第53回 NMR討論会(2014)

The 53rd Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

講演要旨集

Abstracts

会　期：　**2014年11月4日(火)，5日(水)，6日(木)**
November 4(Tue)-6(Thu), 2014

会　場：　**大阪大学コンベンションセンター&体育館**
Osaka University Convention Center
& Gymnasium
〒565-0871　大阪府吹田市山田丘1-1

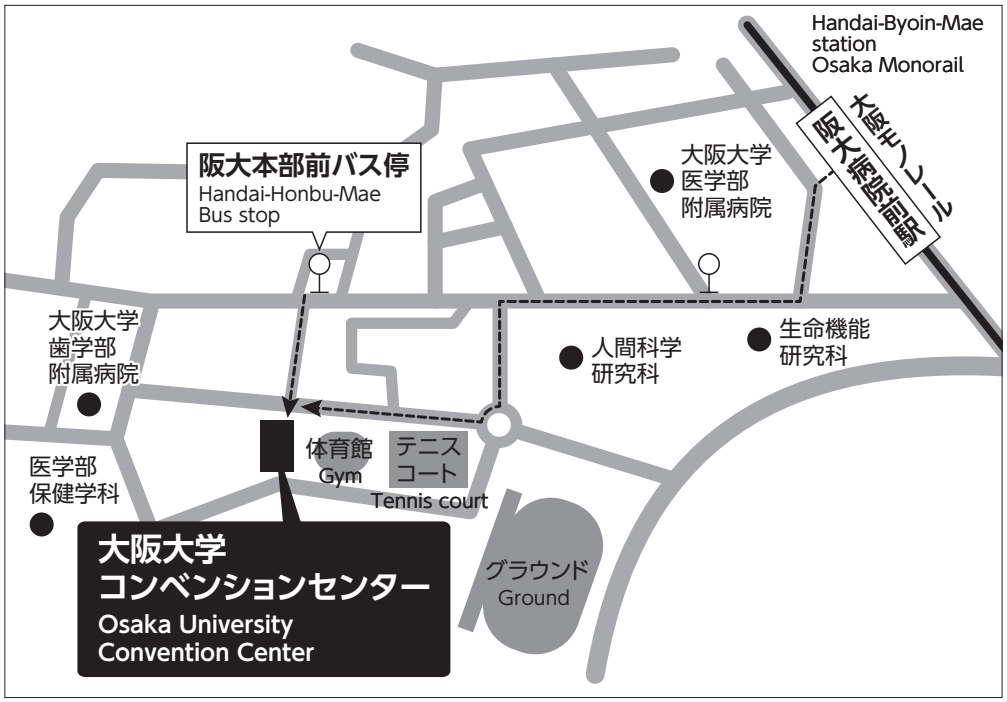
主　催：日本核磁気共鳴学会

共　催：高分子学会、日本生物物理学会、日本農芸化学会、日本材料科学会、
大阪大学蛋白質研究所
協　賛：日本分析化学会、分子科学会、日本蛋白質科学会、日本生化学会、
日本磁気共鳴医学会
後　援：日本物理学会、日本分子生物学会、日本糖質学会

第53回NMR討論会　プログラム委員会

藤原　敏道（大阪大学）［委員長］
児嶋長次郎（大阪大学）
池上　貴久（横浜市立大学）
松木　　陽（大阪大学）
小林　直宏（大阪大学）
根来　　誠（大阪大学）
西村　重徳（大阪府立大学）
上田　貴洋（大阪大学）
吉岡　芳親（大阪大学）
大久保忠恭（大阪大学）
村田　道雄（大阪大学）

会場(大阪大学コンベンションセンター)への交通案内



大阪大学コンベンションセンター

〒565-0871　大阪府吹田市山田丘1-1

[JR東海道線]

茨木駅下車 近鉄バス「阪大病院・阪大本部前」行に乗車。終点「阪大本部前」下車 徒歩3分。

[北大阪急行線]

千里中央駅下車 阪急バス「阪大本部前」行または「茨木美穂ヶ丘」行に乗車。
「阪大本部前」下車 徒歩3分。

[大阪モノレール]

万博記念公園駅で彩都線(国際文化公園都市線)に乗り換え、「阪大病院前」駅下車
徒歩約10分。

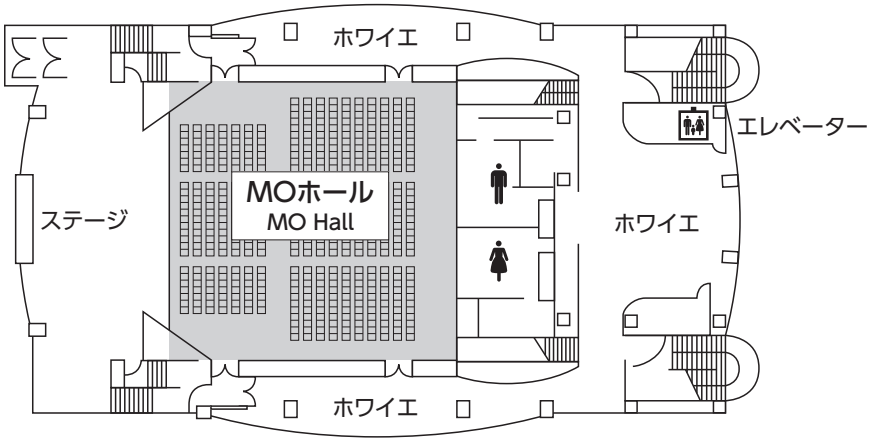
＊詳細は会場ホームページをご覧ください。

http://55099zzwd.coop.osaka-u.ac.jp/convention/map.html

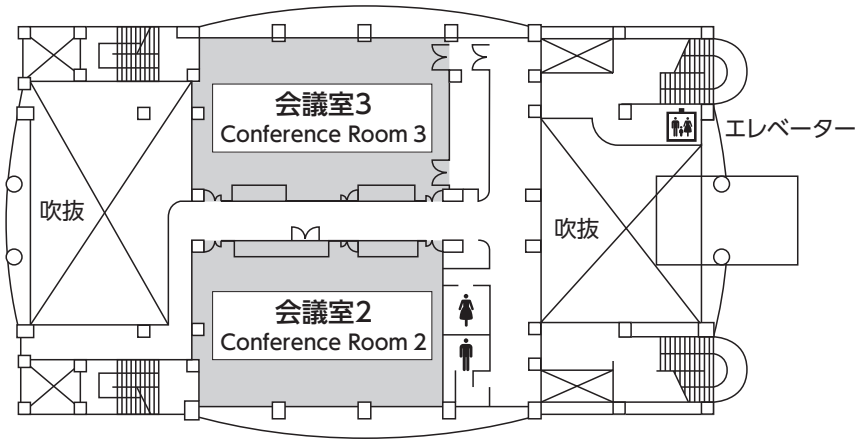
会場の案内図

◆**3F MOホール**：口頭発表会場、総会会場、ランチョンセミナー、公募シンポジウム会場
◆**2F 会議室**：口頭発表会場、公募シンポジウム会場、ポスター賞プレビュー
◆**1F 会議室**：チュートリアルコース会場、クローク
◆**体育館**：ポスター発表会場、展示ブース、インターネットコーナー、休憩所、ドリンクコーナー

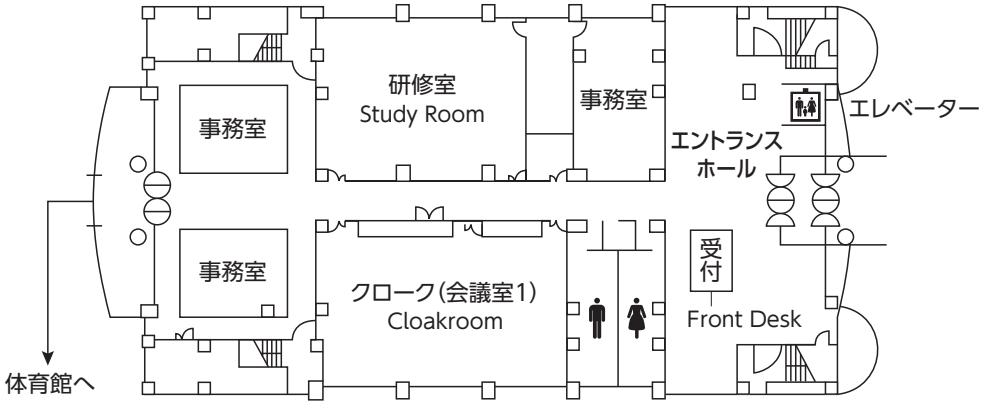
3F



2F



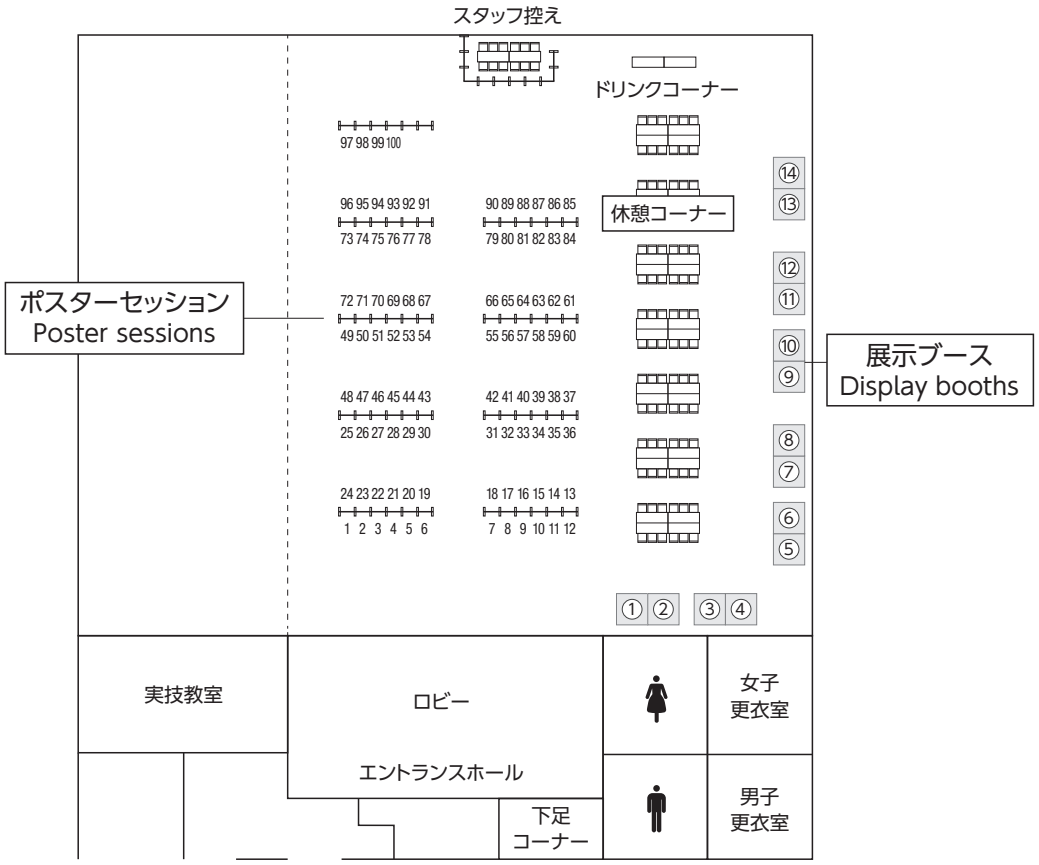
1F



ポスター・展示会場詳細図

場　所：**大阪大学吹田キャンパス体育館**

ポスター発表会場、展示ブース、インターネットコーナー、休憩所、ドリンクコーナー



位置	社　名
①②	ブルカー・バイオスピン株式会社（Bruker BioSpin K.K.）
③	株式会社シゲミ（SHIGEMI Co., Ltd.）
④	株式会社エム アール テクノロジー（Magnetic Resonance Technology Ltd.）
⑤	日本カンタム・デザイン株式会社（Quantum Design Japan, Inc）
⑥	株式会社フレックス（Flex Co., Ltd.）
⑦⑧	アジレント・テクノロジー株式会社（Agilent Technologies Japan, Ltd.）
⑨	大陽日酸株式会社（TAIYO NIPPON SANSO CORPORATION）
⑩	ウェイブファンクション（Wavefunction, Inc.）
⑪	株式会社エルエイシステムズ（L.A.SYSTEMS, Inc.）
⑫	SIサイエンス株式会社（SI SCIENCE Co., Ltd.）
⑬⑭	株式会社JEOL RESONANCE（JEOL RESONANCE Inc.）

懇親会会場案内図

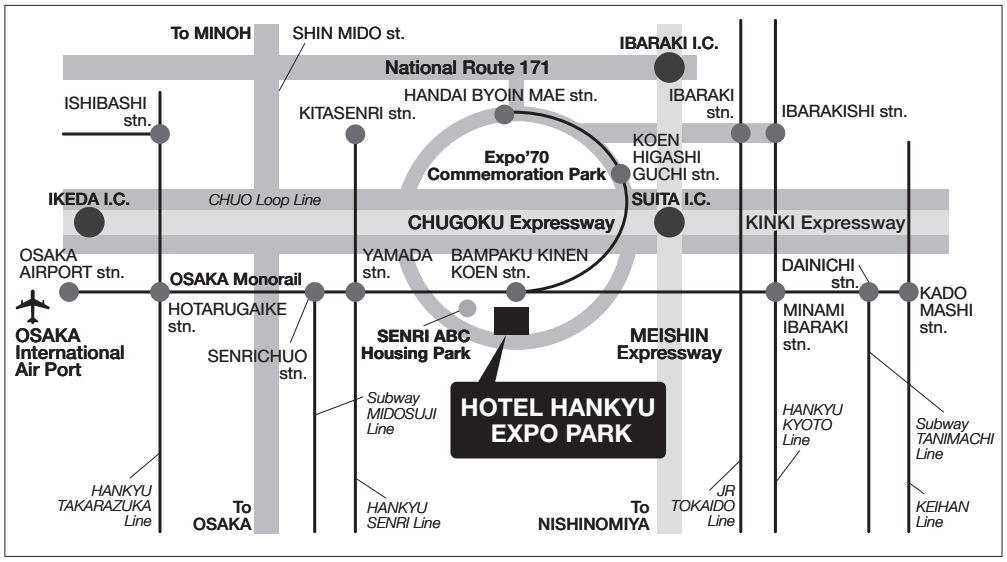
ホテル阪急エキスポパーク

〒565-0826 大阪府吹田市千里万博公園1-5
TEL: 06-6878-5151
（大阪モノレール「万博記念公園駅」下車 徒歩5分）

開始日時：11月5日（水）18:30 ～ 20:30
会　　場：ホテル阪急エキスポパーク　本館2階　星雲

＊ 討論会会場（コンベンションセンター）から懇親会会場への無料バス（2台）をご用意いたしております。
＊ 公共交通をご利用の場合は阪大病院前駅より大阪モノレールのご利用が便利です。
＊ 会場の詳細は会場ホームページ（http://www.hankyu-hotel.com/hotel/hhexpopark/）をご覧ください。

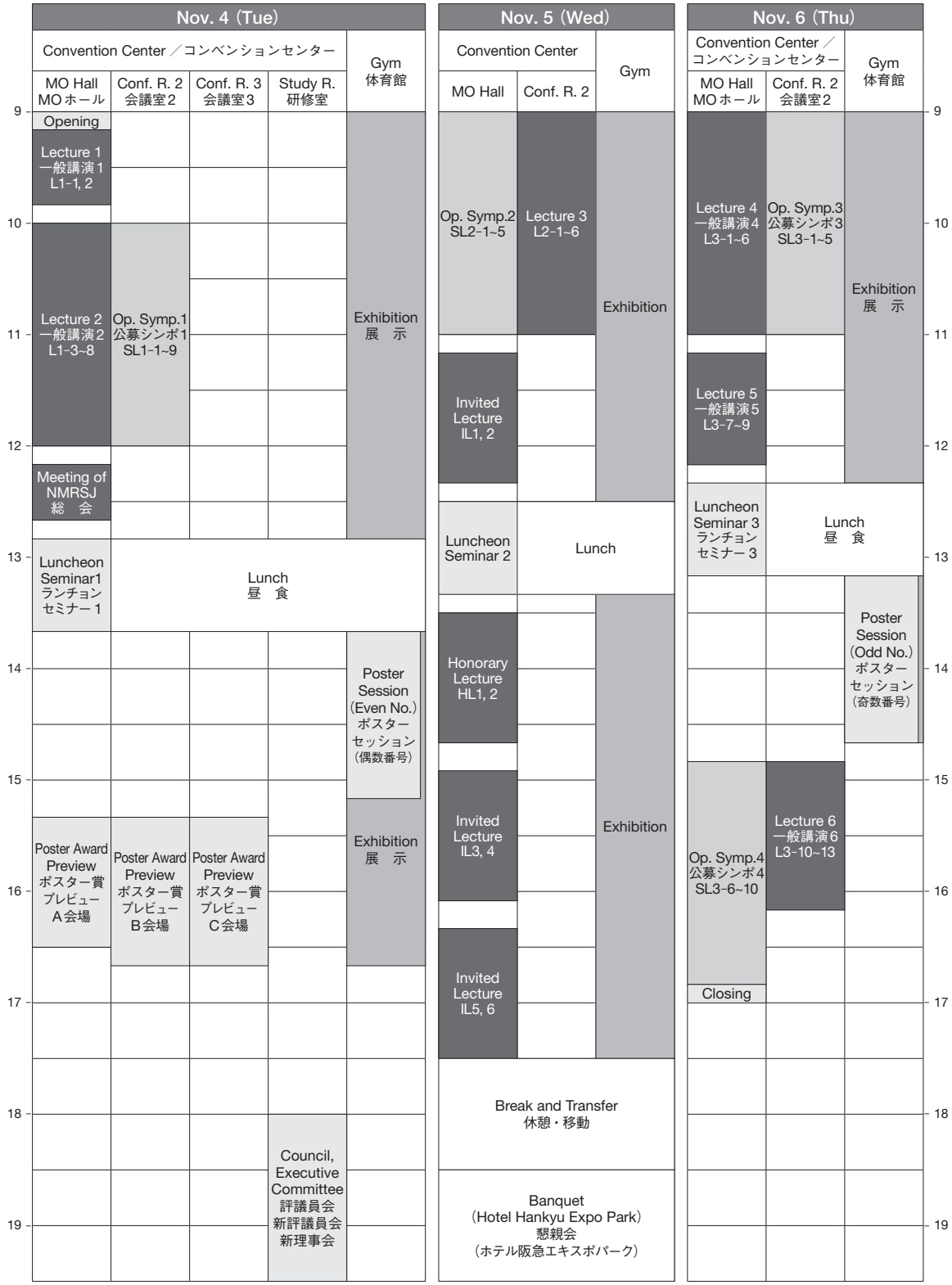
Banquet Venue



HOTEL HANKYU EXPO PARK

Zip Code 565-0826 1-5, Senri-Bampaku-Koen, Suita-City, Osaka
TEL: 06-6878-5151

討論会日程表


Nov. 4 (Tue)
Convention Center ／コンベンションセンター
Gym 体育館
MO Hall MOホール
Conf. R. 2 会議室2
Conf. R. 3 会議室3
Study R. 研修室
Opening
Lecture 1 一般講演1 L1-1, 2
Lecture 2 一般講演2 L1-3~8
Op. Symp.1 公募シンポ1 SL1-1~9
Exhibition 展 示
Meeting of NMRSJ 総 会
Luncheon Seminar1 ランチョンセミナー1
Lunch 昼 食
Poster Session (Even No.) ポスターセッション (偶数番号)
Exhibition 展 示
Poster Award Preview ポスター賞プレビュー A会場
Poster Award Preview ポスター賞プレビュー B会場
Poster Award Preview ポスター賞プレビュー C会場
Council, Executive Committee 評議員会 新評議員会 新理事会
Nov. 5 (Wed)
Convention Center
Gym
MO Hall
Conf. R. 2
Op. Symp.2 SL2-1~5
Lecture 3 L2-1~6
Exhibition
Invited Lecture IL1, 2
Luncheon Seminar 2
Lunch
Honorary Lecture HL1, 2
Invited Lecture IL3, 4
Invited Lecture IL5, 6
Exhibition
Break and Transfer 休憩・移動
Banquet (Hotel Hankyu Expo Park) 懇親会 (ホテル阪急エキスポパーク)
Nov. 6 (Thu)
Convention Center ／コンベンションセンター
Gym 体育館
MO Hall MOホール
Conf. R. 2 会議室2
Lecture 4 一般講演4 L3-1~6
Op. Symp.3 公募シンポ3 SL3-1~5
Exhibition 展 示
Lecture 5 一般講演5 L3-7~9
Luncheon Seminar 3 ランチョンセミナー3
Lunch 昼 食
Poster Session (Odd No.) ポスターセッション (奇数番号)
Op. Symp.4 公募シンポ4 SL3-6~10
Lecture 6 一般講演6 L3-10~13
Closing
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

参加者へのご案内

1．受付と参加登録

◇受　付

受付はコンベンションセンター 1F正面口に設けます。

受付時間：11月4日（火）　8：30 ～ 16：00
　　11月5日（水）　8：30 ～ 17：00
　　11月6日（木）　8：30 ～ 16：00

・事前登録された方で、参加費を支払い済みの方は、本要旨集と一緒に送付した参加章を、忘れずに持参してください。受付前に置いているホルダーに参加章を入れた上で、会期中は常に携帯してください。(受付デスクで手続きを行う必要はありません)
・事前登録された方であっても、参加費の振込みがない場合は、当日参加登録扱いとなります。
・当日参加の方は、受付前に置かれた当日参加用紙を記入の上、受付デスクにお越しください。参加費と懇親会費（懇親会に出席される場合）を現金でお支払いいただきます。

当日参加	会　員		非会員	
	正会員	学生会員	一　般	学　生
年会参加費	￥4,000	￥2,000	￥13,000	￥7,000
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、大会会場では必ず着用してください。参加章のない方の入場は固くお断りします。

◇領収書の発行

参加章に印刷されている領収書をお使いください。それ以外の領収書が必要な方は、参加章を持参して受付デスクへお越しください。

◇講演予稿集

講演予稿集を日本核磁気共鳴学会会員に事前送付します。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。討論会終了後に、予稿本文を第53回NMR討論会ホームページ（http://www.nmrj.jp/NMR2014/）で公開します。

◇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ください。また、日本核磁気共鳴学会への入会も受け付けます。

◇ランチョンセミナー整理券の配布について

ランチョンセミナーの昼食は整理券と引き換えとなります。整理券は、当日の8：30より、受付にて配布いたします。引き換えは、MOホール前（ホワイエ）にて行います。

2. 会場内のサービス・施設

◇クローク

コンベンションセンター1F会議室1にクロークを設置します。ただし、貴重品やコンピュータなどについては、破損、紛失などの責任は負いかねますので、各自でお持ちください。懇親会の際には懇親会会場（ホテル阪急エキスポパーク）のクロークをご利用頂けます。

利用時間　11月4日（火）　8：30 ～ 17：10
11月5日（水）　8：30 ～ 18：00
11月6日（木）　8：30 ～ 17：30
（＊講演が延びた場合の終了時間は、最終講演終了の30分後とします。）

◇昼　食

ランチョンセミナー（MOホールにて毎日150名分の昼食をご用意しております）のほか、大阪大学吹田キャンパス内および大阪大学医学部附属病院内、大阪大学歯学部附属病院内のレストラン、食堂、喫茶店、ファストフード店、売店がご利用頂けます。

◇インターネット

体育館内に無線LAN接続のインターネットコーナーを設置します。また大阪大学は国際学術無線LANローミング基盤“eduroam”に参加しておりますので、国内外の多くの大学・研究機関の方が事前にアカウントを取得しておくことで吹田キャンパス内全域で無償でインターネットをご利用頂けます（参加機関や利用法など詳しくはeduroamのホームページ（http://www.eduroam.jp/）をご覧下さい）。またキャンパス内はスマートフォン等の携帯電話回線接続が快適に行える環境が整っております。コンピュータ等端末は各自ご用意ください。

◇呼び出し

会場内での呼び出しは、緊急の場合を除き、原則行いません。

3. 禁止事項

◇喫煙・飲食

会場内は禁煙です。また、コンベンションセンター内での飲食は（ランチョンセミナー以外）固く禁じられております。喫煙と飲食は所定の場所でお願いします。御協力よろしくお願いします。

◇携帯電話

口頭発表会場内での携帯電話による通話を禁止します。口頭発表会場内では電源をオフにするかマナーモードに設定して、呼び出し音が鳴らないようにしてください。

4. 年会についての問い合わせ

◇会期中

総合受付
〒565-0871　大阪府吹田市山田丘1-1
大阪大学コンベンションセンター　1F正面口

◇会期外

53rd NMR 討論会事務局
〒102-0072　東京都千代田区飯田橋3-11-15　UEDAビル6F
株式会社クバプロ内
TEL：03-3238-1689　FAX：03-3238-1837
E-mail：nmr53@kuba.jp

5. 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、各口頭発表会場内の「座長席」(休憩をはさまない場合は「次座長席」) までお越しください。

進行：進行は座長に一任します。例年、終了時間が延びる傾向にありますが、講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ニシアティブをとっていただき、終了予定時間を厳守するようお願いします。

◇講演者の方へ

招待講演、シンポジウム講演、一般講演および若手ポスター賞講演の講演方法：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。講演に使用するコンピュータは各自で持参して下さい。なお、音声出力には対応しておりません。バッテリー切れに備えて、必ず電源アダプターを持参して下さい。プロジェクターとの接続は、D-sub 15ピンとなります。一部のノートパソコン (特にMac) では専用の出力変換ケーブルが必要となりますので、必ず持参して下さい。タブレットPCなどではD-sub 15ピンが備えられていない場合がございますので、ご注意ください。バックアップ用として、発表データをCD-ROMあるいはUSBメモリで持参して下さい。

招待講演、シンポジウム講演、一般講演および若手ポスター賞講演の受付：講演前の休憩時間までに、各会場の「PC受付」に講演に使用するコンピュータを持参して下さい。なお、スリープモードやスクリーンセーバーの設定は解除して下さい。コンベンションセンター1F正面口受付横に動作確認用のプロジェクタをご用意いたしておりますので、ご利用下さい。

講演時間：進行は座長に一任されています。持ち時間はHonorary Lecture 35分、Invited Lecture 35分、一般講演20分、若手ポスター賞プレビュー10分です。ベルの鳴動時刻は以下の通りです。

	一鈴	二鈴（発表終了）	三鈴（質疑終了）
Honorary Lecture	30分	35分	－※
Invited Lecture	25分	30分	35分
一般講演	13分	15分	20分
若手ポスター賞プレビュー	8分	10分	－※
公募型シンポジウム	※	※	※

※Honorary Lecture、若手ポスター賞プレビューには質疑の時間はありません。
※公募型シンポジウムはそれぞれの発表時間が異なるため、座長に一任いたします。

◇ポスター発表の方へ

作成要項：ポスター作成の使用言語は英語あるいは日本語とします。ただし、図の説明には、英語を用いてください。タイトル、名前、所属については、英語と日本語を併記してください。発表代表者の氏名には、左肩に小さな○印を付けてください。3ｍ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ください。図や表もできるだけ大きくしてください。
ポスターパネルサイズは縦210 cm×横90 cmです。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。床から30 cm程度のスペースを空けておくことを推奨します。画鋲は各ポスターパネルに用意します。

展示場所：ポスター会場は体育館です。演題番号が表示されたパネルに展示してください。

提示期間：会期中はポスターの貼り替えを行いません。すべての発表ポスターは、11月4日（火）9：00 ～ 12：00の間に掲示し、11月6日（木）14：40 ～ 16：30の間に取り外してください。ポスター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撤去します。

ポスター発表時間：ポスター番号が偶数番号の方（P2, P4,…）は、11月4日（火）13：40 ～ 15：10にポスター討論を行ってください。奇数番号（P1, P3,…）の方は、11月6日（木）13：10 ～ 14：40にポスター討論を行ってください。発表時間の間は、必ずポスターの前に立ち、質問と討論に応じてください。

6. 第53回日本核磁気共鳴学会　総会開催通知

日　時：2014年11月4日（火）　12：10 ～ 12：40
場　所：大阪大学コンベンションセンター　MOホール（3F）

第53回日本核磁気共鳴学会総会を開催いたします。是非、ご出席ください。都合で出席できない方は委任状を総会開始前にご送付ください。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ください。

7. 理事会・評議員会の案内

理事会	11月3日（月）17：50より	大阪大学コンベンションセンター　研修室（1F）
評議員会	11月4日（火）18：00より （17：30開場）	同上
新評議員会		
新理事会		

◇いずれも、食事のご用意がございます。

チュートリアルコース

日　時：11月3日（月）／ Nov. 3, Mon.　13：00 ～ 17：40
会　場：大阪大学コンベンションセンター（1F　会議室1）
（受付　1F会議室前）

13:00 ～ 14:00

「NMR法を基軸とした論文執筆」

菊地　淳　先生（理化学研究所）

世界人口急増の反面、超高齢化社会が形骸化しつつある足元を省みて、本コースへの参加者には難解なNMRの世界を勉強しても、将来にわたって持続的に利用できるか不安な人々がいるかもしれない。一方で学術論文を受理させ足元を固めていけば、学位取得、就職、転職、グラント獲得、あわよくば更にPI等での後進指導へと結びつき、こうした“NMRを基軸とした”人材の持続性が本学会の興隆をも左右するであろう。本講演では蛋白質・代謝物群・バイオマス・環境試料へとNMRを基軸とした論文執筆を続け、自らの職を切り拓いてきた演者の体験を基に、着想・行動・文書化の三要素関係の重要性を述べたい。結論から言えば将来の不安は実績の蓄積で解消され、また当人さえ予期せぬ未来も拓かれる。現状では研究者の実績評価軸は学術論文に重きがあり、良い文書は死後においても無形財産として評価され得る。その論文執筆において最も重要な段階は多様な論文との出会いでもあり、良い出会いが動機と着想を育み、重い腰を上げ、数多くの失敗を乗り越えた際には他者に報告（論文化）せずにはいられなくなる。

14:00 ～ 15:00

「溶液NMR実験をデザインする楽しさ」

竹内　恒　先生（産業技術総合研究所）

NMRの魅力は、実験の目的に合わせてサンプルを安定同位体標識する段階から、標識に合わせたNMR実験の実施、測定後の処理に至るまで多くの自由度があり、様々な工夫が可能な点にあると思います。ここではそのような工夫を行った実例と応用例をいくつかお示ししながら、NMR実験をデザインする楽しさ、有効性をお伝えすることが出来ればと思っています。

15:00 ～ 15:10　休　憩

15:10 ～ 16:10

「NMRを1万倍高感度化する技術：DNP
～その基礎原理から最新の応用研究まで～」

根来　誠　先生（大阪大学）

動的核偏極（DNP: Dynamic Nuclear Polarization）は、誕生から60年かけてじっくりと発展を遂げた。現在では様々な試料において、極低温下でDNPを行うことで、通常のNMR分光やMRIに比べて一万倍程度高感度な測定が可能である。具体的には、ポリマー、リゾチーム、膜たんぱく質、ウイルス、薬品、アミロイド生成性ナノ結晶などの高感度分析、細孔物質の界面解析などへと適用されている。また、高偏極化した物質を溶かして体内に注射することで代謝イメージング、pHイメージングが可能で、がん治療の効果判定にも応用されている。本講演では、DNPの基礎原理について説明し、技術的側面における歴史的経緯に沿って上記の応用を紹介していく。また、試料を室温に保ったまま一万倍以上の高感度化が可能となる「トリプレットDNP」の進展についても紹介する。

16:10 ～ 17:40

「NMRはいかに創られたか 8. 二次元FT-NMR」

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の方法論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。若い方々が話を通じて優れた科学者の研究に取り組む姿勢や学問に対する情熱を学んで頂ければ幸いである。今回は二次元FT-NMRについて話す予定である。

第53回 NMR討論会(2014)

The 53rd Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

会　期：　2014年11月4日(火)～6日(木)
November 4 (Tue)-6 (Thu), 2014
会　場：　大阪大学コンベンションセンター
Osaka University Convention Center
〒565-0871　大阪府吹田市山田丘1-1

Poster Session

第1日目　11月4日(火)／Day 1 (Nov. 4, Tue)

9:00 ～ 9:10
開会の挨拶　　内藤　晶(日本核磁気共鳴学会会長)
Opening remarks: Akira Naito (President of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan)

一般講演1 [会場：MOホール]
9:10 ～ 9:50　　**座長：池上　貴久**

9:10 ～ 9:30
L1-1　Dynamic nuclear polarisation enhanced solid-state NMR spectroscopy and magnetic resonance force microscopy for structural biology
○Hiroki Takahashi[1,2], Brad Moores[1], Romana Schirhagl[1], Daniel Lee[2], Jean-Pierre Simorre[3], Michel Bardet[2], Sabine Hediger[2], Gaël De Paëpe[2] and Christian Degen[1] ([1]Department of Physics, ETH Zurich, Switzerland, [2]Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologique, CEA Grenoble, France, [3]Institut de Biologie Structurale, France)

9:30 ～ 9:50
L1-2　多孔質機能性物質の1粒子分析：超偏極^{129}Xeを利用した1粒子スペクトロスコピーと1粒子イメージング
Single particle analysis of porous functional materials: ^{129}Xe single particle spectroscopy and imaging utilizing hyperpolarized gas
○藤原　英明[1]，今井　宏彦[2,1]，武田　和行[3]，木村　敦臣[1] ([1]大阪大学大学院 医学系研究科，[2]京都大学大学院 情報学研究科，[3]京都大学大学院 理学研究科)

9:50 ～ 10:00　　**休憩/Break**

一般講演2 [会場：MOホール]
10:00 ～ 11:00　**座長：上田　貴洋**

10:00 ～ 10:20
L1-3　パイ共役系高分子の分子ダイナミクス計測と生体模倣型信号処理デバイスへの応用
Molecular dynamics of π-conjugated polymers and application to bioinspired signal processing devices
○浅川　直紀[1]，梅村　香一郎[1]，藤瀬　晋也[1]，大野　雄太[1]，福田　國統[1]，矢澤　宏次[2]，清水　禎[3]，丹所　正孝[3]，神吉　輝夫[4]，田中　秀和[4] ([1]群馬大学大学院 理工学府，[2]JEOL RESONANCE Inc.，[3]物質・材料研究機構，[4]大阪大学 産業科学研究所)

10:20 ～ 10:40

L1-4　高温超伝導バルク磁石と高次シムコイルを用いた高分解能NMR/MRIの実現

High resolution NMR/MRI using a high T_c bulk superconducting magnet with a higher-order shim coil

○玉田　大輝[1,2,3]，巨瀬　勝美[1]，柳　陽介[4]，伊藤　佳孝[4]，仲村　高志[3]（[1]筑波大学大学院 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，[3]理化学研究所，[4]（株）イムラ材料開発研究所）

10:40 ～ 11:00

L1-5　$^{6/7}$Li固体NMRを用いたコバルト酸リチウムの欠陥部位の構造解析

Local structure at defect in lithium overstoichiometric $LiCoO_2$ as studied by $^{6/7}$Li solid-state NMR

○村上　美和[1]，野田　泰斗[2]，小山　幸典[1]，竹腰　清乃理[2]，荒井　創[1]，内本　喜晴[3]，小久見　善八[1]（[1]京都大学 産官学連携本部，[2]京都大学大学院 理学研究科，[3]京都大学大学院 人間・環境学研究科）

11:00 ～ 12:00　**座長：加藤 晃一**

11:00 ～ 11:20

L1-6　多成分脂質膜のCSA測定

CSA measurement of multi-component lipid membrane by centerband-only analysis of spin echo

○松岡　茂[1,2]，梅川　雄一[1,2]，村田　道雄[1,2]（[1]大阪大学大学院 理学研究科，[2]科学技術振興機構 ERATO）

11:20 ～ 11:40

L1-7　家蚕絹Silk II型構造の解析とモルフォロジーに関する研究

NMR study for elucidating Silk II structure of *Bombyx mori* silk fibroin and its morphology

○奥下　慶子[1]，浅野　敦志[2]，ウィリアムソン　マイク[3]，朝倉　哲郎[1]（[1]東京農工大学大学院 工学研究院，[2]防衛大学校 応用科学科，[3]シェフィールド大学 分子生物バイオテクノロジー学科）

11:40 ～ 12:00

L1-8　固体MAS NMRによる細胞膜環境中での７本膜貫通型光受容膜タンパク質の構造解析

Conformation of seven-helical transmembrane photoreceptor membrane protein as studied by solid-state MAS NMR

○川村　出[1]，中谷　聡志[1]，槙野　義輝[1]，加茂　直樹[2]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]北海道大学）

公募型シンポジウム1［会場：会議室2 ／ Conference Room 2］

10:00 ～ 12:00

高度な安定同位体標識が拓くNMR技術の展開

The expansion of NMR spectroscopy by elaborated stable isotope labeling

座長：竹内　恒，宮ノ入　洋平

10:00 ～ 10:05　**開会あいさつ：竹内　恒**

座長：竹内　恒（産業技術総合研究所）

10:05 ～ 10:17

SL1-1　植物培養細胞を用いた標識試料の調製方法とその応用例

A method to prepare labeled proteins using suspension cultured plant cells and some examples of its application

○大木　進野（北陸先端科学技術大学院大学 ナノマテリアルテクノロジーセンター）

10:17 ～ 10:29

SL1-2　メチルTROSY法による膜タンパク質の機能調節メカニズムの解明

Functional mechanism of membrane proteins revealed by methyl TROSY

○大澤　匡範[1]，今井　駿輔[1]，竹内　恒[2]，嶋田　一夫[1]（[1]東京大学大学院 薬学系研究科，[2]産業技術総合研究所 創薬分子プロファイル研究センター）

10:29 ～ 10:41

SL1-3　高難度タンパク質のNMR解析に向けた酵母発現系の活用

Utilization of yeast expression systems for stable isotope-assisted NMR analysis of difficult proteins

○高橋　栄夫[1]，大浪　真由美[2]，杉木　俊彦[2]，坂倉　正義[1]，竹内　恒[3]，嶋田　一夫[4]（[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[2]バイオ産業情報化コンソーシアム，[3]産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター，[4]東京大学大学院 薬学系研究科）

10:41 ～ 10:53

SL1-4　安定同位体標識のための無細胞タンパク質合成系の改良

Improvement of cell-free protein synthesis system for the stable isotope-labeling

○横山　順[1,2]，樋口　佳恵[2]，松田　夏子[2]，木川　隆則[2,3,4]（[1]大陽日酸株式会社つくば研究所、[2]理化学研究所イノベーション推進センター，[3]理化学研究所 生命システム研究センター，[4]東京工業大学大学院 総合理工学研究科）

10:53 ～ 11:05

SL1-5　哺乳細胞による安定同位体標識の抗体創薬への利用

Applications of stable isotope labeling by mammalian cells to antibody therapeutics

○鳥澤　拓也（中外製薬株式会社研究本部）

11:05 ～ 11:10　**休憩/Break**

座長：宮ノ入　洋平（名古屋大学）

11:10 ～ 11:22

SL1-6　誤り検出符号によるノイズに強いアミノ酸選択標識法

Noise-tolerant amino-acid selective stable isotope labeling with error detection system

○葛西　卓磨[1]，小柴　生造[1,2]，横山　順[1,3,4]，木川　隆則[1,3,5]（[1]理化学研究所 生命システム研究センター，[2]東北大学 東北メディカル・メガバンク機構，[3]理化学研究所 イノベーション推進センター，[4]大陽日酸株式会社 つくば研究所，[5]東京工業大学大学院 総合理工学研究科）

11:22 ～ 11:34

SL1-7　精製蛋白質への標識導入技術の開発

○児嶋　長次郎（大阪大学 蛋白質研究所）

11:34 ～ 11:46

SL1-8　微生物および植物バイオマスへの固体・溶液NMR解析

Microbial and plant biomass analysis by solid and solution-NMR

○菊地　淳[1,2,3]（[1]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[2]名古屋大学大学院 生命農学研究科，[3]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科）

11:46 ～ 11:58

SL1-9　タンパク質NMRの生体系への応用：新規MRI及びin-cell NMR法
Stable isotope-assisted NMR in living systems: novel MRI and in-cell NMR techniques

李　真和[1]，榎園　能章[2]，猪股　晃介[3]，山田　久嗣[4]，今井　宏彦[5]，牧野　顕[6]，木村　俊作[7]，松田　哲也[5]，近藤　輝幸[4]，白川　昌宏[1]，○杤尾　豪人[2]（[1]京都大学大学院 工学研究科，[2]京都大学大学院 理学研究科 生物物理専攻，[3]理化学研究所，[4]京都大学大学院 工学研究科 物質エネルギー化学専攻，[5]京都大学大学院 情報学研究科，[6]福井大学 高エネルギー医学研究センター，[7]京都大学大学院 工学研究科 材料化学専攻）

11:58 ～ 12:00　**結語：宮ノ入　洋平**

12:10 ～ 12:40　**日本核磁気共鳴学会総会/Meeting of the NMR Society of Japan［会場：MOホール］**

12:50 ～ 13:40　**昼食/Lunch**
ランチョンセミナー/Luncheon Seminar［会場：MOホール］

＜株式会社JEOL RESONANCE＞
新技術紹介 新型NMR装置「NMR spectrometer ZETA」
－世界最高性能のNMR分光計と溶液・固体プローブ－
内海　博明（ソリューション・マーケティング部）

13:40 ～ 15:10　**ポスターセッション（偶数番号，若手ポスター賞審査）**
Poster Session（even numbers）including poster presentations for Young Scientists Poster Awards

15:20 ～ 16:40　**ポスター賞プレビュー/Poster Awards Preview**

［A会場：MOホール／ Room A：MO Hall］

15:20 ～ 15:30

P8　MAPキナーゼp38αのストレスシグナル伝達機構の解明
Structural basis for the stress signal transduction via MAP kinase p38α

○徳永　裕二[1]，竹内　恒[2]，高橋　栄夫[3]，嶋田　一夫[4]（[1]JBiC 次世代天然物化学技術研究組合，[2]産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター，[3]横浜市立大学 生命医科学研究科、[4]東京大学大学院 薬学系研究科）

15:30 ～ 15:40

P10　人工 ligase ribozyme の活性部位のNMR解析
NMR analysis of the catalytic site in an artificial ligase ribozyme

○星野　啓治[1]，目谷　太樹[1]，井川　善也[2]，坂本　泰一[1]（[1]千葉工業大学，[2]富山大学）

15:40 ～ 15:50

P12　ユビキチン化に伴うタンパク質構造不安定化
Folding destabilization of a protein by ubiquitylation

○森本　大智[1]，ヴァリンダ　エリック[1]，菅瀬　謙治[2]，深田　はるみ[3]，曽　友深[4]，蔭山　俊[4,5]，星野　大[6]，藤井　高志[7]，土屋　光[8]，佐伯　泰[8]，有田　恭平[9]，有吉　眞理子[10]，杤尾　豪人[10]，岩井　一宏[11]，難波　啓一[7,12]，小松　雅明[4,5]，田中　啓二[8]，白川　昌宏[1]（[1]京都大学大学院 工学研究科，[2]公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所，[3]大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科，[4]公益財団法人東京都医学総合研究所 蛋白質リサイクルプロジェクト，[5]新潟大学大学院 医歯学総合研究科，[6]京都大学大学院 薬学研究科，[7]独立行政法人理化学研究所 生命システム研究センター，[8]公益財団法人東京都医学総合研究所 蛋白質代謝研究室，[9]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[10]京都大学大学院 理学研究科，[11]京都大学大学院 医学研究科，[12]大阪大学大学院 生命機能研究科）

15:50 ～ 16:00

P58　水分子のNMRダイナミクス解析を用いた高分子と水の相互作用に関する研究
NMR dynamics analysis of water molecules for studying interaction between polymer and water molecule

○亀谷　俊輔[1]，岩本　脩成[2]，関根　素馨[1]，グレゴリー　ボウティス[3]，大窪　貴洋[4]，朝倉　哲郎[2]（[1]三井化学分析センター，[2]東京農工大学大学院 工学府，[3]ニューヨーク市立大学シティカレッジ物理，[4]千葉大学大学院 工学研究科）

16:00 ～ 16:10

P76　グリーンレーザーを用いたアロディニア特異的な痛み応答に関するfMRI研究
An fMRI study of allodynic pain evoked by green laser stimuli

○杠　直哉[1]，吉永　壮佐[1]，平金　真[1]，木村　一成[1]，岩本　成人[1]，佐藤　博司[1]，寺沢　宏明[1]（[1]熊本大学大学院 生命科学研究部 構造生命イメージング分野，[2]ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部）

16:10 ～ 16:20

P90　グラフ・ネットワーク理論による代謝混合物の未知シグナル帰属支援
Supporting for assignment of unknown metabolites signals by graph and network theory

○伊藤　研悟[1,2]，小松　功典[1,2]，伊達　康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[2]独立行政法人理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]独立行政法人理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム，[4]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

16:20 ～ 16:30

P96　エリ蚕絹を用いた再生医療材料開発のためのNMR構造解析
NMR structure analysis of *S.c.ricini* silk fibroin for tissue engineering

○河西　秀和[1]，鈴木　悠[2]，山崎　俊正[3]，齊藤　準[4]，朝倉　哲郎[1]（[1]東京農工大学大学院 工学府，[2]福井大学テニュアトラック推進本部，[3]農業生物資源研究所，[4]京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科）

［B会場：会議室2 ／ Room B：Conference Room 2］

15:20 ～ 15:30

P48　単一細胞あたりの特定タンパク質の分子数計測のための定量固体NMR法の開発
Quantitative solid-state NMR method for counting the number of a protein molecule in a cell

○山田　和哉，江川　文子，藤原　敏道（大阪大学 蛋白質研究所）

15:30 ～ 15:40

P52　*In situ* 光照射固体NMRによる光受容センサー膜タンパク質sensory rhodopsin Iの波長依存的な光反応過程の解析
Color-discriminating photocycle of sensory rhodopsin I as revealed by *in situ* photo irradiation solid-state NMR

○槙野　義輝[1]，四方田　洋樹[1]，友永　雄也[1]，日高　徹朗[1]，川村　出[1]，沖津　貴志[2]，和田　昭盛[2]，須藤　雄気[3]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]神戸薬科大学，[3]岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科）

15:40 ～ 15:50

P54　家蚕絹の繊維化後構造と再生医療材料の開発に関するNMR研究
NMR studies on structure of *Bombyx mori* silk fibroin after spinning and development of silk for biomaterial.

○新井　裕喜[1]，大畑　卓也[1]，奥下　慶子[1]，青木　昭宏[1]，Anne S. Ulrich[2]，朝倉　哲郎[1]（[1]東京農工大学大学院 工学府，[2]カールスルーエ大学 生物化学部）

15:50 ～ 16:00

P60　逆ラプラス変換法によるゴム材料のT_2緩和時間分布解析
The T_2 relaxation distribution of rubber materials estimated by the inverse Laplace transform
○角村　将希[1]，奥下　慶子[2]，大窪　貴洋[3]，浅野　敦志[1]（[1]防衛大学校 応用化学科，[2]東京農工大学大学院 工学研究科，[3]千葉大学大学院 工学研究科）

16:00 ～ 16:10

P64　天然存在比下での^{33}S STMASによるエトリンガイトの研究
A natural abundance ^{33}S STMAS NMR study of ettringite
○佐々木　彬子，Stephen Wimperis（英国グラスゴー大学大学院）

16:10 ～ 16:20

P66　固体NMRによるキンヒドロン合成時の固相反応過程の研究
Solid-state NMR on solid-state reaction process of quinhydrone
○伊澤　研一郎，野田　泰斗，竹腰　清乃理（京都大学大学院 理学研究科）

16:20 ～ 16:30

P68　核磁気共鳴法によるCsの粘土シートへの吸着挙動解析
Solid-state analysis on behavior of adsorption of Cs in clays
○茨城　萌[1]，大窪　貴洋[1]，岩舘　泰彦[1]，出口　健三[2]，大木　忍[2]，清水　禎[2]（[1]千葉大学大学院 工学研究科，[2]物質・材料研究機構）

16:30 ～ 16:40

P78　7CB/*n*-heptane二成分液晶における*n*-heptaneの配向性とダイナミクス
Orientation and dynamics of *n*-heptane in 7CB/*n*-heptane system
○熊谷　翼秀，大橋　竜太郎，井田　朋智，水野　元博（金沢大学大学院 自然科学研究科）

[C会場：会議室3 ／ Room C：Conference Room 3]

15:20 ～ 15:30

P40　磁場配向微結晶粉末を用いた単結晶NMR測定
Single-crystal NMR measurement by using magnetically oriented microcrystal array
○木全　美香子，久住　亮介，木村　史子，木村　恒久（京都大学大学院 農学研究科）

15:30 ～ 15:40

P42　磁場配向微結晶試料を用いたセロビオースの単結晶NMR解析
Single-crystal NMR study of ^{13}C chemical shift tensor of cellobiose via magnetically oriented microcrystal array
○宋　广杰[1]，久住　亮介[1]，木村　史子[1]，木村　恒久[1]，出口　健三[2]，大木　忍[2]，藤戸　輝昭[2]，清水　禎[2]（[1]京都大学大学院 農学研究科，[2]物質・材料研究機構）

15:40 ～ 15:50

P44　マイクロ波照射NMRによる液晶分子のマイクロ波高温および高速加熱現象の解明
Analysis of high temperature and fast heating processes of liquid crystalline molecules by microwave irradiation NMR spectroscopy
○田制　侑悟[1]，谷川　文一[1]，川村　出[1]，佐藤　元泰[2]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]中部大学 工学研究科）

15:50 ～ 16:00

P46　Measurement of proton chemical shift anisotropy tensors using symmetry-based radio-frequency pulse sequences and ultrafast MAS solid-state NMR spectroscopy

○Manoj Kumar Pandey[1], Michal Malon[1, 2] and Yusuke Nishiyama[1, 2]（[1]CLST NMR Facility, RIKEN, [2]JEOL RESONANCE Inc.）

16:00 ～ 16:10

P86　高速高磁場DNP効率シミュレーション計算

Fast calculation of solid-state DNP effectiveness under magic-angle spinning

○深澤　隼，藤原　敏道，松木　陽（大阪大学 蛋白質研究所）

16:10 ～ 16:20

P88　指数窓によるCS法のNMRスペクトル復元精度の改善

To improve accuracy reconstructed the NMR spectrum with the compressed sensing using the exponential window

○田中　勇帆[1]，中尾　朋喜[1]，濱津　順平[2]，泉　顕也[2]，古川　利博[1]（[1]東京理科大学 工学研究科，[2]株式会社 JEOL RESONANCE）

16:20 ～ 16:30

P92　汎用デジタル機器とArduino Dueを用いたデジタルMRIシステムの開発

Development of a digital MRI system using general purpose digital units and board computers “Arduino Due”

○津田　真人，玉田　大輝，寺田　康彦，巨瀬　勝美（筑波大学大学院 数理物質科学研究科）

16:30 ～ 16:40

P94　ダイヤモンドスピンを用いた生体内ジャイロセンシング技術の開発

Nanoscale gyroscope for measurements of cellular dynamics *in vivo* using diamond spins

○久美屋　雄太[1]，五十嵐　龍治[1]，杉　拓磨[2, 3]，外間　進悟[1]，杤尾　豪人[1]，吉成　洋祐[2]，原田　慶恵[2]，白川　昌宏[1, 2]（[1]京都大学大学院 工学研究科，[2]京都大学 物質－細胞統合システム拠点，[3]科学技術振興機構 さきがけ）

17:30 ～　**日本核磁気共鳴学会 評議員会・新評議員会・新理事会　開場**
［会場：研修室（コンベンションセンター１階）］

18:00 ～ 21:00　**日本核磁気共鳴学会 評議員会・新評議員会・新理事会**
（総会で承認された新評議員も出席の必要があります。また、新理事会は新評議員会が終わりしだい開きます）

第2日目　11月5日(水)／Day 2 (Nov. 5, Wed)　English lectures

一般講演3 [Room：Conference Room 2 ／会議室2]

9:00 ～ 10:00　**Chairperson: Toshio Yamazaki**

9:00 ～ 9:20

L2-1　Sulfur-33 NMR of organic solids

○Kazuhiko Yamada[1], Daisuke Aoki[2], Kentaro Kitagawa[3], Hiromitsu Sogawa[2], Masato Takahashi[3], and Toshikazu Takata[2] ([1]Science Research Center, Kochi University, [2]Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology, [3]Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Kochi University, [4] Center for Life Science Technologies, RIKEN)

9:20 ～ 9:40

L2-2　Proton decoupling and recoupling under double-nutation irradiation

○Kazuyuki Takeda[1], Asato Wakisaka[1], K. Takegoshi[1] ([1]Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University)

9:40 ～ 10:00

L2-3　Studies of minute quantities of surface-bound molecules using 2D heteronuclear correlation spectroscopy under 100 kHz MAS

○Yusuke Nishiyama[1, 2], Takeshi Kobayashi[3], Michal Manon[1, 2], Igor I. Slowing[3, 4], and Marek Pruski[3, 4] ([1]JEOL RESONANCE Inc., [2] RIKEN CLST NMR facility, [3]U.S. DOE Ames Laboratory, [4]Department of Chemistry, Iowa State University)

10:00 ～ 11:00　**Chairperson: Tetsuo Asakura**

10:00 ～ 10:20

L2-4　Imaging mice with using vertical superconducting magnets for NMR

○Tomoyuki Haishi (MRTechnology, Inc., Tsukuba, Ibaraki, JAPAN)

10:20 ～ 10:40

L2-5　Water flow in mantle cavity of bivalves analyzed by 7 T NMR microimaging

○Yoshiteru Seo[1], Eriko Seo[2], Masataka Murakami[3], Kazue Ohishi[4], Tadashi Maruyama[4] ([1]Dokkyo Medical University School of Medicine, [2]Atmosphere and Ocean Research Institute, University of Tokyo, [3]National Institute for Physiological Sciences, [4]Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology)

10:40 ～ 11:00

L2-6　Characterization of elusive electronic sate of ferrous high-spin ($S = 2$) heme in deoxy myoglobin

Liyang Xu[1], Ryu Nishimura[1], Tomokazu Shibata[1], ○Yasuhiko Yamamoto[1], Akihiro Suzuki[2], and Saburo Neya[3] ([1]Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, [2]Department of Materials Engineering, Nagaoka National College of Technology, [3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University)

Open Symposium 2 [Room：MO Hall ／ MOホール]

9:00 ～ 11:00

"*in situ* structural biology" opened up by in-cell NMR

In-cell NMRが切り拓く「*in situ*構造生物学」

Chairpersons: Masahiro Shirakawa, Yutaka Ito, Takanori Kigawa

9:00 ～ 9:20

SL2-1 Protein dynamics in crowded environment

○Takanori Kigawa[1, 2] ([1]RIKEN Quantitative Biology Center, [2]RIKEN Innovation Center)

9:20 ～ 9:40

SL2-2 *In situ* structural biology by NMR

○Yutaka Ito[1, 2] ([1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, [2]CREST/JST)

9:40 ～ 10:00

SL2-3 Cell biology by optically detected magnetic resonance (ODMR) spectroscopy

Ryuji Igarashi[1], Yuta Kumiya[1, 2], Takuma Sugi[3], Shingo Sotoma[1], Kazuhiro Ikeda[4], Hitoshi Sumiya[4], Hidehito Tochio[1], Yohsuke Yoshinari[2, 5], Yoshie Harada[2], ○Masahiro Shirakawa[1] ([1]Graduate School of Engineering, Kyoto University, [2]Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, [3]JST, PRESTO, [4]Advanced Materials R&D Laboratories, Sumitomo Electric Industries, Ltd., [5]JEOL Ltd.)

10:00 ～ 10:30

SL2-4 In-cell thermodynamics-curvatures and transient interactions

○Jens Danielsson (Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, Sweden)

10:30 ～ 11:00

SL2-5 In-cell NMR spectroscopy of larger proteins and complexes

Robert Hänsel[1], Laura M. Luh[1], Sina Reckel[1], Ivan Corbeski[1], Frank Löhr[1], Lukas Trantirek[2] and○Volker Dötsch[1] ([1]Institute of Biophysical Chemistry, University of Frankfurt, Frankfurt, Germany, [2]Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic)

11:00~11:10 **Break/休憩**

Invited Lecture [Room：MO Hall ／ MOホール]

11:10 ～ 11:45 **Chairperson: Yoh Matsuki**

IL1 Recent advances in nanoscale MRI

○Christian Degen (Department of Physics, ETH Zurich, Zurich, Switzerland)

11:45 ～ 12:20 **Chairperson: Michio Murata**

IL2 Solid-state NMR for investigating membrane-curvature induction by viral proteins

Hongwei Yao, Tuo Wang, Byungsu Kwon, and○Mei Hong (Department of Chemistry, MIT, Cambridge, MA, USA)

12:30 ～ 13:20 **Lunch/昼食**
Luncheon Seminar/ランチョンセミナー［Room：MO Hall ／ MOホール］

＜Agilent Technologies Japan, Ltd.＞
“Agilent total solution for protein structural analysis”

Session 1
Structural analysis of protein by HPLC-coupled mass spectrometry,
improvement of sensitivity and reproducibility
Hiroyuki Fukuda

Session 2
Multidimensional NMR data processing software VnmrJ,
integrated nmrPipe environment
Junichi Kurita

Session 3
X-ray Crystallography @ own lab, novel *in situ* X-ray screening,
bullet structure analysis and ultra-high resolution structure elucidation
Takashi Sato

Honorary Lecture

13:30 ～ 14:05 **Chairperson: Gohta Kawai**

HL1 NMR structural biology on transcription factors and chromatin-related proteins

○Yoshifumi Nishimura（Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University）

14:05 ～ 14:40 **Chairperson: Yutaka Ito**

HL2 Analytical and biotechnological applications of NMR

○Ei-ichiro Suzuki（Japan Biological Informatics Consortium Research Institute; Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo; Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University）

14:40 ～ 14:55 **Break/休憩**

Invited Lecture

14:55 ～ 15:30 **Chairperson: Ichio Shimada**

IL3 Substrate- and ligand-modulated conformational dynamics of membrane solute carriers revealed by NMR

Sven Brueschweiler[1], Qin Yang[1], Marcelo J. Berardi[1], and ○James J. Chou[1,2]（[1]Harvard University Medical School, Boston, USA, [2]National Center for Protein Science, Shanghai, China）

15:30 ～ 16:05 **Chairperson: Yoshichika Yoshioka**

IL4 Magnetic resonance imaging in real time

○Jens Frahm（Biomedizinische NMR Forschungs GmbH am Max-Planck-Institut füer biophysikalische Chemie, Göettingen, Germany）

16:05 ～ 16:20 **Break/休憩**

Invited Lecture

16:20 ～ 16:55 **Chairperson: Kiyonori Takegoshi**

IL5 Metabolism and microarchitecture from advanced ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy and imaging

Noam Shemesh[1], Jens T. Rosenberg[2], Jean-Nicolas Dumez[1], Avigdor Leftin[1], Tangi Roussel[1], Rita Schmidt[1], Hadassa Degani[1], Samuel C. Grant[2] and○Lucio Frydman[1, 2]（[1]Weizmann Institute, Rehovot, Israel, [2]National High Magnetic Field Lab, Tallahassee, Florida, USA）

16:55 ～ 17:30 **Chairperson: Akira Naito**

IL6 Solid state NMR of disease-associated proteins: methods and results

Marvin Bayro, Jun-Xia Lu, Eric Moore, Dylan Murray, Alexey Potapov, Kent Thurber, Wai-Ming Yau, and ○Robert Tycko（Laboratory of Chemical Physics, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA）

17:30 ～ 18:30 **Break & Transfer by Chartered Bus or Monorail /休憩・移動**

18:30 ～ 20:30 **Banquet［Place: Hotel Hankyu Expo Park］**
懇親会［会場：ホテル阪急エキスポパーク］

第3日目　11月6日(木)／Day 3 (Nov. 6, Thu)

一般講演4［会場：MOホール］

9:00 ～ 10:00　**座長：西村　重徳**

9:00 ～ 9:20

L3-1　Error analysis of NMR parameters in equilibrium systems

○Rieko Ishima (Department of Structural Biology, University of Pittsburgh School of Medicine)

9:20 ～ 9:40

L3-2　天然変性蛋白質の段階的なNMR解析

Features of intrinsically disordered proteins monitored by NMR

大野　悠一[1]，宮下　真奈美[1]，大野　優美[1]，岡崎　萌花[1]，渡部　暁[2]，栃尾　尚哉[2]，○西村　千秋[1] ([1]帝京平成大学 薬学部，[2]理化学研究所 生命システム研究センター)

9:40 ～ 10:00

L3-3　「汎特異的」相互作用を基盤とする多剤耐性転写制御因子の機能発現機構

Entropy-driven dynamic multidrug recognition by multidrug transcriptional repressor

○竹内　恒[1]，嶋田　一夫[2] ([1]産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター，[2]東京大学大学院 薬学系研究科)

10:00 ～ 11:00　**座長：大久保　忠恭**

10:00 ～ 10:20

L3-4　ケモカイン受容体－細胞内制御因子フロント間相互作用の構造生物学的解析

Structural analyses of the interaction between the chemokine receptor and the cytosolic regulator FROUNT

○吉永　壮佐[1]，江崎　芳[1]，辻辰　一朗[1]，遠田　悦子[2]，寺島　裕也[2]，齊藤　貴士[3]，神田　大輔[3]，河野　俊之[4]，大澤　匡範[5]，上田　卓見[5]，嶋田　一夫[5]，松島　綱治[2]，寺沢　宏明[1] ([1]熊本大学大学院 生命科学研究部，[2]東京大学大学院 医学系研究科，[3]九州大学 生体防御医学研究所，[4]北里大学 医学部，[5]東京大学大学院 薬学系研究科)

10:20 ～ 10:40

L3-5　NMRとSAXSによるマルチドメインタンパク質の構造解析

NMR and SAXS studies on multi-domain protein

小林　彩保，金場　哲平，伊藤　隆，○三島　正規 (首都大学東京大学院 理工学研究科)

10:40 ～ 11:00

L3-6　酵素活性部位水素結合ネットワーク中にあるHisの“tug-of-war”(綱引き)による構造安定性変化

The structural stability of the catalytic site of human Pin1 is mediated by the balance of the “tug-of-war” in the hydrogen bond network

○栃尾　尚哉[1]，徐　宁[2]，玉利　佑[2]，津田　亮祐[2]，楯　真一[1,2] ([1]広島大学 核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点，[2]広島大学大学院 理学研究科)

公募型シンポジウム3 [会場：会議室2 ／ Conference Room 2]

9:00 ～ 11:00

NMRとプリオン

NMR and Prion

座長：桑田　一夫

9:00 ～ 9:10

SL3-1　キネティックNMRによるタンパク質の‘かたち’の進化の観測

Evolution of protein conformation observed by the ‘Kinetic NMR’

○桑田　一夫[1,2],山口　圭一[1]（[1]岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科，[2]岐阜大学大学院 医学系研究科）

9:10 ～ 9:35

SL3-2　プリオン蛋白質のモルテングロビュール状態の発見とオリゴマー形成との関連

Identification of the molten globule state of prion protein and its relevance to β-rich oligomer conversion

○本田　諒[1]，山口　圭一[2]，桑田　一夫[1,2,3]（[1]岐阜大学 医学部医学科，[2]岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科，[3]岐阜大学大学院 医学系研究科 遺伝発生学分野）

9:35 ～ 10:00

SL3-3　Sup35天然変性領域のアミロイド構造多形形成機構の解明

Local compact structure in an intrinsically disordered protein Sup35-NM determines amyloid conformation

○大橋　祐美子[1,2]，山口　芳樹[3]，鎌足　雄司[4]，花島　慎弥[3]，桑田　一夫[4]，田中　元雅[2]（[1]東京理科大学 理学部，[2]理化学研究所 脳科学総合研究センター，[3]理化学研究所 糖鎖構造生物学研究チーム，[4]岐阜大学 連合創薬医療情報研究科）

10:00 ～ 10:25

SL3-4　カルボニル炭素−カルボニル炭素（$^3J_{CC}$）相関NMRの利用による変性蛋白質の主鎖信号帰属

Application of carbonyl-carbonyl correlation NMR experiments with ultra-high resolution for resonance assignments of disordered proteins

○吉村　優一[1,2], Natalia Kulminskaya[1,2], Frans Mulder[1,2]（[1]Interdisciplinary Nanoscience Center, Aarhus University, Denmark, [2]Department of Chemistry, Aarhus University, Denmark）

10:25 ～ 10:50

SL3-5　固体NMRとTEMによるヒトカルシトニンにおけるアミロイド線維形成と阻害機構の解明

Amyloid fibril formation and inhibition mechanism of human calcitonin as studied by solid state NMR and TEM

○内藤　晶[1]，伊藤（渡邉）　ひかり[1]，上平（石島）　美弥[2]，Namsrai Javkhlantugs[1]，近藤　正志[3]，中越　雅道[3]，川村　出[1]，辻　暁[2]，斉藤　肇[2]，上田　一義[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]兵庫県立大学理学部大学院，[3]横浜国立大学 機器分析評価センター）

10:50 ～ 11:00　コメント　　後藤　祐児

一般講演5［会場：MOホール：English lecture］

11:10 ～ 12:10　**座長　小林　直宏**

11:10 ～ 11:30

L3-7　**分子混雑環境に適用可能な新規拡張model-free解析法の開発**

Development of an extended model-free analysis for macromolecular crowding environment

○岡村　英保[1]，栃尾　尚哉[2]，杉山　修世[1,2]，渡部　暁[1,2]，優　乙石[3]，フェイグ　マイケル[1,4]，杉田　有治[1,3,5]，木川　隆則[1,2,6]（[1]理化学研究所 生命システム研究センター，[2]理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域，[3]理化学研究所 杉田理論分子科学研究室，[4]ミシガン州立大学，[5]理化学研究所計算科学研究機構，[6]理化学研究所 イノベーション推進センター）

11:30 ～ 11:50

L3-8　**分子量（横緩和時間）の差に由来する物質定量のゆがみを克服する新しい測定法の開発**

Development of new methods to compensate distortion of quantitation caused by difference in molecular weight (transverse relaxation time)

岡村　英保[1,2]，西村　裕志[3,4]，永田　崇[1]，木川　隆則[2]，渡辺　隆司[3,4]，○片平 正人[1,4]（[1]京都大学 エネルギー理工学研究所，[2]理化学研究所 生命システム研究センター，[3]京都大学 生存圏研究所，[4]科学技術振興機構 CREST）

11:50 ～ 12:10

L3-9　Theoretical calculation of $^{1}H/^{13}C$ NMR shifts indicative of salt bridge between methylated Lys and CO_2 group of Asp or Glu residues in proteins

Jakub Šebera[1], Yoshikazu Hattori[2], Yoshiyuki, Tanaka[3], Chojiro Kojima[2], and ○Vladimír Sychrovský[1]（[1]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, [2]Institute of Protein Research, Osaka University, [3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University）

12:20 ～ 13:10　**昼食/Lunch**

ランチョンセミナー /Luncheon Seminar［会場：MOホール］

＜NMR共用プラットフォーム＞

NMR研究の先端的基盤を提供するNMR共用プラットフォームと理研NMR施設の紹介

木川　隆則（理化学研究所）

横浜市大のNMR施設共用の紹介：950 MHz LC-NMRと900 MHz固体NMR

西村　善文（横浜市立大学大学院生命医科学研究科）

大阪大学蛋白質研究所NMR施設における共用取組と研究支援

児嶋　長次郎（大阪大学蛋白質研究所）

13:10 ～ 14:40　**ポスターセッション（奇数番号）**

Poster Session（odd numbers）

一般講演6［会場：会議室2］

14:50 ～ 15:30　**座長：山本　泰彦**

14:50 ～ 15:10

L3-10　^{13}C selective HMBC法による糖鎖の立体構造とダイナミクスに関する研究

Study on 3D structure and dynamics of glycans using ^{13}C selective HMBC

○鵜澤　洵，加藤　雅樹，関　宏子，桝　飛雄真，山口　芳樹（理化学研究所 糖鎖構造生物学研究チーム，千葉大学 共用機器センター）

15:10 ～ 15:30

L3-11　$^{15}N/^{199}Hg$ NMR分光法による水銀を介したチミン-チミン塩基対の構造決定および電子状態解析

Structure determination and electronic structure of Hg^{II}-mediated T-T base-pair in DNA duplex with $^{15}N/^{199}Hg$ NMR spectroscopy

○田中　好幸[1]，大槃　武範[1]，古板　恭子[2]，岡本　到[3,4]，小野　晶[3]，鳥越　秀峰[5]，Vladimir Sychrovsky[6]，児嶋　長次郎[2]（[1]東北大学大学院 薬学研究科，[2]大阪大学 蛋白質研究所，[3]神奈川大学 工学部，[4]理化学研究所，[5]東京理科大学 理学部，[6]チェコ科学アカデミー）

15:30 ～ 16:10　**座長：水野　元博**

15:30 ～ 15:50

L3-12　変性シリカ－水共存系における水の核磁気緩和現象

Magnetic relaxation of water protons in fumed silica/water coexisting system

○牧　秀志[1]，十川　廉[1]，村上　良[2]，山本　雅博[2]，水畑　穣[1]（[1]神戸大学大学院 工学研究科，[2]甲南大学 理工学部）

15:50 ～ 16:10

L3-13　第一原理分子動力学計算とGIPAW法を併用したリチウムホウ酸ガラスのNMRパラメータの推定

NMR parameter estimation of lithium borate glass by combining ab initio molecular dynamics and GIPAW calculation

○大窪　貴洋[1]，岩舘　泰彦[1]，土田　英二[2]（[1]千葉大学大学院 工学研究科，[2]産業技術総合研究所）

公募型シンポジウム4［会場：MOホール／ MO Hall］

14:50 ～ 16:50

NMRの強みを生かした生体系への応用

NMR applications to biological systems

座長：嶋田　一夫，伊倉　光彦

14:50 ～ 15:14

SL3-6　タンパク質の高エネルギー状態を標的とした構造生物学

High-energy conformations of proteins as a new target of structural biology

○北原　亮，北沢　創一郎（立命館大学 薬学部薬学科）

15:14 ～ 15:38

SL3-7　チロシンキナーゼのNMR解析へ向けた試み：受容体型チロシンキナーゼの活性化機構

Development of the method for production of the isotope labeled tyrosine kinase, and its application to NMR analysis of the interaction between kinase domains required for activation of the receptor tyrosine kinase

○小橋川　敬博[1,2]，稲垣　冬彦[2]（[1]熊本大学大学院 生命科学研究部，[2]北海道大学大学院 先端生命科学研究院）

15:38 ～ 16:02

SL3-8　SAIL法を利用したタンパク質構造揺らぎのNMR研究

NMR study on protein dynamics by the SAIL method

○武田　光広[1]，甲斐荘　正恒[1,2]（[1]名古屋大学理学研究科 構造生物学研究センター，[2]首都大学東京 理学系研究科）

16:02 ～ 16:26

SL3-9　生細胞内の生命現象を観測する in-cell NMR法の開発と応用
A bioreactor for NMR observation of biological events inside living cells
○西田　紀貴，嶋田　一夫（東京大学大学院 薬学系研究科）

16:26 ～ 16:50

SL3-10　Dissecting oncogenic RAS signaling by NMR
Smith Mathew J., Mazhab-Jafari Mohammad, Feng Zhenhao, Marshall Christopher B., ○伊倉光彦（Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto）

16:50 ～ 17:00

閉会の挨拶　　藤原　敏道（第53回NMR討論会世話人代表）
Closing Remarks: Toshimichi Fujiwara（Organizer of the 53rd Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan）

公募型シンポジウム 1 / Open Symposium 1［会場: 会議室 2 / Room: Conference Room 2］
11 月 4 日（火）10:00 ～ 12:00

高度な安定同位体標識が拓く NMR技術の展開 / The expansion of NMR spectroscopy by elaborated stable isotope labeling

オーガナイザー：竹内　恒，宮ノ入　洋平 / Organizers: Koh Takeuchi, Yohei Miyanoiri

安定同位体標識技術は、絶対的な感度の制限があるNMR測定において、得られる情報量を最大化するとともに、核緩和速度を抑制することで観測限界を突破するために不可欠な手法である。

そのため、生体高分子の構造解析のみならず、創薬、メタボノミクス、分子イメージングなどNMR解析が必要とされる様々な局面において安定同位体標識技術が利用されている。

本シンポジウムでは学会全体の知識共有、異種分野間の相補性を期待し、高度な安定同位体標識試料の調製法及び最先端の応用例を紹介していただく予定である。

The stable isotope labeling technique is critical to maximize the structural information obtained by an NMR experiment and to overcome the detection limit posed by the intrinsic low-sensitivity of the NMR spectroscopy. Thus the development of an elaborated stable isotope labeling technique plays a crucial role in advanced NMR studies such as structural analysis of large molecular proteins, drug development, metabolome analysis and molecular imaging.

In this symposium, we will introduce various sample preparation methods and its latest applications to discuss how does stable isotope labeling can contribute to the expansion of NMR spectroscopy.

公募型シンポジウム２ / Open Symposium 2［会場: MO ホール / Room: MO Hall］
11 月 5 日（水）9:00 ～ 11:00

In-cell NMRが切り拓く「*in situ* 構造生物学」/ “*in situ* structural biology” opened up by in-cell NMR

オーガナイザー：白川　昌宏，伊藤　隆，木川　隆則 / Organizers: Masahiro Shirakawa, Yutaka Ito, Takanori Kigawa

生きた細胞の中の生体高分子の動態を観察するin-cell NMRは、生体高分子が実際に機能している場における真の姿に迫る学問領域「*in situ* 構造生物学」を推進し、特に真核細胞の *in situ* 構造生物学から得られる知見は、先端医療や創薬科学等にも波及的効果を及ぼし、ライフ・イノベーションの推進に大きく寄与することが期待される。本シンポジウムでは、国内外の当該分野の研究者に最先端の研究内容を紹介していただく予定である。

In-cell NMR, which can observe biomolecular structural dynamics inside living cells at atomic resolution, helps define a new field, “*in situ* structural biology”. Its focus is on to reveal a realistic picture of biomolecules “at work”. Explicit understanding of the structural bases of various biological events inside living eukaryotic cells obtained by *in situ* structural biology will have a ripple effect on state-of-the-art medical technology, drug-discovery, etc., and greatly contribute to“ Life innovation”. In this symposium, recent works on *in situ* structural biology will be presented by the leading scientists in this field.

公募型シンポジウム３ / Open Symposium 3［会場: 会議室 2 / Room: Conference Room 2］
11 月 6 日（木）9:00 ～ 11:00

NMR とプリオン / NMR and Prion

オーガナイザー：桑田　一夫 / Organizer: Kazuo Kuwata

アミノ酸配列により、蛋白質の立体構造が一義的に決定されるという「アンフィンゼンの仮説」には、大きな例外がある。アルツハイマー病などの神経変性疾患、II型糖尿病、一部の統合失調症、一部のがんなどは、遺伝子配列の問題ではなく、アミノ酸配列は同じでも蛋白質の‘かたち’が異常な変化を起こすことにより、発症する。この異常な‘かたち’は、感染性を有し、非メンデル的遺伝を示すため、広い意味でプリオンと呼ばれる。これらの‘かたち’の変化は、溶液中で起きるため、原子分解能でその変化を追跡できるのは、NMRのみであろう。構造生物学を超えた、生命科学の中心的テーマである‘感染 性病原体の進化’を対象とする新しいNMR学の始まりである。

Aberrant forms of particular proteins accumulate in many neurodegenerative diseases, if not all, including Alzheimer's disease, and in type II diabetes mellitus, in a part of schizophrenia as well as in a part of cancer. These proteins are more or less infectious and their structures evolve during passages in the carefully designed experiments.

Thus they can be called as 'Prions'. Because these structural changes occur in a solution state, only NMR can detect their real-time evolution process in atom resolving power. This may be the beginning of the new NMR era in which researchers target a central biological problem 'Evolution of the infectious agents', which is evidently beyond the structural biology.

公募型シンポジウム４ / Open Symposium 4［会場: MO ホール / Room: MO Hall］
11 月 6 日（木）14:50 ～ 16:50

NMR の強みを生かした生体系への応用 / NMR applications to biological systems

オーガナイザー：嶋田　一夫，伊倉　光彦 / Organizers: Ichio Shimada, Mitsuhiko Ikura

核磁気共鳴法は構造生物学において重要な測定法である。その特徴は、生理的条件下でのタンパク質などの生体分子の構造情報を抽出することにある。ここでは、試料調製法などを工夫して機能にかかわる有用な情報を取り出し生体機能の解明を行っている研究例を紹介する。

NMR spectroscopy, which provides information about structures and dynamic of biomolecules under physiological conditions, contributes to structural biology immensely. In our proposed symposium, we will show NMR applications, including sample preparations, for better understanding of the functions of the biomolecules.

