both ^{13}C and ^{15}N channels, $N_{dX}, N_{dY} = 2048$ data points were collected with t_d increment = 25.0 μs . 16 FIDs were accumulated for each t_e value with the relaxation delay of 2.0 sec, and the spectra were recorded for $N_e = 1024$ complex points along the t_e dimension (t_e increment = 25.0 μs) in the States method [7]. The total experimental time was about 19 hr * 2. With a dual-receiver system, this will be reduced to 19 hr. Note that, as will be shown below, 32 complex points are enough for the covariance method. Hence, 19 hr * 2 * 32 / 1024 = 1.19 hr may be required.

Figure 4 shows the 2D ^{13}C - ^{15}N HETCOR and ^{13}C - ^{13}C correlation spectra of NAV, where (a) is processed by 2D-FT with $N_e = 1024$ complex points and (b) is calculated by the covariance, equation (1), using $N_e = 32$ complex points, respectively. Both 2D spectra shows cross peaks among all labeled ^{13}C and ^{15}N peaks and are very similar. The cross-section spectra (the slice spectra) at ^{13}C -H peak along the indirect dimension are also shown in Figure 5. In the slice spectra, however, that by the 2D-FT method has the wiggle despite of the 1024 complex points, while that of the covariance approach does not even with the 32 complex points. In the indirect slice spectra in Figure 5, there is also slight difference in peak ratio between the 2D-FT (a) and the covariance spectrum (b). The difference is because 2D-FT spectra are not symmetrized but covariance spectra are, thus, 1D slice spectra of the indirect and direct dimensions are completely the same in the covariance method.

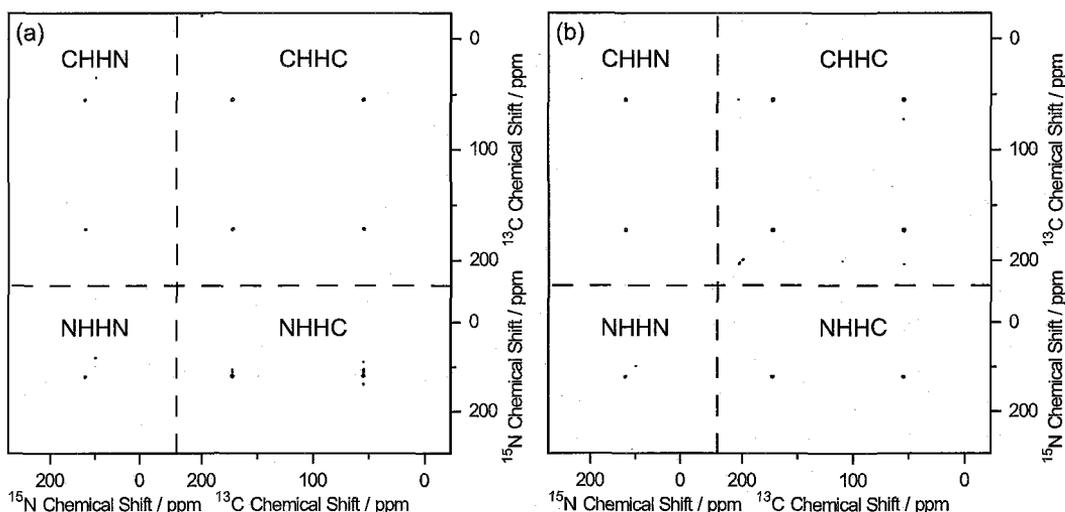


Fig.4. 2D mixed spectra of NAV processed by 2D-FT (a) and the covariance method (b). N_e was set to 1024 complex points for (a) and 32 complex points for (b), respectively.

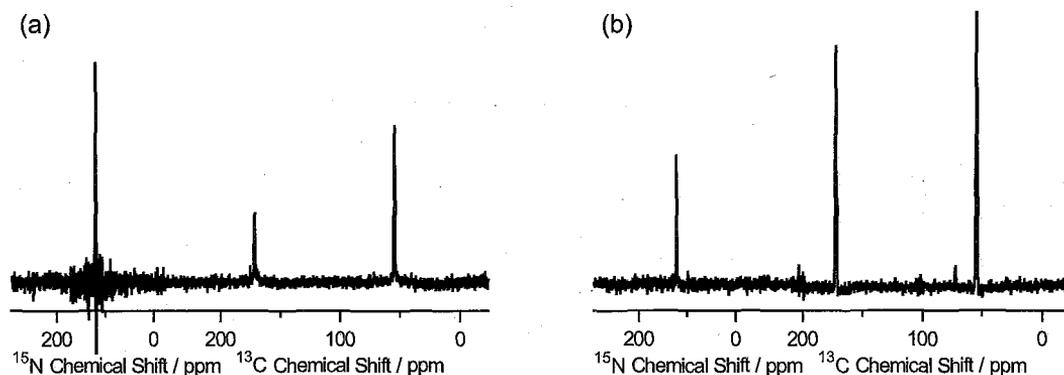


Fig.5. Corresponding slice spectra at ^{13}C -H peak along the indirect dimension. (a) is obtained by the 2D-FT method with $N_e = 1024$ complex points and (b) is calculated by the covariance technique with $N_e = 32$ complex points, respectively.

References

- [1] (a) R. Brüschweiler, and F. Zhang, Covariance nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **120** (2004) 5253-5260. (b) R. Brüschweiler, Theory of covariance nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **121** (2004) 409-414.
- [2] B. Hu, J. P. Amoureux, J. Trebosc, M. Deschamps, and G. Tricot, Solid-state NMR covariance of homonuclear correlation spectra, *J. Chem. Phys.* **128** (2008) 134502.
- [3] A. Lange, S. Luca, and M. Baldus, Structural Constraints from Proton-Mediated Rare-Spin Correlation Spectroscopy in Rotating Solids, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 9704-9705.
- [4] S. D. Cady, and M. Hong, Amantadine-induced conformational and dynamical changes of the influenza M2 transmembrane proton channel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105** (2008) 1483-1488.
- [5] (a) K. Takeda, A highly integrated FPGA-based nuclear magnetic resonance spectrometer, *Rev. Sci. Instrum.* **78** (2007) 033103. (b) K. Takeda, OPENCORE NMR: Open-source core modules for implementing an integrated FPGA-based NMR spectrometer, *J. Magn. Reson.* **192** (2008) 218-229.
- [6] A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, and R. G. Griffin, Heteronuclear decoupling in rotating solids, *J. Chem. Phys.* **103** (1995) 6951-6958.
- [7] D. J. States, R. A. Haberkorn, and D. J. Ruben, A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants, *J. Magn. Reson.* **48** (1982) 286-292.

MRI using an OPENCORE NMR spectrometer

Munehiro Inukai, and ○Kazuyuki Takeda

Graduate School of Science, Kyoto University

Abstract: In this work we demonstrate MRI experiments using an OPENCORE NMR spectrometer, which is an open-design, FPGA-based NMR spectrometer originally designed for solid-state NMR experiments and equipped with three RF channels operational at up to 440 MHz. In order to make ^1H MRI experiments in static fields of up to 14.1 T feasible, we extended its operation frequency to 600 MHz, and built a two-channels field-gradient control extension on the OPENCORE NMR spectrometer. This work is an example of hardware modification in an open-design NMR spectrometer that has lowered the barrier of building spectrometers for those who intend to put their own new ideas in practice.

Recently, we reported on an open-design, field-programmable gate-array (FPGA)-based NMR spectrometer, referred to as the OPENCORE NMR spectrometer [1, 2]. It has a noteworthy feature that resources including FPGA source codes, a console software, circuit diagrams, and board drawing are open and available on our web site [3]. So far, several solid state NMR experiments were demonstrated using the OPENCORE NMR spectrometer. If the spectrometer is used in not only solid state NMR experiments but also MRI experiment, the spectrometer will encourage scientist and engineers who need to develop home-built MRI spectrometer because useful resources are available on web site. The purpose of this work is to modify the OPENCORE NMR spectrometer so as to perform MRI experiments at 14.1 T.

In order to carry out two-dimensional MRI experiments, we equipped the spectrometer with a two-channels field-gradient controller. Converting the two RF channels into the two-channels field-gradient controller, we constructed the spectrometer consisting of one RF transmitter, one signal receiver, and the two-channels field-gradient controller shown in Fig. 1. Also, we extended its operation frequency up to 600 MHz so that the spectrometer can carry out microimaging for magnetic field up 14.1 T. In order to extend maximum operation frequency from 440 MHz to 600 MHz without heavy hardware modification, we utilized DDS image frequency shown in Fig. 2 (a). So far the fundamental signal at 20 MHz was selected by cutting off the image frequencies, but instead, one of the image frequencies can be extracted by passing the signal through a band-pass filter. Figure 2 (b) shows a scheme to generate a higher frequency signal at 600 MHz. Mixing the DDS image signal at 180 MHz

キーワード：プロトンイメージング、MRI分光計、マイクロイメージング

ふりがな：いぬかいむねひろ、○たけだかずゆき

from DDS (I) and a RF source at 420 MHz from DDS (II), which can generate RF source at 5 ~ 420 MHz, after though band pass filter, the spectrometer generates the signal at 600 MHz. Also we have to do something in the receiver, because the receiver digitizing a FID at 80 MHz is required to digitize it at 180 MHz, but it is possible by super-Nyquist sampling [4].

To test the spectrometer, we demonstrated two types ^1H imaging experiments. One type is microimaging to use stationery a 14.1 T MRI system. Another type is portable MRI to use a 1 T permanent magnet MRI system. In the poster, we will show images using the OPENCORE NMR spectrometer.

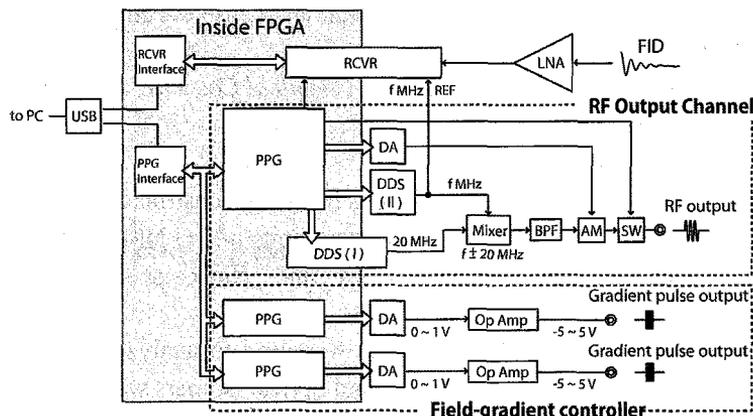


Fig. 1. A diagram for one RF transmitter, one signal receiver and a two-channels field gradient controller in the OPENCORE NMR spectrometer. The glossary is as follows. PPG: Pulse ProGrammer, DA: DA converter, DDS: Direct Digital Synthesizer, AM: Amplitude Modulator, SW: SWitch, RCVR: ReCeIveR, Op Amp: Operational Amplifier.

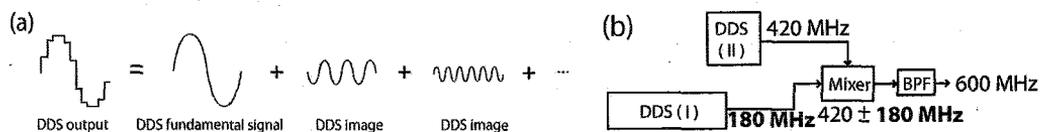


Fig. 2. (a) A schematic figure that DDS output is a superposition of a fundamental signal and image signals. (b) A scheme to generate a RF signal at 600 MHz using the DDS image at 180 MHz instead of the DDS fundamental signal at 20 MHz.

[Acknowledgement] The 1 T permanent magnet used in this work was provided by MR Technology, Inc.. This work has been financially supported by the CREST program of Japan Science and Technology Agency.

References

- [1]. K. Takeda, Rev. Sci. Instrum, **78**, 33103 (2007).
- [2]. K. Takeda, J. Magn. Reson. **192**, 218 (2008).
- [3]. <http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/bun/indiv/takezo/opencorenmr/index.html>
- [4]. M. Negoro and K. Takeda, The 46th Annual meeting of the NMR Society of Japan(2007)

LC-CD-NMR の試み - 光学異性体の分離と化学構造解析を同時に行うために -

徳永 隆司¹, 岡本 昌彦¹, 田中 浩三¹, 都出 千里², ○杉浦眞喜子²

¹住友化学 有機合成研究所

²神戸薬科大学

Chiral LC-CD-NMR for Separation and Structural Analysis of Chiral Compound Mixture

Takashi Tokunaga¹, Masahiko Okamoto¹, Kozo Tanaka¹ and Chisato Tode²,
and ○ Makiko Sugiura

¹ *Organic Synthesis Research Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan.*

² *Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan.*

LC-CD-NMR system for analyzing chiral compounds has been constructed, in which CD unit has been inserted between column and photodiode array units of LC-NMR system. With this hyphenated system, CD and UV chromatogram and NMR spectra are measured simultaneously.

The mixture of chiral pyridylalanine derivatives was used to analyze using this system, and structures were elucidated for these derivatives and optical isomers were discriminated.