一般ポスター発表／Poster presentation［会場：体育館／Gym］

偶数番号：1日目（2014/11/4）、奇数番号：3日目（2014/11/6）
Y1：若手ポスター賞Ⅰ、Y2：若手ポスター賞Ⅱ、A, B, C：ポスタープレビュー会場

P1 **光誘起化学交換スペクトルのペプチドフォールディングへの応用**
Photo-induced exchange spectroscopy applied to peptide folding

○長島　敏雄[1]，植田　啓介[1]，西村　千秋[2]，山崎　俊夫[1]（[1]理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター，[2]帝京平成大学・薬学部）

P2 **WET法の新しい応用測定―Broad Band WET法とその応用について**
Broad Band WET ―a new method to observe quantitatively minor components in foods

○降旗　一夫[1]，佐久間　千勢子[2]，田代　充[3]（[1]東京大学大学院 農学生命化学研究科，[2]東京薬科大学 薬学科，[3]明星大学 理工学部）

P3 **大腸菌蛋白質生合成系を利用した新規SAILアミノ酸標識法の開発**
Effective amino acid labeling method using auxotrophic mutant *E. coli* protein expression system

○宮ノ入　洋平[1]，石田　洋二郎[2]，武田　光広[1]，寺内　勉[3,4]，井上　正順[2]，甲斐荘　正恒[1,3]（[1]名古屋大学大学院 理学研究科・構造生物学研究センター，[2]ラトガース大 医学部 バイオテクノロジーセンター，[3]首都大学東京大学院 理工学研究科，[4]SAILテクノロジーズ株式会社）

P4 **高濃度アルコール酒中に含まれる微量成分の測定**
NMR measurement of minor constituents in high alcohol concentration liquors

○岩下 孝[1]，中村　典子[2]，森 祥子[1]，菅瀬　謙治[1]（[1]（公財）サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所，[2]サントリーグローバルイノベーションセンター（株））

P5 **ヒト培養細胞を用いたcalbindin D_{9k}のin-cell NMR測定**
An in-cell NMR study of calbindin D_{9k} in cultured human cells

○鴨志田　一[1,2]，石川　真帆[1]，田中　孝[1,2]，井上　仁[1,2]，池谷　鉄兵[1,2]，三島　正規[1,2]，白川昌宏[3]，伊藤　隆[1,2]（[1]首都大学東京大学院 理工学研究科，[2]CREST/JST，[3]京都大学大学院 工学研究科）

P6 **難発現蛋白質の安定同位体標識と大量発現を可能にするpCold-GSTシステムの技術開発**
Technological development of pCold-GST system for successful over expression of isotopically-enriched recombinant challenging proteins

片岡　沙織，○杉木　俊彦，古板　恭子，藤原　敏道，児嶋　長次郎（大阪大学　蛋白質研究所）

P7 **遊離状態および糖結合状態におけるミミズ由来R型レクチン改変体のシアル酸糖結合メカニズムに関するNMR解析**
NMR studies on a novel sialic acid-binding lectin mutant from the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm in the sugar-free state or in the sugar-bound states

○逸見　光[1]，久野　敦[2]，海野　幸子[2]，平林　淳[3]（[1]（独）農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所，[2]産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター，[3]産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター）

P8 Y1:A **MAPキナーゼp38αのストレスシグナル伝達機構の解明**
Structural basis for the stress signal transduction via MAP kinase p38α

○徳永　裕二[1]，竹内　恒[2]，高橋　栄夫[3]，嶋田　一夫[4]（[1]JBiC 次世代天然物化学技術研究組合，[2]産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター，[3]横浜市立大学 生命医科学研究科，[4]東京大学大学院 薬学系研究科）

P9　植物細胞発現系を用いた植物由来ホルモンの立体構造解析
NMR analysis of plant defensin-like peptideusing plant cell expression system
○梅津　喜崇[1]，森　正之[2]，大木　進野[1]（[1]北陸先端大学 ナノマテリアルテクノロジーセンター，[2]石川県立大学）

P10 Y1:A 人工 ligase ribozyme の活性部位の NMR 解析
NMR analysis of the catalytic site in an artificial ligase ribozyme
○星野　啓治[1]，目谷　太樹[1]，井川　善也[2]，坂本　泰一[1]（[1]千葉工業大学，[2]富山大学）

P11　常磁性効果を用いたユビキチン二重合体の構造学的研究
Structural study of diubiquitin by paramagnetic NMR
○西澤　茉由[1]，森本　大智[1]，猪股　晃介[2]，外間　進悟[1]，杤尾　豪人[3]，白川　昌宏[1]（[1]京都大学 工学研究科，[2]理化学研究所 生命システム研究センター，[3]京都大学理学研究科）

P12 Y1:A ユビキチン化に伴うタンパク質構造不安定化
Folding destabilization of a protein by ubiquitylation
○森本　大智[1]，ヴァリンダ　エリック[1]，菅瀬　謙治[2]，深田　はるみ[3]，曽　友深[4]，蔭山　俊[4,5]，星野　大[6]，藤井　高志[7]，土屋　光[8]，佐伯　泰[8]，有田　恭平[9]，有吉　眞理子[10]，杤尾　豪人[10]，岩井　一宏[11]，難波　啓一[7,12]，小松　雅明[4,5]，田中　啓二[8]，白川　昌宏[1]（[1]京都大学大学院 工学研究科，[2]公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所，[3]大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科，[4]公益財団法人東京都医学総合研究所 蛋白質リサイクルプロジェクト，[5]新潟大学大学院 医歯学総合研究科，[6]京都大学大学院 薬学研究科，[7]独立行政法人理化学研究所 生命システム研究センター，[8]公益財団法人東京都医学総合研究所 蛋白質代謝研究室，[9]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[10]京都大学大学院 理学研究科，[11]京都大学大学院 医学研究科，[12]大阪大学大学院 生命機能研究科）

P13　hOGG1 の遺伝子修復機構の解析と性状解析
Characterization of human 8-oxoguanine glycosylase 1 and its mechanistic study
○佐藤　大地[1]，米山　桃子[2]，河原　郁美[2]，古板　恭子[2]，児嶋　長次郎[2]，根東　義則[1]，田中　好幸[1]（[1]東北大学大学院 薬学研究科，[2]大阪大学 蛋白質研究所）

P14　硬直な構造をもつ新規ランタニドキレート剤を用いたタンパク質の常磁性 NMR 研究
Paramagnetic NMR study of proteins using a novel chelator designed for rigid lanthanide tagging
○服部　良一[1]，山口　拓実[2,3]，Zhang Ying[2,3]，亀田　倫史[4]，加藤　晃一[2,3]，藤原　敏道[1]，児嶋　長次郎[1]（[1]大阪大学 蛋白質研究所，[2]自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・分子科学研究所，[3]名古屋市立大学 大学院薬学研究科，[4]産業技術総合研究所 ゲノム情報研究センター）

P15　Regnase-1 による mRNA 切断機構の構造生物学的解析
Structural and functional analyses of mRNA degradation by Regnase-1
○横川　真梨子[1]，津嶋　崇[2]，野田　展生[3]，久米田　博之[1]，足立　わかな[1]，榎園　能章[1]，山下　和男[4]，Daron M. Standley[4]，竹内　理[4,5,6]，審良　静男[4,5]，稲垣　冬彦[1]（[1]北海道大学大学院 先端生命科学研究院，[2]北海道大学大学院・生命科学研究院，[3]公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所，[4]大阪大学・免疫学フロンティア研究センター，[5]大阪大学・微生物病研究所，[6]京都大学・ウィルス研究所）

P16　ポリユビキチン鎖線維形成メカニズムの構造学的研究
Structural study of the formation mechanism of polyubiquitin fibrils
○新家　万葉[1]，森本　大智[1]，有吉　眞理子[2]，杤尾　豪人[2]，白川　昌宏[1]（[1]京都大学大学院 工学研究科，[2]京都大学大学院 理学研究科）

P17　溶液状態におけるRNA結合タンパク質Nrd1の構造解析
Solution structural studies of RNA-binding protein Nrd1

○小林　彩保[1]，中西　絢子[2]，佐藤　亮介[3]，藤原　俊伸[4]，伊藤　隆[1]，杉浦　麗子[3]，三島　正規[1]（[1]首都大学東京大学院 理工学研究科，[2]首都大学東京 理工学系，[3]近畿大学 薬学部，[4]名市立大学大学院 薬学研究科）

P18　神経系幹細胞の未分化状態維持と発癌に関わるMusashi1タンパク質の構造基盤
Structural study of Musashi1 involved in the maintenance of neural stem cell pluripotency and oncogenesis

○岩岡　諒[1]，小林　直宏[2]，津田　健吾[3]，今井　貴雄[4]，岡野　栄之[4]，永田　崇[1]，片平　正人[1]（[1]京都大学 エネルギー理工学研究所，[2]大阪大学 蛋白質研究所，[3]理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター，[4]慶應義塾大学 医学部）

P19　微小脂質二分子膜を利用したシトクロム*c*とカルジオリピンの相互作用解析
Characterization of the interaction between cytochrome *c* and cardiolipin using bicelles

○小林　紀，長尾　聡，廣田　俊（奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科）

P20　LINE RNAと逆転写酵素の認識特異性の決定要因
Specificity determinant of LINE RNA for the recognition by LINE reverse transcriptase

○大津　舞菜[1]，梶川　正樹[2]，河合　剛太[1]（[1]千葉工業大学 工学部，[2]東京工業大学大学院 生命理工学研究科）

P21　天然変性タンパク質と低分子のNMR滴定実験における主成分分析の利用
Primary component analysis of HSQC-based NMR titration experiments: Application to interaction between intrinsically disordered proteins and small molecules

岩谷　奈央子[1]，重光　佳基[1]，天野　剛志[1,2]，合田　名都子[1]，松崎　瑞希[2]，成田　哲博[2]，阿部　義人[3]，星　美奈子[4]，○廣明　秀一[1]（[1]名古屋大学大学院　創薬科学研究科，[2]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，[3]九州大学大学院 薬学研究科，[4]京都大学大学院 医学研究科）

P22　HCVゲノムRNAにおけるNS5Bタンパク質コード領域のSL3.2とその200残基上流の一本鎖領域との相互作用の解析
Analysis of interaction between SL3.2 and a single stranded region in the NS5B coding region of HCV genome RNA

○大友　裕貴[1]，Pratima Chaudhuri[2]，河合　剛太[1]（[1]千葉工業大学 工学部，[2]Amity Institute of Biotechnology, Amity University, India）

P23　溶液NMR法を用いた大腸菌由来Aβ（1-42）の品質管理
The quality control of Aβ（1-42）from bacteria by solution NMR

○重光　佳基[1]，岩谷　奈央子[1]，天野　剛志[1]，合田　名都子[1]，松崎　瑞季[2]，成田　哲博[2]，星　美奈子[3]，廣明　秀一[1]（[1]名古屋大学大学院 創薬科学研究科，[2]名古屋大学大学院 理学研究科，[3]京都大学大学院 医学研究科）

P24　^{19}F含有化合物ライブラリを用いた創薬NMRスクリーニング技術の開発
Development of NMR-based screening technique in drug discovery using fluorine-containing library

○片平　律子[1]，古板　恭子[1]，杉木　俊彦[1]，李　映昊[1]，服部　良一[1]，木川　隆則[2]，上村　みどり[1,3]，藤原　敏道[1]，児嶋　長次郎[1]（[1]大阪大学 蛋白質研究所，[2]理化学研究所 生命システム研究センター，[3]帝人ファーマ株式会社）

P25　Sf9細胞のin-cell NMRを用いた3D NOESYスペクトルの測定
Observation of 3D NOESY spectra of proteins in living insect cells using a baculovirus protein expression system
○田中　孝[1,2]，浜津　順平[1]，池谷　鉄兵[1,2]，三島　正規[1,2]，伊藤　隆[1,2]（[1]首都大学東京大学院理工学研究科，[2]CREST/JST）

P26　膜タンパク質ASRとの相互作用解析に向けたASRTのNMR解析
NMR analysis of ASRT toward elucidation of the interaction between ASR and ASRT
○比嘉　一葉[1]，神谷　昌克[1,2]，菊川　峰志[1,2]，熊木　康裕[3]，出村　誠[1,2]，相沢　智康[1,2]（[1]北海道大学大学院 生命科学院，[2]北海道大学大学院 先端生命科学研究院，[3]北海道大学大学院 理学研究院）

P27　In-cell NMRを志向したDOTA-M8リガンドの合成研究
Synthetic study of DOTA-M8 lanthanide ligands for in-cell NMR
○彦根　佑哉[1,2]，平井　剛[2]，袖岡　幹子[2]，三島　正規[1,3]，伊藤　隆[1,3]（[1]首都大学東京大学院理工学研究科，[2]理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室，[3]CREST/JST）

P28　NMR structural analysis of ω-agatoxin IVA in lipid membranes
○Jae Ha Ryu, Ji Young Sim, Jae Ho Lee, Bonggyu Park, Jae Hyun Kim, Sang Hyun Kim, Hyun Jung Lim and Jae Il Kim（School of Life Sciences, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju, Republic of KOREA）

P29　擬コンタクトシフト情報収集のための、種々のランタノイド結合タグの検討
Examination of various lanthanoid binding tag to collect information of Pseudo Contact Shift
○飯沼　純弥，金場　哲平，小林　彩保，伊藤　隆，三島　正規（首都大学東京 理工学研究科）

P30　芳香族アミノ酸側鎖のダイナミクスによる蛋白質と蛋白質及び蛋白質とリガンド相互作用の観測
Protein-protein and protein-ligand interactions revealed by the side-chain dynamics of interfacial aromatic residues
○楊　淳竣[1]，武田　光広[1]，宮ノ入　洋平[1]，寺内　勉[2]，甲斐荘　正恒[3]（[1]名古屋大学大学院 理学研究科，[2]SAILテクノロジーズ（株），[3]首都大学東京大学院 理工学研究科）

P31　常磁性緩和促進を利用したDNA結合ドメインSTPRの分子ダイナミクスの解析
Molecular dynamics of DNA binding domain STPR proved by paramagnetic relaxation enhancement
○柚原　光佑[1]，神谷　昌克[2]，熊木　康裕[3]，滝谷　重治[3]，菊川　峰志[2]，河野　敬一[2,4]，出村　誠[2]，相沢　智康[2]（[1]北海道大学 生命科学院，[2]北海道大学 先端生命科学研究院，[3]北海道大学 理学研究院，[4]千歳科学技術大学）

P32　ガリウム置換フェレドキシンの結晶構造とPSIおよびFNRとの相互作用解析
NMR analysis of Ga-substituted ferredoxin and its interaction sites with photosystem I and Ferredoxin-NADP$^+$ reductase
○武藤　梨沙，村木　則文，河合（久保田）寿子，長谷　俊治，池上　貴久，栗栖　源嗣（大阪大学 蛋白質研究所）

P33　電気穿孔法を用いたin-cell NMR法の検討
Electroporation of protein transduction to human cells for in-cell NMR
○榎園　能章[1]，猪股　晃介[2]，白川　昌宏[3]，杤尾　豪人[1]（[1]京都大学大学院 理学研究科，[2]理化学研究所，[3]京都大学大学院 工学研究科）

P34　Poly(β-*n*-propyl L-aspartate)のヘリックスセンスと側鎖構造の相関
The correlation between the helix-sense and the side-chain conformation of poly (β-*n*-propyl L-aspartate)

○小林　哲雄[1]，古屋　秀峰[2]，大川　浩作[3]，平沖　敏文[1]（[1]北海道大学大学院 工学院，[2]東工大学大学院 理工学研究科，[3]信州大学 繊維学部）

P35　ポリプロピレン溶液の対流速度の測定
Measurement of convection rate in polypropylene solution

○松原　康史[1,2]（[1]日本ポリケム株式会社 研究開発部，[2]三菱化学株式会社 開発研究所）

P36　Nafionの水アルコール混合溶媒中の分散状態解析への^{19}F-NMRスペクトルおよび高速磁場サイクリングNMR測定の適用
Application of ^{19}F-NMR spectroscopy and fast field cycling NMR for Nafion dispersion in water-alcohol mixtures

○山口　真[1]，松永　拓郎[2]，雨宮　一樹[3]，大平　昭博[1,4]，長谷川　直樹[2]，篠原　和彦[1,5]，安藤雅樹[3]，吉田　利彦[3]（[1]技術研究組合FC-Cubic，[2]豊田中央研究所，[3]トヨタ自動車，[4]産業技術総合研究所，[5]日産自動車）

P37　STD-NMRを用いたα-シクロデキストリンと水分子の相互作用解析
The analysis of interaction between α-Cyclodextrin and water molecules using STD-NMR

○児玉　尚士，中野　隆行，木村　一雄，川口　謙（株式会社 東レリサーチセンター）

P38　多核NMR法による高分子電解質の対イオン結合平衡における疎水性相互作用の観測
Multinuclear NMR studies on the counterion binding to weakly acidic and basic polyelectrolytes by hydrophobic interaction

○牧　秀志，吉田　将喜，成相　裕之，水畑　穣（神戸大学大学院 工学研究科）

P39　同種核REDOR NMR法の新展開
Advanced study for homonuclear REDOR NMR experiments

○鄭　智海[1]，櫻木　隆弘[1]，桑原　大介[2]（[1]電気通信大学 情報理工学研究科，[2]電気通信大学 研究設備センター）

P40 Y1:C　磁場配向微結晶粉末を用いた単結晶NMR測定
Single-crystal NMR measurement by using magnetically oriented microcrystal array

○木全　美香子，久住　亮介，木村　史子，木村　恒久（京都大学大学院 農学研究科）

P41　化学シフト異方性測定に基づくバクテリオロドプシン－周辺脂質の親和性評価
Evaluation of affinity between bacteriorhodopsin and boundary lipid based on chemical shift anisotropy measurement

○梅川　雄一[1,2]，川竹　悟史[1,2]，松岡　茂[1,2]，村田　道雄[1,2]（[1]JST-ERATO脂質活性構造プロジェクト，[2]大阪大学大学院 理学研究科）

P42 Y1:C　磁場配向微結晶試料を用いたセロビオースの単結晶NMR解析
Single-crystal NMR study of ^{13}C chemical shift tensor of cellobiose via magnetically oriented microcrystal array

○宋　広杰[1]，久住　亮介[1]，木村　史子[1]，木村　恒久[1]，出口　健三[2]，大木　忍[2]，藤戸　輝昭[2]，清水　禎[2]（[1]京都大学大学院 農学研究科，[2]物質・材料研究機構）

P43　常磁性金属錯体を用いた固体^{13}C NMR測定におけるサンプル温度の測定
Temperature measurements in solid state ^{13}C NMR by using paramagnetic metal complex

○田中　佑弥[1]，梅川　雄一[2,1]，松森　信明[1]，村田　道雄[1,2]（[1]大阪大学大学院 理学研究科，[2]JST-ERATO脂質活性構造プロジェクト）

P44 Y1:C マイクロ波照射NMRによる液晶分子のマイクロ波高温および高速加熱現象の解明
Analysis of high temperature and fast heating processes of liquid crystalline molecules by microwave irradiation NMR spectroscopy

○田制　侑悟[1]，谷川　文一[1]，川村　出[1]，佐藤　元泰[2]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]中部大学 工学研究科）

P45 光励起三重項電子スピンを用いたDNPによる室温下での偏極率40%の達成
Realization of ^{1}H spin polarization of 40% at room temperature with DNP using photo-excited triplet electron spin

○立石　健一郎[1]，月花　智博[2]，浦田　佳治[2]，西田　辰介[3]，森田　靖[3]，和田　智之[2]，上坂　友洋[1]（[1]理化学研究所 仁科センター，[2]理化学研究所 光量子工学研究領域，[3]愛知工業大学工学部）

P46 Y1:C Measurement of proton chemical shift anisotropy tensors using symmetry-based radio-frequency pulse sequences and ultrafast MAS solid-state NMR spectroscopy

○Manoj Kumar Pandey[1], Michal Malon[1, 2] and Yusuke Nishiyama[1, 2]（[1]CLST NMR Facility, RIKEN, [2]JEOL RESONANCE Inc.）

P47 中性膜に結合したラクトフェランピンの膜結合構造と膜親和性に基づく抗菌活性の解明
Structure and affinity analysis of bovine lactoferrampin bound to neutral model membranes as studied by solid state NMR and QCM

○井町　昌義[1]，堤　敦史[1]，吉良　敦史[2]，川村　出[1]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]株式会社アルバック）

P48 Y1:B 単一細胞あたりの特定タンパク質の分子数計測のための定量固体NMR法の開発
Quantitative solid-state NMR method for counting the number of a protein molecule in a cell

○山田　和哉，江川　文子，藤原　敏道（大阪大学 蛋白質研究所）

P49 ^{13}C固体MAS NMRによるフォボロドプシンの信号伝達機能に重要なTyr残基側鎖の構造変化の解析
Conformational changes of Tyr residue which are which important for signal transduction in phoborhodopsin as studied by solid-state state ^{13}C MAS NMR

○西川　亮汰[1]，川村　出[1]，沖津　貴志[2]，和田　昭盛[2]，須藤　雄気[3]，加茂　直樹[4]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]神戸薬科大学，[3]岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科，[4]北海道大学大学院 生命科学院）

P50 カルシウムイオンを介したPradimicin Aのマンノース 結合機構の固体NMR解析
Solid-state NMR analysis of the Mannose binding structure of Pradimicin A through Ca^{2+} ion

○土井　崇嗣[1]，中川　優[2,3]，橋爪　大輔[4]，伊藤　幸成[3,5]，五十嵐　康弘[6]，竹腰　清乃理[1]（[1]京都大学大学院 理学研究科，[2]名古屋大学大学院 生命農学研究科，[3]理化学研究所，[4]理化学研究所 CEMS，[5]科学技術振興機構 ERATO，[6]富山県立大学 生物工学科）

P51 *In-situ* 光照射-固体NMRによるバクテリオロドプシンY185F変異体の光サイクルとO-中間体の解析
Analysis of O-intermediate in the photocycle of Y185F mutant in Bacteriorhodopsin by *in-situ* photo-irradiation solid-state NMR

○大島　恭介[1]，重田　安里寿[1]，槙野　義輝[1]，川村　出[1]，沖津　貴志[2]，和田　昭盛[2]，辻　暁[3]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]神戸薬科大学，[3]兵庫県立大学大学院 生命理学研究科）

P52 Y1:B ***In situ* 光照射固体NMRによる光受容センサー膜タンパク質 sensory rhodopsin Iの波長依存的な光反応過程の解析**

Color-discriminating photocycle of sensory rhodopsin I as revealed by *in situ* photo irradiation solid-state NMR

○槙野　義輝[1]，四方田　洋樹[1]，友永　雄也[1]，日高　徹朗[1]，川村　出[1]，沖津　貴志[2]，和田　昭盛[2]，須藤　雄気[3]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]神戸薬科大学，[3]岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

P53 **固体NMR REDOR法によるヒトカルシトニンのアミロイド線維構造解析**

Fibril structure of human calcitonin as studied by solid-state NMR

○豊田　修平[1]，Lkhamsuren Ganchimeg[1,2]，Namsrai Javkhlantugs[2]，渡邉（伊藤）ひかり[1]，川村　出[1]，上田　一義[1]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]モンゴル国立大学）

P54 Y1:B **家蚕絹の繊維化後構造と再生医療材料の開発に関するNMR研究**

NMR studies on structure of *Bombyx mori* silk fibroin after spinning and development of silk for biomaterial

○新井　裕喜[1]，大畑　卓也[1]，奥下　慶子[1]，青木　昭宏[1]，Anne S. Ulrich[2]，朝倉　哲郎[1]（[1]東京農工大学大学院 工学府，[2]カールスルーエ大学 生物化学部）

P55 **固体NMRにおける常磁性緩和促進を用いたタンパク質立体構造解析**

Application of paramagnetic relaxation enhancement for protein structure analysis by solid-state NMR

○田巻　初[1]，江川　文子[2]，木戸　浩貴[1]，亀田　倫史[3]，神谷　昌克[1]，菊川　峰志[1]，相沢　智康[1]，藤原　敏道[2]、出村　誠[1]（[1]北海道大学大学院 生命科学院，[2]大阪大学 蛋白質研究所，[3]産業技術総合研究所 ゲノム情報研究センター）

P56 **化石由来生薬「竜骨」の固体NMRによる分析**

Analysis of a crude drug “Longgu” originated from animal fossil by solid- state NMR

○宮久保　圭祐[1,2]，小栗　一輝[3]，高橋　京子[1,3]，上田　貴洋[1,2]（[1]大阪大学 総合学術博物館，[2]大阪大学大学院 理学研究科，[3]大阪大学大学院 薬学研究科）

P57 **超高速^{1}H MAS NMRによる置換ポリアセチレンの固体構造の研究**

Ultra fast ^{1}H MAS NMR studies on polyacetylene derivatives

○平沖　敏文[1]，小林　哲雄[1]，矢澤　宏次[2]，西山　裕介[2]，朝倉　哲郎[3]，西村　勝之[4]，吉田　嘉晃[5]，馬渡　康輝[5]，田畑　昌祥[5]（[1]北海道大学大学院 工学研究院，[2]JEOL RESONANCE，[3]東京農工大学大学院 工学府，[4]分子科学研究所，[5]室蘭工業大学大学院 工学専攻）

P58 Y2:A **水分子のNMRダイナミクス解析を用いた高分子と水の相互作用に関する研究**

NMR dynamics analysis of water molecules for studying interaction between polymer and water molecule

○亀谷　俊輔[1]，岩本　脩成[2]，関根　素馨[1]，グレゴリー　ボウティス[3]，大窪　貴洋[4]，朝倉　哲郎[2]（[1]三井化学分析センター，[2]東京農工大学大学院 工学府，[3]ニューヨーク市立大学シティカレッジ物理，[4]千葉大学大学院 工学研究科）

P59 **カルバメート化ポリアリルアミン／ポリアニオン複合体の分子構造解析**

Molecular structure determination of polymer complex of carbamated poly (allyl amine) and poly (anion)

○両角　悠作，柿下　拓史，前田　史郎（福井大学大学院 工学研究科）

P60 Y1:B **逆ラプラス変換法によるゴム材料のT_2緩和時間分布解析**

The T_2 relaxation distribution of rubber materials estimated by the inverse Laplace transform

○角村　将希[1]，奥下　慶子[2]，大窪　貴洋[3]，浅野　敦志[1]（[1]防衛大学校 応用化学科，[2]東京農工大学大学院 工学研究科，[3]千葉大学大学院 工学研究科）

P61　グアガムを用いた非イオン性ゲルの合成と包摂水のダイナミクス
Nonionic gelation agents prepared from guar gum and the water mobility in the swollen hydrogels
○甲野　裕之[1]，原　英之[2]，尾崎　雅人[1]（[1]国立苫小牧工業高等専門学校 物質工学科，[2]ブルカー・バイオスピン株式会社）

P62　固体^{17}O NMRを用いたアルミノシリケートガラス中の酸素構造解析
～架橋酸素と非架橋酸素～
Solid-state ^{17}O NMR for aluminosilicate glasses ~ bridging and non-bridging oxygen ~
○金橋　康二（新日鐵住金 先端技術研究所）

P63　高分子の合成，架橋反応のパルスNMRによる観測
Observation of synthetic process and cross-link reaction of Polymer by pulse NMR
○原　英之（ブルカー・バイオスピン株式会社）

P64 Y1:B　天然存在比下での^{33}S STMASによるエトリンガイトの研究
A natural abundance ^{33}S STMAS NMR study of ettringite
○佐々木　彬子，Stephen Wimperis（英国グラスゴー大学大学院）

P65　ゼオライトの^{29}Si MAS NMR測定に対するニトロキシラジカルの常磁性緩和効果
Paramagnetic effect of nitroxide radicals on the sensitivity of ^{29}Si MAS NMR measurements of zeolites
○稲垣　怜史，川村　出，窪田　好浩，内藤　晶（横浜国立大学大学院 工学研究院）

P66 Y1:B　固体NMRによるキンヒドロン合成時の固相反応過程の研究
Solid-state NMR on solid-state reaction process of quinhydrone
○伊澤　研一郎，野田　泰斗，竹腰　清乃理（京都大学大学院 理学研究科）

P67　pHを変えて固体化したシステイン保護CdSeナノ粒子の表面状態の固体NMR
Solid-state NMR study of the surface states of cysteine-capped CdSe nanoparticles solidified at various pH values
○栗原　拓也，野田　泰斗，竹腰　清乃理（京都大学大学院 理学研究科）

P68 Y1:B　核磁気共鳴法によるCsの粘土シートへの吸着挙動解析
Solid-state analysis on behavior of adsorption of Cs in clays
○茨城　萌[1]，大窪　貴洋[1]，岩舘　泰彦[1]，出口　健三[2]，大木　忍[2]，清水　禎[2]（[1]千葉大学大学院 工学研究科，[2]物質・材料研究機構）

P69　*in situ* Li NMRによるリチウムイオン電池の過充電状態の解析
In situ solid NMR study for real component lithium ion batteries in overcharge state
○伊塚　美里[1]，後藤　和馬[1]，杉山　照泰[2]，中東　里英[2]，新井　寿一[2]，武田　和行[3]，石田　祐之[1]（[1]岡山大学大学院 自然科学研究科，[2]ヤマハ発動機，[3]京都大学大学院 理学研究科）

P70　温度可変固体NMR測定によるポリエチレングリコール含浸木材の解析
Analysis of impregnating wood with polyethylene glycol by variable temperature solid state NMR
○西田　雅一[1]，田中　智子[1]，兼松　渉[1]，三木　恒久[2]，金山　公三[2]（[1]産業技術総合研究所 計測フロンティア（中部），[2]産業技術総合研究所 サステナブルマテリアル）

P71　固体NMRによる鉄鋼関連材料中のフッ素のキャラクタリゼーション
Solid state NMR characterization of fluorine in steel industry-related materials
○高橋　貴文[1]，金橋　康二[1]，長坂　徹也[2]（[1]新日鐵住金株式会社 先端技術研究所，[2]東北大学大学院 工学研究科 金属フロンティア工学専攻）

P72　炭素系導電性サンプルのMASによる温度上昇の検討
Temperature elevation due to MAS of carbon-based conductive materials
秦　弘一郎[1]，○出田　圭子[2]，戸田　繁美[3]，原田　竜介[3]，持田　勲[4]，尹　聖昊[1,2]，宮脇　仁[1,2]（[1]九州大学 総合理工学府，[2]九州大学 先導物質化学研究所，[3]東海カーボン株式会社，[4]一般財団法人九州環境管理協会）

P73　メソポーラスシリカSBA-16に取り込まれたNaCl水溶液中の水分子のダイナミクスの解析
Analysis of water dynamics near sodium ion in NaCl aqueous solution confined to mesoporous silica SBA-16
○宮東　達也[1]，大橋　竜太郎[1]，井田　朋智[1]，水野　元博[1]，橘高　茂治[2]（[1]金沢大学大学院 自然科学研究科，[2]岡山理科大学 理学部）

P74　アルギン酸-イミダゾール複合体の局所構造とプロトン伝導性
Local structure and proton conductivity in alginic acid-imidazole composite
○近井　琢磨，大橋　竜太郎，井田　朋智，水野　元博（金沢大学大学院 自然科学研究科）

P75　固体インジウムNMRと量子化学計算によるIn-doped ZnOの局所構造解析
Local structural analysis of indium-doped zinc oxide using solid-state indium nuclear magnetic resonance and quantum chemical calculation
○大橋　竜太郎[1]，川村　祐史[1]，宮下　智史[1]，井田　朋智[1]，佐藤　渉[1]，水野　元博[1]，丹所　正孝[2]，清水　禎[2]（[1]金沢大学大学院 自然科学研究科，[2]物質・材料研究機構）

P76 Y1:A　グリーンレーザーを用いたアロディニア特異的な痛み応答に関するfMRI研究
An fMRI study of allodynic pain evoked by green laser stimuli
○杠　直哉[1]，吉永　壮佐[1]，平金　真[1]，木村　一成[1]，岩本　成人[1]，佐藤　博司[1]，寺沢　宏明[1]（[1]熊本大学大学院 生命科学研究部 構造生命イメージング分野，[2]ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部）

P77　固体配向PBLGの構造解析とNMR法による気体拡散性評価
Structural analysis and gas diffusion properties of the solid oriented PBLG
○岩本　純，吉水　広明（名古屋工業大学大学院 工学研究科）

P78 Y1:B　7CB/*n*-heptane二成分液晶における*n*-heptaneの配向性とダイナミクス
Orientation and dynamics of *n*-heptane in 7CB/*n*-heptane system
○熊谷　翼秀，大橋　竜太郎，井田　朋智，水野　元博（金沢大学大学院 自然科学研究科）

P79　気体の収着による液晶性ポリエステルの局所分子運動性変化のNMR法による観察
NMR observations of the local molecular mobility change of liquid crystalline polyester by gas sorption
○山内　雅弘，吉水　広明（名古屋工業大学大学院 工学研究科）

P80　高速磁場サイクリング緩和時間計測の産業応用
Fast field cycling NMR relaxometry: Moving from research towards industrial applications
○拝師　智之（株式会社エム・アール・テクノロジー）

P81　安定同位体標識および多次元NMRメタボロミクスによる植物代謝産物の同定
Identification of plant-specific metabolites by multi-dimensional NMR metabolomics with a stable isotope labeling technique

○小松　功典[1,2]，大石　梨紗[1]，篠　阿弥宇[2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[2]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P82　データ駆動型アプローチによる日本近海の多様な水産資源評価
Evaluation of diverse marine resources in Japanese coastal waters by data driven approach

○福地　実[1]，朝倉　大河[1,2]，伊達　康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[2]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム，[4]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P83　生活環境の変動を特徴づける非線形解析手法の検討
Nonlinear analysis for characterizing fluctuation caused by living environments

○塩川　由佳[1]，三澤　拓真[1]，伊達　康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[2]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム，[4]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P84　環境変動の特徴を底泥や魚類試料から捉えるデータマイニング法の検討
Data mining for characterizations of environmental changes from fishes and sediments

○朝倉　大河[1,2]，小倉　立己[1,2]，伊達　康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[2]独立行政法人理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]独立行政法人理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム，[4]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P85　MagRO-NMRView, FLYAによる高度に自動化されたNMRデータ解析
Highly automated analysis of NMR data using MagRO-NMRView and FLYA

○小林　直宏[1]，Bikash Ranjan Sahoo[1]，永田　崇[2]，服部　良一[1]，Elena Schmidt[3]，Peter Güntert[3,4]，児嶋　長次郎[1]，藤原　敏道[1]（[1]大阪大学 蛋白質研究所，[2]京都大学 エネルギー理工学研究所，[3]Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University，[4]首都大学東京 理工学部）

P86 Y1:C　高速高磁場DNP効率シミュレーション計算
Fast calculation of solid-state DNP effectiveness under magic-angle spinning

○深澤　隼，藤原　敏道，松木　陽（大阪大学 蛋白質研究所）

P87　BMRB/XML and BMRB/RDF: common open representations of BMRB NMR-STAR data

○横地　政志[1]，小林　直宏[1]，岩田　武史[1]，高橋　あみ[1]，Eldon L. Ulrich[2]，Yannis E. Ioannidis[3]，Miron Livny[4]，John L. Markley[2]，金城　玲[1]，中村　春木[1]，児嶋　長次郎[1]，藤原　敏道[1]（[1]大阪大学 蛋白質研究所，[2]University of Wisconsin-Madison, Biochemistry，[3]University of Athens, Informatics & Telecommunications，[4]University of Wisconsin-Madison, Computer Sciences）

P88 Y1:C　指数窓によるCS法のNMRスペクトル復元精度の改善
To improve accuracy reconstructed the NMR spectrum with the compressed sensing using the exponential window

○田中　勇帆[1]，中尾　朋喜[1]，濱津　順平[2]，泉　顕也[2]，古川　利博[1]（[1]東京理科大学 工学研究科，[2]株式会社 JEOL RESONANCE）

P89　ベイズ推定を利用したNMR蛋白質構造最適化法の開発
A refinement method for NMR protein structure determination based on Bayesian inference

○池谷　鉄兵[1,2]，伊藤　隆[1]，Peter Güntert[1,2]（[1]首都大学東京大学院 理工学研究科，[2]Goethe University Frankfurt・Institute of Biophysical Chemistry）

P90 Y1:A グラフ・ネットワーク理論による代謝混合物の未知シグナル帰属支援
Supporting for assignment of unknown metabolites signals by graph and network theory

○伊藤　研悟[1,2]，小松　功典[1,2]，伊達　康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[2]独立行政法人理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]独立行政法人理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム，[4]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P91　多核対応型クライオコイルMASプローブによるNMR感度向上
Sensitivity enhancement of a tunable single-tuned cryocoil MAS-NMR probe

○水野　敬[1]，戸田　充[1]，藤岡　耕治[2]，竹腰　清乃理[3]（[1]株式会社JEOL RESONANCE，[2]株式会社クライオウェア，[3]京都大学大学院 理学研究科）

P92 Y1:C 汎用デジタル機器とArduino Dueを用いたデジタルMRIシステムの開発
Development of a digital MRI system using general purpose digital units and board computers “Arduino Due”

○津田　真人，玉田　大輝，寺田　康彦，巨瀬　勝美（筑波大学大学院 数理物質科学研究科）

P93　水素吸蔵コバルトにおけるゼロ磁場^{1}H NMR信号の探索
A search for zero-field ^{1}H NMR signals in hydrogen absorbed cobalt

○佐竹　晋太朗，竹腰　清乃理，野田　泰斗，武田　和行（京都大学大学院 理学研究科）

P94 Y1:C ダイヤモンドスピンを用いた生体内ジャイロセンシング技術の開発
Nanoscale gyroscope for measurements of cellular dynamics *in vivo* using diamond spins

○久美屋　雄太[1]，五十嵐　龍治[1]，杉　拓磨[2,3]，外間　進悟[1]，杤尾　豪人[1]，吉成　洋祐[2]，原田　慶恵[2]，白川　昌宏[1,2]（[1]京都大学大学院 工学研究科，[2]京都大学 物質-細胞統合システム拠点，[3]科学技術振興機構 さきがけ）

P95　Thermal stability of acyl carrier protein from *Escherichia coli* and its metal binding sites

○Min-cheol Jeong, YoungGeun Park, Hee-sang Song, Ki-woong Jeong, Yangmee Kim（Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University）

P96 Y1:A エリ蚕絹を用いた再生医療材料開発のためのNMR構造解析
NMR structure analysis of *S.c.ricini* silk fibroin for tissue engineering

○河西　秀和[1]，鈴木　悠[2]，山崎　俊正[3]，齊藤　準[4]，朝倉　哲郎[1]（[1]東京農工大学大学院 工学府，[2]福井大学テニュアトラック推進本部，[3]農業生物資源研究所，[4]京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科）

P97　Solution structure and backbone dynamics of the cold shock protein from thermophilic bacterium, *Thermus aquaticus*

○Bonghwan Jin, Ki-Woong Jeong, Yangmee Kim（Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University）

P98　Structure and dynamics of *Enterococcus faecalis* acyl carrier protein

○Young-Geun Park, Mincheol Jeong, Ki-woong Jeong, Yangmee Kim（Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University）

P99　Backbone resonance assignment and thermal stabilities of angiogenin and its mutnats

○Hyun-Sung Park, Young-Guen Park, Yangmee Kim（Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University）

P100　The characteristic hinge region in a hybrid antimicrobial peptide, PapMA-P2, and its peptoid analogs

○Areum Shin, Eunjung Lee, Yangmee Kim（Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University）

第一日目
11月4日（火）
日本語／英語セッション

Day 1（Nov. 4, Tue）
（Japanese/English Sessions）

L1-1

Dynamic nuclear polarisation enhanced solid-state NMR spectroscopy and magnetic resonance force microscopy for structural biology

Hiroki Takahashi[1,2], Brad Moores[1], Romana Schirhagl[1], Daniel Lee[2], Jean-Pierre Simorre[3], Michel Bardet[2], Sabine Hediger[2], Gaël De Paëpe[2] and Christian Degen[1]

[1]*Department of Physics, ETH Zurich, Zurich, Switzerland.*

[2]*Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologique, UMR-E3 (CEA/UJF) and CNRS, INAC, CEA, Grenoble, France.*

[3]*Institut de Biologie Structurale, UMR 5075, Grenoble, France.*

Low sensitivity is always a central concern in the NMR community and a number of techniques have been developed to improve the sensitivity of NMR. In particular, thanks to the recent instrumental and theoretical advances such as the developments of high-power / high-frequency microwave sources, low temperature magic-angle spinning probes and polarising agents, high-field magic-angle spinning dynamic nuclear polarisation (MAS-DNP) has been recently developed. It has been proven to be a powerful technique to enhance the sensitivity of solid-state NMR in many different types of systems from inorganic materials to biological systems. MAS-DNP has great potential to tackle challenging tasks and we have recently demonstrated rapid natural-abundance ^{13}C–^{13}C correlation NMR on biomolecules and "on-cell" NMR using DNP-enhanced solid-state NMR.

In MAS-DNP experiments, systems of interest are usually dissolved or suspended in glass-forming matrices doped with polarising agents (e.g. TOTAPOL) and measured at low temperature (< 100 K). Glassy matrices distribute polarising agents uniformly around the sample of interest at low temperature. However, MAS-DNP often faces the obstacles of line-broadening and reduction of effective sample weight owing to the use of such frozen glassy DNP-matrices and thus application of MAS-DNP is not always straightforward. In order to successfully perform MAS-DNP experiments, we have demonstrated matrix-free DNP [1, 2]. This utilises a binding affinity of polarising agents, clearly evidenced during the on-cell MAS-DNP studies below. We have obtained very encouraging results where only 20 minutes were sufficient to record natural-abundance 2D ^{13}C–^{13}C correlation experiments on cellulose (Fig.

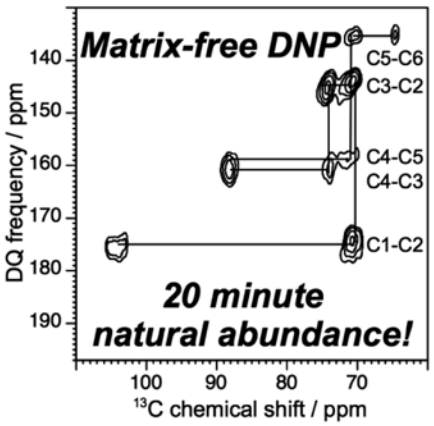


Fig. 1. A DNP-enhanced 2D DQ–SQ ^{13}C–^{13}C dipolar correlation spectrum of cellulose at natural ^{13}C abundance.

Solid-state NMR, Dynamic nuclear polarization, Magnetic resonance force microscopy

1) [1]. Furthermore, technologically interesting self-assembled peptide nanotubes were also studied in this manner [3] - which would have required two “Saturn-years” using conventional solid-state NMR. Importantly, intermolecular constraints were obtained for the peptide nanotubes, which demonstrates the feasibility of supramolecular structure determination of such nano-assemblies at natural isotopic abundance.

DNP-enhanced solid-state NMR also makes it possible to study structures of molecules in whole cells, the concentration of which is too low for conventional solid-state NMR. We have developed a new technique to selectively enhance the sensitivity and improve the resolution of surface signals using MAS-DNP and demonstrated “on-cell” NMR to study cell-wall structures of bacterial cells [4]. This technique will be a great investigation tool for “on-cell” studies.

Though above hyperpolarisation technique will allow one to reduce the sample amount dramatically, conventional NMR still requires > 10^{10} molecules for measurements. Magnetic resonance force microscopy (MRFM) which utilises force detection instead of traditional inductive detection has been emerging as a promising technique to study structures of single nano-objects such as large molecular complexes and virus particles (Fig. 2) [5]. We will present our approach towards structural biology using MRFM, including the use of isotopic labelling for regional image contrast. We will also discuss potential target systems such as membrane proteins embedded in lipid bilayers.

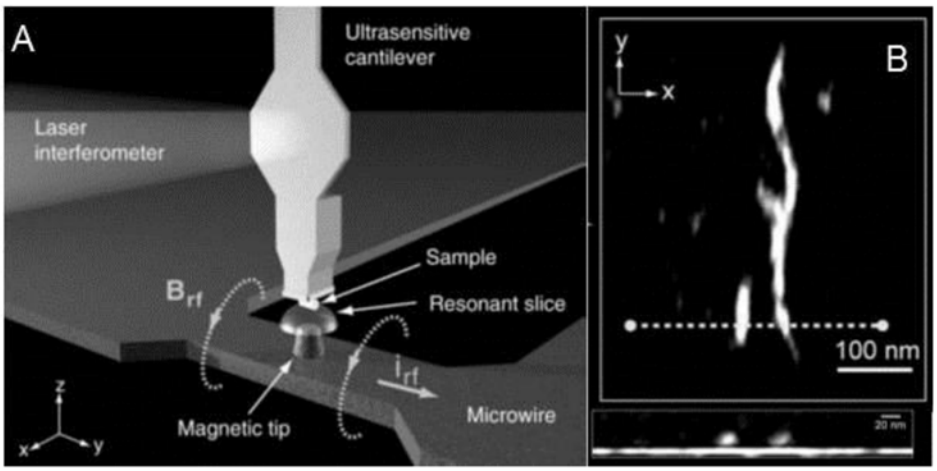


Fig. 2. A: Basic principle of MRFM. B: 3D images of virus particles at a spatial resolution of about 5 nm.

[1] H. Takahashi, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 11766–11769. [2] H. Takahashi, et al. *Chem. Commun.* 2013, 49, 9479–9481. [3] H. Takahashi, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 6979–6982. [4] H. Takahashi, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 5105–5110. [5] C. L. Degen, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009, 106, 1313–1317.

L1-2

多孔質機能性物質の1粒子分析：超偏極^{129}Xeを利用した1粒子スペクトロスコピーと1粒子イメージング

○藤原英明[1], 今井宏彦[2, 1], 武田和行[3], 木村敦臣[1]
[1]大阪大学大学院・医学系研究科
[2]京都大学大学院・情報学研究科
[3]京都大学大学院・理学研究科

Single particle analysis of porous functional materials: ^{129}Xe single particle spectroscopy and imaging utilizing hyperpolarized gas

○Hideaki Fujiwara[1], Hirohiko Imai[2, 1], Kazuyuki Takeda[3], and Atsuomi Kimura[1]
[1] Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan.
[2]Graduate School of Informatics, Kyoto University, Kyoto, Japan.
[3]Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Hyperpolarized ^{129}Xe gas can provide extraordinary enhanced NMR signals, and hence it will be able to promote advanced studies in materials science as well as medical diagnosis. Here, porous functional materials such as zeolites or other organic nano-compounds are considered as targets of application for the hyperpolarized gas, and applicability is tested for a single particle imaging using our homebuilt continuous-flow hyperpolarizer. Our apparatus can provide hyperpolarized ^{129}Xe gas in high Xe content without using buffer gas such as helium. Single particle imaging was successfully observed for 9-14 mesh F9 zeolam (TOSOH Corp.) with an Agilent UNITY INOVA 400WB NMR/MRI system. The sample was located in a $\phi 3 \times 6$ solenoid coil inserted in DOTY Gradient Probe DSI-1117. Elaborated images are now attempted to get fine information.

【序】ゼオライトのような多孔質微粒子は、優れた吸着や触媒特性あるいはその優れた選択性の故に、種々の機能材料として用途が広がっている。NMRがこのような機能材料のキャラクタリゼーションに有効に利用できることは、^{129}Xe NMRのゼオライトへの適用が1980年代（伊藤・Fraissardほか）より広く行われたことからもうかがえる。最近の超偏極技術により^{129}Xe NMRの感度が５桁程度まで向上すること、および２次元NMRのような最新測定法の普及などから、^{129}Xe NMRのこの方面での利用が飛躍的に進むと期待できる。

我々は超偏極希ガス生成供給装置の開発と小動物の生体計測（イメージング）や種々の機能性材料の特性評価への適用を行っている。[1, 2)] 今回は最近のミニプローブ（マイクロプローブ）の発展を採り入れるべく、１粒子イメージングの適用性を検討することとした。

【実験】NMR/MRI測定装置はAgilent UNITY INOVA 400WB(9.4T, ^{129}Xe: 111.2MHz)を用い、ミニプローブとしてコイル（$\varphi 3_{id} \times 6$）を装着した検出系（自作）をDOTY Gradient Probe DSI-1117内に設置し、試料はコイル内を通る高分子チューブ内に置いた。

超偏極^{129}Xe、多孔質微粒子、１粒子イメージング

○ふじわら ひであき，いまい ひろひこ、たけだ かずゆき、きむら あつおみ

超偏極装置（自作）から連続的に供給される偏極ガス（Xe70%+$N_2$30%）をチューブ内に45mL/分程度で流しつつ測定した。試料として、東ソー（株）ゼオラムA5(9-14メッシュ)，F9(4-8メッシュ)、及び東レ（株）HalosorbⅡ（ペレット状φ1、長さ1-3mm）を300℃で3時間以上加熱精製して用いた。MRI撮像には高速のb-SSFP法を利用した。

【結果と考察】

ゼオライトに吸着した^{129}Xeのピークはおよそ50～200ppmの間に現れる。従って、9.4 Tの高磁場ではガスピークと吸着ピークの分離は十分であり、ガス相画像のアーチファクトを含まない吸着相画像を容易に得ることができる。ゼオラムF9の例を図１と図２に示す。ソレノイド型検出コイルは水平に設置され(静磁場に対して垂直)φ1.3～1.8の粒子4個を水平に並べた。図２では3個とその間に挟まれた小さい1個を確認できる。図３にはHalosorbⅡ（1粒、約φ1×3）の吸着相画像を示した。これはペレット状で少し湾曲しており、その様子が確認できる。

今後、さらに、傾斜磁場を上げてFOVを下げ、位相エンコード数を上げ、積算回数を上げ、流速の調整や撮像法の工夫によれば、さらに画像の精緻化が計られるはずである。

【結論】

我々の超偏極^{129}Xe生成供給装置は、高濃度のXeガスをオンラインで連続供給でき、試料に対し安定した入力信号を供給できる点で特徴的であり、今回のような材料科学的な応用にも広く適用性があると期待できる。

超偏極^{129}Xe MRIは顆粒や微粒子等の１粒子イメージングを行うことにより個々の粒子の分布状況が得られることから、将来的には気道内分布のような多孔質微粒子（医薬品関係）の体内動態の観察に有用と考えられる。

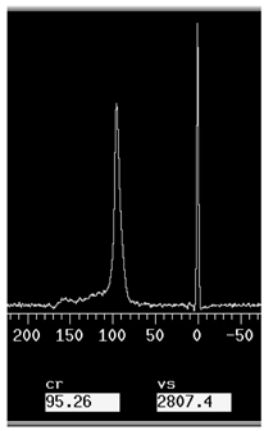


Fig.1 ^{129}Xe NMR Spectrum. F9 (4particles)

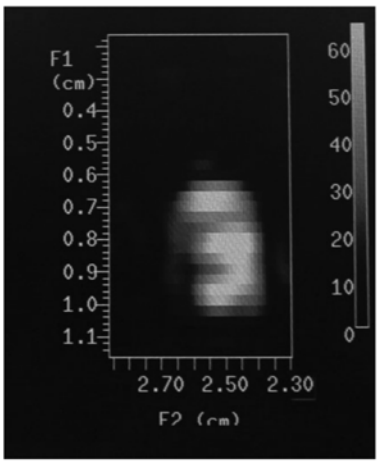


Fig.2 ^{129}Xe Adsorbed-Phase Image. F9 (4particles)

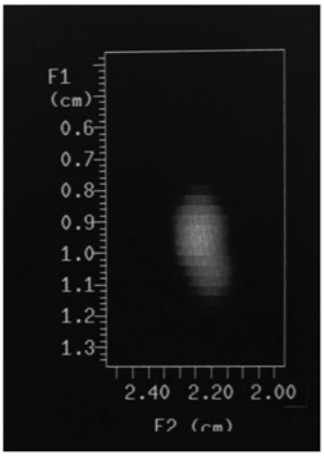


Fig.3 ^{129}Xe Adsorbed -Phase Image. HalosorbII(φ 1×3).

【文献】

1) H. Imai, A. Kimura, and H. Fujiwara, *Anal. Sci.*, **30**, 157-166 (2014).

2) A. Kimura, H. Imai, and H. Fujiwara, in *"Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance"*, ed. E. Brunner and T. Meersmann, Chap. 2.6, Royal Society of Chemistry, London, in press (2014).

L1-3

パイ共役系高分子の分子ダイナミクス計測と生体模倣型信号処理デバイスへの応用

群大院理工 ○ 浅川 直紀, 梅村　香一郎, 藤瀬　晋也,
大野　雄太, 福田　國統
JEOL RESONANCE, Inc. 矢澤　宏次
物材機構 清水　禎, 丹所　正孝
阪大産研 神吉　輝夫, 田中　秀和

Molecular dynamics of π-conjugated polymers and application to bioinspired signal processing devices

Naoki Asakawa,[1] Koichiro Umemura,[1] Shinya Fujise,[1] Yuta Ohno,[1] Koji Yazawa,[2] Tadashi Shimizu,[3] Masataka Tansho,[3] Teruo Kanki,[4] and Hidekazu Tanaka[4]
[1] *Molecular Science Division, Faculty of Science and Technology, Gunma Univ.,*
[2] *JEOL RESONANCE, Inc.,*
[3] *National Institute for Materials Science,*
[4] *Institute of Scientic and Industrial Research, Osaka Univ.*

Abstract: Stochastic threshold devices using trap-filling transition coupled with molecular dynamics in regioregular poly(3-decylthiophene)s [RR-P3DTs] were fabricated as potential key devices for noise-driven bioinspired sensors and signal/information processing devices. The dynamics of the order-disorder phase transition (ODT) for powder samples of RR-P3DT were investigated by differential scanning calorimetry (DSC) measurements and high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy, and the correlation of molecular structure/dynamics with electric properties was discussed.

緒言

近年、膜タンパク質、細胞、組織、組織間、個体といった生体の様々な階層において、ノイズが生体機能の向上に積極的に用いられていることが明らかとなってきた。この機能の一部には「確率共鳴」と呼ばれる現象が観測されている。最近、我々は確率共鳴現象を示す基本素子を多数接続しネットワーク化することにより、環境情報を基にシステムの状態を自律的に変化させるデバイスの設計指針を打ち立てた[1–5]。その設計にとって重要な性質は、「ノイズ発生」、「非線形外場応答性」、「信号の入出力分離」、「素子間結合強度の動的変調」であり、「確率的閾値素子」が基本素子となる。

高分子物質の多くは大きな構造ゆらぎをもつことから不安定な電気物性を示すため、エレクトロニクスのアクティブ材料としては敬遠されてきた。しかし、生体型情報処理デバイスの基本素子である

キーワード: 生体模倣型エレクトロニクスデバイス, パイ共役系高分子, 分子ダイナミクス
あさかわなおき, うめむらこういちろう, ふじせしんや, おおのゆうた, ふくだくにと, やざわこうじ, しみずただし, たんしょまさたか, かんきてるお, たなかひでかず

「確率的閾値素子」にはそのような不安定性こそが重要な要素となる。現在我々の研究室では、いくつかの物質系を用いて確率的閾値素子の作製を行っている。閾値がゆらいだ非線形外場応答性を有するパイ共役系高分子[6]や低融点のバイオベースポリマー[7]に着目し、その電気物性ゆらぎを用いた確率的閾値素子の開発およびその素子集団の協同的ダイナミクスを発生・制御し、超低消費電力の生体型信号情報処理デバイスの実現を目指している。本発表では、パイ共役系高分子である構造様式制御型ポリ (3-アルキルチオフェン)[P3AT] の我々の研究について報告する。[8–16]

結果・考察

温度可変電気伝導度測定や交流インピーダンス測定から、Au/RR-P3DT/Au 縦型素子には、複数の伝導状態が存在し、それらの状態間の準確率的な遷移が観測された。この準確率的な遷移は、空間電荷制限伝導 (SCLC) における電荷キャリアのトラップ充填転移 (TFT) 付近で頻繁に観測された。また、この TFT のオンセット電圧を V_{TFT} とすると、室温でのノイズ測定から、$V < V_{\mathrm{TFT}} = 10\mathrm{V}$ の条件では、ω^{-2} の Debye 型のスペクトル密度をもつノイズの発生が観測され、$V > V_{\mathrm{TFT}}$ の条件では、緩和時間に大きな分布が存在する場合に観測される ω^{-1} 型のノイズの発生が観測された。さらに、V_{onset} 値を温度変化を観測したところ、DSC 測定や固体 NMR 化学シフト (Fig.1) によって観測された側鎖および主鎖のそれぞれの相転移点と相関があることがわかった。このことから、Au/P3DT/Au 素子の準確率的な挙動は、P3DT の分子ダイナミクス物性変化影響を及ぼしていることが明らかとなった。このような P3DT の挙動は、P3HT を用いた素子よりも顕著であった。P3DT では、チオフェン環のねじれ運動に伴う深いトラップのトラップ密度の時間ゆらぎが P3HT の時間ゆらぎよりも大きいことが原因ではないかと推測される。以上の実験結果より、Au/P3DT/Au 縦型素子は確率的閾値素子としての利用が期待される。[6]

謝辞: 本研究の一部は科研費新学術領域「生物規範工学」公募研究 (25120505) および物質・デバイス領域共同研究拠点における共同研究 (2013333) よって遂行された。

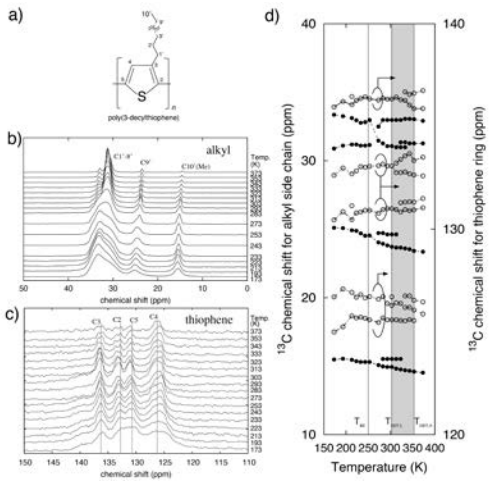


Figure 1: Chemical structure of P3DT and temperature variation of 100MHz ^{13}C CPMAS NMR spectra and ^{13}C isotropic chemical shift for P3DT.

Ref.: 1) Asakawa et al., *Phys.Rev.E*, **79**, 021902 (2009); 2) Hotta et al., *Appl.Phys.Exp.*, **1**, 088002 (2008); 3) Asakawa et al., *ACS Symp.Ser.:"NMR Spec. of Polym.:Innovative NMR Strategies for Complex Macromolecular Systems."*, 161-178(2011); 4) Kanki et al., *Appl.Phys.Lett.*, **96**, 242108(2010); 5) 浅川, 化学と教育, **61**, 396-397(2013); 6) Asakawa et al., *J.Nanophoton.*, **8**, 083077(2014); 7) Maruyama and Asakawa, *J.Phys.D:Appl.Phys.*, **47**, 365402(2014); 8) Asakawa et al., *Polym.J.*, **44**, 855(2012); 9) Yazawa et al., *J.Phys.Chem.*, **B114**, 1241(2010); 10) Yazawa et al., *J.Phys.Chem.*, **B112**, 11580(2008); 11) S.Mori et al., *Polymer J.*, **40**, 475(2008); 12) Yazawa et al, *Phys.Rev.B*, **74**, 241(2006); 13) Mori et al., *Phys.Rev.B*, **71**, 054205(2005); 14) Asakawa et al., *J.Mole.Struct.*, **602-603**, 455(2002); 15) 矢澤, 浅川, 高分子論文集, **68**,11-23(2011); 16) 浅川, 高分子加工, **53**,552-559(2004)

L1-4 高温超伝導バルク磁石と高次シムコイルを用いた高分解能NMR/MRIの実現

○玉田大輝[1, 2, 3]，巨瀬勝美[1]，柳陽介[4]，伊藤佳孝[4]，仲村高志[3]
[1]筑波大学大学院　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 [3]理化学研究所
[4](株)イムラ材料開発研究所

High Resolution NMR/MRI Using a High Tc Bulk Superconducting Magnet with a Higher-order Shim Coil

○Daiki Tamada[1, 2, 3], Katsumi Kose[1], Yosuke Yanagi[4], Yoshitaka Itoh[4], and Takashi Nakamura[3]
[1] Institute of Applied Physics, University of Tsukuba. [2] Research fellow (DC2) of JSPS
[3] RIKEN .[4] IMURA MATERIAL R&D CO., LTD.

A high resolution NMR/MRI using a high critical temperature bulk superconducting magnet with a higher-order shim coil has been achieved in this study. The bulk magnet can produce strong and stable magnetic field without liquid cryogen. However, the field inhomogeneity, caused by crystal imperfections and susceptibility distribution of the material, leads resolution degradation in NMR. To improve the homogeneity, we developed a single layer shim coil for the bulk magnet using the finite difference method.

高温超伝導バルク磁石は，従来のNMR用磁石と同様，強力で安定した静磁場を生成することができる[1]．これに加えて，液体寒剤を用いずに冷凍機のみで超伝導状態の維持が可能であるといった利点を有している．しかしながら，バルク磁石のNMR/MRIへの応用に関しては，静磁場均一性の不足及び，マイスナー効果による勾配磁場・シムコイル磁場の遮蔽といった問題が存在する[2]．これらの問題を解決するために，我々は，磁石構造の最適化によってこれらの問題を改善する手法を提案した[3]． 提案手法によって，大幅な改善が達成されたものの，さらなる高分解能NMR/MRIの実現のためには，より均一な静磁場が必要である．そこで，本研究においては，マイスナー効果を考慮したシムコイルを開発し，磁石の静磁場均一化を目指した．

本研究で用いたMRIシステムは，バルク磁石（磁場強度4.74 T，RTボア径23 mm），MRIコンソール，RFコイル，勾配磁場コイル及びシムコイルから構成されている．

シムコイルのパターンは，ターゲットフィールド法[4]を用いて設計した．まず，n×mの格子状に並べられた矩形電流$I_{i,j}$の基底が生成する磁場分布を算出した．次に，これらの磁場分布が目的のシム磁場を生成するような係数$c_{i,j}$を，重みつき最小二乗法を用いて決定した．このときのシムコイルの$\boldsymbol{J}$は以下の式で表すことができる．

$$J = \sum_{i,j} c_{i,j} I_{i,j} \quad (1)$$

ここで，$\boldsymbol{J}$はコイル電流密度分布，$\boldsymbol{\mu}$は透磁率，$\boldsymbol{R_1}$と$\boldsymbol{R_2}$はそれぞれ超伝導体の内径と外形である．このとき，バルク磁石室温ボア内部の磁場分布計算に有限差分法を用いた．

高温超伝導，MRI
○たまだだいき，こせかつみ，やなぎようすけ，いとうよしたか，なかむらたかし

計算領域内に超伝導体を含む場合の磁場分布計算を行うために，ディリクレ境界条件付きのMaxwell方程式を計算した．超伝導体の内部においては，磁束$\boldsymbol{B}$が常にゼロという境界条件を適用する必要がある．また，超伝導体がロンドン侵入長よりも十分厚い場合，ベクトルポテンシャル$\boldsymbol{A}$ も超伝導体内において常にゼロである．よって，Maxwell方程式は，以下のように書くことができる．

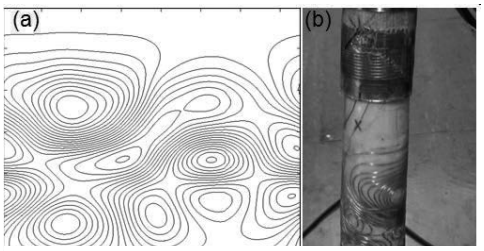


Fig.1 (a) The winding pattern for the shim coil. (b) The fabricated shim coil

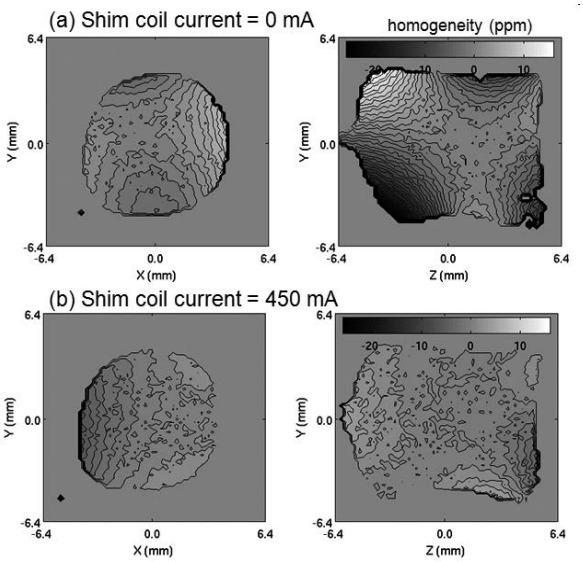
$$\begin{cases} \nabla^2 \mathbf{A} = -\mu \mathbf{J} \\ \mathbf{A}(R_1 < r < R_2) = \mathbf{0} \\ \mathbf{B}(R_1 < r < R_2) = \mathbf{0} \end{cases} \qquad (2)$$

SOR法を用いて式(2)を解き，ベクトルポテンシャルから磁場分布を算出した．最後に，流れ関数法[4]を用いて，最適化した電流密度分布を離散化した．

シムコイルは，直径0.2 mmの被覆銅線を用いて，巻き線パターン(図1(a))を円筒(直径19 mm)上に配置することで製作した．シムコイルは，勾配磁場コイルの内側に設置した（図1(b)）．

シムコイルの性能を確認するために，NMR用10 mm試験管に入った硫酸銅水溶液と位相シフト法を用いて静磁場分布を計測した．撮像には3DSEシーケンス（TR/TE=70/10 ms, matrix size = 64^3, FOV = mm, echo shift time = 0.3 ms, FOV = (12.8 mm)^3）を用いた．静磁場の評価範囲は，ϕ8 mm×長さ10 mmとした．さらに，8mm管に入った硫酸銅水溶液と90度パルスを用いてFID信号を取得し，共鳴線幅を評価した．

図2は本実験で得られた磁場分布である．バルク磁石の静磁場均一性を計測したところ，計測範囲内で44.5 ppm(PP値)であった．また，共鳴線幅は1.57 ppmであった．本研究で開発したシムコイルをバルク磁石に実装し，約450mAの電流を印加したところ，静磁場分布は14.0 ppmにまで改善した．共鳴線幅も0.55 ppmにまで改善した．また，図2より，画像歪みも改善したことがわかる．



シミングによって，静磁場の均一性を改善し，スペクトルの分解能を向上させることに成功した．今後は，さらなるスペクトル分解能を達成するために，バルク用スピニング装置等を開発する予定である．

【参考文献】[1] Ogawa, K., et. al. (2011), [2] Tamada, D., et. al.(2013) , Physica C, 492, 174-177.Appl. Phys. Lett., 98(23), 234101. [3]玉田大輝他，第52回NMR討論会,P62 [4] Liu, W,, et al., J. Phys. D: Appl. Phys. 40.15 (2007): 4418.

L1-5

$^{6/7}$Li固体NMRを用いたコバルト酸リチウムの欠陥部位の構造解析

○村上美和[1],野田泰斗[2],小山幸典[1],竹腰清乃理[2],荒井創[1],内本喜晴[3],小久見善八[1]
[1]京大・産連本部、[2]京大院・理、[3]京大院・人環

Local Structure at Defect in Lithium Overstoichiometric $LiCoO_2$ as Studied by $^{6/7}$Li Solid-State NMR

○Miwa Murakami[1], Yasuto Noda[2], Yukinori Koyama[1], Kiyonori Takegoshi[2], Hajime Arai[1], Yoshiharu Uchimoto[3], Zempachi Ogum[1]
[1]*Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University, Kyoto, Japan.*
[2]*Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.*
[3]*Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

Lithium-overstoichiometric Li_xCoO_2 ($x > 1$) with few phase transitions is promising as a positive electrode material for lithium ion batteries, however, the detailed lithium local structures around excess Li ions remain unknown and need to be elucidated. In this study, we apply solid-state $^{6/7}$Li MAS NMR and show that there are five "major" minor signals at ca. -16, -6, 3, 185, and 1100 ppm with the intensity ratio of 2:4:4:2:0.5~1.0, in addition to the major signal at 0 ppm. Further, the 2D dipolar-correlation and the rotational-resonance recoupling experiments give us distance information among Li ions around the paramagnetic Co ion in Li_xCoO_2 ($x > 1$). With the distance information, we examine the assignment of the minor signals to Li sites at three possible defect models.

リチウムイオン電池の正極材料であるコバルト酸リチウムは、通常、化学量論以上のリチウムを含むため、その$^{6/7}$Li MAS NMRスペクトルには、0 ppm付近のメインの信号の他に複数のマイナー信号が観測される[1]。過剰のリチウムはコバルトサイトに入り、電荷補償のため酸素欠陥が生成してコバルトの価数が変化するとされているが、その構造は決定されていない上、コバルトのスピン状態は2価の低スピンと3価の中間スピン状態の2つが提唱されている（Fig.1）。本研究では、この過剰リチウムによるコバルト酸リチウムの欠陥構造を解析した[2]。

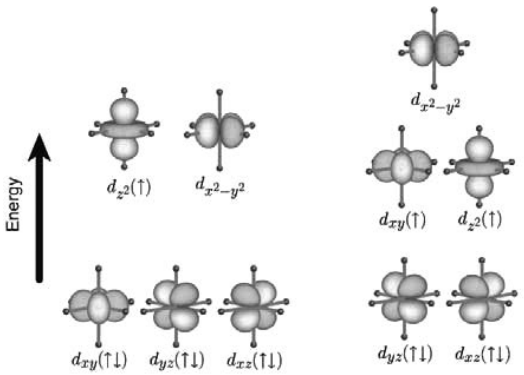


Fig. 1 Schematical representation of the electron configuration and energy diagram of the Co ion; low spin state of Co^{2+} (left) and intermediate spin state of Co^{3+} (right).

コバルト酸リチウム，２次元同種核相関法，回転共鳴法

○むらかみみわ，のだやすと，こやまゆきのり，たけごしきよのり，あらいはじめ，うちもとよしはる，おぐみぜんぱち

我々は主なマイナー信号として、-16 ppm (peak-a), -6 ppm (peak-b), 3 ppm (peak-c), 185 ppm (peak-d), および 1100 ppm (peak-e)の5つの信号に着目した。これらの強度比は2:4:4:2:0.5~1.0であった。まず、化学シフトの温度依存性と^{6}Liの緩和時間解析から、これらのマイナー信号の化学シフトが常磁性によるものであることを確認した。特にpeak-eはその影響が大きいと考えられる。

次に、信号間の距離情報を得るために、2次元相関法を検討した。交換時間500 msのEXSYではメインの信号と0 ppm付近のマイナー信号間のクロスピークを観測できたが、マイナー信号間のクロスピークは観測されなかった。これはマイナー信号の緩和時間が短いためと考えた。そこでHORRORとRFDRを検討した結果、RFDRが効果的であり、0 ppm付近のマイナー信号間のクロスピークを観測することができた（Fig.2）。この結果からpeak-a, b, cとメイン信号(Fig.2中のM)に相当するリチウムはほぼ同じ距離にあると結論した。

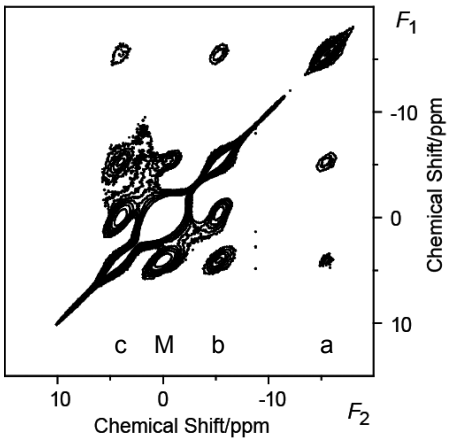


Fig.2 ^{7}Li-^{7}Li 2D-RFDR spectra of Li_xCoO_2 (x>1) taken at 14 T with the mixing time of 2.67 ms. The MAS frequency was 30 kHz.

peak-dの信号についてはオフセット効果から2次元法の適用は難しいと考え、回転共鳴法を適用した。回転周波数と化学シフト差が等しい回転共鳴条件では、MASで消えていた^{7}Li-^{7}Li双極子相互作用が再導入されるために線形のブロードニングが起こり、信号の高さが小さくなる。Fig.3に回転共鳴実験の結果を示す。各信号の回転共鳴条件で信号高さが小さくなり、その度合いはpeak-aが最も大きいことが分かる。この結果からdはaに近く、b,cの順番に遠くなることが分かった。一方、peak-eについては、信号強度が低く、T_1、T_2も小さいことから距離情報を得るのは困難であった。

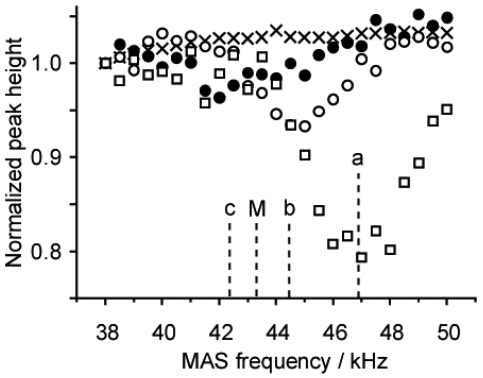


Fig.3 The MAS frequency dependence of the peak height of the major peak (cross), peak-a (square), peak-b (open circle), and peak-c (filled circle) taken at 14 T. The vertical dotted lines labeled by a, b, M, and c indicate the MAS frequency fulfilling the rotational-resonance condition for peak-a, peak-b, the major peak, and peak-c, respectively.

当日は、これらの検討から得られた距離情報、信号強度比、化学シフトなどを基に、これまでに提唱されている欠陥部位のコバルトのスピン状態を仮定した構造モデルを検討した結果についても紹介する。

Reference

1. S. Levasseur et al., *Solid State Ionics*, 128 (2000) 11.
2. M. Murakami et al., *J. Phys. Chem.* C, 118 (2014) 15375.

謝辞：本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)、革新型蓄電池先端科学基礎研究事業(RISING)の下で実施された。

L1-6

多成分脂質膜のCSA測定

○松岡 茂[1,2], 梅川雄一[1,2], 村田道雄[1,2]
[1]阪大院理
[2]JST-ERATO

CSA measurement of multi-component lipid membrane by centerband-only analysis of spin echo.

○Shigeru Matsuoka[1, 2], Yuichi Umegawa[1, 2], and Michio Murata[1, 2]
[1]Gracuate School of Science, Osaka University, Osaka, Japan.
[2]JST-ERATO.

Multi-component and dynamic structure are essential for cellular membranes to play key roles in numerous cellular processes. Uncovering the behavior of individual lipids in membrane dynamics is crucial for understanding the molecular mechanism in biological functions of cell membranes. In present study, we elaborate on simple methods to measure individual lipid ^{31}P CSAs in multi-component bilayer systems. Lipid ^{31}P NMR signals were separated on MAS spectra according to isotropic chemical shifts. CSA was reintroduced by spin-echo with various delay time and evaluated by curve fitting of centerband modulation. By the centerband-only analysis of rotor-unsynchronized spin echo, we evaluated molecular behaviors of individual lipids in DMPC:DMPE:DMPG three-component system before and after addition of Ca^{2+}.

細胞膜は、物質移動の障壁だけでなく、膜タンパク質の構造形成・機能発現、脂質ドメインの集合・離散など、ダイナミックな生理機能の発現に関与する。細胞膜では多様な分子が不均一に分布しており、個々の膜構成脂質がそれぞれ特異的な役割を果たすことで、細胞膜の複雑な分子機構が機能すると考えられている。脂質二重膜の分子挙動解析には、感度と簡便さから蛍光分光法が汎用されるが、観察対象の脂質が小分子であるため化学修飾の影響が大きく、蛍光標識分子から元の脂質分子の性質を知ることは困難である。一方、物理化学的影響の少ない安定同位体標識を利用するNMRは、脂質分子本来の挙動を直接探ることができる方法論として、長年脂質膜の構造研究に利用されている。特に^{31}P CSA解析は、全ての生物種において細胞膜構成脂質の主要成分であるリン脂質に適用できるため、相状態や膜結合分子との相互作用の研究に広く用いられてきた[1]。

リン脂質のリン酸ジエステル基の^{31}P CSAは、脂質集合体の形状に固有の分子運動により減弱され、脂質の相状態を反映した観測値を与える。また、膜結合性分子との相互作用も脂質分子の運動性に影響を及ぼすため、^{31}P CSA値の変化として観測される。一般的に^{31}P CSAは、静止測定の広幅スペクトル、または低速MAS下のスピニングサイドバンドパターン解析により求められるが、成分が複数の場合はシグナル分離が困難である。多成分試料に対しては、等方的化学シフトによるシグナル分離とCSA

化学シフト異方性，脂質膜，スピンエコー

○まつおか　しげる，うめがわ　ゆういち，むらた　みちお

測定を同時に行う、中・高速MAS下の二次元CSAリカップル法が適用される[2]。しかし、CSAの展開軸では、広幅化による信号強度の低下と、スケーリング効果による分解能の低下が問題となり、脂質膜試料への応用は限られている。

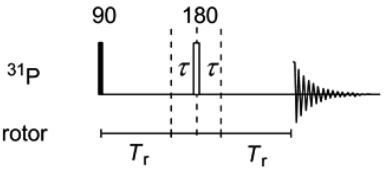


図 1 使用したパルスシーケンス。τ を変化させ、スピンエコー強度の CSA による変調を測定する。

今回我々は、高分解能MAS条件下、単純なスピンエコーシグナルのCSAによる強度変調[3]をカーブフィッティングすることで、多成分膜の構成脂質個々のCSA測定を試みた（図1）。CSAの僅かな違いを精度よく観測するため、高強度を与えるMASセンターバンドのみを利用した（Centerband-Only Analysis of Rotor-unsynchronized Spin Echo : COARSE）。以下に、多成分モデル脂質膜のCa^{2+}添加による再組織化における、個々の脂質成分の挙動解析を示す。

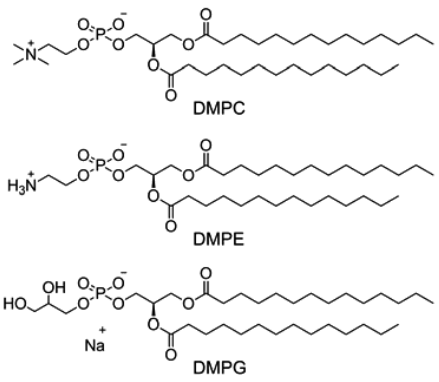


図 2 リン脂質分子の化学構造

図 3a に dimyristoyl phosphatidylcholine（DMPC）:dimyristoyl phosphatidyl- ethanolamine（DMPE）:dimyristoyl phosphatidylglycerol（DMPG）混合モデル膜（1:1:1 molar ratio）の 37 °C における ^{31}P NMR 静止スペクトルおよび MAS スペクトルを示した。静止スペクトル（グレー）では液晶相のラメラ構造に相当する幅約 45 ppm のスペクトルが観測された。一方、MAS スペクトル（黒）では、等方的化学シフトの差により 3 つのリン脂質のシグナルが分離して観測された。

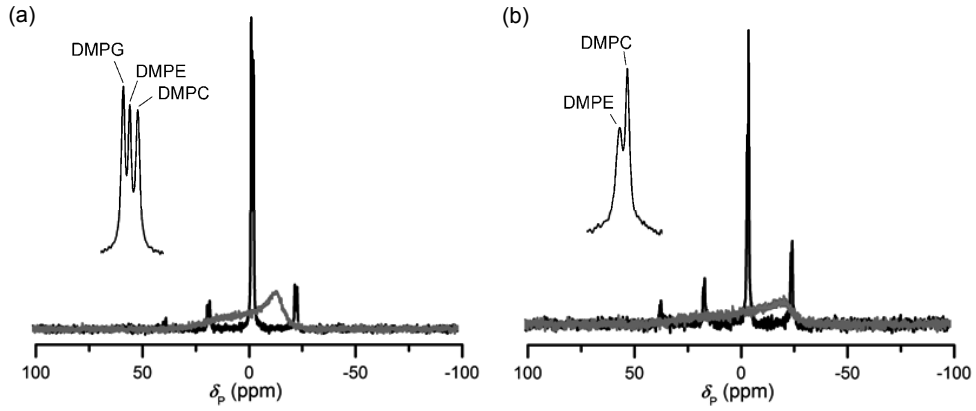


図 3 混合脂質モデル膜の ^{31}P NMR（37°C, ^{1}H non-decoupled, MAS at 5 kHz）。 (a) DMPC:DMPE:DMPG (1:1:1 molar ratio) 50%v/w D_2O の静止スペクトル（グレー）と MAS スペクトル（黒）。(b) DMPC:DMPE:DMPG:$CaCl_2$ (1:1:1:1.5 molar ratio) 50%v/w D_2O の静止スペクトル（グレー）と MAS スペクトル（黒）。挿入図はセンターバンドの拡大を示す。

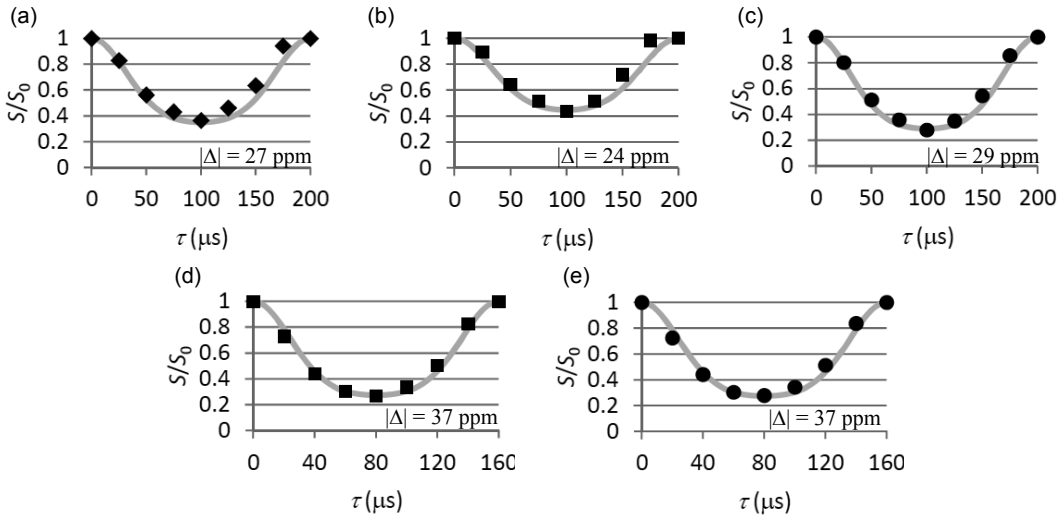


図 4 混合脂質モデル膜の ^{31}P COARSE の結果。横軸は図 1 中のエコー待ち時間τに相当する。縦軸は待ち時間τにおけるセンターバンドの信号強度（S）を$\tau = 0$ の信号強度（S_0）で規格化した値。$\tau = 1T_r$ で $S/S_0 = 1$ になるように、T_2 緩和による減衰を補正した。上段に DMPC:DMPE:DMPG (1:1:1 molar ratio) 50%v/w D_2O 中の DMPG (a)、DMPE (b)、DMPC (c)を示す。下段には DMPC:DMPE:DMPG:$CaCl_2$ (1:1:1:1.5 molar ratio) 50%v/w D_2O 中の DMPE (d)、DMPC (e)の結果を示す。図中、黒色のシンボルは実験値であり、◆、■、●は、それぞれ DMPG、DMPE、DMPC を示す。灰色の実践は計算値を示す。ラメラ相の膜法線に沿った軸回転運動を仮定し、$\eta = 0$ として|Δ|値を 0.5 ppm 単位で計算し、実験値と最も近い結果を与えた計算結果を曲線で示した。

MASセンターバンドのスピンエコー強度変化をカーブフィッティングすることで、それぞれの^{31}P CSAの|Δ|値を得ることができた（図4a-c）。DMPCは典型的な液晶相ラメラ構造に相当する|Δ| = 29 ppmを示した。DMPGは|Δ| = 27 ppmとDMPCよりも小さい値を示し、DMPCよりも極性頭部の揺らぎが大きいラメラ構造の形成が示唆された。相転移温度が50 °CのDMPEは、測定温度では本来ゲル相であるが、PC、PGと混合膜としたことで溶解し、DMPC、DMPGよりも小さい|Δ| = 24 ppmを示した。この値は、極性頭部の揺らぎが大きいラメラ構造に相当し、PE-PGペア形成[4]による混合が示唆さる。

次にDMPC:DMPE:DMPG:$CaCl_2$（1:1:1:1.5 molar ratio）混合モデル膜を調製し、Ca^{2+}の影響を調べた。図3bの静止スペクトル（グレー）ではCa^{2+}の添加による線幅の拡大が確認され、

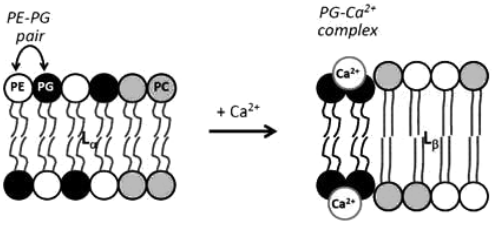


図 5 COARSE から示唆された Ca^{2+}添加による DMPC: DMPE:DMPG 混合モデル膜再構成の概念図。Ca^{2+t} 添加前は相転移温度の高い DMPE（$T_m = 50$ °C）は DMPG（$T_m = 23$ °C）と PE-PG ペアを形成することで液晶相ラメラ構造を取る。Ca^{2+}を添加すると DMPG-Ca^{2+} の強い相互作用により DMPE が DMPC（$T_m = 24$ °C）中に拡散し、DMPC と DMPE が混合したゲル相ラメラ構造を形成する。

ゲル相のラメラ構造に相当するスペクトル幅約60 ppmが観測された。MASスペクトル（図3b 黒）では、DMPC、DMPEが確認されたが、DMPGのシグナルは消失していた。これは、酸性リン脂質であるDMPGとCa^{2+}が複合体を形成し[5]、ミリ秒程度の時間領域で構造変化していることを示している。DMPCとDMPEにCOARSEを適用したところ、どちらもゲル相のラメラ構造に相当する^{31}P CSA値$|\Delta| = 37$ ppmを示した（図4b）。この結果は、PG-Ca^{2+}複合体形成によりPE-PGペアからDMPEが脱離し、DMPCと混合することで相転移温度が上がり[6]、PC-PE混合系のゲル相のラメラ構造が形成されたことを示唆する（図5）。

今回、^{31}P NMRのCOARSEにより、Ca^{2+}添加による多成分モデル脂質膜の再組織化におけるリン脂質個々の挙動が明らかとなった。ヒトの細胞では、細胞膜構成脂質の主要成分であるPC、PEはそれぞれ細胞膜の外側と内側に非対称に分布している。酸性リン脂質は比較的微量成分であるが、PEと似た細胞膜表裏の非対分布が報告されており[7]、本実験で見られたようなCa^{2+}による再組織化の分子機構が存在する可能性があり、細胞膜の生理機能との関与は興味深い。現在、COARSEを用いて脂質－脂質、タンパク質－脂質分子間相互作用における個々の脂質の挙動解析も進めている。

参考文献

1 P. R. Cullis, B. de Kuruyff, *Biochim. Biophyc. Acta* **1979**, *559*, 399–420.
2 a) D. D. Laws, H. L. Bitter, A. Jerschow, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3096–3129; b) L. Shao, J. J. Titman, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 103–137.
3 a) D. P. Raleigh, E. T. Olejniczak, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 1333–1350; b) A. C. Kolbert, D. P. Raleigh, M. H. Levitt, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 679–689.
4 P. Garidel, A. Blume, *Eur Biophys. J.* **2000**, *28*, 629-638.
5 L. Li, X. Shi, X. Guo, H. Li, C. Xu, *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 130-140.
6 C. Laroche, H. Simonin, L. Beney, P. Gervais, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1669*, 8-16.
7 B. D. Smith, T. N. Lambert, *Chem. Commun.* **2003**, 2261-2268.

L1-7 家蚕絹Silk II型構造の解析とモルフォロジーに関する研究

○奥下 慶子[1], 浅野 敦志[2], ウィリアムソン マイク[3], 朝倉 哲郎[1]
[1]農工大院工, [2]防大応化, [3]シェフィールド大バイオ

NMR study for elucidating Silk II structure of *Bombyx mori* silk fibroin and its morphology

○Keiko Okushita[1], Atsushi Asano[2], Michael P. Williamson[3], and Tetsuo Asakura[1]
[1] *Department of Biotech., Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.*
[2]*Department of Applied Chem., National Defense Academy, Kanagawa, Japan.*
[3]*Department of Mol. Biol. and Biotech., University of Sheffield, South Yorkshire, UK.*

Bombyx mori (*B. mori*) silk fibroin has been attracted attentions to its applicability as a potential biomaterial because of its excellent physical properties and high biocompatibility. The deep knowledge about its molecular structure and morphology before and after processing the silk materials will be a key in the development. The primary structure of *B. mori* silk fibroin consists mainly of $(GAGAGX)_n$ repetitive region (X = S (main), Y or V). So far, we have been focused on the molecular structure of the crystalline region, $(GAGAGS)_n$. Here, we present the structure of this region clarified with solid state ^{13}C NMR, especially around the Ser residue in the sequence.

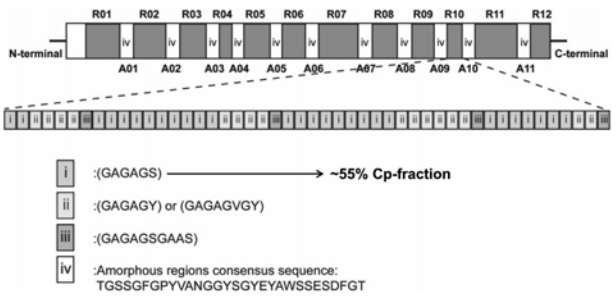


Fig. 1 Primary structure of *Bombyx mori* silk fibroin heavy chain[1]. The main sequential region with $(GAGAGS)_n$ occupies ca. 55 % and can be separated by α-chymotrypsin treatment, which is called Cp-fraction.