近年、医薬品や農薬の分野において、特定の光学異性体のみが望む活性を有し、対掌体が活性を有しない、もしくは、深刻な副作用などの望まない活性を示す例が数多く知られてきている。そのため、工業プロセスで単一な光学活性体を製造することはますます重要になっており、プロセス管理上、光学活性体分析の重要度も高まっている。光学活性体の分析には、キラル液体クロマトグラフィーが最も広く用いられているが、この手法ではピークの同定に光学活性体それぞれの対掌体の標準品が必要であり、これらの調製に多大な労力とコストを要することになる。

LC-CD は、キラル高速液体クロマトグラフィー (LC) と円二色性検出器(CD 検出器) を連結させ、光学異性体を分離しそれぞれのコットン効果曲線の符号の違いからそれらを見分けることが出来るシステムであるが、CDクロマトグラムからは構造に関する情報を得ることは出来ない。一方 LC-NMR は、構造に関する情報を得るには優れているが、光学異性体を見分けることは出来ない。通常これら 2 種類の装置から別々に情報を得て、NMR スペクトルが同じでコットン効果曲線の符号の違うもの

LC-CD-NMR, 円二色性分光計(CD), 光学異性体

とくなが たかし, おかもと まさひこ, たなか こうぞう, とで ちさと,
○すぎうら まきこ

同士を光学異性体と特定するということがなされている。¹⁾

今回我々はこれら二つのシステムを結合させ、構造異性体と光学異性体を同時に解析出来るシステムの構築を試みた。即ち既存のLC-NMR にCD 検出器を連結させ、キラルカラムを用いることとした。連結の方法は、既存のLC-NMR の設定条件等なるべく変更することなく簡便に使用出来るよう、Fig.1 に示すようにカラムとPDA検出器の間に直列でCD検出器を組み込む形とした。

さらにこのシステムの有用性を検討するため、通常分析が困難となる系を想定してモデル化合物を合成し、解析を試みた。

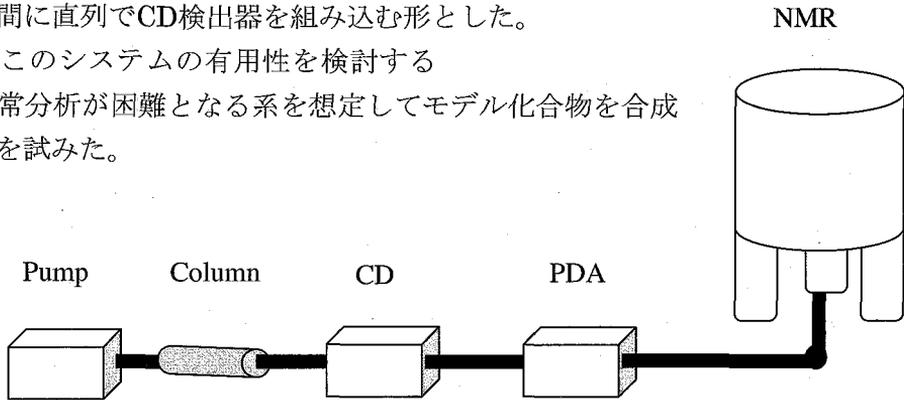


Fig. 1 Constructed LC-CD-NMR System

【実験の部】

LC-NMR は、Varian HPLCシステム (Prostar 230 ポンプ, Prostar 355 PDA) を連結した Varian INOVA-500 (¹H: 499 MHz) NMR 装置 (60 μ l フローセルプローブ付) を、またCD 検出器は日本分光 CD-2095を用いた。

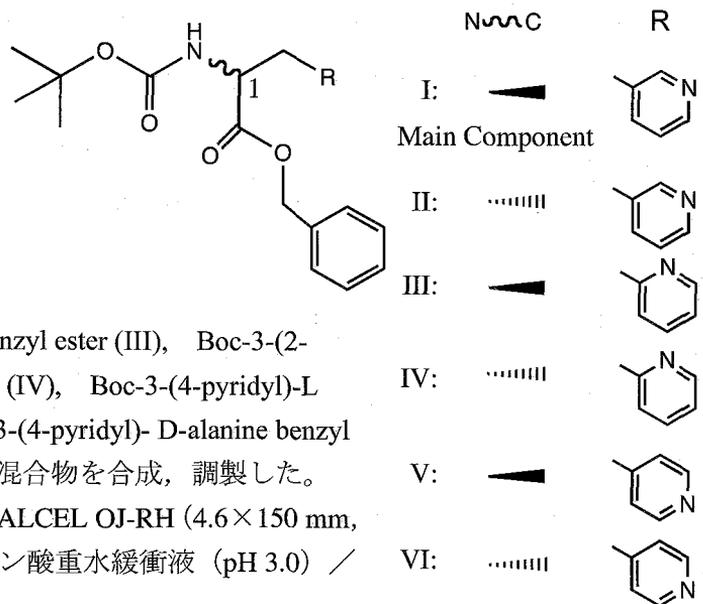
試料として、

Boc-3-(3-pyridyl)-L-alanine benzyl ester (I) を主成分に、対掌体である

Boc-3-(3-pyridyl)-D-alanine benzyl ester (II) 及び、位置異性体である

Boc-3-(2-pyridyl)-L-alanine benzyl ester (III), Boc-3-(2-pyridyl)-D-alanine benzyl ester (IV), Boc-3-(4-pyridyl)-L-alanine benzyl ester (V), Boc-3-(4-pyridyl)-D-alanine benzyl ester (VI) を微量成分とする混合物を合成、調製した。

LC条件は、カラム: CHIRALCEL OJ-RH (4.6 \times 150 mm, 5 μ m), 移動相: 10 mM リン酸重水緩衝液 (pH 3.0) /



アセトニトリル混液 (75 : 25) , 流速 : 1.0 mL/min, カラム温度 : 40 °C, 検出波長 : 254 nm (円二色性スペクトル) である。

【結果と考察】

Fig. 2 に測定で得られたCDクロマトグラムを, また Fig. 3 に同時に測定されたPDA検出器による波長254 nmのUVクロマトグラム示した。共に主成分のピーク以外に, 8本のピークが観測され, 両スペクトルのパターンはよく一致している。

これら主成分と Peak 1 ~ 8 に相当する成分の Stop-flow 測定で得られたNMRスペクトルを, プリジン環部分を拡大して Fig 4 に示した。この図では, Peak 6 が主成分と同じスペクトルを示し, Peak 4 と 5, Peak 7 と 8 がそれぞれ同じスペクトルを示している。一方 Fig. 2 の CDスペクトルからは, Peak 6 (-) と主成分 (+), Peak 4 (+) と 5 (-), Peak 7 (+) と 8 (-) がそれぞれ逆符号となっており, これらの結果から Peak 6 が主成分の対掌体 II であり, またピーク 4 と 5, ピーク 7 と 8 同士がそれぞれ光学異性体であることも分かる。さらに, そのNMRスペクトルパターンから, ピーク 4, 5 は異性体 V, VI, ピーク 7, 8 は III, IV であることも推測できる。

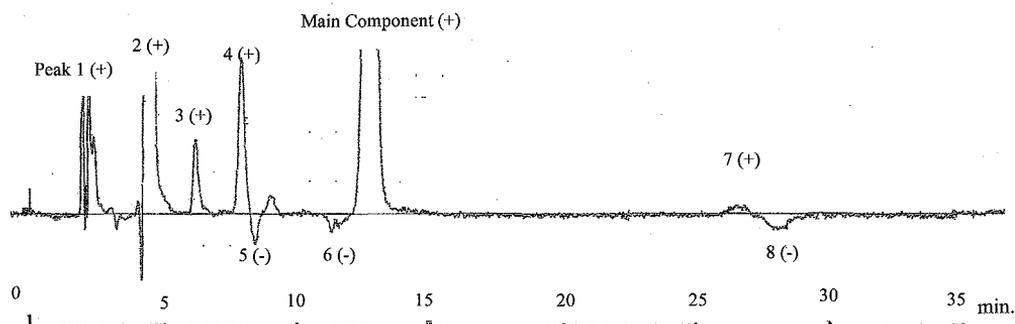


Fig. 2 LC-CD chromatogram of mixture sample

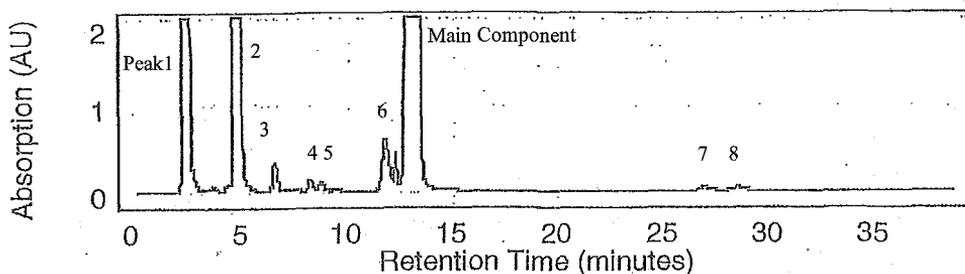


Fig. 3 LC-UV chromatogram of mixture sample (extracted at 254 nm)

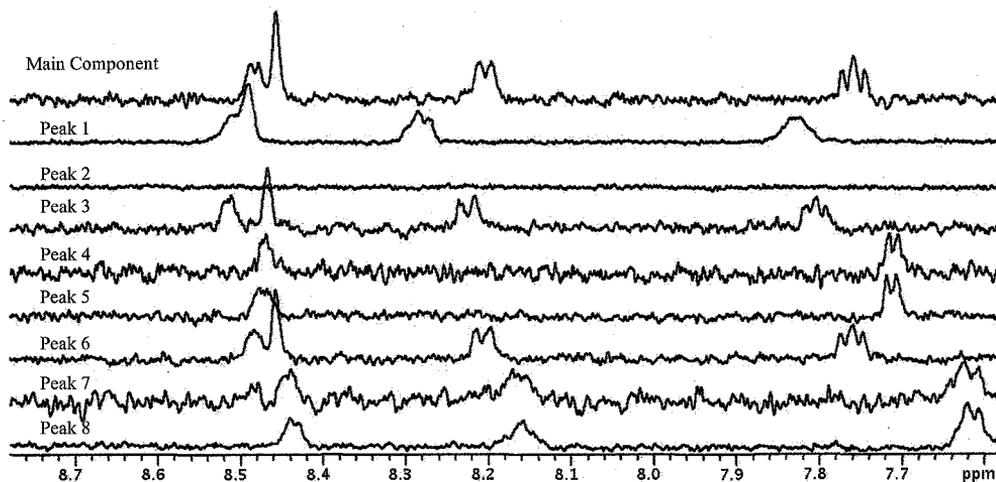


Fig. 4 ^1H -NMR spectra of main component and corresponding to peak 1~8 measured with LC-CD-NMR system. (Pyridyl region)

以上のように、LC-NMRにCD検出器を組み込むことで、単離精製することなく、構造に関する情報を得られるだけでなく、NMRでは区別できない光学異性体についても、一義的に特定することができる。今後、合成研究分野だけでなく、代謝の研究等にも広く応用可能であると思われる。

【文献】

- 1) Mistry, N., Roberts, A. D., Tranter, G. E., Francis, P., Barylski, I., Ismail, I. M., Nicholson, J. K., Lindon, J. C. *Analytical Chemistry*, **1999**, *71*, 2838-2843.

○吉田 卓也¹, 小林 祐次², 大久保 忠恭¹¹大阪大学大学院薬学研究科²大阪薬科大学**Improvement in Analysis of Nonlinear Sampled Data**○Takuya Yoshida¹, Yuji Kobayashi², and Tadayasu Ohkubo¹¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Japan.²Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Takatsuki, Japan.

The increased sensitivity provided by recent developments in NMR instruments makes fast NMR data acquisition methods increasingly attractive. It is now widely recognized that nonlinear sampling (NLS) technique makes it possible to reduce data acquisition time substantially. However, because fast Fourier transformation cannot be directly applied to NLS data, time-consuming methods, including maximum entropy reconstruction, are required. In this presentation, we will describe an improved reconstruction method using a priori information to constrain the spectrum and its fast implementation on GPU.

「目的」

近年、NMR装置の高感度化が進み少ない積算回数でも高いSN比が実現されるようになったが、通常の多次元NMR測定では各次元の分解能に依存したポイント数の積のデータ取得が必要であり、測定時間の短縮には至らない。そのため、非線形サンプリング(Nonlinear sampling; NLS)によって、多次元空間の一部のみをサンプリングすることが有効であると認識され盛んに応用されつつある[1]。NLSデータには高速フーリエ変換を適用することが出来ないため、試行スペクトルと観測データの残差を最小化するようなスペクトル再構成法を用いる必要がある。また、サンプリング数が周波数領域で必要な分解能を満たさず劣決定系となるため、解を正則化するための手法が必要となる。しばしば用いられる最大エントロピー法(MaxEnt)[2]では、式1の目的関数を最大化することによってスペクトルを再構成するため、測定データを満たすスペクトルのうち式中の“エントロピー”項Sを最大にするものが解となる。ここで、Sは一般に平坦なスペクトルで最大値を取り、推定されるスペクトルには特別なバイアスが無いと考えられることから、その使用が正当化される。しかし、多次元NMRスペクトルを数種類組み合わせる際、ほとんどの場合にはスペクトル間で相関がある。従って既知のスペクトルがある場合、平坦なスペクトルモデルが最善とはいえない。

非線形サンプリング，最大エントロピー法

○よしだたくや，こばやしゆうじ，おおくぼただやす

そこで、スペクトル再構成時に既知のスペクトル情報を取り入れる手法について検討した。

$$Q(f) = S(f) - \lambda \frac{1}{2} \chi^2(f) \quad (1)$$

「方法・結果」

スペクトル再構成における目的関数を式2のように既知情報と試行スペクトルの差に依存するペナルティ関数Rを含むものとした。

$$Q(f) = S(f) - \kappa R(f) - \lambda \frac{1}{2} \chi^2(f) \quad (2)$$

2次元のシミュレーションデータを用い、既知情報として1次元投影スペクトルデータを用いた場合、実質的には“エントロピー”項の寄与が無くてもNLSデータからスペクトルを再構成することが出来た。そこで、3次元以上のデータについても低次元スペクトル等の情報を用いた再構成を試みている。

また、スペクトル再構成は収束するまで繰り返し計算が必要であり、多次元NMRスペクトルの処理には大きな計算コストがかかる。目的関数の最適化において、その勾配を繰り返し計算するため、多数回のフーリエ変換・逆変換を行う。そこで、フーリエ変換をGPU (Graphics Processing Unit) を用いて並列実行することによってNLSデータを高速に処理するシステムを構築している。

[1] Sakakibara D. et al. (2009) *Nature*, 458, 102-5

[2] Hoch J. C. & Stern A.S. (1996) *NMR data processing*. Wiley-Liss, NY

Total compensation of pulse transients based on resonator response

Yutaka Tabuchi¹, Makoto Negoro¹, Kazuyuki Takeda² and Masahiro Kitagawa¹¹Graduate School of Engineering Science, Osaka University²Graduate School of Science, Kyoto University

Abstract: We propose a method of designing the shape and phase of an rf-pulse so as to form intended profile in a resonator. The profile of the designed pulse is computed based on the resonator's response which can be measured using a pick-up coil placed beside the sample coil. The resultant profiles in a resonant circuit show decrease of transient phenomena even in the existence of non-linear devices. NMR spectra also shows much less phase distortion arising from the phase transient of the rf pulse in the resonator.