【緒言】本年、富岡製糸工場が世界遺産に登録されたこともあり、一時日本の経済を支えた家蚕絹について、その歴史とともに現在の応用研究にも注目が集まっている。特に、縫合糸として長年使用されてきた実績を踏まえ、再生医療用材料としての利用研究が盛んに報告されている。

一方、家蚕絹の材料利用のために、構造情報を基盤とした物性制御・加工に関する知見が不可欠である。当研究室では家蚕絹を用いた再生医療材料、特に小口径人工血管の開発を進めているが、絹繊維の物性に関わる構造解析手法の確立と、それから得られる知見の蓄積は重要である。

Fig. 1に家蚕絹フィブロインのアミノ酸配列を示す[1]。家蚕絹のアミノ酸配列はGlyAlaGlyAlaGlyX (GAGAGX)という繰り返し配列(X=Ser, Tyr, Val)からなるのが特徴であり、各配列領域は家蚕糸中で特徴的なドメインを形成する。[1] 中でも結晶部と呼ばれるSerを含んだ$(GAGAGS)_n$配列が全体の約55%を占める。これまでの家蚕絹繊維中のSer側鎖に関するNMR研究から、Ser残基は一部、分子間水素結合形成を通して絹のβ-sheet構造の安定化に寄与することが示唆されている[2]。

本研究では、^{13}C固体NMRを用いて、家蚕絹のキモトリプシン処理後沈殿部である結晶部試料(Cp-fraction)について詳細な構造解析[3-5]を行ったので発表する。

Bombyx mori silk fibroin, β-sheet structure, Relaxation time
○おくした けいこ、あさの あつし、うぃりあむそん まいく、あさくら てつお

【実験】

試料作製：家蚕を飼育時、餌に［U-$^{13}C_6$］Glucoseを混合、アミノ酸の全炭素を^{13}C均一ラベル化（［U-^{13}C］）した絹糸を得た。［U-^{13}C］家蚕絹の再生絹フィブロイン水溶液をα-キモトリプシン処理した後、沈殿部（全体の55%）を集めて、Silk II型構造の［U-^{13}C］Cpフラクションを得た。

固体NMR測定：Cpフラクションの2D DARR測定はBruker DMX 500 NMR、MAS 11 kHz下で行い、混合時間10 msと400 msの2点を測定した。

【結果・考察】

Fig. 2は混合時間10 msにおける2次元DARRスペクトル、拡大図はSer残基内の交差ピークを示す。混合時間10 msでは直接結合した残基内の相関が主として観測されるため、拡大図より、Cpフラクション内のSer残基については少なくとも4つの異なる化学的環境が存在することがわかる。SerCβ炭素ピークについて、SerCβ ^{13}C化学シフトと主鎖内部回転角を定量的に関連づけた化学シフトの等高線マップを用いて、ピーク分離(Fig. 3)を行うとともに、既に報告してきたAlaCβピークの帰属[3]と対応させることで、(i) Distorted β-sheet A、(ii) β-sheet A、(iii) β-sheet B, (iv) Random coil のように帰属した。

さらに、緩和時間測定と混合時間を長く設定したDARR測定からナノメートルスケールのドメインサイズに関する情報を得た結果の詳細については本会で発表する。

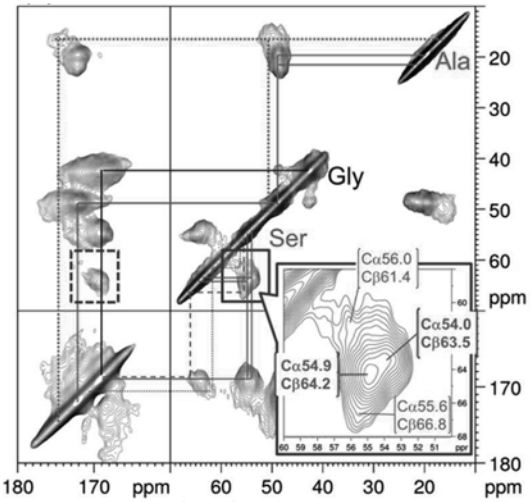


Fig. 2 2D ^{13}C–^{13}C DARR spectrum of [U-^{13}C] Cp fraction (silk II) observed with a mixing time of 10 ms. Intra-residue assignment of the detected peaks and expansion of the Ser Cα-Cβ correlation are also shown.[5]

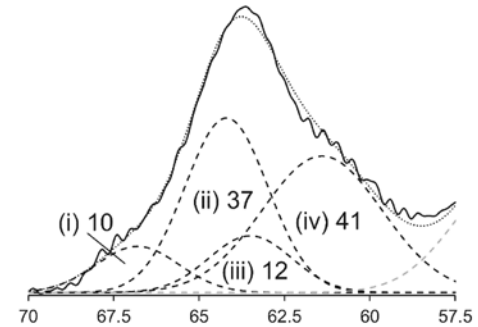


Fig. 3. Gaussian line shape fitting of Ser-Cβ peak in ^{13}C CP/MAS spectrum of [U-^{13}C] Cp fraction (silk II).[5] The individual peak position was determined from Fig.2 and Ser-Cβ chemical shift contour map.[3]

【謝辞】

本研究は、農林水産省アグリ・ヘルスプロジェクトならびに平成23年度科学研究費補助金基盤研究A（課題番号23245045, 26248050）から一部補助を受けた。

【参考文献】

[1] Zhou et al., *Proteins, Struct. Funct. Genet*, **2001**, 44, 119.
[2] Kameda et al. *Macromolecules* **1999**, 32, 7166.
[3] Asakura, T. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 30, 8794.
[4] 朝倉ら，平成 25 年度繊維学会年次大会発表 **2013** 1C06.
[5] Okushita, K. et al. *Macromolecules*, **2014**, 47, 4308.

L1-8

固体MAS NMRによる細胞膜環境中での7本膜貫通型光受容膜タンパク質の構造解析

○川村 出[1]、中谷 聡志[1]、槙野 義輝[1]、加茂 直樹[2]、内藤 晶[1]
[1]横浜国立大・院工
[2]北海道大学

Conformation of seven-helical transmembrane photoreceptor membrane protein as studied by solid-state MAS NMR

○Izuru Kawamura[1], Satoshi Nakatani[1], Yoshiteru Makino[1] Naoki Kamo[2], Akira Naito[1]
1. Yokohama National University,
2. Hokkaido University

Membrane proteins play important roles as transporter or signal transduction. *Pharaonis* phoborhodopsin (*pp*R) is a seven-helical transmembrane negative-phototaxis receptor and forms a 2:2 complex with the cognate transducer in the cell membrane. We have demonstrated that the functional photo-intermediates were successfully trapped using by *in-situ* photo irradiation solid state MAS NMR. We will show the solid-state NMR data of *pp*R under near physiological condition and discuss the conformation and dynamics in the lipid environment.

【序論】

真正細菌シアノバクテリア由来の7回膜貫通型-光受容膜タンパク質であるアナベナセンサリーロドプシン(ASR)について、固体NMRによる構造解析によって細胞膜中で形成する三量体状態の立体構造が2013年に決定され、膜タンパク質の反応場である細胞膜中での分子メカニズムの理解につながった[1]。

我々はこれまでに*In-situ*光照射-固体NMR測定によって、7回膜貫通型光受容膜タンパク質のひとつである負の走光性受容体ファラオニスフォボロドプシン(*pp*R)のレチナール光異性化反応を観測し、光活性中間体の構造解析を行っている[2,3]。本発表では*pp*Rを細胞膜中に再構成し、温度変化によるNMR実験によって運動性の解析や^{17}O標識タンパク質試料のNMR測定を試みたことを報告する。

【実験方法】

目的タンパク質のプラスミドを導入した大腸菌BL21(DE3)株を利用して、M9培地による培養によって、均一^{13}C、^{15}N標識*pp*Rおよび^{17}Oζ-Tyr (^{17}O: 35-40%)標識*pp*Rを大量発現し,Ni-NTA agaroseによる精製を行った。これをEgg PC脂質膜にタンパク質：脂質＝1：30（モル比）で再構成した。固体NMR測定は再構成試料を4 mmのジルコニア製MASローターに詰め、Bruker 600 MHz Avance III 分光器とE-freeプローブを用いて、MAS周波数11.6 kHzで行った。温度を変化させて^{13}C, ^{15}NのNMRスペクトルを観測した。

固体 NMR、細胞膜、膜タンパク質

○かわむらいずる、なかたにさとし、まきのよしてる、かもなおき、ないとうあきら

^{17}Oξ-Tyr 標識 *p*pR の ^{17}O NMR 測定はローターからのバックグラウンド信号を消すために、試料を 4 mm の窒化ケイ素製の MAS ローターに詰めた。また、水からの ^{17}O 信号を少なくするために、^{16}O (99.99%)の水でタンパク質-脂質試料を水和することで、水の ^{17}O NMR 信号を弱めた。また、合わせて粉末の ^{17}Oξ-Tyr (^{17}O; 35-40%)の ^{17}O MAS および Static NMR 測定も行った。測定には 2 重共鳴プローブを用い、^{1}H デカップリング条件下で Hahn Echo 法を用い、MAS 周波数 12 kHz で行った。

【結果】

^{13}C DARR (mixing time 50 ms)測定や^{15}N CP-MAS測定によって、*p*pRの^{13}Cや15N NMR信号を観測した。温度変化に対する信号の強度や線幅を調べて、運動性を解析した。解析結果は討論会で議論したい。

*p*pRのTyr残基の^{17}O NMR実験は、*p*pR中のTyrは11残基あり、いくつかのTyrがその機能に関与しているため、より詳細に構造変化を調べる必要があることが実験を行う大きな理由である。粉末の^{17}Oξ-Tyrに関する^{17}O NMR測定によって、信号を観測することに成功した(図1)。このときのMASおよびStaticのスペクトルパターンは文献[4]とよく一致した。次にタンパク質試料の^{17}O測定の前に、^{16}O(99.99%)で濃縮した水の^{17}O NMR信号を観測し、純水の^{17}O NMR信号に比べて1/6程度に減少した。つづけて、この水で水和した^{17}Oξ-Tyr標識*p*pRについて^{17}O NMR測定を行い、膜タンパク質の^{17}O NMR信号の観測を試みた。現在、スペクトルの解析を行っており、こちらについても討論会で議論したい。

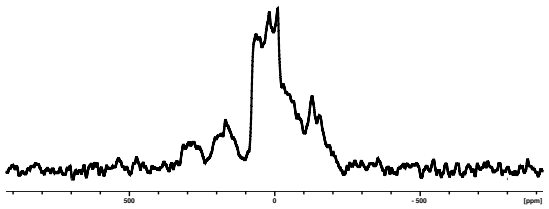


図 1: 粉末の ^{17}Oξ-Tyr の ^{17}O MAS NMR スペクトル

【参考文献】

[1] S. Wang et al. (2013) ***Nature Methods*** 10 1007-1013.
[2] Y. Tomonga et al. (2011) ***Biophys. J.*** 101 L50-L52.
[3] H. Yomoda et al. (2014) ***Angew. Chem. Int. Ed.*** 53 6960-6964.
[4] J. Zhu et al. (2010) ***J. Phys. Chem. B*** 114 11681-11688.

SL1-1 植物培養細胞を用いた標識試料の調製方法とその応用例

○大木進野[1]
[1]北陸先端科学技術大学院大学・ナノテクセンター

A method to prepare labeled proteins using suspension cultured plant cells and some examples of its application

○Shinya Ohki[1]
[1]*Center for Nano Materials and Technology (CNMT), Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)*

A new protein expression system using suspension cultured plant BY2 (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2) had been developed. To achieve higher protein productivity, we prepared a DNA that encodes an RNA virus vector and a sample protein. Then, the artificial DNA fragment connected to the DNA of a transcription factor activated by estradiol were inserted into chromosome DNA of BY2. It was found that use of ER targeting peptide effectively works to express and fold proteins containing SS-bonds. This BY2 system was employed to prepare plant peptide hormones, stomagen and ESF1, for the NMR study. Both of them are defensin-like secretory peptides containing several SS-bonds, so that it was difficult to express them using popular *E. coli* systems.

【はじめに】　大腸菌や酵母、無細胞タンパク質合成系を利用しても調製が困難なタンパク質は多い。代替策として昆虫・動物細胞などの利用も報告されているが、植物細胞はほとんど試料の調製に利用されてこなかった。そこで我々は、植物培養細胞BY2（*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2）を使って新たなNMR用試料調製システムを開発した。本発表では、その概略と幾つかの安定同位体標識試料調製の事例を報告する。さらに、これを構造解析に適用した応用例を2つ紹介する。

【BY2試料調製システムの概略】　光合成能力を欠損しているBY2は、炭素・窒素ともに液体培地中から取り込むため、各種の安定同位体標識タンパク質を調製する潜在能力を有している。一般的なBY2用液体培地では炭素源にシュークロースを用いるのだが、安定同位体標識試薬のコスト面を考慮し、我々は、炭素源にグルコースを用いる実験条件を最適化した。開発した発現システムの概略を次に述べる。

まず、RNAウイルスをコードするcDNAの下流に目的タンパク質の遺伝子をつなぎ、目的タンパク質の発現量を大幅に上昇させた。次に、エストラジオールによって活性化する転写因子を発現させることで、目的タンパク質の発現を誘導できるようにした。また、発現したタンパク質の立体構造形成を促すために、各種のシグナルペプチドも利用した。この結果、目的タンパク質を小胞体へ移行させることで、特に、複数のジスルフィド（SS）結合を有するタンパク質を正しい折れたたみ構造をとらせた状態で調製できるようになった [1]。

植物培養細胞、安定同位体標識、ディフェンシン様ペプチド

○おおきしんや

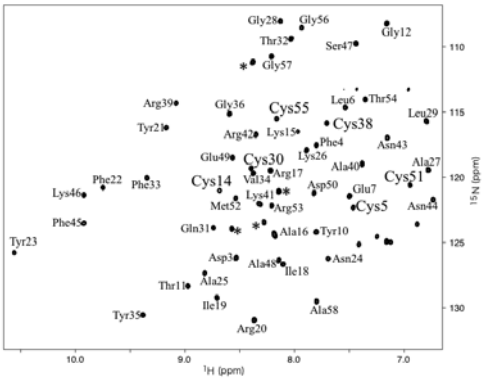


Fig. ^{1}H-^{15}N HSQC of BPTI.
^{15}N-labeled BPTI was expressed as a soluble protein with the proper conformation in the BY2 cells. Thus, refolding process to form SS-bonds is unnecessary during the sample purification [1].

このシステムを利用して、均一同位体標識のほかにも、Ile, Leu, Valの選択標識などができるようになっている。

【応用例1：ストマジェン】　ストマジェンは分子内に3組のSS結合を持つ45残基のディフェンシン様ペプチドで、植物の葉の表面にある気孔の数を増やす働きをしている。BY2システムを利用して安定同位体標識試料を調製し、定法に則ってストマジェンの立体構造解析を溶液NMR法で行った。ストマジェンと類似のアミノ酸配列を持ち気孔の数を減らすEPF2 (epidermal patterning factor 2)についてもNMRデータを取得し、モデル構造を構築した。両者を比較すると、βシートと1回転ヘリックスから成るコア部分が共通で、そこから伸びたループ部分の長さとアミノ酸配列に大きな違いが見られた。ループ部分を交換した変異体を作製して構造と機能を調べ、ループ部分が機能を担っていることを実験的に証明できた。また、コア部分に存在するSS結合が立体構造を形成するために必須であることや、機能発現には安定な立体構造が不可欠であること等を明らかにした [2]。

【応用例2：ESF1】　新たに発見された68残基のESF1（embryo surrounding factor 1）は、植物が受精して種子が形成される初期段階でのみ発現が確認される分泌性ペプチドであり、その不活性化は種子の大きさを不揃いにする。今回、我々はBY2システムを利用してESF1の安定同位体標識試料を調製し、溶液NMR法でその立体構造解析を行った。ESF1の立体構造はSS結合で安定化されたβ/αフォールドを持ち、分子の表面には2個のトリプトファン残基と1個のロイシン残基が直線上に並んでいることが明らかになった。これらに変異を導入すると生理活性が大きく低下することから、これらの側鎖の嵩高く疎水的な性質と相対的な位置関係が機能発現に重要な役割を果たしていると推定された [3]。

【謝辞】　本発表の内容は、石川県立大学の森正之准教授との協同研究として行われました。また、応用例2は、Warwick大学のJ. F. Guetirrez-Marcos博士の研究グループとの協同研究の成果です。ここに記して感謝いたします。

【参考文献】
1. Ohki, *et al.*　*J. Biomol. NMR* (2008) **42**, 271-277.
2. Ohki, *et al.*　*Nat. Commun.* (2011) **2**, 512.
3. Costa, *et al.*　*Science* (2014) **344**, 168-172.

SL1-2 メチルTROSY法による膜タンパク質の機能調節メカニズムの解明

○大澤　匡範[1]，今井　駿輔[1]，竹内　恒[2]，嶋田　一夫[1, 2]
[1]東大・院薬系
[2]産総研・創薬分子プロファイル研究セ

Functional mechanism of membrane proteins revealed by methyl TROSY

○Masanori Osawa[1], Shunsuke Imai[1], Koh Takeuchi[2], and Ichio Shimada[1]
[1]Grad. Sch. Pharm. Sci, The university of Tokyo, Tokyo, Japan.
[2]Molprof, AIST, Tokyo, Japan.

KcsA is a tetrameric K^+ channel that is activated by acidic pH. Methyl TROSY analyses revealed that the selectivity filter undergoes an equilibrium between permeable and impermeable conformations under open conditions. Here, we report that population of the permeable conformation (p_{perm}) positively correlates with the tetrameric stability and that the population in a lipid bilayer nanodisc (rHDL), is lower than that in detergent micelles, indicating that dynamic properties of KcsA are different in these two media. Perturbation of the membrane environment by the addition of 1-3% 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) increases p_{perm} and the open probability, revealed by NMR and single channel recording analyses. These results demonstrate that KcsA inactivation is determined not only by the protein itself, but also by the surrounding membrane environments, including lateral pressure.

【目的】放線菌由来 pH 依存性 K^+チャネル KcsA は、細胞内 pH が中性では巨視的電流が観測されない閉状態を取るが、pH5 以下の酸性刺激を与えると、一過性のピーク電流の後 2-3 秒で減衰し、ピーク電流の 15%程度の電流を流す開状態に達する。この巨視的電流の特徴は真核生物の電位依存性 K^+チャネルにも共通して見られ、activation-coupled inactivation と呼ばれる、膜電位制御に関わる重要な性質である。

中性における閉状態の結晶構造および変異体を用いた電気生理解析から、KcsA の膜貫通領域の K^+透過路には、K^+の透過を阻む helix bundle crossing (HBC)とその選択性を担う selectivity filter(SF)の 2 つのイオンゲートが存在することが示されており、開状態では、酸性刺激に応答して HBC が開き、K^+を透過する permeable 状態と、透過しない impermeable 状態の間の平衡にあることが示唆されていた。我々は、これまでに、界面活性剤 dodecyl maltoside(DDM)に可溶化した KcsA の溶液 NMR 解析により、酸性における permeable 状態と impermeable 状態の間の平衡が、SF 周辺の K^+と H_2O の結合・解離を伴う構造平衡であることを明らかにし、activation-coupled inactivation の分子機構を解明した。

一方で、酸性刺激時のピーク電流の減衰速度は、KcsA の細胞内領域を認識する抗体

メチル TROSY, KcsA, functional dynamics

○おおさわまさのり，いまいしゅんすけ，たけうちこう，しまだいちお

を添加すると遅くなり、細胞内領域を欠失した変異体では速くなることが報告されており、細胞内領域がKcsAの膜貫通領域の細胞外側に存在するSFの構造平衡に間接的に影響を及ぼしていることが示唆されていた。KcsAの細胞内領域はヘリックスバンドルを形成し、4量体を安定化することが知られている。そこで、本研究では、KcsAの4量体の安定性を変調しうるC末端領域への変異導入や、膜環境の変調によるSFの構造平衡への影響を溶液NMR法により解析することにより、KcsAのイオン透過活性に重要なSFの構造平衡を支配する要因を調べることとした。

【方法】全長KcsA（以降、C末端の残基番号を付してKcsA160と称する）およびKcsAのC末端を欠失した変異体KcsA134, KcsA132, KcsA130, KcsA128, KcsA125を大腸菌にて発現、DDMで可溶化し、定法に従って精製した。各タンパク質について、SDS-PAGEによりpH3.2における4量体の熱安定性を調べた。また、SFに存在するV76のメチルTROSYシグナル強度を指標として各タンパク質のpermeable状態の存在割合(p_{perm})を求め、KcsA160とKcsA125については^{13}C ZZ exchange法によりpermeable状態とimpermeable状態の交換速度を求めることにより、C末端欠失のSFの構造平衡への影響を調べた。さらに、膜環境のSFの構造平衡に対する影響を調べるために、KcsAを脂質二重膜のディスク状ナノ粒子であるrHDLに再構成し(KcsA-rHDL)、膜環境に変調を与えることが知られている2,2,2-trifluoroethanol (TFE)を添加した際のSFの構造平衡をNMRにより解析した。また、機能との相関を調べるために、平面二重膜に再構成したKcsAのK^+透過活性を、TFE存在下・非存在下において調べた。

【結果】C末端細胞内領域の長さが異なるタンパク質の解析により、細胞内領域が長いほど4量体の熱安定性が高く、また、p_{perm}が大きいことが示され、4量体の熱安定性とp_{perm}との間には正の相関があることが分かった (R^2=0.82)。KcsA125では、impermeable状態からpermeable状態への遷移速度k_{ip}はKcsA160と同じであるのに対し、逆の過程の遷移速度k_{pi}はKcsA160の15倍であったことから、C末端細胞内領域は間接的にSFのpermeable状態を安定化していることが分かった。

rHDL中ではDDM中とスペクトルが対応しておりglobalな構造変化は見られなかったが、SFの構造平衡においては、rHDL中の方がp_{perm}が低いことが分かった。

KcsA-rHDLに、1-3% (v/v)のTFEを添加したところ、SFは、impermeable状態からpermeable状態へと遷移した。単一チャネル電流解析では、1-3%(v/v)のTFEの添加とともに開口確率が増加した。

【考察】DDM中においては、KcsA細胞内領域が、KcsAの膜貫通領域内の細胞外側に位置するSFの、permeable状態を安定化する。一方、膜環境が界面活性剤から脂質二重膜に変わると、SFはimpermeable状態へと移行した。また、1-3% (v/v)TFE添加時のKcsA-rHDLの構造平衡のシフトは、電気生理解析におけると開口確率の上昇と良く対応していた。TFEは20-25%(v/v)の高濃度ではαヘリックスの安定化、pK_aの上昇、KcsAの4量体の不安定化などの影響を及ぼすことが知られている。しかし、今回の解析に用いた1-3%(v/v)程度の低濃度TFEにはそのような効果はなく、膜の水平方向の圧力を上昇させる効果が唯一報告されている。したがって、今回得られた結果は、rHDL中においてNMRで捉えたKcsAの構造平衡が、脂質二重膜環境におけるチャネル機能と密接に関連しており、膜環境に大きく影響を受けることを示している。

SL1-3 高難度タンパク質のNMR解析に向けた酵母発現系の活用

○高橋 栄夫[1], 大浪 真由美[2], 杉木 俊彦[2], 坂倉 正義[1], 竹内 恒[3], 嶋田 一夫[4]
[1]横浜市立大学・大学院生命医科学研究科, [2]バイオ産業情報化コンソーシアム, [3]産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター, [4]東京大学・大学院薬学系研究科

Utilization of yeast expression systems for stable isotope-assisted NMR analysis of difficult proteins

○Hideo Takahashi[1], Mayumi Onami[2], Toshihiko Sugiki[2], Masayoshi Sakakura[1], Koh Takeuchi[3], and Ichio Shimada[4]
[1]Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, [2]Japan Biological Informatics Consortium, [3]Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, [4]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Escherichia coli expression systems are widely used for the production of isotopically enriched recombinant proteins for NMR analyses, but a number of eukaryotic proteins are not functionally expressed in *E.coli* because of problems related to disulfide bond formation, post-translational modifications and folding. Instead, yeast expression systems are attractive alternatives for successful production of these proteins because yeast expression systems combine several advantages of both other eukaryotic and prokaryotic expression systems. Here we introduce a cost-effective isotope-labeling system using yeast *Kluyveromyces lactis* and show that a high level of uniform deuteration is possible using the yeast expression system. Moreover, the methyl-selective $^{1}H/^{13}C$-labeling can be effectively achieved by co-overexpression of branched-amino-acid-aminotransferases in cytosol. This kind of yeast expression systems would be a good candidate for the expression of large eukaryotic proteins for NMR analyses.

NMRによるタンパク質の立体構造解析・相互作用解析を行うためには、安定同位体標識したタンパク質の調製が必要となる。目的タンパク質の発現系としては、遺伝子操作の容易さや、タンパク質発現量、発現コスト、等の観点から、大腸菌発現系が汎用的に用いられており、重水素標識やメチル基選択標識、交互標識などの様々な安定同位体標識技術も大腸菌発現系をベースに開発されている。しかしながら、真核生物であるヒト由来のタンパク質は、原核生物である大腸菌での発現が困難な場合も少なくない。我々は、近年、大腸菌での発現が困難な標的タンパク質のNMR解析に向け、単純でロバストな真核細胞であり、高密度培養による高発現も期待できる酵母細胞を

安定同位体標識，酵母発現系

○たかはし ひでお，おおなみ まゆみ，すぎき としひこ，さかくら まさよし，たけうち こう，しまだ いちお

活用したNMR試料調製系の検討を行ってきたので、その成果について報告する。

【*K.lactis* 発現系による低コスト安定同位体標識法】

酵母 *K. lactis* 発現系は、LAC4プロモーターを活用した発現系であり、炭素源であるガラクトース（20 g / L）により定常的に発現誘導される。しかしながら、同位体標識ガラクトースは高価であるとともに、炭素源にグルコースを使用すると、通常は発現抑制を引き起こすことが知られているため、本発現系により現実的なコストでNMR解析用試料を調製することは困難であると考えられていた。これに対し、我々はグルコース発現効果が抑制されているGG799株を用い、流加培養法を実施することで、同位体標識グルコースを炭素源として、大腸菌発現系なみのコストで安定同位体標識タンパク質試料を調製できる発現系を確立することができた。

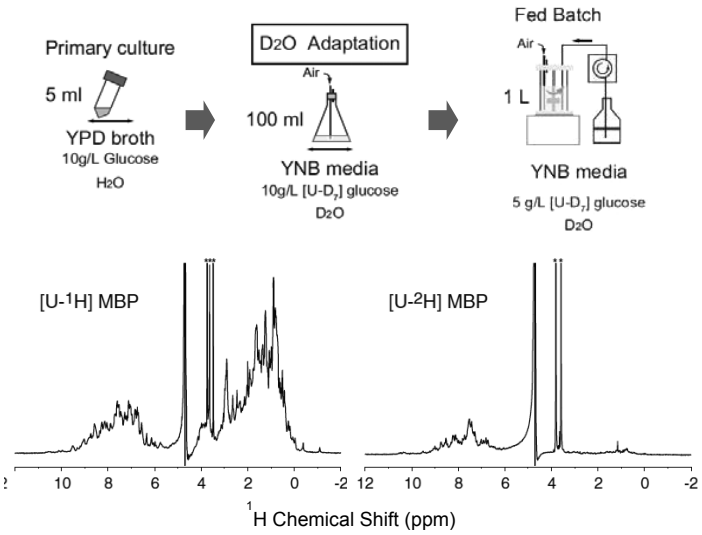


Figure 1. Upper: The expression scheme of perdeuterated target proteins by *K. lactis* expression system. Lower: 1D 1H NMR spectrum of unlabeled (left) and deuterated (right) MBP prepared using *K. lactis* expression system.

【*K.lactis* 発現系による完全重水素化とメチル選択標識法】

高分子量タンパク質のNMR解析において必須となる、高度に重水素標識されたタンパク質試料調製系の検討を行った。重水へ馴化するステップを経てからfed-batch培養へ移行することで、NMR測定に十分な量の重水素標識試料（重水素化率95%以上）を調製することが可能となった。重水素化条件下におけるIle、Leu、Valのメチル選択 $^{1}H/^{13}C$標識については、大腸菌において一般的に用いられる前駆体を利用した培養では、Ile δ1は70%程度の標識率であったのに対し、Val γ、Leu δの標識率は極めて低いものであった。そこで、*E. coli* あるいは *S. cerevisiae* 由来の分岐アミノ酸アミノ基転移酵素を細胞質に共発現させることで、これらのアミノ酸のメチル選択$^{1}H/^{13}C$標識効率を上昇させることに成功した。一方、^{13}C標識Valを培地中に添加すれば、Leu、Valともその$^{1}H/^{13}C$標識率は85%以上となることも判明した。

現在、より汎用的に用いられている酵母発現系である *P. pastoris* 発現系（pPIC系およびpGAP系）を用いた高難度タンパク質発現、および各種安定同位体標識試料調製法の検討も行っており、その進捗についても報告したい。

References: T. Sugiki et al., *J. Biomol. NMR*, 42, 159-162 (2008); H. Takahashi and I. Shimada, *J. Biomol. NMR*, 46, 3-10 (2010); T. Sugiki et al., *Meth. Mol. Biol.*, 831, 19-36 (2012); M. Miyazawa-Onami et al., *J. Biomol. NMR*, 57, 297-304 (2013)

SL1-4 安定同位体標識のための無細胞タンパク質合成系の改良

○横山順[1,2]，樋口佳恵[2]，松田夏子[2]，木川隆則[2,3,4]
[1]大陽日酸株式会社つくば研究所
[2]理化学研究所イノベーション推進センター無細胞技術応用研究チーム
[3]理化学研究所 生命システム研究センター 生体分子構造動態研究チーム
[4]東京工業大学 大学院総合理工学研究科 知能システム科学専攻

Improvement of cell-free protein synthesis system for the stable isotope-labeling

○Jun Yokoyama[1,2], Kae Higuchi[2], Natsuku Matsuda[2], and Takanori Kigawa[2,3,4]
[1] Tsukuba Laboratory, Taiyo Nippon Sanso Corporation, Ibaraki, Japan.
[2] Cell-Free Technology Application Laboratory, RIKEN Innovation Center,Yokohama, Japan.
[3]Laboratory for Biomolecular Structure and Dynamics,Cell Dynamics Research Core, RIKEN Quantitative Biology Center, Yokohama, Japan.
[4] Department of Computational Intelligence and Systems Science, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan.

The cell-free protein synthesis system is a powerful tool for NMR studies that can be incorporated the stable isotope labeled amino acid into the protein effectively. We have been developing a practical cell-free protein synthesis system to avoid stable isotopic scrambling and dilution. Precise amino acid selective labeling can be achieved by using the E. coli-cell extract with reduced endogenous amino acid metabolisms. We also developed a system which can be efficiently synthesized disulfide-containing proteins for NMR analyses by optimizing the redox potential condition in the cell-free protein synthesis reaction. In order to promote the widespread use of the cell-free protein synthesis system, we had commercialized a series of the cell-free protein synthesis kits "Musaibo-kun", which are optimized for NMR studies. In the presentation, important features of these kits will be introduced.

無細胞タンパク質合成系は、添加した安定同位体標識アミノ酸を効率的にタンパク質に導入できることから、NMR 測定試料用のタンパク質合成方法として、大変優れている。現在までに、様々な研究者により改良や提案がなされ、安定同位体標識効率や生産性は大きく向上している。しかしながら、NMR 測定用試料合成法として多くのメリットがあるにも関わらず、広く普及しているとは言い難い。その理由として、NMR 用途としての仕様に合った適切な製品が販売されていないことや、研究室での系の立ち上げ、維持に労力とコストがかかることなどが挙げられる。市販の無細胞タンパク質合成キットでは、NMR 測定に必要とされるミリグラムスケールのタンパク

安定同位体，　無細胞タンパク質合成系

○よこやまじゅん，ひぐちかえ，　まつだなつこ，　きがわたかのり

質を合成することを想定されているものは少なく、最大でも数十～数百マイクログラムの試料を得る程度である。これらを用いてNMR測定に十分量の安定同位体標識試料を得るにはかなりのコストもかかる。また、同位体標識効率について十分考慮されている製品はさらに少ない。そこで我々は、現在NMR試料作製用に最適化された実用的な無細胞タンパク質合成キットの開発を進めている。それに必要な条件として、１）高い安定同位体標識効率、２）様々な種類のタンパク質合成に対応できる、３）ミリグラムスケールの試料が適正なコストで得られる、４）再現性が高く、反応のスケールアップ、スケールダウンが容易である、５）操作が簡単で誰でも合成できる、などが挙げられる。我々は、安定同位体標識率の更なる向上のため、無細胞タンパク質合成系内に残存するアミノ酸等の代謝系を調べ、安定同位体標識アミノ酸の分解や、同位体希釈およびスクランブルに関わる代謝をできるだけ抑える工夫を進めた。これにより、正確なアミノ酸選択的安定同位体標識が可能となり、これらの技術を応用したタンパク質合成キット”無細胞くんSI”を製品化した。また、無細胞反応液の酸化還元条件の最適化とジスルフィド結合異性化酵素の添加による効率的なジスルフィド結合の異性化により、正しいジスルフィド結合を形成したタンパク質の合成技術を開発し、”無細胞くんSI SS”として製品化している。発表では、安定同位体標識率向上のための改善方法やジスルフィド結合を持つ低分子化抗体（scFv、Fab）を合成した事例などを紹介する。

参考文献

1) J. Yokoyama, T. Matsuda, S. Koshiba, N. Tochio, T. Kigawa, *Anal Biochem.*411, 223-229 (2011)
2) T. Matsuda, S. Watanabe, T. Kigawa, *Biochem Biophys Res Commun.* 431, 296-301 (2013)

SL1-5 哺乳細胞による安定同位体標識の抗体創薬への利用

○鳥澤 拓也[1]
[1]中外製薬株式会社・研究本部

Applications of Stable Isotope Labeling by Mammalian Cells to Antibody Therapeutics.

○Takuya Torizawa[1]
[1]Research Division, Chugai Pharmaceutical Co.,Ltd., Kamakura, Japan.

The biotherapeutics market is expanding rapidly, and global pharmaceutical companies are competing to develop drugs in this field. Chugai, a member of the Roche group, is a pioneer of antibody therapeutics. We were the first to launch a developed antibody product on the Japan market and our research pipeline includes various candidate molecules that could become the next generation of antibody drugs. This rapidly developing field requires a wide range of analytical information on the molecules of interest, first at the discovery stage of lead drugs, then in their optimization to become drugs, and finally in subsequent production and quality control. To provide this essential information, we are using NMR analysis to discover what is going on around the antibody molecules in terms of structure, physicochemical issues, and interactions. This presentation will introduce a range of NMR activities, including basic experiments for sample preparation of antibody labeled with stable isotopes by using mammalian cells, NMR measurements for them and applications to antibody therapeutics.

現在、バイオ医薬品は従来の低分子医薬品で占められていた市場を席巻しつつ急速に市場を拡大し、世界の製薬企業は最先端のバイオ医薬品の研究開発にしのぎを削っている。中外製薬ではこのバイオ医薬品にいち早く着目し、エリスロポエチンやG-CSFといったサイトカインを皮切りに、日本国内で初めて開発された抗体医薬品を世に送り出し、バイオ医薬品開発の国内先駆者となってきた。さらに、上市されたもののみならず、次世代の抗体医薬品になっていくであろう種々の候補分子についても日夜、研究を進めている。この急速に進化する創薬分野において、抗体リード分子の探索から、それが医薬品となるための最適化、その後の生産・品質管理に至るまで、対象分子についての多様な分析情報が必要とされる。それらの情報の中でも抗体分子に構造・物性・相互作用の観点でどのようなことが起きているかについてNMR法特有の情報を提供していくことにより、抗体医薬品の創製の一翼を担うべく日々取り組んでいる。本発表では哺乳細胞を用いた抗体の安定同位体標識試料の調製、およびそのNMR測定、さらには抗体創薬へのアプリケーションを含む中外製薬におけるNMR解析の活動について紹介する。

抗体，創薬，高分子量

○とりざわたくや

哺乳細胞（HEK293由来：一過性発現系）による抗体発現系と安定同位体標識アミノ酸を添加した培地を用いて、IgGを発現させた。標識されたIgGを限定分解酵素によりFab(50 kDa)、Fc(50kDa：ホモダイマー)フラグメントに断片化・精製し、NMR解析の対象とした。必要に応じてフラグメント化しないIgG(150 kDa)も解析対象とした。抗体分子の局所構造のNMR観測によりアプリケーションが成立する場合には、アミノ酸選択的に標識した試料を用いて解析した。アミノ酸選択的な標識は、Asp、Gln、Glu、Proを除く16種類のアミノ酸で可能であることが確認された。これらの標識試料の主鎖アミド基、側鎖メチル基のシグナルを観測した。メチル基については、Ala、Met、Ile, Leu, Valのシグナルを観測し、IgGにおいても十分な検出感度を得た。アミノ酸選択標識試料のNMRシグナルの帰属は、主に変異体の利用、および二重標識法の同時実施により行われた。抗体分子を網羅的にNMR検出する必要があるアプリケーションにおいては、^{2}H, ^{13}C, ^{15}N 均一標識を行い解析対象とした（Fig. 1）。この均一標識試料のシグナル帰属には、^{1}H-^{15}N TROSY検出タイプの各種三重共鳴スペクトル（Fig. 2）および^{15}N-edited NOESYスペクトルを用いた。ある解析対象の抗体においては、主鎖アミド基シグナルの帰属率が、Fcについて99 %、Fabについて91 %（IgGとしては94 %）に達した。これらの抗体のNMR解析技術基盤を背景に、抗体分子構造のキャラクタリゼーション、物性、分子間相互作用等の抗体創薬のためのアプリケーションを実施している。本発表では、当研究所で実施された応用例について紹介する。研究所で開発されたCa^{2+}依存性抗原結合抗体の抗原結合部位におけるCa^{2+}結合部位を、CDRループのNMRシグナルを指標に、Ca^{2+}添加に伴う化学シフト変化から同定した。これに加えてCa^{2+}滴定実験から解離定数を算出した。またADC(Antibody Drug Conjugate)の開発においては、抗体と薬剤との共有結合反応を、反応部位であるCys残基のNMRシグナルを指標に追跡し、各結合反応部位における反応分子種ごとの定量値を算出した。上市抗体医薬品についても、抗体生産工場で用いられている哺乳細胞（安定性発現CHO）と生産培地により安定同位体標識抗体を調製した。これによって、抗体医薬製品に含まれる副成分と主成分の高次構造の同一性を検証する実験を行った。

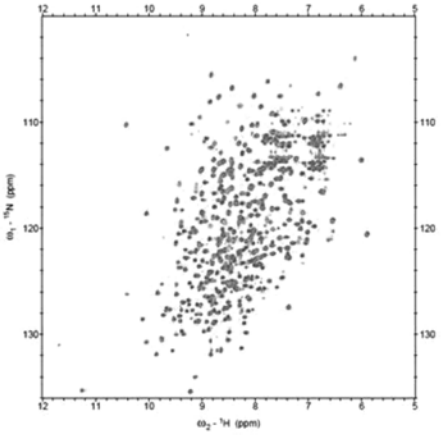


Fig. 1: ^{1}H-^{15}N TROSY of [u-^{2}H,^{13}C,^{15}N] Fab

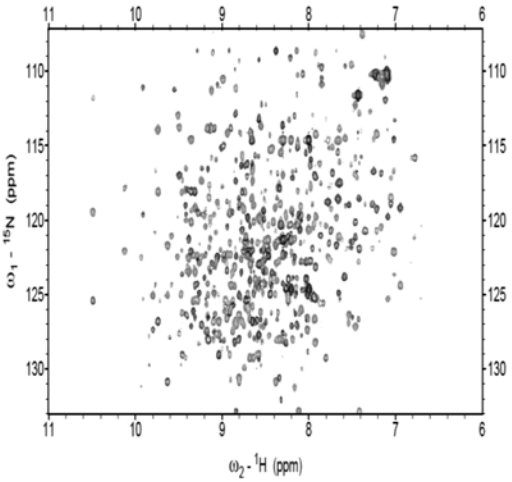


Fig. 2: 3D TROSY–(H)N(CA)NH of [u-^{2}H,^{13}C,^{15}N] Fab (2D HN projection)

SL1-6 誤り検出符号によるノイズに強いアミノ酸選択標識法

○葛西卓磨[1]，小柴生造[1,2]，横山順[1,3,4]，木川隆則[1,3,5]
[1]理研・生命システム研究センター・生体分子構造動態研究チーム
[2]東北大・東北メディカル・メガバンク機構
[3]理研・イノベーション推進センター・無細胞技術応用研究チーム
[4]大陽日酸（株）・つくば研究所
[5]東工大・総合理工学研究科・知能システム科学専攻

Noise-tolerant Amino-acid Selective Stable Isotope Labeling with Error Detection System

○Takuma Kasai[1], Seizo Koshiba[1,2], Yokoyama Jun[1,3,4], and Takanori Kigawa[1,3,5]
[1] *Laboratory for Biomolecular Structure and Dynamics, RIKEN Quantitative Biology Center.*
[2] *Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University.*
[3] *Cell-Free Technology Application Laboratory, RIKEN Innovation Center.*
[4] *Tsukuba Laboratory, Taiyo Nippon Sanso Corporation.*
[5] *Department of Computational Intelligence and Systems Science, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology.*

Amino-acid selective stable isotope labeling (AASIL) is useful for the main-chain assignment process of difficult target proteins under challenging conditions such as in-cell NMR. We have developed Stable Isotope Encoding (SiCode) by regarding AASIL as a “encoding-and-decoding” process, that is, information of amino acid type is encoded to isotope labeling ratios and decoded by analyzing NMR spectra. From this point-of-view, various techniques of informatics, such as error detection and correction codes, can be incorporated to AASIL. We will report the improvement of noise tolerance of SiCode by adding check digit, which is a widely used error detection system.

＜背景＞

NMRにより高分子量あるいは低溶解度のタンパク質を解析する場合や、in-cell NMRなど困難な環境下で測定をおこなう場合など、三重共鳴法による連鎖帰属だけでは主鎖帰属が難しい場合には、アミノ酸選択的安定同位体標識法は有用である。しかし、単純な選択標識法ではアミノ酸の数と同数の選択標識体の数が必要となり、タンパク質調製の手間・コストやNMR測定時間が大きい。そこで我々は、アミノ酸選択標識を、アミノ酸情報を安定同位体標識率に「符号化」し、NMRスペクトルから「復号」する過程であるとみなし「符号化標識法（SiCode）」を提案した。この考えに基づくと、標識体あたりに盛り込む情報量を増やすことにより必要な標識体数を削減することができる。これにより、わずか3種類の標識体をもちいて、19種類のアミノ酸を判別できることを示した（葛西(2013)「符号理論を応用した新規の安定同位体標識戦略」第52回NMR討論会）。

アミノ酸選択的安定同位体標識法、符号理論、無細胞タンパク質合成系

○かさいたくま，こしばせいぞう，よこやまじゅん，きがわたかのり

＜誤り検出符号による通信路ノイズへの対処＞

情報通信において、通信路で発生するノイズは情報の正しい復号を阻害する。ノイズの発生しやすい環境下における通信の信頼性を確保するため、情報科学の分野においては誤り検出符号などいくつかの手法が用いられている。

チェックディジットは代表的な誤り検出符号のひとつであり、一般的な例では、データを符号化している複数桁の数値と、チェックディジットと呼ばれる誤り検出のための一桁の数値の組み合わせで情報が送信される。チェックディジットはデータの各桁の数値からあるアルゴリズムによって計算される。このアルゴリズムの代表的なものとして、チェックサムなどがある。チェックディジットを用いると、データあるいはチェックディジットのいずれかひとつの桁に誤りが生じた際に、「誤りが生じたこと」を検出することができるため、データの信頼性の確保に役立つ。

＜符号化標識法への誤り検出符号の導入＞

高分子量や低溶解度など高難度のタンパク質の解析をおこなう場合、S/N比の低いスペクトルを解析することになる。これは、符号化標識法の考え方にもとづけば、ノイズの発生しやすい通信路で送られてきた信号を復号する状況と同じであるので、こうした状況に対処するための情報科学的な手法を利用することができる。

Fig. 1(a)は符号化標識法において、3種類の標識体のみを用いて19種類のアミノ酸を判別するための標識パターン（符号語への変換表）である。ここでは各アミノ酸は3桁の3進数からなる符号語に対応付けられている。この3桁の3進数をデータと考えると、Fig. 1(b)に示すように4番目の標識体をチェックディジットとして追加することにより、誤り検出の機能を持たせることができる。この例では、チェックディジットの算出法としてチェックサム法を用いた。

本発表では、S/N比の低い状況下において、誤り検出符号の活用によりアミノ酸判別の信頼性が向上している実例を示す。

a

amino acid	sample 1		sample 2		sample 3		corresponding codeword
	^{13}C	^{15}N	^{13}C	^{15}N	^{13}C	^{15}N	
G	● 100	● 100	● 100	● 100	● 100	● 100	222
F	● 100	● 100	● 100	● 100	◑ 50	◕ 75	221
N	● 100	● 100	● 100	● 100	○ 0	◑ 50	220
L	● 100	● 100	◑ 50	◕ 75	● 100	● 100	212
S	● 100	● 100	◑ 50	◕ 75	◑ 50	◕ 75	211
D	● 100	● 100	◑ 50	◕ 75	○ 0	◑ 50	210
M	● 100	● 100	○ 0	◑ 50	● 100	● 100	202
K	● 100	● 100	○ 0	◑ 50	◑ 50	◕ 75	201
R	● 100	● 100	○ 0	◑ 50	○ 0	◑ 50	200
A	◑ 50	◕ 75	● 100	● 100	● 100	● 100	122
I	◑ 50	◕ 75	● 100	● 100	◑ 50	◕ 75	121
C	◑ 50	◕ 75	● 100	● 100	○ 0	◑ 50	120
V	◑ 50	◕ 75	◑ 50	◕ 75	● 100	● 100	112
Y	◑ 50	◕ 75	○ 0	◑ 50	● 100	● 100	102
Q	○ 0	◑ 50	● 100	● 100	● 100	● 100	022
E	○ 0	◑ 50	● 100	● 100	◑ 50	◕ 75	021
H	○ 0	◑ 50	● 100	● 100	○ 0	◑ 50	020
T	○ 0	◑ 50	◑ 50	◕ 75	● 100	● 100	012
W	○ 0	◑ 50	○ 0	◑ 50	● 100	● 100	002

b

amino acid	sample 4		check digit
	^{13}C	^{15}N	
G	◑ 50	◕ 75	1
F	○ 0	◑ 50	0
N	● 100	● 100	2
L	○ 0	◑ 50	0
S	● 100	● 100	2
D	◑ 50	◕ 75	1
M	● 100	● 100	2
K	◑ 50	◕ 75	1
R	○ 0	◑ 50	0
A	○ 0	◑ 50	0
I	● 100	● 100	2
C	◑ 50	◕ 75	1
V	● 100	● 100	2
Y	◑ 50	◕ 75	1
Q	● 100	● 100	2
E	◑ 50	◕ 75	1
H	○ 0	◑ 50	0
T	◑ 50	◕ 75	1
W	○ 0	◑ 0	0

● 100% ^{15}N　◕ 75% ^{15}N　◑ 50% ^{15}N
● 100% ^{13}C　◑ 50% ^{13}C　○ 0% ^{13}C

Figure 1. (a) Labeling (codeword) table of SiCode to distinguish 19 amino acids using 3 labeled samples. Each amino acid is assigned to one of the ternary three-digit codewords. (b) Additional labeling pattern of the fourth sample as a check digit.

SL1-7 精製蛋白質への標識導入技術の開発

○児嶋長次郎
大阪大学蛋白質研究所

Labeling techniques utilized for purified proteins

○Chojiro Kojima
Insititute for Protein Research, Osaka University

Chemical modification techniques were utilized for protein NMR. First, we applied lysine ^{13}C-methylation NMR to monitor protein-protein interactions. The affinity and the intermolecular interaction sites of methylated ubiquitin with three ubiquitin-interacting proteins were successfully determined. Also we quantitatively demonstrated that the salt bridge formation induced the upfield shift and the split peaks in the ^{1}H-^{13}C HSQC spectrum of the methyl group of the methylated-lysine residue. Second, we utilized a novel lanthanide chelator with limited molecular weight and rigid structure for paramagnetic NMR study. The observed PCSs were enough large and the position of paramagnetic center was uniquely determined. Third, we utilized PRE to refine the solution structure of a protein which NOE data was insufficient for the structure determination. By combining a total of 867 PRE-derived distance restraints with NOE-derived distance restraints, the structure of the protein was successfully determined with sufficient convergence and accuracy.

【はじめに】

蛋白質の NMR では、２５年前に多次元多核種 NMR 技術が開発されて以来、安定同位体標識技術が必須となっている。幸い、NMR で利用可能な安定同位体（^{13}C/^{15}N/^{2}H）を導入する技術は概ね確立されており、専門家にとっては、ほぼ常識となっている。逆に、安定同位体標識が未だに他分野からの NMR 利用を妨げている最大のネックであることは、多くの専門家に意識されなくなってきた。NMR が幅広い分野で有効利用されるためには、簡便かつ効率的な安定同位体標識技術の開発が必須である。

化学修飾による安定同位体標識技術は古くからその基盤が確立されており、簡便かつ効率的な標識法として良く知られてきた。化学修飾法は、安定同位体標識の導入のほか、偽コンタクトシフト（PCS）法や常磁性緩和（PRE）法で必須となっているスピンラベルやキレート剤の導入などにも用いられており、その利用範囲は年々拡大を続けている。特に、ケミカルバイオロジーの分野において、細胞内のターゲットと任意のリガンドを特異的に化学反応させることが可能になりつつあることから、今後の NMR への発展が期待されている。

本発表では、リジン側鎖に付加した ^{13}C メチル基を用いた NMR 解析法の開発や、新規ランタニドキレートの導入法の開発、スピンラベルによる蛋白質の立体構造決定法の開発など、我々が開発している化学修飾を活用した標識技術を幾つか紹介する。

蛋白質のNMR，標識導入技術，化学修飾

○こじまちょうじろう

【リジン側鎖に付加した ^{13}C メチル基を用いた NMR 解析法の開発】

還元的メチル化法では、化学修飾によってリジン側鎖アミノ基に高感度な ^{13}C メチル基を導入することができる（Fig. 1）。そこで、この ^{13}C メチル基をタンパク質との相互作用解析のプローブとして用いることで、0.2 μM での蛋白質相互作用部位の解析に成功した（Hattori *et al.*, J. Biomol. NMR, 2013）。さらに、メチル化によってアミノ基の pK_a が 0.5-1 程度しか変化しないため、メチル基の化学シフト変化から本来のアミノ基の静電的性質を推定できる。この特徴を用いて、直接的な NMR 検出が難しい蛋白質表面におけるリジン残基の塩橋形成を、メチル基の化学シフトから解析する手法を開発した（服部ら、第 52 回 NMR 討論会要旨集、2013）。

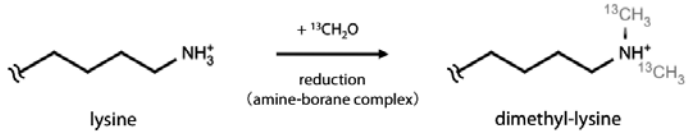


Fig. 1 ^{13}C-methylation of lysine side-chain amino group.

【新規ランタニドキレートの導入法の開発】

蛋白質に適用可能な上記還元的メチル化法と同じ化学反応、すなわち、アルデヒド基とアミノ基との結合反応を用いることで、様々なタグ分子を蛋白質に固定化することが可能になる。そこで、PCS 法で必須となっているランタニドキレートを、この方法で導入することとした。キレート剤としては、分子研の加藤らによって糖の PCS 解析のために開発された、1 点固定化においても十分に大きな PCS を引き起こすことが期待される、必要最小限かつ硬直な構造を持つもの（Fig. 2）を用いた。最終的に蛋白質の N 末端アミノ基にランタニドキレートを導入することで、構造情報と対応する十分に大きな PCS が観測され、1 点固定化においても十分に大きな PCS が得られることが分かった（服部ら、第 53 回 NMR 討論会要旨集、2014）。

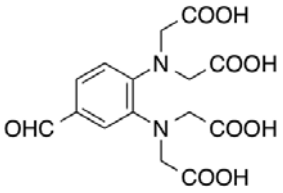


Fig. 2. Chemical structure of an aldehyde derivative of PhDTA

【スピンラベルによる蛋白質の立体構造決定法の開発】

PRE 法は、高分子量タンパク質やミセル中の膜タンパク質など、限られた NOE 距離情報しか得られないタンパク質の全体構造を決定するために有効であることが示されている。そこで、化学シフトの帰属が困難であり、また良好な NOESY スペクトルが得られず、常法では高分解能構造を決定することが困難であった可溶性蛋白質を対象として、PRE 法を用いた構造精密化法を開発した（Furuita *et al.*, J. Biomol. NMR, under revision）。NOE だけでは、主鎖 RMSD が 3.06 ± 0.89 Å、RDC 相関係数 0.56 ± 0.12 という、収束度、確度ともに不十分な構造しか得られなかったが、9 種類のスピンラベル体から得た 867 個の PRE 距離制限情報を同時に用いていることで、主鎖 RMSD が 0.91 ± 0.17 Å、RDC 相関係数 0.86 ± 0.05 の高分解能構造の決定に成功した。± 7 Å という大きな誤差を含むにも拘らず、PRE の距離制限には構造の収束度及び確度を向上させる効果があったことは極めて興味深い。PRE 法を構造精密化に用いることが可能であることを示している点でも極めて重要な結果である。

このように、化学修飾による標識技術は幅広い応用が可能であるため、NMR を幅広い分野で用いるためには大変有効であろう。

SL1-8 微生物および植物バイオマスへの固体・溶液NMR解析

○菊地淳[1,2,3]
[1]理研CSRS, , [2]名大院・生命農, [3]横市大院・生命医

Microbial and plant biomass analysis by solid and solution-NMR

○Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]Grad. Sch. Medbio. Sci., Yokohama City Univ., Yokohama, Japan. [2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Japan. [4]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., Nagoya, Japan.

Microbial and plant biomass is difficult to analyse due to its complexity and insolubility. First, we employed solid-state dipolar dephasing filtered (DDF)-INADEQUATE, in order to remove signals derived from cellulose, allowing for the hemicellulosic signals in lignocellulosic mixture to be detected. Then, the chemical shifts of β-D-Xylp and α-L-Araf in glucuronoarabinoxylan, which is the major hemicellulose in the secondary cell walls of the gramineous plant were assigned in uniformly ^{13}C-labeded lignocellulose. Comparison of ^{13}C shifts in solid-state and solution assigned by 3D-HCCH-COSY showed similar values, whereas signals of C4 and C6 cellulose were far different. This difference is attributed from formation of rigid structure of cellulose

＜緒言＞ ゲノム情報が書き込まれた核酸が第一の生体高分子，その情報の翻訳先である蛋白質が第二の生体高分子だとしたら，バイオマスには第三・第四の生体高分子とでも言えよう多糖とリグニンが，複雑な超分子構造体を形成し，リグノセルロースが構成されている．リグノセルロースは難溶解性かつ難分解性であるために，タンパク質や核酸ほど分子生物学的研究手法が確立されていない．筆者らは超分子構造体としての物性情報を固体 NMR 法で、分子組成情報を溶液 NMR 法より得ている[1]。本会では、バイオマス試料が ^{13}C 標識化なされている利点として ^{13}C-^{13}C 磁化移動のパルス系列が利用可能な点、^{12}C 混雑物中での ^{13}C 代謝追跡が可能な点を議論する。

1-. 固体2D-NMR法パルス系列を用いたシグナル帰属と超分子構造評価

冒頭で述べたようにリグノセルロースは難溶性で溶解させること自体が難しく，また優れた物性は固体の超分子状態でこそ発揮される．特にセルロース以外のヘミセルロース，リグニンやペクチンは非晶性でX線結晶構造解析のようなアプローチが難しく，こうした高分子混合物にこそ固体NMR法の技術開発が期待される．ここで，結晶性と非晶性の成分が混在するということは，こうした超分子構造の違いに基づく分子運動性の差を，NMR緩和速度の違いとして分離して観測できるのではと着目した．そこで筆者らは，緩和速度の違いをフィルターとして利用した2D-固体NMRパルスシーケンスDDF（Dipolar-Diphasing-Filtered）法により[2]、通常のCP-INADEQUATEで占有してしまうセルロースの信号を抑え，非分離混合物のままヘミセルロースの解析が容易になった（図1上）．

リグノセルロース 、緩和編集、^{13}C磁化移動
○きくち　じゅん

2. 溶液 2D, 3D-NMR 法によるシグナル帰属と固体構造との比較解析

可溶化バイオマスのシグナル解析を行う場合，通常はまず ^{13}C-HSQC スペクトルを計測し，同条件で過去にシグナル帰属されたデータベース(Bm-Char, https://database.riken.jp/ecomics/biomass)[3]を利用しながらアノテーションを進めることができる。しかし、更なる未知シグナル帰属への挑戦が難題として残されていることから、筆者らは ^{13}C 標識化バイオマスを用いた 3D-HCCH-COSY 法のような ^{13}C-^{13}C 磁化移動型のパルス系列を利用した．これら一連の解析から，21 の構成単位 116 シグナルの ^{1}H および ^{13}C の化学シフトを網羅的に帰属できた[4]．

このようにして得た溶液・固体状態の ^{13}C 化学シフト値を比較すると、セルロースのシフト差が顕著であった．筆者らは過去に，固体 NMR の実験値[5]，分子動力学および量子化学計算から非晶セルロースに準安定構造があることを示唆している[6]．特に，σ結合の回転が可能な C1, C4, および C6 位では，化学シフトのずれが大きい傾向にあり，これは，σ結合の回転運動が凍結されるあるいは遅くなることに由来する．

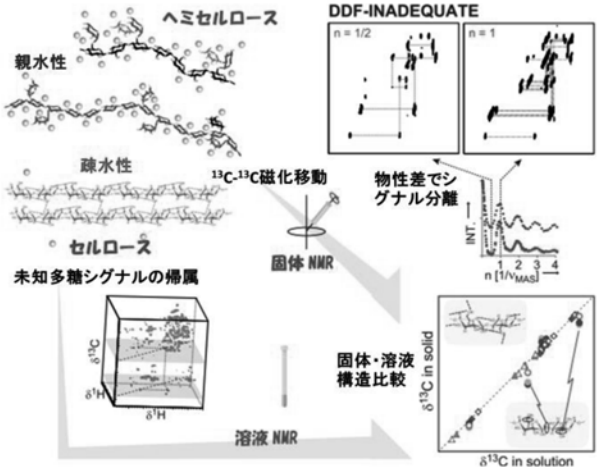


図１　^{13}C バイオマスへの固体・溶液 NMR 解析例

3. 微生物群集の複雑系中における ^{13}C セルロース分解過程の追跡

NMR 法で ^{13}C 標識物質のシグナルを追跡できる利点として，種々の夾雑物が混在した状態でも，天然存在比の ^{12}C が 1.1%である事実を利用し，混合系中にバイオマス量としては少ない ^{13}C シグナルを追跡していくことが可能な点があげられる．筆者らはシロアリ腸内微生物叢[7]やメタン発酵微生物叢での ^{13}C-セルロース分解過程追跡も遂行しており[8,9]、年会にて議論したい。

＜引用文献＞

(1)　小松功典; 菊地淳 *細胞工学* **2014**, *33*, 843.

(2)　Komatsu, T.; Kikuchi, J. ***J Phys Chem Lett*** **2013**, *4*, 2279.

(3)　Ogata, Y.; Chikayama, E.; Morioka, Y.; Everroad, R. C.; Shino, A.; Matsushima, A.; Haruna, H.; Moriya, S.; Toyoda, T.; Kikuchi, J. ***PLoS ONE*** **2012**, *7* e30263.

(4)　Komatsu, T.; Kikuchi, J. ***Anal Chem*** **2013**, *85*, 8857.

(5)　Okushita, K.; Chikayama, E.; Kikuchi, J. ***Biomacromolecules*** **2012**, *13*, 1323.

(6)　Mori, T.; Chikayama, E.; Tsuboi, Y.; Ishida, N.; Shisa, N.; Noritake, Y.; Moriya, S.; Kikuchi, J. ***Carbohydr Polym*** **2012**, *90*, 1197.

(7)　Tokuda, G.; Tsuboi, Y.; Kihara, K.; Saitou, S.; Moriya, S.; Lo, N.; Kikuchi, J. ***Proc Royal Soc. B*** **2014**, *281*, 20140990.

(8)　Yamazawa, A.; Iikura, T.; Morioka, Y.; Shino, A.; Ogata, Y.; Date, Y.; Kikuchi, J. ***Metabolites*** **2013**, *4*, 36.

(9)　Yamazawa, A.; Iikura, T.; Shino, A.; Date, Y.; Kikuchi, J. ***Molecules*** **2013**, *18*, 9021.

SL1-9 タンパク質NMRの生体系への応用：新規MRI及びin-cell NMR法

李真和[1]，榎園能章[2]，猪股晃介[3]，山田久嗣[4]，今井宏彦[5]，牧野顕[6]，木村俊作[7]，松田哲也[5]，近藤輝幸[4]，白川昌宏[1]，○杤尾豪人[2]
[1]京大工・分子工，[2]京大理・生物物理，[3]理研，[4]京大工・物エネ，[5]京大情報，[6]福井大・高エネ医センター，[7]京大工・材化

Stable isotope-assisted NMR in living systems: novel MRI and in-cell NMR techniques

Masakazu Lee[1], Yoshiaki Enokizono[2], Kohsuke Inomata[3], Hisatsugu Yamada[4], Hirohiko Imai[5], Akira Makino[6], Shunsaku Kimura[7], Tetsuya Matsuda[5], Teruyuki Kondo[5], Masahiro Shirakawa[1], and ○Hidehito Tochio[2]
[1] Dept of Molecular Engineering, Grad Schl of Engineering and [2]Dept of Biophysics, Grad Schl of Science, Kyoto University. [3]QBiC, RIKEN. [4]Dept of Energy and Hydrocarbon Chemistry and [5]Dept of System Sci, Grad Schl of Informatics, Kyoto University. [6]Biomedical Imaging Research Center, Fukui University. [7]Dept of Material Chemistry, Grad Schl of Engineering, Kyoto University.

In this study, we tried to develop a novel molecular probe for MR-imaging that can visualize tumors in living mice. Several different polymers were designed and synthesized with ^{13}C enrichment. The polymers were injected to mice implanted with tumor cells, for which the ^{1}H-{^{13}C} HMQC-MRI were measured on a 7T MRI scanner dedicated for small animals. The obtained images clearly demonstrated the accumulation of some of ^{13}C-polymer in the tumor region, implying a future possibility of detecting cancer. We are also working on analysis of proteins in living mammalian cells with NMR spectroscopy. Electroporation was explored to deliver ^{15}N-labeled proteins into HeLa cells, for which ^{1}H-^{15}N HMQC measurement were performed. The spectra were comparable to that obtained by using the CPP method that we previously reported, showing the usefulness of the method for in-cell NMR.

タンパク質の構造解析のために、様々な安定同位体標識技術やNMRパルス系列が開発されてきたが、その技術体系は、試験管内のタンパク質を対象としたものである。一方、広く認識されているように、NMR 自体は極めて生体適合性の高い分光法である。例えば、適切な安定同位体標識を施した低分子化合物を体内に投与すれば、*in vivo* NMR/MRS によって特定器官での当該分子の化学変化を経時的に観察することができ、実際に、代謝や薬物動態の研究に利用されている。我々は、タンパク質NMRの分野で開発・蓄積された方法論を、*in vivo* NMRに応用し、生体や細胞から、他の手法では得られないユニークな分子情報を引き出すことを目指し、研究を進めている。

HMQC-MRI, in-cell NMR, electroporation
○りまさかず，えのきぞのよしあき，いのまたこうすけ，やまだひさつぐ，いまいひろひこ，まきのあきら，きむらしゅんさく，まつだてつや，こんどうてるゆき，しらかわまさひろ，とちおひでひと

本発表では、①異種核 MRI を使ったマウス腫瘍の *in vivo* 検出と、②ヒト由来培養細胞でのタンパク質 NMR（in-cell NMR）について、最近の進捗を紹介する。

^{1}H-{^{13}C} HMQC-MRIによる分子イメージング法

一般的なMRIは、水^{1}Hで画像化しているため、体内の詳細な形態情報が得られるものの、そこに存在する「分子」についての情報を得ることはできず、いわゆる「分子イメージング」に用いる事はできない。このため、例えば、ガドリニウム錯体等の造影剤に酵素活性を検知する分子を組み合わせて、その活性をMRI検出する方法などが考案されてきた[2)]。しかし、常磁性造影剤が生み出すコントラストは、水の動態や共存物質の影響を受けやすいため、分子プローブ自体のNMR信号を観測できたほうが、直接的で好ましく、定量的な解析も期待できる。そこで、我々は、^{1}H-{^{13}C} HMQC-MRI[1)]の利用を前提に、^{13}C標識分子プローブの開発を進めている。本MRIパルス系列では、HMQCによって、^{13}Cと直接結合した^{1}Hの磁化のみを選択し、これに従来型のMRIパルス系列を組合わせて位置情報をエンコードすることで^{13}C含有分子の分布を画像化する。分子プローブとしては、特定部位を^{13}C標識した合成高分子を用いた。各単量体由来の信号は殆ど同一の化学シフトを示すため、結果として、単純かつ強いNMR信号が得られる。合成した高分子を腫瘍を移植したヌードマウスに腹腔内投与し、^{1}H-{^{13}C}-HMQC-MRIにて画像化を検討した。その結果、マウス腫瘍を良好に描出する^{13}C-高分子を得ることができた（図１）。

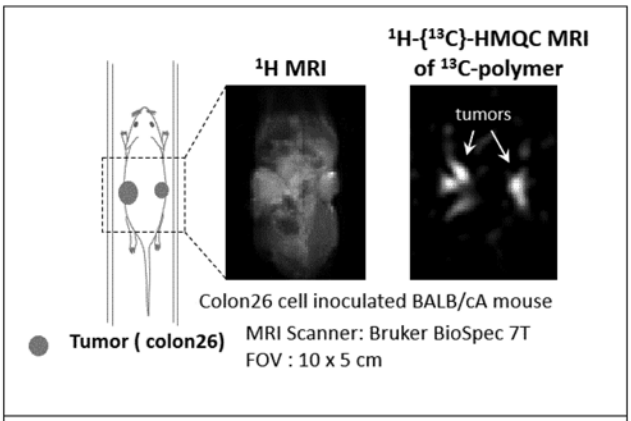


Fig.1 ^{1}H-{^{13}C} HMQC-MRI of a mouse bearing tumor

In-cell NMRによる細胞内タンパク質の解析

NMR 分光法は、細胞試料をも計測対象とする事ができるため、十分な量の安定同位体標識タンパク質を細胞内に用意できれば、細胞内環境下にある当該タンパク質の NMR スペクトルを取得できる。これにより、細胞内でのタンパク質の構造やダイナミクスを解析できる。今回、我々は、遺伝子導入に常用される電気穿孔法の in-cell NMR への応用を試みた。HeLa 細胞を用い、印加する電気パルスの電圧や長さなどを検討した結果、我々が過去に報告した細胞膜透過ペプチドを使った手法[3)]と同等の in-cell NMR スペクトルを、より簡便な操作で得られることが分かった。その結果について報告する。

参考文献

1) van Zijl, et al., *Magnetic Resonance in Medicine* **30**, 544–551 (1993).

2) Mizukami S. et al, *JACS* 139, 794-795 (2008).

3) Inomata K. et al, *Nature* **458**, 106-109 (2009).

第二日目
11月5日（水）
英語セッション

Day 2 (Nov. 5, Wed)
(English Sessions)

L2-1

有機化合物の固体^{33}S NMR

○山田和彦[1], 青木大輔[2], 北川健太郎[3], 曽川洋光[2], 高橋雅人[4], 高田十志和[2]
[1]高知大学総合科学系複合領域科学部門
[2]東京工業大学大学院理工学研究科
[3]高知大学自然科学系理学部門
[4]理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター

Sulfur-33 NMR of Organic Solids

○Kazuhiko Yamada[1], Daisuke Aoki[2], Kentaro Kitagawa[3], Hiromitsu Sogawa[2], Masato Takahashi[3], and Toshikazu Takata[2]
[1]Multidisciplinary Sciences Cluster, Research and Education Faculty, in charge of Science Research Center, Kochi University, Kochi, Japan.
[2]Department of Organic and Polymeric Materials, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, O-okayama, Meguro-ku, Tokyo, Japan.
[3]Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Kochi University, Kochi, Japan.
[4]Division of Structural and Synthetic Biology, Center for Life Science Technologies, RIKEN Yokohama Campus, Kanagawa, Japan.

We present the experimental investigations of field-swept ^{33}S solid-state NMR spectra of a cyclic octaatomic molecule of elemental sulfur, α-S_8, and diphenyl disulfide at the Larmor frequency of 16.2 MHz with a superconducting magnet varied from 6.32 to 0.50 T. Analysis methods for the field-swept ^{33}S NMR spectra in which both Zeeman and quadrupole interactions are dominant, were developed, and, for example, the quadrupole coupling constant, C_Q, and the asymmetry parameter, η_Q, were found for α-S_8 to be 22.99 MHz and 0.57, respectively. In addition to the cases where perturbation theory is no longer valid, the present approach can be applied to NMR spectra with spectral width being extremely wide, *i.e.*, there is no limitation of the magnitudes of quadrupole interactions.

Sulfur atoms play important roles in a variety of research fields, *e.g.*, the cross-linked structure of a rubber and a biological molecule involved in a disulfide bond. Thus, solid-state ^{33}S (I = 3/2, natural abundance = 0.75 %, $\gamma = 2.055\times10^{7}$ radT^{-1}s^{-1}, $Q = -5.5\times10^{26}$ Qm^{-2}) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has attracted the attention of researchers because, regardless of a sample state, it can be used to unambiguously determine the molecular structures, the molecular dynamics of compounds, and the electric properties. There have been a large number of literatures concerning ^{33}S NMR of inorganic compounds, which has made a tremendous impact on the development of chemical and physical sciences.

Sulfur, Solid-state NMR

○やまだ　かずひこ, あおき　だいすけ、きたがわ　けんたろう、そがわ　ひろみつ、たかはし　まさと、たかた　としかず

However, much less is known about ^{33}S NMR of organic and biological molecules, more specifically, compounds forming covalent bonds with the sulfur atom. This is not surprising because large quadrupole interactions originating from sulfur involved with a covalent bond considerably broadened their line widths, making ^{33}S NMR experiments more difficult.

In addition to frequency-swept types, the NMR experiment of field-swept types is an attractive option for recording of NMR spectra with spectral width being extremely wide. The advantage is that, contrary to the frequency-swept types, mechanical setting of NMR spectrometer is not severe since the transmitting and receiving frequencies are constitutively fixed, while the disadvantage is that the spectral analysis is not trivial, in particular when perturbation theory cannot be applied. Under the current situations where 10–30 MHz of Larmor frequency, ν_Q, is generally used for swept-field ^{33}S NMR experiments, the ^{33}S NMR spectrum of α-S_8, whose quadrupole frequency was reported to be approximately 23 MHz, is expected to be more complicated. To the best of our knowledge, the research field of analyzing of such line shapes has been undeveloped, and there still seems to be room for the development of NMR experiments of field-swept types. We present the experimental investigations of field-swept ^{33}S NMR of elemental sulfur and organic compounds and discuss simulating procedures for analyzing of NMR spectra in which both Zeeman and quadrupole interactions are dominant.

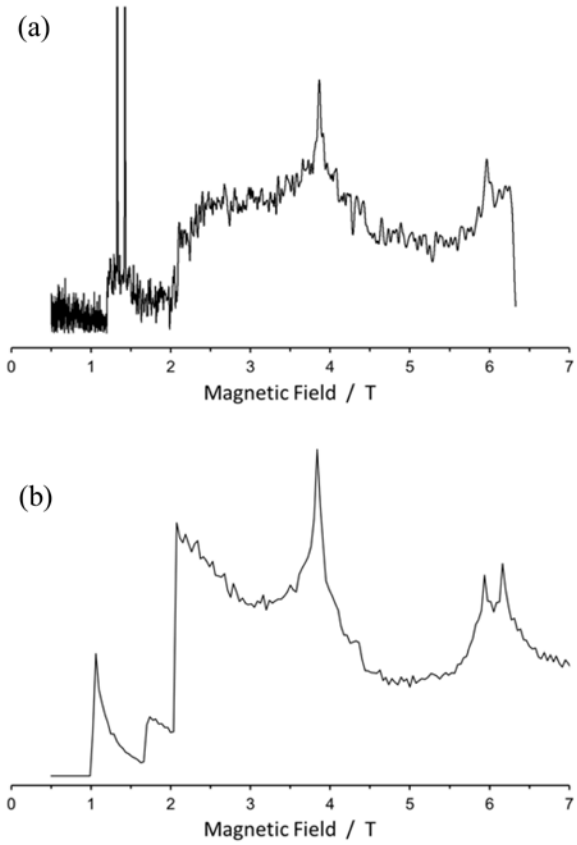


Figure 1 (a) Experimental and (b) best-fitted calculated field-swept ^{33}S NMR spectra of α-S_8, as measured at 16.2 MHz. The analysis of the stationary NMR spectrum where the existence of a single sulfur-site was assumed yielded the following parameters: C_Q = 22.99 MHz and η_Q = 0.57.

Figure 1 (a) shows experimental field-swept ^{33}S NMR spectrum of α-S_8 at the Larmor frequency of 16.2 MHz, acquired at 260 K. Two sharp peaks were observed at approximately 1.3 and 1.4 T, which were assigned to the NMR signals of copper 65 and 63, respectively, arising from the transmitting and receiving antenna in the NMR probe. Figure 1(b) shows the best-fitted calculated field-swept ^{33}S NMR spectrum of α-S_8 at the Larmor frequency of 16.2 MHz. On the assumption of the presence of single sulfur site, the analysis of the stationary NMR spectrum yielded the following parameters: C_Q = 22.99 MHz and η_Q = 0.57, which is agreement with the previous results.

L2-2 Proton decoupling and recoupling under double-nutation irradiation

○Kazuyuki Takeda[1], Asato Wakisaka[1], K. Takegoshi[1]
[1] *Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Japan*

In NMR of organic solids, ^{1}H decoupling is essential to obtain highly resolved spectra of rare spins. To attain better decoupling performance, various rf-modulated schemes have been developed. Tekely et al. proposed to apply periodic phase reversal of the decoupling rf field[1]. This method, also known as X inverse-X (XiX), works well especially under fast MAS[2, 3]. Bennett et al. developed two-pulse phase modulation (TPPM) decoupling[4], in which a pair of phase-shifted pulses are applied one after another. Recently, Vinther et al. proposed refocused continuous-wave (rCW) schemes, reporting that insersion of rotor synchronized π pulses during cw irradiation can suppress residual couplings up to the third order[5]. At present, TPPM and its variants, such as swept-frequency TPPM (SW_f-TPPM)[6], SPARC[7], SPINAL[8], cosine phase modulation (CPM)[9], and so on, have found extensive applications.

The effect of TPPM on spin dynamics is diverse, depending on the choice of the three parameters: the rf amplitude ν_{rf}, phase angle ϕ_0, and pulse duration τ_{p} (Fig. 1(a)). In general, under MAS and TPPM decoupling, the spin Hamiltonian acquires time dependence according to three incommensurable frequencies due to irradiation, phase modulation, and sample spinning. Scholz et al. exploited a triple-mode Floquet theory to derive analytical expressions for the effective Hamiltonians carrying the residual couplings, which, in many cases, arise from the cross terms between anisotropic chemical shielding interactions of the irradiated spins and the relevant heteronuclear dipolar couplings[11]. The cross terms were studied as a function of the phase shift ϕ_0 and the pulse width τ_{p} for various rf amplitudes ν_{rf}, and were shown to have minima along the line satisfying

$$\tau_{\mathrm{p}} = \frac{\pi}{\nu_{\mathrm{rf}} \cos\phi_0}, \tag{1}$$

for such small ϕ_0 that $\tan\phi_0 \sim \phi_0$. The reason why the condition given by Eq. (1) leads to better decoupling was accounted for by Gan and Ernst[12], who showed that *double nutation*, i.e., simultaneous nutations of the ^{1}H spins around a pair of axes, contribute to second averaging of the residual couplings.

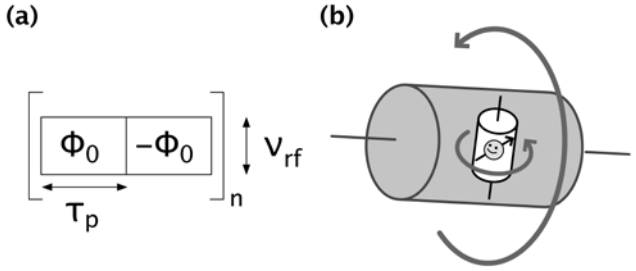


Fig. 1. (a) A TPPM sequence. (b) When the parameters satisfy Eq. (1), the irradiated spins undergo *double nutation*, in analogy with double rotation of a macroscopic body.

Key Words: proton decoupling, double nutation
○たけだかずゆき, わきさかあさと, たけごしきよのり

For double nutation that TPPM and its variants can perform, the second nutation frequency ν_2 is inevitably much lower than the first nutation frequency ν_1, so that the case where $\nu_1 \sim \nu_2$ or $\nu_1 < \nu_2$ has not been explored. In this work, we complement the study of ^{1}H decoupling under general DOuble NUTation (DONUT). Since the rf irradiation ought to cause spin evolution according to the propagator of the form

$$U(t) = \exp\left[2\pi i \nu_2 t I_y\right] \exp\left[2\pi i \nu_1 t I_x\right], \tag{2}$$

the corresponding rf Hamiltonian $\mathcal{H}_{\rm rf}$ is given by

$$\mathcal{H}_{\rm rf}(t) = i\dot{U}(t)U^{-1}(t) = -2\pi\nu_1 \left[I_x \cos(2\pi\nu_2 t) + I_z \sin(2\pi\nu_2 t)\right] - 2\pi\nu_2 I_y, \tag{3}$$

whence we obtain the amplitude $a(t)$, phase $\phi(t)$, and frequency offset $\Delta\nu(t)$ as

$$a(t) = 2\pi \left[\nu_1^2 \cos^2(2\pi\nu_2 t) + \nu_2^2\right]^{\frac{1}{2}}, \tag{4}$$

$$\phi(t) = \tan^{-1}\left[\frac{\nu_2}{\nu_1 \cos(2\pi\nu_2 t)}\right], \tag{5}$$

and

$$\Delta\nu(t) = -\nu_1 \sin(2\pi\nu_2 t). \tag{6}$$

In practice, it is often convenient to incorporate frequency modulation into phase modulation, so that

$$\mathcal{H}_{\rm rf}(t) = a(t)\left[I_x \cos\phi'(t) + I_y \sin\phi'(t)\right], \tag{7}$$

where

$$\begin{aligned} \phi'(t) &= \phi(t) + 2\pi \int_0^t dt' \Delta\nu(t') \\ &= \phi(t) + \frac{\nu_1}{\nu_2}\left[\cos(2\pi\nu_2 t) - 1\right]. \end{aligned} \tag{8}$$

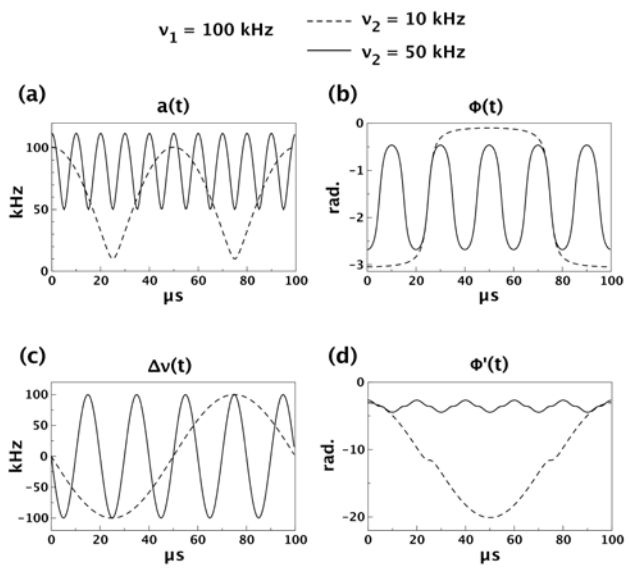


Fig. 2. Modulation profiles of the (a) amplitude, (b) phase, and (c) frequency corresponding to double nutation with the first nutation frequency ν_1 of 100 kHz and the second nutation frequency ν_2 of 10 and 50 kHz. (d) shows phase profiles when the frequency modulation is incorporated according to Eq. (8).

Figure 2 shows examples of the amplitude, phase, and frequency profiles required to implement double-nutation decoupling.

We performed double-nutation decoupling experiments in polycrystalline 2-^{13}C,^{15}N-labeled glycine in a magnetic field of 9.4 T at room temperature, and examined the peak heights of the methylene ^{13}C resonance as a duplex function of the ^{1}H double-nutation frequencies (ν_1, ν_2). We observed a number of recoupling bands caused by interference of the spin part of the dipolar Hamiltonian (modulated by irradiation) with the spatial part (modulated by sample spinning), and found that all recoupling bands draw straight lines (Fig. 3). This is in contrast to the case of TPPM, where the recoupling bands are on somewhat complicated, curved lines when the decoupling efficiency is plotted as a function of the TPPM parameters $(\nu_{\mathrm{rf}}, \phi_0)$ (Fig. 4(a)).

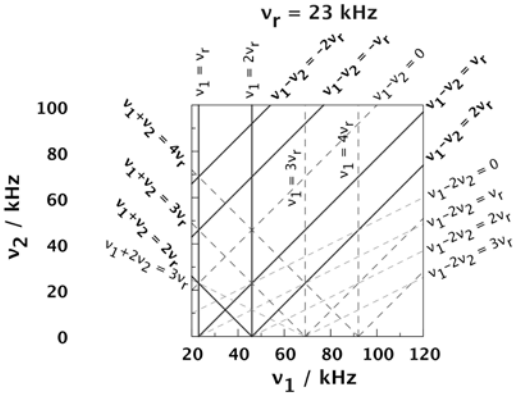


Fig. 3. Lines of the recoupling bands satisfying $p\nu_1 + q\nu_2 = r\nu_r$ (p, q, r are integers) for ν_r = 23 kHz.

The partial equivalence of double-nutation with TPPM justifies interchange of the parameters between (ν_1, ν_2) and $(\nu_{\mathrm{rf}}, \phi_0)$. We found the transformation rules:

$$\nu_1^2 + \left(\frac{\pi}{2}\nu_2\right)^2 = \nu_{\mathrm{rf}}^2. \tag{9}$$

$$\nu_2 = \frac{2}{\pi}\tan\phi_0\nu_1. \tag{10}$$

Eqs. (9)(10) indicate that, in the ν_1-ν_2 plane, the line of constant rf amplitude is described by an arc of an ellipse, while the constant-phase line is a linear function with a slope given by $(2/\pi)\tan\phi_0$.

Very interestingly, this transformation maps the TPPM recoupling bands into the very straight lines that coincide with those obtained for double-nutation decoupling (Fig. 4(b)). The result indicates that, even though the rf amplitude and the rf phase are the *straightforward* basis parameters in TPPM, the nutation frequencies ν_1 and ν_2 would give a *natural* basis set from the viewpoint of spin decoupling dynamics. Such a change of the viewpoints gives an instructive insight into the interference effect causing recoupling and thereby degradation of the decoupling efficiency.

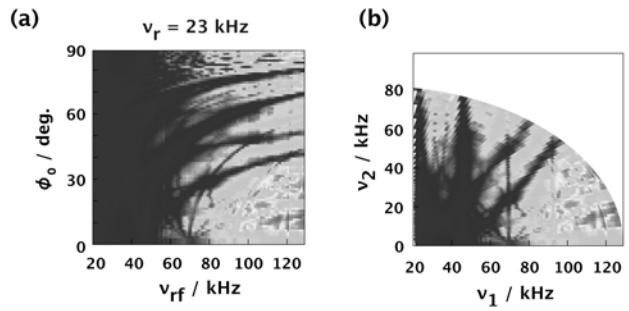


Fig. 4. (a)Experimental peak height of the ^{13}C resonance line of the methylene group in polycrystalline 2-^{13}C,^{15}N-labeled glycine obtained under TPPM decoupling as a function of the rf amplitude ν_{rf} and the phase angle ϕ_0. The spinning speed was 23 kHz. In (b), the same data is plotted as a function of the first and the second nutation frequencies ν_1 and ν_2 of double nutation according to the transformation rules given by Eqs. (9)-(10).

References

[1] P. Tekely, P. Palmas, D. Canet, Journal of Magnetic Resonance, 1994, A107, 129–133.

[2] A. Detken, E.H. Hardy, M. Ernst, B.H. Meier, Chemical Physics Letters, 2002, 356, 298–304.

[3] M. Ernst, A. Samoson, B.H. Meier, Journal of Magnetic Resonance, 2003, 163, 332–339.

[4] A.E. Bennett, C.M. Rienstra, M. Auger, K.V. Lakshmi, R.G. Griffin, Journal of Chemical Physics, 1995, 103, 6951–6958.

[5] J.M. Vinther, A.B. Nielsen, M. Bjerring, E.R.H. van Eck, A.P.M. Kentgens, N. Khaneja, N.C. Nielsen, Journal of Chemical Physics, 2012, 137, 214202.

[6] R.S. Thakur, N.D. Kurur, P.K. Madhu, Chemical Physics Letters, 2006, 426, 459–463.

[7] Y. Yu, B.M. Fung, Journal of Magnetic Resonance, 1998, 130, 317–320.

[8] B.M. Fung, A.K. Khitrin, K. Ermolaev, Journal of Magnetic Resonance, 2000, 142, 97–101.

[9] A. Khitrin and B.M. Fung, Journal of Chemical Physics, 2000, 112, 2392–2398.

[10] S. Paul, V.S. Mithu, N.D. Kurur, P.K. Madhu, Journal of Magnetic Resonance, 2010, 203, 199–202.

[11] I. Scholz, P. Hodgkinson, B.H. Meier, M. Ernst, Journal of Chemical Physics, 2009, 130, 114510.

[12] Z. Gan and R.R. Ernst, Solid State Nuclear Magnetic Resonance, 1997, 8, 153–159.

L2-3

Studies of minute quantities of surface-bound molecules using 2D heteronuclear correlation spectroscopy under 100 kHz MAS

○Yusuke Nishiyama[1,2], Takeshi Kobayashi[3], Michal Manon[1,2], Igor I. Slowing[3,4], and Marek Pruski[3,4]

[1] *JEOL RESONANCE Inc., Tokyo, Japan*

[2] *RIKEN CLST NMR facility, Yokohama, Japan*

[3] *U.S. DOE Ames Laboratory, Ames, Iowa, USA*

[4] *Department of Chemistry, Iowa State University, Ames, Iowa, USA*

We demonstrate that despite the miniscule rotor size, ultrafast MAS technology offers the opportunity to measure 2D $^{1}H\{^{13}C\}$ spectra of natural abundance solids using pulse sequences similar to heteronuclear single quantum correlation (HSQC) experiments used in solution NMR. Remarkably, high quality spectra can be measured on samples containing surface-bound functionalities, containing just 10^{16} of ^{13}C-^{1}H pairs. We show that the measurements are easy to optimize, remarkably sensitive, and compare favorably with those carried out using much larger rotors capable of MAS at 40 kHz. In favourable cases, the heteronuclear multiple quantum correlation (HMQC-type) schemes can be used, as well. Moreover, by using appropriate mixing conditions the CP-based HSQC measurements under MAS at 100 kHz can serve to produce spectra equivalent to J-based schemes.

The $^{1}H/^{13}C$ correlation spectra were obtained by CP-based HSQC method (Figure 1). The ^{1}H magnetization is transferred to ^{13}C by the first CP. The first CP conditions are optimized to maximize the total magnetization transfer. The contact time for the first CP is typically 1 to 2 ms. The ^{13}C time evolution is recorded under CW ^{1}H decoupling in the t_1 dimension. The magnetization is stored along z direction at 2 τ_{RR} with suppressing residual ^{1}H magnetization. The magnetization is finally measured after transferring to ^{1}H by the second CP. The ^{1}H-^{13}C J coupling is suppressed by WALTZ/SPINAL64 ^{13}C decoupling.

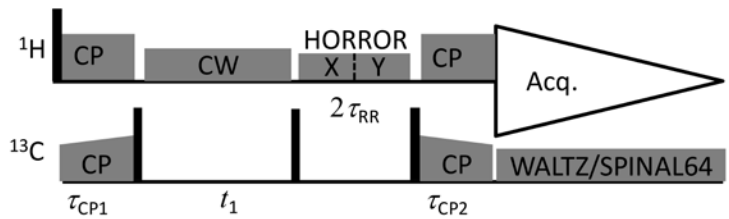


Figure 1. Pulse scheme used to measure 2D ^{1}H-^{13}C HSQC-type spectra.

Ultrafast magic angle spinning, volume limited samples, natural abundance

○にしやま　ゆうすけ、こばやし　たけし、まろにゅ　みはる、すろういんぐ　いごーる、ぷるすき　まれっく

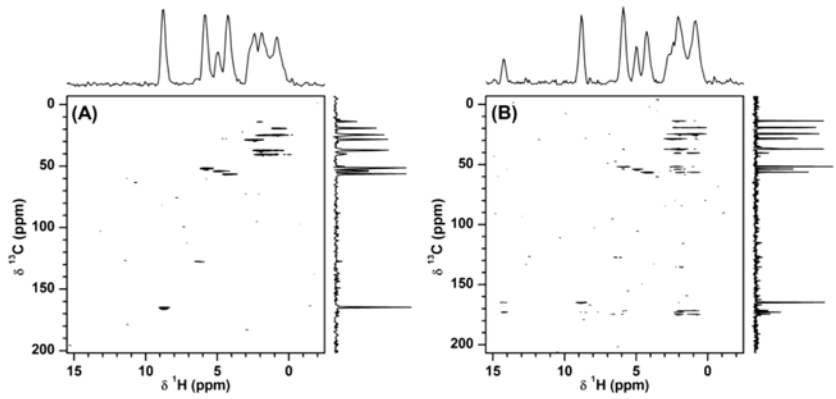


Figure 2. 2D ^{1}H-^{13}C HSQC-type spectra of f-MLF-OH taken at 14.1 T under the following conditions: (a) ^{1}H{^{13}C}, ν_R = 100 kHz; τ_{CP1} = 2 ms, τ_{CP2} = 0.4 ms; (b) ^{1}H{^{13}C}, ν_R = 100 kHz; τ_{CP1} = 2 ms, τ_{CP2} = 2 ms.

Figure 2 shows the ^{1}H-^{13}C HSQC-type spectra observed at two different contact times for the second CP transfers. Both spectra give satisfactory sensitivities even for the limited sample amount of 0.3 mg without any isotopic labeling due to sensitivity enhancement by ^{1}H indirect acquisition [1]. The spectra recorded at shorter contact time of 0.4 ms gives only directly bonded ^{1}H-^{13}C correlations, while that obtained with the longer contact time of 2 ms gives even inferior sensitivities except for methyl correlations. This is because of the suppression of ^{1}H-^{1}H dipolar interactions at ultrafast MAS, resulting in dipolar truncation during the second CP. The major internuclear interactions during CP at ultrafast MAS are recoupled ^{1}H-^{13}C dipolar interactions. These interactions do not commute each other, thus the strong interactions dominate the spin dynamics and weak interactions play only minor role (dipolar truncation) [2]. Thus magnetization is efficiently and quickly transferred for directly bonded ^{1}H-^{13}C pair due to suppression of magnetization leakage even at short contact time of 0.4 ms. Although the maximal magnetization transfer occurs at the contact time of 60 ~ 70 μs for typical ^{1}H-^{13}C pair, the ramp CP needs much longer contact time due to short efficient contact time. On the other hand, magnetization transfer between non-bonded ^{1}H-^{13}C pair is suppressed due to dipolar truncation. In addition to selective magnetization transfer between bonded ^{1}H-^{13}C, short CP further avoids the loss of magnetization due to $T_{1\rho}$ relaxation. The resultant efficiency after two-way magnetization transfer is typically more than 30%.

In the presentation, we will show the demonstration on several surface modified mesoporous silica. Notably Phenethyl-HMDS-MSN shows very long T_2 relaxation time, which enables ^{1}H-^{13}C HMQC-type measurements. The overall efficiency of two-way magnetization transfer is more than 60%, enabling 9 mins measurements at ^{13}C natural abundance.

[1] K. Mao, M. Pruski, *J. Magn. Reson.*, **201** (2009) 165-174.

[2] P. Paluch, T. Pawlek, J.-P. Amoureux, M.J. Potrzebowski, *J. Magn. Reson.* **233** (2013) 56-63.

L2-4 縦型NMR磁石を活用した普及型マウス用MRIとその応用

○拝師智之
株式会社エム・アール・テクノロジー（つくば市）

Imaging mice with using vertical superconducting magnets for NMR

○Tomoyuki HAISHI
MRTechnology, Inc., Tsukuba, Ibaraki, JAPAN

The number of small animal MRI scanners having a capability of imaging rats, is about 1,000 in the world, while the installation of human whole body MRIs is 20,000. Major reason of the limited popularity of the animal MRI scanners is, say, the cost of horizontal bore's superconducting magnets. On the other hands, vertical bore NMR systems are now commodity and the total installations are about 10,000 in the world. The NMR's vertical bore magnets have potentially high filed compared with imaging magnets because each has small bore. If we giving up the rat imaging and the horizontal bore for the scanners, we can avoid the problem of the cost for making a MR scanner for mice. Out motivation is to produce the simple mouse imaging system at low cost, which utilizes existing vertical NMR Magnets.

＜背景＞

超伝導磁石を使用した小動物用MRIは主にラットが撮像できることを必要条件として世界中に約1,000台広まった。成体ラットの撮像体位や、計測実施者による動物のハンドリングへの利便性を考慮して、ほとんど全ての専用装置は水平方向に開口が向いた横型MRIである。しかし今日に至っては、MRI装置の探求は別枠としても、大口径の横型超高磁場磁石を必要とする高価なMRIはコストの問題点から、今後の生命科学の発展に呼応した普及は見込めない。しかも現在の小動物用横型MRIは、多忙を極める生命科学の研究者が汎用機として使用するには図体が大きく成り過ぎている。

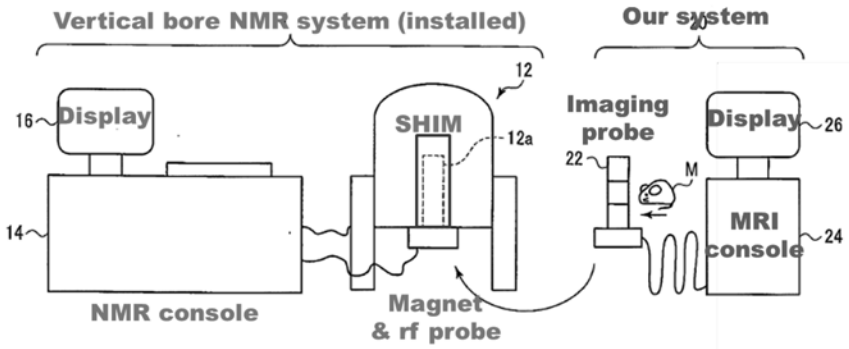


Fig.1. Concept of the mouse imaging unit which utilizing existing NMR systems

マウス用MRI，勾配磁場コイル，縦型NMR

○はいしともゆき

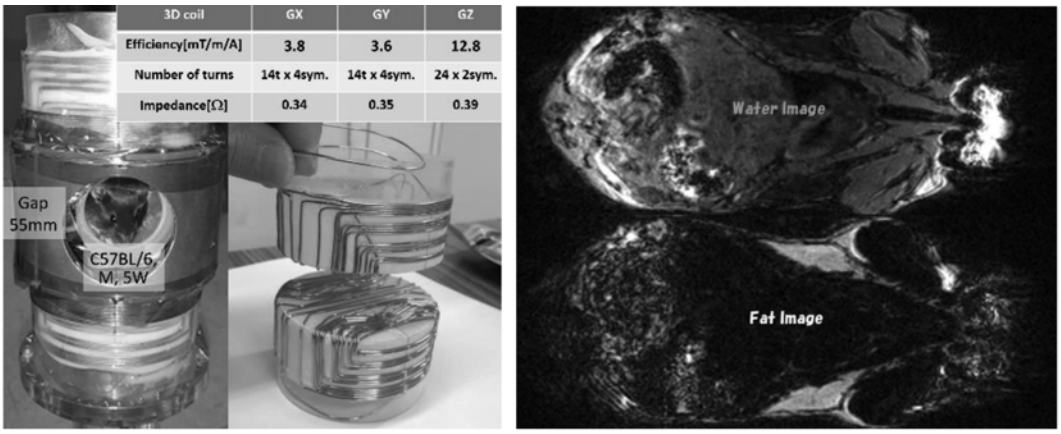


Fig.2. Three-axis cup-shaped gradient coil set and DIXON imaging result of a live mouse (C57BL, 31g) of prone position in a solenoid rf coil (35mmφ).

＜目的＞

生命科学における研究モデル動物はマウスが世界標準となっている。小動物用 MRI も、マウスよりも体の大きなラットを諦めてマウス専用 MRI とできれば、磁石の小口径化が可能であり磁石製造コストの劇的な圧縮が期待できる。また、小口径化は高磁場化に有利である。縦型 NMR 磁石は世界に約 10,000 台の量産品として普及し、マウス用 MRI の汎用化の可能性を有している。以上の状況の下、NMR と MRI の医学・生命科学への貢献を願い、Fig.1 に示す、縦型 NMR 磁石を活用したマウス用 MRI を開発したので代表的な結果を報告する。本研究開発プロジェクトは JST 先端計測分析技術・機器開発プログラム(H24 年 10 月 1 日～H27 年 3 月 31 日;期間 2.5 年)「超高磁場 NMR を活かすマウス用 MRI ユニットの開発」の支援によって遂行されている。

＜桶底対向型勾配磁場コイル、マウスの腹臥位撮像実験、および結果＞

Fig.2 左側に桶底型 2 個を対向させた三次元的な勾配磁場コイルを示す。2 次元構造の平板型勾配磁場コイルを 3 次元構造に拡張している。底面 70mmφ×壁面 30mm 高の巻枠に対してφ0.8mm の被覆銅線を使用し、GX/GY/GZ の勾配磁場効率は各 3.8/3.6/12.8 [mT/m/A]、直流抵抗値は各 0.34/0.35/0.39[Ω]であった。最適な電流線配置は ABC アルゴリズムによって求めた。

開発した桶底型 G コイル、縦型超伝導磁石(4.7T/89mm)、MRI コンソール(自社製, S7D, iPlus)、および rf コイル(分割ソレノイド型, 7 巻, φ35×40mm)を用いて、麻酔下マウス(C57BL, 31g, イソフラレン 1%)を 3D-GRE 法で撮像した。この撮像結果を Fig.2 右側に示す。DIXON 法(TR/TE/FA=100ms/4.88ms&4.2ms/90°, $(200\mu m)^3$)による水脂肪解析もマウスの頸部(紙面右方向)から臀部(紙面左方向)まで明瞭であった。

＜まとめ＞

マウス用 MRI の普及を目標とし、縦型 NMR 磁石を用いたマウス用 MRI の応用の一つとして、マウスの腹臥位撮像を可能とする桶底対向型三軸 G コイルを新開発した。4.7T/89mm ワイドボア磁石を用いた 3D-GRE 法による撮像実験の結果、成体マウスの腹臥位画像の取得に成功し、横型磁石による撮像の代替とできる機能が確認できた。測定対象はマウスに留まらず、材料や食品計測への展開も可能である。[結]

＊参考文献：NMR マイクロイメージング研究会 2014(金沢)予稿集

L2-5 7 T MRIによる二枚貝外套腔における水流の解析

○瀬尾 芳輝[1*]、瀬尾 絵理子[2]、村上政隆[3]、大石 和恵[4]、丸山 正[4]
[1]獨協医大、[2]大気海洋研、[3]生理研、[4]海洋研究開発機

Water flow in mantle cavity of bivalves analyzed by 7 T NMR microimaging

○Yoshiteru Seo[1,], Eriko Seo[2], Masataka Murakami[3], Kazue Ohishi[4], Tadashi Maruyama[4]
[1]*Dokkyo Medical University School of Medicine, Tochigi, Japan.*
[2]*Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo, Kashiwa, Japan.*
[3]*National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan.*
[4]*Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, Yokosuka, Japan*

Water flow inside shells of bivalves (*Mytilus galloprovincialis*) was measured by phase-contrast magnetic resonance imaging (MRI). Water entered from the inhalant aperture (40-20 mm s^{-1}), and filled in the lower mantle cavity. Then, water approached to the demibranches (5-10 mm s^{-1}). After passing through the lamellae to the upper mantle cavity, the water stretched the interlamellar cavity, and turned to posterior direction in the upper mantle cavity, and exhaled out from the exhalant siphon (50 mm s^{-1}). Dynamic changes in water velocity were imaged by using the inflow effect of T_1-weighted MRI. Spontaneous opening of the shells caused a quick increase of the flow in the mantle cavity within 1 min. There was a high correlation between the area in the inhalant aperture and that in the exhalant siphon. However, the flow in the interlamellar cavity showed a low correlation with that in the inhalant aperture. The flow in the right and left interlamellar cavities changed independently. These results suggested that the mussel controls the amount of flow by changing the area and region of active lateral cilia in the demibranches. In conclusion, a combination of PC-MRI and the inflow effect of T_{1w}-MRI allowed us to perform quantitative flow analysis in all of the cavities in the mussel.

哺乳類の脳脊髄液は側脳室· 第III脳室· 第IV脳室の脈絡叢上皮細胞で産生され、脳室からクモ膜下腔へ流れる。脈絡叢上皮細胞での脳脊髄液の分泌圧が、脳脊髄液流を生み出していると考えられてきた。しかし、脳室上衣細胞の運動性繊毛が欠如したり、運動性の低下したマウスが脳室の拡大する水頭症を発症することから、繊毛運動が水流を引き起こしているとの仮説が提案されている。しかし、ヒト中脳水道での脳脊髄液は、心周期に同期した±25 mm/sの流速変動を示し、脳室上衣細胞の繊毛が起こす水流の寄与は定かではない。一方、二枚貝の鰓の側繊毛（lateral cilia）は、鰓を透過

繊毛運動、二枚貝、水流

○せおよしてる，せおえりこ、むらかみまさたか、おおいしかずえ、まるやまただし

する水流をおこしていると考えられ、数多くの研究が行われている。そこで、海水性二枚貝を脳脊髄液水流研究の実験動物として使えるか検討した[1)]ので報告する。

【実験装置】

測定には、7 T AVANCE III マイクロイメージング装置（Bruker Biospin）にmicro2.5磁場勾配コイルと、25 mm径^{1}Hプローブを用いた。*Mytilus galloprovincialis*（ムラサキイガイ）を測定対象とし、プローブ内での海水温は22℃に維持した。この状態で24時間以上安定に測定できることを確認している[2)]。

【外套腔の水流測定】

外套腔内の水流速度と方向の測定には、flow-encoding gradient 法を用い、低速領域に最適化した。水流は、貝後部の入水管から入り、過外套腔に拡がりつつ前方に進む。順次、背側方向に向きを変え、4 枚の鰓葉に向けて流れ、鰓板の鰓糸間隙を通過する。鰓葉間腔では後方へ流れの方向を変え、上外套腔に集まり、出水管から放出された。入水管、下外套腔、鰓葉間腔、及び出水管での水流速は、各々、40-20、10-20、5-10、及び 50 mm/s であった [3)]。すべて層流であった。出水管での水流速度は、マイクロスフェア法などで報告された値の範囲であった。

【流れの時間変化の測定】

inflow artifact による T_1 強調画像の信号強度変化は、$I = A\{ 1 - \exp(-B \cdot V)\} + C$ と表される。ここで、A, C はフリップ角とスライス厚に依存し、B は T_1 と T_R（高周波パルス間隔）に依存する定数である。水流 $V = 0$ の場合、スライス面内の水の画像強度は短い T_R により繰り返し与えられる高周波によって、飽和し信号強度が減少する。しかし、スライス面に垂直方法の流れが生じると、スライス外から流入する水は飽和されないので水流速度に依存して信号強度が増加する。1.92 秒間隔で、入水管･出水管部位および房室弁部位の２スライスの、水流（$V \geqq 5$ mm/s）の連続測定が可能となった。鰓の水流開始時には、殻の開口から１分以内に定常状態の水流速度に到達した。また、入水管･出水管での水流変化は高い相関関係を示すが、鰓葉管腔とは相関が低く、左右の鰓葉管腔の水流は独立して制御されている場合を確認できた。以上より、二枚貝の鰓の側繊毛は、鰓板の局所毎に制御されていることが示唆された [3)]。

【まとめ】

以上より、海水性二枚貝は、脳脊髄液の水流の解析モデルとしての可能性がある。現在、水流の開始/停止時の水流動態についてデータ収集を行い、繊毛運動による流れの形成について解析を進めている。発表では、外套腔水流の経時的変化をmovieで供覧する。

【文献】

1) Knight K. Inside JEB: Mussels waft water with precision. *J Exp Biol.* 217:2223, 2014
2) Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y. Testing the constant-volume hypothesis by magnetic resonance imaging of the mussel heart in the *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Biol* 217: 964-973, 2014 (doi:10.1242/jeb.092577)
3) Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y. Magnetic resonance imaging analysis of water flow in the mantle cavity of live *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Biol.* 217:2277-2287, 2014 (doi:10.1242/jeb.101949)

L2-6 デオキシミオグロビンの鉄(Ⅱ)高スピン(S = 2)ヘムにおける特異な電子状態の解析

許 力揚[1], 西村 龍[1], 柴田友和[1], ○山本泰彦[1], 鈴木秋弘[2], 根矢三郎[3]
[1]筑波大院・数理物質
[2]長岡高専・物工
[3]千葉大院薬

Characterization of Elusive Electronic Sate of Ferrous High-Spin (S = 2) Heme in Deoxy Myoglobin

Liyang Xu[1], Ryu Nishimura[1], Tomokazu Sahibata[1],○Yasuhiko Yamamoto[1], Akihiro Suzuki[2], and Saburo Neya[3]
[1]*Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.*
[2]*Department of Materials Engineering, Nagaoka National College of Technology, Nagaoka, Japan.*
[3]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan.*

The heme electronic structures of deoxy myoglobins reconstituted with 7-PF and 2,8-DPF have been characterized by ^{19}F NMR. Analysis of temperature dependence of the paramagnetically-shifted ^{19}F signals allowed qualitative characterization of the thermodynamic properties of the equilibrium between spin quintet (S = 2) ^5E and $^5B_2$ states of hemes in the proteins.

INTRODUCTION Despite their physiological importance, deoxy forms of oxygen(O_2)-binding hemoproteins have been the least understood in terms of the molecular and electronic properties of their heme active sites. Heme Fe^{2+} in the deoxy protein adopts the high-spin d^6 system with the spin quantum number S = 2, and its ground state d-electron configuration still remains to be unveiled. The d-orbital splittings derived from ^5E, $(d_{xy})^1(d_{xz})^2(d_{yz})^1(d_{z^2})^1(d_{x^2-y^2})^1$ or $(d_{xy})^1(d_{xz})^1(d_{yz})^2(d_{z^2})^1(d_{x^2-y^2})^1$, and $^5B_2$, $(d_{xy})^2(d_{xz})^1(d_{yz})^1(d_{z^2})^1(d_{x^2-y^2})^1$, states for the heme complex (Figure 1) are close in energy, the contributions of these electronic states to the electronic and magnetic nature of deoxy protein have complicated the data interpretation in terms of structural features of its heme active site. We characterized the admixed d-electron configuration between ^5E and $^5B_2$ states of deoxy form of O_2 storage hemoprotein, myoglobin (Mb), reconstituted with trifluoromethyl group(CF_3)-substituted hemes, i.e., 7-PF [1] and 2,8-DPF [2] (Figure 2), deoxy Mb(7-PF) and deoxy Mb(2,8-DPF), respectively, through analysis of the temperature dependence of the paramagnetically-shifted ^{19}F NMR signals.

RESULTS AND DISCUSSION In the ^{19}F NMR spectra, two well-separated signals were observed at ~35 and ~50 ppm in each spectrum of the deoxy Mbs (Figures 2A and 2B). The unequal intensities of the signals in Figures 2B reflected the fractions of the two isomers due to the heme orientation disorder, i.e., heme is accommodated in the heme pocket of apoprotein with two possible orientations differing by 180° rotation about the 5-H-15-H axis, with respect to the protein. The assignments of these signals have been obtained by making use of the nature of the heme orientational disorder and characteristic paramagnetic shift pattern. Considering that the signals of diamagnetic carbon monoxide(CO)-bound proteins (Mb(CO)) were observed at ~30 ppm (Figures 2A' and 2B'),

Curie law, Heme electronic structure, Paramagnetic shift

しゅうりーやん、にしむらりゅう、しばたともかず、○やまもとやすひこ,
すずきあきひろ、ねやさぶろう

the values of ~5 and ~20 ppm were yielded for paramagnetic shifts of the signals of deoxy Mbs.

Plots of the observed shifts of the ^{19}F signals of deoxy Mb(2,8-DPF) against reciprocal of absolute temperature (Figure 3) demonstrated that the signal due to CF_3 at position 8 (8-CF_3) exhibited anti-Curie behavior, i.e., paramagnetic shift increases with increasing temperature as opposed to Curie behavior that paramagnetic shift decreases with increasing temperature, manifesting the occurrence of the thermal equilibrium between the ^5E and $^5B_2$ states. The plots of 8-CF_3 signal of the protein could be fitted using van't Hoff equation, $\ln K = \Delta H/RT + \Delta S/R$, where equilibrium constant $K = [^5B_2]/[^5E]$, in order to characterize the equilibrium. The fitting indicated that the ^5E state dominates over the $^5B_2$ one at ambient temperatures, and yielded the values of -22 ± 8 kJmol^{-1} and -67 ± 30 JK^{-1}mol^{-1} for ΔH and ΔS, respectively. Almost identical results were obtained through similar analysis of the ^{19}F signals of deoxy Mb(7-PF), i.e., the ΔH and ΔS values were determined to be -20 ± 4 kJmol^{-1} and -64 ± 10 JK^{-1}mol^{-1}, respectively. These results suggested that the thermal equilibrium between the ^5E and $^5B_2$ states of heme in deoxy Mb is independent of the number of CF_3 substitution.

In contrast to the plots of 8-CF_3 signal of deoxy Mb(2,8-DPF), those of 2-CF_3 one apparently obeyed Curie law (Figure 3). This result could be interpreted in term of delocalization of unpaired electron density from heme Fe atom to porphyrin π system. Paramagnetic shifts of the 2-CF_3 and 8-CF_3 signals depend primarily on the contact shifts due to unpaired electron density delocalized through d_{yz} and d_{xz} orbitals, respectively. The contact shift of the 2-CF_3 signal is essentially independent of the thermal equilibrium between the ^5E and $^5B_2$ states, because, irrespective of the states, one unpaired electron resides in d_{yz} orbital (Figure 1). In contrast, the contact shift of the 8-CF_3 signal is affected by the thermal equilibrium, because the number of unpaired electron in d_{xz} orbital is 0 in the ^5E state and 1 in the $^5B_2$ one. Hence the paramagnetic shift of the 8-CF_3 signal should be more susceptible to the equilibrium between the ^5E and $^5B_2$ states than that of the 2-CF_3 one.

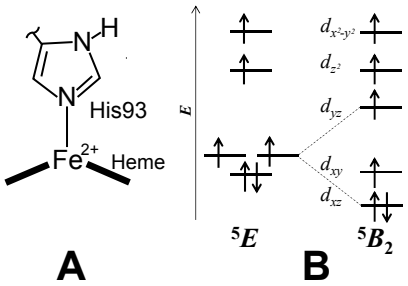


Figure 1. Coordination structure of heme Fe atom in deoxy Mb (A) and d-electron configurations of ^5E and $^5B_2$ states (B).

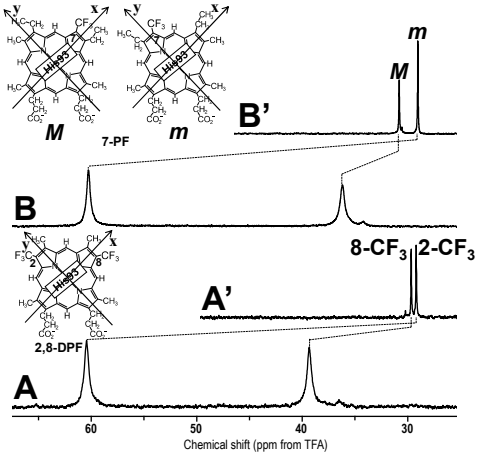


Figure 2. ^{19}F NMR spectra of (A) deoxy Mb(2,8-DPF), (A') Mb(2,8-DPF)CO, (B) deoxy Mb(7-PF), and (B') Mb(7-PF)CO at 25 °C in 90% H_2O/10% ^2H_2O at pH 6.5. Molecular structures of 2,8-DPF and 7-PF are shown in the inset. *M* and *m* represent two different 7-PF orientations differing by 180° rotation about the 5-H-15-H axis, with respect to the axial His93. Signal assignments are indicated in the spectra.

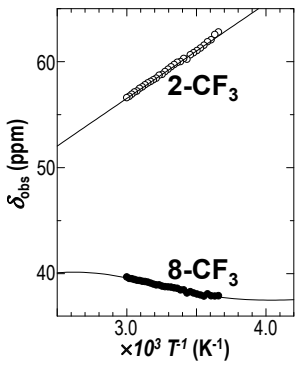


Figure 3. Plots of the observed shifts of the ^{19}F signals of deoxy Mb(2,8-DPF) against reciprocal of absolute temperature

REFERENCES

[1] H. Toi *et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1791-1792.

[2] T. Shibata *et al., J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6091-6098.

SL2-1 Protein dynamics in crowded environment

○Takanori Kigawa[1, 2]
[1]*RIKEN Quantitative Biology Center (QBiC), Yokohama, Japan.*
[2]*RIKEN Innovation Center (RInC), Yokohama, Japan.*

In actual biological cellular environment, biomolecules such as proteins are generally surrounded by high concentrations of macromolecules, so-called 'macromolecular crowding'. The effect of this macromolecular crowding is thought to strongly influence the structure and dynamics of the biomolecules. NMR spectroscopy is an ideal tool to analyze this effect because it is able to non-invasively observe the structural dynamics of biomolecules at atomic resolution. In order to elucidate cellular events at atomic resolution, we have been analyzing structural dynamics of biomolecules in the cellular environment mainly by using NMR spectroscopy. We have been also developing new NMR technologies for sample preparations, stable-isotope labeling, measurements, and data analyses to acquire unprecedented detail of the structural dynamics of biomolecules.

To further understand the structural dynamics of proteins in environments with molecular crowding, we are conducting detailed investigation of the NMR relaxation data of the model protein systems including those composed of extremely high concentrations of villin (32 mM) and/or protein G (16 mM) proteins. These systems were also analyzed by using all-atom molecular dynamics simulation in collaboration with Prof. M. Feig, Michigan State University, and Dr. Y. Sugita, RIKEN (1). During the course of the investigation, we found that the conventional model-free formalism is not adequate for NMR relaxation data of proteins in highly crowded environment. We have therefore developed a novel method of model-free analysis especially suitable for analyzing the data of proteins in macromolecular crowding environment. Our newly developed model-free analysis has been successfully applied to elucidate characteristic property of structural dynamics of proteins under macromolecular crowding environment.

Amino-acid selective SI labeling (AASIL) is particularly useful for analyzing difficult targets, such as large complex systems, low-solubility proteins, and proteins in actual biological cellular environment. We have developed a novel SI labeling strategy called Stable Isotope Encoding (SiCode), which is based on the idea that AASIL can be considered as an "encoding-and-decoding" process. SiCode introduces a new concept into AASIL, by enabling the combination with information techniques. For example, the robustness of SiCode can be improved by introducing the error detection mechanism using the check digit. We anticipate SiCode could be useful for analyzing difficult targets under challenging conditions.

1. Harada, R., Tochio, N., Kigawa, T., Sugita, Y., and Feig, M.: "Reduced Native State Stability in Crowded Cellular Environment Due to Protein-Protein Interactions", *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 3696-701 (2013).

Protein dynamics, Stable Isotope Labeling, Macromolecular Crowding

○Takanori Kigawa

SL2-2 *In situ* structural biology by NMR

Yutaka Ito[1,2]

[1]*Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Hachoiji, Tokyo, Japan*

[2]*CREST/JST*

In vivo observations of 3D structures, structural changes, folding stability, dynamics or interactions of proteins are essential for the explicit understanding of the structural basis of their functions inside cells. In-cell NMR [1] is currently the only approach that can provide structural information of proteins inside cells at atomic resolution. We have reported the first 3D protein structure calculated exclusively on the basis of information obtained in living *E.coli* cells [2,3]. The results opened new avenues for the investigation of proteins' conformations under the effect of macromolecular crowding and how they change in response to biological events in living environments.

Extending in-cell NMR to study proteins inside higher eukaryotic cells, and thus making this method more useful in medical and pharmaceutical researches, was another issue to be investigated. Inomata et al. and Ogino et al. introduced innovative methods for in-cell NMR studies in human cultured cells in which cell-penetrating peptides [4] or pore-forming toxin [5] have been used to deliver proteins into the cells. However, the low intracellular concentration of target proteins in HeLa cells makes it difficult to perform detailed NMR analyses, such as backbone/side-chain resonance assignments, collection of various structural information etc.

We will report our recent methodological developments/optimisations in stable isotope labelling of target proteins, extension of "life time" of cell samples by using the BIOREACTOR system [6], rapid measurement of multidimensional NMR spectra, improved data processing algorithms [7], and efficient structure calculations from limited structural constraints by employing the idea of the Inferential Structure Determination [8].

[Reference]

[1] Serber, Z. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2446-2447 (2001).

[2] Sakakibara, D. et al. *Nature* **458**, 102-105 (2009).

[3] Ikeya, T. et al. *Nat. Protoc.* **5**, 1051-1060 (2010).

[4] Inomata, K. et al. *Nature* **458**, 106-109 (2009).

[5] Ogino, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10834-10835 (2009).

[6] Kubo, S. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 1208-1211 (2013).

[7] Hamatsu, J. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1688-1691 (2013).

[8] Rieping, W. et al. *Science* **309**, 303-306 (2005).

in-cell NMR

SL2-3 Cell biology by optically detected magnetic resonance (ODMR) spectroscopy

Ryuji Igarashi[1], Yuta Kumiya[1,2], Takuma Sug[3], Shingo Sotoma[1], Kazuhiro Ikeda[4], Hitoshi Sumiya[4], Hidehito Tochio[1], Yohsuke Yoshinari[2,5] , Yoshie Harada[2], and Masahiro Shirakawa[1]

[1]Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Nishikyo-Ku, Kyoto 615-8510, Japan, [2]Institute for Integrated Cell-Material Sciences(WPI-iCeMS), Kyoto University, Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, [3]JST, PRESTO, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan, [4]Advanced Materials R&D Laboratories, Sumitomo Electric Industries, Ltd., 1-1-1, Koyakita, Itami, Hyogo, 664-0016, Japan, [5]JEOL Ltd., Akishima, Japan

The conformational changes macromolecules in cells and dynamic properties of cellular components, such as plasma membranes, cytoskeletons and organelle are coupled with and important for various cellular functions, including cellular responses to external signals. However, the conformational changes of molecules and molecular assemblies often take place as rotational movements of lobs, domains or subunits of molecules relative to the other parts. These structural changes alter rather little spacial distances between sites of molecule and their assemblies, but are associated with large orientation changes. For measuring dynamic properties of cellular components, tracking the orientations are practical.

We have constructed microscopes which enable to observe optically detected magnetic resonance (ODMR) spectroscopy. Then, by combining the ODMR microscope with an assembles of pulsed-magnetic field generator, we could determine the orientations of diamond particles. I will introduce several cell-biological applications in which nanodiamonds are used as probes.

ODMR, fluorescence, diamond

SL2-4

In-Cell Thermodynamics - Curvatures and transient interactions

Jens Danielsson
Dept. of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, Sweden

SOD1 aggregation and fibrillation kinetics *in vitro* mirrors with remarkable accuracy the spinal-cord aggregate build-up and disease progression in transgenic mice. This similarity between *in-vitro* and *in-vivo* data suggest that, despite the complexity of live tissue, SOD1 aggregation follows robust and simplistic rules, providing new mechanistic insights into the ALS pathology and organism-level manifestation of protein-aggregation phenomena in general.

SOD1 aggregation starts from the fully unfolded state, and although the principles of protein folding and stability are well explored under simplified conditions *in vitro*, it is yet unclear how these basic self-organisation events are modulated by the crowded interior of live cells. To find out, we used in-cell NMR to follow the thermal unfolding of a SOD1 variant protein inside living mammalian cells. Challenging the view from *in-vitro* crowding effects, we find that the cells destabilise the protein at 37 °C but with a conspicuous twist: while the melting temperature goes down the cold-unfolding increases, coupled to an augmented heat-capacity change. The effect seems induced by diffuse, sequence specific, interactions with the cellular components, acting preferentially on the unfolded ensemble.

However, not only the unfolded state undergoes transient interactions with the in-cell environment, affecting the physical-chemical properties of the protein. Also the folded state forms short-lived interactions with the surroundings, affecting rotational and translational diffusion. The transient contacts are modulated not only by overall net-charge, but also by charge distribution and surface topology.

SL2-5 In-cell NMR Spectroscopy of larger Proteins and Complexes

Robert Hänsel[1], Laura M. Luh[1], Sina Reckel[1], Ivan Corbeski[1], Frank Löhr[1], Lukas Trantirek[2] and Volker Dötsch[1]

[1]*Institute of Biophysical Chemistry, University of Frankfurt, Frankfurt, Germany*

[2]*Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic*

The non-invasive character of NMR spectroscopy allows researchers to investigate the conformation and dynamics of biological macromolecules in their natural environment, for example the cytoplasm of cells. In the past we have used in-cell NMR investigations to study several proteins as well as the behavior of telomeric DNA in different cellular systems. In addition to giving an overview of the field of in-cell NMR we will show data on two different systems.

The telomeric G-overhang is the 3' single stranded protrusion of double stranded telomeres and consists of repeating d(TTAGGG)n elements. These elements form G-quadruplexes, which however under different *in vitro* conditions can adopt several different conformations. In order to investigate which of these conformations is the biologically relevant conformation we have injected quadruplexes of different length into *Xenopus* oocytes or investigated them in oocytes extracts. These investigations revealed that G4 units coexist in two conformations, the hybrid-2 and the 2-tetrad antiparallel basket.

In addition, we have used in-cell NMR to investigate the behavior of Pin-1, a peptidyl-prolyl isomerase and show that the protein uses its WW domain to nonspecifically investigate other proteins as potential substrates. This non-specific interaction can be blocked by phosphorylation in the WW domain.

in-cell NMR

IL1

Recent Advances in Nanoscale MRI

Christian Degen[1]
[1]*Department of Physics, ETH Zurich, Zurich, Switzerland.*

Magnetic resonance imaging (MRI) is well-known from clinical medicine for providing noninvasive images of objects with three-dimensional resolution and rich image contrast. Although MRI is typically limited to micrometer-to-millimeter-sized samples, extension to voxels of a few $(nm)^3$ containing 10^4-10^6 nuclear spins has recently been reported by several techniques including magnetic resonance force microscopy [1] and diamond-based magnetometry with nitrogen-vacancy (NV) centers [2]. An especially worthwhile goal for such "nanoMRI" would be the direct imaging of the internal structure of macromolecules, like protein complexes, which would greatly aid molecular structure determination in biology. In this talk I will present our group's effort towards this goal.

In a first part I will introduce the basics of diamond-based spins sensors, and show how they can be applied to detect NMR signals. By reducing the distance between the NV center and target nuclei on the surface to a few nanometers, we find that it is possible to detect a few hundred, and more recently also single proton spins. I will further show how the local gradient of the NV electronic spin can be used to determine the spatial coordinates of individual protons. These results indicate that NV centers may be capable of mapping atomic positions in molecules up to ~10 nm in size. In a second part I will provide an outlook on an alternative nanoMRI technique, known as Magnetic Resonance Force Microscopy (MRFM), which is applicable to larger objects. I will briefly explain the principle of MRFM and show our effort to image the coarse structure of macromolecular assemblies on truly single entities.

[1] M. Poggio, and C. L. Degen, "Force-detected nuclear magnetic resonance: Recent advances and future challenges", Nanotechnology 21, 342001 (2010).

[2] R. Schirhagl, K. Chang, M. Loretz, and C. L. Degen, "Nitrogen-vacancy centers in diamond: Nanoscale sensors for physics and biology", Annu. Rev. Phys. Chem. 65, 83 (2014).

IL2

Solid-State NMR for Investigating Membrane-Curvature Induction by Viral Proteins

Hongwei Yao, Tuo Wang, Byungsu Kwon, and Mei Hong
Department of Chemistry, MIT, Cambridge, MA, USA

I will present our latest studies of the structure and dynamics of curvature-inducing membrane proteins and the development of chemical and biological methods for membrane-protein structure determination by solid-state NMR. Many proteins generate membrane curvature for function. Examples include viral fusion proteins and proteins that mediate virus budding and release. How protein structure underlies membrane-curvature generation is so far poorly understood. We are investigating the conformation, dynamics, and lipid interactions of two curvature-inducing membrane proteins: the fusion protein of the paramyxovirus PIV5, which catalyzes virus-cell membrane fusion, and the influenza M2 protein, which mediates membrane scission during virus release. ^{13}C and ^{15}N chemical shifts indicate that the fusion peptide (FP) and transmembrane (TM) domain of PIV5 adopt dramatically different conformations in different lipid membranes. ^{31}P NMR lineshapes and correlation spectra reveal that these conformations differ in their abilities to induce membrane curvature and dehydration, which are necessary for high-energy fusion intermediates, thus the multiple conformations have different functional relevance. We characterize the nature of the membrane curvature by solid-state NMR, supplemented by small-angle X-ray scattering, and propose possible FP and TM conformations involved in the hemifusion intermediate and post-fusion states.

To investigate how the influenza M2 protein generates membrane curvature for virus budding, we developed novel relaxation and correlation approaches involving oriented bicelles under static and off-magic-angle-spinning conditions. The data show that an amphipathic helix in M2 causes high membrane curvature and M2 is localized in this high-curvature domain. To determine the conformation of the cytoplasmic domain that encompasses the amphipathic helix, we have adopted a two-pronged approach, assigning and simulating the spectra of uniformly ^{13}C, ^{15}N-labeled full-length protein, as well as measuring site-specifically labeled proteins produced using chemical ligation. The results consistently indicate that the cytoplasmic domain is highly disordered, suggesting that binding to other virus proteins or membrane domains may play a significant role in M2 function.

Structural studies of membrane proteins at very low temperatures often suffer from significant line broadening. We have investigated a number of cryoprotectants for enhancing the spectral resolution of lipids and proteins down to ~200 K. Our results suggest three promising cryoprotectants, which have significantly better performances than the commonly used glycerol/water solution. Our data also provide insights into the molecular mechanism of line narrowing and structural ordering of peptides in lipid membranes at low temperature.

Acknowledgement: This work is supported by NIH grants GM066976 and GM088204.

HL1

NMR structural biology on transcription factors and chromatin-related proteins.

○Yoshifumi Nishimura

Graduate School of Medical Life Science、*Yokohama City University, Yokohama, Japan.*

Transcription is the most important process in gene regulation. Here, I will show our NMR works on transcription factors and chromatin-related proteins.

At first we worked on prokaryotic transcription factors, the osmolarity response regulator, OmpR (1,2) and the phosphate response regulator, PhoB (3-6), both are involved in well-known two component regulator systems in *E. coli*, as well as the purine biosynthesis feedback repressor, PurR (7). These proteins contain a DNA binding domain, which is essential and sufficient for binding to a specific DNA sequence, and a regulatory domain, which modulates the DNA-binding activity. We examined their specific DNA-recognition modes based on their complex structures of the DNA-binding domains bound to DNA, and their DNA-binding regulation mechanisms by their regulator domains.

Figure 1. NMR structure of the PhoB DNA-binding domain bound to pho box DNA.

We then worked on several eukaryotic transcription factors, a proto-oncogene product cMyb (8-10), which plays an essential role in the regulation of hematopoiesis, ATF-2 (9), which is activated by stress activated protein kinases, p38 and JNK and binds to the cyclic AMP responsive element (cre) DNA sequence, and neuron restrictive silencer factor (NRSF) or repressor element 1 (RE1) silencing transcription factor (REST) (12, 13), which is a master regulator of neuronal and glial fate specification acting at multiple levels of stem cell differentiation and is responsible for neurological diseases.

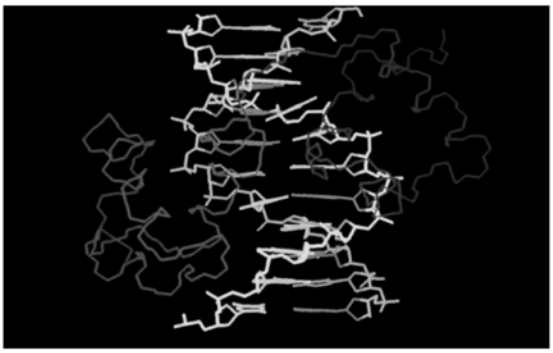
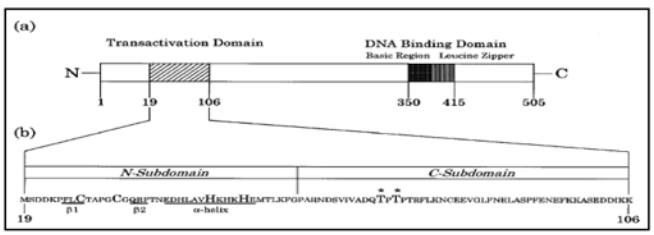


Figure 2. NMR structure of the cMyb DNA-binding domain bound to the Myb specific DNA sequence.



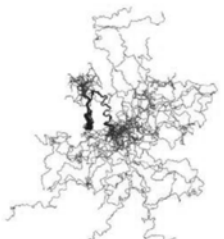


Figure 3. ATF2 domain structures (left) and superimposed NMR structures of the transactivation domain consisting of Zn finger-like and intrinsically disordered subdomains (right).

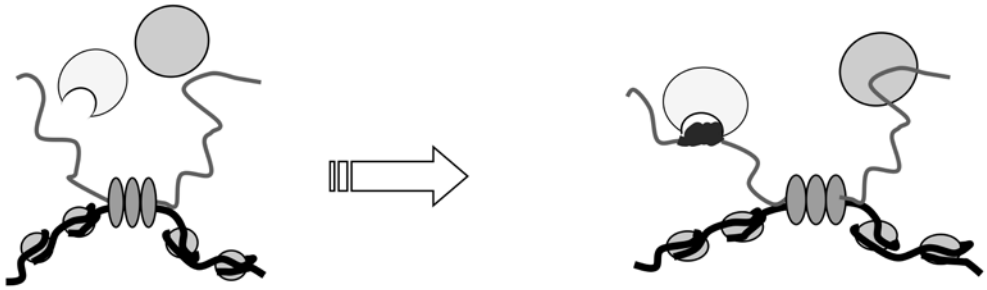


Figure 4. Schematic representation of a transcription factor, activator or repressor, consisting of N-terminal and C-terminal activation or repression domains, which are intrinsically disordered, and a DNA-binding domain bound to DNA in chromatin (left). Both regulation domains interact with coactivators or corepressors by a coupled folding and binding or string-like mode (right).

In addition we have examined a general transcription factor TFIIE (14-16), which plays important roles in preinitiation complex formation and activation of transcription, and the transition from initiation to elongation. TFIIE consists of a αβ heterodimer, both core domain structures were well determined (Fig. 5b and c). We found that the C-terminal acidic domain (CTAD) of TFIIEα bind to the PH domain of p62 subunit of TFIIH for recruiting TFIIH on the promoter and determined the complex structure of CTAD bound to the PH domain (16). Recently we have first revealed the complex structure of the phosphorylated p53 transactivation domain bound to the PH domain (17).

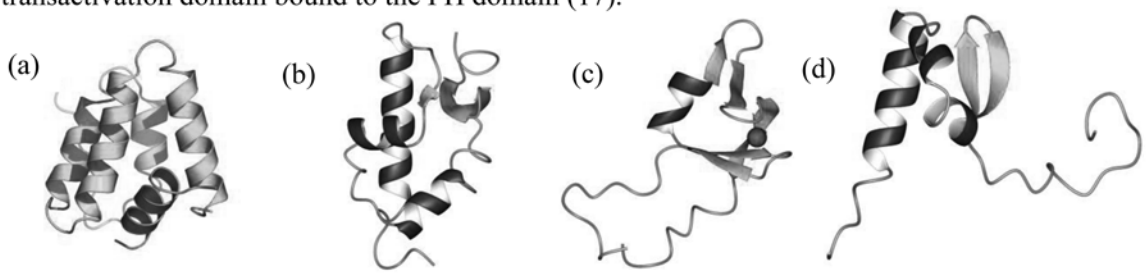


Figure 5. NMR structures of the repressor domain of NRSF/REST bound to the PAH1 domain of mSin3 corepressor (a), the core domain of TFIIEβ (b), the core domain of TFIIEα (c), and the C-terminal acidic domain of TFIIEα, which contains intrinsically disordered N-terminal tail (d).

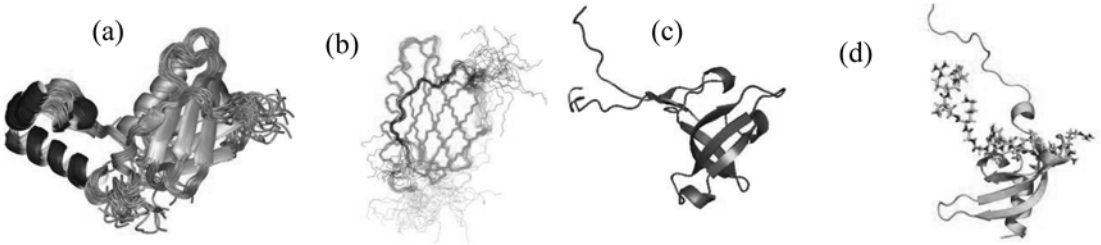


Figure 6. NMR structures of CTAD of TFIIE bound to the PH domain of THIIH (a), the phosphorylated p53 transactivation domain bound to the PH domain (b), the Esa1 chromodomain responsible for RNA binding (c), and Chp1 chromodomain bound to histone H3K9me responsible for non-coding RNA binding (d).

As for chromatin-related proteins, we have been studying essential telomere proteins, TRF1 and TRF2 (18-21), both of which are necessary for maintaining the ends of mammal chromosome. And also some choromodomain containing proteins associated with the

remodeling and manipulation of chromatin: Chd1 (22), Esa1 (23), Chp1 (24), Swi6, Eaf3, Clr4 and HP1. We are going into the structural study of chromatin itself and now examining interaction between histone H2AH2B and a histone chaperone, NAP1 by NMR.

References.

1. Tate, S., Kato, M., Nishimura, Y., Arata, Y. and Mizuno, T. Location of DNA-binding segment of a positive regulator, OmpR, involved in activation of the *ompf* and *ompc* genes of *Escherichia coli*. **FEBS Lett. 242**, 27-30 (1988).
2. Kondo, H., Nakagawa, A., Nishihira, J., Nishimura, Y., Mizuno, T. and Tanaka, I. *Escherichia coli* positive regulator OmpR has a large loop structure at the putative RNA polymerase interaction site. **Nature structural biology 4**, 28-31 (1997).
3. Okamura, H., Hanaoka, S., Nagadoi, A., Makino, K., and Nishimura Y. Structural Comparison of the PhoB and OmpR DNA-binding/transactivation Domains and the Arrangement of PhoB Molecules on the Phosphate Box. **J. Mol. Biol. 295**, 1225-1235 (2000).
4. Okamura, H., Makino, K., and Nishimura, Y. NMR Dynamics Distinguish Between Hard and Soft Hydrophobic Cores in the DNA-binding Domain of PhoB and Demonstrate Different Roles of the Cores in Binding to DNA. **J. Mol. Biol. 367**, 1093-1117 (2007).
5. Yamane, T., Okamura, H., Ikeguchi, M., Nishimura, Y., and Kidera, A. Water-mediated interactions between DNA and PhoB DNA-binding/transctivation domain: NMR-restrained molecular dynamics in explicit water environment. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics**, **71**, 1970-1983 (2008).
6. Yamane T, Okamura H, Nishimura Y, Kidera A, and Ikeguchi M. Side-chain conformational changes of transcription factor PhoB upon DNA binding: a population-shift mechanism. **J. Am. Chem. Soc., 132**, 12653-12659 (2010).
7. Nagadoi, A., Morikawa, S., Nakamura, H., Enari, M., Kobayashi, K., Yamamoto, H., Sampei, G., Mizobuchi, K., Schumacher, MA., Brennan, RG. and Nishimura, Y. Structural comparison of the free and DNA-bound forms of the purine repressor DNA-binding domain. **Structure 3**, 1217-1224 (1995).
8. Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: A helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. **Proc. Natl. Acsd. Sci. USA**, **89**, 6428-6432 (1992).
9. Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. **Cell 79**, 639-648 (1994).
10. Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Hojo, H., Yoshimura, S., Zhang, R., Aimoto, S., Ametani, Y., Hirata, Z., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain from c-Myb. **Nature structural biology 2**, 309-320 (1995).

11. Nagadoi, A., Nakazawa, K., Uda, H., Okuno, K., Maekawa, T., Ishii, S., and Nishimura, Y. Solution structure of the transactivation domain of ATF-2 comprising a zinc finger-like subdomain and a flexible subdomain. **J. Mol. Biol. 287**, 593-607 (1999).
12. Nomura, M., Uda-Tochio, H., Murai, K., Mori, N., and Nishimura, Y. The Neural Repressor NRSF/REST Binds the PAH1 Domain of the Sin3 Corepressor by Using its Distinct Short Hydrophobic Helix. **J. Mol. Biol.**, **354,** 903-915 (2005).
13. Higo, J., Nishimura, Y., and Nakamura, H. A Free-energy Landscape for Coupled Folding and Binding of an Intrinsically Disordered Protein in Explicit Solvent from Detailed All-atom Computations. **J. Am. Chem. Soc., 133**, 10448-10458 (2011).
14. Okuda, M., Watanabe, Y., Okamura, H., Hanaoka, F., Ohkuma, Y., and Nishimura Y. Structure of the central core domain of TFIIEβ with a novel double-stranded DNA-binding surface. **EMBO J**. **19**, 1346-1356 (2000).
15. Okuda, M., Tanaka, A., Arai, Y., Satoh, M., Okamura, H., Nagadoi, A., Hanaoka, F., Ohkuma, Y., and Nishimura, Y. A Novel Zinc Finger Structure in the Large Subunit of Human General Transcription Factor TFIIE. **J. Biol. Chem. 279**, 51395-51403 (2004).
16. Okuda, M., Tanaka, A., Satoh, M., Mizuta, S., Takazawa, M., Ohkuma, Y., and Nishimura, Y. Structural insight into the TFIIE/TFIIH interaction: TFIIE and p53 share the binding region on TFIIH. **EMBO J. 27**, 1161-1171 (2008).
17. Okuda, M. and Nishimura, Y. An Extended String Binding Mode of the Phosphorylated Transactivation Domain of p53. **J. Am. Chem. Soc.** Accepted for publication (2014).
18. Nishikawa, T., Nagadoi, A., Yoshimura, S., Aimoto, S., and Nishimura, Y. Solution structure of the DNA-binding domain of human telomeric protein, hTRF1. **Structure**, **6**, 1057-1065 (1998).
19. Hanaoka, S., Nagadoi, A., Yoshimura, S., Aimoto, S., Li, B., de Lange, T., and Nishimura, Y. NMR Structure of the hRap1 Myb Motif Reveals a Canonical Three-helix Bundle Lacking the Positive Surface Charge Typical of Myb DNA-Binding Domains. **J. Mol. Biol. 312**, 167-175 (2001).
20. Nishikawa, T., Okamura, H., Nagadoi, A., König, P., Rhodes, D., and Nishimura, Y. Solution Structure of a Telomeric DNA Complex of Human TRF1. **Structure 9**, 12237-1251 (2001).
21. Hanaoka, S., Nagadoi, A., and Nishimura, Y. Comparison between TRF2 and TRF1 on their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. **Protein Sci. 14**, 119-130 (2005).
22. Okuda, M., Horikoshi, M., and Nishimura Y. Structural Polymorphism of Chromodomains in Chd1. **J. Mol. Biol. 365**, 1047-1062 (2007).
23. Shimojo, H., Sano, N., Moriwaki, Y., Okuda, M., Horikoshi, M., and Nishimura, Y. Novel Structural and Functional Mode of a Knot Essential for RNA Binding Activity of the Esa1 Presumed Chromodomain. **J. Mol. Biol. 378**, 987-1001 (2008).
24. Ishida, M., Shimojo, H., Hayashi, A., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Uegaki, K., Nishimura, Y., Nakayama, J. Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing. **Mol. Cell 47**, 228-241 (2012).

HL2 Analytical and Biotechnological Applications of NMR

Ei-ichiro Suzuki
(Former) Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki; *(Present)* Japan Biological Informatics Consortium (JBIC) Research Institute; Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. of Tokyo, Tokyo; Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., Yokohama, Japan

In 1977, I started my NMR career in Central Research Lab., Ajinomoto Co., Inc., in which the environment of NMR utilization was well refined and maintained mainly by two great seniors Drs. Kainosho, M. and Nakamura, A. The latter pioneered NMR of amino acids and peptides with Jardetzky, O. I attended 17th Annual Meeting of the NMR Society of Japan in the next year for the first time, and admired the profundity of NMR. Although Varian's XL-100 was there, the apparatus I myself used at that time was Bruker's minispec P-20 (broad-line & pulsed; 20MHz) for research on evaluation of food texture. By attaching a mini-computer to it, an automatic recording system was developed for water content and T_2 measurements as continuous function of temperature. The advantage of that system was that high-sensitivity temperature measurement was possible with special device. Freezing-thawing hysteresis phenomena, such as (1) recrystallization of solute and freezing of released hydrated water molecules in frozen aqueous solutions, and (2) hysteresis as the characteristic feature of gels, and (3) super-cooling of capillary water in water-insoluble materials were analyzed [1].

Around in 1982, our company purchased 400MHz NMR from JEOL and I was responsible for the good use and maintenance. Soon after, I was ordered, in 1984, to stay and study at UCSF (Prof. Tom James Lab.). Pure absorption phase proton 2D NOE spectra at (Nicolet-GE's) 500 MHz were obtained for [d (5'ATATATATAT3')]$_2$ at several mixing times. The experimental spectra were compared with theoretical spectra calculated by using the complete relaxation matrix analysis method and X-ray determined coordinates of several forms of DNA and those of energy-minimized structures via AMBER. It was concluded that the wrinkled D form yields the best fit for the A-T decamer [2]. It is more impressive that no simplex crystal structural model was good for longer mixing time data and it was realized that it is necessary to introduce "conformation ensemble" concept. Later, the program MARDIGRAS developed based on this concept played an important role to understand significance of flexible region in enzymatic reaction. In 1987, I came back to the company. Although, as for structure determination of small molecules, taste modifiers (*kokumi* & *atsumi*) [3] and hypoglycemic agent metabolites [4] are profoundly memorable, I started to work mainly with two categories of macromolecules, i.e., polysaccharides (β-D-glucans such as lentinan [5]) and proteins (sweet proteins [6], interleukins [7], and enzymes) by using Bruker's 600MHz NMR, whose installation was not straightforward and therefore fantastic.

Being strongly influenced by a preprint from Prof. Rüterjans H. who was studying ribonuclease T1 (RNaseT1) with MARDIGRAS (Pfeiffer, S, Karimi-Nejad, Y, Rüterjans, H, *J Mol Biol.* **266**, 400-23 (1997)), the existence of a flexible region for substrate recognition by an enzyme was first discovered through a structure comparison study among RNase T1–related molecules (collaboration with Prof. Tanokura, M.), including intact molecules, those

complexed with 2'-guanylic acid (GMP), and carboxymethylated ones complexed with 2'-GMP. Next, it was demonstrated that a microbial transglutaminase (MTG) activity could be enhanced by identifying the flexible residues that affect the active site using NMR [8]. Finally, such an approach was used to increase the production of 5'-inosinic acid (5'-IMP) and 5'-GMP which are key materials of *umami* seasoning (*AJINOMOTO*®). The enzyme is a nonspecific acid phosphatase (NSAP) with pyrophosphate-nucleoside phosphotransferase activity that is C-5' position-selective. The crystal structure of G74D/I153T given by random mutation with a reduced K_M is virtually identical to that of the wild type, and the two regions around residues 70 and 140 show the most flexible conformational rearrangement upon phosphate analogue binding. On the basis of 3D structural information, some practical, high-performance enzymes for 5'-nucleotides production were discovered and a long cherished dream ("enzymatic production of nucleotides") was accomplished [9].

By the way, phosphorylation of His-containing proteins is a key step in the mechanism of many kinases and phosphatases. Hence collaborating with Russian Academy of Science, the GROMOS96 force field parameters for phosphoimidazole molecule---a realistic model of the phospho-His side chain were developed and resulting parameters were incorporated into the molecular modeling package GROMACS and used in molecular dynamics simulations of such a protein as NSAP in explicit solvent [10]. After the above mentioned success, engineering of Escherichia (E.) coli L-serine O-acetyltransferase, desensitization to feedback inhibition by L-cysteine became also successful using the similar approach [11]. Next, effectiveness of such approach was confirmed with activity improvement of MTG, in which the rational mutagenesis was named as water-accessible surface hot-space region-oriented mutagenesis (WASH-ROM)) [12]. In conclusion, as there is a common tendency between these cases, i.e. effective random mutation cites clustered on one side of the molecular surface, combined approach with rational mutation is favorable for activity improvement of enzymes.

On the other hand, around in 1992, a solid state NMR (CP-MAS) equipment was attached to the 400MHz machine and one more 400MHz for solution was installed. Through the above mentioned 20MHz NMR study, it became very clear that water proton signals disappear in two ways; one is in ice formation, and another is in glass transition of its hydrated materials. On the basis of this understanding, the change in molecular structure of the soy protein samples as a result of MTG (main ingredient of *ACTIVA*®, a texture providing formulation for e.g. *kamaboko*) treatment was studied using solid-state ^{13}C NMR spectroscopy, and the relation to the glass transition temperature (Tg) was examined. From NMR measurements, the structure of the local region of the Cα methine was observed to change, and the region had relatively high mobility, and the state of the secondary structure of a protein was suggested to be a key in determining its Tg [13]. Solid state NMR was also useful for analyzing crystal strucutures of glutamate and aspartame (a peptide sweetener) [14]. Another example of our NMR studies of enzymes for food processing is reaction mechanism elucidation and its product micro-imaging of α-glucosidase for cooking rice [15], and the structure of another important glutaminase, i.e. a protein glutaminase, could be determined by NMR only [16] (collaboration with Prof. Inagaki, F.).

In the stream of P. M. Obuchi's "millennium project" and establishment of the AIST along with government offices reorganization, Profs. Kyogoku-Shimada's project started and

the Japan Biological Informatics Consortium (JBIC) was established in the summer of 2000. Under such condition, collaborative investigation with Profs. Shimada, I. and Takahashi, H. produced the following valuable results: 1) Collagen-binding mode of vWF-A3 domain determined by a transferred cross-saturation experiment [17], 2) Direct determination of the insulin-insulin receptor interface using transferred cross-saturation experiments [18], 3) Rapid identification of protein-protein interfaces for the construction of a complex model based on multiple unassigned signals by using time-sharing NMR measurements [19], 4) Rapid identification of ligand-binding sites by using an assignment-free NMR approach [20].

In vivo NMR is also useful and important for biotechnology, i.e. fermentation. At first, by using a wide-bore 400MHz machine, we observed ^{31}P-NMR signals of intracellular phosphorylated metabolites, i.e. ATP, NADH and UDPG, in the aerobically cultured cells of a derivative of E. coli K-12 without circulating fermentation system (CFS), which needs much more cells. Each NMR spectrum was obtained with a 25 mm Φ sample tube mini-fermenter equipped with a pH electrode and three supply routes for O_2 gas, aqueous ammonia and glucose. When glucose was consumed, ^{31}P-NMR signals of ATP disappeared first and then those of ADP decreased to below the limit of detection. The intracellular concentration of ATP was estimated to be ca. 7 mM [21]. Second, to determine the actual potential of the energetic conversion efficiency of E. coli during aerobic respiration, apparent P/O ratios under either limited or standard glucose-feeding conditions were estimated. CFS was developed, and ^{31}P NMR saturation-transfer techniques were employed. By coupling with on-line NMR observations, CFS allowed us to evaluate cellular energetics directly [22].

In U.S.A. of 2008, it was reported that certain lots of other's heparin were associated with an acute, rapid onset of serious side effects indicative of allergic reaction, and ^{1}H NMR is one of the convenience but strong analytical methods to identify a contaminant in heparin. However, an NMR signal from the contaminant in some cases was overlapped with a satellite peak from heparin, leading a misunderstanding of the presence of the contaminant. Therefore, we showed the satellite peak observed close to the NMR signal of the contaminant, and recommended the ^{13}C decoupling NMR to discriminate the satellite peak from the contaminant [23]. As for satellite peak demonstration, we'd like to appreciate immediate approval by Prof. Nishimura, Y. for our use of NMR machines with several frequencies.

Main References of NMR & Computational Sciences:

1. Suzuki, E and Nagashima, N, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 2730-2733 (1982); *Chem. Lett.*, **1981**, 181-184 (1981) & p247-64, Water Activity: Influence on Food Quality (The Proceedings of ISOPOW II organized by Arai, S), ed. by Rockland, LB & Stewart, GF (Academic Press, London, 1981); *Appl. Spectrosc. Rev.*, **20**, 1(1984).
2. Suzuki, E, Pattabiraman, N, Zon, G, and James, TL, *Biochemistry*, **35**, 8329-8334 (1986).
3. *(Atsumi)* Shima, K, Ishikawa, K, Izawa, K, and Suzuki, E, *Analytical Sciences*, **14**, 1185-1186(1998); *(kokumi)* Kuroda, M, Ohtake, R, Suzuki, E, and Harada, T, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 6317-24(2000).
4. *(Nateglinide)* Takesada, H, Matsuda, K, Ohtake, R, Mihara, R, Ono, I, Tanaka, K, Naito, M, Yatagai, M, and Suzuki, E, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **4**, 1771-1781(1996).
5. Miyano, H and Suzuki, E, *Analytical Sciences*, **8**, 561-564(1992).
6. *(Monellin)* Mizukoshi, T, Kohmura, M, Suzuki, E, and Ariyoshi,Y, *FEBS Lett.*, **413**, 409-416(1997);

(Curculin) Kurimoto, E, Suzuki, M, Amemiya, E, Yamaguchi, Y, Nirasawa, S, Shimba, N, Xu, N, Kashiwagi, T, Kawai, M, Suzuki, E, Kato, K, *J Biol Chem.* **282**, 33252-6(2007).

7. *(His microenvironments of IL-2; 400MHz with MS)* Miyano, H, Suzuki, E, Akashi, S, Furuya, M, Tsuji, T, Hirayama, K, and Nagashima, N, *Analytical Sciences*, **5**, 759-761(1989); *(IL-6 & modeling)* Sumikawa, H, and Suzuki, E, *Chem. Pharm. Bull.*, 46, 136-138(1998).
8. Shimba, N, Shinohara, M, Yokoyama, K, Kashiwagi, T, Ishikawa, K, Ejima, D, Suzuki, E, *FEBS Lett.* **517**, 175-179 (2002).
9. Suzuki, E, Ishikawa, K, Mihara, Y, Shimba, N, and Asano, Y, *Bull. Chem. Soc. Jpn.,* **80**, 276–286 (2007) (Award Acc.: The Chemical Society of Japan Award for Technical Development for 2004).
10. Kosinsky, YA, Volynsky, PE, Lagant, P, Vergoten, G, Suzuki, E, Arseniev, AS, Efremov, RG, *J Comput Chem.*, **25**, 1313-21 (2004).
11. Kai, Y, Kashiwagi, T, Ishikawa, K, Ziyatdinov, MK, Redkina, EI, Kiriukhin, MY, Gusyatiner, MM, Kobayashi, S, Takagi, H, Suzuki, E, *Protein Eng. Des Sel.*, **19**, 163-7 (2006).
12. *(Mutation)* Yokoyama, K, Utsumi, H, Nakamura, T, Ogaya, D, Shimba, N, Suzuki, E, Taguchi, S, *Appl Microbiol Biotechnol.* **87**, 2087-96 (2010); *(Simulation)* Tagami, U, Shimba, N, Nakamura, M, Yokoyama, K, Suzuki, E, Hirokawa, T, *Protein Eng Des Sel.* **22**, 747-52(2009); *(Enz. Label.)* Shimba, N, Yamada, N, Yokoyama, K, and Suzuki, E, *Anal. Biochem*., **301**, 123-127 (2002); *(High Expression with Corynebacterium)* Shinagawa M, Shimba N, Mizukoshi T, Arashida N, Yamada N, Kikuchi Y, Suzuki E, *Anal Biochem.* **344**, 281-3 (2005).
13. Mizuno, A, Mitsuiki. M, Motoki, M, Ebisawa, K, Suzuki, E, *J Agric Food Chem.* **48**, 3292-7 (2000).
14. *(Glutamate)* Nishimura, K, Ebisawa, K, Suzuki, E, Saito, H, and Naito, A, *J. Mol. Struc.* **560**, 29-38 (2001); *(Aspartame)* Ebisawa, K, Nagashima, N, Fukuhara, K, Kumon, S, Kishimoto, S, Suzuki, E, Yoneda, S, and Umeyama, H, *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 708-715 (2000).
15. Shimba, N, Shinagawa, M, Hoshino, W, Yamaguchi, H, Yamada, N, Suzuki, E, *Anal Biochem.* 393, 23-8(2009).
16. Kumeta, H, Miwa, N, Ogura, K, Kai, Y, Mizukoshi, T, Shimba, N, Suzuki, E, Inagaki, F, *J Biomol NMR.* **46**, 251-5(2010).
17. Nishida, N, Sumikawa, H, Sakakura, M, Shimba, N, Takahashi, H, Terasawa, H, Suzuki, E, Shimada, I, *Nat Struct Biol.*, **10**, 53-8 (2003); Tsukuba Foundation for Chemical and Bio-Technology Award, 2005.
18. Nakamura, T, Takahashi, H, Takahashi, M, Shimba, N, Suzuki, E, Shimada, I, *J Med Chem.*, **53**, 1917-22 (2010).
19. Kodama, Y, Reese, ML, Shimba, N, Ono, K, Kanamori, E, Dötsch, V, Noguchi, S, Fukunishi, Y, Suzuki, E, Shimada, I, Takahashi, H, *J Struct Biol.* **174**, 434-42 (2011).
20. Kodama, Y, Takeuchi, K, Shimba, N, Ishikawa, K, Suzuki, E, Shimada, I, Takahashi, H, *J Med Chem.,* **56**, 9342-50 (2013).
21. Takesada, H, Ebisawa, K, Toyosaki, H, Suzuki, E, Kawahara, Y, Kojima, H, Tanaka, T, *J Biotechnol.,* **84**, 231-6 (2000).
22. Noguchi, Y, Nakai, Y, Shimba, N, Toyosaki, H, Kawahara, Y, Sugimoto, S, Suzuki, E, *J Biochem.* **136**, 509-15 (2004).
23. Yamaguchi, H, Shinagawa, M, Shimba, N, Miyano, H, Suzuki, E, *Yakugaku Zasshi*. **128**:1513-5 (2008).

IL3

Substrate- and Ligand-Modulated Conformational Dynamics of Membrane Solute Carriers Revealed by NMR

Sven Brueschweiler[1], Qin Yang[1], Marcelo J. Berardi[1], and James J. Chou[1,2]

[1]*Harvard University Medical School, Boston, USA*

[2]*National Center for Protein Science, Shanghai, China*

A key aspect of membrane transport proteins is the dynamic coupling between solute binding and protein conformational switch that facilitates solute translocation across the membrane. With rapid growth of crystal structures capturing various states of transporters and advances in molecular dynamics simulation, it is increasingly feasible to address conformational dynamics of transporters by computational means. But, experimental observation of ligand modulated dynamics and allostery of membrane transporters is still technically limited. Here, we demonstrate the use of the latest NMR methods to investigate the function and mechanism of mitochondrial solute carriers including the uncoupling protein (UCP) and the ADP/ATP carrier (AAC). Our structural and titration measurements of UCP2 characterized the mechanism by which UCP uses fatty acid to transport protons across the mitochondrial inner membrane to generate heat (Figure 1). Furthermore, our R_2 relaxation dispersion measurements of the AAC revealed how transporting substrate can modulate the dynamics of interconversion between the two alternating access states of the transporter.

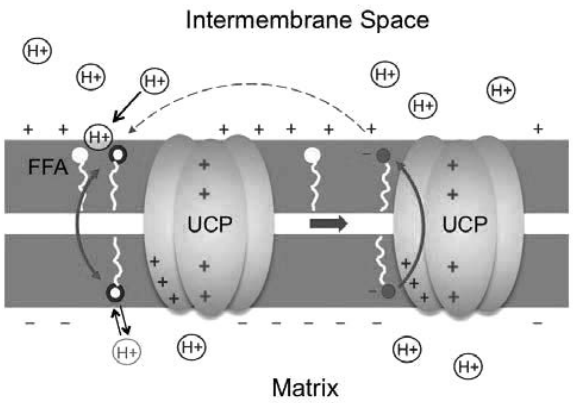


Figure 1. Interplay among UCP, fatty acid, and GDP in modulating H^+ translocation across the mitochondrial inner membrane

IL4

Magnetic Resonance Imaging in Real Time

Jens Frahm[1]

[1]*Biomedizinische NMR Forschungs GmbH am Max-Planck-Institut fuer biophysikalische Chemie, Goettingen, Germany*

This lecture presents recent advances towards real-time magnetic resonance imaging (MRI) which result in high-quality image series of dynamic processes with acquisition times of only 20 to 40 milliseconds.

The acquisition technique employs a radially encoded gradient-echo sequence (spoiled, refocused or fully balanced gradient conditions) with up to 30-fold data undersampling and the use of complementary sets of radial spokes in successive frames. Image reconstruction of multi-coil data is accomplished with the use of an iterative algorithm which jointly estimates the image and all coil sensitivities as the solution of a nonlinear inverse problem. The basic approach therefore emerges as an advanced reconstruction technique for parallel imaging. However, in order to properly solve the ill-conditioned problem for high degrees of undersampling, it becomes temporally regularized by exploiting the continuity of successive frames within an image series. Online image reconstruction and visualization is accomplished by a highly parallelized version of the algorithm and its implementation on a bypass computer equipped with 8 graphical processing units which could be fully integrated into a commercial MRI system (invisible to the user).

Apart from a description of the acquisition and reconstruction technique, the talk will cover a variety of experimental examples ranging from joint dynamics to speaking and swallowing processes as well as access to turbulent flow. Most importantly, real-time MRI largely facilitates the immediate physiologic monitoring of cardiovascular function and quantitative blood flow without the need for ECG synchronization and during free breathing or in response to specific protocols (e.g., pressure, stress, exercise).

Selected references:

M. Uecker, S. Zhang, D. Voit, A. Karaus, K.D. Merboldt, J. Frahm. Real-time MRI at a resolution of 20 ms. *NMR Biomed.* **23**, 986-994 (2010).

S. Zhang, A. Olthoff, J. Frahm. Real-time magnetic resonance imaging of normal swallowing. *J. Magn. Reson. Imaging* **35**, 1372-1379 (2012).

A. Niebergall et al. Real-time MRI of speaking at a resolution of 33 ms: Undersampled radial FLASH with nonlinear inverse reconstruction. *Magn. Reson. Med*. **69**, 477-485 (2012).

D. Voit et al. Real-time cardiac MRI at 1.5 T using balanced SSFP and 40 ms resolution. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 15, 79 (2013).

A.A. Joseph et al. Real-time flow MRI of the aorta at a resolution of 40 ms. *J. Magn. Reson. Imaging* **40**, 206-213 (2014).

S. Zhang et al. Real-time MRI of cardiac function and flow – Recent progress. *Quant. Imaging Med. Surg.,* doi: 10.3978/j.issn.2223-4292.2014.06.03 (2014).

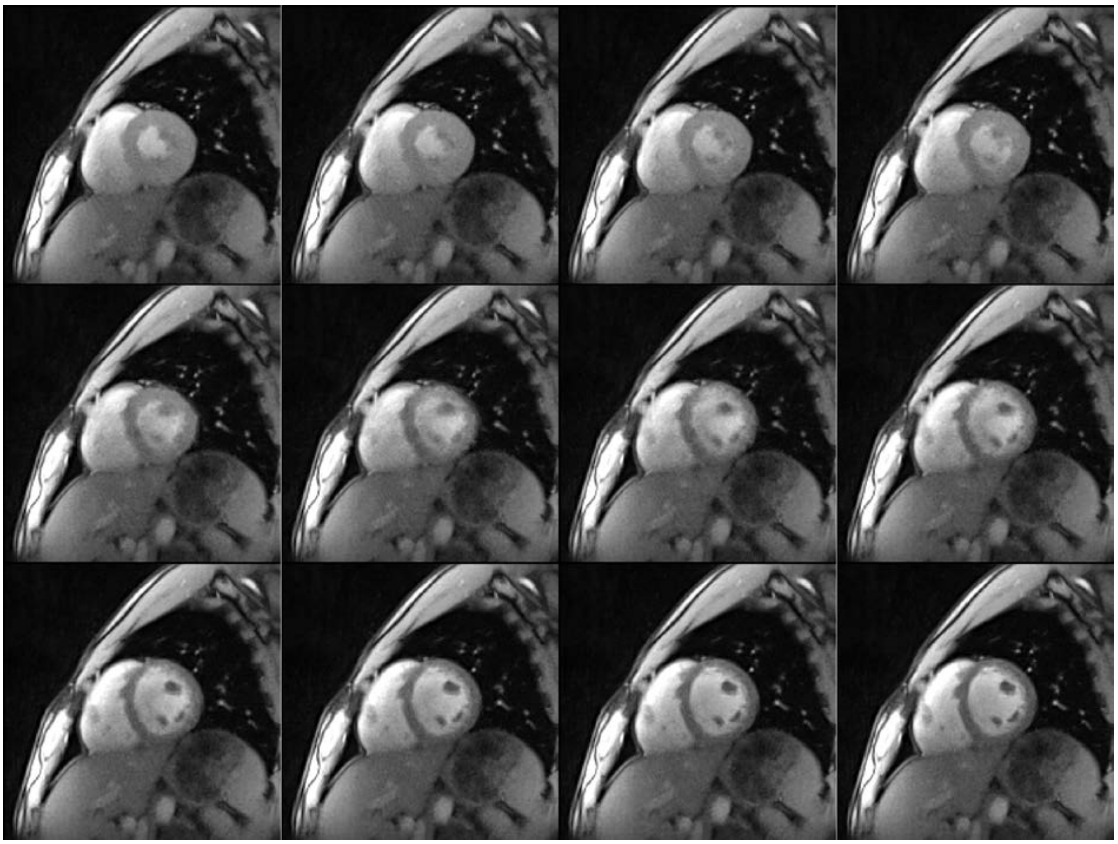


Figure 1 Real-time MRI of the human heart in a short-axis view – consecutive frames (top left to bottom right) from a respective movie at 33 ms temporal resolution (30 fps) and 1.5 mm in-plane resolution (6 mm slice thickness). The images represent a single cardiac cycle from peak systole (top left) to early diastole (bottom right) demonstrating the rapid post-systolic expansion of the contracted and thickened myocardium.

IL5

Metabolism and Microarchitecture From Advanced ^{1}H and ^{13}C NMR Spectroscopy and Imaging

Noam Shemesh,[1] Jens T Rosenberg,[2] Jean-Nicolas Dumez,[1] Avigdor Leftin,[1] Tangi Roussel,[1] Rita Schmidt,[1] Hadassa Degani,[1] Samuel C. Grant[2] and Lucio Frydman[1,2]

[1]*Weizmann Institute, Rehovot, Israel*
[2]*National High Magnetic Field Lab, Tallahassee, Florida, USA*

Sensitivity remains a crucial problem to overcome in nuclear magnetic resonance spectroscopy (MRS) and spectroscopic imaging (MRSI). *In vivo* MRS and MRSI seek to exploit the unique fingerprints that metabolites residing in tissues –usually at $<10^{-4}$ lower abundances than water– can provide in a non-invasive fashion. Performing such measurements with good sensitivity could be crucial to understand the structural, functional, metabolic and energetic changes associated to health and disease. Substantial obstacles arise, however, when attempting to mine this low-sensitivity information; this talk will focus on two emerging, complementary ways to overcome MRS and MRSI's sensitivity challenges. One originates in relaxation-enhanced 1H techniques that solely excite the peaks of interest, while keeping scrupulously clear of water. When executed at ultrahigh magnetic fields, distortion-free *in vivo* ^{1}H MRS traces delivering >50:1 signal-to-noise ratios in under 6 sec, can be obtained from 125 uL brain volumes. This is orders of magnitude more efficient than what is currently available from state of the art commercial instruments and standard sequences (Figure 1). The new kind of microarchitectural and biochemical aspects that this kind of sensitivity can provide, will be exemplified. A second route to sensitivity enhancement is offered by *ex situ* Dynamic Nuclear Polarization of slowly-relaxing ^{13}C sites. Due to its reliance on the observation of highly polarized but metastable nuclear states, the full utilization of DNP's potential calls for the development of new, fast acquisition strategies. These will be discussed, and exemplified within *in vivo* metabolic and functional contexts.

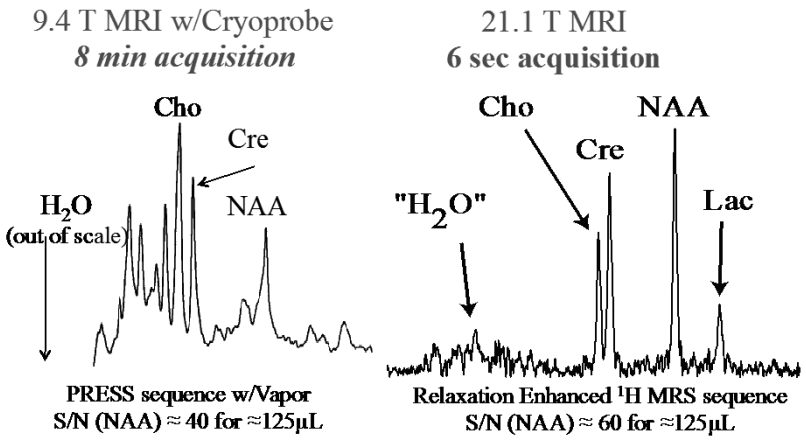


Figure 1. Comparison between a state-of-the-art 1H MRS acquisition using conventional sequences and fields (left) and one of the new sequences to be discussed, executed at NHMFL's 21.1 T MRI User Facility. Notice the different acquisition timescales.

IL6

Solid State NMR of Disease-Associated Proteins: Methods and Results

Marvin Bayro, Jun-Xia Lu, Eric Moore, Dylan Murray, Alexey Potapov, Kent Thurber, Wai-Ming Yau, and Robert Tycko

Laboratory of Chemical Physics, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America

Our research group works on the development of solid state NMR methods for structural studies of biological systems and on the application of solid state NMR to specific systems that are of biophysical interest and biomedical importance. In this lecture, I will summarize recent progress on molecular structures of amyloid-β (Aβ) fibrils associated with Alzheimer's disease and capsid (CA) protein assemblies associated with HIV-1 infectivity. I will also briefly describe methods we have developed for making site-specific, quantitative structural measurements in uniformly ^{15}N,^{13}C-labeled proteins in the solid state, methods for computer-assisted assignment of chemical shift values in multidimensional spectra of uniformly-labeled proteins, new technology for solid state NMR measurements with magic-angle spinning (MAS) and dynamic nuclear polarization (DNP) at very low temperatures, and recent contributions to our understanding of DNP mechanisms under MAS.