従来のパルス核磁気共鳴実験において、プログラムされたパルス磁場は我々が意図したものとは逸れ、スピンは振幅や位相について誤差を含んだラジオ波磁場を感じている。この誤差は分光計内のフィルタやアンプなどの回路素子や、プローブに用いられる共振回路の過渡現象に起因する。過渡現象による振幅や位相の誤差はスピンのダイナミクスを複雑にし、高速な変調を必要とする多重パルス実験や、正確なスピントロールを必要とする量子計算において特に問題となる。最近、我々は振幅の誤差に関する補償法を線形応答理論に基づいて展開した [1]。波形を大きく歪める共振回路のある応答関数によって近似させ、波形歪みを打ち消すことのできるパルス励起電圧波形を計算する手法を提案した。本研究ではプローブ回路を含めた分光計全体を詳細に評価し、得られた応答関数に基づいた補償法を提案する。

核磁気共鳴分光計内の D/A コンバータの出力電圧波形は、様々な要因によって歪み、パルス照射磁場としてスピンス系に照射される。この歪みの原因をモデル化するために、我々は線形応答理論を分光計全体に適用する。D/A コンバータの出力電圧 $v(t)$ と照射磁場波形 $B_1(t)$ の間に線形性を仮定すると、線形応答理論によれば $v(t)$ と $B_1(t)$ の間の関係は

$$B_1(t) = h(t) * v(t) = \int_{-\infty}^t h(t-\tau) v(\tau) d\tau \quad (1)$$

と記述される。ここで * 記号は畳み込み積分を意味し、また $h(t)$ は応答関数と呼ばれる波形歪みの原因を記述するモデルの核であり、Tesla/volts の次元を持つ。例えば全く歪みの無い理想的な場合であれば、 $h(t) = k\delta(t)$ と Dirac のデルタ関数と適当な比例係数 k によって与えられ、 $B_1(t) = kv(t)$ が導かれる。もし波形ひずみの原因 $h(t)$ を知ることができれば、任意の磁場照射波形 $B_1(t)$ を共振コイル内に与える電圧波形 $v(t)$ を計算することができる。ラプラス変換 $\mathcal{L}[a(t)] = A(s) = \int_0^{\infty} a(t) \exp(-st) dt$ を用いて、

$$v(t) = \mathcal{L}^{-1}[H(s)/B_1(s)] \quad (2)$$

と表現することができる。ここで $H(s)$ と $B_1(s)$ は $h(s)$, $B_1(s)$ のラプラス変換であり $\mathcal{L}^{-1}[\cdot]$ は逆ラプラス変換を意味する記号である。この電圧波形を“補償パルス”と呼ぶ。

キーワード: 過渡現象, 応答関数, 共振回路

たぶちゆたか, ねごろまこと, たけだかずゆき, きたがわまさひろ

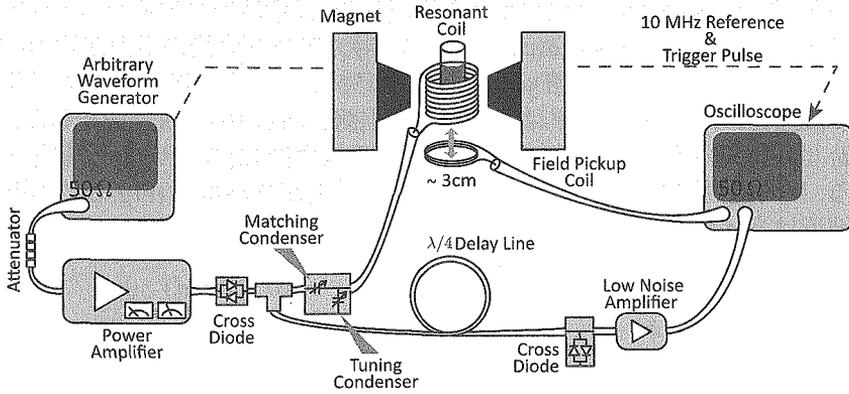


Fig. 1: A schematic diagram of the experimental setup.

線形応答理論によれば、応答関数は適当な入力に対する出力を得ることで導くことができる。適当な入力電圧を $u(t)$ とし、対応する磁場波形を $y(t)$ とする。するとこの関係は

$$y(t) = h(t) * u(t) \quad (3)$$

となる。ここで $h(t)$ は前述の応答関数である。この応答関数を求めるために入力 $u(t)$ に対する応答磁場波形 $y(t)$ を実測することが出来れば、両辺をラプラス変換することで

$$H(s) = Y(s)/U(s) \quad (4)$$

が与えられる。この関係を式(2)に代入することによって

$$v(t) = \mathcal{L}^{-1} \left[\frac{Y(s)}{U(s)B_1(s)} \right] \quad (5)$$

を得る。つまり、予めある適当な入力 $u(t)$ に対する応答 $y(t)$ を測定しておき、共振コイル内に発生させる磁場波形 $B_1(t)$ を与えることで補償パルスは計算することができる。

実験系は Fig. 1 のように構成した。任意波形発生器 (AWG7102, Tektronix) からの励起電圧波形はパワーアンプで増大されクロスダイオードと $\lambda/4$ 線から成るデュプレクサに入力される。共振回路は 12.7 MHz の共振周波数となるように調整し、給電路と整合がとられている。ネットワークアナライザによって測定した Q 値は約 35 であった。共振コイルからの磁場は 3cm 離れたピックアップコイルによって、また NMR 信号は増幅された後にデジタルオシロスコープ (DPO7254, Tektronix) によって観測される。

スピンの感じる照射磁場をピックアップコイルを用いて測定することによって、補償パルスの効果を確認した。ここではデュプレクサ以降 NMR 観測系は取り外している。初め

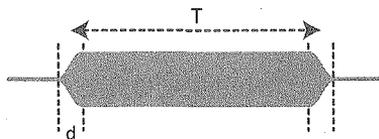


Fig. 2: A profile of an rf-pulse with cosine rising and trailing edges (transition time d) and a plateau (dutation T).

に系の応答を測定し、応答から補償パルスを構成した。任意波形発生器から 10 GS/s の時間分解能でステップ入力 $u(t) = \sin(\omega_0 t)$ ($t > 0$) を与え、アンプ直後の電力が約 10 W となるように減衰器を調整した。磁場応答 $y(t)$ はピックアップコイルを通してデジタルオシロスコープで観測され、標本化レートは任意波形発生器と同じ 10 GS/s に設定した。観測された応答 $y(t)$ は離散的なデータであり、数値的ラプラス変換 [2] を用いると補償パルスの計算ができる。目的磁場波形 $B_1(t)$ としてコサイン立ち上がりパルス (Fig. 2) を採用した。このパルス波形は次式のように定義される。

$$B_1(t) = \begin{cases} \frac{1}{2}[1 - \cos(\pi t/d)] \sin(\omega_0 t + \phi) & (0 \leq t < d) \\ \sin(\omega_0 t + \phi) & (d \leq t < T) \\ \frac{1}{2}[1 - \cos(\pi(T+d-t)/d)] \sin(\omega_0 t + \phi) & (T \leq t < T+d) \\ 0 & (\text{otherwise}) \end{cases} \quad (6)$$

ここで $T = 7 \mu\text{s}$, $d = 1 \mu\text{s}$ とし、式 (5) に基づいて補償パルスを計算した。計算結果を Fig. 3(b) に示す。

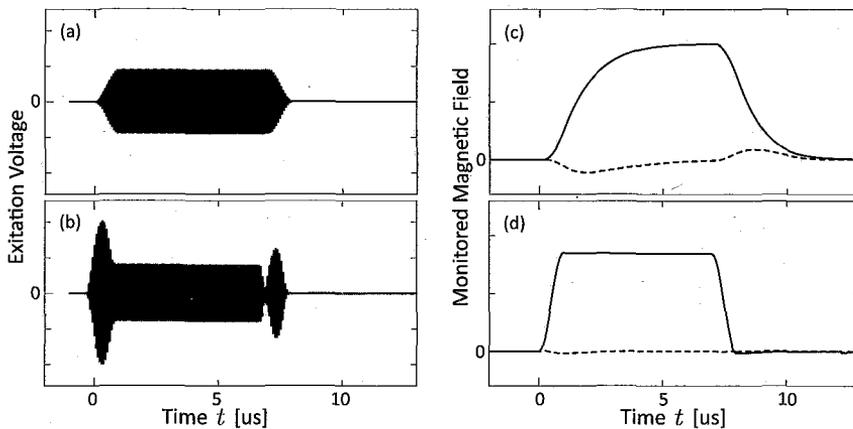


Fig. 3: (a) A cosine rise and trailing pulse generated by an arbitrary wave form generator, and (b) its compensation pulse, the shape of which was computed from Eq. (5). Both of them have the same carrier frequency of 12.7 MHz. The resultant magnetic field without compensation is shown in (c), and compensated one is in (d), demodulated into two orthogonal components. Solid and dashed lines denote the in-phase components and the quadrature-phase ones respectively.

Fig. 3(a)(b) のコサイン立ち上がりパルスとその補償パルスを励起電圧として与え、ピックアップコイルを通して共振コイルに生じる磁場波形をオシロスコープによって観測した。デジタル直交復調を施した結果を Fig. 3(c) (d) に示す。図から明らかなように、振幅の鈍りの改善と同時に、立ち上がりや立下りの位相変化の結果として生じる直交成分を良く抑制できていることが分かる。

次に水の ^1H NMR による補償パルスの効果を確認した。Fig. 1 の実験系においてステップ応答を計測し、この応答に基づいて補償パルスを計算する。0.298 Tesla のマグネットを用い、 $d = 1 \mu\text{s}$ とし、照射時間 T に対する FID 信号を観測した。Fig. 4 に照射時間に対するスペクトル波形を示す。従来のパルスを用いた場合と補償パルスを用いた場合の Nutation 周波数が等しくなるように可変減衰器を調整している。

パルスの立ち上がりや立下りに生じる位相の変化は、パルス照射時のFIDスペクトルを分散波形へと導く。本実験ではパルス長さ $T = 4.3 \mu\text{s}$ が π パルスであり、従来のパルス照射では π パルス照射時に分散波形が観測されている (Fig. 4(a)). 一方補償パルスを用いることで分散波形は消失し、正弦的な Nutation の様子が見られる (Fig. 4(b)). これらの結果よりパルスの立ち上がり、または立下りにおける位相変化の影響を良く抑制していると言える。

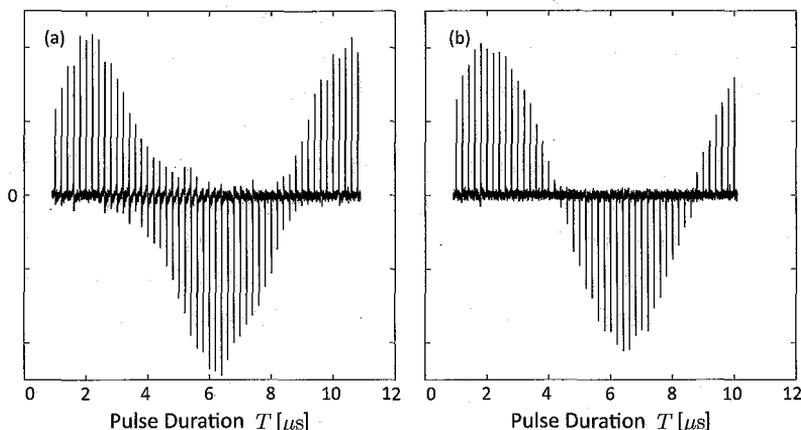


Fig. 4: Nutation of ^1H NMR spectra of water using (a) conventional cosine rise and fall pulse and (b) compensated one.

観測に関する不感時間については、全不感時間 $15 \mu\text{s}$ に対して $4 \mu\text{s}$ 程度の低減しか見られなかった。Fig. 3(d) から分かるように、実際には NMR 信号強度に対して十分に過渡信号が小さくなるような完全な補償は行えていない。これらの補償の不完全の原因としてパワーアンプやクロスダイオード等の非線形素子が考えられ、次のステップとして非線形モデルを採用した補償パルスの開発が必要となる。

本研究は補償パルスの構成法を提案し、その効果を実験により確認した。その結果、振幅と位相に関する誤差を良く抑制できていることを示した。共振器の振幅・位相過渡現象は共振器の時定数 $\tau = 2Q/\omega_0$ に対してパルス幅 T が小さくなればなる程顕著となる。本研究は Q 値の高いクライオコイルプローブ [3] や、周波数が低く高速な変調を必要とする固体材料に対する多重パルス実験、また正確なスピンコントロールを必要とする NMR/ESR 量子計算機の実現に十分な効果が発揮できると期待される。

Acknowledgement

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。

References

- [1] K. Takeda *et al.*, *J. Magn. Reson.* **197**, 242-244 (2009).
- [2] S. Ichikawa, *IEICE Tech. Rep.*, CAS **101**, pp. 107-114, Jun. 2001.
- [3] T. Mizuno, *et al.*, *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 044706 (2008).

NQR を用いた靴に隠された物質探知

○中原優¹、篠原 淳一郎¹、Bryn Baritomba¹、
赤羽 英夫¹、糸崎秀夫¹

¹大阪大学大学院基礎工学研究科

Detection of substances hidden in shoes using NQR

○Yu Nakahara¹, Junichiro Shinohara¹, Bryn Baritomba¹, Hideo Akaba¹ and Hideo Itozaki¹

¹Graduate School of Science Engineering, Osaka University

In this paper we study the application of nuclear quadrupole resonance (NQR) to the detection of illicit substances hidden in shoes. By combining two gradiometer antennas in parallel, we formed a cloverleaf shaped antenna covering a 26cm square. After simulating the magnetic field distribution, we optimized the strong off-resonance comb (SORC) pulse sequence. As a result, we were able to obtain a clear NQR signal from a 200g sample of HMT in 5 seconds.