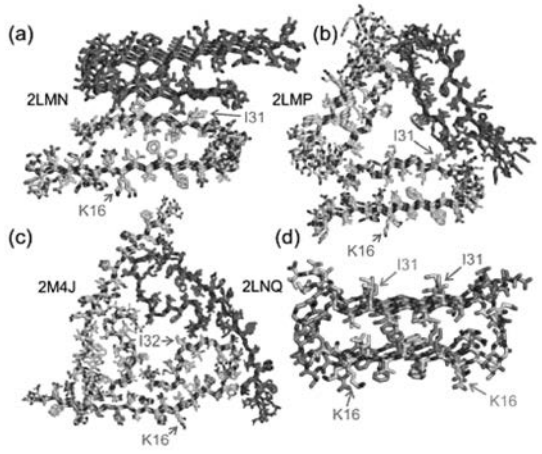


Figure 1. Structural models for Aβ fibrils, viewed in cross-section.

In the area of Aβ fibril structure, we have developed detailed molecular structural models for two distinct polymorphs of 40-residue Aβ (Aβ40) fibrils prepared *in vitro* (Figure 1a,b), one Aβ40 polymorph that was derived from brain tissue of an Alzheimer's disease patient (Figure 1c), and a metastable "protofibril" formed by the disease-associated Asp23-Asn mutant of Aβ40 (Figure 1d). We are currently investigating other structures from human tissue, in part to determine whether variations in Aβ fibril structures are correlated with variations in disease development.

In the area of HIV-1 CA assemblies, we have obtained nearly complete chemical shift assignments for the 231-residue wild-type CA protein in tubular assemblies, allowing us to identify structurally ordered protein segments, disordered and dynamical segments, and segments that undergo conformational changes within CA assemblies. Recent comparisons of solid state NMR data for tubular CA assemblies with data for planar assemblies, formed by the Arg18-Leu mutant of CA, show that the variable surface curvature of these assemblies arises from conformational variations within the disordered and dynamical segments.

Our ultra-low-temperature MAS NMR experiments are motivated by the goal of using solid state NMR to characterize transient intermediates in processes such as protein folding, protein aggregation, and protein-protein recognition. Transient intermediates can be trapped by rapid freezing and subsequently studied by ultra-low-temperature solid state NMR, but the low protein concentrations require sensitivity enhancements from DNP. For this purpose, we have designed and built MAS NMR probes that use liquid helium for sample cooling (20-25 K range) and nitrogen gas for sample spinning (up to 7 kHz with 4 mm diameter rotors and 80 μl sample volumes). With microwave powers in the 0.7-1.4 watt range at 264 GHz (9.4 T magnet), enhancement factors of 50-200 for cross-polarized ^{13}C NMR signals are achieved (Figure 2). Initial results from studies of the Aβ40 aggregation process will be presented.

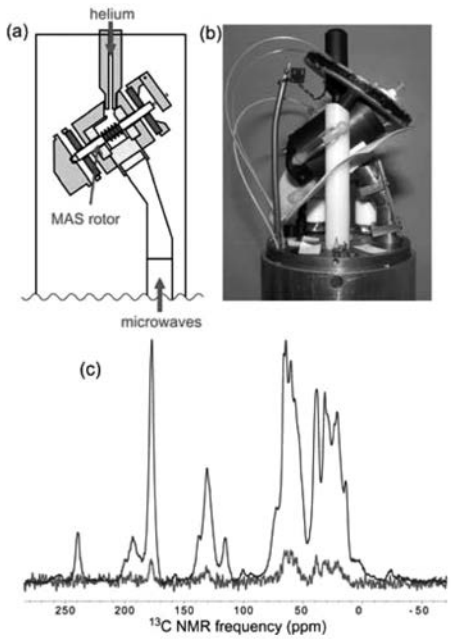


Figure 2. Ultra-low-temperature DNP-enhanced MAS NMR. (a,b) Schematic diagram and photograph of the head of the ultra-low-temperature MAS DNP probe. (c) ^{13}C MAS NMR spectrum of ^{13}C-labeled M13 peptide bound to calmodulin in frozen solution, with and without microwave irradiation (4 and 64 scans, respectively).

第三日目
11月6日（木）
日本語／英語セッション

Day 3 (Nov. 6, Thu)
(Japanese/English Sessions)

L3-1

Error analysis of NMR parameters in equilibrium systems

○ Rieko Ishima

Department of Structural Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15260, USA.

Recently, advances in NMR technologies have tremendously increased the sensitivity of NMR relaxation experiments, which also emerges systematic errors more prominently. Thus, we are studying NMR relaxation experiments and analysis of the ligand-protein titration data from the aspect of the error analysis.

Since NMR relaxation rates depend on the magnetic field strength, as well as the relaxation mechanism, it is important to optimize and validate relaxation experiments and their analysis under a wide variety of conditions. Previously, we characterized effect of cross-correlation between ^{1}H-^{15}N dipolar interaction (DD) and ^{15}N chemical shift anisotropy (CSA) in the {^{1}H}-^{15}N NOE experiment at high magnetic field strength [1]. Subsequently, we have studied off-resonance error in the ^{15}N transverse relaxation rate (R_2) determined using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sequence and that in the dispersion, and validated the performance of the CPMG sequence with and without an alternative phase cycle (Figure 1) [2-4].

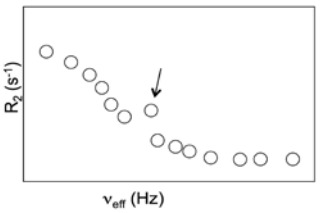


Figure 1. A cartoon of CPMG R_2 dispersion experiments. The data points that are significantly deviated from the curve is often due to the off-resonance error

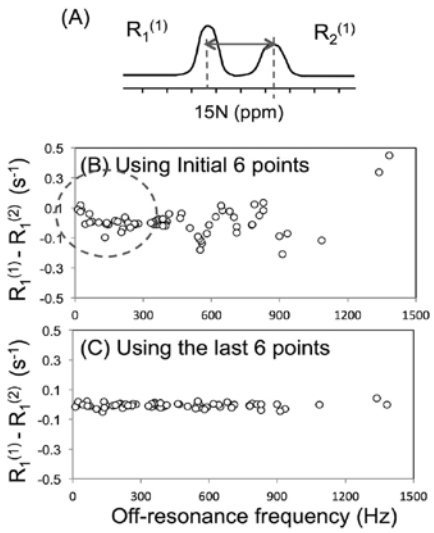


Figure 2. ^{15}N $R_1^{(1)} - R_1^{(2)}$ of ^{15}N labeled perdeuterated ubiquitin, shown as a function of ^{15}N off-resonance frequency. R_1 was determined at 900 MHz using (A) the initial 6 points, and (B) the last 6 points. Reduction of $R_1^{(1)} - R_1^{(2)}$ was observed *even around* the ^{15}N carrier frequency due to the imperfection of the cancellation of the cross correlation, but not only by the pulse imperfection.

We also re-investigated performance of the ^{15}N longitudinal relaxation rate (R_1) experiment with a focus on error generated by sources other than the water-amide ^{1}H exchange. Since ^{15}N R_1 mainly decreases as magnetic field strength increases, it is subject to pronounced systematic errors at high magnetic field strengths. We demonstrated decrease in the effectiveness of cancellation of the cross correlation effect between ^{1}H-^{15}N DD and ^{15}N CSA at high magnetic field strength by monitoring the $R_1^{(1)}$-$R_1^{(2)}$ (Figure 2) [5].

Rieko Ishima

○いしまりえこ

High sensitivity of the current NMR instruments also emerges systematic errors in the chemical shifts more prominently: the importance of uncertainty and systematic error estimation is not limited to NMR relaxation rates. Using the currently available NMR instruments, such as 600 MHz or above, changes in chemical shifts, even at about 10 Hz, can be easily detected with sufficient accuracy of resolution (<< 10 Hz, i.e., < 0.02 ppm for ^{1}H at 600 MHz) these days. Because of this, chemical exchange that reflects minor events other than the major (desired) interaction pathway may be detected as well as the major pathway in the fast exchange systems. Such minor events might include non-specific interactions or artifact due to precipitation of either ligand or protein (or both). Given that the magnitudes of chemical shift changes in the fast exchange systems do not correlate with distance from the ligand, it is essential to analyze all chemical shift changes above the detection limit, i.e., shift changes over a wide dynamic range: small shift changes are not eliminated simply due to their small magnitudes. Thus, we are investigating an analysis method for assessing an entire dataset to conclude whether a selected interaction model is adequate or not.

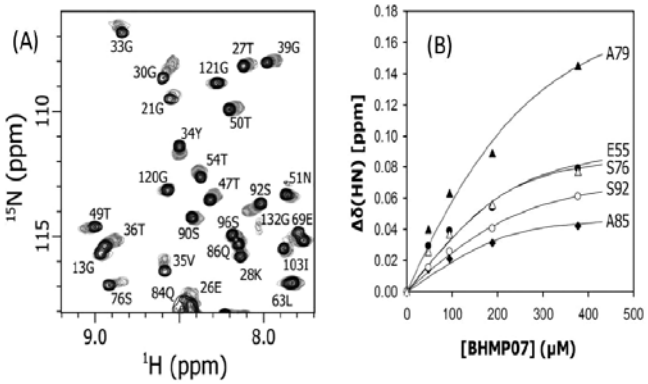


Figure 7. (A) Overlay of ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of RNH (15 kDa) at different inhibitor, BHMP, concentrations (protein: inhibitor ratios are 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:1.5), and (B) changes in chemical shifts plotted for some representative residues [6]. Although the approximate dissociation constant could be determined by analyzing the several datasets, (1) it is not known whether the entire datasets are reasonably explained by the dissociation constants, and (2) the source of the errors in the titration datasets were not investigated in detail.

[1] Gong Q & Ishima R (2007) J. Biomol. NMR, 37, 147-157.
[2] Myint W, Gong Q & Ishima R (2009) Concepts in Magnetic Resonance, A34, 63-75.
[3] Myint W, Cai Y, Schiffer C & Ishima R (2012) J Biomol NMR, 53, 13-23.
[4] Ishima R (2014) CPMG Relaxation dispersion experiment. Chapter 2 in Protein Dynamics (Methods in Molecular Biology), Humana Press. 1084.
[5] Ishima R (2014), J Biomol NMR, 58, 113-22.
[6] Christen MT, et al (2012) Chem Biol Drug Des, 80, 706-16.

L3-2 天然変性蛋白質の段階的なNMR解析

大野悠一[1], 宮下真奈美[1], 大野優美[1], 岡崎萌花[1], 渡部暁[2], 栃尾尚哉[2],
○西村千秋[1]
[1]帝京平成大・薬学部
[2]理研・生命システム研究センター・生体分子構造動態

Features of intrinsically disordered proteins monitored by NMR

Yu-ichi Ono[1], Manami Miyashita[1], Yumi Ono[1], Honoka Okazaki[1], Satoru Watanabe[2], Naoya Tochio[2], and ○Chiaki Nishimura[1]
[1]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University, Tokyo, Japan.
[2]NMR Pipeline Methodology Team, RIKEN Systems and Structural Biology Center, Kanagawa, Japan.

Intrinsically disordered protein is one of the targets for the development of effective medicines. The residual structures in the intrinsically disordered protein may be responsible for the binding to the small molecules. In this study, the residual structures of 5 proteins were analyzed by the secondary chemical shifts and amide-protections by CLEANEX-PM. The relaxation studies were also employed for the analyses of the globular folded proteins, which were predicted to be highly intrinsic disorder from the sequence. A feature for intrinsic disorder was the behavior of the signal intensities. As reported in α–synuclein studies, the intensities of signals were diverse and random on the sequence. Furthermore, amide-protections at the helical structure were compared with those at β–structure.

天然変性蛋白質は、pH7 などの生理的な条件下でも折りたたまれない蛋白質である。他の蛋白質との相互作用により、初めて折りたたまれることもある。その折りたたみ機構や残存している構造を理解できれば、蛋白質の相互作用や機能発現への洞察が得られると考える。

蛋白質の構造形成においても、1)自発的に折りたたまれるもの(文献 3)から、2)シャペロンと相互作用して初めて折りたたまれるもの、3)折りたたまれないものがあるが、天然変性蛋白質にも天然変性度に関して、種々の異なる段階があるように思われる。これまで我々は、天然変性度の高いアルファーシヌクレイン溶液の NMR 解析では CLEANEX-PM を用いて(文献 1)、プロテクトされる残存構造を解析してきた。さらに高い天然変性とアミノ酸配列から予測されるが、構造を有する HIV-1 マトリックス蛋白質(文献 2)とカプシド蛋白質(文献 4)の解析では緩和実験などを用いて解析してきた。

本研究では、その中間の天然変性度を有する麻疹ウイルス核蛋白質の C 端ドメインと、膜融合に関与し目の形態形成に関連するペリフェリン 2 の C 端ドメインの天然変性度を、化学シフトとアミドプロトン交換を中心に用いて解析してきたので報告する。

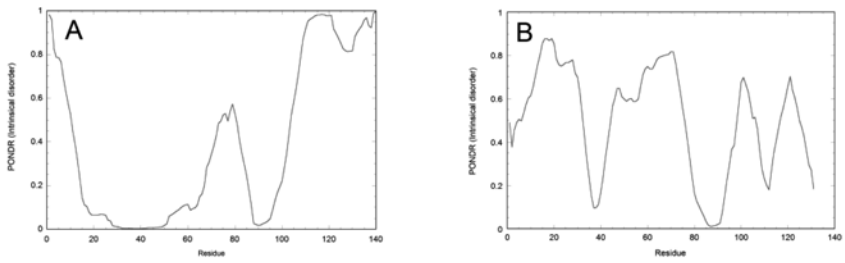
Yu-ichi Ono, Manami Miyashita, Yumi Ono, Honoka Okazaki, Satoru Watanabe, Naoya Tochio, Chiaki Nishimura
おおのゆういち, みやしたまなみ, おおのゆうみ, おかざきほのか, わたなべさとる, とちおなおや, ○にしむらちあき

ランダムコイルの化学シフト値と比較すると、残存構造として主にアルファーとベータ構造も両蛋白質とも含んでいた。特にこれら 2 種の変性蛋白質の中央領域には、化学シフト値からすると、顕著なヘリックス構造が存在していたが、アミドプロトンのプロテクションを測定する CLEANEX-PM を測定しても、若干の弱いプロテクションしか観測されなかった。一方そのほかに、ペリフェリン 2 の C 端ドメイン中では、N 端領域においてプロテクションが観測されたが、その領域は化学シフト値からすると、ベータ構造であることがわかった。また麻疹ウイルス核蛋白質の C 端ドメインでは、ヘリックス構造の配列上のその直後部分にあたるベータ構造部分に、弱いながらもプロテクションが観測された。またペリフェリン 2 では、シグナル強度がヘリックスなどの構造を有する位置と対応していたが、麻疹ウイルス核蛋白質では、アルファーシヌクレインで観測されるように、シグナル強度が配列とは関連がなかった。

ヘリックス構造では、4残基間ごとに水素結合が形成され、局所的に2次構造を形成することにより、コンタクトオーダーへの貢献が少ないローカルな相互作用が中心である。このことにより、この変性蛋白質の残存構造中に存在する化学シフト値から推定されるヘリックス構造も、プロテクションの弱い未熟なヘリックス構造である可能性を考えている。ベータ構造では、コンタクトオーダーに寄与するロングレンジな水素結合が形成され、従って、よりプロテクトされる構造であると考えている。

このように天然変性蛋白質の残存構造中においては、ヘリックス構造とベータ構造において、プロテクションに違いのある可能性を考えている。さらに変性状態では、分子間や分子内でもベータ構造を形成しにくいと思われるので、構造形成の核形成として、ベータヘアピン構造が形成されているのではないかと考えているが、今後は検証していきたい。

以上のように天然変性蛋白質の残存構造を調べる際には、化学シフト値に関するランダム構造の値との差が鋭敏であると考えているが、アミドプロトンの交換や他の観点からも考えていきたい。天然変性度のPONDRプロットを性格づけに活用し、議論をしていきたい。



PONDR VL-XTプロット。Aは α-synuclein。Bはp17 Matrix protein。縦軸は変性度。

1. Okazaki, H., Ohori, Y., Komoto, M., Lee, Y-H, Goto, Y., Tochio, N., and Nishimura, C.: *FEBS Lett.* **587**, 3709-3714, 2013
2. Ohori, Y., Okazaki, H., Watanabe, S., Tochio, N., Arai, M., Kigawa, T., and Nishimura, C.: *Biochim. Biophys. Acta, Proteins and Proteomics* **1844**, 620-626, 2014
3. Aoto, P.C.[1], Nishimura, C.[1], Dyson, H.J., and Wright, P.E. *Biochemistry* **53**, 3767-3780, 2014 [1]*Two authors contribute equally.*
4. Okazaki, H., Kaneko, C., Hirahara, M., Watanabe, S., Tochio, N., Kigawa, T., and Nishimura, C. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins and Proteomics* **1844**, 1638-1647, 2014

L3-3 「汎特異的」相互作用を基盤とする多剤耐性転写制御因子の機能発現機構

○竹内　恒[1],嶋田　一夫[2]
[1]産業技術総合研究所　創薬分子プロファイリング研究センター
[2]東京大学・大学院薬学系研究科

Entropy-driven dynamic multidrug recognition by multidrug transcriptional repressor

○Koh Takeuchi[1], and Ichio Shimada[2]
[1] Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Science and Industrial Technology, Tokyo, Japan
2: Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Multidrug transcriptional repressors (MDTRs) serve as sensors of multidrug resistance system, which control the expression of multidrug transporters and/or enzymes. However, the molecular mechanism by which MDTRs bind to structurally unrelated compounds with high affinity and are released from the promoter region remains largely unknown. Here, we structurally and dynamically characterized a PadR-like family MDTR, LmrR, by solution NMR. We found that the compound ligation shifts the preexisting conformational equilibrium to varying extents to achieve multidrug recognition. Meanwhile, the compound binding redistributes ps–ns dynamics to the allosteric sites, which entropically favors the high-affinity recognition. Collectively, the data show how LmrR can entropically achieve promiscuous multi-target interactions, in a manner that cannot be understood by a static structural view.

多剤耐性転写制御因子 (MDTR) は、原核生物の細胞内で様々な薬剤を認識し、多剤排出ポンプ、多剤耐性酵素などの多剤耐性遺伝子の発現を亢進させる。MDTR に薬剤が結合すると、転写制御領域への MDTR の相互作用が抑制され、その下流に位置する多剤耐性遺伝子の発現が誘導される。同様の機構はヒトにおいても保存されており、核内レセプターPXR は、薬剤により P 糖タンパク質や CYP3A4 などの発現を誘導する。すなわち MDTR は多剤耐性システムにおけるセンサーであり、MDTR がその機能を発現するためには、様々な薬剤に高い親和性で結合するとともに、その結合情報をプロモーター領域からの解離という同一の機能に転換する必要がある。しかしながら、それらを可能とする分子機構はいまだ明らかとなっていない。

本研究では、PadR-like ファミリーに属する MDTR であり、*L. lactis* の主要な多剤耐性機構を担う LmrR を題材に、LmrR が様々な薬剤を高親和かつ「汎特異的」に認識する分子機構、および「汎特異的」認識をプロモーター領域からの解離という特定の機能に変換する分子機構を明らかにするため、溶液 NMR 法を用いた動的立体構造解析を行った。

LmrRは2量体形成面において挟み込むようにして1分子の薬剤を結合することが知

Multidrug Resistance, Dynamics, Conformational Entropy

○たけうち　こう，しまだ　いちお

られている（Fig. 1）。また分子下部に存在するDNA結合ヘリックスα3は、隣り合ったmajor grooveに収まると推定されている。

まず薬剤非結合状態におけるLmrRのNMR緩和測定を行った結果、薬剤結合部位を形成するヘリックスがμs-ns時間スケールの運動性を有することが明らかとなった。メチル基シグナルに関しても基質結合部位のシグナル強度が弱い傾向にあり、主鎖の運動を直接反映するAlaのメチル基オーダーパラメーター（S^2）を算出すると、α4ヘリックスに存在するAla-92, Ala-108のS^2が小さく、α4ヘリックスの構造的柔軟さが示唆された。

X線結晶構造によって明らかになった各種構造を比較すると、各構造の由来する結晶型は異なるものの、α4ヘリックスには付け根をヒンジとして上下に可動域が存在した。興味深いことに、X線結晶構造におけるα4ヘリックスのコンフォメーションとIle-62のχ2角が相関し、α4ヘリックスが上向きの時には、Ile-62の χ2 角がgauche-となっており、メチル基は上を向いていた。逆にα4ヘリックスが下向きの構造の時には、メチル基が押し下げられIle-62の χ2 角がtrans構造をとることが明らかとなった。

一方^{13}C HMQC スペクトル中でIle-62のδ1シグナルは^{13}C方向に広幅化しており(Fig. 3)、またそのS^2は他に比べて小さかった。Ileのδ1シグナルの^{13}C化学シフトは、χ2角を反映することが知られているが、薬剤非結合状態におけるIle-62 δ1の^{13}C化学シフトからそのχ2はtrans/gauche-がほぼ等しく存在する状態にあった。よって、α4ヘリックスは非結合状態において上・下向きの間での構造平衡下にあり、両者間のエネルギー差がほとんど存在しないことが示された。また測定温度を変化させるとIle-62 δ1の^{13}C化学シフトは他の残基と比べて大きく変化し、α4ヘリック

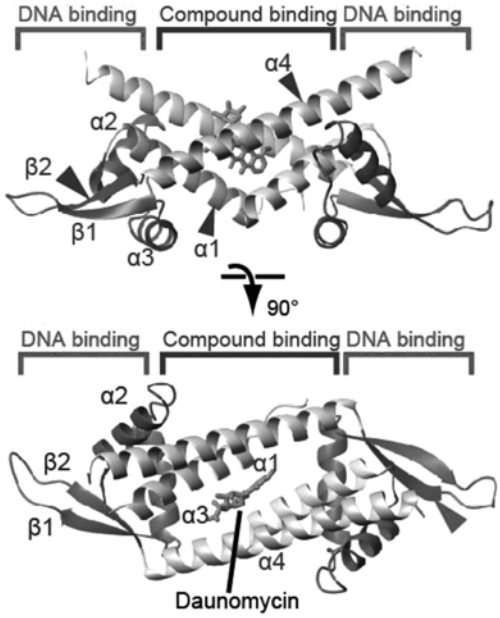


Fig. 1 structure of LmrR-daunomycin complex

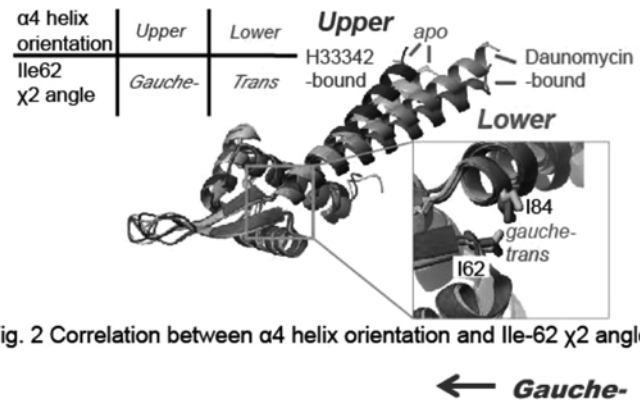


Fig. 2 Correlation between α4 helix orientation and Ile-62 χ2 angle

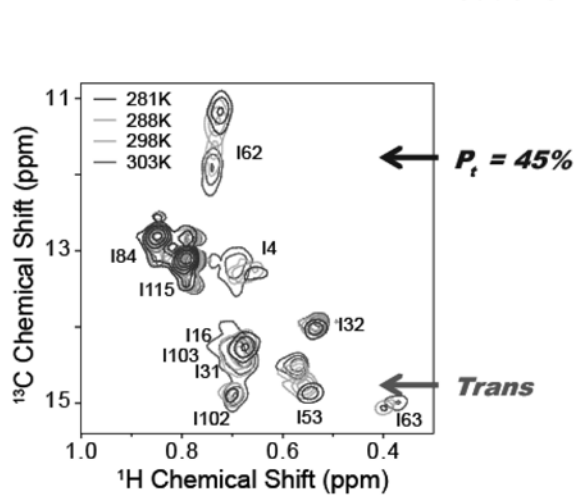


Fig. 3 Temperature dependence of the Ile δ1 resonances and the χ2 angle rotational equilibrium deduced from ^{13}C chemical shift.

スの構造平衡の存在がさらに支持された (Fig. 3)。

次に LmrR に結合する各種薬剤を飽和量添加し、Ile-62 δ1 の ^{13}C 化学シフト変化を解析した。その結果、薬剤結合に伴い Ile-62 δ1 の ^{13}C 化学シフトはすべて高磁場シフトし、薬剤結合が α4 ヘリックスの構造平衡を上向きに傾けることが分かった (Fig. 4)。また Ile-62 δ1 の ^{13}C 化学シフトの温度依存性を見ると、非結合状態においては 11.5~12 ppm からの幅広い分布がみられたのに対して、化合物添加時には、非結合状態を超えない範囲で構造平衡が上向きに移行した。このことは LmrR が非結合状態において広く浅い自由エネルギー平面を有する一方、各種薬剤結合時には一定の運動性を保ちながら異なる度合いで上向き方向へ構造平衡を傾けることを示している。すなわち LmrR は非結合状態で既に存在する構造平衡から、一部の平衡が薬剤に応じて安定化されることで、多剤結合を達成している (Fig. 5)。

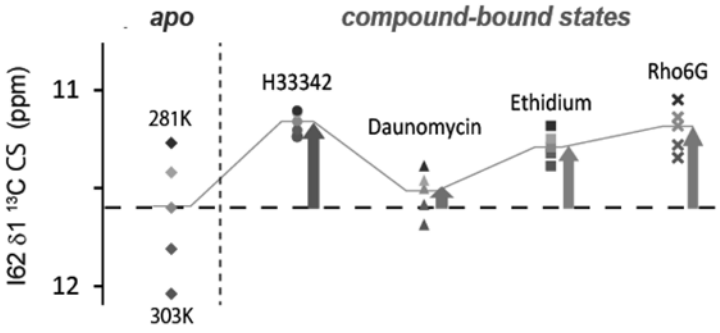


Fig. 4 Temperature dependence of the Ile-62 δ1 ^{13}C chemical shifts in apo and compound bound states

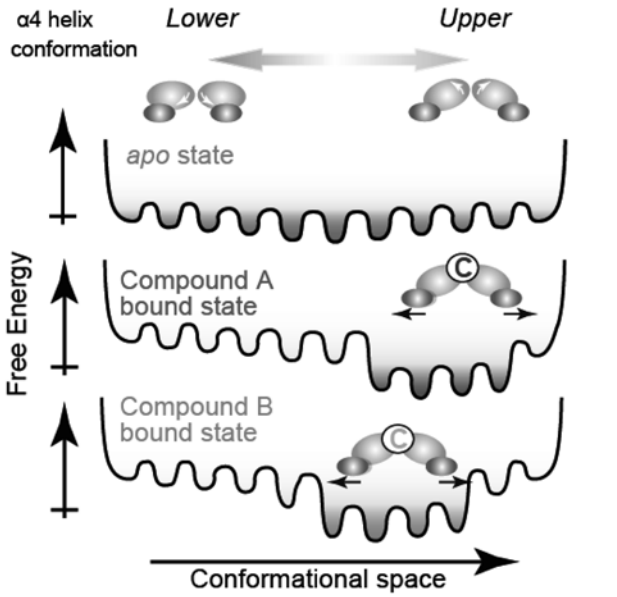


Fig. 5 Multidrug recognition and transcriptional regulation through differential shifting of the preexisting conformational equilibrium.

また非結合状態では、薬剤結合サイトから離れた部位に ps-ns の速い運動性が小さい領域が存在するが、薬剤結合によりそのような部位での運動性が増大し、負の構造エントロピー変化を示すことで、2~10 倍程度結合定数を増強させていた。すなわち LmrR は速い運動性を再分配することにより高親和性結合を実現している (Fig. 6)。

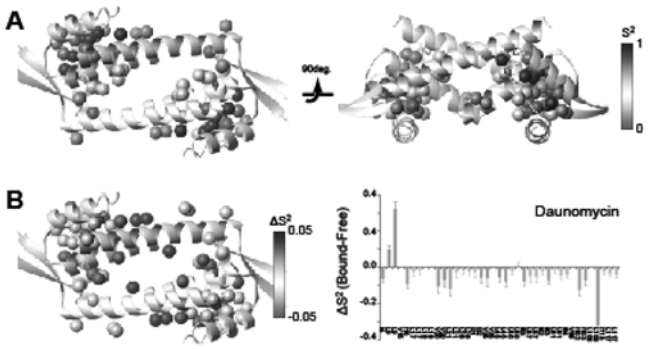


Fig. 6 (A) The mapping of the ILV methyl S² values in the apo state. (B) The mapping of the methyl moieties that showed substantial ΔS² values upon binding to each compound.

このことは、結合の熱力学的パラメーターにも反映されている。LmrRと様々な薬剤との結合をITCにより解析すると、LmrRと薬剤との結合はすべてエントロピー駆動

型であった。一方で複数の特異的相互作用部位を持つTetRファミリーに属するMDTRの薬剤認識はエンタルピー駆動型であり、両者の多剤結合機構は全く異なっていた。LmrRが柔軟な構造選択機能により構造を固定化することなく様々な薬剤を認識する一方、TetRファミリーのMDTRは、薬剤認識を複数パターンの特異的相互作用に依存している。このためTetRファミリーのMDTRは、結合しうる薬剤があらかじめ制限されている。一方、LmrRはそのような制限を受けることなく様々な薬剤と結合できるため、より多様な薬剤の認識を可能にする新たな機構をもつと考えられる。

ＤＮＡ結合は、Ile-62 δ1に対して化合物とは逆向きの化学シフト変化を誘起した（Fig. 7A）。このことは、薬剤結合がα4ヘリックスの構造平衡を上向きに変化させる一方、DNA結合はα4ヘリックスの構造平衡を下向きに変化させることを示している。Fig. 7Bにα4にヘリックスの向きとDNA結合ヘリックス間距離を示す通り、α4ヘリックスの向きはDNAヘリックス間の距離を規定する。すなわち、α4ヘリックスが上向きの時にはDNA結合ヘリックス間の距離は長く、下向きの時は短くなっており、薬剤結合に伴い、DNA結合状態よりもα4ヘリックスが上向きになることは、DNA結合ヘリックス間の距離が増大することを意味している。よって、薬剤結合に伴いDNA溝間の距離とDNA結合ヘリックス間の距離が合わなくなることでLmrRのDNAからの解離が誘起されると考えられる。

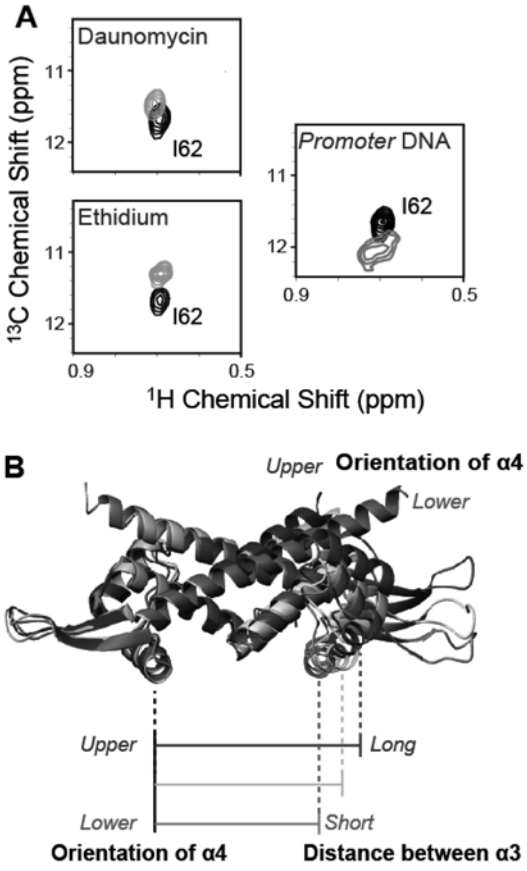


Fig. 7 (A) The Ile6-2 δ1 resonances of LmrR in the *apo* state (black) was overlaid with that of the compound-bound states or promoter bound state (gray). (B) Correlation between the α4 orientation and the distance between the DNA-binding α3 helix.

以上、NMRを用いた緩和解析、温度依存性解析、変異体解析などからLmrRは柔軟な構造選択機構により多剤認識を達成することが明らかとなった (Fig. 5) 。またその際、遠位における運動性が増大し、構造エントロピーのロスを回避し高親和性を実現していた (Fig. 6)。さらに、薬剤・DNA結合は相反する構造平衡を誘起し、このことが薬剤による転写制御の基盤になっていると考えられた (Fig. 7)。このような動的分子機構はタンパク質の動的平衡をありのままに解析できる溶液NMRにより初めて明らかとなったものであり、タンパク質の機能発現における運動性および構造エントロピーの重要性を示すものである。

L3-4

ケモカイン受容体—細胞内制御因子フロント間相互作用の構造生物学的解析

○吉永壮佐[1]，江崎芳[1]，辻辰一朗[1]，遠田悦子[2]，寺島裕也[2]，
齊藤貴士[3]，神田大輔[3]，河野俊之[4]，大澤匡範[5]，上田卓見[5]，
嶋田一夫[5]，松島綱治[2]，寺沢宏明[1]
[1]熊本大学大学院生命科学研究部，[2]東京大学大学院医学系研究科，
[3]九州大学生体防御医学研究所，[4]北里大学医学部，
[5]東京大学大学院薬学系研究科

Structural analyses of the interaction between the chemokine receptor and the cytosolic regulator FROUNT.

○Sosuke Yoshinaga[1], Kaori Esaki[1], Tatsuichiro Tsuji[1], Etsuko Toda[2], Yuya Terashima[2], Takashi Saitoh[3], Daisuke Kohda[3], Toshiyuki Kohno[4], Masanori Osawa[5], Takumi Ueda[5], Ichio Shimada[5], Kouji Matsushima[2] and Hiroaki Terasawa[1]
[1]Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, [2]Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, [3]Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan, [4]Kitasato University School of Medicine, Sagamihara, Japan, [5]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

The membrane-proximal C-terminal region (Pro-C) is important for the regulation of G-protein coupled receptors (GPCRs), but the Pro-C binding to a cytosolic regulator has not been structurally analyzed. The chemokine receptors CCR2/5, members of GPCRs, bind to the cytosolic regulator FROUNT. Studying the interaction between CCR2/5 Pro-C and FROUNT provides a basis for understanding the signal transduction mechanism via GPCR. Cross-saturation-based experiments revealed that the binding surface on Pro-C for FROUNT overlapped with the binding site for membrane-mimicking micelles, suggesting competitive binding of Pro-C between FROUNT and micelles. These results support an equilibrium model: chemokine binding changes the conformational equilibrium of CCR2/5 toward the active state, and Pro-C switches its binding partner from the membrane to FROUNT.

【背景・目的】炎症免疫反応において白血球はケモカインに誘引され、速やかに炎症部位へ集積する。細胞膜に発現する G タンパク質共役受容体 (GPCR) がケモカインを認識することで、白血球の遊走応答が生じる。我々は、ケモカイン受容体 CCR2、および CCR5 と結合し、遊走シグナルを伝達する細胞内因子フロントを同定した[1, 2)]。さらに、受容体の C 末端に位置する細胞膜近傍領域 (Pro-C) がフロントとの結合に必須であることを示した[3)]。フロントは、既知の GPCR 制御タンパク質と相同性をもたないため、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。

GPCR, CCR2/CCR5, 分子認識

○よしながそうすけ，えさきかおり，つじたついちろう，とおだえつこ，てらしまゆうや，さいとうたかし，こうだだいすけ，こうのとしゆき，おおさわまさのり，うえだたくみ，しまだいちお，まつしまこうじ，てらさわひろあき

本研究は、ケモカイン受容体―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、NMR に基づいて明らかにすることを目的とする。

【方法】大腸菌を用いて CCR2 Pro-C、および、全長フロントタンパク質を調製した。フロント結合時の Pro-C の構造決定は、800 μM $^{13}C/^{15}N$ 標識 Pro-C と 8 μM 非標識フロントを混合した試料に TRNOE 法を適用して行った。DPC ミセル結合時の Pro-C の構造決定は、200 μM $^{13}C/^{15}N$ 標識 Pro-C と 10 mM ^{2}H 標識 DPC ミセルを混合し、定法の NOE 情報を用いた方法により行った。Pro-C 上のフロント結合部位の同定は、200 μM $^{2}H/^{15}N$ 標識 Pro-C に 4 μM 非標識フロントと 10 mM ^{2}H 標識 DPC ミセルを混合し、転移交差飽和法[4]を適用して行った。Pro-C 上のミセル結合部位の同定は、200 μM $^{2}H/^{15}N$ 標識 Pro-C に 10 mM 非標識 DPC ミセルを混合し、交差飽和法[4]を適用して行った。スペクトル解析には、Olivia と TopSpin、立体構造計算には CYANA を用いた。

【結果・考察】^{13}C の化学シフトに基づく二次構造解析、および、アミドプロトンの緩和解析により、Pro-C はランダムコイルであることが分かった[5]。全長フロント結合時の Pro-C の立体構造を TRNOE 法により決定したところ、フロント結合にともなってヘリックス構造が形成されることが明らかになった[5]。一方、Pro-C は生体内において細胞膜近傍に位置するため、細胞膜を模した DPC ミセル存在下において Pro-C の立体構造を決定したところ、典型的なαヘリックス構造をもつことが分かった[5]。そこで、Pro-C 上のフロントとミセルの結合部位をそれぞれ同定するため、転移交差飽和法および交差飽和法を適用した[5]。$^{2}H/^{15}N$ 標識 Pro-C に非標識フロントと ^{2}H 標識 DPC ミセルを同時に混合し、非標識フロントの ^{1}H 核をラジオ波照射したところ、フロント結合時に Pro-C のヘリックスの片側に形成される疎水面上のアミノ酸残基において、転移交差飽和による信号の減弱が見られた。これらのアミノ酸残基の一部は、$^{2}H/^{15}N$ 標識 Pro-C と非標識 DPC ミセルを用いた交差飽和実験により同定したミセル結合残基と同じであった。

これらの結果は、Pro-C 上のフロントとミセルの結合部位が一部重複しており、両者が同時に結合できないことを示す。また、ミセル存在下においても Pro-C とフロントの相互作用が観測されたことから、Pro-C は２つの結合相手を動的に交換しつつ相互作用することが分かった。なお、これらの NMR を用いて得た結果が、表面プラズモン共鳴を用いた速度論的解析の結果と矛盾しないことを確認した[5]。

以上より、フロントはケモカイン受容体と結合することにより細胞膜から Pro-C を引き離し、活性化状態へ平衡をシフトさせることが考えられる。本研究において明らかにした細胞内因子によるケモカイン受容体の活性化機構に基づいて、GPCR に共通する新規の制御機構が明らかになることが期待される。

【参考文献】

(1) Terashima, Y. *et al.*, *Nat. Immunol.* **6**, 827–835 (2005), (2) Toda, E. *et al.*, *J. Immunol.* **183**, 6387–6394 (2009), (3) Toda, E. *et al.*, *Biochem. J.* **457**, 313–322 (2014), (4) Shimada, I., *Methods Enzymol.* **394**, 483–506 (2005), (5) Esaki, K. *et al.*, *FEBS J.* **281**, in press (2014)

L3-5 NMRとSAXSによるマルチドメインタンパク質の構造解析

小林　彩保、金場　哲平、伊藤　隆、○三島　正規
首都大院・理工

NMR and SAXS studies on multi-domain protein

Ayaho Kobayashi, Kanaba Teppei, Yutaka Ito, and ○Masaki Mishima
Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan

Multi-domain protein shares around 80% of eukaryotic protein, and the inter-domain interactions play key roles in the protein functions. However, multi-domain protein often has long flexible linker and the domain interactions are weak. It thus has dynamic property, and this dynamic nature hampers crystallization. Combination use of NMR and SAXS is attractive to analyze the structure of multi-domain protein. Negative regulator of differentiation 1 (Nrd1) is a four RRM domain protein. In an effort to delineate the relationship between Nrd1 structure and function, we analyzed the structure using NMR and SAXS. We will discuss usage of protein ligation and paramagnetic relaxation enhancement for the full-length Nrd1.

【序論】

真核生物では全タンパク質の約80%がマルチドメインタンパク質とされている[(1)]。マルチドメインタンパク質の多くは、ドメイン間のリンカーが柔軟である、ドメインードメイン間相互作用が弱いことなどによって動的な性質をもち、全長での結晶化が困難な場合もしばしばである。したがって、溶液条件での解析が可能なNMR法はマルチドメインタンパク質の解析にとって有力な手法である。しかしながら、ドメイン間の距離情報を得るには、従来のNOEでは不十分であり、我々は、常磁性緩和効果（PRE）等の長距離情報の取得や、そのための試料調製（ドメイン単位の、区分標識やスピンラベルされた試料のためのタンパク質ライゲーション等）に取り組んできた。さらにドメイン配置が動的な場合にはPREによる解析のみでは、ドメイン間の距離が近づいたときの構造を大きく反映するため、ポピュレーションを考慮した解析など慎重な取り扱いが必要である[(2)]。そこで、タンパク質全体の平均構造の情報を与えるSAXSの併用は非常に有効といえる[(2)]。

我々は４つのRRMドメインからなるRNA結合タンパク質であるNrd1を対象に[(3)] [(4)] [(5)]、まず、各RRM単独での試料の調製を行い、RRM2については既にその立体構造を決定した[(6)]。また、NMRによる解析からRRM3-4(もしくはRRM3)がRNAとの結合に重要であることを明らかにしている。一方SAXSを用い、全長では各ドメインの配置が伸びた状態で、RNA結合を担うRRM3が露出していることを明らかにした。討論会では常磁性NMRとSAXSを用いたNrd1の全長の知見について議論したい。

マルチドメインタンパク質、常磁性、SAXS
○こばやしあやほ，かなばてっぺい，いとうゆたか，みしままさき

【結果・考察】

全長構造のドメイン配置の知見を得るためにX線小角散乱(SAXS)の測定を行った。その結果、非リン酸化状態のNrd1全長は4つのRRMが一直線上に並んだ伸びた構造であることが明らかとなった（図）。非リン酸化状態では伸びた構造であることにより、RNAと結合可能な領域が露出し、RNAとの結合が可能のではないかと考えられた。

次に、より詳細なドメイン間情報を得るため、RRM1-RRM2のタンデム領域の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルと、該当する各RRM単独の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを比較したところ、化学シフトは一致しなかったことから、RRM1とRRM2との間の相互作用の存在が示唆された。RRM3-RRM4タンデム領域に関しても同様の結果が得られた。

Nrd1全長の構造解析に先駆け、現在、RRM1-RRM2タンデム領域の構造解析を行っている(図)。最終的にはsortase等を用いた全長の再構成及び常磁性緩和効果を用いたNMR解析、SAXSを組み合わせてNrd1全長の構造解析を行い、リン酸化によって起こるドメインの配置変化によるRNA結合能の制御機構を明らかにしたい。

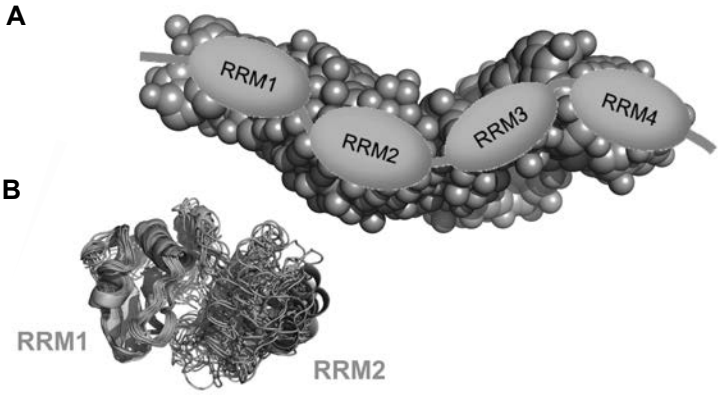


Fig. Structure analyses of Nrd1

A. Pseudo atomic model of full length Nrd1 constructed by GASBOR based on SAXS data and superimposition of a schematic drawing of domain orientation.

B. Calculated ensemble structure of RRM1-RRM2 by NMR.

参考文献

(1) Vogel C, et al, *Curr Opin Struct Biol.* 14, 208-16 (2004)
(2) Huang JR, et al *J. Am. Chem .Soc.* 136, 7068-76 (2014)
(3) Tsukahara, K. et al. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4488-98 (1998)
(4) Jeong, H.T. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1621-6 (2004)
(5) Satoh, R. et al. *Mol. Biol. Cell,* 20, 2473-85 (2009)
(6) Kobayashi, A. et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 437, 12-17 (2013)

謝辞

SAXS測定は、創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業によるマシンタイム（PF BL-10C）、清水　伸隆　准教授（高エネ研）のご支援を受けています。

L3-6 酵素活性部位水素結合ネットワーク中にあるHisの”tug-of-war”（綱引き）による構造安定性変化

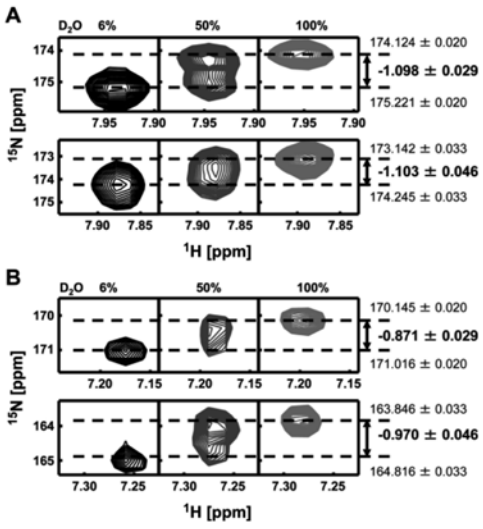
○栃尾尚哉[1]，徐　宁[2]，玉利　佑[2]，津田亮祐[2]，楯　真一[1,2]
[1]広大・RcMcD，[2]広大・院理

The structural stability of the catalytic site of human Pin1 is mediated by the balance of the “tug-of-war” in the hydrogen bond network

○Naoya, Tochio[1], Ning, Xu[2], Yu, Tamari[2], Ryosuke, Tsuda[2], and Shin-ichi, Tate[1,2]
[1]RcMcD, Hiroshima Univ., Hiroshima, Japan
[2]Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ., Hiroshima, Japan

Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase, Pin1, specifically catalyzes the isomerization of pSer/pThr-Pro motif. Pin1-mediated post-phosphorylation regulation is engaged in diverse cellular processes. Pin1 has two domains; WW domain and catalytic PPIase domain. The structural analyses of Pin1 PPIase domain showed that the four conserved residues (C113, H59, H157, and T152) form a hydrogen bond network. We developed a new method to detect the difference of the strength of a hydrogen bond in this network using the H/D isotope effect to ^{15}N chemical shift of the imidazole ring. We found that the C113D mutant, which has less PPIase activity, showed the stronger D113-H59 and the weaker H59-H157 hydrogen bond relative to the wild type. We revealed that the imbalance of the tug of war for H59 by the C113D mutation destabilized the catalytic site structure and reduced the binding affinity to the substrate through the allosteric effect.

Figure 1



プロリン*cis-trans*異性化酵素Pin1はpSer/pThr-Pro配列の異性化を特異的に行う．Pin1による標的タンパク質のリン酸化後調節は様々な生体内プロセスに関与している．Pin1は，リン酸化ペプチド結合能をもつWWドメインと異性化活性を担うPPIaseドメインをもつ．Pin1 PPIaseドメインの構造解析は，4つの保存残基(C113-H59-H157-T152)が分子内で水素結合ネットワークを形成することを示した．我々は，イミダゾールリングの^{15}N化学シフトに対するH/D同位体シフト効果を利用して，このネットワーク中の水素結合強度を計測する手法を開発した．リン

プロリン異性化酵素，H/D 同位体シフト効果

○とちおなおや，じょちょ，たまりゆう，つだりょうすけ，たてしんいち

Figure 1 (legend). H/D isotope effects on the chemical shifts for ^{15}N nuclei in the histidine imidazole ring were measured in solutions with different D_2O contents.
(A) 2D ^{1}H-$^{15}N^{\delta 1}$ HSQC signals for H157 collected in the solution containing 6% (left), 50% (middle), and 100% D_2O (right). Data in the top and bottom panels are for the wild type and C113D mutant, respectively.
(B) Same data set for 2D ^{1}H-$^{15}N^{\varepsilon 2}$ signals for H59.

酸化ペプチドを用いたEXSY測定により野生型に比べ活性の低下が見られたC113D変異体は，野生型と同様の立体構造をもつが，D113-H59の水素結合強度が強くなり，その結果H59-H157の水素結合が弱くなっていることを見出した(Figure 1)．一方で，H/D交換実験ならびに温度依存的なCDスペクトルの変化の野生型との比較からC113D変異が構造を不安定化することを確認した．また等温滴定熱量測定によってC113Dの基質結合能低下も合わせて確認している．本研究は，C113D変異による，H59を「綱引き」する水素結合強度のバランスの乱れが，活性部位の構造安定性を低下させ，結果的に基質結合能を低下するアロステリックな構造変化を誘導することを明らかにした(Figure 2)．

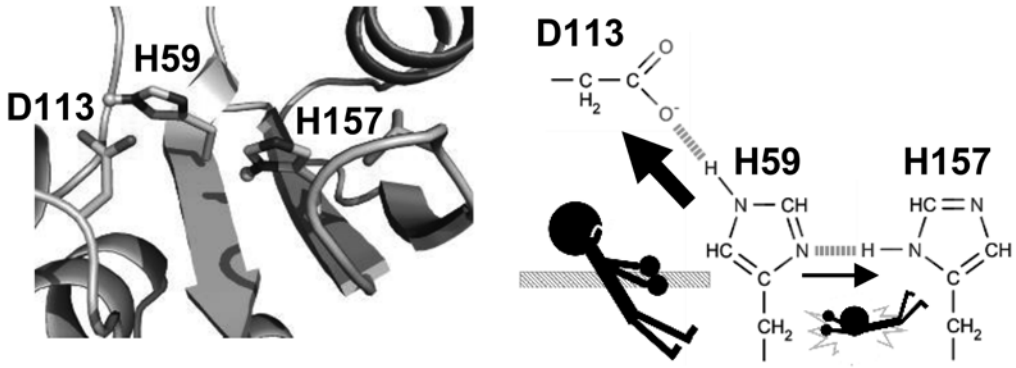


Figure 2. Hydrogen bond network and the tug of war for H59.
(Right) Close up view of the hydrogen bond network formed by the four conserved residues (C113-H59-H157-T152) in the C113D mutant of Pin1 PPIase domain.
(Left) Cartoon representation of the imbalanced tug of war for H59 in the hydrogen bond network of the C113D mutant.

SL3-1 キネティックＮＭＲによるタンパク質の‘かたち’の進化の観測

○桑田一夫[1, 2], 山口圭一[1]
[1]岐阜大院・連合創薬
[2]岐阜大院・医学研究科

Evolution of protein conformation observed by the ‘Kinetic NMR’

○Kazuo Kuwata[1, 2], and Keiichi Yamaguchi[1]
[1]*United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Sciences, Gifu University, Japan*
[2]*Graduate School of Medicine, Gifu University, Japan.*

Protein conformations evolve in the environment. Even though their amino-acid sequences are the same, their conformations are different. The conformational evolution is induced by structural fluctuation, inherent instability of the native conformation, intermolecular interactions and oligomer formation. In order to observe the conformational evolution in atomic resolution, we developed Kinetic NMR system.

神経変性疾患、Ⅱ型糖尿病、一部のがん、一部の統合失調症などは、遺伝子配列が問題なのではなく、それぞれの疾患に特有の蛋白質が、アミノ酸配列は変わらないが、その‘かたち’が変化することにより発症する。変化した異常な‘かたち’は、多かれ少なかれ感染性を有し、その‘かたち’は非メンデル遺伝をする。従って、これらの疾患を、広い意味で、プリオン病と呼んでもよいだろう。

アミノ酸配列により、タンパク質の立体構造が一義的に決定されるとする、アンフィンゼンの仮説には大きな例外がある。上記の立体構造進化の原理は、十分解明されていないが、おそらく、集合体形成が関与している、と考えられている。モノマー状態では、大部分の蛋白質は、おそらく熱力学的に安定な立体構造に（速度論的に）到達できるかもしれない。しかしながら分子量が大きいと、これも困難である。また途中で集合体を形成する性質があれば、探索する位相空間の体積は飛躍的に増大する。特にそのような空間においては、自己複製する性質を有する‘かたち’は、そうでない‘かたち’よりも、結果として、ポピュレーションが増大する、と考えられる。従って、あたかも蛋白質が増殖するように見える。しかし、これは、超多自由度系における見かけの現象にすぎない。自己複製された‘かたち’は、厳密に再生産されたものではなく、もとのかたちとは微妙に異なり、実際は、環境に合わせて進化できる、という特質を備えている。これらは、‘かたち’の世界の現象であるが、生命の最も原始的な姿である可能性がある。蛋白質と核酸が相互作用し、より複雑な形態形成を行ったものが現在の生物であるとすると、その場合も厳密な再生産であれば、環境の変化に対応できず、生物としては弱くなる、ということは、我々自身がよく知っていることだ。

この自己複製能力を有する病原体を抑える分子（薬剤）とは、どのようなものだろうか？それは、単なるリガンドではなく、病原体の‘かたち’を変える能力を有する分子であろう。我々は、このような特殊なリガンドを「メディカルシャペロン」と名付け、その外延を、実験的に調査しているところである。意外と、単純な分子である

可能性がある。ただ、その数理的理解は単純ではない。

いずれにせよ、このような自己複製能力を有する最小病原体であるプリオンは、どのように発生するのだろうか？我々は、これを原子レベルで観測するために、「キネティックＮＭＲ」装置を、世界で初めて作成した。ＮＭＲはこれまで、タンパク質や核酸の立体構造を決定するという「構造生物学」の機器のひとつとして用いられてきたが、その役割も時間とともに、終わりつつある。今後、重要になってくるのは、分子集団の中で自己複製能力を有するプリオンの構造の分類とその発生機構・制御機構の解明であろう。

キネティック観測装置には、「キネティック蛍光」、「キネティックＣＤ」（図１）、「キネティックＤＬＳ」、「キネティックＮＭＲ」（図２）などがある。重要なことは、これらの分子には感染性があるため、ＮＭＲ施設には、感染性分子を取り扱える「Ｐ３」細胞実験施設、及び動物感染実験が行える「Ｐ３」動物実験施設が隣接していることが必要である。我々は、ここ10年くらいで、戦略的にそのような施設を整備してきた。

図１　キネティックＣＤ

図２　キネティックＮＭＲ

本講演では、これらの機器とともに、構造生物学を超え、生命の本質に迫る、タンパク質立体構造進化観測の途中経過について、極手短に、ご紹介する。

Kazuo Kuwata, Keiichi Yamaguchi

○くわたかずお，やまぐちけいいち

SL3-2 プリオン蛋白質のモルテングロビュール状態の発見とオリゴマー形成との関連

○本田諒[1], 山口圭一[2], 桑田一夫[1, 2, 3]
[1]岐阜大学　医学部医学科
[2]岐阜大学大学院　連合創薬医療情報研究科
[3]岐阜大学大学院　医学系研究科　遺伝発生学分野

Identification of the molten globule state of prion protein and its relevance to β-rich oligomer conversion

○Ryo P. Honda[1], Kei-ichi Yamaguchi[2], and Kazuo Kuwata[1, 2, 3]
[1]Medical Course, School of Medicine, Gifu University
[2]United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Sciences, Gifu University
[3]Department of Gene and Development, Graduate School of Medicine, Gifu University

The conversion of α-rich prion protein (PrP^C) to its β-rich pathogenic isoform (PrP^{Sc}) is a critical event in the pathogenesis of prion diseases. We investigated the mechanism underlying the β-rich oligomer conversion of PrP^C at low pH, and identified an acid-induced molten globule state (A-state) as a candidate for its monomeric precursor state. Hydrogen/deuterium exchange experiment with NMR detection revealed that the Strand 1-Helix 1-Strand 2 segment at the N-terminal was preferentially unfolded in the A-state. This specific conformation of the A-state would provide crucial insights into the mechanisms of pathogenic conversion, as well as facilitate the design of novel medical chaperones for treating prion diseases.

【背景・目的】

プリオン病はクロイツフェルト・ヤコブ病、クールー病などを含む神経変性疾患の１つである。プリオン病に対する有効な治療法は現在なく、ほとんどは発症後１年以内に死に至る。プリオン病の発症機序については未解明な部分が多いが、一般に正常なプリオン蛋白質（PrP^C）から異常型プリオン（PrP^{Sc}）への変換によって誘発されると考えられている。プリオン蛋白質は天然状態でαヘリックス優位の単量体を形成するが、異常型プリオンはβシート優位の凝集体を形成する。従ってα→β転移及び凝集体形成がプリオン病の発症に深く関与しており、この機構をさらに解明することが同疾患の治療法開発にも役立つと考えられる。

１９９０年代からプリオン蛋白質は酸性条件下でβシート優位のオリゴマー（β-オリゴマー）に構造変換することが知られていたが、その詳細な機構は明らかにされてこなかった。興味深いことに、β-オリゴマー形成速度はイオン強度に依存し、低イオン強度では極めて遅くなることが報告されている。我々はこの現象に注目し、酸性条件・低イオン強度下において、β-オリゴマーに変換される前にプリオン蛋白質

プリオン，モルテングロビュール，ミスフォールディング

○ほんだりょう，やまぐちけいいち，くわたかずお

がどのような構造体を形成しているかを調べた。

【結果】

酸性条件・低イオン強度下でプリオン蛋白質は、天然状態でなく、「非」天然状態を形成していることが分かった。さらに様々なｐＨ条件下でオリゴマー形成速度を調べたところ、この非天然状態の割合とオリゴマー形成速度には強い正の相関があることが明らかになった。この非天然状態は単量体であり、かつＮＭＲなどを用いた構造解析によって「モルテングロビュール状態」に近い性質をもつことが明らかになり、我々はこの状態をA-state（Acid-induced molten globule state）と呼ぶことにした。さらにＮＭＲと重水素交換法を組み合わせて構造解析を行ったところ、A-stateの局所的な領域－N端のStrand 1, Helix 1, Strand 2－のみが不安定であった。

【考察・展望】

本研究からプリオン蛋白質のモルテングロビュール状態（A-state）の形成、あるいはStrand 1, Helix 1, Strand 2領域の不安定化がβ-オリゴマー形成と深く関与していることが示唆された。興味深いことに、Strand 1, Helix 1, Strand 2領域がβシート化することによってプリオン蛋白質の異常化が引き起こされるとする仮説がStanley B. Prusinerらによって提唱されている（βヘリックス説）。

本研究はA-state形成を抑制することでプリオン病を制御できることをも示唆している。A-state形成はいくつかの特徴的なカルボキシル基のプロトン化、及び塩橋の破壊によって引き起こされると考えられ、このような部位を標的にした低分子化合物がプリオン病治療薬として効果があると考えられる。

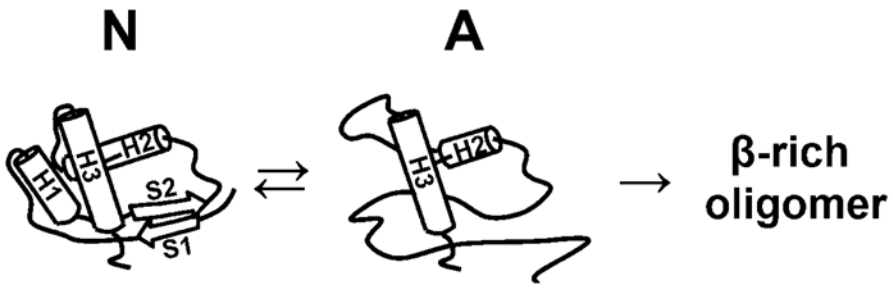


FIGURE. A proposed scheme for the β-rich oligomer conversion of PrP^C. In this scheme, the β-rich oligomer conversion of PrP^C proceeds via A-state, where the Strand 1 (S1), Helix 1 (H1), and Strand 2 (S2) regions are preferentially unfolded.

SL3-3 Sup35天然変性領域のアミロイド構造多形形成機構の解明

○大橋祐美子[1,2],山口芳樹[3],鎌足雄司[4],花島慎弥[3],桑田一夫[4],田中元雅[2]
[1]東京理科大・理学部
[2]理研・脳科学総合研究センター
[3]理研・糖鎖構造生物学研究チーム
[4]岐阜大・連合創薬医療情報研究科

Local compact structure in an intrinsically disordered protein Sup35-NM determines amyloid conformation.

○Yumiko Ohhashi[1,2], Yoshiki Yamaguchi[3], Yuji O. Kamatari[4], Shinya Hanashima[3], Kazuo Kuwata[4], and Motomasa Tanaka[2]
[1]*Department of Applied Chemistry, Tokyo University of Science.*
[2]*Brain Science Institute, RIKEN.*
[3]*Structural Glycobiology Team, RIKEN.*
[4]*Center for Emerging Infectious Diseases, Gifu University.*

Self-perpetuating β-sheet-rich fibrillar protein aggregates, amyloid, are involved in a variety of neurodegenerative disorders. A remarkable feature of the diseases is that a mutation in causal genes or conditions in protein misfolding can lead to formation of distinct amyloid conformations of causative proteins and each conformation dictates different physiologic consequences such as cytotoxicity and tissue specificity. However, it is poorly understood how the structural polymorphism of amyloid is encoded in a monomeric protein. Here we show that a N-terminal intrinsically disordered region of yeast prion protein Sup35 (Sup35-NM) has a potential to form two strikingly different amyloid cores. In contrast to the N terminal core of wild-type Sup35NM amyloid, S17R mutant in which serine-17 was replaced with arginine adopted a C-terminal amyloid core region in the prion domain. A variety of solution NMR measurements of Sup35NM revealed that exposed asparagine residues play critical roles in determination of amyloid core regions. Remarkably, intrinsically disordered Sup35NM formed compact local structures, which regulate self-intermolecular interactions that are required for initiation of amyloid formation. These results demonstrate that local compact structures of Sup35NM monomer despite its natively unfolding structure drastically alter amyloid conformations. These studies highlight conformational fluctuation in monomer as a critical target for regulation of pathologic consequences of protein aggregates.

アミロイド，プリオン，天然変性蛋白質

○おおはしゆみこ，やまぐちよしき，かまたりゆうじ，はなしましんや，くわたかずお，たなかもとまさ

蛋白質の多くは天然構造とは異なる、非常に安定な線維状凝集体（アミロイド線維）を形成することが知られており、それらは蛋白質の配列や長さに関わらず、分子間のβシート構造を骨格に持つ等、様々な特徴的な性質を共有していることが分かっている。ある特定のアミロイド線維は神経変性疾患をはじめとする様々な重篤な疾患と関係しているため、創薬のターゲットとして、凝集抑制や天然構造安定化の視点から多くの研究が行われているが、決定的な治療法は未確立である。そこで、我々が着目した、多くのアミロイドに共通する性質は「アミロイド構造多形」である。一つの蛋白質は様々な線維構造を取ることが可能であり、その構造の違いはアミロイドの物性の違いや、露出表面の違いを導き、結果、沈着部位、細胞毒性、そして感染性の違いをもたらす。このことから、低毒性のアミロイド構造へ人為的に誘導することで疾患の進行を遅らせる処置が可能となることが期待できる。しかし、アミロイド構造決定のメカニズムはほとんど明らかになっていない。そこで我々は、酵母の翻訳終止因子Sup35(酵母プリオン蛋白質)のN末端天然変性領域Sup35-NMをモデル蛋白質として用い、アミロイド構造の決定に関与する内的因子の検出を試みた。

初めに我々はWTとS17R変異体（セリン17→アルギニン）Sup35-NMのアミロイドコア領域をマススペクトルを用いた方法で比較した。S17Rのアミロイドは、WTアミロイドのような娘細胞への安定な伝播が起こりにくいという表現型の変化が報告されている。そこから異なるアミロイド構造を持つであろうと考えられてきたが実際に構造を比較する研究はこれまで行われていなかった。In vitroで作成したアミロイド線維をプロテアーゼ処理することで、コア以外のフレキシブルな領域を切断し、プロテアーゼ耐性を示すコア領域のみが得られる。このペプチドをマススペクトルで同定したところ、WTとS17Rは異なる領域がアミロイドのコアとなっていることが分かり(Fig. 1a)、予想されていた通りアミロイドの構造が変化していることが明らかになった。次にPhe残基がS17Rコア領域にのみ存在することを利用し(Fig. 1a)、Phe-1-13Cラベル Sup35-NMを用いたアミロイドの個体NMR dipolar recoupling測定を行った。結果、S17Rアミロイドでのみ Phe残基が分子間パラレルβシート構造を形成していること分かり（Fig. 1b)、マススペクトルのデータを支持する結果が得ら

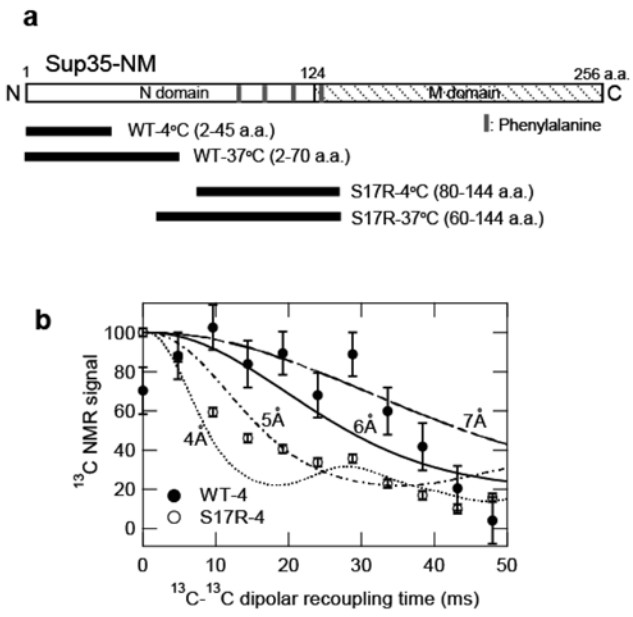


Fig. 1. a, Proteinase K-resistant core peptides of WT and S17R Sup35-NM amyloids formed at 4°C and 37°C identified by MALDI-TOF and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. **b,** Solid-state NMR ^{13}C-^{13}C dipolar recoupling experiments of Phe-1-^{13}C-labeled WT (●) and S17R (○) amyloids formed at 4°C.

れた。

更に WT モノマーは S17R アミロイドをシードとして用いることで、S17R 型アミロイドコアを形成し得ることや、高塩濃度下では自発重合で WT が S17R 型のアミロイドを形成し得ることが分かり、S17R 型アミロイド構造も WT Sup35-NM が取りうる可能性の一つであり、溶媒条件や蛋白質分子の性質から、より形成に有利な構造が選択されているものと考えられた。そこで、我々はより詳細な Sup35-NM の構造、揺らぎ情報を得る為、Sup35-NM（254 残基）^{1}H-^{15}N HSQC シグナルの帰属を行い(Fig. 2 left)、各種溶液 NMR 測定を試みた。

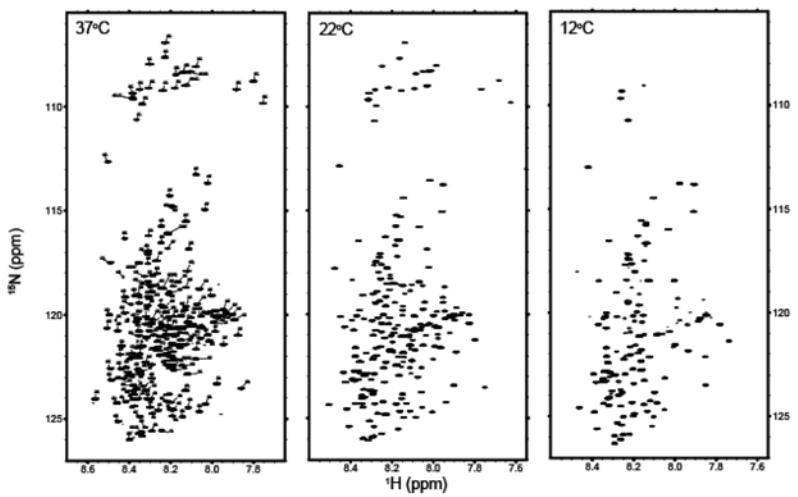


Fig. 2. ^{1}H-^{15}N HSQC temperature dependent spectrum change.

我々の以前の研究から、低温条件で観察されるSup35-NMオリゴマーがアミロイドの構造決定に大きく寄与していることが分かっている。そこでWT及びS17Rのオリゴマー形成の詳細を^{1}H-^{15}N HSQCピーク強度解析及び飽和移動差(STD)-NMR測定にて調べた。様々な温度で^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定すると、低温でオリゴマー形成が進むに従い、Nドメインの中央付近の残基を中心にシグナルの低下が観察され(Fig. 2)、ここがオリゴマー分子間相互作用のコアとなっていることが推察された。WTとS17Rはコアの領域に大きな違いは無かったが、S17Rは全体的にシグナルの低下が緩やかであり、オリゴマー形成能がWTと比較して低いことが示された。STD-NMR測定はモノマーとオリゴマーが共存する22ºCで行った。WTとS17Rに共通してオリゴマーコアの分子間相互作用が観察されたと同時に、WTではコアのN末端側、S17RではC末端側にそれぞれ相互作用があるらしいことを発見した(Fig. 3a)。それらはそれぞれのアミロイドコアの領域内にあり、アミロイド形成に重要な役割を持つとされるアスパラギン残基が集中する箇所であることから、アミロイド形成に関与する相互作用であることが考えられた。

次に緩和測定を行った。測定はSup35-NMがほぼモノマーの状態で存在する37ºCで行った。^{1}H-^{15}N異種核NOE測定では、Mドメインが大きく揺らいでいるのに対し、Nドメインの中央付近は何らかの構造が存在する可能性が示された(Fig. 3b)。そこで常磁性緩和促進法(PRE)で部分構造の存在を確認したところ、確かにその領域が他と比べコンパクトになっていることが観察できた。Sup35-NMは天然変性領域であると考えられていた為、この発見は驚きであった。さらに部分構造領域は、オリゴマーのコア領域と完全に重なっていることから、分子内の部分構造が形成された上でオリゴマー

の分子間相互作用が形成されているものと思われる。また、先のSTD測定で得られた分子間相互作用は部分構造領域の両端に位置し、C末端側の相互作用領域は部分構造内に位置していることが分かった。

最後にCLEANEX-PM測定で遅い時間スケールの揺らぎの観察を行った。この測定ではNドメインに二箇所速いアミドプロトンの交換を観察できた。それらは部分構造の両端に位置し、STDで分子間相互作用が観察された領域と一致していた。また、WTと比較してS17Rでは全体的に速い交換速度を示し、^{1}H-^{15}N HSQCで観察されたオリゴマー量の低下と合わせて、S17Rでは部分構造が不安定化している可能性が示された。

以上のNMR測定で得られた結果より、我々は部分構造の両端の２領域がアミロイド形成の開始点であると仮定し、その領域にAsp→Ala変異を入れることで開始点の破壊を試みたところ、C末側の開始点を破壊し、アミロイドコア領域を変化させることに成功した。

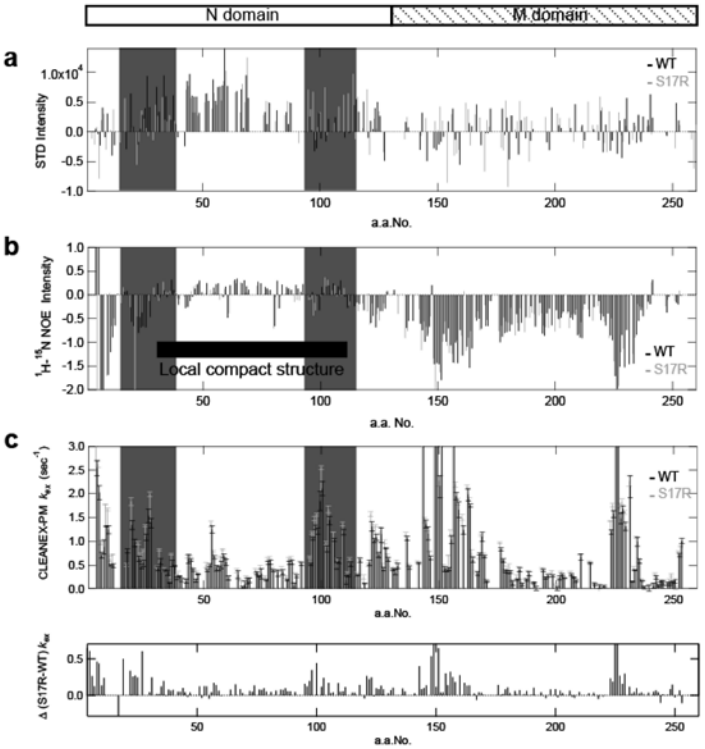


Fig. 3. a, STD-NMR intensity of WT (black) and S17R (gray) at 22 ºC. **b,** ^{1}H-^{15}N heteronuclear NOE values for WT (black) and S17R (gray) at 37 ºC. **c,** Hydrogen exchange rates of WT (black) and S17R (red) at 37 ºC measured by CLEANEX-PM. Bottom panel shows subtracted values (kex S17R – kex WT).

以上の結果から、天然変性領域であるとされていたSup35-NMのNドメインには部分構造が存在しており、その構造を介して分子間相互作用が起こり、オリゴマーが形成されていると考えられる。部分構造の両端には、溶媒に露出したアスパラギン残基が集まるアミロイド形成開始点となる領域が存在し、オリゴマー内ではその領域の分子間相互作用を確認することが出来た。WTではC末側の開始点はほぼ部分構造に取り込まれているためN末端側の開始点が有利となり、N末側にアミロイドコアが出来る。しかしS17R変異体はN末端領域に立体障害をもたらすと同時に部分構造の不安定化を引き起こすことでC末端側の開始点がより有利となり、C末端側にアミロイドコアが出来る。これがS17Rによって引き起こされるアミロイド構造変化のメカニズムであると考えられる。

SL3-4 カルボニル炭素—カルボニル炭素 ($^3J_{C'C'}$) 相関NMRの利用による変性蛋白質の主鎖信号帰属

○吉村優一[1, 2], Natalia Kulminskaya[1, 2], Frans Mulder[1, 2]
[1]オーフス大学・Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO)
[2]オーフス大学・Department of Chemistry

Application of carbonyl–carbonyl correlation NMR experiments with ultra-high resolution for resonance assignments of disordered proteins

○Yuichi Yoshimura[1, 2], Natalia V. Kulminskaya[1, 2], Frans A. A. Mulder[1, 2]
[1]Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), Aarhus University, Aarhus, Denmark
[2]Department of Chemistry, Aarhus University, Aarhus, Denmark

Sequential resonance assignment strategies are typically based on matching one or two chemical shifts of adjacent residues, which leads to ambiguity in resonance assignments. In particular, unambiguous resonance assignments for intrinsically disordered proteins (IDPs) are often challenging due to high chemical shift degeneracies, as they lack a well-defined secondary and/or tertiary structure under physiological conditions, and exist as dynamic ensembles of interconverting structures. Since IDPs play diverse and important roles in biology, such as transcriptional and translational regulation, membrane fusion and transport, and cell cycle control, and IDPs are also implicated in various human disorders, it is of significant biological relevance to study IDPs, and continuous advances in NMR techniques are therefore necessary for their structural characterization.

We investigated the potential of using connectivities through the three-bond couplings between sequentially adjoining ^{13}C' nuclei ($^3J_{C'C'}$ couplings), combined with semi-constant time chemical shift evolution, for resonance assignments of uniformly ^{13}C, ^{15}N-labelled α-synuclein. The (HN)CO(CO)NH [1] and (H)N(COCO)NH [2] schemes utilize homonuclear Hartmann–Hahn cross polarization to transfer ^{13}C' magnetization between neighbors. Fig. 1(a,b) illustrates sequential connectivities of ^{13}C' and $^{15}N^H$ nuclei obtained by those 3D experiments. Although the small magnitude of $^3J_{C'C'}$ (about 1 Hz for disordered proteins) requires an extended isotropic mixing period for efficient coherence transfer, a modified phase cycled Carr–Purcell multiple pulse sequence with XY16 supercycles (MOCCA-XY16, Fig. 1(c)) allows a significant reduction of relaxation loss as the magnetization is kept longitudinal during the trajectory between the 180° pulses [3]. As shown in Fig. 2, an extremely long (> 500 ms) mixing with the MOCCA-XY16 sequence correlated up to seven adjacent ^{13}C' and $^{15}N^H$ nuclei, which strongly lifts chemical shift degeneracy of the backbone nuclei in IDPs. Although proline residues are often abundant in IDPs, which complicates sequential resonance assignments of IDPs, connectivities across proline residues are also obtained, and all the backbone $^1H^N$, $^{15}N^H$, and ^{13}C' resonance assignments can be completed *de novo* with a single pair of 3D experiments.

chemical shift degeneracy, isotropic mixing sequence, $^3J_{C'C'}$-coupling

○よしむら ゆういち，なたりあ くるみんすかや，ふらんす むるだー

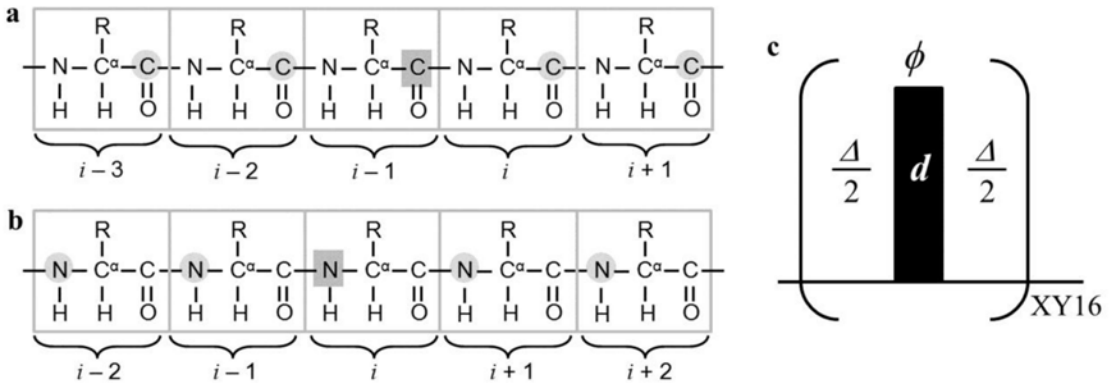


Figure 1. (a,b) Sequential connectivity of $^{13}C'$ (a) and $^{15}N^{H}$ (b) nuclei, obtained by 3D (HN)CO(CO)NH (a) and (H)N(COCO)NH (b) experiments, respectively. The 3D (HN)CO(CO)NH experiment provides a "diagonal" resonance ($^{13}C_{i-1}$) and cross resonances ($^{13}C_{i-3}$, $^{13}C_{i-2}$, $^{13}C_{i}$, and $^{13}C_{i+1}$) in the ω_1 dimensions in the strip plot of the amide group of residue i with the $^{15}N_i$ (ω_1) and $^{1}H_i$ (ω_3) frequencies, whereas the 3D (H)N(COCO)NH experiment provides a diagonal resonance ($^{15}N_i$) and cross resonances ($^{15}N_{i-2}$, $^{15}N_{i-1}$, $^{15}N_{i+1}$, and $^{15}N_{i+2}$) in the ω_1 dimensions in a strip plot of the amide group of residue i. (c) Basic building block of MOCCA-XY16. The RF field of the 180° pulses in MOCCA-XY16 was set at 8.64 kHz with a duration of the 180° pulse (d) of 57.9 μs, which was determined such that $^{13}C^{\alpha}$ nuclei experience an effective 360° rotation during each carbonyl 180° pulse. The delays between the 180° pulses (Δ) were set at 500 μs. The supercycle of the phase of the RF pulse for XY16 (ϕ) is: $\phi = \{x, y, x, y, y, x, y, x, -x, -y, -x, -y, -y, -x, -y, -x\}$.

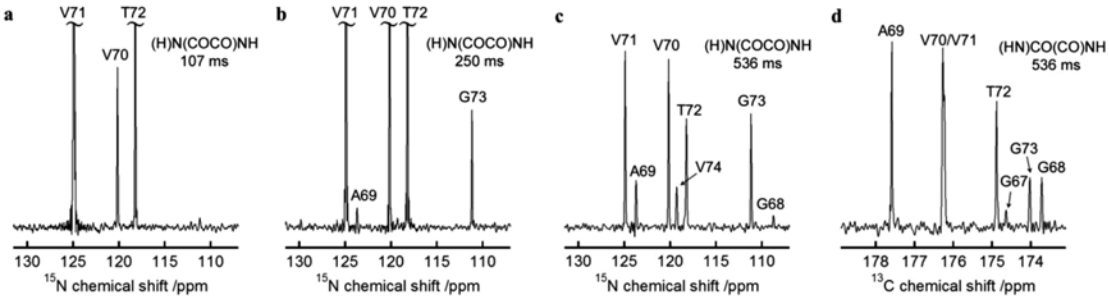


Figure 2. (a–c) Traces extracted from a series of 3D (H)N(COCO)NH spectra recorded at ^{1}H frequency of 500 MHz (11.7 T) with MOCCA-XY16 isotropic mixing for 107 (a), 250 (b), and 536 (c) ms. (d) A trace extracted from the 3D (HN)CO(CO)NH spectrum at ^{1}H frequency of 500 MHz (11.7 T) with MOCCA-XY16 isotropic mixing for 536 ms. The chemical shifts of $^{15}N^{H}$ (ω_2) and $^{1}H^{N}$ (ω_3) are 124.92 ppm and 8.33 ppm, respectively, for the diagonal resonance of V71.

References

1. Grzesiek and Bax (1997) *J. Biomol. NMR*, **9,** 207–211.
2. Liu *et al*. (2000) *J. Biomol. NMR*, **16,** 127–138.
3. Felli *et al*. (2009) *J. Biomol. NMR*, **43,** 187–196.

SL3-5 固体NMRとTEMによるヒトカルシトニンにおけるアミロイド線維形成と阻害機構の解明

○内藤　晶[1],伊藤-渡邉ひかり[1]、上平-石島美弥[2]、Namsrai Javkhlantugs[1]、近藤正志[3]、中越雅道[3]、川村　出[1]、辻　暁[2]、斉藤　肇[2]、上田一義[1]
[1]横浜国大　院工
[2]兵庫県立大　院理
3横浜国大　機器分析評価センター

Amyloid fibril formation and inhibition mechanism of human calcitonin as studied by solid state NMR and TEM.

○Akira Naito[1], Hikari Itoh-Watanabe[1], Miya Kamihira-Ishijima[2], Namsrai Javphlantugs[1], Masashi Kondoh[3], Masamichi Nakakoshi[3], Izuru Kawamura[1], Satoru Tuzi[2], Hazime Saitô[2] and Kazuyoshi Ueda[1]
[1]Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama.
[2]Graduate School of Science, University of Hyogo
3Instrumental Analysis Center, Yokohama National University, Yokohama, Japan.

Human calcitonin (hCT) is a 32-amino acid peptide hormone and involved in calcium metabolism. hCT tends to form a fibril precipitate of the same type as amyloid. Fibril structure of hCT was examined using ^{13}C solid state NMR spectroscopy. It turned out that antiparallel and mixture of parallel and anti-parallel β-sheets grew at pH 7.5 and 3.3, respectively. Kinetic analysis indicated that hCT fibrillation mechanism showed two steps autocatalytic reaction with nucleation (k_1) and elongation (k_2) rate constants. hCT mutated to Leu at the position of 16 (F16L-), 19 (F19L), and 12, 16 and 19 (TL-hCT) were examined to reveal the role of aromatic side-chains. It turned out that aromatic residues play important role to stabilize the fibril. The fibrillation process in HEPES solution was examined using TEM. It turned out that HEPES stabilize spherical intermediates in the nucleation process.

【序】ヒトカルシトニン(hCT)は３２アミン酸残基からなるペプチドホルモンであり、骨からのカルシウムの溶出を制御する作用をもっている。一方、hCTは水溶液中で容易にアミロイド線維形成することが知られている。アミロイド線維はアルツハイマー病や狂牛病などアミロイド病の原因物質として知られており、アミロイド線維の形成機構を研究することはアミロイド病の予防や治療の面からも重要である。このhCTの線維形成現象を解明するため、固体高分解能NMRの手法を用いて線維形成の反応速度および、線維の二次構造決定を行い、線維形成の分子機構を明らかにする研究を行った(1-3)。また、芳香族アミノ酸が線維構造の安定因子として働いていることから、阻害効果について検討した(4)。

Human calcitonin, Solid state NMR, Spherical intermediates

○ないとう　あきら、いとう-わたなべ　ひかり、かみひら-いしじま　みや、なむずらい　じゃぶからんたぐす、こんどう　まさし、なかこし　まさみち、かわむら　いずる、つじ　さとる、さいとう　はじめ、うえだ　かずよし

芳香族アミノ酸をLeuに置き換えた変異体を作成し、芳香族アミノ酸の置換による線維形成
これまで、線維形成反応速度解析から、線維形成が2段階自己触媒反応機構をとることが分かっていたが、HEPES溶液中では、この反応機構で存在するとされていた球状中間体を初めて観測することに成功した(5)。

【実験】

WT-hCTは固相法によりFmoc-アミノ酸を用いてペプチド合成機(ABI431)により合成した。合成したペプチドは逆相HPLCにより精製した後、空気酸化によりジスルフィド架橋反応を起こし、さらに逆相ＨＰＬＣにより精製し、最終生成物を95%以上の純度で得た。次に[1-^{13}C]Phe22, [3-^{13}C]Ala26-hCT, [1-^{13}C]Gly10, [1-^{13}C]Ala26-hCT, F16L-hCT, F19L-hCT, TL-hCT(Y12L, F16L, F19L-hCT)も同様に合成した。固体NMR測定においてモノマー成分を観測するDD-MAS法と線維成分を観測するCP-MAS法を交互に使用し、同一試料内でモノマーと線維成分の^{13}C NMR信号を分離して測定した。

【結果と考察】

固体^{13}C CP MAS NMR測定 による線維構造の決定

Fig. 1にWT-hCTにおける、pH=3.3とpH7.5において測定した^{13}C DD-MASと^{13}C CP-MAS NMRスペクトルを示す。化学シフト値―二次構造相関から中性においてはG10-F22の領域がモノマーではα-ヘリックスをとり、線維ではβ-シート構造をとることが判明した。一方、酸性において、モノマーはG10-F22の領域でα-ヘリックスをとるが、線維においてはG10-A31の領域とG10-A26の領域でβ-シート構造をとる２種類の混合状態であることが判明した(Fig.1)。２種類のβ-シート構造についてはA31の信号が２本に分かれていることから平行β-シートと逆平行β-シートが混合状態になっていることが示唆された。さらに、精密な[1-^{13}C]Phe16, [^{15}N]Phe19-hCTについて^{13}C-^{15}N 核間距離をREDOR法により測定し、３スピン系で解析した。この結果、Phe16とPhe19はβ-ストランド間で１残基はなれた位置に存在することが判明した。このような逆平行β-シートを形成するとしてMDシミュレーションを行い、線維形成に重要な相互作用を検索した結果、Y22-F22(π-π), D15-F19 (π-anion), F16-K18 (π-cation)が強い相互作用であることが判明した (Fig,2)。

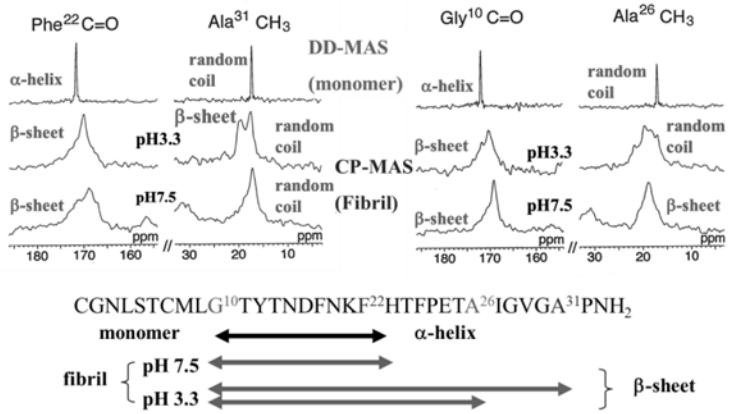


Fig. 1. ^{13}C DD MAS and CP MAS NMR spectra before and after the fibril formation. Bottom part shows the region of secondary structures.

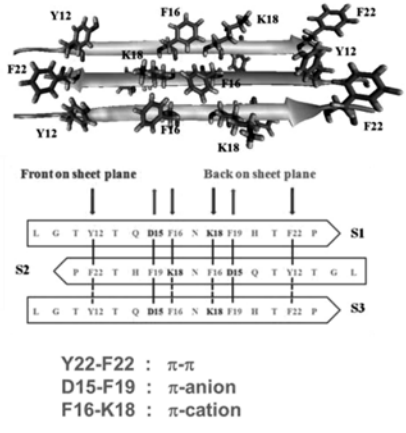


Fig.2. Interaction ways between peptide strands by MD simulation

線維形成の反応速度解析

線維形成の時間変化をCP-MASの信号強度をプロットすることにより解析した。Fig. 3に示すように、線維は５０時間の遅延時間の後、急激に成長しているのが観測された。これはFig,3に示す、２段階自己触媒反応の特徴である。すなわち、遅い核形成反応（k_1）の後に速い線維伸長反応（k_2）が引き続いて起こることを示している。中性および酸性条件で解析した線維形成速度定数をTable 1に示す。この結果、k_1はk_2に比べてはるかに遅いことが分かる。また、k_2は中性が酸性に比べてはるかに速いことが判明した。

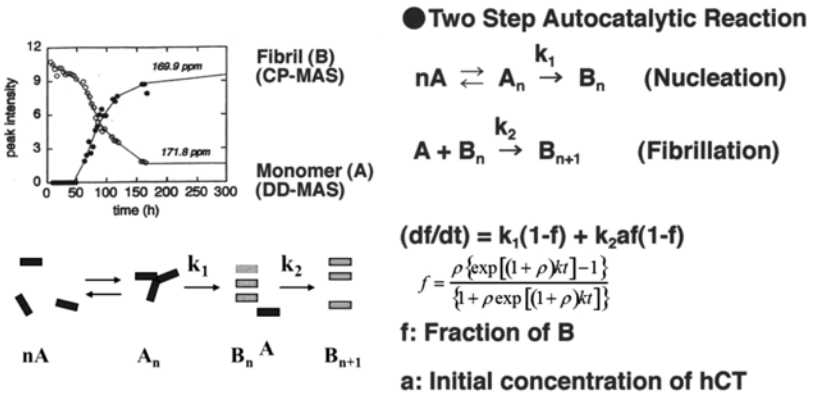


Fig. 3. Time course of fibril growth vs. time. Analysis in terms of two step autocatalytic reaction mechanism

Table 1. Kinetic parameters of the fibril formation of hCT

	pH	$k_1(S^{-1})$	$k_2(S^{-1}M^{-1})$
WT-hCT	3.3	3.3×10^{-6}	1.0×10^{-3}
	7.5	2.7×10^{-6}	2.3

固体^{13}C CP-MAS NMRと分子動力学計算によるヒトカルシトニンのアミロイド線維形成における芳香族残基の影響

ヒトカルシトニンに比べてサケカルシトニンは類似の活性をもつにもかかわらずアミロイド線維形成が格段に遅いことが知られている。アミノ酸配列を見ると、サケカルシトニンではヒトカルシトニンの Tyr12, Phe16, Phe19 がすべて Leu に代わっている。そこで、本研究ではヒトカルシトニンの芳香族アミノ酸残基がアミロイド線維形成速度に与える役割を解明する目的で研究を行った。

ヒトカルシトニンの芳香族アミノ酸を Leu に置き換えた変異体（F16L-, F19L-, TL-hCT）を調製し、それぞれについてアミロイド線維形成速度定数を ^{13}C NMR および UV スペクトル測定から決定した。この結果、変異体と hCT との線維形成速度を比較すると、線維伸長過程の速度定数 k_2 が特に影響を受けて、速度が遅くなることが判明した(Table 2)、さらに線維核形成速度 k_1 にはあまり影響のないことが判明した。分子動力学計算により、線維構造について解析した結果、芳香族アミノ酸残基が線維構造の安定化に寄与していることが判明した(Fig. 2)。このため、F が L に置き換わることにより、線維構造が不安定になり、線維成長速度が遅くなることが判明した。

Table 2. Rate constants of the fibrillation of hCT mutants

	pH3.3		pH7.4	
	$k_1(s^{-1})$	$k_2(s^{-1}M^{-1})$	$k_1(s^{-1})$	$k_2(s^{-1}M^{-1})$
WT-hCT	2.71×10^{-8}	1.04×10^{-3}	2.79×10^{-6}	2.29
F16L-hCT	1.84×10^{-6}	6.16×10^{-3}	1.88×10^{-7}	4.79×10^{-2}
F19L-hCT	1.27×10^{-4}	1.58×10^{-4}	7.41×10^{-9}	2.90×10^{-2}
TL-hCT	5.38×10^{-6}	4.82×10^{-3}	3.40×10^{-6}	2.98×10^{-3}

^{13}C CP-MAS NMR および TEM による HEPES 溶液中で生成する球状中間体の観測

HEPES 溶液中で hCT の線維形成実験を行った。この結果、リン酸緩衝液（中性）、や酢酸緩衝液（酸性）中の hCT 線維形成に比べて格段に線維形成が遅くなることが判明した。さらに、この場合は２段階自己触媒反応機構において、核形成速度、k_1、が格段に遅くなることが判明した。この原因を解明するため、TEM により、線維形成過程を観測した。その結果、hCT を HEPES 溶液中で線維形成させたところ、その初期過程で、球状形の中間体が観測された。さらに、この球状中間体は数週間にも渡る寿命をもち、その球状中間体の表面から線維前駆体が発芽する様子を観測することができた(Fig. 4)。その後、この線維前駆体は成長して、球状中間体は消失する過程が観測された。この結果は、２段階自己触媒反応機構で仮定していた線維核あるいは中間体の実体を明らかにしたことに加えて、線維核形成速度が遅くなるのは、核あるいは中間体が HEPES によって安定化され、この寿命が格段に長くなることが原因であることが判明した。この球状中間体の存在は Aβペプチドにおいても報告されており、細胞毒性の高いことが分かっている。hCT においても、この球状中間体が細胞毒性を示すのかどうかを明らかにすることは今後の課題である。

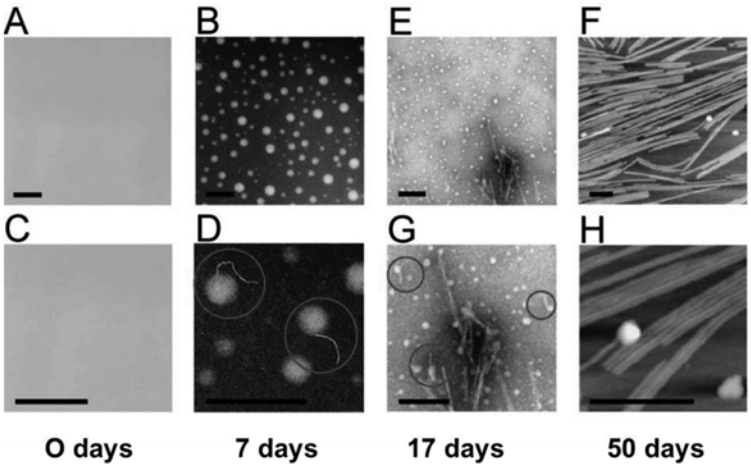


Fig. 4 Fibril growth process of human calcitonin in HEPES solution. Bars indicate 50 nm length.

【文献】

1. M. Kamihira et al. Protein Science, 9, 867-877 (2000).
2. M. Kamihira et al. J. Biol. Chem. 278, 2859-2865 (2003).
3. A. Naito et al. Magn. Reson. Chem. 42, 247-257 (2004).
4. H. Itoh-Watanabe et al. Phys. Chem. Chem. Phys. 15, 8890-8901 (2013).
5. H. Itoh-Watanabe et al. Phys. Chem. Chem. Phys. 15, 16956-16964 (2013).

L3-7

分子混雑環境に適用可能な 新規拡張 model-free 解析法の開発

○岡村英保[1], 栃尾尚哉[2], 杉山修世[1,2], 渡部暁[1,2],
優乙石[3], フェイグ マイケル[1,4], 杉田有治[1,3,5], 木川隆則[1,2,6]
[1] 理化学研究所 生命システム研究センター, [2] 理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域, [3] 理化学研究所 杉田理論分子科学研究室, [4] ミシガン州立大学, [5] 理化学研究所 計算科学研究機構, [6] 理化学研究所 イノベーション推進センター

Development of an extended model-free analysis for macromolecular crowding environment

○Hideyasu Okamura[1], Naoya Tochio[2], Shusei Sugiyama[1,2], Satoru Watanabe[1,2],
Isseki Yu[3], Michael Feig[1,4], Yuji Sugita[1,3,5], Takanori Kigawa[1,2,6]
[1]RIKEN Quantitative Biology Center, [2]RIKEN Systems and Structural Biology Center, [3]Department of Biochemistry & Molecular Biology and Department of Chemistry, Michigan State University, [4]RIKEN Theoretical Molecular Science Laboratory, [5]RIKEN Advanced Institute for Computational Science, [6]RIKEN Innovation Center

The interior of biological cells is a crowding environment. Such macromolecular crowding environment is significantly different from the experimental condition performed in diluted solutions. The model-free analysis for NMR relaxation data is one of the most popular methods for obtaining the dynamic information of proteins. However, the application of the conventional model-free analysis to macromolecular crowding environment has proven problematic. Here, we newly extended the model-free analysis to be applicable to macromolecular crowding environment.

細胞内は数百 mg/ml といわれる分子混雑環境にあり、そこでの蛋白質の振る舞いは希薄溶液環境とは異なる可能性が高い。model-free 解析法は蛋白質ダイナミクスを調べる最も一般的な方法の１つであるが、分子混雑環境下では適用困難であることがしばしば指摘されている。我々は昨年の NMR 討論会において、蛋白質濃度を 0.4-135mg/ml と変化させ、それらに対して 400-900MHz の複数の NMR 装置で取得した緩和データを包括的に解析した結果、高濃度条件下の蛋白質分子全体の回転運動を記述するためには回転相関時間が少なくとも２つ必要であることを報告した。我々は、その後、このような系に対応できるように拡張した新規 model-free 解析法を開発し、緩和データの解析を行ったので、その結果の詳細を本討論会で報告する。

緩和解析, model-free 解析, 分子混雑環境
○おかむらひでやす, とちおなおや, すぎやましゅうせい, わたなべさとる, ゆういっせき, ふぇいぐ まいける, すぎたゆうじ, きがわたかのり

Villin head peace sub domain (36aa)を 0.4 ~135 mg/ml 濃度で調製することで、希薄溶液環境 (0.4 mg/ml / 0.1 mM) から分子混雑環境 (135 mg/ml / 32 mM) への変化のモデルシステムとした。これらの濃度条件に対して、400, 600, 700 および 900 MHz NMR 装置により、主鎖 ^{15}N R_1, R_2, NOE 緩和データを得た。現在、確立されている一般的な model-free 解析法では単一の磁場強度で解析が行えるようになっているが、我々の開発した方法では、複数生じる分子全体の回転相関時間を決定するために、緩和データの磁場依存性が重要な情報となるので、複数の磁場強度で取得した緩和データを用いることが前提となっている。また、分子全体の回転運動に対しては楕円体を想定した異方性のモデルを、局所的な内部運動には 2 つの相関時間を持つものや化学交換をもつモデルなどにも対応している。Fig.1 に解析の例として、0.1 mM と 32 mM 濃度条件での結果を示す。このように、希薄溶液環境と高濃度溶液環境では分子全体の回転運動と内部運動が共に顕著に変化するという結果が得られている。

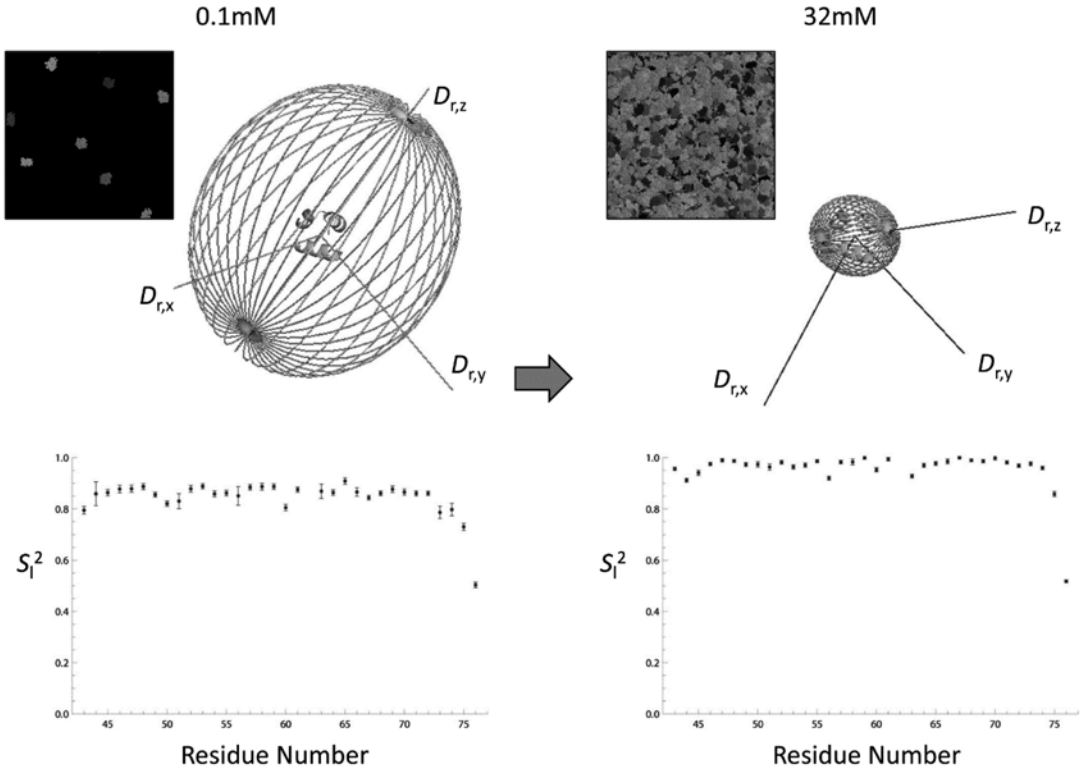


Fig. 1. Model-free analysis for Villin relaxation data at 0.1 and 32 mM concentrations. The axes of rectangular coordinates ($D_{r,x}$, $D_{r,y}$ and $D_{r,z}$) represent the principal axes of the overall rotational diffusion tensor. Ellipsoids represent the amplitudes of the overall rotational diffusion. S_I^2 is the square of the generalized order parameter characterizing the amplitude of the internal motions.

L3-8

分子量(横緩和時間)の差に由来する物質定量のゆがみを克服する新しい測定法の開発

岡村英保[1, 2], 西村裕志[3, 4], 永田崇[1], 木川隆則[2], 渡辺隆司[3, 4],
○片平正人[1, 4]
[1]京大・エネルギー理工学研究所, [2]理研・生命システム研究センター, [3]京大・生存研, [4]JST・CREST

Development of new methods to compensate distortion of quantitation caused by difference in molecular weight (transverse relaxation time)

Hideyasu Okamura[1, 2], Hiroshi Nishimura[3,4], Takashi Nagata[1], Takanori Kigawa[2], Takashi Watanabe[3,4], ○Masato Katahira[1,4]
[1]Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Kyoto, Japan, [2]RIKEN Quantitative Biology Center, Yokohama, Japan, [3]RISH, Kyoto University, Kyoto, Japan, [4]CREST, JST, Tokyo, Japan.

To determine the amounts of each component in solution is a fundamental first step to study the solution. HSQC is one of the most powerful tools to achieve this. A week point of quantitation with HSQC is that magnetization reduces through transverse relaxation during INEPT and reverse INEPT periods and that the volume of a correlation peak is affected and distorted by the molecular weight-dependent relaxation rate. Here, the method to correctly quantify the amounts of each component was developed by combined use of HSQC and TROSY. This method was applied to a solution that contains biomass-related components whose molecular sizes differ largely, and the validity of the method was proved. This method is also tolerant to other factors that distort quantitation such as either variation in $^{1}J_{CH}$ or imperfectness of pulses.

（序）溶液に含まれる様々な物質の量を知る事は、溶液の物性研究や利活用法の開発を行う上で、基本的な第一歩である。HSQC法は物質を定量する有力な手法であるが、弱点がある。同法のINEPT期とreverse INEPT期において、磁化は横緩和によって減弱する。横緩和速度は分子量が大きいほど早いので、高分子量の物質ほど減弱が激しく、磁化が小さくなってしまう。この為HSQCの相関ピークの体積は、高分子量の物質ほど小さくなる。この為様々な分子量を有する物質の混合液に対しては、相関ピークの体積に基づいて物質量を定量した場合、正しい結果が得られない。この問題を解決する為に今回、HSQC法とTROSY法を組み合わせた新しい物質定量法を開発した。分子量が大きく異なる二つのバイオマス関連物質の混合液にこの手法を適用した結果、定量が正確にできる事が実証された。またHSQC法による物質定量を不正確にする他の要因（$^{1}J_{CH}$のバリエーション、パルスの不完全性）に対しても、本法は対応可能である。

物質定量法，TROSY，バイオマス

おかむらひでやす，にしむらひろし，ながたたかし，きがわたかのり，わたなべたかし，○かたひらまさと

(結果と考察)バイオマス関連物質であるリグニン２量体とカードラン(Fig. 1)をDMSO溶液に当モル溶解した。この溶液のHSQCスペクトルを測定し、リグニン２量体に関する相関ピーク1-4と、カードランに関する相関ピーク9-12の各々の体積を計算した。リグニン２量体に関するピークの平均値を１に規格化したものをFig. 2左に示す。カードランはリグニン２量体に比べて分子量がはるかに大きい為、横緩和速度が速い。この為INEPT期とreverse INEPT期においてカードランの磁化はより減弱し、その結果相関ピークの体積がかなり小さくなってしまう(平均値0.671)。この為HSQCの相関ピークの体積に基づいて、物質の量比を正確に決定する事はできない。

TROSY法においては、プトロンの定常状態磁化*Hz*とカーボンの定常状態磁化*Cz*の両方が、相関ピークに寄与する。同法においてプロトン由来の磁化は、INEPT期とSP2-PT期の両方で横緩和によって磁化が減弱するが、一方カーボン由来の磁化は、SP2-PT期でのみ横緩和によって磁化が減弱する。従ってプロトン由来のTROSY相関ピークとカーボン由来のTROSY相関ピークの強度の比較から、INEPT期における磁化の減弱量に関する情報を取得する事ができる。この情報に基づいてHSQCの相関ピークの体積を補正した結果をFig. 2右に示す。カードランに関する相関ピークの体積が総じて大きくなり、リグニンに関する相関ピークの体積と大きさに遜色がない(平均値0.989)。従ってこの補正を施した体積を用いれば、分子量(横緩和時間)が大きく異なる物質に関しても、その量比を正確に決定する事ができる。

$^{1}J_{CH}$の値は物質毎に異なり、例えばバイオマス関連物質においては、115 Hz から 175 Hz 程度のバリエーションがある。$^{1}J_{CH}$の値に応じて、INEPT 期及び reverse INEPT 期における磁化のトランスファー効率に依存した磁化の減弱が生じ、その結果相関ピークの体積が影響を受ける。この事も物質の量比の正確な決定を妨げる。本法は、INEPT 期と reverse INEPT 期における磁化の減弱に関し、それを引き起こす原因に関係なく相関ピークの体積を補正できるので、$^{1}J_{CH}$の値が大きく異なる物質に関しても、正確な量比を決定する事ができる。

INEPT 期において ^{13}C 180° パルスによる ^{13}C 磁化の反転がオフセットに依存して不完全である場合にも、相関ピークの体積は影響を受ける。本法はそのような場合にも適切な補正を与え、量比を正確に決定する事ができる。

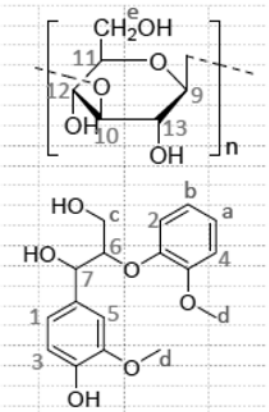


Fig. 1 Molecular structures of a curdlan (upper) and a lignin dimer (lower)

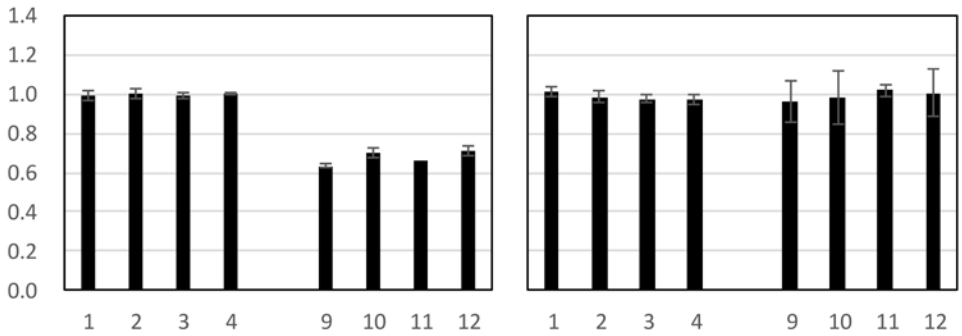


Fig. 2 The volumes of each ^{1}H-^{13}C HSQC correlation peak; 1-4 for a lignin dimer and 9-12 for a curdlan. The volumes are normalized so that the average of peaks 1-4 is 1. Left; no calibration, right; calibrated with information derived from TROSY

L3-9 Theoretical calculation of $^{1}H/^{13}C$ NMR shifts indicative of salt bridge between methylated Lys and CO_2 group of Asp or Glu residues in proteins

Jakub Šebera[1], Yoshikazu Hattori[2], Yoshiyuki, Tanaka[3], Chojiro Kojima[2], and Vladimír Sychrovský[1]

[1] *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 16610, Prague, Czech Republic, E-mail : vladimir.sychrovsky@uochb.cas.cz*

[2] *Institute of Protein Research, Osaka, Osaka University, Japan*
[3] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan*

The measurements of ^{1}H and ^{13}C NMR shifts of methyl groups of methylated Lys residues in Ubiquitin, Thioredoxin and FKBP12 protein indicated their dependence on distance between Lys head group and CO_2 group of neighboring Asp or Glu residues. The measured ^{1}H NMR shifts of methyl groups decreased by ca 0.2 ppm and ^{13}C NMR shifts decreased by ca 0.4 ppm when distance between terminal Nε nitrogen of lysine and CO_2 group was smaller than ca 5 Å. The observed behavior of ^{1}H and ^{13}C NMR shifts could be therefore indicative of salt bridge between methyl groups at lysine and CO_2 group at Asp or Glu. In this work we confirmed the assumption of salt bridge by theoretical calculations of ^{1}H and ^{13}C NMR shift.

The initial geometries of pairs of amino acids consisting of Lys and Asp or Glu residues were extracted from original crystallographic structures with the PDB ID 1D7J, 1UBQ, and 2TRX. Two methyl groups were added to the Nε nitrogen of Lys residues to comply with experimental structures because the original x-ray structures contained non-methylated Lys residues. The rotation of head group of Lys was sampled because actual mutual orientation of methylated head group of Lys residues with respect to CO_2 group of Asp or Glu was unknown. Three starting structures with head group of Lys rotated by 120° were prepared for each of amino acid pairs. The geometries of amino acids in pairs were than optimized: the head group of lysine (except Nε nitrogen) and all hydrogen atoms added to x-ray structure were optimized freely keeping the rest of atoms fixed in their x-ray geometries. The calculated geometry of amino acid pair with lowest energy was employed in subsequent calculations of NMR parameters. The ^{1}H and ^{13}C NMR shifts were calculated as NMR shielding of respective atom calculated in Lys monomer that was extracted from amino acid

pair minus NMR shielding of the same atom calculated in amino acid pair. The $\Delta\delta_H$ and $\Delta\delta_C$ NMR shifts thus described the effect of presence of CO_2 group in neighborhood of Lys residues. The ^1H NMR shielding was calculated as average value of six NMR shieldings calculated for hydrogen atoms of two methyl groups at Nε nitrogen of Lys. The ^{13}C NMR shielding was calculated accordingly. The B3LYP method and 6-311++G** basis set including CPCM model of water solvent was employed both in geometry optimizations and NMR calculations.

The majority of ^1H NMR shifts calculated in amino acid pairs decreased by ca 0.2 ppm upon close contact of Lys head group to CO_2 group of Asp or Glu residues. The trend that was observed experimentally was thus calculated with large statistical significance (Figure 1). Only the ^1H NMR shifts of Lys 73 residue of FKBP12 and Lys 11 of Ubiquitin increased when distance between Nε nitrogen of Lys and CO_2 group was close to 4 Å (Figure 1). The $\Delta\delta_C$ shifts calculated for the two residues also did not correspond to experimental trend (data not shown). A closer look unveiled the $\Delta\delta_H$ shifts calculated for three conformers describing rotation of Lys 73 head group differed significantly: 0.35 ppm, -0.03 ppm, and 0.48 ppm while the respective energies of these conformers differed less than 1.7 kcal mol^{-1}. Similar situation occurred also for the Lys 11 residue of Ubiquitin. The sampling of conformers employing one structure that was derived employing original x-ray structures of non-metlylated proteins seemed to be insufficient in these cases. Large variation of the calculated ^1H NMR shifts was combined with relatively close energies of Lys conformers. The reliable x-ray structure of the three proteins containg methylated Lys residues would apparently improve the sampling of structures and subsequent NMR modeling. In any case, only the two pairs of amino acids out of 23 pairs extracted from three different proteins did not described the experimental trend correctly.

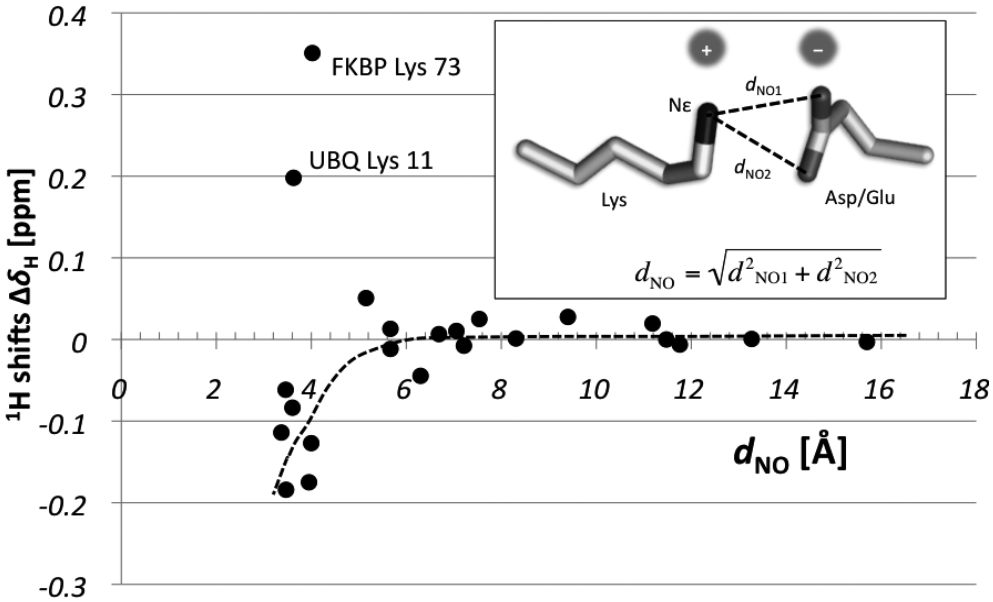


Figure 1. The dependence of ^{1}H NMR shifts on distance between Nε nitrogen of Lys and CO_2 group of Asp or Glu residues calculated in Lys – Asp and Lys – Glu amino acid pairs extracted from Ubiquitin, Thioredoxin and FKBP12 protein. The dashed line indicates the trend of ^{1}H NMR shifts owing to salt bridge formation that occurs when amino acid residues get closer than ca 4 Å.

To summarize, the ^{1}H and ^{13}C NMR shifts of methylated lysine can be used for detection of the salt bridge involving methyl group at Lys and CO_2 group at Asp or Glu residues of proteins. The structural interpretation of original NMR experimental data by means of theoretical calculations confirmed the assumption of decreasing trend of ^{1}H and ^{13}C NMR shifts upon salt bridge formation. The NMR detection of salt bridge can be employed as new structural constraint in NMR studies of proteins.

L3-10 ^{13}C selective HMBC 法による糖鎖の立体構造とダイナミクスに関する研究

鵜澤 洵、加藤雅樹、関 宏子、桝 飛雄真、山口芳樹
理研　糖鎖構造、千葉大共用機器センター

Study on 3D structure and dynamics of glycans using ^{13}C selective HMBC

○Jun Uzawa[1,2], Masaki Kato[1], Hiroko Seki[2], Hyuma Masu[2], Yoshiki Yamaguchi[1]
[1]Structural Glycobiology Team, RIKEN,　[2]Center for Analytical Instrumentation, Chiba University

Abstracts

$^{n}J_{C\text{-}H}$ scalar couplings across sugar residues are one of the important NMR parameters for the analysis of dihedral angles. In this presentation, we report an NMR analysis of three model glycans including a pair of sialoglycans. A novel pulse program, ^{13}C selective HMBC, was developed and applied to these model glycans. In the measurement, we focused on quaternary carbon (Neu-2), which is characteristic of sialic acid. We could estimate the inter-residue $^{n}J_{C\text{-}H}$ coupling constants in a reasonable time. Further, we found that the conformation of the sialic acid linkage differs depending on the type of NeuAc-connecting sugar, GalNAc or GlcNAc.

序論

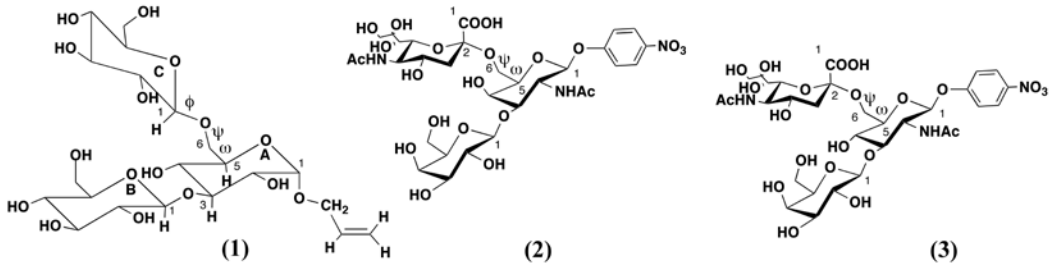
NMR による糖鎖構造の研究は水溶液中における立体構造とダイナミクスに関する情報が同時に得られるという優れた特質を持っている。C-H スピン結合定数（$^{n}J_{C\text{-}H}$ 値）は重要なパラメータの一つである。$^{n}J_{C\text{-}H}$ 値を得る HR-HMBC 法は降旗らによって開発された有益な測定法である [1)]。演者は、Glucose 3 糖よりなる試料 **(1)**を用いて測定し、結果を農芸化学会 2014 年大会において報告した。今回は、より短時間での測定が可能と思われる ^{13}C selective HMBC 法のパルス系列を開発・検討した。糖鎖機能において重要なシアロ糖鎖の一つ Gal-β(1-3)[Neu5Ac-α(2-6)] GalNAc-β-pNP **(2)**をモデル試料として、各種 NMR 法を用いて通常の構造解析を行った後、^{13}C selective HR-HMBC 法により $^{n}J_{C\text{-}H}$ 値を得た。FG-SIMBA 法 [2)]を用いることにより、$^{n}J_{C\text{-}H}$ に関する情報をさらに短時間で得た。これらの結果を基に、分子動力学法も合わせて検討した結果を報告する。構成単糖による影響（GalNAc と GlcNAc の違い）を解析するため、Gal-β(1-3)[Neu5Ac-α(2-6)]GlcNAc-β-pNP **(3)**についても解析中である。

キーワード: HR-HMBC, ^{13}C selective HMBC, 糖鎖構造

○うざわじゅん、かとうまさき、せきひろこ、ますひゅうま、やまぐちよしき

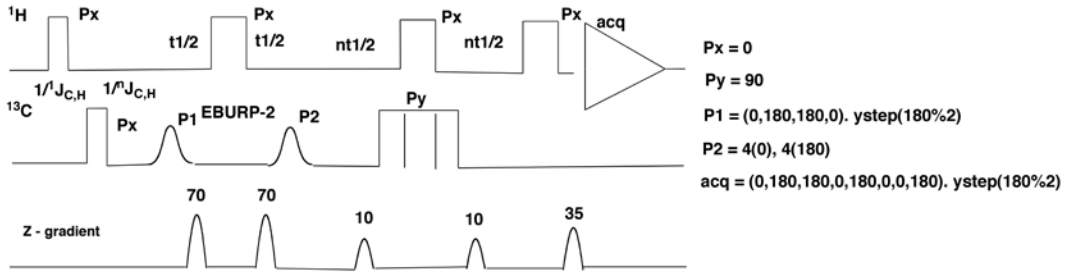
実験

試料**(1)**は理研・細胞制御研（小川智也主任）より譲り受けた。**(2)** および **(3)** は（株）東京化成より購入し、（株）シゲミ製の対称型試料管に重水に溶解して測定に用いた。



装置は JEOL-ECA-600 に Royal プローブを付属させて測定した。データ解析は主として Alice を用いた。それぞれの測定条件は個々の図の説明に記した。パルス系列を Fig.1 に示す。基本パルス系列の f1 パルスの２つを EBURP-2 にしたものを(a) HR-HMBCS とし、Claridge と Victoria による CT-^{13}C selective HMBC のパルス系列[3] に *J* 分解部分を付加させたものを(b)HR-HMBC-CV とした。後者は ^{13}C selective パル

(a) HR-HMBCS



(b) HR-HMBC-CV

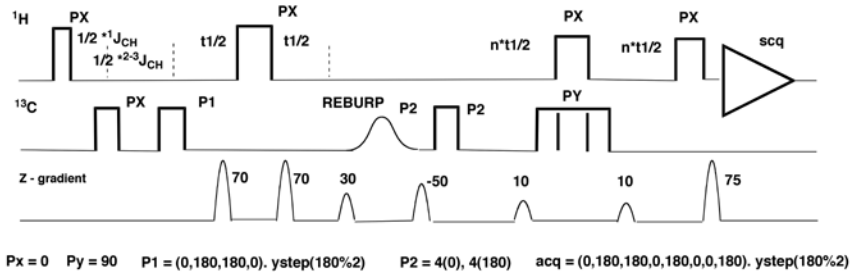


Figure 1. Pulse sequences of ^{13}C selective HMBC.

スが REBURP である。この２つを様々な試料および条件（パルス幅;2-6ms）を変えて測定して比較したところ、後者が選択性や水信号の消え方で勝っていた。

結果と考察

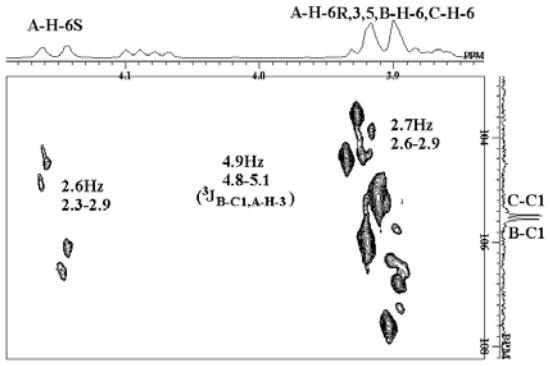


Figure 2. HR-HMBC spectra of (1).
34 mg/0.5 ml.f2;4 K,8 ppm. f1;512,100 ppm.
25℃. 12 hour.

(1) の HR-HMBC による結果のうち、Glc1-6Glc 結合部分であるプロトンの 3.8-4.2 ppm、カーボンの 103-108 ppm 付近のスペクトルを Fig.2 に示す。6 位プロトンの *R* と *S* の帰属は大類らによる経験則 [4]を使った。HR-HMBC によって得られた $^nJ_{C\text{-}H}$ 値による情報と分子力場計算の結果は、φ、ψ、ω とも良い一致を示した。ω については DPFGSE-SPT- Diff[5] 測定から得られた結果を併用した。また、f1,f2 部分プロジェクションスペクトルによる比較も行った。以上の結果を得て、シアル酸を持つ 3 糖を解析するにあたり、得られる試料の量と必要な時間を検討し、より短時間で測定可能な HR-HMBC-CV 法により **(2)** の解析を行った。

(a) (b)

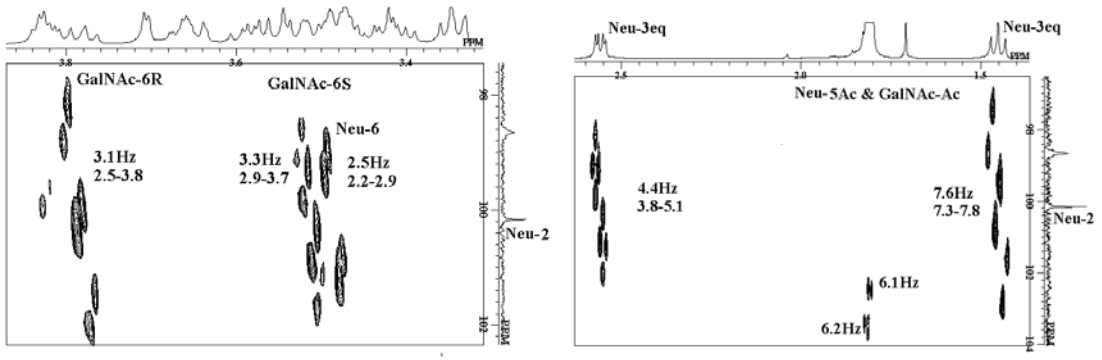


Figure 3. HR-HMBC-CV spectra of **(2)**. (a);Neu-C2 and GalNAc-H-6 correlation, (b);Neu-C2 and Neu-H-3ax,eq correlation. 10 mg/0.15 ml. f2;2 K,6 ppm. f1;32,12 ppm. 15℃.4 hour.

Neu-2 カーボンへの相関は、いくつかのシアル酸含有化合物に共通して、比較的に容易に測定できた。*J* 値の誤差範囲も小さかった。これに反して、6 位部分は分裂が大きいこともあって、測定時間も長くかかった。ここで得た $^nJ_{C\text{-}H}$ 値は、*R* と *S* で大差無い。これは Neu-2 への配座に差が小さいことを示していると考えた。

糖鎖のダイナミックな情報を得るには温度可変による $^nJ_{C\text{-}H}$ 値の変化を見るのが理想的である。また、糖鎖の構成単糖による影響（例えば GalNAc と GlcNAc の違い）を解析することが必要である。このため、さらに短時間で可能な測定法を検討した。

FG-SIMBA 法 [2]は一次元で、特定のカーボンに限定して相関ピークをプロトン観測する測定法である。演者も様々な試料で測定経験を有するが、プロトンが直接結合し

たカーボンとの相関ピーク検出には様々な工夫が必要であり、あまり良い結果が得られていなかった。シアロ糖鎖については 4 級炭素部分が重要であり、この測定法に適している。f1 軸の 選択パルスとして、一般に使われる Gauss パルスと比較検討後、SINC パルスを用いた。パルス幅は 14ms とした。

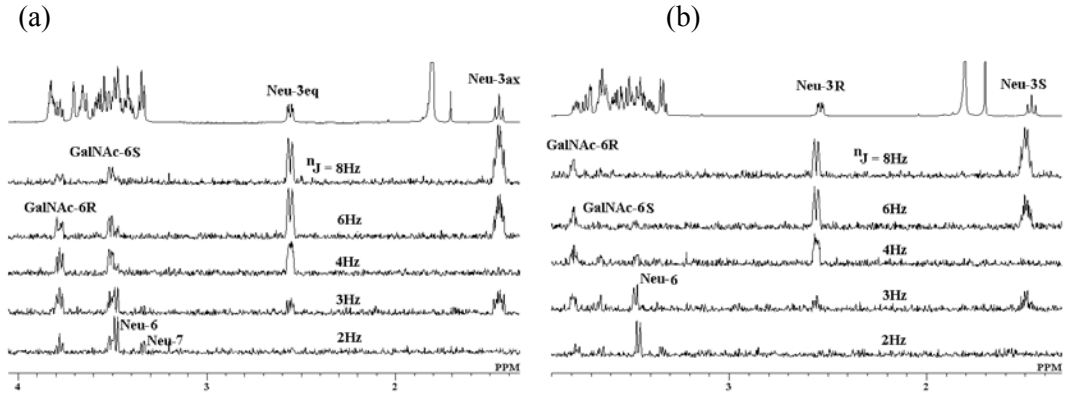


Figure 4. FG-SIMBA spectra of **(2)** and **(3)**. 15℃. (a):**(2)**;10 mg/0.15 ml, f2; 2 K,128 scan,5 min for each spectrum. (b):**(3)**;4 mg/0.15 ml, f2; 2 K,256 scan,10 min for each spectrum. Power spectrum mode.

Fig.4-(a) に見られるように、$^{n}J_{C\text{-}H}$ 値の設定を 8 Hz から 2 Hz に変えても GalNAc-6 の *R* と *S* の強度に変化は見られない。一方、(b)では明らかに異なっている。これは、シアル酸が 2−6 結合する相手が GalNAc と GlcNAc で配座が異なっていることを示している。測定時間も大幅に短縮できるので、温度可変の実験も可能となった。

結語

カーボンの選択性について、C-H スピン結合による f1 軸の広がりのため、選択性をぎりぎりまであげることはできない。むしろ余裕をもって広い領域を励起しなければならなかった。一次元の SIMBA 法はデータポイントを減らしてパワースペクトルでみた。この測定法では、$^{n}J_{C\text{-}H}$ 値そのものは得られないが、目安を得ることは可能であり、貴重な情報を短時間で得られることを示した。

最後に、試料 **(1)** の使用を快諾していただいた小川智也博士に深謝します。

参考文献

1. K.Furihata, M.Tashiro and H.Seto, Magn.Reson.Chem., **48**, 179(2010).
2. F.G.Vogt and A.J.Bennet, J.Magn.Reson., **132**, 214(1998).
3. T.D.W.Claridge and I.P.Victoria, Org.Biol.Chem., **1**, 3632(2003).
4. H.Ohrui, Y.Nishida, H.Hori and H.Meguro, J.Org.Chem., **56**, 1726(1991)
5. Y.Kubota, H.Hori, R.Sawa, H.Seki and J.Uzawa, Magn.Reson.Chem., **50**, 659(2012).

L3-11

$^{15}N/^{199}Hg$ NMR分光法による水銀を介したチミン-チミン塩基対の構造決定および電子状態解析

○田中好幸[1], 大樂武範[1], 古板恭子[2], 岡本到[3,4], 小野晶[3], 鳥越秀峰[5], Vladimir Sychrovsky[6], 児嶋長次郎[2]
[1]東北大院薬, [2]阪大・蛋白研, [3]神奈川大工, [4]理研, [5]東京理大理, [6]チェコ科学アカデミー

Structure determination and electronic structure of Hg^{II}-mediated T-T base-pair in DNA duplex with $^{15}N/^{199}Hg$ NMR spectroscopy

○Yoshiyuki Tanaka[1] , Takenori Dairaku[1], Kyoko Firuita[2], Itaru Okamoto[3,4], Akira Ono[3], Hidetaka Torigoe[5], Vladimir Sychrovsky[6], Chojiro Kojima[2]
[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, [2]Institute for Protein Research, Osaka University, [3]Faculty of Engineering, Kanagawa University, [4]RIKEN, [5]Faculty of Science, Tokyo University of Science, [6]Academy of Sciences of the Czech Republic

In order to determine structures of metal-complexes in solution and coordination-geometries in biomolecules, observations of heteronuclear NMR signals from coordinating atoms and metal centers are indispensable. In this presentation, we report a structure of Hg^{II}-mediated T-T base-pairs (T-Hg^{II}-T) in a DNA duplex.

We observed 2-bond ^{15}N-^{15}N *J*-coupling across Hg^{II}, $^{2}J(^{15}N,^{15}N)$, and N3-Hg^{II}-N3 linkages in the T-Hg^{II}-T base-pairs were identified. We further observed 1-bond ^{199}Hg-^{15}N *J*-coupling, $^{1}J(^{199}Hg,^{15}N)$ for a thymidine-Hg^{II}-thymidine complex in DMSO, and its value was found to be huge (1050 Hz). This is the largest $^{1}J(^{199}Hg,^{15}N)$ value which was observed so far (3 times as large as the pre-existing value). From this result, we experimentally demonstrated that $^{1}J(^{199}Hg,^{15}N)$ values intrinsically possess quite a wide range of $^{1}J(^{199}Hg,^{15}N)$ values.

金属錯体の溶液構造および生体分子内の金属配位構造の決定には、配位部位のヘテロ原子のNMRスペクトルの観測が必須である。今回、水銀イオンを介したT-T塩基対（T-Hg^{II}-T）の化学構造決定を報告する。なお、このような金属イオンを介した塩基対のことをメタロ塩基対と呼び、メタロ塩基対を含むDNA分子のことをメタロDNAと呼ぶことにする。

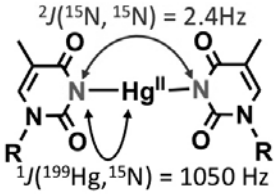


Figure 1 T-Hg^{II}-T base-pair

部位特異的に^{15}N標識チミンを導入したDNA二重らせん分子を化学合成にて調製した。向かい合うチミン塩基が^{15}N標識されているDNA二重らせん分子では、Hg^{2+}とDNA二重らせん分子の複合体形成時に、結合部位（N3）のシグナルが水銀原子を介した^{15}N-^{15}N *J*-coupling ($^{2}J(^{15}N,^{15}N)$) により二重線に分裂した（Figure 1）[1]。この時の$^{2}J(^{15}N,^{15}N)$値は2.4 Hzであった（Figure 1）[1]。このように生体高分子（DNA分子）中において、

多核NMR分光法, 金属錯体, メタロ塩基対

○たなかよしゆき，だいらくたけのり，ふるいたきょうこ，おかもといたる，おのあきら，とりごえひでたか，シフロフスキー ブラジミール，こじまちょうじろう

^{15}N NMR分光法によりメタロ塩基対の配位構造を決定した。

さらに水銀原子と窒素原子の$^{1}J(^{199}\mathrm{Hg},^{15}\mathrm{N})$値を決定するために、^{199}Hg NMR測定を行った。なお、感度不足のために、上記の水銀-DNA複合体からは^{199}Hgシグナルが観測できなかったため、^{15}N標識チミジン-Hg^{II}複合体をサンプルとして用いた。化学交換を押さえるために、水銀イオンのカウンターイオンが不在の条件下で、かつ、有機溶媒（DMSO）中にて^{199}Hg NMR測定を行った。

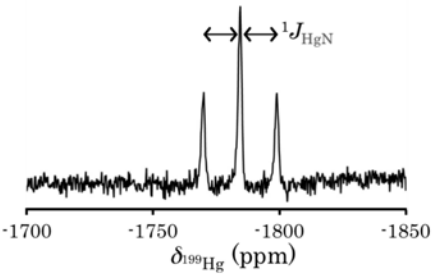


Figure 2. Mercury-199 NMR spectrum

その結果、^{199}Hgシグナルが^{15}N核との*J*-カップリング（$^{1}J(^{199}\mathrm{Hg},^{15}\mathrm{N})$）で三重線に分裂し、水銀原子に対して二つのチミン塩基が結合していることがわかった（Figure 2）。なお本$^{1}J(^{199}\mathrm{Hg},^{15}\mathrm{N})$値は1050 Hzという巨大な値であった。過去に観測された最大の$^{1}J(^{199}\mathrm{Hg},^{15}\mathrm{N})$値が395.5 Hz（EDAT類縁体CyDTAとHg^{II}の複合体）であったことからすると[2]、一桁大きな値となっている。このように$^{1}J(^{199}\mathrm{Hg},^{15}\mathrm{N})$値のレンジは従来知られていたレンジより格段に広いことが実験的に示された。

また量子化学計算により算出されたT-Hg^{II}-T塩基対および$[(Me_3Si)_2N]_2Hg$錯体[3]の$^{1}J(^{199}\mathrm{Hg},^{15}\mathrm{N})$の絶対値は実験値を良い一致を示した（CyDTA-Hg^{II}複合体の構造は未定のため）。しかし$^{1}J(^{199}\mathrm{Hg},^{15}\mathrm{N})$値は過去に三例しか実測値がないため、$^{1}J(^{199}\mathrm{Hg},^{15}\mathrm{N})$値がどのような構造因子（窒素原子の軌道混成状態等）と相関するかを議論できるには至っていない。

最後に、T-Hg^{II}-T塩基対形成に伴うチミンN3の^{15}N化学シフト値変位（30 ppmの低磁場シフト）について考察する。^{15}N核の遮蔽定数（σ_{15N}）は $\sigma_{15N} = \sigma_D + \sigma_P$ と表され、互いに逆符号の二つの項からなる（σ_D: 反磁性項 = 高磁場シフト項; σ_P: 常磁性項 = 低磁場シフト項）[4,5]。プロトン以外の核種では一般に$|\sigma_D| << |\sigma_P|$であり、化学シフト値は$|\sigma_P|$に大きく依存している。$|\sigma_P| \propto 1/|\Delta E|$（$|\Delta E|$は測定核周りの電子の平均励起エネルギー）の関係から[4,5]、^{15}N化学シフト値は窒素原子のローンペアが励起しやすくなると$|\sigma_P|$の寄与が大きくなり低磁場シフトするする。T-Hg^{II}-T塩基対では、N3-Hg^{II}-N3結合の共鳴寄与体（$N3:^{-}\ Hg^{2+}\ {}^{-}:N3$）を考える。ここで仮想的に生じたローンペアがN3-H結合（$N3:^{-}\ H^{+}$）のローンペアより励起しやすい（= N3-Hg^{II}結合がN3-H結合よりイオン性が高い）と考えることで、低磁場シフトが説明できる（ヘテロ核化学シフト値変位の解釈指針）。このようにヘテロ核のNMRデータは錯体の化学構造決定のみでなく、電子状態解析に資するデータを与えることが解った。

1. Y. Tanaka, S. Oda, H. Yamaguchi, Y. Kondo, C. Kojima, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 244–245.
2. E. H. Curzon, N. Herron, P. Moore *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1980**, 721–725.
3. Bernatowicz, P.; Szymański, S.; Wrackmeyer, B. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 6414–6419.
4. 阿久津秀雄，嶋田一夫，鈴木榮一郎，西村善文 編，NMR分光法 原理から応用まで（日本分光学会　測定法シリーズ41），学会出版センター，東京 (2003).
5. 宗像惠，北川進，柴田進 著，多核NMR入門 状態解析へのアプローチ，講談社サイエンティフィク，東京 (1991).

L3-12 変性シリカ－水共存系における水の核磁気緩和現象

○ 牧 秀志[1]・十川 廉[1]・村上 良[2]・山本雅博[2]・水畑 穣[1]
[1]神戸大学大学院・工学研究科
[2]甲南大学・理工学部

Magnetic Relaxation of Water Protons in Fumed silica/Water Coexisting System

○Hideshi Maki[1], Ren Sogawa[1], Ryo Murakami[2], Masahiro Yamamoto[2], Minoru Mizuhata[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kobe University, Hyogo, Japan*
[2]*Department of Chemistry of Functional Molecules, Konan University, Hyogo, Japan*

"Dry water" is the solid/liquid coexisting system with hydrophobic interface. In this study, we investigated the water molecular behavior of dispersion in the dry water by ^{1}H NMR and Raman spectroscopy. ^{1}H NMR result indicated that the dry water signals were broader and shifted to lower magnetic field than that of bulk phase. This result shows that water molecular mobility in the dry water was more reduced than in bulk phase. It is noteworthy that the detected amount of water molecules which estimated by the integral intensities of ^{1}H NMR signals is decreased with an increase of the actual amount of water molecules. Raman spectroscopy suggested solid-liquid interfacial adsorption of silica at low water fraction. There results suggested that the water molecules in the dry water were stabilized by silica with hydrophobic interaction.

【緒言】

酸化物粉体と水または電解質溶液が共存する固液共存系においては、固相近傍における液相の挙動が固相界面からの影響を受け、イオン種の構造変化や電気伝導度の変化など、バルクとは異なる物性を示すことが報告されている[1)]。固液界面での液相分子の挙動を知ることは、固液共存系における物質移動現象を解明する上で重要である。親水性を有する固相が形成する固液共存系と比較して、疎水性を有する固相が形成する系に関する研究例は少ない。本研究で用いるDry waterは疎水性を付与させた変性シリカが液滴の表面自由エネルギーを低下させるために気/液界面に吸着し、液滴をシリカ粉体が完全に包含することでその内部に多量の液体を含みながら直径数十μmの構造体を形成したものである[2)]。本研究では、疎水性界面に内包されたDry water中の水分子や電解質溶液の動的挙動を^{1}H NMRスペクトルやR_1およびR_2緩和速度測定、ラマン分光法を中心に検討を行い、水分子や電解質が疎水性界面から受ける影響、およびその液相分率依存性について考察を行った。同時に、親水性変性シリカを水および電解質溶液に均一分散させた系との比較も行った。

【実験方法】

水中に疎水性変性シリカを5 wt% 分散したコロイド分散液を調整し、その分散液を高速撹拌してDry waterを作製した。残余水を除去したDry water試料中の内包水の重量分率はTG測定により0.934であった。この試料から液相体積分率、f_w、を減少させるために試料を室温にて風乾または真空乾燥させて内包水を蒸発させ、f_wを変化させた。一方、親水性

定量NMR, 固液界面, 磁気緩和

○まき ひでし, そがわ れん, むらかみ りょう, やまもと まさひろ, みずはた みのる

変性シリカを水に均一分散させた試料も作製し、同様にf_wを変化させて各種測定を行った。NMR測定時、試料とロック用重水素化溶媒の混合を避けるため同軸二重サンプル管を用い、Varian Unity INOVA 400にて測定を行った。R_1測定は反転回復法、R_2測定はCPMG法により行った。併せて^{1}H核磁気緩和観測用のXigo nanotools社製Acorn areaを用いたR_1, R_2緩和速度測定を行った。

【結果と考察】

各f_wにおける Dry water および水－親水性変性シリカ分散系の ^{1}H NMR スペクトルはバルク水と比べ大きく高幅化し、固液界面近傍の水分子の運動性はバルク状態よりも低下することが明らかとなった。Fig.1 に Dry water 試料について信号面積強度を用いた定量 NMR（qNMR）解析を行った結果を示した。図中の点線は ^{1}H qNMR によって測定系内の水が全量検出された場合を示すが、f_w が高い領域において水分子の検出率が低下していることが分かった。Dry water 内に水が潤沢に存在する場合、疎水性変性シリカ粒子間に疎水性相互作用が充分に作用することで疎水性界面のネットワーク構造が強化され、固液界面における水分子の運動性が低下すると考えられる。種々の f_w における Dry water 試料のラマンスペクトルのピーク分解解析を行った結果、高 f_w 領域では水の OH 対称伸縮モードに帰属される 3200 cm^{-1} と 3450 cm^{-1} 付近のピーク面積比がバルク水と類似していたのに対して、f_w が低下するほど、水分子間の水素結合に帰属される Out of phase に起因する 3450 cm^{-1} 付近のピーク分率が増大した。さらに水－親水性変性シリカ分散系では、含水率の増加に従って T_2 が増加する一方、Dry water 試料では、含水率に依らずほとんど一定であった（Fig.2）。これらは高 f_w 領域における水－疎水性変性シリカ間の相互作用の増大を意味し、上述の ^{1}H qNMR 解析を支持する結果である。

さらに親水性変性シリカを 1.0 mol･L^{-1} $LiClO_4$ 水溶液に均一分散させた系では、含水率を変化させると水分子に対して電解質が強く影響を及ぼす領域と変性シリカが強く影響を及ぼす領域が存在することが明らかになった。

本研究は CREST-JST プロジェクト研究領域「エネルギー高効率利用のための相界面科学」の元に行われた。

【引用文献】

1) M. Mizuhata, et al., *J. Mol. Liq.*, 1999, **83**, 179
2) R. Murakami, et al., *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 767

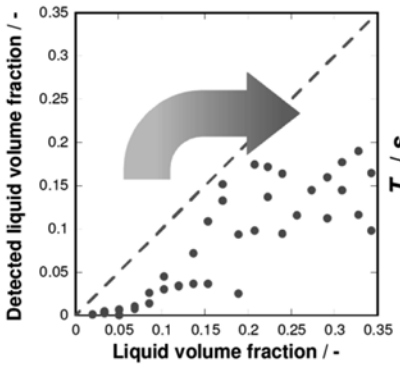


Fig. 1 Liquid volume fraction dependence of detected water amount in Dry water by ^{1}H qNMR.

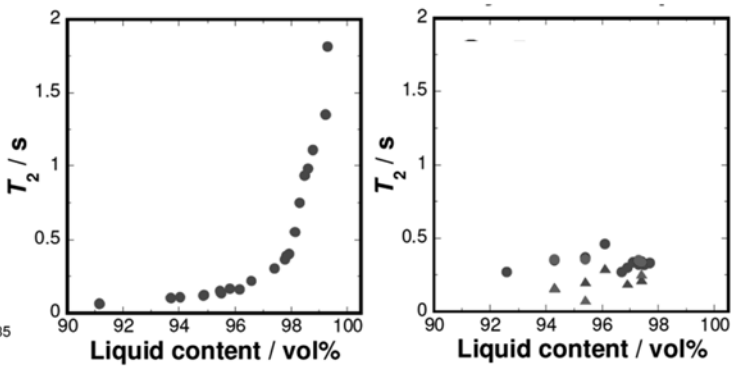


Fig. 2 Liquid content dependence of spin-spin relaxation rate. (left) fumed silica dispersion, (right) Dry water

L3-13 第一原理分子動力学計算と GIPAW 法を併用したリチウムホウ酸ガラスの NMR パラメータの推定

○大窪 貴洋 [1], 岩舘 泰彦 [1], 土田 英二 [2]
[1] 千葉大院工, [2] 産総研

NMR parameter estimation of lithium borate glass by combining ab initio molecular dynamics and GIPAW calculation

○ Takahiro Ohkubo[1], Yasuhiko Iwadate[1], Eiji Tsuchida[2]
[1] *Graduate School of Engineering, Chiba University, Japan*
[2] *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan*

An atomic structure of a molten $0.3Li_2O$-$0.7B_2O_3$ glass melt at 1250 K has been investigated by using ab initio molecular dynamics (abMD) simulation. The GIPAW calculation was applied to the structures of 500 snapshots, which were obtained from each time-steps of abMD calculation. Obtained chemical shifts and quadrupole coupling constants were analayzed into detailed classification of B units, which was identified based on number of bonding bridging oxygen and coordination number. We discuss a possibility of discrimination with these structural units by means of NMR parameters.

[緒言]

ホウ酸ガラス中の B は多様な結合様式を示し、これまでにホウ酸ガラスの固体 ^{11}B NMR による構造解析が多数報告されている。ホウ酸ガラスの局所構造解析に固体 ^{11}B NMR の有用性が認識される一方、^{11}B のケミカルシフト (δ_{iso}) と四極子結合定数 (C_Q) は、ガラス特有の B-O 結合長や O-B-O 結合角の自由度に由来する広い分布をもっており、δ_{iso} と C_Q の僅かな変化を構造と関連付けて議論することが難しい。近年、周期境界条件の下で平面波展開した波動関数に摂動を与えて δ_{iso} を推定する Gauge Including Projector Augmented Waves(GIPAW) 法は、構造から δ_{iso} を予測する強力なツールとして認識されている。酸化物ガラス材料でも古典分子動力学計算 (MD) で作成した原子構造に基づいて GIPAW 計算を行い、実測した NMR スペクトルの詳細な解析結果を行う MD-GIPAW 法によるアプローチが数多く報告されている。GIPAW 計算は、現在の計算機資源ではせいぜい数百原子の系を対象とした計算が限界である。よって、MD-GIPAW による構造解析は、限られた原子数から評価される δ_{iso} と C_Q にガウス関数等の分布関数を導入してスペクトルパターンをシミュレーションする手法が一般的に行われている。しかし、数百原子のただ一つの構造から得られる δ_{iso} と C_Q は、構造の自由度の高いガラスネットワーク構造のすべてを再現し取り得る可能性のある構造単位全ての NMR パラメータを評価しているとは言い難い。本研究では、リチウムホウ酸ガラス融体を対象により精緻な NMR スペクトルの推定を目的とし、数百原子の第一原理分子動力学計算から得られる 500 個のスナップショット (原子構造) の GIPAW 計算を行うことで、NMR パラメータの分布関数を導入せずに NMR スペクトルを推定するアプローチを試みたので報告する。

[解析方法]

解析対象としたリチウムホウ酸ガラス融体は、$0.3Li_2O$-$0.7B_2O_3$ の組成とした。GIPAW 計算を行った原子構造は、既報の研究 [1)] で行った 202 粒子から成る系の第一原理分子動力学計算から得られた 500 個のスナップショットを対象にした。GIPAW 計算は、 QE-

GIPAW, ホウ酸ガラス

○おおくぼ たかひろ, いわだて やすひこ, つちだ えいじ

GIPAW5.0.3 パッケージで行い、擬ポテンシャルは、PSLibrary0.3.1 を用いた。ケミカルシフトと四極子モーメントのリファレンスは、結晶構造と δ_{iso} および C_Q が既知の物質で得られた計算結果により与えた。波動関数と電荷密度を展開するカットオフは、80 および 800 Ry とし収束を確認した。

[結果]

^{11}B NMR のケミカルシフトのリファレンスおよび四極子モーメントは、$LiBO_2$, $NaBO_2$ および B_2O_3 結晶の GIPAW 計算より与えた。これら結晶の GIPAW 計算より得られた δ_{iso} は 1.8 ppm 以内、C_Q は 0.05MHz 以内で実験値と一致した。GIPAW から得られた δ_{iso} と C_Q は、ガラスネットワークを形成する B と O の連結構造に基づいて分類した。これまでのホウ酸ガラスの研究より、B の構造は、O との配位数によりリング状の 3 配位 (BO3ring)、非リング状の 3 配位 (BO3nonring) および四面体の 4 配位 (BO4) が単位ユニットとして知られている。本研究では、B と結合している非架橋酸素数およびリング構造で大きく分類し、Figure 1 に示すような構造のラベル付けを行って GIPAW により得られる δ_{iso} および C_Q を整理した。ここで、BO3nonring は B3Tm(m は B に結合している架橋酸素数)、BO3ring は Tmr(m は B に結合している架橋酸素数)、ring を構成していない BO4 は Q4To(o は B に結合している架橋酸素数)、ring を構成している BO4 は Q4Tpr(p は B に結合している架橋酸素数) とラベル付けした。B-O 結合や架橋と非架橋酸素の判定は、B-O の動径分布関数に基づいてカットオフ距離 2.0Å を用いて行った。

Figure 2 は、GIPAW 計算により得られた δ_{iso} と C_Q のヒストグラム (δ_{iso} と C_Q の bin 幅は 0.1 ppm と 0.05 MHz) を Figure 1 の分類構造でプロットした結果を示す。δ_{iso} と C_Q は広い分布を持っており、ピークトップは実験より得られた既報の BO3ring, BO3nonring および BO4 の δ_{iso} と C_Q を良く再現した。着目すべき結果として、Q4T4 の δ_{iso} は他の BO4 構造と比較して高磁場側に δ_{iso} を示す。また B3T2 の C_Q は B3T3 と比較して小さい C_Q を示した。このように構造の詳細な分類に基づいて NMR パラメータを評価できることは、実験から得られる δ_{iso} や C_Q のわずかな変化と構造との関係を議論する際に有用である。講演では ^{7}Li と ^{17}O の結果についても報告する。

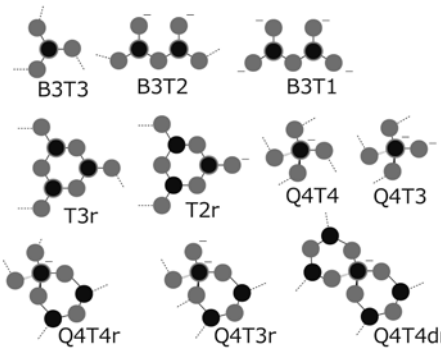


Figure 1: Depiction of B structure on basis of coordination number and bridging oxygen number. Circles of black and gray face color are B and O, respectvely. Circles with gray edge color are B assigned to bottom symbol.

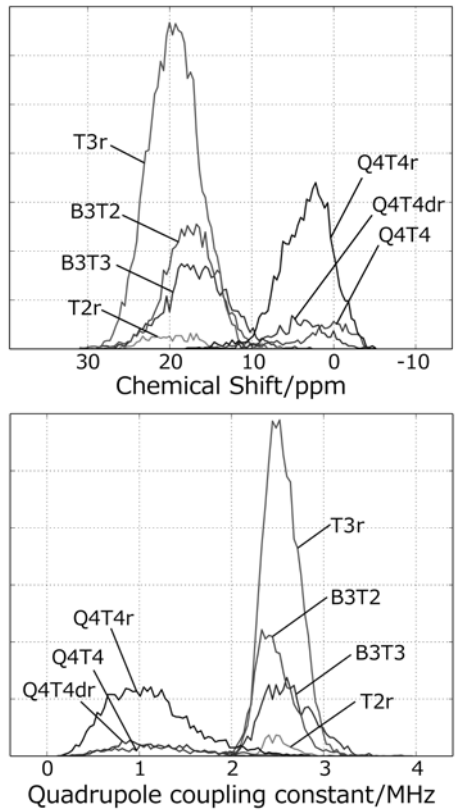


Figure 2: Calculated ^{11}B chemical shift distribution and quadrupole coupling constant of each B stracture.

参考文献

1) T. Ohkubo et al., *J. Phys. Chem. B*, **117**, 5668–5674 (2013)

SL3-6 タンパク質の高エネルギー状態を標的とした構造生物学

○北原亮[1]、北沢創一郎[1]
[1]立命館大・薬学部

High-energy conformations of proteins as a new target of structural biology

○Ryo Kitahara[1], Soichiro Kitazawa
[1]*College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University.*

Although transiently populated conformations of proteins, which have higher free energy than the basic folded state, can be involved in their functions as well as molecular assembly, characteristics in structure, dynamics, and thermodynamics of the high-energy states are largely unknown. By using high-pressure NMR spectroscopy, we performed an NOE based structural determination of the ubiquitin variant Q41N at 2500 bar, where the alternatively folded conformation of ubiquitin is 97% populated. Because conformational changes from the basic folded state to the alternatively folded state match changes seen on binding of ubiquitin to the ubiquitin-activating enzyme E1, we suggest that the E1 recognition of ubiquitin occurs by conformational selection, rather than induced-fit motion. In the case of RNA recognition motif 1 (RRM1) of TDP-43 protein, which is a core component of ubiquitinated inclusions in FTLD and ALS, we found time-dependent changes in chemical shifts without signal broadening. These observations indicate an accumulation of misfolded conformation of RRM1. Pressure accelerated the misfolded reaction. Because the misfolded regions are involved in the core of the RRM1-aggregates, the misfolding could trigger following oligomerization and aggregation of RRM1. It is challenging to investigate atomic coordinates for the misfolded conformation of RRM1 and how the misfolding of RRM1 induces pathogenic conversion of TDP-43.

タンパク質は最安定状態から変性状態の間を熱的に揺らいでいる。最安定状態より高い自由エネルギーを持った状態（高エネルギー状態）は、部分的に構造が壊れ疎水性残基が露出した状態となる場合もあり、タンパク質の機能発現だけでなく分子凝集に関わっている可能性もある。近年、高エネルギー状態を捉える手法として、緩和分散法だけでなく高圧力NMR法も普及し始めており、高エネルギー状態の構造、ダイナミクスや熱力学的な研究が活性化している。本発表では、高圧力NMR法を用いた高エネルギー状態の立体構造とミスフォールディング状態の研究について紹介する。

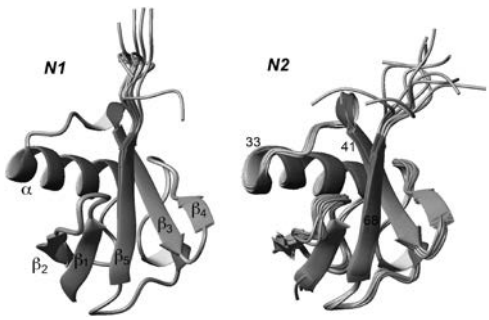


Fig. 1 Solution structures of WT ubiquitin at 1 bar (N_1, PDB:1D3Z) (左) and Q41N variant at 2500 bar (N_2, PDB: 2RU6) (右).

high-pressure NMR, high-energy state, misfolding

○ きたはら　りょう，きたざわ　そういちろう

タンパク質の立体構造形成と部分モル体積には正の相関があるため、加圧により構造が壊れ水和した部分モル体積が小さな状態が安定化される。加圧とともに、最安定状態を僅かに逸脱した状態、すなわち準安定状態や局所変性状態などの高エネルギー状態が安定化され、次に変性状態が安定化される。そのため、高圧力下で高エネルギー状態を選択的に安定化できれば、その立体構造解析が可能となる。高圧力下で安定化された高エネルギー状態の構造は、常温常圧下の揺らぎにより一時的にとる構造と良い一致を示している。例えば、ユビキチンでは折れ畳み中間体の特徴と[1]、OspAでは重水素交換NMR法で観測された変性中間体の特徴と[2]、T4リゾチームではR2緩和分散法で観測された特徴と[3]良い一致をしている。これらの結果は、圧力が常圧下で僅かに存在する高エネルギー状態の分布率を増加させているとする考えを強く支持する。

[ユビキチン準安定状態の立体構造解析]

ユビキチンの構造揺らぎ情報に基づく合理的なアミノ酸変異により、常温常圧下で準安定状態N_2の分布率を71%もつ変異体Q41Nの作製に成功した[4]。この合理的アミノ酸変異と圧力摂動の組み合わせにより、N_2の分布率を2500気圧下で97%にまで高め、3次元NMR測定に基づく高精度な立体構造解析に成功した(Fig.1)[5]。1245個の距離情報と72個の主鎖二面角情報に基づく立体構造の精度は、先行研究の解析精度を大幅に改善し、通常のNMR試料管による解析精度に近い。大変興味深い事に、N_2状態の構造はユビキチンがユビキチン活性化酵素E1と相互作用するときに形成するコンフォメーションと類似していた事から、ユビキチンによるE1酵素の認識は、誘導適合型ではなくコンフォメーション選択型であることを示唆した。

[TDP-43 RRM1ドメインのミスフォールディング]

TDP-43は核タンパク質でRNAプロセッシングの役割を有するが、細胞質への異所局在や細胞質内での凝集体形成が前頭側頭葉変性症(FTLD)及び筋萎縮性側索硬化症（ALS）病態に及ぼす影響が注目されている。TDP-43が持つ２つのRNA認識モチーフ(RRM)のうちの１つRRM1について、経時的に複数の部位で不可逆的にアミド水素とアミド窒素の化学シフト値が変化する事を発見した。化学シフト変化を示した残基は分子の片側に集中していること、またクロスピークの線幅に変化が無いことタンパク質濃度に依存性があることから、弱い分子間相互作用によりミスフォールディング状態がトラップされたものと推測される。興味深い事に、2000気圧での圧力処理により同様のミスフォールディング状態が速やかに形成された。RRM1は、熱処理や振とう、圧力によって凝集体を形成するが、ミスフォールディングする部位は、凝集コア領域と良い一致を示していることから、高エネルギー状態或はミスフォールディング状態への転移が凝集体形成の引き金となる事が示唆された[6]。

高エネルギー状態或はミスフォールド状態の立体構造情報が明らかになると、生命現象の解明のみならず、それらを標的としたドッキングシミュレーションや低分子化合物の探索など創薬を目的とした計算科学的アプローチも可能となる。高圧力NMR測定の感度は通常セルの1/2にまで到達しており、構造解析を含めたあらゆる溶液NMRアプローチが可能なため、高エネルギー状態を標的とした構造生物学研究の発展が期待される。

[参考文献]1. Kitahara et al. PNAS 2003, 2. Kitahara et al. Biophys. J. 2012, 3. Maeno et al. 第51回NMR討論会, 4. Kitazawa et al. Biochemistry 2013, 5. Kitazawa et al. Biochemistry 2014, 6. Shodai et al. J. Biol. Chem. 2013

SL3-7 チロシンキナーゼの NMR 解析へ向けた試み：受容体型チロシンキナーゼの活性化機構

○小橋川　敬博[1,2]，稲垣　冬彦[2]
[1]熊大・院・生命科学
[2]北大・院・先端生命

Development of the method for production of the isotope labeled tyrosine kinase, and its application to NMR analysis of the interaction between kinase domains required for activation of the receptor tyrosine kinase

○Yoshihiro Kobashigawa[1,2], and Fuyuhiko Inagaki[2]
[1]*Kumamoto University, Kumamoto, Japan.*
[2]*Hokkaido University, Sapporo, Japan.*

Tyrosine kinases are key protein family, which play central role in cellular signal transduction. Their aberrant activation is related to progression of cancers, thereby tyrosine kinases are assumed to be attractive therapeutic targets. NMR is a powerful analytical tool for drug discovery. However, use of NMR is quite limited due to difficulty in production of isotope labeled tyrosine kinase, presumably by toxicity against *E.coli*. We developed a general method for production of tyrosine kinase for NMR analysis. Using this system, we performed NMR, cross link experiment and docking analysis to clarify transient and weak interaction between kinase domains, which is required for initial trans-phosphorylation step for activation of the receptor tyrosine kinase.

チロシンキナーゼはタンパク質のチロシン残基のリン酸化を触媒する酵素であり、ヒトには 97 種類が存在する。細胞内シグナル伝達のトリガーとなるタンパク質であり、その活性は厳密に制御されている。発現の亢進、無秩序な活性化および不活性化はがんをはじめとして様々な疾患に関わり、創薬ターゲットの重要な一翼を担う。受容体型チロシンキナーゼは、細胞外領域へのリガンドの結合を検知して 2 量体化し、構造変化が誘起されることで細胞質領域内のキナーゼドメイン同士が近接し、互いの分子が分子間でリン酸化し合うことで活性化する。チロシンキナーゼの活性はキナーゼドメイン内の活性化ループのリン酸化により制御されるが、その過程において、細胞外ドメイン間の相互作用だけでは不十分であり、キナーゼドメイン同士が相互作用し、2 量体構造を形成することが不可欠である。このキナーゼドメイン間の相互作用

---

tyrosine kinase, isotope labeling, transphosphorylation

○こばしがわ　よしひろ，いながき　ふゆひこ

は弱く、過渡的なものであるため、観測は難しい。そのような構造および相互作用を捉える上では NMR は有効な手法である。しかしながら、チロシンキナーゼは大腸菌に対して毒性を示すために、安定同位体標識試料の調製が難しく、NMR の利用は限られている。X 線結晶構造解析においても、結晶中のスナップショットとして偶然捉えられる以外には方法がなかった。そのため、約 50 種類ある受容体型チロシンキナーゼの中でも、活性化ループのリン酸化に関わるキナーゼドメイン間の 2 量体構造が報告されているのは IGF1R[(1)]のみである。そのため、この 2 量体構造がチロシンキナーゼにおいて共通するのか、それとも異なっているのかは明らかではない。本研究では、大腸菌を用いた安定同位体標識チロシンキナーゼの汎用的な発現手法の構築を行った。さらに、その手法を利用し，受容体型チロシンキナーゼの 1 種である FGFR1 の安定同位体標識試料を調製し、NMR、Cross Link、Docking を組み合わせることにより、その活性化ループのリン酸化に関わるキナーゼドメイン間の相互作用および過渡的2量体構造を解析した。

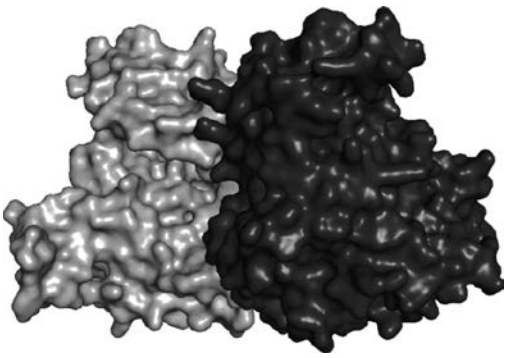


Fig. 1. The structural model calculated by using HADDOCK 2.1[(2), (3)] software for homo dimer of FGFR1 kinase domains based on the distance restraint from the cross-link experiment.

その結果，FGFR1 のキナーゼドメインが head-to-head 型の対象な平行 2 量体構造を形成することが明らかとなった (Fig. 1.)。また、活性部位及び活性化ループ以外にも広い領域で 2 分子が相互作用していることが明らかとなった。IGF1R では head-to-tail 型の対称な逆平行 2 量体構造を形成し，相互作用面は活性部位と活性化ループ周辺に限局することが明らかにされており、FGFR1 の 2 量体構造は、これとは異なっていた。現在，他のチロシンキナーゼについて解析を進めるとともに、本研究で明らかとなった 2 量体構造の相互作用面を標的とした阻害剤の探索を進めている。

References

(1) Wu *et al.*, . (2008) *EMBO J.* **27**:1985-1994.

(2) de Vries *et al*., (2007) *Proteins: Struc. Funct. & Bioinformatic* **69**: 726-733.

(3) Dominguez *et al*., (2003). *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 1731–1737.

SL3-8 SAIL法を利用したタンパク質構造揺らぎのＮＭＲ研究

○武田光広[1], 甲斐荘正恒[1,2]
[1]名大・理学・構造生物学研究センター
[2]首都大・理学系研究科

NMR study on protein dynamics by the SAIL method

○Mitsuhiro Takeda[1] and Masatsune Kainosho[1,2]
[1]Graduate School of Science, Nagoya University, Aichi, Japan.
[2]Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.

A new NMR approach for investigating the protonation states and hydrogen exchange rates for the side-chain amino groups of lysine (Lys) residues in proteins will be described. The method, which was developed as a part of our efforts to obtain NMR information about the exchangeable protons on side-chain functional groups, utilizes the isotope shifts for the ^{13}C-chemical shifts of ε-carbons, induced by deuteration of the amino groups. For this purpose, proteins specifically labeled with [ε-^{13}C; ε,ε-D_2]-lysine were prepared, and the chemical shifts and line-shapes of the $^{13}C_\varepsilon$ signals in H_2O/ D_2O mixtures at various ratios were measured. Using this approach, we investigated the hydrogen exchange rates for the amino group of Lys-15 (*P1* residue) of *bovine* pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) in the free and trypsin-bound states. Other aspects of this approach will also be discussed.