NQR(核四極子共鳴)は、化学物質を非接触で検知できる技術であり、その技術を応用したセキュリティ分野での活躍が期待されている。また、多くの爆発物や不正薬品には、NQR 反応を起こす ¹⁴N を持つことから、NQR を用いた検知技術の有効性は大きいものと予想される。

現在、密輸方法として不正薬品を靴の中に隠匿し、国内に持ち込まれている事例がある。このように巧妙に隠匿され持ち込まれる不正物質に対し、NQR を用いてこの物質を検知するためには、靴の中にある少量の物質を短時間で検知できるアンテナの構造と NQR パルスシーケンスが必要となる。

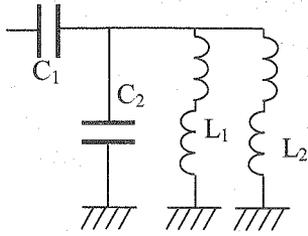
そこで、本研究では靴の中に隠された化学物質に効率良く励起磁場を与え、その化学物質を検知できるアンテナ構造の検討を行った。

アンテナ構造

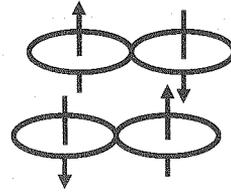
従来の NQR では、二つのコイルを磁場が反対向きに照射されるように接続し、遠方から一様に入ってくるノイズに対して差分型となり耐ノイズ性の高いグラジオメータを用いていた。一つのグラジオメータを用いた NQR 測定では、靴のように測定対象が複数あるときに信号感度を上げることができなかった。Fig.1(a)に作製した共振回路の回路図を示す。整合用コンデンサ C_1 と共振用コンデンサ C_2 を接続し、 C_2 に並列に二つのグラジオメータを接続している。この二つのグラジオメータを Fig.1(b)のように、グラジオメータの各ループが作り出す磁場が隣り合うループについて違う方向になるよう配置する。この二つのグラジオメータを固定し、四つのコイルを持つアンテナを作製した。各グラジオメータのループの直径は 13cm、巻き数 3 巻きである。

NQR、非接触検知、ヘキサメチレンテトラミン

著者ふりがな：○なかはらゆう、しのはらじゅんいちろう、ばりとんぱぶりん、あかばひでお、いとざきひでお



(a) Resonant circuit



(b) Adjacent gradiometers

Fig.1 Structure of antenna

励起磁場の分布測定

作製したアンテナ(26cm×26cm)について、励起磁場の分布を見るための磁場シミュレーションを行った。磁場シミュレーションはアンテナ表面の磁場について、有限要素法を用いた解析ソフト Opera 3D を用いて行った。磁場の絶対値をアンテナの各箇所において解析した結果を Fig.2 に示す。

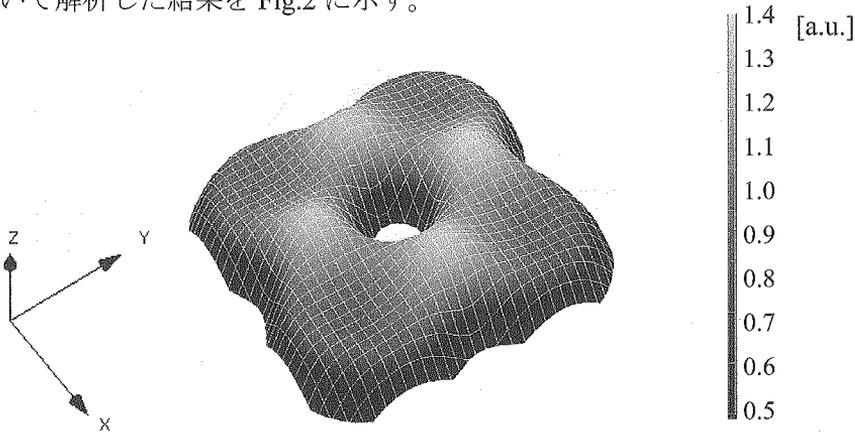


Fig.2 Magnetic field created by antenna

Fig.2 に励起磁場の強度の分布のシミュレーション結果では、xy 平面にアンテナがあり、z 軸がその場所での磁場の絶対値を示した。磁場強度は、アンテナ全体の中心では、磁場がほとんど無く、中心まわりで磁場強度は強くなりグラジオメータのループ同士の間で最大となる。また、中心付近から離れるにつれて磁場強度が減少する。

コイル結合部では、隣り合ったコイルの磁束の流入と流出が重なり強め合っただけで磁場が強くなる。逆にアンテナ全体の中心では、強め合っただけで磁場が弱めあう方向に集まるので磁場が弱くなる。

NQR 信号の分布測定

作製したアンテナについて、アンテナの受信感度分布を測定した。アンテナ(26cm×26cm)の表面において HMT 100g (5cm×5cm×5cm)のサンプルを 2cm ずつ動かし、x-y 平面の各箇所で NQR 信号取得し、受信感度分布を作成した。励起磁場分布と同様に、グラジオメータのループ1つについて計測を行い、アンテナ全体に拡張している。測定に用いた NQR 励起信号については、周波数 3.312MHz、電力 146W、受信時間遅延時間 500 μ 秒、SORC シーケンス 4000 回積算 5 秒の測定を行った。この計測の結果を Fig.3 に示す。この計測では、測定時間をより短くするために SORC シーケンスを用いた。SORC (strong off-resonant comb:($\theta_{90}-(\tau/2-\theta_{90}-\tau/2)_n$))は、縦緩和 T_1 を待たずに励起パルスを打ち続け、FID 信号と ECHO 信号の足し合わせを取得するシーケンスである。このシーケンスでは、パルスとパルスの間隔を短くできるので、 T_1 の長い物質であっても短い時間で積算回数を増やすことができる。サンプル HMT(ヘキサメチレンテトラミン)4000 回積算において、FID シーケンスで計測時間 5 分かかるのに対して、SORC シーケンスでは測定時間 5 秒にまで減らすことができる。

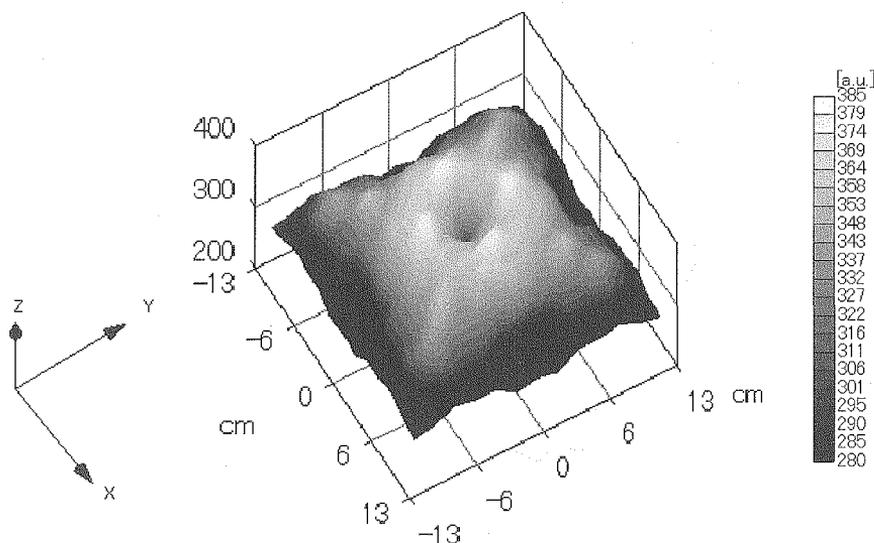


Fig.3 NQR signal strength distribution

Fig.3 では、xy 平面にアンテナがあり、z 軸がその場所での NQR 信号強度を示している。NQR 信号強度は、アンテナ全体の中心でほとんど取得できず、NQR 信号強度が中心を取り巻くように強くなっている。励起磁場の分布 Fig.2 と比較すると、最大励起磁場の部分で NQR 信号も最大となっている。励起磁場の分布に比べ、NQR 信号強度の変化が大きく、最大信号以外の部分で NQR 受信感度が大幅に落ち込む。これは、NQR 信号を取得するためには最適な 90° パルス幅が存在し、サンプルに照射される磁場がそれ以上でもそれ以下でも信号が減少してしまう。Fig.3 で、励起磁場が最大になるところでパルス幅を最適化している為、それ以外のところの場所で信号が十分磁場が照射されておらず、励起磁場の減少以上に受信感度が落ちている。さらにサンプルに大きさがあるため受信感度分布に乱れがある。

靴の中に入れたサンプルの NQR 信号取得

作製したアンテナについて、靴の中に隠匿されたサンプルを 5 秒の計測でどの程度の SNR で NQR 信号を取得できるかの計測を行った。サンプルは、Fig.4 に示すように靴の踵の底を削り、そこに HMT 100g を詰め込んだものである。靴の両足に入れているので計 200g の HMT を測定することとなる。なお、踵の底の厚さは 1cm である。

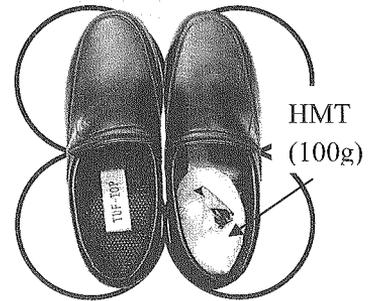


Fig.4 HMT hidden in shoes.
Circles show antenna placement

靴の中に 200g の HMT 入れたサンプルを、Fig.4 と同じようにアンテナの真上に置き信号測定を行った。周波数 3.312MHz、電力 146W、受信時間遅延時間 500 μ 秒、SORC シーケンス 4000 回積算 5 秒の測定を行った結果を Fig.5 に示す。測定した信号について SNR を計算しているが、このときのノイズの定義は受信周波数でサンプルを置いていないときの 3.312MHz でのノイズとしている。これは、受信周波数に共振回路があっているので、その周波数のノイズも増幅され受信感度に大きく影響を与えるからである。

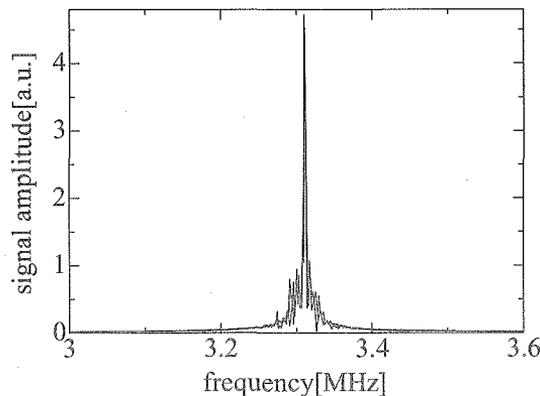


Fig.5 HMT signal

SORC シーケンス 4000 回積算 5 秒で靴の中の 200g の HMT において、SNR 2.0 の信号を得ることができた。

まとめ

本研究では、二つのグラジオメータをあわせたものをアンテナとし、広い面積に励起磁場を照射できるようになった。左右の靴について、同時に計測できるようになり、5 秒で SNR 2.0 の明瞭な信号を取ることに成功した。

参考文献

- 1) A. Konnai ; N. Odano ; T.Asaji ; Hyperfine Interact(2008) 181;93-98

低分子量生体分子のNMR立体構造/化学シフトを

BMRBデータベースへ登録するための日本サイト公開

○中谷 英一^{1,2}、松浦 孝範^{1,2}、Steven Mading³、原野 陽子²、小林 直宏²、Eldon L. Ulrich³、John L. Markley³、阿久津 秀雄²、中村 春木²、藤原 敏道²
¹科学技術振興機構-BIRD、²大阪大学蛋白質研究所、³ウィスコンシン大学マディソン-BioMagResBank

Release of SMSDep (Small Molecule Structure Deposition) website at PDBj in Japan.

○Eiichi Nakatani^{1,2}、Takanori Matsuura^{1,2}、Steven Mading³、Yoko Harano²、Naohiro Kobayashi²、Eldon L. Ulrich³、John L. Markley³、Hideo Akutsu²、Haruki Nakamura²、Toshimichi Fujiwara²

¹Japan Science and Technology Agency – BIRD, ²Institute for Protein Research, Osaka University, ³University of Wisconsin Madison, BioMagResBank

A data deposition website, “SMSDep” (Small Molecule Structure Deposition) has been released at PDBj in Japan in this autumn following at BMRB main site in University of Wisconsin Madison. The SMSDep is a data deposition system for the NMR structures of small biological molecules that fall outside the guidelines of the PDB (i.e. the molecule is a peptide with 23 or fewer residues, a polynucleotide with 3 or fewer residues, a polysaccharide with 3 or fewer sugar residues, or a natural product) along with their chemical shifts. These NMR structures are accepted by BMRB entry, not by PDB. Authors choose the website either ADIT-NMR or SMSDep based on the size of studied molecule. The deposition process in SMSDep is quite similar to that in ADIT-NMR. The website of “BMRB/PDB deposition tutorial” at PDBj will be available to support the data deposition of SMSDep and ADIT-NMR.

BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank)では、PDB (Protein Data Bank)で登録を受け付けていない23残基以下のタンパク質や3塩基以下の核酸、3つ以下の糖鎖のNMR立体構造データの登録を受け付けている。PDBj (Protein Data Bank Japan)でも、そのような低分子量生体分子のNMRで決定された立体構造と化学シフトなどの

キーワード：データベース、BMRB、SMSDep

○なかたにえいいち、まつうらたかのり、Steven Mading、はらのようこ、こばやしなおひろ、Eldon L. Ulrich、John L. Markley、あくつひでお、なかむらはるき、ふじわらとしみち

BMRBデータベース登録を受け入れるウェブサイト「SMSDep」(Small Molecule Structure Deposition)をこの秋に公開する。SMSDepは従来のBMRB/PDBデータ登録ウェブサイト「ADIT-NMR」を基本として開発されており、利用や登録の方法はほぼ同様である。登録する生体高分子の大きさによって、登録者がSMSDepかADIT-NMRかを選択する。SMSDepでは登録時にPDB IDは発行されず、NMR化学シフトと立体構造の登録データの組に対して1つのBMRB登録番号(BMRB Accession Number)がSMSDepによって自動的に発行される。

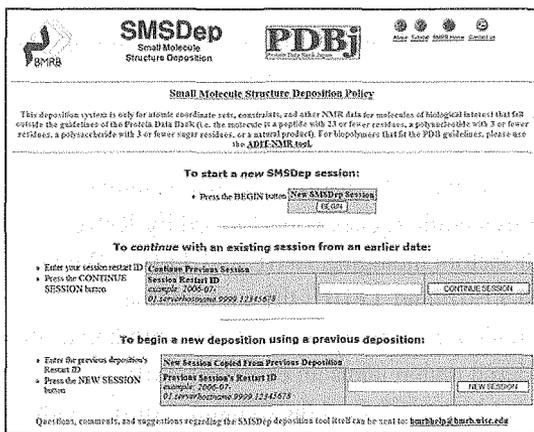


Fig. 1 Top page of SMSDep

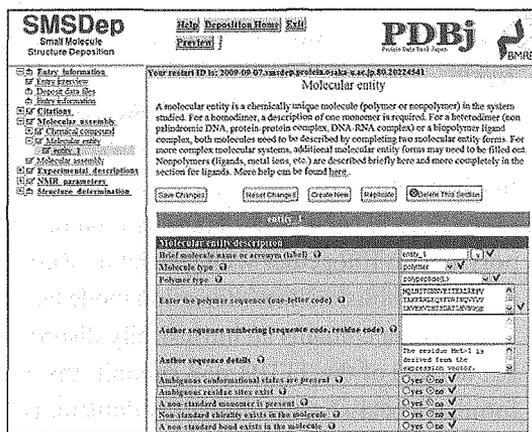


Fig. 2 Data inputting page of SMSDep

URL: <http://smsdep.protein.osaka-u.ac.jp/bmrbs-adit>

NMR構造の登録ではPDBフォーマットの原子座標ファイルと立体構造決定で使った制限情報ファイルの提供が必須である。タンパク質と核酸の登録における原子座標の確認は、PDBの「Maxit」を使用してRamachandran plotsや χ_1 - χ_2 plots、2次構造特性などによる立体構造や記述の一貫性などの確認がPDBjによって行なわれる。これは23残基以上のタンパク質のNMR立体構造をADIT-NMRでPDBに登録するときの手続きと同様である。ただし、3残基未満についてはこのような検定は行わない。

また、PDBjのBMRBグループでは、SMSDepによるデータ登録受け付けを開始するのを機会に、PDBj-BMRBウェブサイトの「PDB/BMRB登録の手引き」の日本語ページを更新する。これらと併せてBMRBとPDBの簡易登録ツール「BESS」(BMRB Entry Support System)を開発し、よりNMRデータの登録しやすい環境づくりに向けて活動している。



Fig. 3 The top page of PDBj-BMRB website for BMRB/PDB data deposition tutorial.

URL: <http://bmrdep.protein.osaka-u.ac.jp>

ヒト基本転写因子TFIIE alpha 酸性ドメインの動的構造解析

○小松正史¹, 奥田昌彦¹, 長土居有隆¹, 菅瀬謙治², 西村善文¹

¹横浜市・生命ナノシステム・生体超分子システム科学

²サントリー生物有機科学研究所

NMR dynamics of the acidic domain of human TFIIE alpha

○ Tadashi Komatsu¹, Masahiko Okuda¹, Aritaka Nagadoi¹, Kenji Sugase²

Yoshihumi Nishimura¹

¹Lab. of Struct. Biol., Grad. Sch. of Supermol. Biol, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.

²Suntory Institute for Bioorganic Research. Osaka, Japan.

In eukaryotic cells, many nuclear proteins contain intrinsically disordered regions under physiological conditions. Transcription of protein-encoding genes is performed by RNA polymerase II together with general transcription factors including TFIIE and TFIIH. We have already established the interaction mode between TFIIE and TFIIH; the acidic domain of TFIIE alpha contains an intrinsically disordered region in its free state and upon binding to the PH domain of the TFIIH p62 subunit, the disordered region takes an extended conformation forming a beta-sheet with the PH domain. Here, we have examined the dynamics of the acidic domain of TFIIE alpha upon binding to the PH domain of TFIIH by NMR R2 dispersion spectroscopy, which is a sensitive technique for characterizing to the chemical exchange processes on sub millisecond-millisecond time scale.

真核生物の特に核内蛋白質において、遊離状態では特定の立体構造を持たないがターゲットと結合すると特定の立体構造へとフォールディングする領域、天然変性領域を持つものが多く見られる。蛋白質をコードする遺伝子情報を元にmRNAを合成する過程、転写を制御する因子である転写因子と呼ばれる蛋白質の多くの部分でも天然変性領域が見られ、近年注目を集めているiPS細胞を誘導する転写因子もまた天然変性領域を持っている。転写因子の天然変性領域の動的構造と機能との相関を原子レベルでおこなうことは、転写を合理的に制御する研究をおこなうために重要である。

NMR緩和時間測定であるR2分散測定は、蛋白質の構造変化、酵素反応、蛋白質-リガンド結合などの重要なイベントを含む時間領域、サブミリ秒からミリ秒オーダーの化学交換(構造変化)を解析することができる。

mRNAを合成する際にRNA Polymerase IIが正確に機能することを補助する基本転写因子のうち、本研究室で機能と構造が明らかとなっているヒトTFIIH p62サブユニットPHドメインと天然変性領域で結合す

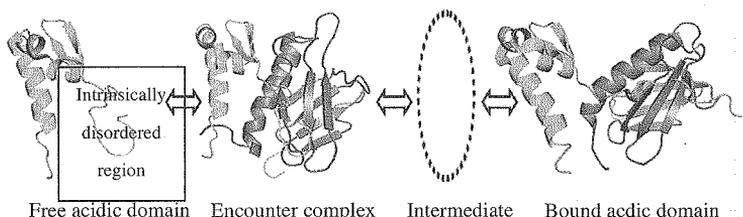


Fig. 1 Binding mode of the acidic domain of human TFIIEalpha to the PH domain of human TFIIH p62 subunit.

るalpha 酸性ドメインに ^1H - ^{15}N HSQC測定と ^{15}N R2分散測定を行い、化学交換モデルの決定および分子認識機構を原子レベルで解明する。

【結果】

^{15}N 標識したTFIIE alpha 酸性ドメインと非標識のp62 PHドメインを用いて ^1H - ^{15}N 異種核単量子相関(HSQC)測定を行った。この実験から ^{15}N 標識したTFIIE alpha 酸性ドメインのアミド基の ^{15}N 、つまり酸性ドメインの主鎖の立体構造変化の情報が得られる。PHドメインを加える前の酸性ドメインのN末端に対応するシグナルは、特定の立体構造のない領域で見られる ^1H 化学シフトの狭い範囲での集中が見られた。非標識のPHドメインを加えていくと酸性度メインN末端に対応するピークが連続的にわずかにシフトしていく現象(速い交換)とそれぞれの位置は変わらず、別の位置にもうひとつのピークが出現する現象(遅い交換)が同時に見られた。速い交換は酸性ドメインとPHドメインの非特異的な相互作用による複合体の形成、遭遇複合体の形成を示唆するものであり、特異的な複合体形成(遅い交換)と比べ、非常に速い交換速度を持つため別々に測定されたと推測される。

^{15}N 標識したTFIIE alpha 酸性ドメインと非標識のp62 PHドメインを用いて ^{15}N R2分散測定を行った。この実験から酸性ドメインの主鎖の動的構造に関する情報を得られ、ミリ秒からサブミリ秒オーダーの化学交換が存在する場合、R2分散曲線は減衰していくが、存在しない場合は水平である。

^{15}N R2分散測定の結果、酸性ドメインN末端のアミノ酸残基(F387, V390, D392)でR2分散曲線の減衰が観測された(Fig. 2)。またA391やコアの残基(F434)でもわずかにR2分散が観測された。酸性ドメインのN末端のアミノ酸残基F387-A391は、PHドメインと結合する際に、新たにbeta鎖(S0鎖)を形成している残基である(Fig. 3)。そのため、S0鎖上のF387とV390、S0鎖に近いD392で観測されたR2分散は、この立体構造変化を捉えたものであると考えられる。

現在、複数の濃度比でR2分散測定を行い、化学交換速度、存在比、化学シフト差の取得を行い、折りたたみ中間体などが存在するのかなどを解析している。

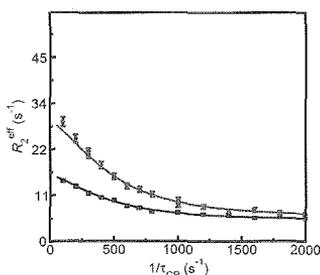


Fig. 2 ^{15}N R₂ relaxation dispersion profile for F387 of the acidic domain of TFIIE recorded at two static magnetic fields.

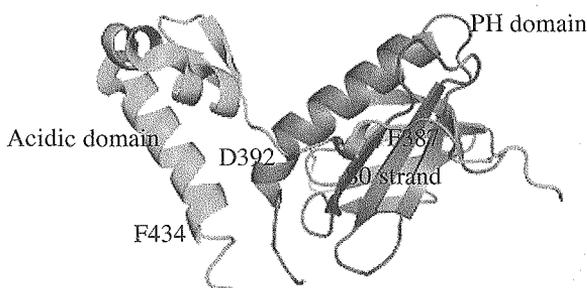
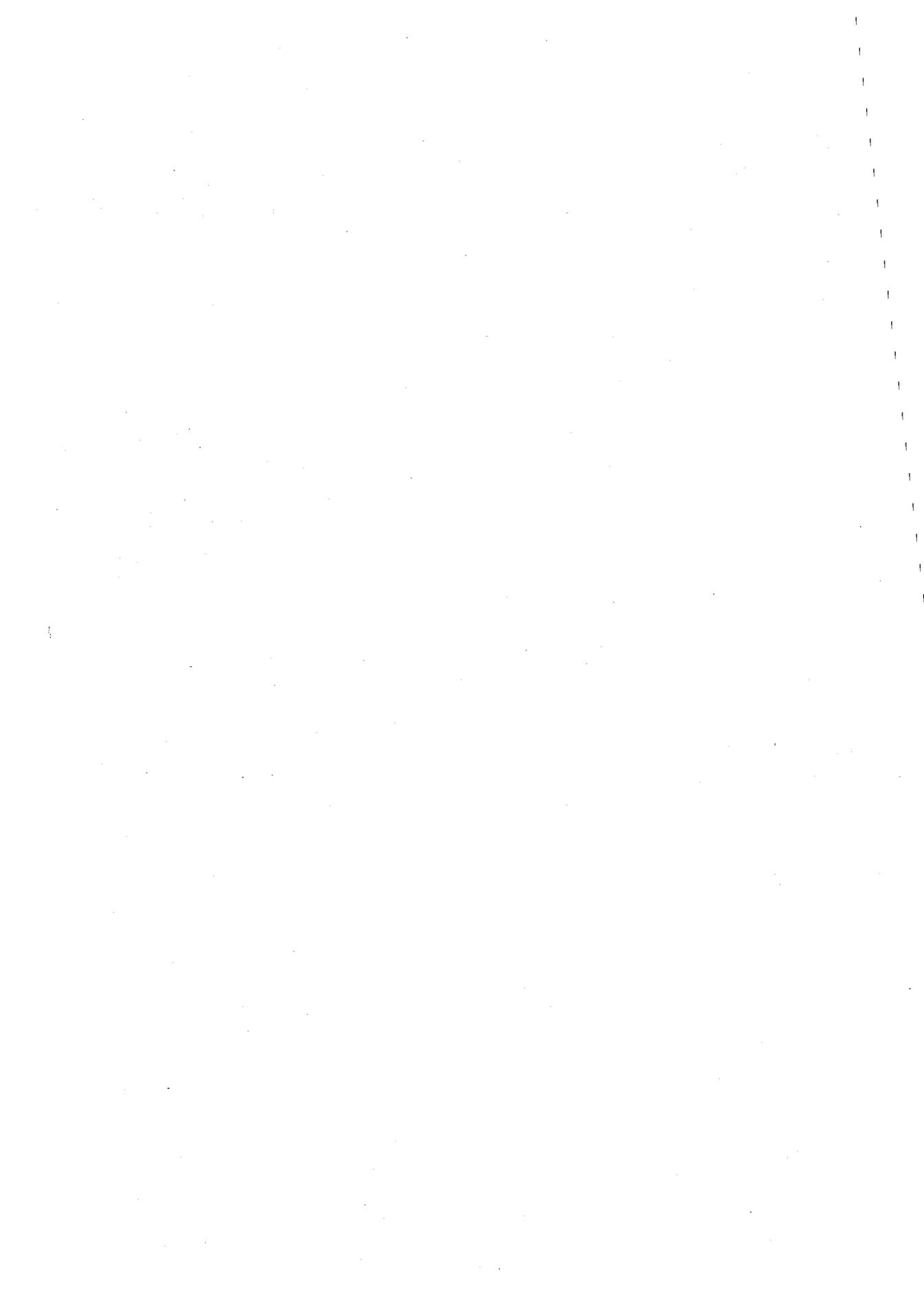


Fig. 3 Structure of the acidic domain of human TFIIE alpha bound to the PH domain of human TFIIEH p62 subunit.

基本転写因子, 天然変性領域, R2分散測定

〇こまつただし, おくだまさひこ, ながどいありたか, すがせけんじ, にしむらよしふみ



キーワード索引

(数字アルファベット)

| | |
|---------------------------------------|------|
| (EDOTTF) ₂ PF ₆ | YP05 |
| ¹ H | 3L8 |
| 2D-NMR | P035 |
| ² H NMR | P074 |
| ² H NMR | YP05 |
| 3 D geometrical phantom | YP09 |
| 4 塩基コドン法 | P092 |
| ¹³ C NMR | P043 |
| ¹³ CPMAS | P057 |
| ¹³ C 標識 | P094 |
| 15N-NMR | P069 |
| ²⁷ Al MAS Spectra | 3L10 |
| ²⁷ Al NMR | P078 |
| ³³ S NMR spectroscopy | P113 |
| ⁴³ CaNMR | P080 |
| ⁵¹ V NMR | P074 |
| ⁹⁵ Mo | P081 |
| ¹²⁹ XeNMR | P084 |
| ²⁰⁷ Pb スペクトル | P055 |

(A)

| | |
|----------------------|------|
| Alkali salt | 2L3 |
| Al-MCM-41 catalyst | 3L10 |
| Al-NMR | P069 |
| ambiguous assignment | P013 |
| Anti-prion compounds | 1L3 |
| assignment | P099 |

(B)

| | |
|----------------------------|------|
| biradicals | P060 |
| BMRB | P120 |
| Brevibacillus choshinensis | P091 |
| brown algae | P035 |
| β-シート構造 | YP01 |
| β-シクロデキストリン | P075 |

(C)

| | |
|-----------------------------|------|
| CAST/CNMR | P076 |
| Chemical shift perturbation | 1L3 |
| chemical shift | P099 |

| | |
|----------------------------|------|
| CIP4 | P006 |
| conformation | P043 |
| Cryogenic probe technology | P113 |
| CSA | P034 |
| CT-PRESS | 1L6 |
| CYANA | P040 |
| cytokine | P001 |

(D)

| | |
|------------------------------|------|
| deuterium label | P034 |
| DFT | P081 |
| DNA double-strand breaks | P029 |
| DNP | P061 |
| DNP | P062 |
| DNP | P088 |
| dodecylphosphocholine | P001 |
| domain orientation | P033 |
| domain orientation | P034 |
| dynamic nuclear polarization | P060 |
| dynamic nuclear polarization | P088 |
| Dynamics | 1L5 |
| dynamics | 3L3 |

(F)

| | |
|----------|------|
| FID | 3L1 |
| FPGA | YP10 |
| fucoidan | P035 |

(G)

| | |
|-------------------------|------|
| GA-AG ミスマッチ塩基対 | P031 |
| Gd 造影剤 | P103 |
| GFP | P032 |
| GLUT4 | P006 |
| GPCR | P023 |
| GPCR | P039 |
| G-quartet | P009 |
| growth-blocking peptide | P001 |
| GST-tag | 3L4 |
| G タンパク質共役受容体 | P037 |

(H)

| | |
|------------|------|
| HETCOR | P114 |
| HMG | P033 |
| homo-dimer | P040 |

| | | | |
|----------------------------|------|-----|---|
| Hyperpolarization | 2L3 | (O) | |
| hyperpolarization | P088 | | Optical pumping 2L3 |
| | | | organic complex YP05 |
| | | (I) | |
| In-Cell NMR | 2L5 | | (P) |
| in-cell NMR | 3L3 | | Photoillumination 2L11 |
| In-cell NMR | P018 | | PH ドメイン P052 |
| In-cell NMR | P019 | | Poly(L-lysine) P043 |
| infinitesimal adjustment | P058 | | poly(β -benzyl L-aspartate) P059 |
| insulin | P006 | | Pressure 2L1 |
| Intermediate | 2L1 | | Pressure application 2L11 |
| isotope labeling | P091 | | protein structure 3L3 |
| | | | Protein-compound interaction 1L3 |
| | | | protein-protein interaction 3L4 |
| | | | proton exchange 3L10 |
| | | | pseudo-contact shift 1L1 |
| | | | p-テルフェニル P076 |
| | | | π - π stacking P009 |
| | | (L) | |
| LC-CD-NMR | P116 | | |
| ligase | P017 | | |
| Light-driven anion pump | P041 | | |
| line-shape | P109 | | |
| Lipid reconstitution | P041 | | |
| Lys63-linked polyubiquitin | P029 | | |
| | | (Q) | |
| | | | Quadruplex DNA P009 |
| | | (M) | |
| MAS | 3L8 | | |
| MAS | P053 | | R ₂ 緩和分散法 P014 |
| MAS | P058 | | R2 分散測定 P121 |
| MAS プローブ | P054 | | Rap80 P029 |
| MAS ローター | P054 | | recombinant protein P091 |
| MBF1 | P020 | | REDOR P050 |
| Membrane Protein | P041 | | Retinal Protein 2L11 |
| Metabolic profiling | P101 | | RF コイル P109 |
| MRI | P104 | | RGD P046 |
| MRI 分光計 | P115 | | Rho-kinase P021 |
| MS | P101 | | ribozyme P017 |
| | | | RNA P016 |
| | | (N) | |
| NDSB | 1L5 | | |
| NMR | P027 | | SAIL P027 |
| NMR | P033 | | SAIL 法 P028 |
| NMR | P094 | | SAIL 法 P095 |
| NMR | P101 | | secretion P091 |
| NMR 帰属法 | P095 | | self-refocused P104 |
| NQR | P119 | | sheared 構造 P031 |
| NQR | YP12 | | shimming method YP09 |
| | | | Signal-to-noise ratio P113 |
| | | | silk fibroin P046 |
| | | (O) | |
| | | (P) | |
| | | (Q) | |
| | | (R) | |
| | | (S) | |

| | | | |
|----------------------|------|--------------|------|
| slice selection | P104 | (あ行) | |
| SMSDep | P120 | 亜鉛イオン濃度検知機構 | 3L5 |
| solid-state NMR | P058 | 圧力 | P086 |
| solid-state NMR | P060 | アプタマー | 3L6 |
| solution structure | P026 | アミノデオキシ誘導体 | P025 |
| spin-diffusion | 3L8 | アミロイド線維 | P049 |
| Stabilization | 1L5 | アミロイド線維阻害 | P049 |
| STD | P090 | アミロイドβタンパク質 | YP17 |
| STMAS | P079 | アミロイドベータペプチド | YP20 |
| structure | P099 | アメロジェニン | P002 |
| | | アルトロース | P025 |
| | (T) | 安定同位体標識 | 1L4 |
| TICAM-1 | P036 | 安定同位体標識 | P015 |
| TICAM-2 | P036 | 安定同位体標識 | P016 |
| TIR ドメイン | P036 | 安定同位体標識 | P096 |
| transcription factor | 3L4 | 安定同位体標識法 | P092 |
| triplet-DNP | P062 | アンフォテリシン B | 3L11 |
| | (U) | 異種核 NOE | P050 |
| UBA domain | P040 | 立体構造 | P019 |
| | (V) | 異種核多次元 NMR | 2L5 |
| Vaccine | 2L1 | 異種核多次元 NMR | P018 |
| | (W) | イネ | P012 |
| Water LOGSY | P090 | 異方性スピン相互作用 | 2L8 |
| Watson-Crick 構造 | P031 | インターネット | P093 |
| | (X) | ウイルスベクター | P096 |
| XRD | P069 | 液晶 | P065 |
| | (Z) | 液状化現象 | YP08 |
| ZZ-exchange 法 | P014 | エポキシ樹脂 | P068 |
| | | 塩酸塩 | YP12 |
| | | 円二色性分光計 (CD) | P116 |
| | | 応答関数 | P118 |
| | | オーバーハウザー | P061 |
| | | オリクチン | YP13 |
| | | オリゴマー | YP17 |
| | | オリゴマー | YP20 |
| | | 温度分布 | P055 |
| | | (か行) | |
| | | 会合性タンパク質 | YP16 |
| | | 開発 | P056 |
| | | 外部ロック | YP06 |

| | | | |
|----------------|------|----------------|------|
| 化学交換 | YP17 | 高磁場 NMR | YP06 |
| 化学シフト異方性 | P059 | 高磁場固体 NMR | P083 |
| 化学シフト異方性 | YP02 | 構造訂正 | P076 |
| 化学純度 | P087 | 高速 MAS | P083 |
| 拡散 | P077 | 高速回転 | P053 |
| 家蚕絹 | P045 | 高速 MAS | P054 |
| カテキン | P050 | 高速 MAS | P055 |
| 過渡現象 | P118 | 高等哺乳動物細胞 | 2L5 |
| 可溶性タグ | P098 | コールドショックベクター | P098 |
| ガラス・融体 | P078 | 極微量固体 NMR | P063 |
| カルシウムアルミノシリケート | P078 | 固体 15N NMR | 3L9 |
| カルシウムハイドロシリケート | P080 | 固体 19F MAS NMR | P075 |
| 緩和時間 | P065 | 固体 NMR | 3L11 |
| 緩和時間解析 | P005 | 固体 NMR | P042 |
| 希ガス | 3L2 | 固体 NMR | P048 |
| 帰属 | P051 | 固体 NMR | P049 |
| 気体拡散係数 | P082 | 固体 NMR | P051 |
| 気体の NMR | P082 | 固体 NMR | P052 |
| 気体輸送特性 | P082 | 固体 NMR | P053 |
| 基本転写因子 | P121 | 固体 NMR | P056 |
| 吸着 | P072 | 固体 NMR | P057 |
| 吸着 | P084 | 固体 NMR | P064 |
| 共振回路 | P118 | 固体 NMR | P066 |
| 共分散 | P114 | 固体 NMR | P068 |
| 金属イオン | P017 | 固体 NMR | P070 |
| 金属イオン錯体 | P042 | 固体 NMR | P071 |
| 金属水素化物 | P074 | 固体 NMR | P072 |
| クロマチン | P022 | 固体 NMR | P073 |
| クロモドメイン | P012 | 固体 NMR | P110 |
| 計量標準 | P087 | 固体 NMR | YP01 |
| 血液透析 | P107 | 固体 NMR | YP02 |
| 結晶化 | P047 | 固体高分解能 | P065 |
| ケモカイン | P003 | ゴム | P083 |
| ケモカイン受容体 | P037 | 混合原子価 | P081 |
| ケモカイン受容体 | P038 | 混合物 | P057 |
| ゲル | P047 | | |
| ゲルフィルム | P044 | (さ行) | |
| 高温超電導 | P111 | 最大エントロピー法 | P117 |
| 高温超電導 | P112 | 錯体 | 1L2 |
| 光学異性体 | P116 | 酸化ストレス | P020 |
| 抗菌タンパク質 | P004 | 残余双極子相互作用 | 1L2 |
| 抗菌ペプチド | YP02 | 残余双極子相互作用 | P015 |
| 光合成 | P024 | 磁化率効果 | P103 |

| | | | |
|-----------------|------|---------------|------|
| シグナル伝達 | P038 | (た行) | |
| シクロデキストリン | P025 | 大腸菌大量発現系 | P098 |
| 自己会合 | P032 | ダイナミクス | P019 |
| 自己凝集 | P002 | 多孔質 | 3L2 |
| 脂質二重膜 | 3L11 | 多重共鳴 | P097 |
| 脂質二重膜 | P052 | 多変量解析 | 3L1 |
| ジスルフィド結合 | P005 | 炭素化過程 | 3L9 |
| 自然免疫 | P003 | 蛋白質 | P028 |
| シトクロム c | P007 | タンパク質 | YP07 |
| シトクロム c 酸化酵素 | P007 | タンパク質・DNA 複合体 | P015 |
| 磁場安定化 | YP06 | タンパク質化学修飾 | P100 |
| 磁場分布解析 | P112 | 蛋白質間相互作用 | P030 |
| 磁場変動 | YP07 | 蛋白質間相互作用 | YP14 |
| シム | P110 | 蛋白質構造 | 2L8 |
| 腫瘍 | P097 | 蛋白質複合体 | P005 |
| 常磁性 NMR | P010 | 蛋白質複合体 | P030 |
| 常磁性緩和効果 | P021 | 蛋白質立体構造解析 | P030 |
| 常磁性プローブ | P004 | タンパク質立体構造解析 | P086 |
| 常磁性ランタノイド | 1L1 | 地磁気 NMR | YP11 |
| 植物ウイルス | P016 | 中間複合体 | YP18 |
| 植物細胞 | P096 | 超 1GHz NMR | YP07 |
| シリンジポンプ | P106 | 超伝導磁石 | P110 |
| シルセスキオキサン | P068 | 超電導バルク磁石 | P111 |
| 新方式 NMR | 3L7 | 超電導バルク磁石 | P112 |
| 新方式 NMR | P108 | 超偏極 | 3L2 |
| 新方式 NMR | P109 | 低分子量 G タンパク質 | P014 |
| 水素 | P070 | 定量 NMR | P087 |
| 水素結合 | P071 | 定量化 | 1L6 |
| 水素貯蔵物質 | P085 | データベース | P120 |
| スズメバチシルク | P044 | デキストリン脂肪酸エステル | P047 |
| スプリット PH ドメイン | P021 | 鉄 | P105 |
| スプリット型超電導磁石 | 3L7 | 転移交差飽和 | P024 |
| スプリット型超電導磁石 | P108 | 転移交差飽和法 | P023 |
| スペクトルシミュレーション | YP03 | 電子伝達 | P007 |
| ゼオライト | P072 | 転写因子 | 3L5 |
| ゼオライト | P084 | 転写因子 | P020 |
| セリンプロテアーゼインヒビター | YP13 | 転写抑制 | P022 |
| 繊維化 | P045 | 天然変性タンパク質 | YP18 |
| 相互作用 | P011 | 天然変性領域 | P121 |
| 装置開発 | YP11 | 糖 | P011 |
| ソレノイド型 RF コイル | 3L7 | ドッキングシミュレーション | YP14 |
| ソレノイド型 RF コイル | P108 | トバモライト | P080 |