蛋白質の側鎖官能基は、水素結合、静電相互作用を形成する事により蛋白質の構造形成や分子認識に重要な寄与する。そのため、これらの側鎖官能基の原子レベルの構造情報は構造機能相関研究において非常に利用価値が高い。しかし、主鎖アミド基と比べて側鎖官能基をプローブとしたNMR研究は少ない。その理由として側鎖官能基に結合したプロトンは主鎖アミド基に結合したものに比べ２桁から３桁ほど水との化学交換が速く、従来の^{1}H検出型のNMR測定では直接観測できない場合が多い点が挙げられる。だが、重要な役割を担う側鎖官能基についてみると、水素結合を形成する事でその水素交換速度が遅くなり^{1}H検出型のNMR測定でも観測可能となる。このような従来見過ごされがちな交換の遅い側鎖官能基を網羅的に同定できれば、利用価値の高い情報源となることが期待される。

我々はSAIL-NMR法の応用技術開発の一つして、タンパク質側鎖官能基の水素交換の解析法開発を進めている。これは、官能基の水素原子が重水素置換されることにより、隣接する炭素の ^{13}C-NMR シグナルに誘起される同位体シフト効果を利用する。軽水/重水(1:1) 混合溶媒中に特定残基の解離性官能基の隣接炭素のみを選択的に ^{13}C-標識した蛋白質試料を溶解させ、^{13}C-NMRシグナルを観測した場合、標識したアミノ酸残基の官能基上の水素/重水素交換速度が同位体シフトの逆数よりも十分遅ければ、

SAIL、ダイナミクス、^{13}C NMR

○たけだみつひろ, かいのしょうまさつね

^{13}C-NMR シグナルは分離して観測されが、交換速度が十分速いと平均化されたシグナルが観測される。このような同位体シフト効果を利用した手法は一般性が高く、これまでに、Ser, Thr, Tyr の OH 基、Cys 残基の SH 基を標的とした解析法を開発した。(論文１－４)

本発表では、最近本手法の解析対象として新たに付け加わったLys残基側鎖アミノ基に関して紹介する。Lys 残基側鎖アミノ基は軽水/重水(1:1)混合溶媒中に置かれると、NH_3, NH_2D, NHD_2、及び ND_3 の同位体異性体が 1:3:3:1 の割合で混在した状態となる。これら４つの異性体の $^{13}C^{\varepsilon}$-NMR シグナルは互いに化学シフト値が異なり、溶媒の水を介した水素/重水素交換反応により相互変換している。もし、その速度が、同位体シフト(重水素一つあたり 0.1 ppm 程度)より遅い場合、異性体の炭素シグナルが分離観測され 1:3:3:1 の４重線が観測され、交換速度が速ければ平均化された１つのシグナルとして観測される。(右図) $^{13}C^{\varepsilon}$シグナルは水素交換速度によらず観測できるためその線形から水素交換速度の遅いアミノ基を網羅的に同定する事が可能となる。実証試験としてウシ膵臓トリプシン阻害剤 BPTI およびトリプシン複合体を対象として、トリプシン基質特異性ポケット(S1 サイト)に格納された Lys15 の側鎖アミノ基の水素交換速度を調べた。新たに合成した[ε-^{13}C; ε,ε-D_2]-lysine により選択標識された BPTI 試料を用いて Lys15 の $^{13}C^{\varepsilon}$-NMR シグナルを軽水/重水混合溶媒中にて直接観測すると、同炭素シグナルはトリプシン非結合状態では１重線として観測されていたが、トリプシン結合に伴い 1:3:3:1 の４重線へと線形変化する事が観測された。この結果は、Lys15 の側鎖アミノ基の水素交換速度が S1 ポケット格納により大幅に遅くなる事を明確に示している。また、本発表では同位体シフト効果を利用した別の側鎖官能基に対する応用研究の可能性についても発表する。

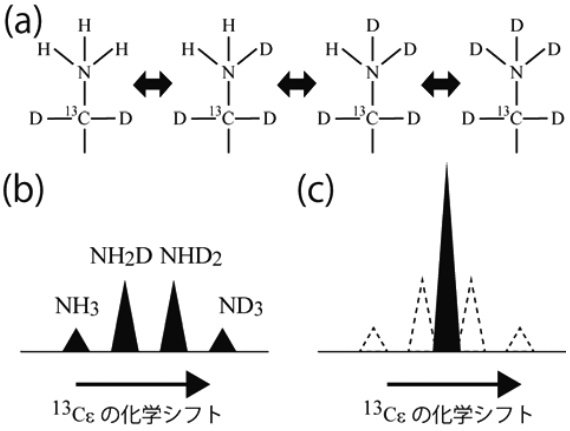


Fig. 1 (a) Equilibrating four isotopomers in a 1:1 mixture of H_2O and D_2O. If hydrogen exchange rate is slower than the size of isotope shift effect, the 13Ce signals gets resolved for the isotopomers (b), otherwise averaged as single averaged peak (c)

[謝辞] 合成リジンの有機合成は寺内勉博士、試料調製は近藤早苗研究員が実施した。本研究は、倉田記念日立科学技術財団および創薬等支援事業の助成を受けて行われた。

[論文]

1. Takeda M *et al.* (2014) *J Magn Reson* **241**, 148-154
2. Takeda M *et al.* (2011) *J Am Chem Soc* **133**, 17420-17427
3. Takeda M *et al.* (2010) *J Am Chem Soc* **132**, 6254-6260
4. Takeda M *et al.* (2009) *J Am Chem Soc* **131**, 18556-18562

SL3-9 生細胞内の生命現象を観測するin-cell NMR法の開発と応用

○西田紀貴[1], 嶋田一夫[1]
[1]東京大学大学院・薬学系研究科

A bioreactor for NMR observation of biological events inside living cells

○Noritaka Nishida[1], and Ichio Shimada[1]
[1]Gtaduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

in-cell NMR is a useful approach for obtaining structural information within living cells, but the rapid increase of the dead cells has limited the usage of various NMR experiments that require long-term measurements. To overcome this problem, we developed a novel bioreactor system, in which fresh culture medium is supplied to cells encapsulated in thermoreversible Mebiol gel inside the NMR tube, thereby maintaining intracellular ATP level and reducing the dead cell population. Using the bioreactor established above, we successfully identified the binding site of the externally introduced protein, CG1 (the microtubule-binding domain of CLIP-170), for the endogenous microtubule based on the in-cell transferred cross saturation (in-cell TCS) experiments.

【目的】in-cell NMR法は細胞内の安定同位体標識タンパク質のNMRシグナルを直接観測し、その構造情報を得る手法である。近年、より高等な哺乳細胞を対象としたin-cell NMR法が開発され、哺乳細胞内で実際に起こる生命現象の観測や、細胞内環境下での創薬スクリーニングなど、様々な応用が期待されている。しかし、高密度の細胞をNMR試料管内に充填して測定を行うin-cell NMR法では、細胞内環境の劣化および細胞死が経時的に生じるため､限られた時間内でしかNMR観測を行うことができないという問題があった。そこで、我々は細胞内環境を保ったまま長時間のin-cell NMR測定を行うための新規バイオリアクターシステムの開発を行い、細胞内の生命現象を観測する手法の確立を目指した(Ref.1)。

【方法】本研究では、NMR 測定中の細胞に培地を灌流するバイオリアクター装置を開発した（Fig.1）。まず、細胞を温度可塑性の Mebiol gel と混合し、NMR サンプル管でコイル状にゲル化した。その後、サンプル管底部に挿入したガラスキャピラリーより一定の速度で培地を供給した。コイル状にゲル化して表面積を大きくすることで、培地成分が速やかに浸透し、老廃物や漏出タンパク質を効率よく除去できる。またサンプル管上部の過剰な培地はアスピレーターによって吸引した。

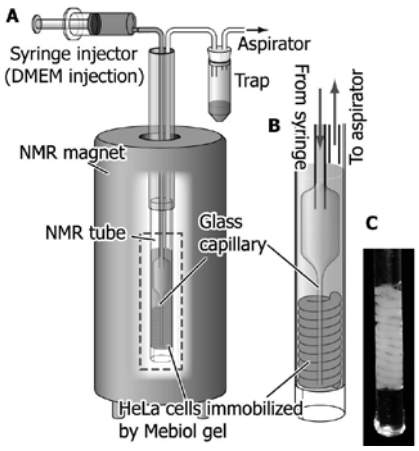


Fig.1 Schematics of gel-encapsulated bioreactor system

in-cell NMR，バイオリアクター，転移交差飽和法

○にしだのりたか，しまだいちお

【結果】①細胞内ATP濃度の経時変化

バイオリアクターを用いて細胞を生理的に保持できているか調べるため、^{31}P NMR法によって細胞内ATPに由来するシグナルを観測し、その強度変化から細胞内ATP濃度の経時的変化を調べた。従来法で測定を行った場合は、開始から30分後の時点で細胞内ATPはほぼ枯渇した。一方、バイオリアクターを用いた場合は20時間経過後も細胞内ATP濃度は初期濃度の80%以上に保たれており、細胞が生理的環境に保持されていることが明らかとなった(Fig.2)。

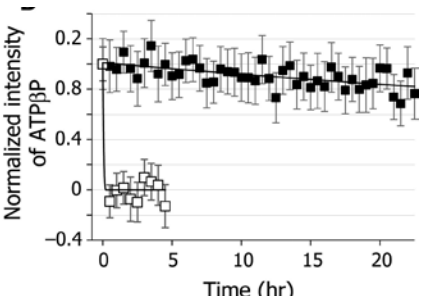


Fig.2 Time-course of intracellular ATP concentration with (black) and without (white) usage of the bioreactor system

②漏出タンパク質の影響の評価

本研究では、微小管結合タンパク質CLIP-170の微小管結合ドメインであるCG1 (9.4 kDa) を観測対象とした。CG1は当研究室でこれまでに開発したSLOを用いた可逆的な膜透過法(Ref.2) により、HeLa S3細胞に導入した。細胞内CG1のNMR シグナルを高感度で測定するため、Ile, Leu, Valの側鎖メチル基を選択的に^{1}H, ^{13}C標識したCG1を観測対象として、^{1}H-^{13}C SOFAST-HMQC法によるin-cell NMRスペクトルの測定を行った。まず、従来法で 1 時間のin-cell NMR測定を行うと、測定後の細胞上清から測定中に漏出したCG1由来のシグナルが観測されていたが、バイオリアクターを用いて測定を行った場合は、測定後の上清からはCG1に由来するシグナルはほとんど観測されず、漏出タンパク質の影響を排除できることが明らかとなった。

③転移交差飽和（TCS）法を用いた細胞内タンパク質間相互作用の観測

バイオリアクターを用いることで長時間のin-cell NMR測定が可能になったため、導入したCG1 における内在性微小管との相互作用部位をTCS法により解析した。in-cell TCS実験の結果、L77, I90, L92, V103, I117 において顕著な強度減少比が観測された(Fig. 3A)。これらの残基は CG1 の立体構造上において一定の面を形成し、報告されているCG1 の微小管相互作用界面と一致した(Fig. 3C)。一方、過剰量のCG1を用いた競合TCS実験においては、これらの残基には顕著な強度減少は観測されず(Fig. 3B)、in-cell TCS実験の強度減少は特異的な相互作用を反映していることが支持された。

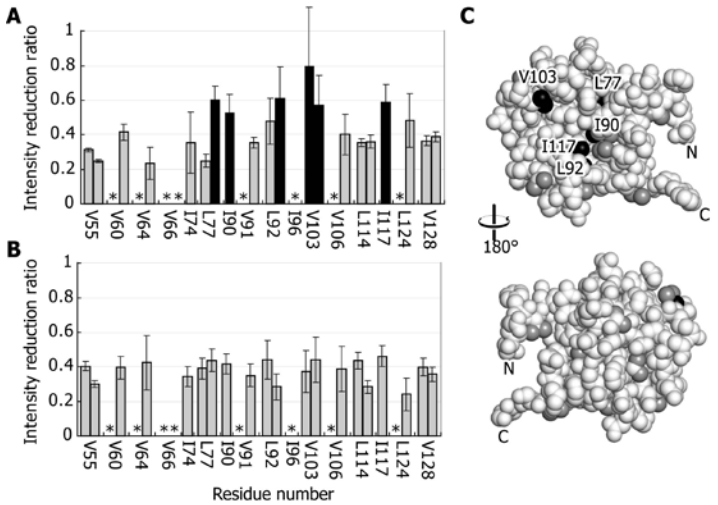


Fig.3 Results of the in-cell TCS experiment

【参考文献】

(1) Kubo S., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 1208-11 (2013)
(2) Ogino S., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10834-5 (2009)

SL3-10

Dissecting Oncogenic RAS Signaling by NMR

Mathew J. Smith, Mohammad Mazhab-Jafari, Zhenhao Feng,
Christopher B. Marshall, **Mitsuhiko Ikura***

Princess Margaret Cancer Centre and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, M5G 1L7
mikura@uhnres.utoronto.ca

RAS proteins are frequently mutated in cancer (~25% of all human tumours) and have been known as major drivers of tumourgenesis for decades. However, the development of clinically effective, RAS-targeted cancer therapies has been unsuccessful, and RAS-driven cancers remain among the most refractory to available treatments. This is largely owing to the lack of understanding of how mutant RAS functions and alters related signaling pathways in tumours. To overcome this, we sought to develop better functional assays for, and mechanistic insights into oncogenic RAS-affected pathways. We employ NMR spectroscopy to study RAS enzymatic kinetics and the underlying mechanisms of catalysis, as well as interactions with downstream effector proteins. We have extensively used real-time NMR-based GTPase assays we developed previously (1-3) to characterize oncogenic Ras mutations and Noonan syndrome-derived mutations in the Ras guanine nucleotide exchange factor (GEF) Son-of-Sevenless (SOS) expressed in mammalian cells. Our parallel and quantitative NMR assays of RAS-effector interactions demonstrated that mutant RAS G12V alters properties of the integrated RAS network (4). RAS is prenylated and functions on the plasma membrane, but previous mechanistic studies were mainly carried out using a truncated, soluble form of RAS. We employed the nanodisc technology developed by Sligar and coworkers to study membrane-anchored RAS, which enabled us to characterize how the biological membrane affects the structure and function of wild-type and mutant RAS. These structural and functional characterizations of RAS by NMR may help to design new therapeutic strategies for anti-cancer agents and diagnostic tools (Supported by CFI, CIHR, CCSRI, HSFO, and CRS).

1. Marshall CB, Ho J, Buerger C, Plevin MJ, Li GY, Li Z, Ikura M, Stambolic V. Sci Signal. 2009 Jan 27;2(55):ra3.
2. Marshall CB, Meiri D, Smith MJ, Mazhab-Jafari MT, Gasmi-Seabrook GM, Rottapel R, Stambolic V,Ikura M. Methods. 2012 Aug;57(4):473-85.
3. Smith MJ, Neel BG, Ikura M. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Mar 19;110(12):4574-9.
4. Smith MJ, Ikura M. Nat Chem Biol. 2014 Mar;10(3):223-30.

ポスター発表要旨

Poster Abstracts

P1

光誘起化学交換スペクトルのペプチドフォールディングへの応用

○長島敏雄[1]，植田啓介[1]，西村千秋[2]，山崎俊夫[1]
[1]理研・ライフサイエンス技術基盤研究センター
[2]帝京平成大・薬

Photo-induced exchange spectroscopy applied to peptide folding

○Toshio Nagashima[1], Keisuke Ueda[1], Chiaki Nishimura[2], Toshio Yamazaki[1]
[1]*Center for Life Science Technologies, RIKEN*
[2]*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University*

Azobenzene derivatives are used as photosensitive molecular devices utilized as polymer material, liquid crystal, and optogenetics. A structure of azobenzene was controlled by light irradiation, that is a conversion from *trans*- to *cis*-form by irradiating UV light and from *cis*- to *trans*-form by irradiating blue light. The isomerization of azobenzene derivatives followed change of distance between both the ends. We apply the distance change to force a peptide to transform its structure. To promote photo-isomerization of azobenzene in NMR, we developed an effective photo-reaction cell for NMR tube. Furthermore, we obtained photo-induced exchange spectra of azobenzene-alkylated peptide.

アゾベンゼン誘導体は、光感受型分子デバイスとして、ポリマー、液晶、オプトジェネティクスで利用されている。光異性化反応によって、UV照射で*trans*から*cis*へ、青色光照射で*cis*から*trans*へ可逆的に変換できる。アゾベンゼンの両端(4, 4’位)に構造的にリジッドな置換基を付けた場合、光異性化反応により18 Åから14 Åに変化させることができる。また、構造変化はピコ秒オーダーで起こるとされている。この距離変化と反応速度をペプチドのフォールディング状態を強制的に変化させる分子スイッチとして応用することを考えた。

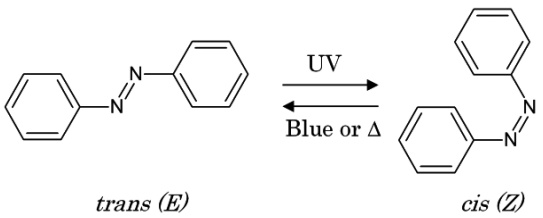


Fig. 1 *trans-cis* isomerization of azobenzene is induced by photo-irradiation or thermal relaxation

まず、効率的なNMR内光反応のための装置構築を行った。UVと青色光として、比較的安価に入手でき、なおかつNMRの漏えい磁場中で取り回しやすいという理由で、発光ダイオード(LED)と半導体レーザー(LD)を用いた。UV光源として365 nm LED (Thorlabs、日亜製、ファイバ出力(以下同じ) 100 mW)、青色光源として、455 nm LED (OSRAM製、150 mW)または450 nm LD (フォトンリサーチ、OSRAM製、1000 mW)を使用した。光源からサンプルまでの光ファイバを短くして光強度の減衰を抑制するために、光源はNMR磁石上部にテープで固定した。磁石サイズによらずファイバ長は3メートルを用いた。

NMR内光反応方法は、CIDNPの研究分野で様々発表されており、今回は過去のこれら

アゾベンゼン, 化学交換, フォールディング

○ながしま としお, うえだ けいすけ, にしむら ちあき, やまざき としお

の手法を参考にして開発を行った。光反応領域の制限と光反応の高効率化を目的として、磁化率マッチ対称管（シゲミ管）の中心を光ファイバが貫通する構造の光反応セルを開発した。450 nm 1000 mW LDの100 ms程度の照射時間で*cis*から*trans*への構造変化を起こすことができるようになった。パルスシークエンスの中で構造変化を起こさせるのに十分短い時間に到達した。そこで、NOESYのmixing timeの部分で構造変化をさせる光を照射することで、アゾベンゼンの光異性化反応による化学交換スペクトルの取得を行った。Relaxation delayで365 nmの光を照射し、mixing timeで455 nmの光を照射した結果、*cis*の磁化を*trans*の構造で観測することができた。この光照射方法では、*trans*から*cis*への逆方向の構造変化は起こりにくいため、非対称な化学交換スペクトルが得られた。

ハロゲン化アルキルを両端に持つ水溶性アゾベンゼン誘導体をmyoglobinのH helix部分のペプチドにS-アルキル化した。ペプチドは、2点のシステイン置換とアゾベンゼンが結合することで立体障害が出る部分をアラニンに置換した。アゾベンゼン誘導体を結合したペプチドの*trans*状態のNOESYを測定した結果、主鎖のHN-HNの連鎖NOEが観測されたことからα ヘリックス構造を形成していることが確認できた。UVを照射して*cis*構造にすると、このHN-HNの連鎖NOEが観測されなくなったためα ヘリックスが壊れたことも確認できた。アゾベンゼン誘導体の両端の距離を変えることで、ペプチドの構造が変化していることが確認できた。次に、*cis*構造から*trans*構造、つまりアンフォールド状態からフォールド状態への光化学交換スペクトルを測定した結果、いくつかのアミノ酸でアンフォールド状態のシグナルをフォールド状態の化学シフトで検出できた。この結果により、これまでとは別の視点からフォールディングにアプローチできるようになり、新しい知見が得られる可能性を示せた。

DC Burns, et al. Nature Protocols, 2, 251-258 (2007)
C Feldmeier, et al. Journal of Magnetic resonance, 232, 39-44 (2013)

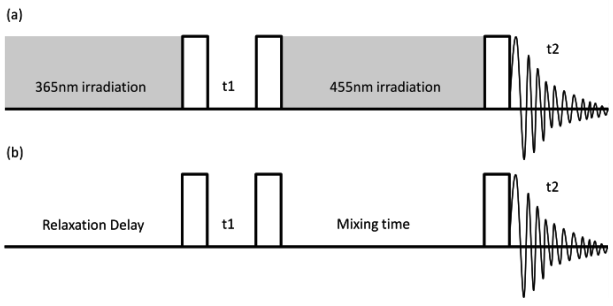


Fig.2 A pulse diagram of photo-induced exchange spectroscopy. (a) 365 nm light irradiation during relaxation delay followed by 455 nm irradiation during mixing time. (b) in case of light-off, the pulse diagram is normal NOESY.

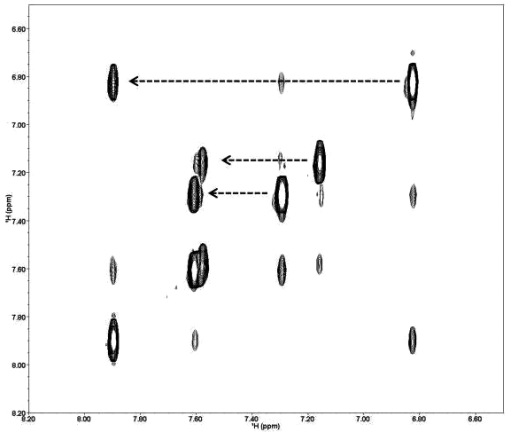


Fig.3 Light-induced EXSY produced asymetric 2D spectrum. Arrows indicate magnetization transfer from *cis* to *trans*.

P2 WET 法の新しい応用測定--Broad Band WET 法とその応用について

○降旗一夫[1]，佐久間千勢子[2]，田代 充[3]
東大院農・応生化[1]，東薬大・薬[2]、明星大・理工[3]

Broad Band WET ---a new method to observe quantitatively minor components in foods

K. Furihata[a)], C. Sakuma[b)] and M. Tashiro[c)]

The NMR analysis of foods frequently suffers from a problem of dynamic range. In many foodstuffs, the main components such as sugars (especially evident in fruits) are observed as strong signals as well as water. The signals of water and sugars make the minor components undetectable or detected with very low sensitivity due to the limitation of dynamic range. Because in foods the information of minor components is important like major ones, it is indispensable to suppress the strong signals of water and sugars simultaneously to detect the minor components with high sensitivity.

In order to solve the above problem, we have developed new techniques, Broad Band WET, for saturating a broad bandwidth. The proposed methods were applied to saturate the resonances of water and sugars simultaneously in pineapple juice as an example, and the quantitative ability of Broad Band WET method was systematically evaluated.

NMR の高感度に伴い、食品のジュースそのままで NMR スペクトルが測定できるようになった。その食品の溶液の NMR のスペクトルは、食品にどのような成分が含まれるかを示し、その食品の特徴を表すことが出来る。しかし食品の NMR スペクトルは混合物で複雑であるため、スペクトルから直接成分が何であるか判別できない。また食品の特徴を NMR スペクトルからは容易には説明できない。そのため、混合物の食品の NMR スペクトルから主成分および微量成分を、定量を含め帰属をすることはますます食品の NMR データの蓄積の上で重要になると思われる。

これらの食品の NMR スペクトルを測定する場合の問題点として、その溶液は軽水であり、また、食品の特徴である糖のシグナルが強く観測される。そのため、軽水を saturation しても強い糖のシグナルにより NMR の dynamic range が支配されるため、糖以外の微量成分を S/N よく観測することは困難になることがしばしばある。この問題を解決する方法として、如何に軽水と糖のシグナルを低く抑えて微量成分を観測するかが重要になっている。この軽水と糖シグナルを低く抑え、微量成分を観測する方法として、Broad Band(BB)-WET 法を検討し良好な結果を得ることができた[1)]。

<u>Broad Band (BB)-WET の PULSE 系列</u>

図 1,には BB-WET に関係した 4 つのパルス系列(a)WET1D, (b)WET-NOESY1D, (c)Improved WET-NOESY1D, (d)BB-WET を示す。この 4 つの pulse に対応するスペクトルを図２に示す。この Broad Band(BB)- WET 法は NOESY1D と WET 法を組み合わせたパルス系列である。この BB-WET 法のパルスの説明として、順次(a)WET1D, (b)WET-NOESY1D, (c)Improved WET-NOEST1D,(d)BB-WET のスペクトルを示すことにより、如何に broad band saturation が可能になるかを示す(図 2)。サンプルには DSS を入れたキャピラリーを挿入し積分値の基準とした。全ての測定に置いて、軽水の

WET, Broad Band(BB)-WET
○ふりはたかずお、さくまちせこ、たしろみつる

pre-saturation を加えた。(a)は WET1D のスペクトルである[2]。WET-pulse は E-BURP を使用し、すべて 90° pulse を使用した。また saturation 範囲は、2.98ppm から 5.28ppm に設定した。糖のシグナルはエタノールのメチルシグナルの高さ 1/3 のレベルまで saturation することができた。しかし、軽水シグナルは pre-saturation を併用しているにも拘わらず強く観測された。なお、パイナップルの軽水及び糖の saturation 無しのスペクトルは図４(a),(b)に示している。(b)は WET1D と NOESY1D を結合した WET-NOESY1D のスペクトルである。Mixing time は 1.0msec を設定した。WET-NOESY1D スペクトルでは、WET1D スペクトルとほぼ同程度に、軽水と糖の saturation が可能であった。Mixing time の間に homo spoil pulse を入れても大きな変化はない。(c)は改良 WET-NOESY1D スペクトルである。mixing period に新たに g1-sel 90°-g2-g3-sel 90°(±)-g4 を導入した。この二つの selective-90° pulse は位相回しの結果、0° パルスと 180° パルスとなり、selective pulse による水と糖のシグナルは消去される。その結果、糖のシグナルは WET-NOESY1D スペクトル(b)よりはさらに 1/5 の LEVEL まで大幅に saturation することが可能になった。(d)は BB-WET のスペクトルである。g1-sel 90°-g2-g3-sel 90°(±)-g4 pulse に新たに 180° pulse を導入した。(c)のスペクトルと比較して分かるように、180° pulse を導入した方がシグナルの saturation 効果をさらに高める役割を果たすことが判明した。このように、BB-WET 法は強大な水及び糖のシグナルを微量成分と同等あるいはそれ以下のレベルまで saturation することが示された。この BB-WET スペクトルは、WET-1D スペクトルと比較して、観測する微量成分のシグナルの強度はほとんど変わらずそのままシグナルの積分測定に使用可能である。これは、BB- WET の mixing period が非常に短いために、T_1によるシグナル強度には影響しないと考えられる。

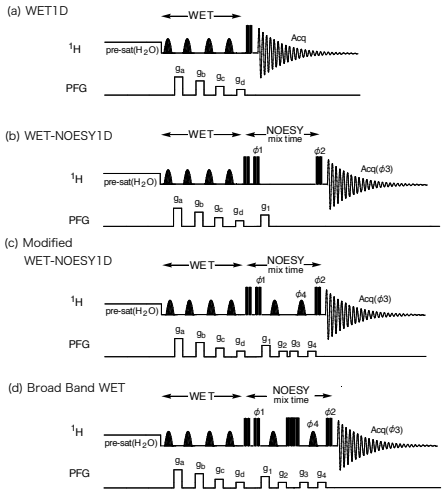


Fig.1 Pulse sequences of Broad Band WET. The thin and thick bars represent 90° pulse and 180° pulses respectively.

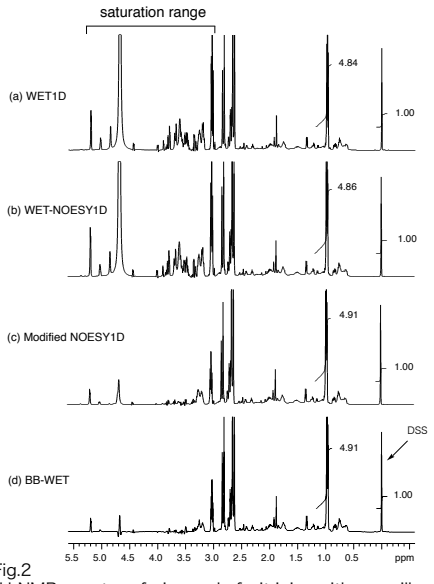


Fig.2
^{1}H-NMR spectra of pineapple fruit juice with a capillary sample of DSS. The reciever gain was set 40 dB and water presaturation was employed in all measurements. The saturation was set in the range of 2.98-5.28 ppm.

図 3 には Broad Band-WET と Conventional WET の saturation の profile を示す。水のシグナルを用いて、観測 offset を 100Hz ステップに可変して測定した。Selective pulse は E-BURP- pulse を使用し 1175Hz(2.35ppm)を saturation するように設定した。このときの selective 90° pulse は 3.88msec であった。(a)Conventional WET-1D で

はsaturation範囲はBB-WETと同じであるが、saturationシグナルにおいては、WETパルスのselective pulseのflip angleが影響し、指定したsaturation範囲以上にsaturationされシグナルの選択性を低めている。これに対して、(b)BB-WETの場合では、selective pulseのflip angleをすべて90°pulseに置き換えた結果、ほぼ1000Hz(2ppm)に渡り、選択性の高いsaturationを示した。一方、軽水および糖の領域以外の観測領域においては、saturation磁場の影響はほとんどなく、均一なシグナル強度を示した。これは、軽水及び糖を除いた領域ではそのまま積分測定が可能であることを示した。

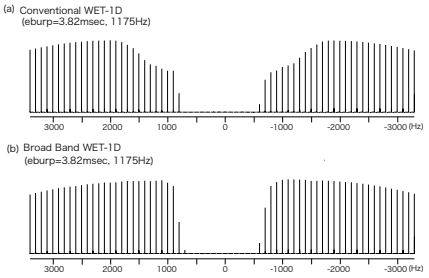


Fig.3 The saturation profiles acquired using (a) conventional WET and (b) BB-WET pulse sequences. The pulse width of E-BRUP was 3.82 ms Resonance offsets were recorded at 100Hz increments. A solution containing 5% H_2O was used.

図4において(a)Conventional 1Dスペクトル、(b)軽水のpre-saturationによるNOESY1Dスペクトル、(c)DPFGSE-1D(saturation)スペクトル、(d)Conventional WET-1Dスペクトル、(e) BB-WET-1Dスペクトルを示す。測定sampleはパイナップル fruit juiceである。パイナップル fruit juiceは糖の濃度が高く、微量成分であるアミノ酸シグナルの観測が困難である。このサンプルをモデルサンプルとした。

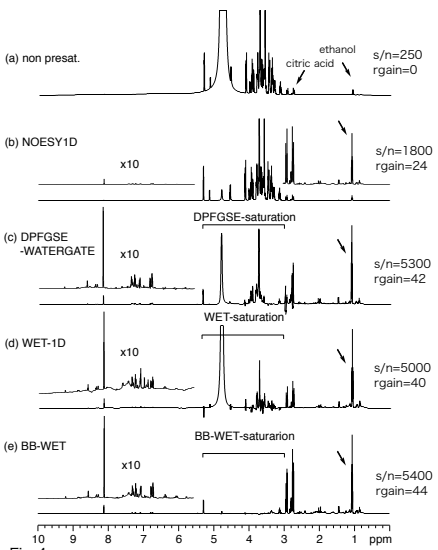


Fig.4
^{1}H-NMR spectra of pineapple fruit juice The values of reciever gain and S/N ratio calculated in the ethanol signal of 0.97 ppm are indicated in each spectrum.

(a)通常の1D-NMRスペクトルでは、巨大な軽水シグナルと糖のシグナルが観測されている。この時のreceiver gain(RGAIN)=0である。このスペクトルでは高磁場側にcitric acidとethanolのシグナルのみが観測された。また低磁場側5.5〜10ppmの領域では微量成分のシグナルの観測は困難であった。(b)はNOESY1D-presat法により軽水をsaturationしたスペクトルである。このスペクトルでは糖のシグナルが強く観測されるが、微量成分アミノ酸のシグナルが解析でできるほどの強度では観測されていない。(c)はDPFGSE(water-gate)スペクトルである[3]。DPFGSE(water-gate)法はDPFGSE法の-g1-sel 180°-g1-g2-sel 180°-g2-のsel 180°pulseをsel 180°-Hard 180°pulseに置き換えた方法であり、強大な軽水シグナルのsaturation法である。この方法を軽水ばかりでなく軽水と巨大な糖のsaturationに応用した。Selective pulseの励起範囲は2.98ppmから5.28ppmである。Pre-saturationを導入しあらかじめ軽水をsaturationしている。Selective pulseはRE-BURPを使用し、そのpulseの巾は4.1 msecであった。このスペクトルでは0ppm〜3ppm及び、5.5ppm〜10ppmの微量アミノ酸成分のシグナルを感度良く観測できるが、それと同時に、3.05〜5.40ppmの間で強度の強い水と糖のシグナルを検出している。このシグナルは、選択励起パルスの漏洩磁場による off resonance シグナルである。また、citric acid(2.52ppm)のシグナルに示されるように、スピン結合の大きなシグナルにおいて、J-modulationによるシグナルのゆがみが観測され、積分強度の観測は

困難であった。(d)Conventional WET-1D スペクトルである[2]。WET-pulse は 2.98ppm から 5.28ppm を saturation するように設定した。Selective pulse は E-BURP を使用し、その pulse の巾は 3.9 msec であった。このスペクトルにおいて、軽水と糖のシグナルを saturation したことにより、RGAIN を 40 まで上げることが出来、0〜3ppm 或いは 5.5〜10ppm の領域に於いて、微量成分のシグナルを観測できた。しかし、軽水のシグナルは十分には saturation 出来ていない。また、糖のシグナルの強度が強く観測されている。これは軽水も糖のシグナルも強大であり、WET pulse だけでは十分な saturation が出来なかったものと思われる。(e)は BB-WET-1D スペクトルである。WET-pulse は 2.98ppm から 5.28ppm を saturation するように設定した。Selective pulse は E-BURP を使用し、その pulse の巾は 3.9msec であった。また、RGAIN は 44 であった。BB- WET 法では presaturation を併用し、軽水と糖の saturation を行った。このスペクトルにおいて、軽水と糖のシグナル(2.98ppm〜5.28ppm)の領域が saturation され、しかも、糖のシグナルに於いては WET スペクトル(d)よりもかなり低く抑えることが可能となった。また、saturation していない高磁場側(0〜3.1ppm)と低磁場側(5.5ppm〜10ppm)の微量成分のシグナルが容易に観測された。

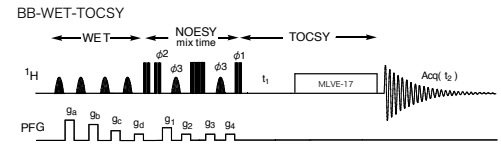


Fig.5 Pulse sequences of BB- WET-TOCSY. The thin and thick bars represent 90° pulse and 180° pulses respectively, and sine shapes are E-BURP-90° pulses. All pulses are along x unless otherwise shown.

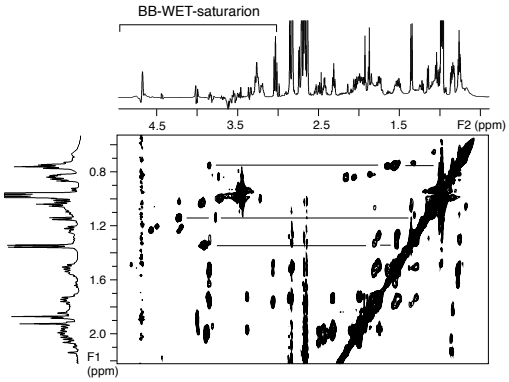


Fig.6 BB-WET-TOCSY spectra of pineapple fruit juice
F1x F2 = 6700 x 6700 Hz, point = 512 x 2048
scans = 64, mix=50 msex, sel-pulse=3.8 msec

BB-WET-TOCSY スペクトル

図 5 と図 6 に BB-WET-TOCSY のパルス系列とそのスペクトルを示す。BB-WET 法が 2D-NMR に応用できることが重要である。パイナップルのような溶媒が軽水でしかも糖のシグナルが強く観測される化合物では、微量成分の帰属を行うには 2D-スペクトルが測定出来なければならない。図 6 に示すように、BB-WET-TOCSY スペクトルにおいて、軽水および糖のシグナルを非常に低く抑えることができ、微量成分のクロスピークをはっきりと観測できた。しかも F2 軸の糖のシグナル強度の強い領域で、微量成分のクロスピークの観測が可能であることを示した。

まとめ

食品の NMR スペクトルの問題点は軽水と糖のシグナルが強く観測されるため、このシグナルを如何に小さく押さえるかが問題であった。BB-WET 法は軽水と糖のシグナルを同時に低く抑え、微量成分の観測を可能にした。しかも、積分測定も可能であった。また、この BB-WET 法は COSY 法や TOCSY 法にも応用が可能である。この方法を応用し如何に微量成分のシグナルを帰属できるかが問題となる。

1). K. Furihata, J. Zhang, M. Koda, T. Miyakawa, M. Tanokura, Magn. Reson. Chem.,2014, **52**, 333.
2). S. H. Smallcombe, S. L. Patt, P. A. Keifer, J. Magn. Reson.,A1995, **117**, 295
3). K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T. Hwang, A. J. Shaka, J. Am. Chem. Soc. 1995,**117**, 4199.

P3

大腸菌蛋白質生合成系を利用した新規SAILアミノ酸標識法の開発

○宮ノ入洋平[1], 石田洋二郎[2], 武田光広[1], 寺内勉[3,4], 井上正順[2], 甲斐荘正恒[1,3]
[1]名古屋大学大学院・理学研究科・構造生物学研究センター
[2]ラトガース大学・医学部・バイオテクノロジーセンター
[3]首都大学東京大学院・理工学研究科
[4]SAILテクノロジーズ株式会社

Effective amino acid labeling method using auxotrophic mutant *E.coli* protein expression system.

○Yohei Miyanoiri[1], Yojiro Ishida[2], Mitsuhiro Takeda[1], Tsutomu Terauchi[3,4], Masayori Inouye[2], and Masatsune Kainosho[1,3]
[1]*Structural Biology Research Center, Graduate School of Science Nagoya University, Nagoya, Japan.*
[2]*Center for Advanced Biotechnology and Medicine, Rutgers University – Robert Wood Johnson Medical School, New Jersey, U.S.A.*
[3]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.*
[4]*SAIL technologies, Inc, Kanagawa, Japan.*

During the past several years, we have been trying to develop *relaxation optimized* SAIL methods, to allow us to obtain precise information for the structures and dynamics of very large protein particles, for which *conventional* SAIL methods cannot be applied. We have already succeeded in observing and assigning the aromatic ring and aliphatic ^{1}H-^{13}C signals for a 723 a.a. (82 kDa) protein, *E. coli* malate synthase G (MSG). To make this innovative method available for the worldwide biological NMR community, our efforts have also been focused on developing efficient and practical protocols to prepare proteins specifically labeled with expensive labeled amino acids, such as SAIL amino acids. In this presentation, we report a newly derived *E. coli* auxotrophic mutant for Val, Leu and Ile, which is extremely useful for labeling proteins with these important amino acid residues for structural studies.

[序] 我々は、これまでに立体整列同位体標識（stereo-array isotope labeling: SAIL）法を駆使し、従来の溶液NMR法では困難とされてきた、高分子量（> 50 kDa）蛋白質の精密立体構造の解析手法を開発してきた。昨年度の年会までに、核磁気緩和過程を徹底的に制御した新規SAILアミノ酸の開発、及び大腸菌高発現系を用いた選択SAIL標識蛋白質の試料調製プロトコルを開発し、分子量82kDaのリンゴ酸合成酵素（malate synthase G: MSG）について、メチル基、芳香環及び脂肪族側鎖の$^{1}H^{13}C$相関シグナルを高感度に観測し、立体構造決定の要となるNOEシグナルを高精度に帰属することに

SAIL法, 高分子量蛋白質, 大腸菌蛋白質発現系

○みやのいりようへい, いしだようじろう, たけだみつひろ, てらうちつとむ, いのうえまさより, かいのしょうまさつね

成功した[1)]。本年会では、SAIL-NMR法の更なる高度化及び汎用化を目指し、アミノ酸要求性大腸菌を利用した試料調製法を確立したので、報告する。

[実験] Ile, Leu 及びVal 残基の要求性を示すBL21(DE3) *E.coli* (ILV要求性大腸菌)は、P1ファージを用いた遺伝子破壊法(P1 transduction)で作製した。Ile, Leu, Valに立体特異的に安定同位体標識を施したSAILアミノ酸をSAILテクノロジーズ社により合成した(Fig.1a,b)。これらSAIL-Ile/Leu/Valは、通常の大腸菌とILV要求性大腸菌を用いて、MSGへ取り込ませた。M9最少培地 (SAIL-Ile/Leu/Val, [U-^{2}H]-グルコース, [^{15}N]-塩化アンモニウム, 99.8% 重水) を用いて、様々な培養条件下で目的蛋白質の発現量を確認した。また、得られた試料を加水分解後にMS分析し、同位体標識率や代謝転移の有無を確認した。調製したSAIL-Ile/Leu/Val標識MSGの各種NMRスペクトルの測定は、cryoprobeを装着したBruker AVIII-900及び600を使用した。

[アミノ酸要求性大腸菌を利用した試料調製] これまでの研究より、通常の大腸菌を利用した場合、例えばVal残基を90% 以上の標識率で目的蛋白質に取り込ませるためには、M9最少培地100 mLあたり10 mg のVal残基を添加する事が必要であった。今回、様々な培養条件を検討した結果、ILV要求性大腸菌を利用する事で、Ile, Leu及びValの添加量を大幅に抑えつつ、特異的かつ98 % 以上の高い標識率で目的蛋白質にSAILアミノ酸を取り込ませることに成功した。実際に、ILV要求性大腸菌を用いて、MSG蛋白質を調製したところ、アミノ酸添加量を大幅に減らしつつも、蛋白質の発現量を損なうことなく、各アミノ酸特異的に標識されたMSG試料を調製する事に成功した。NMRスペクトルにおいても、立体特異的なメチルシグナルの観測やNOEシグナルを高感度に観測し、正確に帰属する事にも成功した(Fig.1c)。

[結論] アミノ酸要求性大腸菌を利用したSAILアミノ酸標識試料の調製法を新たに確立した。本手法により、SAILアミノ酸の添加量を大幅に抑える事が可能となり、SAIL-NMR法をより汎用性の高い手法として確立する事ができた。今後、様々なアミノ酸について、アミノ酸要求性大腸菌と核磁気緩和最適化SAILを併用していく予定である。

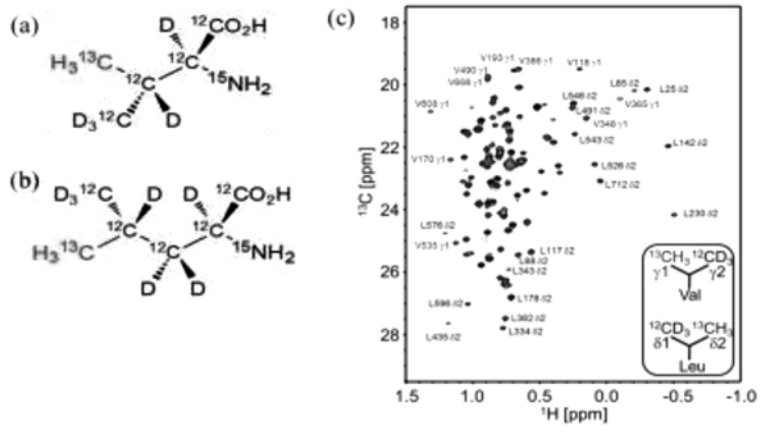


Fig.1 Structure of (a) γ1-Val and (b) δ2-Leu. (c) methyl TROSY spectrum of γ1-Val / δ2-Leu labeled MSG, prepared from ILV auxotrophic mutant *E.coli*.

[文献] 1) Y. Miyanoiri, *et al.* (2013), *J. Biomol. NMR,* **57**: 237-249
[謝辞] 本研究は科研費 (若手研究B)及び創薬等支援技術基盤プラットフォームの支援を受けて行われました。

P4

高濃度アルコール酒中に含まれる微量成分の測定

○岩下　孝[1], 中村典子[2], 森　祥子[1], 菅瀬謙治[1]
[1]（公財）サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所
[2] サントリーグローバルイノベーションセンター（株）

NMR Measurement of Minor Constituents in High Alcohol Concentration Liquors

○Takashi Iwashita[1], Noriko Nakamura[2], Shoko Mori[1], and Kenji Sugase[1]
[1]*Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences, Osaka, Japan.*
[2]*Suntory Global Innovation Center Ltd., Osaka, Japan.*

Usually, a small amount of deuterium oxide was added to the aqueous samples for the lock system of nuclear magnetic resonance (NMR). When searching physicochemical property and minor constituents of liquors containing high concentration alcohol such as whisky using NMR method, it was very difficult to obtain high resolution spectra of constituents, because the lock signal was broadened by chemical exchange between the ethanol hydroxyl group and water. This difficulty could be avoided by use of deuterated methanol instead of deuterium oxide for the lock substance, because the deuterated methyl group was not influenced by exchanging between hydroxyl proton and water in the solution. This method enable us to investigate physicochemical property and minor constituents of liquors using the stable high-resolution NMR spectra.

【緒言】核磁気共鳴法（NMR）を用いてウィスキーなど高濃度アルコールを含有する酒の微量成分検索および物性研究をおこなう場合、NMR装置の要請で重水素核を含む物質を添加し、その重水素信号の共鳴周波数をリファレンスとして磁場の均一性を高めて保持する必要がある。一般に水溶液サンプルにおいては10%程度の重水を加えることにより、この目的を達する。しかし、ウィスキーなど高濃度アルコールを含有する酒の場合、同様に10%程度の重水を加えるとエタノール、重水、軽水間での化学交換が起こり、そのために交換系の核磁気共鳴の特性により重水素信号がブロード化してしまい、磁場の変動に対する応答が極めて悪くなった。結果として、測定された核磁気共鳴スペクトルの分解能は悪くなり、スペクトル線の微細構造等を観測することができなかった。この課題はNMRロック用物質として重水の代りに重メタノールを用い、重メタノールの重水素化メチル基の信号をリファレンスとして用いることによって回避することができた。すなわち、重メタノールの重水素化メチル基は試料系中のいかなる官能基とも交換しないため極めてシャープな信号を維持することができ、これをリファレンスとすることによって高い分解能の核磁気共鳴スペクトルが得られるようになった。

【実験】通常、水溶液サンプルは5ないし10%の重水（化学式：D_2O）を添加してロック

高濃度アルコール酒，化学交換，ロックシグナル

○いわした　たかし，なかむら　のりこ，もり　しょうこ，すがせ　けんじ

信号を得る。少量の化学物質を水に溶かしてサンプルとする場合、溶質に水分子と交換可能な官能基があったとしても圧倒的な量の水分子が存在するためにその平衡は一方に完全に偏った状態になる。そのため、重水素ピークの線幅は充分狭い状態を保つことができる。それに対して系内に大量のエタノールが存在するとFigure 1. (A)のようにプロトンを含む分子種と重水素を含む分子種が混在することになる。すなわち、重水10%を含む場合、HDOとEtODの２種類の重水素が存在していてその間に交換が存在する系となる。エタノールを含む水溶液サンプルに5ないし10%の重メタノール（化学式：CD_3OD）を添加し重水素化されたメチル基の信号を用いてロックを掛けた場合、Figure 2. (B)のように３種類の重水素が存在することになる。このうち、エタノールおよびメタノールの水酸基と水の間では化学交換が存在するが、重メタノールの重水素化メチル基は化学交換する分子種が存在しない。さらに重水素化メチル基の化学シフトは水酸基や水よりかなり高磁場側に存在し、ピーク強度も強いので容易にこのピークにロックを掛けて信号をモニターすることができる。

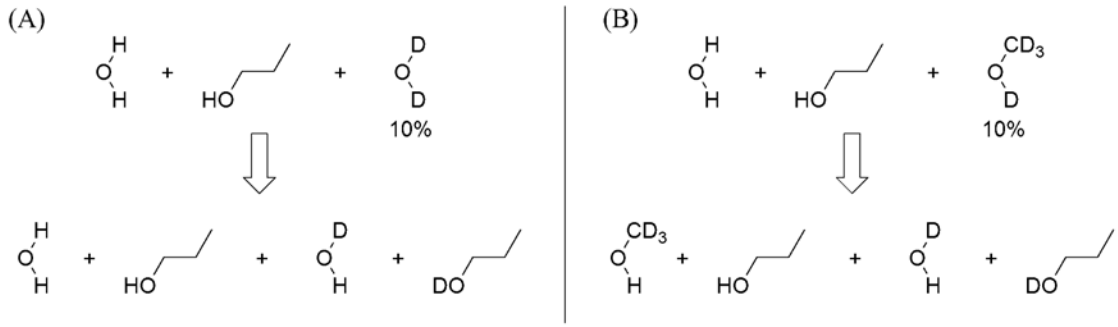


Figure 1. (A)Addition of Deuterium Oxide, (B)Addition of Deuterated Methanol

例としてFigure 2. にフルフラールの60%エタノールを含む水溶液サンプルに10%の重水を加えて測定した場合と9%重メタノールを加えて測定した場合を比較して示す。重水添加の場合、それほど分解能が上がっていないのに対して重メタノールではスピン－スピン結合による微細構造が見えるまで分解能が上がっている。

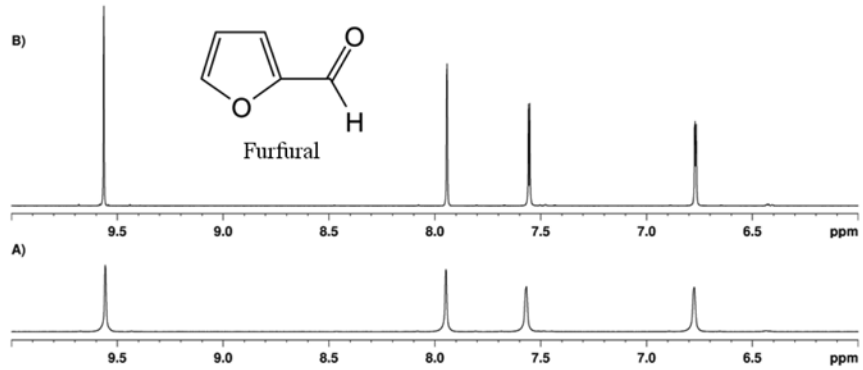


Figure 2. ^{1}H-NMR (750MHz) Spectra of Furfural in 60% Ethanol Solution , (A)+10% D_2O, (B)+9% CD_3OD

【結論】明らかに重メタノールの重メチル基にロックを掛けた場合の方が高い分解能のスペクトルが得られ、さらに詳細なNMR実験を行う場合に良好なスペクトルを提供するものと考えられる。

P5 ヒト培養細胞を用いた calbindin D_{9k} の in-cell NMR 測定

○鴨志田一[1,2], 石川真帆[1], 田中　孝[1,2], 井上　仁[1,2], 池谷鉄兵[1,2],
三島正規[1,2], 白川昌宏[3], 伊藤　隆[1,2]
([1]首都大院・理工, [2]CREST/JST, [3]京大院・工,)

An in-cell NMR study of calbindin D_{9k} in cultured human cells

○Hajime Kamoshida[1,2], Maho Ishikawa[1], Takashi Tanaka[1,2], Jin inoue[1,2],
Teppei Ikeya[1,2], Masaki Mishima[1,2], Masahiro Shirakawa[3] and Yutaka Ito[1,2]
(*[1]Dept. of Chem., Tokyo Metropolitan Univ., [2]CREST/JST*
[3]Dept. of Eng.,Univ. of Kyoto)

Recent developments in in-cell NMR techniques have allowed us to study proteins in details inside living eukaryotic cells. The lifetime of in-cell NMR sample is however much shorter than that in culture media.

In this study, aiming at measuring 3D triple-resonance NMR spectra in cultured human cells, we evaluated the life time of HeLa and HeLa.S3 cells during in-cell NMR experiments with/without the BIOREACTOR system. Human calbindin D_{9k}, which is incorporated into the cells by using the procedure with cell penetrating peptides, was used as the model protein.

【緒言】

昨年私たちは, ヒト培養細胞 HeLa に calbindin D_{9k} 蛋白質を導入し, in-cell NMR を測定することで, 細胞内 Ca^{2+}濃度の変動を観測した結果を報告した[1]. In-cell NMR 測定では様々な原因から, 真核細胞・原核細胞を問わず NMR 試料管中の細胞の寿命が短く, 長時間の NMR 測定を妨げているとともに, より生理的条件に近い測定条件の必要性が認識されるようになっている.

本研究では, in-cell NMR 測定中の細胞寿命の維持を目的に, NMR 試料管へ培地を供給し続ける BIOREACTOR システム[2]を用いた実験を行った. ホスト細胞として HeLa や HeLa.S3 細胞を用い, 細胞内に導入する標的蛋白質としては, Ca^{2+}結合蛋白質であり, Ca^{2+}のバッファーの機能を担っていると考えられている, ヒト calbindin D_{9k} (80 a.a.)を用いた.

【実験】

HeLa や HeLa.S3 細胞を用いて in-cell NMR 測定するためには, 猪股らによって

In-cell NMR, calbindin D_{9k}, BIOREACTORシステム

○かもしだ　はじめ, いしかわ　まほ, たなか　たかし, いのうえ　じん,
いけや　てっぺい, みしま　まさき, しらかわ　まさひろ, いとう　ゆたか

開発された cell penetrating peptides (CPPs)を用いる方法[3]を採用した. 実験に用いる calbindin D_{9k}としては, Pro47 残基における cis-trans 異性化を妨げる変異(P47M)と, CPP との結合用の C 末端 Cys 残基(C80)を導入したもの[calbindin D_{9k}(P47M+C80)]を用い, 安定同位体標識を行った.

精製した calbindin D_{9k} を HIV TAT 由来の CPP(CPP^{TAT})と結合させ, その後 HeLa や HeLa.S3 細胞内に導入し, BIOREACTOR システムの有り無しで 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC 測定を行うことで, BIOREACTOR システムの効果の検討を行った. なお測定の際には, 間接観測軸(^{15}N 軸)に nonlinear sampling を適用し, 1D MaxEnt を用いてスペクトルを再構築した.

【結果・考察】

CPP^{TAT} を用いた calbindin D_{9k} の細胞への導入効率は非常に良好で, 高感度の 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC スペクトルが観測できた. BIOREACTOR システムを使用せずに測定したスペクトルと, *In vitro* で測定した, Mg^{2+}結合型, Ca^{2+}結合型のスペクトルとの比較から, HeLa や HeLa.S3 細胞内の calbindin D_{9k} は, 測定開始直後は Mg^{2+}結合型であり, その後経時的に Ca^{2+}結合型へ変化することが判明している.

単に NMR 試料管に封入した条件で, トリパンブルー染色を用いて生存率を見積もったところ, 生存率が 80%以上となる時間が HeLa 細胞では約 6 時間, HeLa.S3 細胞では約 9 時間という結果になった. HeLa.S3 細胞は(HeLa 細胞とは異なり)浮遊状態での培養も可能であるため, この性質の差が生存率(寿命)の差に表れたと考えられる. BIOREACTOR システムを用いた場合, HeLa 細胞では約 12 時間で生存率が約 80%という結果が得られた(Fig.1). また HeLa.S3 細胞ではさらに長時間の NMR 測定が可能となった. 現在 HeLa.S3 細胞+BIOREACTOR システムで 3D triple-resonance NMR の測定を試みており, ヒト培養細胞内での蛋白質主鎖 NMR シグナルの帰属を目指している.

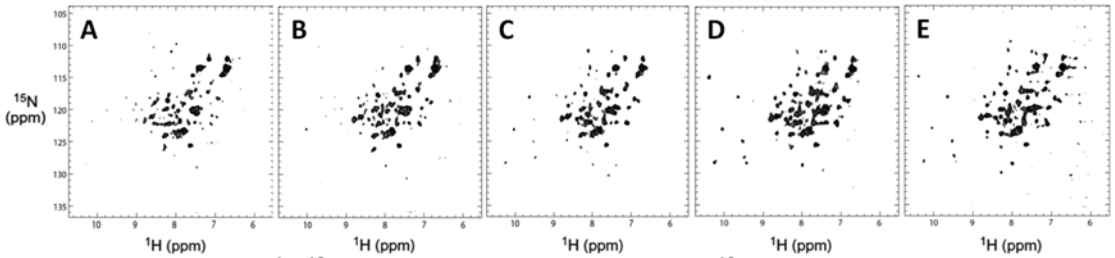


Fig1. Time course of the 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectra of uniformly ^{15}N-labelled calbindin D_{9k}(P47M+C80) in HeLa cells by using BIORIACTOR SYSTEM. The spectra were obtained during the period of 0-152 min (A), 153-304 min (B), 305-456 min (C), 457-608min (D), 609-760 min (E) from the start of the in-cell NMR experiments.

【参考文献】

(1) Hembram, D. S. S. *et al*., *Biophys. Biochem. Res. Comun.***438**, 653-659 (2013) (2) Kubo, S.. *et al*., *Angew Chem. Intl. Ed.* **51**, 1-5 (2012) (3) Inomata, K. *et al*., *Nature* **458**, 106-109 (2009)

P6 難発現蛋白質の安定同位体標識と大量発現を可能にするpCold-GSTシステムの技術開発

片岡沙織，○杉木俊彦，古板恭子，藤原敏道，児嶋長次郎
大阪大・蛋白研

Technological development of pCold-GST system for successful over expression of isotopically-enriched recombinant challenging proteins.

Saori Kataoka, ○Toshihiko Sugiki, Kyoko Furuita, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima.
Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

Expression of sufficient amount of isotopically-enriched recombinant protein is a first essential step toward its NMR studies. At present, many kind of recombinant protein expression systems are available. Among them, an expression system that utilizes *Escherichia coli* (*E. coli*) as living host cells is most widely used since it has many advantages; easy availability and handling, rapid growth rate, wide variety of isotope labeling techniques, powerful recombinant protein expression potential, etc. However, it remains difficult to over-express protein which has complex disulfide bonding network, membrane proteins, kinases. In this study, we examine better *E. coli* host cells which more suitable for pCold-GST systems in an effort to over-express such challenging proteins.

遺伝子組替え蛋白質の安定同位体標識と大量発現は、解析対象の蛋白質のNMR実験を行ううえで最初に必要となるステップである。現在、大腸菌発現系をはじめ、酵母や昆虫細胞を宿主とした発現系、無細胞発現系など、多種の発現系が整備されており、解析対象の蛋白質に合わせて様々な発現系を研究者が選択できる状況は年々発展している。その中でも、扱いやすく（入手しやすい、増殖速度が速い、培養に特別な機器を必要としない、など）、様々な培地組成で増殖可能で様々な安定同位体標識が可能である事、他の発現系に比べて組換え蛋白質の発現量も多い事などから、大腸菌発現系は多くの場合で第一選択である。

複雑なジスルフィド結合の形成が正常な高次構造の形成に必要な蛋白質、多数回膜貫通型蛋白質、酵素（リン酸化酵素など）、翻訳後修飾が必要な高等生物由来の蛋白質などは、大腸菌発現系では発現量が極めて乏しいか、発現しても活性を保持した状態で発現することが困難になる場合も多い。

我々はこれまでに、低温誘導プロモーターを利用して目的蛋白質を穏和かつ大量に発現させるpColdベクターと可溶性促進タグGSTを組み合わせたpCold-GSTベクターを開発し、大腸菌発現系で発現しなかった多数の蛋白質を発現させることに成功した[1]。しかし、多数のジスルフィド結合の形成が必要な蛋白質や膜蛋白質などの難発現蛋白質関しては、pCold-GSTシステムをもってしても発現が困難である場合が多かった。

我々は今回、pCold-GSTと大腸菌宿主細胞株の組み合わせを網羅的に検討し、より強力に難発現蛋白質の発現を改善する培養条件を探索した。

pCold-GST，安定同位体標識，溶液NMR

かたおかさおり，○すぎきとしひこ，ふるいたきょうこ，ふじわらとしみち，こじまちょうじろう

【実験】

セリンスレオニンキナーゼ TOR の一種である Human SAPK-interacting protein 1 (hSin1) と、GPCR class-B に属する PTH2R および GLP2R の N 末端細胞外ドメインをコードする cDNA(3種)を、それぞれ pCold-GST ベクターのマルチクローニングサイトに組み込んだ。

それらの 3 種類の pCold-GST コンストラクトを、それぞれ 5 種類の大腸菌株 BL21(DE3)Rosetta (Novagen), ArcticExpress(DE3) (Agilent), Chaperone Competent Cell pKJE7/BL21(DE3) (TaKaRa), Chaperone Competent Cell pGro7/BL21(DE3) (TaKaRa), SHuffle Competent Cells (NEB) に形質転換した。得られたシングルコロニーを M9 培地 10mL に植菌して 37℃で培養し、濁度 OD_{600}の値が 0.5 に達した時点で培地を氷水に浸して 10 分間急速冷却した後に終濃度 1mM の IPTG を添加し、引き続き 13℃で一晩培養を行った。目的蛋白質の発現の有無は SDS-PAGE にて確認した。

【結果と考察】

今回検討対象とした hSin1 および PTH2R, GLP2R は、複数対のジスルフィド結合を有する蛋白質である。hSin1 は、pCold-GST システムを用いても、一般的な大腸菌株の一つである BL21(DE3)Rosetta を用いた場合は全く蛋白質発現が認められなかった。低温シャペロニン Cpn10 と Cpn60 を目的蛋白質と共発現させる大腸菌株 ArcticExpress(DE3) を用いた場合も、hSin1蛋白質の発現量は極めて乏しいままであった。しかし、シャペロン DnaK, DnaJ, GrpE を目的蛋白質と共発現させる Chaperone Competent Cell pKJE7/BL21(DE3)、シャペロン GroES と GroEL を目的蛋白質と共発現させる Chaperone Competent Cell pGro7/BL21(DE3)、ジスルフィド結合イソメラーゼ DsbC を目的蛋白質と共発現させる SHuffle を宿主とした際に、hSin1 蛋白質が可溶性画分に発現が認められた。

一方、GPCR class-B に属する PTH2R および GLP2R の N 末端細胞外ドメインは、BL21(DE3)Rosetta を用いた際には、不溶性画分には蛋白質発現が認められたが可溶性画分には全く発現しなかった。しかし宿主を ArcticExpress(DE3), Chaperone Competent Cell BL21(DE3), および SHuffle に変更した結果、可溶性画分に蛋白質を発現させることができた。

ArcticExpress(DE3) および Chaperone Competent Cell BL21(DE3) は、pColdシステムと組み合わせて低温発現誘導に供することにより目的蛋白質の発現量がさらに改善することが報告されている。しかし pCold-GST システムは、pCold システムをより強力に改善したものであり、目的蛋白質が一般的な可溶性蛋白質であれば宿主に依らず発現量の改善が十分に達成できることがわかっている。しかし、pCold-GST システムを用いても発現量が乏しい蛋白質、特に今回検討を行った hSin1 や GPCR class-B のように、ジスルフィド結合を多数有する蛋白質の場合は、シャペロンやジスルフィド結合イソメラーゼのように適正なジスルフィド結合ネットワークの形成を補助する因子を共発現させることが有意に有効であることが判明した。

【参考文献】

1. Hayashi K and Kojima C. (2008) *Protein Expr. Purif.*, 62:120-127

【謝辞】

本研究は「文部科学省 創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業」の補助により、支援技術の高度化を目的として実施された。

P7

遊離状態および糖結合状態におけるミミズ由来R型レクチン改変体のシアル酸糖結合メカニズムに関するNMR解析

○逸見　光[1], 久野　敦[2], 海野幸子[2], 平林　淳[3]
[1]農研機構・食品総合研究所
[2]産総研・糖鎖創薬技術研究センター
[3]産総研・幹細胞工学研究センター

NMR studies on a novel sialic acid-binding lectin mutant from the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm in the sugar-free state or in the sugar-bound states

○Hikaru Hemmi[1], Atsushi Kuno[2], Sachiko Unno[2], and Jun Hirabayashi[3]
[1]National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Japan.
[2] Glycomedicine Technology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan.
[3]Research Center for Stem Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan.

We tailored a novel sialic acid-binding lectin (SRC) from the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm *Lumbricus terrestris* (EW29Ch) by natural evolution-mimicry and the crystal structures of the sugar-free and the sugar-bound SRC have been determined. However, the X-ray crystallographic analysis does not explain the characterization of dynamic structure of the extended loop of subdomain γ. In this study, we performed NMR studies on SRC in the sugar-free state, the lactose-bound state, and the 6'-sialyllactose-bound state, respectively. The NMR signals of K143-D146 in subdomain α and those of S239 and A240 in subdomain γ were almost same between the sugar-free state and the lactose-bound state, but those signals were largely changed in the 6'-sialyllactose-bound state. Thus, the results suggest that the crystallographically observed interactions between the sialic acid moiety of 6'-sialyllactose and G148 or S239 of SRC occur in solution.

発表者らは、これまで、NMRによるミミズ由来R型レクチンC末端ドメイン（EW29Ch）の糖鎖結合メカニズムについての研究を行い、分子内の２つの糖結合部位の糖結合活性が、X線結晶構造においてほとんど同じ相互作用を示しているにも関わらず、α糖結合部位がγ糖結合部位に比べ約100倍高いこと［1］、さらに、遅い分子内運動による構造の揺らぎが糖結合活性に関係することを明らかにした［2］。一方、このR型レクチンを分子進化工学的手法により改変させてシアル酸結合性レクチン（SRC）を創製し、SRCとラクトース及び６'－シアリルラクトースとの複合体のX線結晶構造解析を行い、その結果、α結合部位のみ糖と結合し、γ結合部位は結合しないこと、また、シアリルラクトースのラクトースの部分では、EW29Chのα糖結合

Lectin, Sialic acid, Natural evolution-mimicry

○へんみひかる，くのあつし，うんのさちこ，ひらばやしじゅん

部位の場合とほとんど同じ相互作用を示すとともに、シアル酸の部分とは新たに２つの水素結合（サブドメインα中の G148 とサブドメインγ中の S239）が形成されることを示した。その新たに形成された２つの水素結合のうちの１つは、サブドメインγの糖結合能が消失したのと引き換えに、サブドメインγ中の１つのループがサブドメインαの糖結合部位付近へシフトすることにより可能になったシアル酸との水素結合である［3］。しかしながら、その特異的なシアル酸糖鎖結合能獲得メカニズムについては十分に解明できていない。その解明の一環として、今回、ラクトース結合状態に加え、遊離状態及びシアル酸糖鎖（6’-sialyllactose）結合状態での SRC について、主鎖の NMR シグナルの帰属を行うとともに、^{15}N 緩和測定法による分子内運動についての解析も行ったので、それらの結果について報告する。

［結果と考察］

今回、SRC を遊離状態で、安定して発現させる方法を確立出来たことから、遊離状態で^{15}N ラベル体 SRC を調製した。遊離状態での^{15}N ラベル体 SRC、及び 6’-sialyllactose を過剰量添加した^{15}N ラベル体 SRC を用いて、Bruker 社製 DRX 600MHz により、^{1}H-^{15}N HSQC、^{15}N-edited TOCSY 及び^{15}N-edited NORSY を測定し、遊離状態及び 6’-sialyllactose 結合状態での主鎖の NMR シグナルをほぼ帰属することができた。その結果、^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルの比較において、サブドメインα中の K143－D146、D162 の主鎖と W161 の側鎖、及びサブドメインγ中の S239，A240 の主鎖の ^{1}H-^{15}N の NMR シグナルが、遊離状態とラクトース結合状態ではほとんど同じであったが、6’-sialyllactose 結合状態では、著しく変化することが分かった。

次に、15℃で、^{15}N 核緩和（R_1, R_2, 及び{^{1}H}-^{15}N NOE）の測定を行い、遊離状態及び 6’-sialyllactose 結合状態における分子内運動の解析を行った。その結果、ラクトース結合状態と同様に、サブドメインγのループ領域（K233－A240）において{^{1}H}-^{15}N NOE の値が低く、野性体である EW29Ch と比較して分子内運動が著しく高いこと分かったが、6’-sialyllactose 結合状態でのみ A240 の{^{1}H}-^{15}N NOE の値が、遊離状態及びラクトース結合状態での{^{1}H}-^{15}N NOE の値より有意に高いことから、S239 とシアル酸との水素結合形成により分子内運動が抑制された結果と推測される。

以上の結果から、SRC のサブドメインγのループ領域が、SRC の特異的な糖鎖結合能獲得メカニズム解明に重要であることが示唆されるとともに、α結合部位においても、ラクトースと結合様式の違いが推測されたことから、今後さらに、NMR を用いて詳細に解析を進める予定である。

References

1. Hemmi, H., Kuno, A., Ito, S., Suzuki, R., Hasegawa, T., and Hirabayashi, J. (2009) FEBS J. 276, 2095-2105.
2. Hemmi, H., Kuno, A., and Hirabayashi, J. (2013) FEBS J. 280, 70-82.
3. Yabe, R., Suzuki, R., Kuno, A., Fujimoto, Z., Jigami, Y., and Hirabayashi, J. (2007) J. Biochem. 141, 389-399.

［謝辞］本研究は主に、科学研究費補助金・基盤研究（C）（24580500）の助成を受けて行われた。

P8

MAPキナーゼ p38αのストレスシグナル伝達機構の解明

○徳永 裕二[1], 竹内 恒[2], 高橋 栄夫[3], 嶋田 一夫[4]
[1]JBiC・次世代天然物化学技術研究組合
[2]産総研・molprof
[3]横市大・生命医科学
[4]東大・院薬系

Structural basis for the stress signal transduction via MAP kinase p38α

○Yuji Tokunaga[1], Koh Takeuchi[2], Hideo Takahashi[3], and Ichio Shimada[4]
[1]*I, Technology Research Association for Next generation natural products chemistry.*
[2]*Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology.*
[3]*Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University.*
[4]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo.*

MAPK p38α pathway plays essential roles in intracellular signal transduction in response to various stimulations. Within the pathway, p38α phosphorylates its specific substrates, using ATP as a cosubstrate. On the other hand, intracellular ATP concentration is known to decrease considerably when cells are exposed to stressor. Currently, however, the molecular basis of how p38α is kept active under low ATP conditions remains unknown.

Here, we investigated the effects of the interaction between p38α and its specific substrates, as well as of the another stress-associated environmental change, pH decrease, on p38α structure and activity. We found that both the specific interaction and the pH decrease independently enhance the kinase activity of p38α, mainly via enhancements of affinity to ATP. Thus, the p38α-mediated stress signal is able to concomitantly achieve its robustness and substrate specificity.

【序論・研究の目的】

細胞は恒常性維持機構を持つ一方、ストレス条件下では生体分子の細胞内濃度が変動することも知られており、ATP 濃度低下はこの一例である。MAP キナーゼ p38α 経路は各種のストレス下において活性化され細胞応答を担うが、p38α は基質リン酸化において ATP を共基質として用いるため、ストレス刺激に伴う ATP 濃度低下は p38α のキナーゼ活性に不利に働く可能性がある。このように ATP 濃度低下を伴うストレス下においても、p38α 経路シグナルが伝達される分子機構は不明である。同機構の理解には、p38α と基質との特異的相互作用、およびストレス条件に固有の生理的環境が p38α の構造および活性に与える影響の理解が必須である。基質との相互作用については、p38α は活性部位 (ATP 結合部位および基質リン酸受容部位を結合する P+1 部位) から離れた“ドッキング部位”にて基質とアロステリックな“ドッキング相互作用”を形成し、特異的結合を達成する (図 1a)。しかしながら、既存の p38α-基質複合体構造においては、ドッキング相互作用は形成されている一方、p38α は活

protein kinase, stress response, signal transduction

○とくなが ゆうじ、たけうち こう、たかはし ひでお、しまだ いちお

性に必要な活性化ループ上の二重リン酸化を受けておらず不活性な状態であるため、活性部位には ATP、基質リン酸受容部位のいずれも結合しておらず、p38αのキナーゼ活性の発現および調節に対するドッキング相互作用の役割は不明であった。一方、ストレス刺激に伴う生理的環境の変化として、細胞内 pH の低下が知られているものの、pH 低下に伴う p38αの構造および活性の変化は不明である。本研究では、ATP 濃度低下を伴うストレス下において、p38α 経路のシグナル伝達が達成される分子機構の解明を目的とした。特に、シグナル伝達の根幹を担う、p38α-ATP-基質からなる“反応複合体”の形成過程に着目し、NMR法を用いた構造生物学的解析を行った(図 1b)。

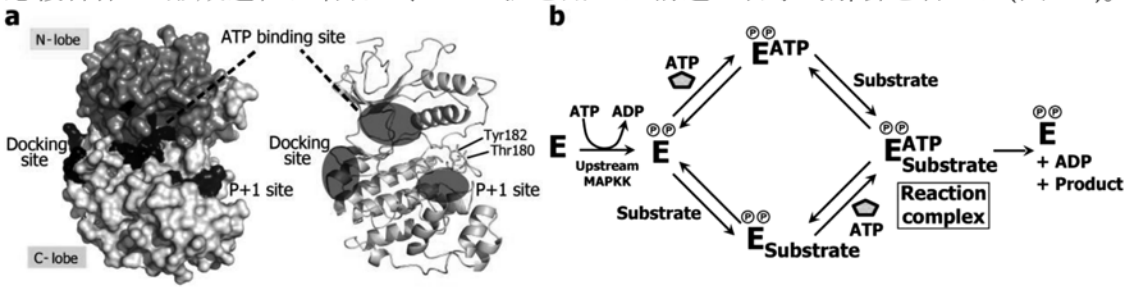


図 1. (a) p38α の立体構造、および (b) p38α の基質リン酸化反応経路

【方法】

ヒト由来 p38α は大腸菌にて発現し、上流の MAPKK6 を用い活性化ループ上 Thr180 および Tyr182 を二重リン酸化した (以下、リン酸化 p38α を p38α と表記する)。p38α の主鎖アミドシグナルは、化学交換に起因する横緩和速度増大のために約 40% が帰属不可能であった。この問題を解決するため、高感度の ILVM 残基メチル基のシグナルを利用し、これらについて95% を立体選択的に帰属した。相互作用解析の基質として、生理的基質である MAPKAPK-2 のリン酸受容部位 Thr334 および C 末端ドッキング配列からなる 334D-peptide を用いた。また、ドッキング相互作用と活性部位への基質リン酸受容部位の結合の影響を分離する目的にて、Thr334 周辺配列からなる 334-peptide、ドッキング配列 D-peptide を調製した。

【結果】

1. p38α の構造および活性に対するドッキング相互作用の影響の解析

ATP アナログ非存在下および存在下にて、p38α に対して等モル量の 334D-peptide を添加した。この結果、p38α のメチル領域 ^{1}H-^{13}C HMQC スペクトル上に部位特異的な化学シフト変化が観測された。特異的結合を担うドッキング部位は ATP アナログの有無によらず化学シフト変化を示した一方 (図 2a)、リン酸受容部位が結合する P+1 部位は ATP アナログ存在下においてのみ、化学シフト変化を示した (図 2b)。このことは、p38α は ATP の有無によらず基質との間にドッキング相互作用を形成できる一方、ATP を結合した状態においてのみ、活性部位にてリン酸受容部位を結合することを示す。即ち、p38α-ATP-基質の反応複合体は ATP 結合を契機として形成されることが明らかとなった。

p38α キナーゼ反応経路の各要素 (図 1b) に対するドッキング相互作用の寄与を解析する目的にて、p38α の ATP に対する親和性、基質リン酸受容部位に対する親和性、およびリン酸転移反応速度を、D-peptide の有無にて比較した。この結果、いずれの要素も、D-peptide 存在下にてアロステリックに増強・促進されることが明らかとなった (図 3)。

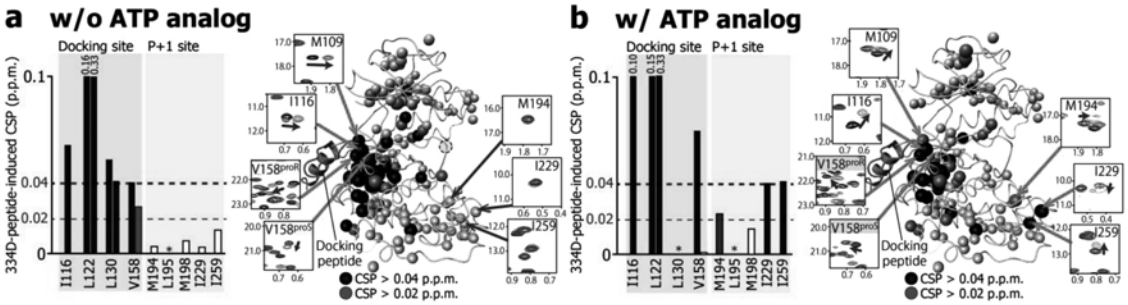


図 2. 334D-peptide 結合に伴う p38α の化学シフト変化

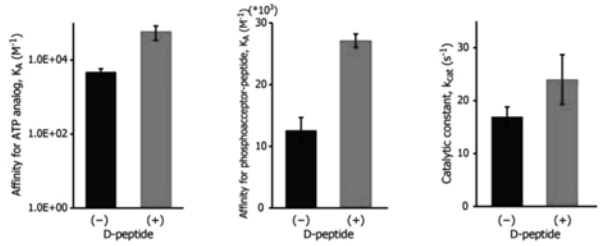


図 3. D-peptide 有無における p38α の ATP 親和性、334-peptide 親和性、および 334-peptide リン酸化の速度定数

2. p38αの構造および活性に対する pH 低下の影響の解析

p38α のキナーゼ活性を、ATP 濃度 2 mM および 0.5 mM、pH 8.0 および 6.3 にて測定した。この結果、pH 8.0 においては ATP 濃度低下に伴いキナーゼ活性の低下が認められた一方、pH 6.3 においては ATP 濃度が低下しても、キナーゼ活性は同等に保たれた (図 4)。即ち、低 pH 条件にて、p38α の活性は、ATP 濃度低下に対して頑強となることが示された。

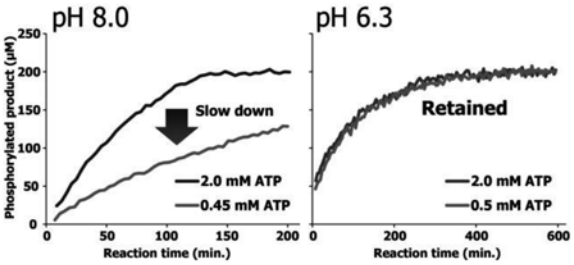


図 4. p38α の基質リン酸化活性の pH および ATP 濃度依存性

pH 低下に伴う p38α キナーゼ活性頑強化の構造基盤を解明する目的にて、apo 条件で p38α のメチル領域 ^{1}H-^{13}C HMQC スペクトルの pH 依存性を解析した。この結果、pH 6.3 (低 pH 条件) にて一部のメチル基に、中性 pH にて観測されていたメジャーシグナルに加えて、強度の弱いマイナーシグナルが観測された (図 5a)。Z 磁化交換（EXSY）実験にてメジャー・マイナーシグナル間に交換ピークが観測されることから、p38α は低 pH 条件にて 2 状態間の平衡状態にあることが示された (図 5b)。以下、メジャー・マイナーシグナルを与える状態をそれぞれ A, B 状態と表記する。A 状態から B 状態への移行に伴う化学シフト変化は、p38α に対する ATP アナログ結合に伴う化学シフト変化とよく相関した (図 5c)。このことより、B 状態は ATP を結合した活性化構造に類似した状態であることが示唆された。p38α の ATP アナログに対する親和性は pH 低下に伴い増大し、これと対応して B 状態の存在割合も増大したことから、B 状態が ATP に対する高親和性を担うことが強く示唆された (図 5d)。このような pH 依存性を担う残基を、ATP アナログを結合した p38α の活性化構造モデル上に探索した結果、活性化ループ上および P+1 部位に存在する 2個の His 残基、His174 および His199 が、酸性残基と近接することを見出した (図 5e)。これに基づき、pH 低下に伴うこれら His 残基のプロトン化により、酸性残基との静電相互作用が増強される結果、活性化構造が安定化されるモデルを考案した。実際に、

これら His 残基に変異導入した H174A, H199A 変異体においては、pH 低下に伴う B 状態の形成が認められず、モデルを支持する結果が得られた (図 5f)。さらに、これら His 残基の pH 滴定実験を実施し、側鎖 pK_a 値を決定した。得られた pK_a 値は 7 付近の比較的高い値を示したことから、ストレス刺激により誘起される中性から弱酸性への pH 低下に対し、敏感に応答できることが示された。

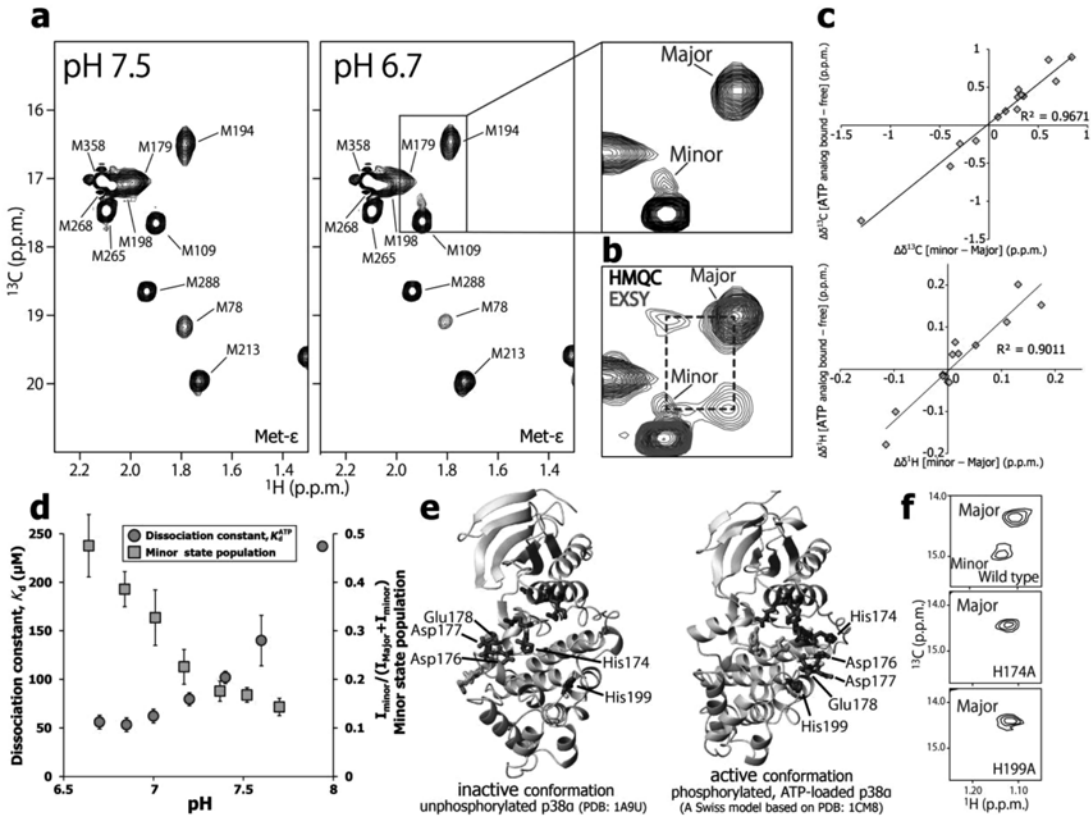


図 5. pH 低下に伴う p38α の構造平衡の変化および構造基盤

(a) pH 7.5 および 6.3 におけるメチル HMQC スペクトル (Met-ε 領域) (b) Z 磁化交換 (EXSY) スペクトルの重ね合わせ (c) A, B 状態間の化学シフト差および ATP アナログ結合に伴う化学シフト変化の間の相関プロット (d) p38α の ATP アナログに対する親和性および B 状態存在割合の pH 依存性 (e) p38α の不活性および活性構造モデルにおける His174 および His199 の位置 (f) pH 6.7 における H174A および H199A 変異体の Ile84 (ATP 結合部位) シグナル領域

【考察】

本研究にて、ATPの結合が p38α-ATP-基質の反応複合体形成の契機となること、またドッキング相互作用および pH 低下は、いずれも 10 倍程度の顕著な ATP 親和性増強に基づき、p38α の活性増強および活性維持に寄与することが明らかとなった。この基質存在下および酸性条件下でのATP親和性の増大は、ストレス刺激に伴う ATP 濃度低下条件においても、p38αがATP-基質との反応複合体の形成効率を維持し、シグナルを高効率に伝達することを可能にする巧妙な分子機構である。

【参考文献】

Tokunaga, Y., Takeuchi, K., Takahashi, H., and Shimada, I. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2014), **21**, 704-711.