| | | | | |
|--------------|------|------|---------------|------|
| | (な行) | | ヘキサメチレンテトラミン | P119 |
| ナノ粒子 | | P064 | ペプチド | P003 |
| 二次元 NMR | | P114 | ペプチド | P039 |
| 二次元処理 | | 3L1 | ペプチドおよびタンパク質 | P046 |
| 二次元相関 NMR | | P073 | ヘム | P010 |
| 二次構造 | | P059 | 偏極法 | YP11 |
| 燃料電池 | | P070 | 芳香環シグナル | P095 |
| 脳血流量計測 | | P103 | 芳香族アミノ酸 | P028 |
| | | | 包接錯体 | P075 |
| | | | ハウ素 | P079 |
| | (は行) | | ポリアミノ酸 | P042 |
| 配向 | | P044 | ポリアラニン | YP01 |
| バイセル | | P066 | ポリピロール | 3L9 |
| パターン認識 | | P107 | | |
| パルスプログラマー | | YP10 | (ま行) | |
| 反磁性磁場配向 | | 1L2 | マイクロイメージング | P115 |
| 光照射固体 NMR | | P048 | マイクロコイル | YP04 |
| 非磁性 | | P106 | マイクロコイル MAS | P063 |
| ヒストン | | P027 | マイクロコイル NMR | P111 |
| 非接触検知 | | P119 | 膜タンパク質 | P008 |
| 非線形サンプリング | | P117 | 膜タンパク質 | P048 |
| ヒト脳 | | 1L6 | 膜蛋白質 | P051 |
| 表面修飾 | | P064 | 膜ペプチド・蛋白質 | YP03 |
| 微量 | | P079 | マジック角コイル回転 | YP04 |
| ピロ化 | | YP20 | ミセル相互作用 | P004 |
| 部位特異的安定同位体標識 | | YP14 | 無機ガラス構造 | P073 |
| フェリチン | | P105 | 無機固体酸塩 | P071 |
| フェロモン | | YP19 | 無細胞合成系 | P092 |
| ファミリー | | YP19 | 無細胞タンパク質合成 | 1L4 |
| プリオンタンパク質 | | 3L6 | メタボローム | P093 |
| プロスタグランジン | | YP15 | メタボローム | P094 |
| ブロック共重合体 | | P077 | メタボロミクス | P093 |
| プロテインキナーゼ | | 1L4 | メタボロミクス | P107 |
| プロトンイメージング | | P115 | メチル化ヒストン | P012 |
| フロント | | P037 | モデルペプチド | P045 |
| フロント | | P038 | モルフォロジー | P077 |
| 分極移動 | | P056 | | |
| 分子イメージング | | P097 | (や行) | |
| 分子シャペロン | | YP16 | 溶液 NMR | YP15 |
| 分子動力学計算 | | YP03 | 溶液 NMR | P008 |
| 分子内相互作用 | | P100 | 溶液 NMR | YP16 |
| 分子認識 | | P039 | 溶液構造 | YP18 |
| 分子配向 | | 2L8 | 幼若ホルモン結合タンパク質 | P013 |

| | |
|---------|------|
| 横緩和機構 | P105 |
| 四重鎖 DNA | P010 |

(5行)

| | |
|----------------------|------|
| 藍色細菌 | 3L5 |
| ランタノイド結合タグ | 1L1 |
| リアルタイムモニタリング | 3L6 |
| リジン | P100 |
| リチウムイオン電池 | P063 |
| 立体構造 | P018 |
| 立体構造解析 | YP19 |
| リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素 | YP15 |
| リフォールディング | P086 |
| 量子化学計算 | YP12 |
| 量子計算 | P062 |
| レイリー・テイラー不安定性 | YP08 |
| レクチン | P011 |

| 著者索引 | | (アルファベット) | | | |
|------------------------|------|---------------------|------|----------|------|
| Alana Simorellis | 2L1 | Peter Güntert | P040 | 阿久津秀雄 | YP03 |
| Allan M. Weissman | 2L4 | R. Andrew Byrd | 2L4 | 朝倉哲郎 | P045 |
| Amanda Altieri | 2L4 | Ranabir Das | 2L4 | 朝倉哲郎 | P046 |
| Anton E. Frise | P089 | Ravi Kalathur | 2L4 | 朝倉哲郎 | P053 |
| Ayyalusamy Ramamoorthy | 2L2 | Robert G. Griffin | P060 | 朝倉哲郎 | YP01 |
| Brian O. Smith | 3L3 | Robert McFeeters | 2L4 | 浅野敦志 | P055 |
| Bryn Baritomba | P119 | Sergey V. Dvinskikh | P089 | 安達聖 | YP09 |
| Dorothee Kern | 2L7 | Sevdalina Lyubenova | P060 | 阿部俊之助 | 3L5 |
| Egon Rizzato | P060 | Shunsuke Meshitsuka | 3L4 | 阿部孝政 | P088 |
| Eldon L. Ulrich | P120 | Sseziwa Mukasa | P057 | 天野まゆみ | P031 |
| Francois Le Moigne | P060 | Steven Mading | P120 | 天野睦紀 | P021 |
| Fuyuhiko Inagaki | 2L6 | Takahiro Ichikawa | P089 | 有竹浩介 | YP15 |
| Hakim Karoui | P060 | Takahisa Ikegami | 3L4 | 有福和紀 | P087 |
| Hiroshi Hirota | 3L4 | Takashi Kato | P089 | 有吉眞理子 | P029 |
| Hiroyuki Ohno | P089 | Tamio Noguchi | 3L4 | 安藤一郎 | P107 |
| Istvan Furo | P089 | Tavernier Bruno | P077 | 安藤啓太 | P025 |
| J. T. Gerig | P045 | Thomas Prisner | P060 | 安藤慎治 | P075 |
| Jee, Jun Goo | YP18 | Thorsten Maly | P060 | 飯島隆広 | P081 |
| Jennifer Mariano | 2L4 | Volker Dötsch | YP14 | 五十嵐龍治 | P097 |
| Jess Li | 2L4 | William M. Westler | 2L9 | 井川善也 | P017 |
| John L. Markley | P120 | Xinhua Ji | 2L4 | 池上貴久 | 3L5 |
| John L. Markley | 2L9 | Yien Che Tsai | 2L4 | 池上貴久 | P030 |
| Jonathan F. Stebbins | P078 | Yi-Jan Lin | P040 | 池田恵介 | YP03 |
| Judith Herzfeld | P060 | Yoon Ho Sup | 1L4 | 池谷鉄兵 | 3L3 |
| Kazuya Takahashi | 3L4 | Yoshitaka Ishii | 2L10 | 池谷鉄平 | P018 |
| Kazuya Yamada | 3L4 | Yuki Horie | 3L4 | 池谷鉄平 | P019 |
| Klaas P. Pruessmann | 2L12 | | | 石井剛志 | P050 |
| Kuang-Lung Hsueh | 2L9 | (あ行) | | 石井佳誉 | P053 |
| Markus Wälchli | 3L3 | 相沢智康 | P001 | 石川潔 | 2L3 |
| Masafumi Yoshio | P089 | 相沢智康 | P002 | 石川堯洋 | YP08 |
| Michael H. Frey | P057 | 相沢智康 | P003 | 石川雅之 | P014 |
| Michael L. Reese | YP14 | 相沢智康 | P004 | 石倉孝一 | 1L3 |
| Mohammed S. Mustak | 3L4 | 相沢智康 | P041 | 石橋純 | YP13 |
| Mohammed S. Mustak | P035 | 青山安宏 | P097 | 石森浩一郎 | P007 |
| Ojeiru F. Ezomo | 3L4 | 赤井智子 | P073 | 泉桂星 | P005 |
| Ojeiru F. Ezomo | P035 | 赤坂一之 | 2L1 | 磯貝信 | 2L5 |
| Olivier Ouari | P060 | 赤坂領吾 | P040 | 磯貝信 | P029 |
| Paul Tordo | P060 | 赤羽英夫 | P119 | 市川貴之 | P069 |
| Peter Güntert | 3L3 | 赤羽英夫 | YP11 | 市川貴之 | P085 |
| Peter Güntert | P018 | 赤羽英夫 | YP12 | 一木洋太 | 3L7 |
| Peter Güntert | P019 | 阿久津秀雄 | P051 | 市橋俊 | P003 |
| | | 阿久津秀雄 | P099 | 出原敏孝 | P061 |
| | | 阿久津秀雄 | P120 | 伊藤(新澤)恭子 | P007 |

| | | | | | |
|-------|------|-------|------|-------|------|
| 伊藤隆 | 2L5 | 海野幸子 | P011 | 甲斐莊正恒 | P028 |
| 伊藤隆 | 3L3 | 江川文子 | P041 | 甲斐莊正恒 | P095 |
| 伊藤隆 | P018 | 江崎芳 | P037 | 貝淵弘三 | P021 |
| 伊藤隆 | P019 | 江崎芳 | P038 | 香川晃徳 | P062 |
| 伊藤隆 | P020 | 榎園能章 | P036 | 梶井聡子 | P101 |
| 伊藤隆 | P021 | 海老澤佑輔 | YP06 | 片平正人 | 3L6 |
| 伊藤隆 | P022 | 遠藤由宇生 | P054 | 加藤悦子 | P014 |
| 糸崎秀夫 | P119 | 黄前真吾 | P068 | 加藤晃一 | 1L2 |
| 糸崎秀夫 | YP11 | 大石徹 | 3L11 | 加藤瀬里 | 1L5 |
| 糸崎秀夫 | YP12 | 大木出 | P100 | 加藤信幸 | YP15 |
| 稲垣大介 | YP12 | 大木忍 | P110 | 金場哲平 | P021 |
| 稲垣冬彦 | 1L1 | 大木進野 | P096 | 金橋康二 | P078 |
| 稲垣冬彦 | P006 | 大窪貴洋 | P077 | 金橋康二 | P079 |
| 稲垣冬彦 | P036 | 大久保忠恭 | P117 | 叶大輔 | P006 |
| 稲垣冬彦 | P086 | 大久保忠恭 | YP15 | 鎌足雄司 | 1L3 |
| 乾隆 | YP15 | 大澤一弘 | 2L11 | 神原孝之 | P059 |
| 犬飼宗弘 | P115 | 大竹紀夫 | 3L2 | 上平美弥 | P049 |
| 犬飼宗弘 | YP04 | 大塚昭弘 | YP07 | 上平美弥 | P050 |
| 井上真 | P015 | 大野曜吉 | P106 | 神谷歩 | 1L5 |
| 井上真 | P040 | 大橋若奈 | P040 | 神谷昌克 | P001 |
| 猪股晃介 | 2L5 | 大平昭博 | P077 | 神谷昌克 | P002 |
| 井原俊英 | P087 | 小笠広起 | P024 | 神谷昌克 | P003 |
| 今井宏彦 | P084 | 岡澤誠裕 | P082 | 神谷昌克 | P041 |
| 今井美咲 | P016 | 岡田潔 | P092 | 神谷昌克 | P046 |
| 今井潤 | P107 | 岡田道哉 | 3L7 | 亀田恒徳 | P044 |
| 今城文雄 | YP05 | 岡田道哉 | P108 | 亀田倫史 | YP03 |
| 伊谷野悠里 | P016 | 岡田道哉 | P109 | 亀谷俊輔 | YP01 |
| 岩崎郁 | P051 | 岡村英保 | P014 | 加茂直樹 | 2L11 |
| 岩浪克之 | 3L10 | 岡本昌彦 | P116 | 加茂直樹 | P048 |
| 岩本成人 | YP20 | 小川勇 | P061 | 傘俊人 | P082 |
| 上釜奈緒子 | P066 | 荻野孝史 | 3L1 | 河合剛太 | P016 |
| 植草義徳 | P050 | 奥田昌彦 | P026 | 河合剛太 | P017 |
| 植田啓介 | P061 | 奥田昌彦 | P121 | 川内進 | 3L9 |
| 上田卓見 | P023 | 奥村祐生 | P082 | 川崎久美子 | P020 |
| 上田卓見 | P024 | 小椋賢治 | P036 | 川崎健司 | 3L7 |
| 上平晃聖 | P097 | 小椋賢治 | P086 | 河田康志 | YP16 |
| 上脇隼一 | P033 | 尾崎純一 | 3L9 | 河田陽子 | P084 |
| 内田毅 | P007 | 小野明 | P095 | 河野敬一 | P001 |
| 内海博明 | P057 | 小野泰輔 | P069 | 河野敬一 | P002 |
| 梅川雄一 | 3L11 | 小野泰輔 | P085 | 河野敬一 | P003 |
| 梅津喜崇 | P001 | | | 河野敬一 | P004 |
| 梅山万左子 | YP02 | | (办行) | 河野敬一 | P041 |
| 裏出良博 | YP15 | 海江田修至 | P030 | 川畑俊一郎 | P004 |

| | | | | | |
|-------|------|-------|------|-------|------|
| 川村出 | 2L11 | 桑田一夫 | 1L3 | 小林将俊 | P083 |
| 川村出 | P048 | 桑原大介 | 3L8 | 小林祐次 | P117 |
| 川村出 | YP02 | 小池薫 | P106 | 小林祐次 | YP15 |
| 河村純一 | P063 | 小池秀明 | P047 | 小松正史 | P121 |
| 川本仁志 | P035 | 小池昌義 | P087 | 小森佳彦 | P083 |
| 木川隆則 | 1L4 | 小出昌平 | 2L1 | 近藤隆博 | P048 |
| 木川隆則 | P015 | 小糸祐介 | P075 | 近藤正志 | P049 |
| 木川隆則 | P040 | 高妻孝光 | 3L7 | 近藤靖 | P103 |
| 木川隆則 | P047 | 高妻孝光 | P108 | | |
| 菊川峰志 | P003 | 神田大輔 | P005 | 斉尾智英 | 1L1 |
| 菊地淳 | P093 | 河野隆英 | P004 | 斎尾智英 | P086 |
| 菊地淳 | P094 | 河野俊之 | P034 | 斉藤香織 | P010 |
| 岸本浩一 | P034 | 河野俊之 | P091 | 西道隆臣 | YP20 |
| 北川勝浩 | P062 | 河野俊之 | P092 | 齊藤貴士 | P005 |
| 北川勝浩 | P118 | 河野俊之 | YP20 | 斉藤貴志 | YP20 |
| 北口仁 | 3L7 | 幸福裕 | P023 | 齋藤剛 | P087 |
| 北口仁 | P108 | 古我征道 | P024 | 斉藤裕之 | P016 |
| 北口仁 | P109 | 小佐見謙一 | P032 | 斎藤雄太 | P113 |
| 北原亮 | 2L1 | 越野広雪 | P076 | 斉藤雄太 | YP06 |
| 北村成史 | P055 | 越野広雪 | P111 | 坂倉俊康 | 3L10 |
| 貴傳名甲 | P077 | 越野広雪 | P112 | 坂本光一 | P007 |
| 木下俊文 | P103 | 小柴生造 | 1L4 | 坂本泰一 | P017 |
| 木村敦臣 | P084 | 小柴生造 | P040 | 佐治修吾 | P084 |
| 木村隆之 | P035 | 小島健一 | P069 | 佐藤明子 | P021 |
| 木村力 | 1L3 | 小島健一 | P085 | 佐藤宗太 | 1L2 |
| 木本裕子 | P039 | 児嶋長次郎 | P032 | 佐藤徹 | P039 |
| 木吉司 | YP06 | 児嶋長次郎 | P098 | 佐藤直樹 | P113 |
| 木吉司 | YP07 | 児嶋長次郎 | P100 | 佐藤格夫 | P106 |
| 清末優子 | P030 | 児嶋長次郎 | YP18 | 佐藤寛子 | P076 |
| 吉良敦史 | YP02 | 小島奈津子 | P072 | 佐藤昌彦 | P027 |
| 楠英樹 | P091 | 小島由繼 | P069 | 佐藤道夫 | P049 |
| 久野敦 | P011 | 小島由繼 | P085 | 佐藤真奈美 | P040 |
| 久保均 | P088 | 巨瀬勝美 | YP08 | 佐野徳彦 | P026 |
| 熊木康裕 | P001 | 巨瀬勝美 | YP09 | 山東信介 | P097 |
| 熊木康裕 | P002 | 巨瀬勝美 | YP10 | 塩月孝博 | P013 |
| 熊木康裕 | P003 | 小玉優哉 | YP14 | 繁木良介 | YP09 |
| 熊澤茂則 | P050 | 小橋川敬博 | P006 | 品川秀行 | P110 |
| 久米田博之 | 1L1 | 小橋川敬博 | P086 | 篠阿弥宇 | P016 |
| 久米田博之 | P006 | 小林恭平 | YP08 | 篠崎一雄 | P015 |
| 久米田博之 | P036 | 小林直宏 | P040 | 篠原淳一郎 | P119 |
| 黒木重樹 | 3L9 | 小林直宏 | P099 | 渋澤庸一 | P090 |
| 黒崎千智 | P040 | 小林直宏 | P120 | 嶋田一夫 | P023 |
| 黒津卓三 | P055 | 小林将俊 | P051 | 嶋田一夫 | P024 |

(さ行)

| | | | | | |
|-------|------|-----------|------|-------|------|
| 嶋田一夫 | P037 | 関山恭代 | P093 | 田代充 | P090 |
| 嶋田一夫 | P038 | 関山恭代 | P094 | 多勢祥 | P013 |
| 嶋田一夫 | P039 | 瀬谷司 | P036 | 多田敦子 | P087 |
| 嶋田一夫 | YP14 | 相馬洋之 | P064 | 龍野宏人 | P075 |
| 島本茂 | YP15 | 曾雌泰央 | P103 | 楯真一 | 2L8 |
| 清水禎 | P073 | 藺田晃弘 | P037 | 楯真一 | P033 |
| 清水禎 | P080 | 藺田晃弘 | P038 | 楯真一 | P034 |
| 清水禎 | P081 | | | 楯直子 | P033 |
| 清水禎 | P110 | (丸行) | | 立石健一郎 | P062 |
| 清水裕太 | P068 | 太虎林 | P009 | 田中昭子 | P040 |
| 治村圭子 | P071 | 太虎林 | P010 | 田中健太郎 | P051 |
| 下池田勇一 | P054 | 高尾智明 | P113 | 田中浩三 | P116 |
| 下條秀朗 | P026 | 高尾智明 | YP06 | 田中慎治 | YP16 |
| 下田景士 | P069 | 高久洋 | 3L6 | 田中剛史 | P091 |
| 下田景士 | P085 | 高橋和也 | P035 | 田中剛史 | P092 |
| 相宏宇 | P014 | 高橋勝利 | P101 | 田中千香子 | P055 |
| 莊司顯 | P059 | 高橋圭子 | P025 | 田中秀樹 | 3L7 |
| 白川昌宏 | 2L5 | 高橋俊哉 | P076 | 田中秀樹 | P108 |
| 白川昌宏 | 3L3 | 高橋征三 | 3L1 | 田中利好 | P034 |
| 白川昌宏 | P018 | 高橋貴文 | P079 | 田中利好 | P091 |
| 白川昌宏 | P019 | 高橋利和 | 3L10 | 田中利好 | P092 |
| 白川昌宏 | P020 | 高橋栄夫 | YP14 | 田中亮 | 3L2 |
| 白川昌宏 | P029 | 高橋大樹 | P061 | 谷生道一 | P091 |
| 白川昌宏 | P097 | 高橋雅人 | P113 | 谷口雅浩 | YP19 |
| 白水美香子 | P040 | 高橋雅人 | YP06 | 谷本登 | P065 |
| 榛葉信久 | YP14 | 高橋雅人 | YP07 | 田之倉優 | YP13 |
| 末松孝子 | P087 | 高屋展宏 | 1L6 | 多原主哲 | 3L11 |
| 菅瀬謙治 | 1L5 | 高屋展宏 | P105 | 田淵豊 | P118 |
| 菅瀬謙治 | P121 | 竹内和久 | P107 | 玉井淳史 | P096 |
| 杉浦眞喜子 | P116 | 武内敏秀 | 2L5 | 田巻初 | P041 |
| 杉本収 | P050 | 竹内誠 | P096 | 玉田大輝 | YP10 |
| 杉本直樹 | P087 | 竹腰清乃理 | P058 | 丹治健一 | P050 |
| 杉山隆一 | 3L6 | 竹腰清乃理 | P059 | 丹所正孝 | P073 |
| 鈴木榮一郎 | YP14 | 竹腰清乃理 | P114 | 丹所正孝 | P080 |
| 鈴木拳直 | P047 | 竹腰清乃理 | YP05 | 丹所正孝 | P081 |
| 鈴木俊治 | P051 | 武田和行 | P063 | 近山英輔 | P093 |
| 鈴木悠 | P045 | 武田和行 | P114 | 近山英輔 | P094 |
| 鈴木陽 | P074 | 武田和行 | P115 | 千葉亮 | P064 |
| 鈴木倫太郎 | P012 | 武田和行 | P118 | 陳国躍 | P103 |
| 鈴木倫太郎 | P013 | 武田和行 | YP04 | 塚本卓 | P008 |
| 須永絵理 | P101 | 武田光広 | P028 | 月岡大輔 | P047 |
| 関原明 | P015 | 武田光広 | P095 | 辻暁 | P052 |
| 関山直孝 | P029 | 田代(下高原)櫻子 | P090 | 辻暁 | P066 |

| | | | | | |
|-------|------|-------|------|-------|------|
| 堤敦史 | YP02 | | (な行) | 西村哲治 | P087 |
| 坪井裕理 | P093 | 内藤晶 | YP02 | 西村善文 | P026 |
| 坪田雅己 | P069 | 内藤晶 | 2L11 | 西村善文 | P027 |
| 坪田雅己 | P085 | 内藤晶 | P048 | 西村善文 | P121 |
| 鶴村俊治 | YP15 | 内藤晶 | P049 | 西山裕介 | P053 |
| 出村誠 | P001 | 内藤晶 | P050 | 西山裕介 | P054 |
| 出村誠 | P002 | 永井圭祐 | P043 | 西山裕介 | P057 |
| 出村誠 | P003 | 永井義崇 | P020 | 根来誠 | P062 |
| 出村誠 | P004 | 中越雅道 | P049 | 根来誠 | P118 |
| 出村誠 | P008 | 中込秀樹 | YP07 | 根本貴宏 | P054 |
| 出村誠 | P041 | 長島敏雄 | P047 | 根本直 | P101 |
| 出村誠 | P046 | 中瀬生彦 | 2L5 | 根本直 | P107 |
| 寺内勉 | P095 | 永田宏次 | YP13 | 納口恭明 | YP08 |
| 寺尾武彦 | P111 | 永田崇 | 3L6 | 野田泰斗 | P063 |
| 寺沢宏明 | P037 | 中谷英一 | P120 | 野本直子 | P007 |
| 寺沢宏明 | P038 | 長土居有隆 | P027 | 野本直子 | P024 |
| 寺沢宏明 | P039 | 長土居有隆 | P121 | | |
| 寺沢宏明 | YP19 | 長友重紀 | P009 | (は行) | |
| 寺沢宏明 | YP20 | 長友重紀 | P010 | はが紗智子 | P039 |
| 寺島裕也 | P023 | 中野佑亮 | P009 | はが紗智子 | YP19 |
| 寺島裕也 | P037 | 中野義明 | YP05 | 萩原祥子 | P065 |
| 寺島裕也 | P038 | 長濱淳子 | P093 | 朴ミンソク | 3L7 |
| 寺田貴帆 | P040 | 中原優 | P119 | 朴ミンソク | P109 |
| 寺脇慎一 | P021 | 中村和浩 | P103 | 箱嶋敏雄 | P021 |
| 天野剛志 | 2L5 | 中村浩蔵 | P050 | 橋本雄幸 | P104 |
| 天明宏之助 | YP06 | 仲村高志 | P111 | 橋本康博 | P080 |
| 天明宏之助 | YP07 | 仲村高志 | P112 | 長谷川学 | P108 |
| 土居幹嗣 | 3L11 | 中村春木 | P120 | 秦信宏 | 3L2 |
| 東原和成 | P039 | 中山勉 | P050 | 蜂谷健一 | P054 |
| 東原和成 | YP19 | 行木信一 | 1L5 | 服部峰之 | 3L2 |
| 徳田尚美 | P052 | 名雪三依 | P080 | 服部良一 | P100 |
| 徳永隆司 | P116 | 新野睦子 | P040 | 花方信孝 | P008 |
| 遠田悦子 | P037 | 仁木國雄 | 3L8 | 花島知美 | 3L3 |
| 遠田悦子 | P038 | 西尾拓道 | P048 | 花島知美 | P018 |
| 戸田充 | P061 | 西川諭 | 3L6 | 花島知美 | P019 |
| 枳尾尚哉 | 1L4 | 西川大英 | 2L11 | 濱田季之 | P040 |
| 枳尾豪人 | 2L5 | 西川富美子 | 3L6 | 濱田衛 | YP06 |
| 枳尾豪人 | P029 | 錦織雅樹 | P014 | 濱田衛 | YP07 |
| 枳尾豪人 | P097 | 西谷弘 | P088 | 浜津順平 | 3L3 |
| 都出千里 | P116 | 西村勝之 | P056 | 浜津順平 | P018 |
| 戸所泰人 | P051 | 西村勝之 | P066 | 浜津順平 | P019 |
| 友永雄也 | 2L11 | 西村勝之 | P081 | 早川洋一 | P001 |
| | | 西村伸 | P070 | 早川洋一 | P003 |

| | | | | | |
|-------|------|----------|------|-------|------|
| 林こころ | P098 | 藤原敏道 | P041 | 松井久仁雄 | P080 |
| 林繁信 | 3L10 | 藤原敏道 | P051 | 松井茂 | P104 |
| 林繁信 | P064 | 藤原敏道 | P061 | 松井千幸 | P030 |
| 林繁信 | P071 | 藤原敏道 | P083 | 松浦孝範 | P120 |
| 林繁信 | P072 | 藤原敏道 | P099 | 松木陽 | P060 |
| 林繁信 | P074 | 藤原敏道 | P120 | 松木陽 | P061 |
| 林秀則 | 3L5 | 藤原敏道 | YP03 | 松崎勝巳 | YP16 |
| 林文晶 | P040 | 藤原英明 | P084 | 松崎勝巳 | YP17 |
| 林文晶 | P047 | 藤原広匡 | P070 | 松島綱治 | P023 |
| 林崎良英 | P040 | 藤原正子 | P107 | 松島綱治 | P037 |
| 早野陽介 | 1L3 | 二木史朗 | 2L5 | 松島綱治 | P038 |
| 早水紀久子 | 3L2 | 降旗一夫 | P090 | 松永達弥 | YP05 |
| 原田英里砂 | YP03 | 古板恭子 | P032 | 松野信也 | P080 |
| 原田雅史 | P088 | 古板恭子 | P100 | 松森信明 | 3L11 |
| 原野陽子 | P120 | 古板恭子 | YP18 | 圓尾廣子 | YP15 |
| 半田晋也 | YP08 | 古川亜矢子 | 3L6 | 三浦大典 | P101 |
| 半田晋也 | YP09 | 逸見光 | P009 | 三浦亨 | P087 |
| 半田晋也 | YP10 | 逸見光 | P010 | 三神すずか | P022 |
| 樋岡克哉 | P053 | 逸見光 | P011 | 美川務 | 3L3 |
| 樋岡克哉 | P054 | 星野大 | YP16 | 三木康成 | P035 |
| 樋岡克哉 | P058 | 星野大 | YP17 | 三島正規 | 3L3 |
| 樋口真理花 | P041 | 細野政美 | YP06 | 三島正規 | P018 |
| 平冲敏文 | P042 | 細野政美 | YP07 | 三島正規 | P019 |
| 平冲敏文 | P043 | 保母史郎 | P113 | 三島正規 | P020 |
| 平賀隆 | 3L2 | 堀内正隆 | P036 | 三島正規 | P021 |
| 平金真 | P039 | 堀江迪喜 | P035 | 三島正規 | P022 |
| 平川慶子 | P106 | 堀越正美 | P026 | 三島正規 | YP18 |
| 平林淳 | P011 | 堀田彰一朗 | YP13 | 水口峰之 | P001 |
| 廣明秀一 | 2L5 | | | 水口峰之 | P004 |
| 広瀬進 | P020 | (ま行) | | 水澤圭吾 | P097 |
| 廣田洋 | P040 | 真板(大野)綾子 | 2L5 | 水沢重則 | P103 |
| 深田はるみ | YP18 | 前川英己 | P063 | 水野敬 | P058 |
| 福井泰久 | P052 | 前澤博 | P088 | 水野敬 | P059 |
| 福田健治 | P016 | 前田史郎 | P068 | 水野敬 | YP05 |
| 福地将志 | P114 | 前田恒昭 | P087 | 三森文行 | 1L6 |
| 藤江正樹 | P042 | 前田秀明 | P113 | 三森文行 | P105 |
| 藤田誠 | 1L2 | 前田秀明 | YP06 | 宮川拓也 | YP13 |
| 藤戸輝昭 | P110 | 前田秀明 | YP07 | 宮澤光博 | P013 |
| 藤戸輝昭 | P111 | 真嶋司 | 3L6 | 宮田清蔵 | 3L9 |
| 藤村由紀 | P101 | 増野智彦 | P106 | 宮ノ入洋平 | P095 |
| 藤本瑞 | P013 | 増原泰英 | YP16 | 宮本優也 | YP15 |
| 藤森功 | YP15 | 増本秀史 | P104 | 武藤香織 | P001 |
| 藤森裕基 | P065 | 松井文香 | 1L5 | 武藤淳二 | 1L3 |