P9 植物細胞発現系を用いた植物由来ホルモンの立体構造解析

○梅津喜崇[1], 森正之[2], 大木進野[1]
[1]北陸先端大・ナノマテリアルテクノロジーセンター
[2]石川県立大

NMR analysis of plant defensin-like peptideusing plant cell expression system

○Yoshitaka Umetsu[1], Masashi Mori[2], and Shinya Ohki[1]
[1]Center for Nano Materials and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology, Ishikawa, Japan.
[2]Reserch Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Ishikawa, Japan.

We studied structure-activity relationship of plant defensin-like peptide embryo surrounding factor 1.3 (ESF 1.3). ESF1.3 regulates early embryo patterning in flowering plants. For NMR analysis, *E. coli* or yeast expression systems are frequently employed for producing isotope-labeled proteins. However, this peptide was not expressed as functional form. Therefore, we established a new system using suspension-cultured plant BY-2 cells with an inducible virus vector. In this method, the peptide are expressed and folded correctly with proper disulfide bonds. From our elucidated structure we revealed that two Trp residues of ESF 1.3 play an important role for the activity.

【序論】

安定同位体標識を施したNMRサンプルの試料調製には、大腸菌や酵母などが一般的に用いられる。しかし、アミノ酸配列内に複数のジスルフィド結合をもつ場合や翻訳後修飾が施されるタンパク質など、既存の大腸菌や酵母の発現系では調製困難な試料は数多く存在する。

Embryo surrounding factor 1.3 (ESF1.3)は、顕花植物の種子形成において胚乳の元となる中央細胞で発現される分泌性ペプチドとしてごく最近同定された。このペプチドホルモンは全長68アミノ酸残基からなり、分子内に4組のジスルフィド結合をもつ。ESF1.3が発現しない植物体では種子の形状が不揃いになり、胚形成の初期段階で胚柄の形成を制御する因子として働いていることが明らかとなっている。

ESF1.3は分子内に複数のジスルフィド結合をもち、既存の大腸菌・酵母を用いた発現系では生理活性をもつサンプルの調製が困難であった。そこで、今回我々は新たに開発した植物培養細胞発現系[1]を利用し、植物由来ホルモンESF1.3の立体構造解析を試みた。

【実験】

ESF1.3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

Structural analysis, Plant hormone, Plant cell expression system

○うめつよしたか, もりまさし, おおきしんや

ルスベクターをタバコ培養細胞（BY-2）に取り込ませた。安定同位体標識試薬（^{13}C-glucose, K^{15}NO$_3$, ^{15}NH$_4$^{15}NO$_3$）を含む液体培地で培養細胞を増殖させた後、β-エストラジオール添加によりESF1の発現誘導を行った。培養後3日目の細胞を回収し、Ni-アフィニティークロマトグラフィーによる粗精製後、Prescission protease処理によりHis-tagを取り除いた。その後、逆相クロマトグラフィーによる精製を行い、NMRサンプルとした。測定にはBruker AVANCE III 800MHzを使用した。得られたデータはNMRPipeで処理し、Sparkyを用いて解析を行った。立体構造計算にはCYANA（ver. 2.1）を使用した。

【結果】

植物培養細胞発現系により調製したESF1.3は生理活性をもつことから、正しいジスルフィド結合パターン、立体構造を有していることがわかった。その後、各種NMRスペクトルを測定・解析し、それぞれの立体構造を決定した。特に、ESF1.3は限定分解によるジスルフィド結合パターンの決定が困難であったため、^{13}C-edited NOESY HSQCスペクトルの解析により結合パターンも決定した。ジスルフィド結合を形成しているすべてのCys残基のHβ-Hβ間にNOEが観測され、4組のジスルフィド結合パターン（Cys19-Cys36, Cys24-Cys64, Cys34-Cys60, Cys37-Cys47）を決定することができた。

【考察】

ESF1.3はフレキシブルなN末端領域と、4本のジスルフィド結合により安定化された3本のストランド（Ile15-Leu16, Thr23-Ser25, Lys31-Asp33）及び1つのヘリックス（Pro54-Ala62）を含んだコア領域からなる。ジスルフィド結合欠損変異体のNMR解析から、4組あるジスルフィド結合は、どれもコア領域の構造形成に必須であることを明らかにした。また、ESF1.3は分子の片側に2つのTrp残基と1つのLeu残基が直線上に並んでいる。これら3つの疎水性残基はこれまで発見されたESFペプチド及びESF様ペプチドで比較的保存性が高い。2つのTrp残基をAla残基へと置換した変異体は生理活性を失うことから、直線上に並んだ疎水性残基がESF1.3の受容体認識に重要な役割を果たしていることが示唆された[2]。

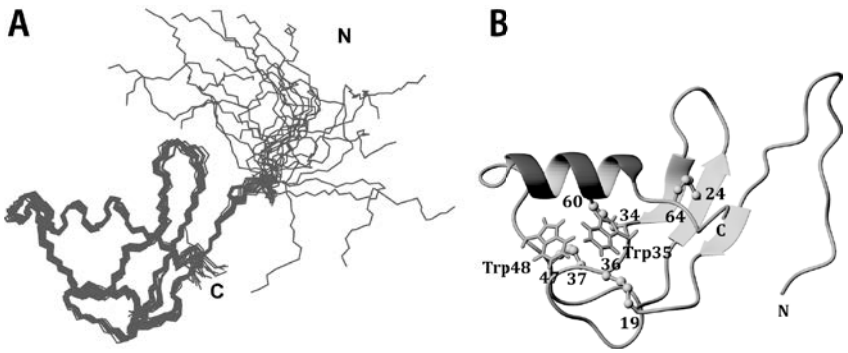


Fig1. Solution structure of ESF1.3. Superposition of 20 final structures (A) and ribbon model (B) showing the location four disulfide pairs and two conserved tryptophan residues.

【参考文献】

1. Ohki, et al. J. Biomol. NMR (2008) 42, 271-277.
2. Costa, et al. Science (2014) 344, 168-172.

P10

人工 ligase ribozyme の活性部位の NMR 解析

○星野啓治[1]，目谷太樹[1]，井川善也[2]，坂本泰一[1]
[1]千葉工業大学
[2]富山大学

NMR analysis of the catalytic site in an artificial ligase ribozyme

○Keiji Hoshino[1], Hirotatsu Meya[1], Yoshiya Ikawa[2], and Taiichi Sakamoto[1]
[1] *Chiba Institute of Technology, Chiba, Japan.*
[2]*University of toyama, Toyama, Japan.*

A novel ligase ribozyme was developed by the modular architecture through 'Design and selection'. The ligase ribozyme requires magnesium ions. In this study, we analyzed NMR spectra of catalytic site of the ligase ribozyme (L24). Upon addition of Mg^{2+}, chemical shift change were observed at G8, U17, and C20. Upon addition of $Co(NH_3)_6^{3+}$, chemical shift changes were observed at G4 and G8. Furthermore, inter-molecular NOEs were observed between amino proton of $Co(NH_3)_6^{3+}$ and imino protons of G4 and G5. Next, we added paramagnetic manganese ions to L24. Broadening of the ^{1}H-^{13}C HSQC signals for G1, G2, A3, G4, and G5 was observed. We proposed that metal ions bind around G4 and induce the conformational change of L24, which results in the chemical shift changes around G8.

【序論】

既知の RNA 構造体を組み合わせて，新規の RNA 構造体を創製する方法を RNA 建築学という．RNA 建築学と *in vitro* selection 法を組み合わせ，Mg^{2+} 存在下で RNA の ligation 反応を触媒する人工 Ligase ribozyme が作製された．本研究では，人工 Ligase ribozyme の活性部位を含む RNA 断片 (L24; Fig. 1) の金属イオン結合部位および立体構造を明らかにすることを目的とした．

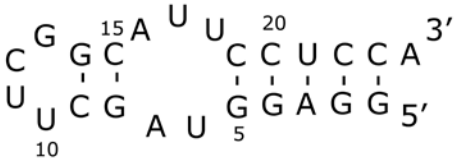


Fig. 1 Secondary structure of L24

【方法】

L24 を T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応により合成し，変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した．^{15}N および ^{13}C により標識した L24 についても，同様に調製した．日本ブルカー社製の NMR 分光計（ DRX-600 および Avance 600）を用いて NMR スペクトルを測定した．緩衝液として 10 mM リン酸ナトリウム (pH6.5) を用い，測定温度は 310 K とした．L24 の NMR シグナルの帰属のため，2D NOESY，2D HOHAHA，^{1}H-^{15}N HMQC，^{1}H-^{13}C HSQC，HNN-COSY，HCCH-TOCSY，HCCH-COSY，HCP の測定を行なった．さらに，金属イオンとの相互作用解析のためには，$MgCl_2$，$MnCl_2$，$Co(NH_3)_6Cl_3$ により L24 を滴定し，NMR スペクトルを解析した．

金属イオン，リボザイム，RNA

○ほしのけいじ，めやひろたつ，いかわよしや，さかもとたいいち

【結果および考察】

易動性のプロトンの帰属のためには，2D NOESY，^{1}H-^{15}N HMQC，HNN-COSY の測定を行った．非易動性のプロトンの帰属のためには，2D NOESY，2D HOHAHA, ^{1}H-^{13}C HSQC, HCCH-TOCSY, HCCH-COSY，HCP の解析を行なった．L24 のヌクレオチドの塩基部分については，アミノプロトン，イミノプロトン，H2，H5，H6，H8 に由来するシグナルを帰属した．リボース部分については，H1′および H2′ に由来するシグナルを帰属した．

次に，金属イオンにより L24 を滴定し，NMR シグナルの変化を解析した．10 mM $MgCl_2$ を加えたところ，Mg イオンの結合により化学シフト変化が観測された．特に，G8，U17，C20 に由来するシグナルが大きくシフトした．次に，1 mM $Co(NH_3)_6Cl_3$ を加えたところ，G4，G8 に由来するシグナルが大きく変化した．さらに，$Co(NH_3)_6^{3+}$ のアミノプロトンと G4，G5 のイミノプロトンの間に NOE シグナルが観測された．

さらに，2 μM $MnCl_2$ を加えたところ，G1，G2，A3，G4，G5 に由来するシグナル強度が減少した(Fig. 2, 3)．これは，Mn イオンによる常磁性緩和によって，シグナル強度が減少しており，特に G4 および G5 のシグナルが観測された．

$Co(NH_3)_6Cl_3$，$MgCl_2$，$MnCl_2$ による滴定実験から，金属イオンは G4 の近傍に結合していると考えている(Fig. 4)．さらに，金属イオンの結合によって，L24 の構造変化が起こり，G8 を含む内部ループの部分の NMR シグナルが変化したと考えている．

今後は，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していく予定である．

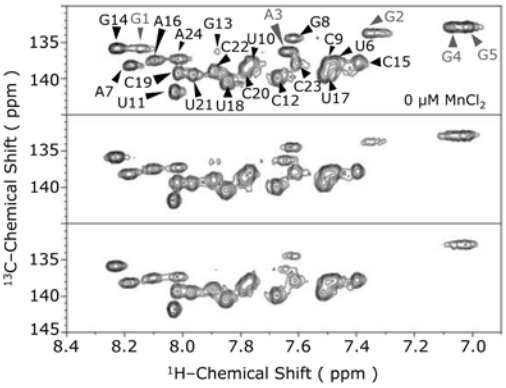


Fig. 2 ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of L24 (H-C8 and H6-C6)

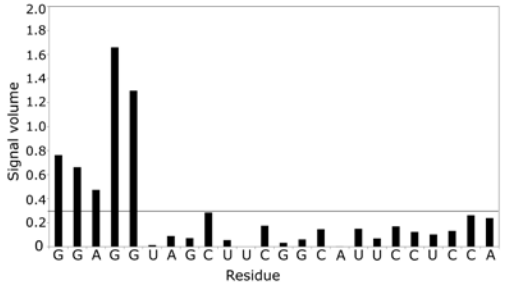


Fig. 3 Changes of the signal volume of ^{1}H-^{13}C HSQC spectra.

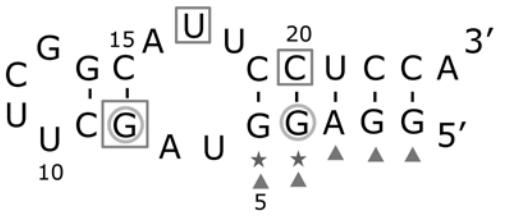


Fig. 4 Metal-ion-binding site. □ and ○; Chemical shift change for addition of Mg^{2+} and $Co(NH_3)_6^{3+}$, representatively , ★ ; inter-molecular NOE for $Co(NH_3)_6^{3+}$, ▲ ; PRE by Mn^{2+}.

P11

常磁性効果を用いたユビキチン二重合体の構造学的研究

○西澤茉由[1]，森本大智[1]，猪股晃介[2]，外間進悟[1]，杤尾豪人[3]，白川昌宏[1]
[1]京都大学・工学研究科・白川研
[2]理研・生命システム研究センター・細胞動態計測研究グループ
[3]京都大学・理学研究科・杤尾研

Structural Study of Diubiquitin by Paramagnetic NMR

○Mayu Nishizawa[1], Daichi Morimoto[1], Kousuke Inomata[2], Shingo Sotoma[1], Hidehito Tochio[3] and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.*
[2]*QBiC, RIKEN, Yokohama, Japan.*
[3]*Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

Ubiquitin chains are conjugated to target proteins in human cells and control protein function, localization and lifetime. It is previously reported that linear diubiquitin can exist in either an open or a closed conformation in crystals. However, it is not understood which conformation linear diubiquitin adopts in solution. By exploiting paramagnetic effects in the form of Pseudo Contact Shifts (PCS), it is possible to extract structural information such as molecular orientation and distances of proteins in a short time. In this study, we determined the orientation of each ubiquitin subunit in linear diubiquitin by PCS. Our results suggest that in solution linear diubiquitin does not adopt an open conformation, but a closed conformation.

【背景・目的】

真核生物のあらゆる細胞において、76個のアミノ酸から成るユビキチンという小さなタンパク質が存在する。ユビキチンは細胞内で標的タンパク質に幾つも鎖状に結合し、そのタンパク質の機能や局在、寿命を制御している。この制御機構の不全は、癌や神経変性疾患などの病気を引き起こす。最も興味深い点は、標的タンパク質に形成するポリユビキチン鎖の多様性である。ポリユビキチン鎖は、ユビキチンの7個のリシン残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63)や、N末端のアミノ基を介して形成されるため、合計8つの種類が存在する。

現在、直鎖型ユビキチン二重合体は、二つのユビキチン分子が伸びた構造(開構造, PDBID:2W9N)[1]と、互いに相互作用している構造(閉構造, PDBID: 3AXC)[2]の二種類の結晶構造が報告されている (Fig.1)。しかし、溶液中において直鎖型ユビキチン二重合体がどのような高次構造を形成しているか、よく理解されていない。本研究では、常磁性効果のひとつであるPCS (Pseudo Contact Shifts: 擬コンタクトシフト)を用いて、溶液中における直鎖型ユビキチン二重合体の各ユビキチン分子の配向情報を得ることを目的とした。

PCS, ubiquitin

○にしざわまゆ, もりもとだいち, いのまたこうすけ, そとましんご, とちおひでひと, しらかわまさひろ

PCS (Pseudo Contact Shifts: 擬コンタクトシフト)とはランタノイド金属でタンパク質を標識し、常磁性効果を用いてNMR測定を行う手法である。PCSを測定すれば、ランタノイドとNH間の距離を正確に決定でき、タンパク質の構造情報を得ることが出来る。PCS測定は、NOESYに比べて遙かに短時間で、なおかつ40Åまでの広範囲の構造情報を得ることが出来る。

PCS観測のための試料調製

ユビキチン単体もしくは、直鎖型ユビキチン二重合体のN末側のユビキチン分子の35番目グリシンをシステインに変異し、そこに金属キレート剤であるDOTA (1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸) をアルゴン下で結合させた。このキレート剤に異なる常磁性効果を示す三種類のランタノイド金属 （ジスプロシウム、テルビウム、ツリウム）をそれぞれ配位させ、^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定することによって三種類のPCSを測定した。

Fig. 1. Two different crystal structures of linear diubiquitin[1,2].

【実験結果と考察】

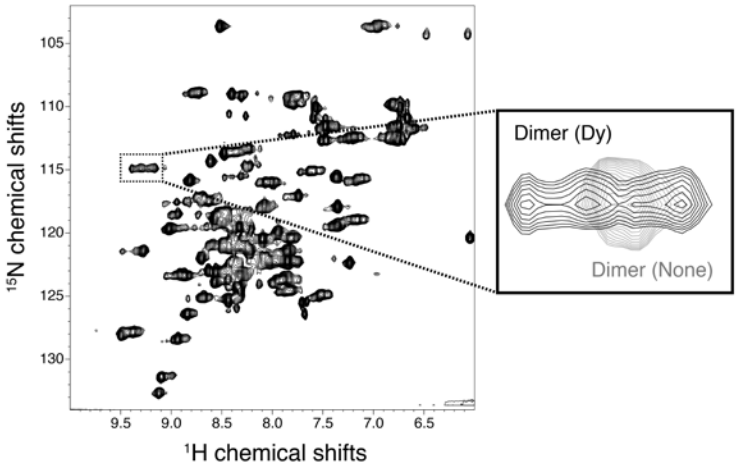


Fig. 2. ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of linear diubiquitin. The right enlarged view indicates a representative shifted peak. Gray: a control peak; black: a shifted peak by dysprosium.

はじめに、ユビキチン単体および直鎖型ユビキチン二重合体の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定した。スペクトル解析より、二重合体特有のピークが得られた。さらに、ユビキチン単体および直鎖型ユビキチン二重合体において、三種類の金属を用いて常磁性効果により変化したピークの帰属を行なった (Fig. 2)。

解析ソフトNumbat[3]を用いて、得られたPCSをもとに、単体および直鎖型ユビキチン二重合体における常磁性金属の座標ならびに配向テンソルを計算した。その結果、報告されている二種類の結晶構造（Fig. 1）と比較すると、溶液中において直鎖型ユビキチン二重合体は、閉構造の結晶構造に近い高次構造を形成していることが示唆された。

参考文献

[1] Komader, *et al. EMBO Rep*. 2009. **10**. 466-473
[2] Rohaim, *et al. Acta Crystallogr. D* 2012. **68**. 102-108
[3] Schmitz, *et al. J Biomol NMR*. 2008. **41**. 179-189.

P12 ユビキチン化に伴うタンパク質構造不安定化

○森本大智[1], Erik Walinda[1], 菅瀬謙治[2], 深田はるみ[3], 曽友深[4], 蔭山 俊[4,5], 星野大[6], 藤井高志[7], 土屋光[8], 佐伯泰[8], 有田恭平[9], 有吉眞理子[10], 杤尾豪人[10], 岩井一宏[11], 難波啓一[7,12], 小松雅明[4,5], 田中啓二[8], 白川昌宏[1]

[1]京都大・工, [2]サントリー生命科学財団, [3]大府大・生命環境, [4]東京都医学研・蛋白質リサイクル, [5]新潟大・医, [6]京都大・薬, [7]理研・QBiC, [8]東京都医学研・蛋白質代謝, [9]横市大・生命医, [10]京都大・理, [11]京都大・医, [12]大阪大・生命機能

Folding destabilization of a protein by ubiquitylation

○Daichi Morimoto[1], Erik Walinda[1], Kenji Sugase[2], Harumi Fukada[3], Yu-shin Sou[4], Shun Kageyama[4,5], Masaru Hoshino[6], Takashi Fujii[7], Hikaru Tsuchiya[8], Yasushi Saeki[8], Kyohei Arita[9], Mariko Ariyoshi[10], Hidehito Tochio[10], Kazuhiro Iwai[11], Keiichi Namba[7,12], Masaaki Komatsu[4,5], Keiji Tanaka[8] and Masahiro Shirakawa[1]

[1]Eng., Kyoto Uni., Kyoto, Japan, [2]Suntory Fdn. Life Sci., Osaka, Japan, [3]Life Envi. Sci., Osaka Pref. Uni., Osaka, Japan, [4]Protein Metabolism Proj., Tokyo Metro. Ins. Med. Sci., Tokyo, Japan, [5]Med., Niigata Uni., Niigata, Japan, [6]Pharm., Kyoto Uni., Kyoto, Japan, [7]QBiC, RIKEN, Osaka, Japan, [8]Lab. Protein Metabolism, Tokyo Metro. Ins. Med. Sci., Tokyo, Japan, [9]Med. Life Sci., Yokohama City Uni., Yokohama, Japan, [10]Science, Kyoto Uni., Kyoto, Japan, [11]Med., Kyoto Uni., Kyoto, Japan, [12]Frontier Biosci., Osaka Uni., Osaka, Japan.

Ubiquitin is one of the most stable intracellular proteins, but it is often found in inclusion bodies associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. To gain insight into this contradictory behavior, we have examined the physicochemical properties of ubiquitin and its polymeric chains that lead to aggregate formation. We found that the folding stability of ubiquitin chains unexpectedly decreased with increasing chain length, resulting in the formation of amyloid-like fibrils. Not only polymerization of ubiquitin itself, but also ubiquitylation of substrate proteins causes fibril formation. Furthermore, when expressed in cells, polyubiquitin chains also formed aggregates depending on chain length. Notably, these aggregates were selectively degraded by autophagy. We propose that the instability of polyubiquitin chains drives fibril formation, which serve as an initiation signal for autophagy.

ユビキチンは極めて可溶性が高く、物理的化学的に安定なタンパク質である。一方、アルツハイマー病等の神経変性疾患患者の脳病変部位ではユビキチンの凝集体形成が確認されている(Mori, *et al. Science.* 1987)。ユビキチンと凝集体形成との接点は何か。本研究ではユビキチンの多重合体や基質結合体に着目し物理化学的解析を行なった。

Ubiquitin, amyloid fibrils

○もりもとだいち, づぁりんだえりっく, すがせけんじ, ふかだはるみ, そうゆうしん, かげやましゅん, ほしのまさる, ふじいたかし, つちやひかる, さえきやすし, ありたきょうへい, ありよしまりこ, とちおひでひと, いわいかずひろ, なんばけいいち, こまつまさあき, たなかけいじ, しらかわまさひろ

1. 鎖長依存的な熱力学的不安定化

まず、鎖長別にポリユビキチン鎖の示差走査熱量測定をし、熱力学的安定性解析を行なった。図 1 に示すように、ポリユビキチン鎖は鎖長が長くなれば長くなる程、熱変性点つまり熱力学的安定性が低下した。一般的に、独立した立体構造を有するタンパク質のポリマーは、その重合度が増えるに従い、熱変性点が上昇することが知られており(Cortajarena, *et al*. *Protein Sci*. 2011)、ポリユビキチン鎖の鎖長依存的不安定化は非常に新規性が高い。

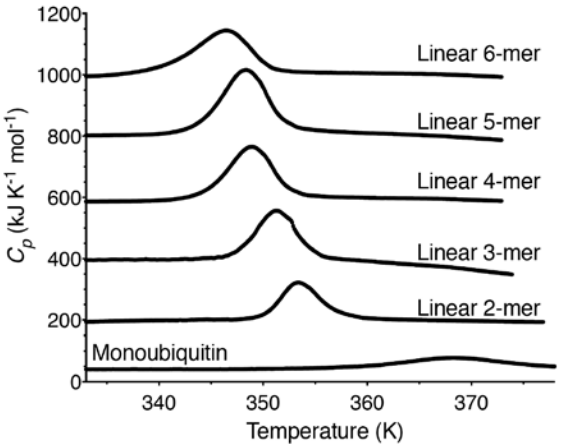


Fig. 1. Comparative analysis of thermal denaturation for polyubiquitin chains of different length.

2. 基質タンパク質の構造不安定化

前述のユビキチン化による熱力学的不安定化は、ユビキチン化タンパク質においても同様に起こる可能性がある。実際、分子動力学解析でユビキチン化による基質タンパク質の熱力学的不安定化が指摘されている(Hagai, *et al. PNAS.* 2006)。二種類の基質(FKBP12、FABP4)に関し蛍光測定により検証した結果、ユビキチン化により熱力学的不安定化を引き起こすことが実験的に証明できた。さらに、^{15}N{^{1}H}NOE 解析により、ユビキチン化により基質タンパク質主鎖の構造ゆらぎが引き起こることが分かった。

3. ポリユビキチン鎖及びユビキチン化タンパク質のアミロイド様線維形成

透過型電子顕微鏡(TEM)、円偏光二色性(CD)スペクトルならびに Thioflavin T 結合実験により、鎖長や結合型ならびに基質タンパク質との結合の有無に関係なく、熱変性や力学的応力によりユビキチン鎖はアミロイド様線維形成することが分かった。

4. 細胞内ポリユビキチン鎖凝集体形成とオートファジーによる凝集体分解

試験管内で解析した現象が、細胞内でも引き起こるか否か検証した。マウス胎児線維芽細胞においてポリユビキチン鎖あるいはモノユビキチンを細胞内で発現させた。モノユビキチンを発現させた細胞では、顕著な凝集体形成は確認出来なかった。しかし、ポリユビキチン鎖を発現させた細胞では、2 μm 程度の凝集体が形成していた。

細胞内のユビキチン陽性凝集体は選択的オートファジーにより分解される(Kirkin, *et al*. *Mol Cell*. 2009)。選択的オートファジーによる認識があるか否か検証するため、NMR 滴定実験を行なった。ユビキチン鎖線維を滴定した結果、p62 の ^{15}N 横緩和速度が増加し(図 2)、相互作用が示唆された。また、野生型の細胞では凝集体は 24 時間でほぼ全量分解されたが、オートファジー欠損細胞(*Atg7*$^{-/-}$)では分解されなかった。これらの結果よりポリユビキチン鎖は鎖長依存的に凝集体形成し、その凝集体は選択的オートファジーにより分解されることが分かった。

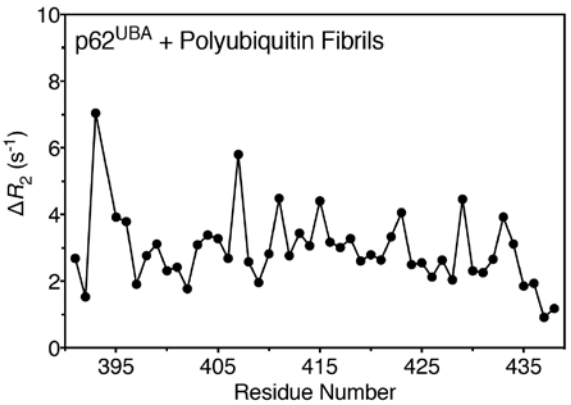


Fig. 2. Estimation of ΔR_2, the difference of the transverse relaxation rates (^{15}N-R_2) of free p62^{UBA} and p62^{UBA} titrated with polyubiquitin fibrils.

P13

hOGG1の遺伝子修復機構の解析と性状解析

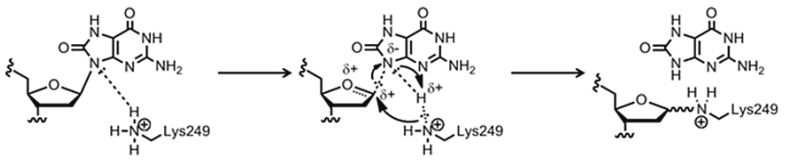
○佐藤大地[1],米山桃子[2],河原郁美[2], 古板恭子[2], 児嶋長次郎[2], 根東義則[1], 田中好幸[1]
[1]東北大学大学院・薬学研究科
[2]大阪大学・蛋白質研究所

Characterization of human 8-oxoguanine glycosylase 1 and its mechanistic study

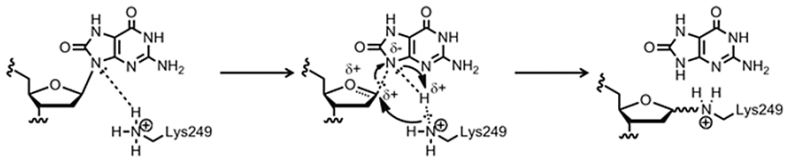
○Daichi Sato[1], Momoko Yoneyama[2], Ikumi Kawahara[2], Kyoko Fruita[2], Chojiro Kojima[2], Yoshinori Kondo[1], Yoshiyuki Tanaka[1]
[1] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Miyagi, Japan.*
[2] *Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

Human 8-oxoguannine glycosylase 1 (hOGG1) is responsible for eliminating one of the major DNA lesions, 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8oxoG). Reaction mechanism of hOGG1 has not been elucidated yet, and several competing hypotheses have been proposed. Recently, our collaborator proposed a novel hypothesis. In this hypothesis, pyramidal structure of the glycosyl nitrogen (N9) of 8oxoG in an enzyme-bound state may facilitate the elimination of 8oxoG. In this study, we constructed expression system of hOGG1 for its mechanistic analysis, and obtained the NMR spectrum of hOGG1.

損傷塩基8-oxoguanine(8oxoG)の除去・修復を行う酵素human 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1)による8oxoGを含むDNA鎖の修復機構は現在、未決定のままであり、様々な反応機構が提唱されている。中でも現段階で最も単純化されたものは1996年にVerdineらによって発表された機構[1](Scheme 1.)であるが、最近Sychrovskýらによって行われた量子化学計算によるhOGG1の反応機構解析で全く新しい反応機構[2](Scheme 2.)が提唱された。



Scheme 1.



Scheme 2.

蛋白質性状解析、構造解析

○さとうだいち, よねやまももこ, かわはらいくみ, ふるいたきょうこ, こじまちょうじろう, こんどうよしのり, たなかよしゆき

この反応機構解析によると、hOGG1の基質結合ポケット内で8oxoGのグリコシル結合位窒素N9が活性残基の1つである249番目のLysのアミノ基のアンモニウムプロトンと水素結合を組み、N9の軌道構成状態がsp^2からsp^3様になることが反応の駆動力になると考えられている(Figure 1.)。本機構は既存のどの反応機構とも異なる新規機構であり、他の提唱機構より圧倒的に低いエネルギー障壁で反応が進むことが示されている。そこで本研究ではNMR分光法を用いて酵素結合時の8oxoGのN9の軌道混成状態の検証を行い、本反応機構の仮説を立証することを目的としている。

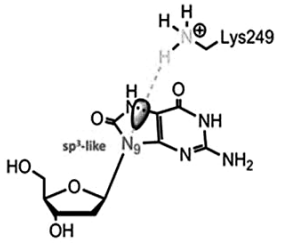


Fig. 1 hOGG1 bound to 8oxoG

この軌道混成状態の検証のためには基質である8oxoGとは結合するものの切断活性はもっていないhOGG1の不活性変異体が必要である。このような不活性変異体として活性残基の1つである268番目のアスパラギン酸(Asp/D)をアスパラギン(Asn/N)に変異させたD268N変異体が知られている[3]。結晶構造解析にも用いられた本不活性変異体hOGG1 D268Nを利用して軌道混成状態の検証を行うことを計画した。

まずはじめに、不活性変異体hOGG1 D268Nおよび天然型hOGG1の発現系より得られた316残基の2種類のhOGG1による酵素活性の有無を検証した。その結果、天然型hOGG1では時間経過に伴い切断されたDNA鎖が増加していることが確認された(Fig. 2)。一方、不活性型hOGG1ではDNA鎖が全く切断されていないことがわかった(Fig. 2)。また、hOGG1 D268Nの^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルの測定を行い、構造解析可能な溶液条件を見いだした (Fig. 3)。これらのことから作製した酵素が正しいフォールディングを保持していることが示唆された。現在、基質-酵素結合時の構造解析に向けて、8oxoGヌクレオシドが基質となるかどうかの検証、及び、hOGG1蛋白質がより安定に存在できる溶液条件について検討を行っている。

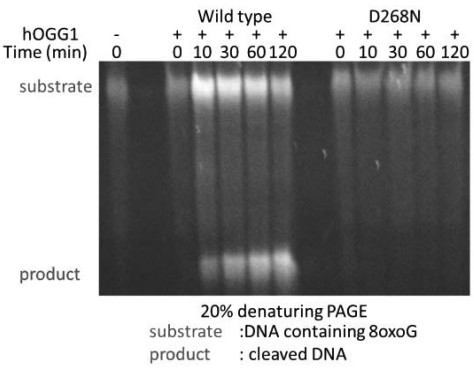


Fig. 2 active measurement of hOGG1

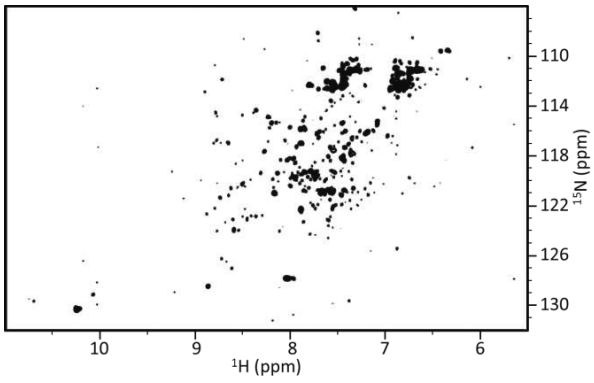


Fig. 3 ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of hOGG1 (D268N)

Reference

[1] Nash, H. M., Bruner, S. D., Schärer, O. D., Kawate, T., Addona, T. A., Spooner, E., Lane, W. S. and Verdine, G. L. *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 968-980.

[2] Šebera, J., Trantírek, L., Tanaka, Y. and Sychrovský, V. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12535-12544.

[3] Norman, D. P. G., Chung, S. J., and Verdine, G. L. *Biochemistry* **2003**, *42*, 1564-1572.

P14

硬直な構造をもつ新規ランタニドキレート剤を用いたタンパク質の常磁性 NMR 研究

○服部良一[1]，山口拓実[2,3]，Zhang Ying[2,3]，亀田倫史[4]，加藤晃一[2,3]，藤原敏道[1]，児嶋長次郎[1]
[1]大阪大学 蛋白質研究所
[2]自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・分子科学研究所
[3]名古屋市立大学 大学院薬学研究科
[4]産業技術総合研究所 ゲノム情報研究センター

Paramagnetic NMR study of proteins using a novel chelator designed for rigid lanthanide tagging

○Yoshikazu Hattori[1], Takumi Yamaguchi[2,3], Ying Zhang[2,3], Tomoshi Kameda[4], Koichi Kato[2,3], Toshimichi Fujiwara[1], Chojiro Kojima[1]
[1]*Insititute for Protein Research, Osaka University*
[2]*Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences*
[3]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University*
[4]*Computational Biology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*

Anisotropic effects in paramagnetic NMR, such as pseudocontact shift (PCS), provide powerful structural information for proteins. Lanthanide ions produce large PCS, thus lanthanide tagging to proteins is important issue. Here we utilized a novel small lanthanide chelator with rigid structure for paramagnetic NMR study. This chelator is conjugated to amino groups in a protein and moderately selective reaction toward N-terminus was achieved by lowering the pH of reaction solution. The observed PCSs were enough large (up to 1.5 ppm), and the position of paramagnetic center and the anisotropy of magnetic susceptibility were uniquely determined. Furthermore, more selective and easier labeling strategy using reductive methylation and subsequent protease digestion was developed.

【序論】

擬コンタクトシフト（PCS）とよばれる常磁性シフトは、長い距離情報や角度情報を得る上で有用である。ランタニド系列の金属イオンがとりわけ強い PCS を引き起こすが、金属結合性ではないタンパク質にランタニドイオンを標識するには、ランタニドイオンを配位するタグ分子をタンパク質に化学修飾する必要がある。また、常磁性中心位置が解析可能であり、かつ十分に大きな PCS をタンパク質分子で観測するには、ランタニド金属がタンパク質に強く固定化されていることが望ましい。そのような固

常磁性NMR，ランタニド，化学修飾

○はっとりよしかず, やまぐちたくみ, ちゃんいん, かめだともし, かとうこういち, ふじわらとしみち，こじまちょうじろう

定化の方法として、キレート剤あるいはランタニド結合ペプチドを 2 点固定化する方法が挙げられる。この方法では立体構造に基づくコンストラクトの検討が必要であるが、1 点固定化であっても、DOTA など強固なキレート剤を用いることで大きな PCS が観測された例がある。しかし、これらは分子量が非常に大きい（> 600）ために疎水性が高く、場合によってはタグ構造の化学交換によってマイナーピークが見られる。そこで本研究では、1 点固定化においても十分に大きな PCS を引き起こすことが期待される分子量が小さくかつ硬直な構造を有するキレート剤をタンパク質に化学修飾し、PCS 解析におけるランタニドプローブとしての性能を評価した。

【材料と方法】

o-phenylenediaminetetraacetic acid（PhDTA）のアルデヒド誘導体（Fig. 1）とタンパク質のアミノ基を還元剤（$NaBH_3CN$）の存在下で反応させ、PhDTA をタンパク質に付加した。タンパク質として ubiquitin を用いた場合には、pH 5.5 で反応を行い、N 末端への反応選択性を向上させた。反応物は陰イオン交換カラムを用いて、未反応物および副反応物との分離を行った。精製物に各種ランタニド金属の塩化物を 5 等量添加後に、限外濾過フィルターを用いて遊離の金属を除去した。

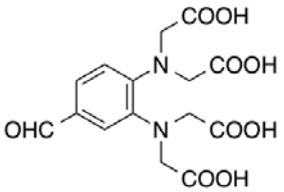


Fig. 1. Chemical structure of an aldehyde derivative of PhDTA

【結果と考察】

ubiquitin の PhDTA 修飾物を陰イオン交換カラムにかけた溶出画分の NMR 測定を行った結果、N 末端の修飾物がメジャーな画分の他に、K6 の修飾物が単離された。K6 の修飾物では大きな PCS（> 2 ppm）が観測されたが、常磁性中心位置を同定することができなかった。これは、K6 の側鎖が複数のコンホメーションを取りうるためであることが、MD シミュレーションから示された。一方、N 末端の修飾物では実験値と計算値がよく一致し、常磁性中心位置および磁化率の異方性が精度良く決定された（Fig. 2 and Fig. 3）。これについて、同様の MD シミュレーションから、N 末端が比較的均一なコンホメーションを取ることが示された。

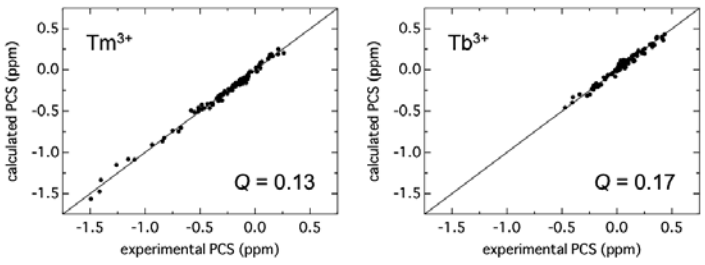


Fig. 2. Correlation between experimental PCS and calculated PCS of PhDTA with lanthanides at N-terminus of ubiquitin.

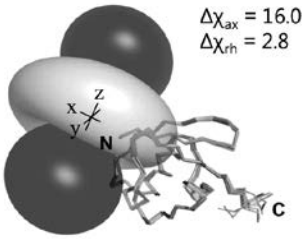


Fig. 3. PCS isosurface (countered at ±0.5 ppm) induced by PhDTA with Tm^{3+} at N-terminus of ubiquitin and principal axes of $\Delta\chi$ tensors $[10^{-32}\ m^3]$.

【結論と今後】

硬直な構造をもつランタニドキレート剤を ubiquitin の N 末端アミノ基に修飾し、構造情報と対応する十分に大きな PCS が観測された。現在、アミノ基の還元的メチル化とそれに続くプロテアーゼ切断で N 末端アミノ基を露出させることで、N 末端選択的なタグ分子の修飾反応を容易に行う方法を検討している。

P15

Regnase-1によるmRNA切断機構の構造生物学的解析

○横川真梨子[1], 津嶋崇[2], 野田展生[3], 久米田博之[1], 足立わかな[1], 榎園能章[1], 山下和男[4], Daron M. Standley[4], 竹内理[4,5,6], 審良静男[4,5], 稲垣冬彦[1]
[1]北海道大学大学院・先端生命科学研究院
[2]北海道大学大学院・生命科学研究院
[3]公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所
[4]大阪大学・免疫学フロンティア研究センター
[5]大阪大学・微生物病研究所
[6]京都大学・ウィルス研究所

Structural and functional analyses of mRNA degradation by Regnase-1

○Mariko Yokogawa[1], Takashi Tsushima[2], Nobuo N. Noda[3], Hiroyuki Kumeta[1], Wakana Adachi[1], Yoshiaki Enokizono[1], Kazuo Yamashita[4], Daron M. Standley[4], Osamu Takeuchi[4,5,6], Shizuo Akira[4,5], and Fuyuhiko Inagaki[1]
[1]Facalty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
[2]Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
[3]Institute of Microbial Chemistry, Microbial Chemistry Research Foundation, Tokyo, Japan.
[4]World Premier International Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan.
[5]Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan.
[6]Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, Japan

Regnase-1, also known as Zc3h12a or MCPIP1, is RNase that prevents autoimmune diseases by controlling the stability of a set of inflammatory genes: interleukin (IL)-6 and IL-12p40. Regnase-1 is comprised of a PilT N-terminus like domain (PIN) with RNase activity, a CCCH type zinc-finger domain (ZF), and other domains. Recently, the crystal structure of PIN-like domain of Regnase-1 was reported (Xu J. *et. al.*, *Nucleic Acids Research* (2012), **40**, 6957-65), however, the structure and function of other domains of Regnase-1 and the RNA recognition mechanism have not been elucidated. Here, we performed structural and functional analyses of the target RNA degradation mechanism by Regnase-1.

［背景］
Regnase-1は、IL-6やIL-12p40などのmRNAを切断するリボヌクレアーゼであり、過剰な炎症反応を抑制することで免疫応答の制御を担う。Regnase-1はヌクレアーゼ活性の本体であるPIN様ドメイン(PIN)、CCCH型ジンクフィンガードメイン(ZF)を含む複

RNA，リボヌクレアーゼ，RNA-タンパク質相互作用

○よこがわまりこ，つしまたかし，のだのぶお，くめたひろゆき，あだちわかな，えのきぞのよしあき，やましたかずお，すたんどれーだーろん，たけうちおさむ，あきらしずお，いながきふゆひこ

数のドメインからなる。近年、ヒト由来 Regnase-1 の PIN の結晶構造が報告された（Xu J. *et. al.*, *Nucleic Acids Research* (2012), **40**, 6957-65)。しかしながら、他のドメインを含む Regnase-1 の全体構造や基質 RNA との結合様式は不明である。本研究では、Regnase-1 がどのようにして基質 RNA を認識し、切断しているのかを明らかとすることを目的とした。

［方法・結果・考察］

マウス由来 Regnase-1 の各ドメインを大腸菌にて発現させ、NMR 法により N 末端の UBA 様ドメイン(NTD)、ZF、C 末端ドメイン(CTD)の溶液構造を決定した。なお、PIN ドメインの構造は X 線結晶構造解析法により決定した（Fig. 1)。PIN は結晶構造中において head to tail のオリゴマーを形成しており、ゲルろ過解析においても、高濃度になるほど高分子量化する非対称の溶出ピークを示した。そこで、X 線結晶構造に基づき PIN の分子間相互作用残基に変異を導入することにより、モノマー化変異体を作製した。均一 ^{13}C, ^{15}N 標識体を調製し、3 重共鳴法によりモノマー化変異体の主鎖帰属を行った。モノマー化変異体と野生型の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを比較した結果、野生型では結晶構造中における分子間相互作用界面に位置する残基が広幅化していた（Fig. 2)。以上より、PIN は溶液中においても結晶中と同様の様式にて相互作用していることが分かった。現在、*in vitro* cleavage assay により、PIN の会合状態と RNA 切断活性の関連を調べているところである。

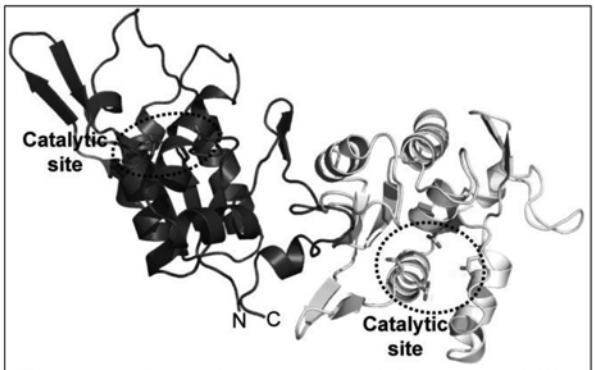


Fig. 1　Crystal structure of Regnase-1 PIN
Two molecules were exhibited. Catalytic residues were shown in sticks.

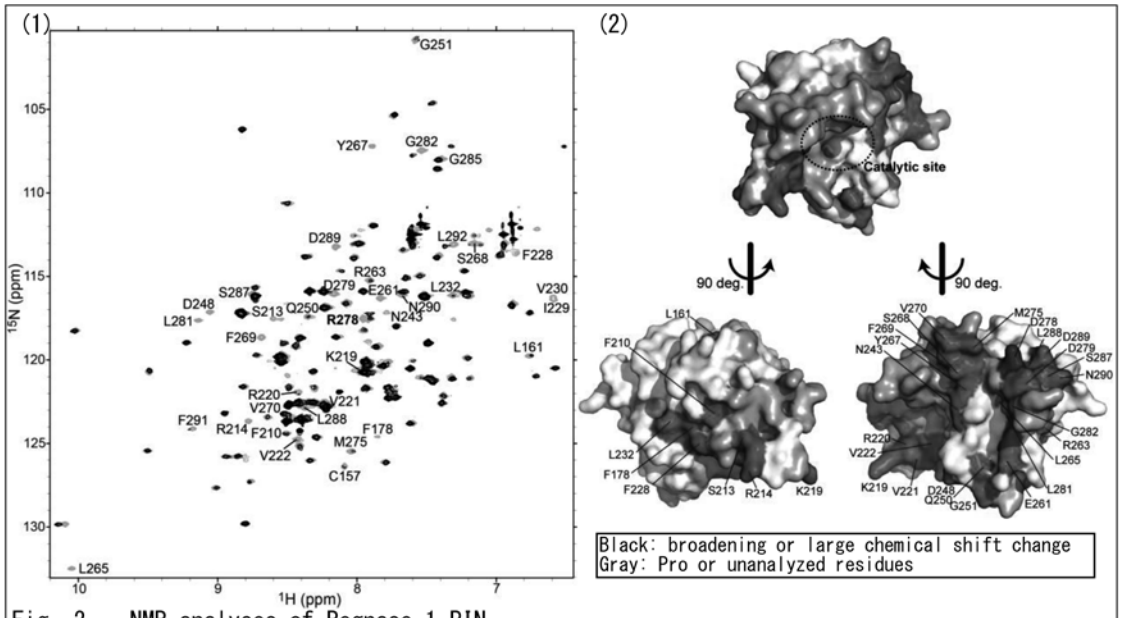


Fig. 2　NMR analyses of Regnase-1 PIN
(1) ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of wild-type (black) and monomeric mutant (gray) were overlaid.
(2) Residues with large chemical shift changes or significant broadening in wild-type compared to monomeric mutant were mapped on the surface structure of PIN.

P16

ポリユビキチン鎖線維形成メカニズムの構造学的研究

○新家万葉[1]、森本大智[1]、有吉眞理子[2]、杤尾豪人[2]、白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院・工学研究科
[2]京都大学大学院・理学研究科

Structural study of the formation mechanism of polyubiquitin fibrils

○Mayo Shinke[1], Daichi Morimoto[1], Mariko Ariyoshi[2], Hidehito Tochio[2], and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.*
[2] *Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

Ubiquitin is conjugated with a substrate protein in a monomeric and/or polymeric form. This modification regulates the intracellular function, localization and degradation of the substrate protein. We previously showed that polymerization of ubiquitin molecules causes their folding destabilization and fibril formation in response to heat or hydrodynamic forces. These properties may be related with formation of ubiquitin-positive inclusions which are observed in neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease; however, the structure and formation mechanism of polyubiquitin fibrils have been elusive. In this study, we produced soluble reaction intermediates in fibril formation and analyzed them with solution NMR. The thermodynamic properties and backbone chemical shifts of the intermediates were obtained. Based on the results, we will discuss formation mechanism of polyubiquitin fibrils.

【背景・目的】

全ての真核生物は、ユビキチンという76個のアミノ酸から成り、あらゆる細胞にユビキタスに存在するタンパク質を持つ。ユビキチンは細胞内で標的タンパク質に幾つも鎖状に結合し、そのタンパク質の機能や局在、寿命を制御している。この制御機構の不全は、癌や神経変性疾患などの病気を引き起こす。

先行研究において、ユビキチンはポリマー化することによって、単量体の持つ高い物理的・化学的安定性を失い、さらに熱変性や流体力学的応力により、線維化・凝集化することが明らかになった。ユビキチン陽性の封入体は、アルツハイマー病やパーキンソン病を始めとする神経変性疾患患者の脳内において確認されていることから、線維・凝集体の形成とこれらの疾患との関係が指摘されている。しかし現在、このポリユビキチン鎖線維の構造や形成機構に関する知見は皆無である。そこで本研究では、線維形成機構を原子レベルで解明することを目的とする。

【結果・考察】

線維や凝集体は不溶性で非結晶性の固体であるため、溶液NMRやX線回折といった分析ツールを用いた構造解析が困難である。そこで本実験では、線維から可溶で分析

Ubiquitin, Amyloid fibril, Reaction intermediate

○しんけ まよ、もりもと だいち、ありよし まりこ、とちお ひでひと、しらかわ まさひろ

可能なオリゴマー分子を抽出することにより線維形成過程における反応中間体を作製し、この分子を溶液 NMR により解析することを目的とした。ユビキチン単量体は線維化しないという性質を利用し、次に示すような実験を行った。

まず、ユビキチン G76C 変異体を用いてジスルフィド結合を介した二重合体を調製し、これを熱変性により線維化させた。次に、還元剤を加えてジスルフィド結合を切断した。可溶化した分子を分子排斥クロマトグラフィーにより精製したところ、単量体とは別に線維由来のオリゴマー分子が得られた。この線維由来分子の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを測定した結果、スペクトルパターンが単量体のものと異なり、単量体と異なる立体構造を形成していることが示唆された。また、線維由来分子のピークは温度・時間に依存して強度が減衰することが分かった（Fig. 1）。同時に、単量体由来のピークの強度が増加したことから、線維由来分子は不可逆的に単量体に変化することが分かった。これらの結果より、この線維由来分子は、線維形成過程における反応中間体であると示唆される（Fig. 2）。

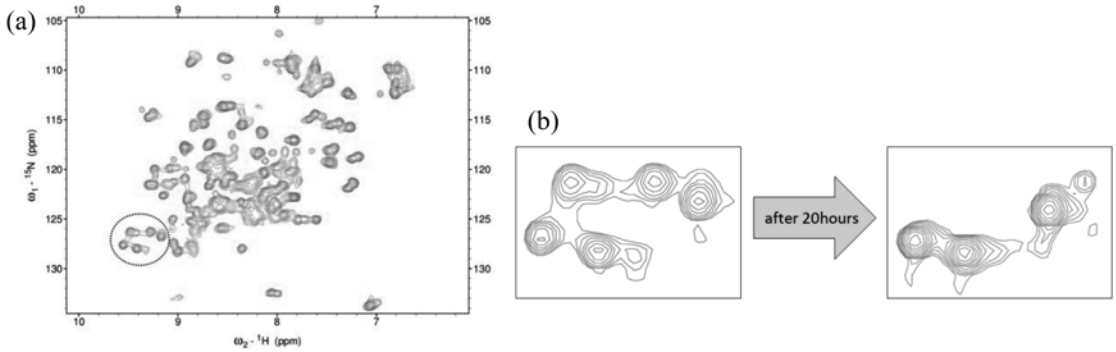


Fig. 1. Thermodynamic properties of polyubiquitin fibril intermediates.
a. ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of the intermediate at 37℃.
b. Enlarged view of the part as shown in (a). Peaks of the intermediate disappeared time-dependently.

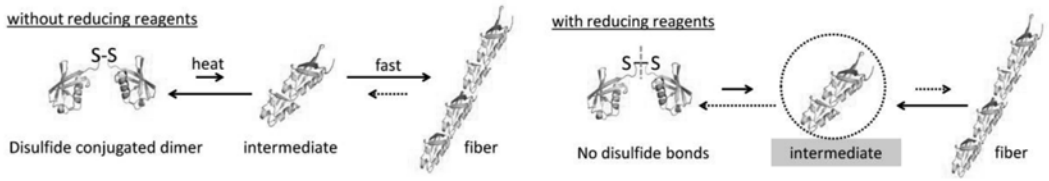


Fig. 2. A schematic model of polyubiquitin fibril formation.
Reaction intermediates are hard to detect in fibril formation (left), whereas, it is possible to detect them by cleaving fibers with DTT at low temperature (right).

一般的にタンパク質の構造解析に用いられるNMR測定法では、観測に時間がかかり、この分子のように不安定で短命なタンパク質の場合、主鎖の化学シフトなど、高次の構造情報を短時間で得ることは困難である。しかし近年、高速かつ高感度で測定可能な手法が開発されており、半減期が一時間以下の短命なタンパク質の構造解析が報告されている。そこで本研究では、低温下で高速測定法の一種であるBEST-NMR法を用いて、準安定状態の主鎖の化学シフトを取得した。これらの結果から、線維形成機構について構造学的に議論する。

P17

溶液状態におけるRNA結合タンパク質Nrd1の構造解析

○小林彩保[1], 中西絢子[2], 佐藤亮介[3], 藤原俊伸[4], 伊藤隆[1], 杉浦麗子[3], 三島正規[1]
[1]首都大院・理工, [2]首都大・化学, [3]近畿大・薬, [4]名市立大院・薬,

Solution structural studies of RNA-binding protein Nrd1

○Ayaho Kobayashi[1], Ayako Nakanishi[2], Ryosuke Satoh[3] , Toshinobu Fujiwara[4], Yutaka Ito[1], Reiko Sugiura[3] and Masaki Mishima[1]
[1]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan*
[2]*Department of chemistry, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan*
[4]*School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Osaka, Japan*
[3]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan*

Negative regulator of differentiation 1 (Nrd1) is known as a negative regulator of sexual differentiation in fission yeast. Further, Nrd1 binds and stabilizes the Cdc4 mRNA which encodes a myosin II light chain, and thereby suppressing the cytokinesis. Pmk1 (yeast MAPK) phosphorylates Nrd1 resulting in markedly reduced RNA binding activity. The mechanism by which Pmk1 regulates the RNA binding activity of Nrd1 is unknown. In an effort to delineate the relationship between Nrd1 structure and function, we prepared each RRM (RNA recognition motif) of Nrd1. Furthermore, we will discuss usage of protein ligation and paramagnetic relaxation enhancement for the full-length Nrd1.

分裂酵母におけるRRM型RNA結合タンパク質Nrd1は、これまで減数分裂や性的分化を抑制する因子として同定されてきた[(1),(2)]。さらに、Nrd1はアクトミオシン環の収縮に必須なミオシンIIの必須軽鎖をコードする*cdc4*±のmRNAに結合し安定化することで、細胞質分裂を制御する。興味深いことに、Nrd1は、Pmk1 MAPキナーゼによってThr40及びThr126がリン酸化されるとRNA結合能が抑制される(**図1**)[(3)]。本研究は、構造解析によって、MAPキナーゼによる翻訳マシナリーの直接のリン酸化が分子スイッチとして機能するメカニズムを明らかにすることを目的としている。

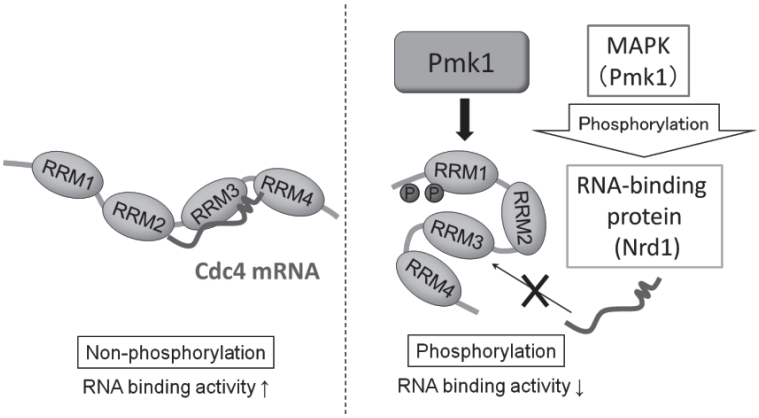


Fig.1 Schematic drawing of Nrd1 function

RRM, リン酸化, マルチドメインタンパク質
○こばやしあやほ, なかにしあやこ, さとうりょうすけ, ふじわらとしのぶ, いとうゆたか, すぎうられいこ, みしままさき

各RRMごとに発現系を作製し、その調製を行い、NMRによるCdc4 mRNAとの結合実験を行った。Pmk1によりリン酸化されるThr126が存在するRRM1ではRNAとの結合が見られなかったものの、RRM3-RRM4タンデム領域で比較的強い結合が確認された。リン酸化を受けるRRM1ではなく、配列上離れた位置にあるRRM3-RRM4タンデム領域がRNAとの結合に重要であることから、Nrd1のRNA結合能の制御を理解するためには、ドメイン間の配置がリン酸化によってどのように変化するのか調べる必要である。そこで、全長構造のドメイン配置の知見を得るためにX線小角散乱(SAXS)の測定を行った。その結果、非リン酸化状態のNrd1全長は4つのRRMが一直線上に並んだ伸びた構造であることが明らかとなった。非リン酸化状態では伸びた構造であることにより、RNAと結合可能な領域が露出しているのではないかと考えられる。

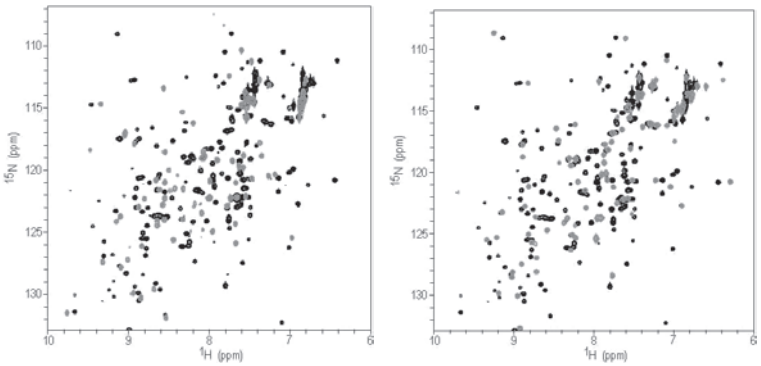


Fig.2 The ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of RRM1-RRM2, RRM1, RRM2
(Left)　Overlay of RRM1-RRM2(black) and RRM1(gray)
(Right)　Overlay of RRM1-RRM2(black) and RRM2(gray)

また、RRM1-RRM2のタンデム領域と該当する各RRM単独の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを比較したところ、化学シフトは一致しなかったことから、RRM間の相互作用の存在が示唆された(**図2**)。RRM3-RRM4タンデム領域に関しても同様の結果が得られた。

Nrd1全長の構造解析に先駆け、RRM2単独ドメイン(**図3**)[4]及びRRM1-RRM2タンデム領域の構造解析を行っている(**図4**)。最終的にはsortase等を用いた全長の再構成及び常磁性緩和効果を用いたNMR解析、SAXSを組み合わせてNrd1全長の構造解析を行い、リン酸化によって起こるドメインの配置変化によるRNA結合能の制御機構を明らかにする。

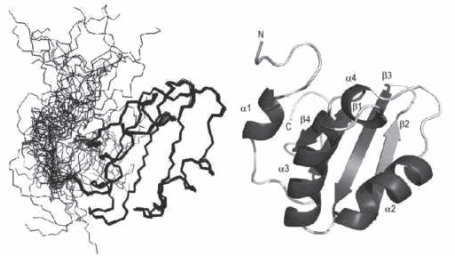


Fig.3　Structure of Nrd1 RRM2 domain

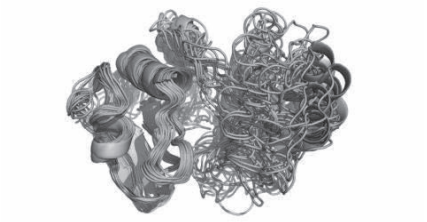


Fig.4　Structure calculations of Nrd1 RRM1-RRM2 tandem region

参考文献

(1)　Tsukahara, K. et al. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4488-98 (1998)
(2)　Jeong, H.T. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1621-6 (2004)
(3)　Satoh, R. et al. *Mol. Biol. Cell,* 20, 2473-85 (2009)
(4)　Kobayashi, A. et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 437, 12-17 (2013)

P18

神経系幹細胞の未分化状態維持と発癌に関わるMusashi1タンパク質の構造基盤

○岩岡諒[1]，小林直宏[2]，津田健吾[3]，今井貴雄[4]，岡野栄之[4]，永田崇[1]，片平正人[1]
[1]京都大・エネルギー理工学研究所
[2]大阪大・蛋白質研究所
[3]理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター
[4]慶應義塾大・医学部

Structural study of Musashi1 involved in the maintenance of neural stem cell pluripotency and oncogenesis

○Ryo Iwaoka[1], Naohiro Kobayashi[2], Kengo Tsuda[3], Takao Imai[4], Hideyuki Okano[4], Takashi Nagata[1] and Masato Katahira[1]
[1]*Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Kyoto, Japan*
[2]*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan*
[3]*RIKEN, Center for Life Science Technologies, Kanagawa, Japan*
[4]*School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan*

Musashi1 (Msi1) represses the translation of the mRNA encoding Numb protein, an inhibitor of Notch signaling, resulting in the maintenance of pluripotency of neural stem cells and oncogenesis. Translation is initiated and promoted by the interaction between eIF4G bound at the 5′-cap structure and Poly (A)-Binding Protein (PABP) at the 3′-poly (A) sequence. In the stem cells, Msi1 competes with eIF4G and directly binds to PABP on mRNA, resulting in the inhibition of translation initiation. In this study, we have determined the solution structure of RBD2-C comprised Msi1 2nd RNA-binding domain (RBD) and its C-terminal extremity in complex with r(GUAGU). Structural comparison of the RBD1:r(GUAGU) complex with the RBD2-C:r(GUAGU) complex revealed the similarities as well as notable differences in the mode of RNA recognition.

【諸言】
多分化能を有する神経系幹細胞の未分化状態及び増殖性の維持と発癌に関わるMusashi1タンパク質(Msi1)は、Notchシグナルを抑制するタンパク質Numbの発現を翻訳レベルで抑制する。翻訳は、5′端のキャップ複合体の構成因子eIF4Gと、3′端のポリ(A)に結合したPoly(A)-Binding Protein (PABP)との相互作用により、開始・促進される。しかし神経系幹細胞では、mRNAに結合したMsi1がeIF4Gと競合して直接PABPに結合し、eIF4GとPABPの結合を阻害することにより、翻訳の抑制が成立する。これまでに我々は、Msi1が有する二つのRNA結合ドメイン(RBD)、RBD1とRBD2の構造をNMRにより明らかにし[1,2]、RBD1については、標的配列に含まれるr(GUAGU)との複合体の

Keywords: タンパク質−RNA複合体

○いわおかりょう，こばやしなおひろ，つだけんご，いまいたかお，おかのひでゆき，ながたたかし，かたひらまさと

構造を決定することで結合様式を明らかにした[3]。本研究では、以前決定したMsi1 RBD2よりもC末端側に数残基伸長したMsi1 RBD2-Cを調製し、単体とr(GUAGU)との複合体について構造解析を行ない、得られた構造に基づいてRBD2-CのRNA結合様式を明らかにする。さらにRBD1とRBD2-CのRNA結合様式を比較することで、Msi1が標的とするmRNAについて議論を行う。

【方法】

Msi1 RBD2-C単独とRNA複合体の他核多次元NMRスペクトルは、Bruker社製AVANCE 600を用いて測定を行った。複合体の構造解析用に、^{13}C, ^{15}N-[f1, f2]-filtered NOESY, ^{13}C, ^{15}N-[f2]-filtered NOESY及びTOCSYを測定した。さらに^{13}C-edited [f2]-filtered-NOESY-HSQCをBruker社製AVANCE Ⅲ 950（大阪大・蛋白研）を用いて測定を行った。スペクトル処理はNMRPipe/NMRDrawまたはTopspinで行い、解析にはMagRO-NMRView、Topspin及びSparkyを使用した。TALOS-Nプログラムを使用し主鎖ケミカルシフトから主鎖二面角情報を、NOEの情報から側鎖（Phe、Val、Leu及びIle）二面角情報を得た。構造計算はCYANA 2.1を用いて行った。

【結果と考察】

^{13}C/^{15}NでラベルしたMsi1 RBD2-Cを調製し、すべてのスペクトルを298 Kにて測定を行った。RBD2-C単独とRNA複合体の他核多次元NMRスペクトルを基に、各々化学シフトを帰属した。結果、ほぼすべての主鎖と側鎖の化学シフトを帰属することが出来た。RNAの構造制限情報は、RNA分子内のNOE情報を^{13}C, ^{15}N-[f1, f2]-filtered NOESYから取得し、タンパク質－RNA間のNOE情報を^{13}C, ^{15}N-[f2]-filtered NOESYとRNA分子内のNOEを基に取得した。さらに、TOCSYスペクトルから糖のPuckeringの情報を取得した。これら帰属された制限情報とCYANAにより自動帰属されたRBD2-CのNOE情報を基に、RBD2-C単独とRNA複合体の溶液構造をそれぞれ決定した。RBD1とRBD2-CのRNA結合様式を比較したところ、これらの二つのRBDとRNAとの結合には共通の相互作用と明らかに異なる相互作用が見いだされた。RBD1とRBD2-Cの間で保存されているアミノ酸残基に関しては同様のRNA結合様式を示し、RBD2-Cにおいてはドメインから C端側に続く天然変性領域の一部がRNA結合に関与していることが明らかになり、更に結合時のみヘリカルな二次構造を形成することも明らかになった。本発表では、明らかになったRBD2-CのRNA結合様式を基に、現在見つかっているMsi1の標的mRNAのうち、特に分化制御及び発癌に関わるものとの結合について議論する。

【参考文献】

[1]Nagata *et al*. (1999) *JMB*. **287**, 315-330
[2]Miyanoiri *et al.* (2003) *JBC*. **278**, 41309-41315
[3]Ohyama *et al.* (2012) *NAR*. **40**, 3218-3231

【謝辞】

本研究の一部は、「大阪大学蛋白質研究所共同利用・共同研究拠点」により実施された。

P19

微小脂質二分子膜を利用したシトクロム*c*とカルジオリピンの相互作用解析

○小林紀、長尾聡、廣田俊
奈良先端大・物質創成

Characterization of the interaction between cytochrome *c* and cardiolipin using bicelles

○Hisashi Kobayashi, Satoshi Nagao, and Shun Hirota
Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan.

Cytochrome *c* (cyt *c*) is a heme protein, which transfers electrons in the respiratory chain and plays an important role in apoptosis. Cyt *c* has been known to interact with an anionic phospholipid, cardiolipin (CL), at the inner membrane of mitochondria. Although it is important to characterize the structure of cyt *c* during interaction with CL in detail for elucidating its structure-function relationship, the interaction sites of cyt *c* with CL have not been fully understood. We constructed small CL-containing bicelles with isotropical tumbling motions to reduce the line-broadening of the NMR signals.

序論

シトクロム*c*(cyt *c*, Fig.1)はヘムタンパク質であり、ミトコンドリア内膜に局在するリン脂質のカルジオリピン(CL)と相互作用している。Cyt *c*とCLの相互作用は、呼吸鎖における電子伝達だけでなく、アポトーシスのトリガーとなるミトコンドリア膜間部から細胞質へのcyt *c*の放出に関与するとされている。Cyt *c*の機能発現の分子機構を理解するには、cyt *c*におけるCLとの相互作用部位や、CLとの相互作用によって生じるcyt *c*の構造変化を詳細に明らかにする必要がある。溶液NMRでは原子レベルの構造情報が得られるが、一般的なモデル脂質二分子膜として用いられるリポソームとタンパク質を相互作用させると、分子量増大により著しいシグナルのブロードニングが起こり、解析が困難となる。そこで本研究では、分子サイズが小さく均一な脂質二分子膜であるバイセルにCLを導入し、溶液NMRによりcyt *c*とCL含有バイセルの相互作用解析を試みた。

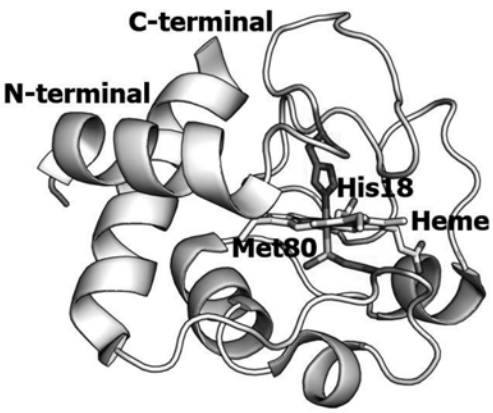


Fig.1 X-ray crystal structure of horse heart cyt *c*. (PDB: 1HRC)

シトクロム*c*，バイセル，タンパク質－脂質相互作用

○こばやしひさし，ながおさとし，ひろたしゅん

結果・考察

長鎖のリン脂質1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocoline (DMPC)と短鎖のリン脂質1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocoline (DHPC)とウシ由来CL (BHCL, Fig.2)をモル比3.14 : 1 : 0.17で混合し、BHCL含有バイセルを作製した。BHCL含有バイセル中のリン脂質に由来する^{31}Pシグナルはシャープに観測され、溶液中でバイセルが等方的な回転運動をしていることが示唆された。Cyro-TEMでは、BHCL含有バイセルが粒径約20 nmのサイズの均一なディスク構造を有している様子が観察された。

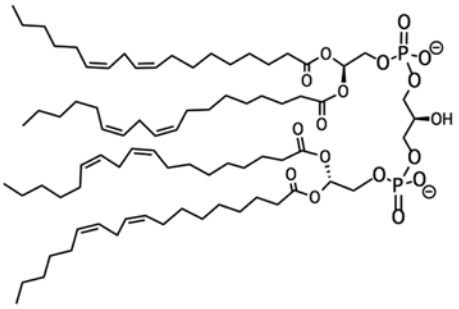


Fig.2 Structure of bovine heart CL (BHCL).

大腸菌発現系により^{15}N同位体標識したウマcyt *c*を調製し、HSQC－TOCSY、HSQC－NOESY測定により酸化型ウマcyt *c*の主鎖アミドNHのシグナル帰属を行った。次に、Cyt *c*におけるCLとの相互作用部位を明らかにするため、酸化型ウマcyt *c*にBHCL含有バイセルを添加し、^{1}H－^{15}N HSQC測定を行い、各アミノ酸残基のNHシグナルの化学シフト変化量を見積もった。その結果、Lys22周辺とC末端ヘリックスの両端のアミノ酸残基に由来するNHシグナルの化学シフト変化が大きいことがわかった(Fig.3)。化学シフト変化の大きいアミノ酸残基は結晶構造上で近接しており、Lys22周辺とC末端のアミノ酸残基がCLとの相互作用部位であることが示唆された(Fig.4)。一方、ヘム近傍のアミノ酸残基の主鎖NHシグナルは化学シフト変化が小さかった。酸化型cyt *c*の吸収スペクトル測定においても、BHCL含有バイセル添加によってヘム鉄－Met80結合に由来する吸収が変化しなかったことから、CLとの相互作用によりcyt *c*の活性部位構造は変わらないことが示唆された。以上の結果より、cyt *c*はLys22周辺とC末端のアミノ酸残基を介して、電子伝達活性を保持したままCLと相互作用していると考えられる。

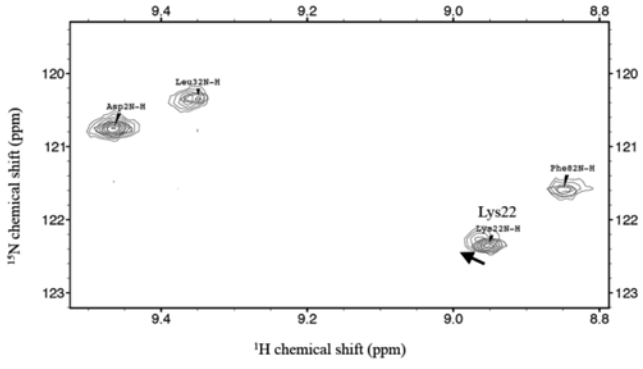


Fig.3 ^{1}H－^{15}N HSQC spectra of cyt *c* in the absence (black) and presence (gray) of bicelles containing BHCL.

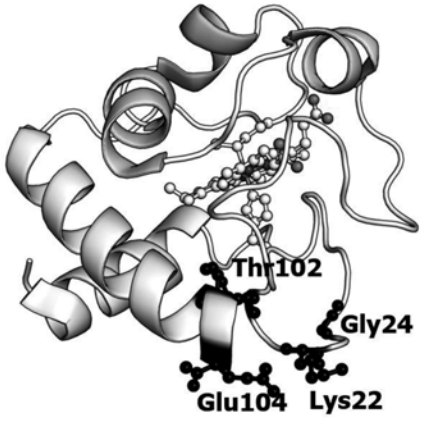


Fig.4 Proposed interaction sites (black) of cyt *c* with BHCL.

P20 LINE RNAと逆転写酵素の認識特異性の決定要因

○大津 舞菜[1]，梶川 正樹[2]，河合 剛太[1]
[1]千葉工業大学・工学部，[2]東京工業大学大学院・生命理工学研究科

Specificity Determinant of LINE RNA for the recognition by LINE reverse transcriptase

○Maina Otsu[1], Masaki Kajikawa[2], and Gota Kawai[1]
[1] Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan.
[2] Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Japan.

Long interspersed nuclear element (LINE) is known to be transposed by the reverse transcription using its RNA transcript. Recognition of the 3' stem-loop of LINE RNA by its reverse transcriptase (RT) is the important step of the retrotransposition. Among several LINEs found in the zebrafish genome, ZfL2-1 and ZfL2-2 are similar to each other but RT of ZfL2-1 does not recognize the RNA of ZfL2-2, and vice versa. ZfL2-1 is almost identical to a LINE from eel, UnaL2, and we already determined the structure of the RT recognition site of UnaL2. In the present study, structure of the RT recognition site of the LINE RNA from zebrafish (ZfL2-1-34) was determined. In order to elucidate the recognition mechanism, the interaction between the RNAs and peptides derived from RTs was analyzed.

序論

Long interspersed nuclear element（LINE）は，自身にコードされた逆転写酵素によりRNAを介して逆転写することで新たな位置に挿入されることが知られているが，逆転写酵素がどのようにしてLINE RNAを認識しているのかは解明されていない．そこで本研究ではLINE RNAの逆転写酵素認識部位の立体構造を決定し，さらにLINE RNAと逆転写酵素のLINE RNA認識部位との相互作用解析を行うことで，逆転写酵素による認識機構を解明することを目的としている．これまでに，ウナギのLINE RNA（UnaL2）の逆転写酵素認識部位のステムループ（UnaL2-17，UnaL2-36）の立体構造を決定しており，ウナギのLINE逆転写酵素の認識においてG8が重要であり，U10がその構造を支えていることを示した[1,2]．

今回は，ゼブラフィッシュ由来のLINEで，UnaL2とほぼ同じLINEであるZfL2-2と，それによく似ているが逆転写酵素の特異性の異なるZfL2-1の2つのLINEに着目し，その特異性の決定要因について解析を進めている．すでにZfL2-1のRNAの逆転写酵素認識部位（ZfL2-1-34，Fig. 1）の暫定構造を報告した[3]．ZfL2-1とZfL2-2については，逆転写酵素のRNA認識に関与する領域（48アミノ酸残基）が特定されており，これに相当するペプチドにおいても一定のRNA認識の特異性が示されている[4]．そこで，LINE RNAの立体構造を決定するとともに，このペプチドとLINE RNAの相互作用解析を行うことを試みている．

LINE, 逆転写酵素, RNA

○おおつまいな，かじかわまさき，かわいごうた

方法

<立体構造解析>

ZfL2-1-34の暫定構造[3]を基に残余双極子相互作用（RDC）を用いて立体構造の精密化を行った．まず，$^{13}C/^{15}N$標識したRNAのTROSYスペクトルを，Pf1ファージ有無で測定し，シグナルの割れ幅の変化からRDCの値を得た．次に，ステム部分のみのRDC（33個）を用いて配向テンソルを計算し，全体のRDC（42個）を用いて精密化計算を行った．

ZfL2-1-34-G10（Fig. 1）を転写合成し，NMRスペクトルの測定，解析，立体構造計算を行った．スペクトルの解析はZfL2-1-34の帰属を基に行った．

<相互作用解析>

ZfL2-1，ZfL2-2由来の2種類のペプチド（理化学研究所，外部利用課題13-700-007）とZfL2-1-34，ZfL2-1-34-G10，ZfL2-2-17を用い，ゲルシフト法による相互作用実験を行った．LINE RNAとペプチドのモル比が1：1および1：3になるように試料を調製し，12%非変性PAGEを行った．

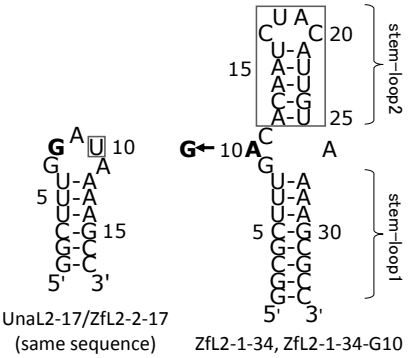


Fig. 1　RNAs used for the NMR analysis

結果

<立体構造解析>

ZfL2-1-34の精密化計算では立体構造をより収束させることができ，A10が外側に飛び出していることが分かった（Fig. 2）．また，ZfL2-1-34-G10の立体構造も暫定的に決定し，A10と同じくG10も外側に飛び出していることが分かった．

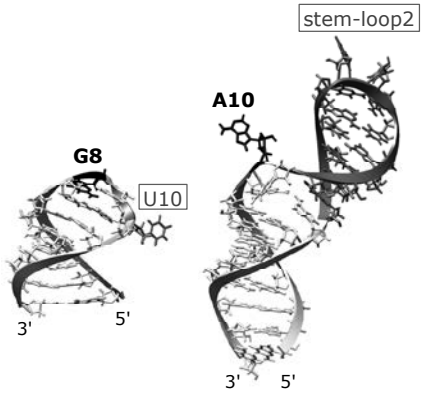


Fig. 2　The solution structures of ZfL2-2-17 (left, PDB ID: 1wks) and ZfL2-1-34 (right)

<相互作用解析>

ZfL2-1由来のペプチドは3種類のRNAのいずれとも結合したが，ZfL2-2由来のペプチドはZfL2-1-34-G10，ZfL2-2-17のみ結合し，ZfL2-1-34とは結合しなかった．

考察

ZfL2-1-34とZfL2-1-34-G10の構造がほぼ同じであるにも関わらずペプチドとの相互作用実験において結合の差が出たことから，A10およびG10が認識特異性の決定要因であると推測している．現在，NMR法による相互作用解析を試みている．なお，ZfL2-1由来のペプチドは3種類全てのLINE RNAと結合したことから，解析している領域の他にもLINE RNAを特異的に認識する部分があることが示唆された．

ZfL2-1-34のA10は外側に飛び出しているが，ZfL2-2-17（UnaL2-17と同一）のG8はG7とスタッキングしている（Fig. 2）．逆転写酵素による認識の容易さから，認識される際にG8はフリップアウトすると推測している．そこで，ZfL2-2-17単独でのマイナーコンホメーションをCPMG dispergion法などにより解析する予定である．

引用文献

1. Baba S. et al., *RNA* **10**, 1380–1387, 2004.
2. Nomura Y. et al., *Nucleic Acids Res.* **34**, 5184–5193, 2006.
3. 大津ほか，第52回NMR討論会，2013年11月，金沢．
4. Hayashi Y. et al., *Nucleic Acids Res.* in press.

P21

天然変性タンパク質と低分子のNMR滴定実験における主成分分析の利用

岩谷奈央子[1]、重光佳基[1]、天野剛志[1,2]、合田名都子[1]、松崎瑞希[2]、成田哲博[2]、阿部義人 [3]、星美奈子[4]、○廣明秀一[1]
[1]名古屋大院・創薬科学研究科
[2]名古屋大院・理学研究科附属構造生物学研究センター
[3]九州大院・薬学研究科
[4]京都大院・医学研究科

Primary Component Analysis of HSQC-based NMR Titration Experiments : Application to Interaction between Intrinsically Disordered Proteins and Small Molecules

Naoko Iwaya[1], Yoshiki Shigemitsu[1], Natsuko Goda[1], Takeshi Tenno[1,2], Mizuki Matsuzaki[2], Akihiro Narita[2], Yoshito Abe[3], Minako Hoshi[4], and ○Hidekazu Hiroaki[1,2]
[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Aichi, Japan.
[2]Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University, Aichi, Japan.
[3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan.
[4]Graduate School of Medicine, Kyoyo University, Kyoto, Japan.

Intrinsically disordered protein (IDP) is an emerging idea, which may have high flexibility in the polypeptide chains lacking a stable 3D structure. Because of its difficulty of X-ray crystallography, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) method is the first choice for atomic level investigation of IDPs' nature. ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of IDPs are characterized with a lower spectral dispersion along ^{1}H chemical shift axis, since IDPs are equilibrateing among several local conformtions and exchanging among them. Small molecule compounds that interact to disease-related IDPs are now focused. For example, compounds that inhibit the growth of β-amyloid fibrils from amyloid-beta (Aβ) peptides, a typical IDP, are potential therapeutic agents for Alzheimer's disease (AD). However, this dynamic conformational equilibrium of IDPs may hamper the interpretation of NMR titration data. Here we propose the use of principal component analysis (PCA) for analyzing NMR titration data of Aβ(1–42) with inhibitors. We measured ^{1}H-^{15}N 2D spectra at various temperatures as well as in the presence of several inhibitors. The PCA diagram suggested that various amyloid inhibitors alter the conformational equilibrium of IDPs.

近年、天然変性タンパク質(IDP)という新たな概念が提案され、注目を集めている。通常のタンパク質が、フォールディングにより一次構造に規定された立体構造を形成し、その構造に基づいた特異的機能を発現するのに対し、IDPは、生理的条件下で、単独では特定の立体構造を持たないことが特徴である。IDPには、アミロイド

天然変性タンパク質，NMR滴定実験，化学シフト摂動，速い化学交換，主成分分析

いわやなおこ，しげみつよしき，ごうだなつこ，てんのたけし，まつざきみずき，なりたあきひろ，あべよしと，ほしみなこ，○ひろあきひでかず

線維形成能を有しているものや、疾病の原因となっているため創薬標的と目されているものがいくつか存在する。IDPの研究、とくにIDPと他の分子との相互作用に関わる研究においては、溶液NMR法が強力な手法の一つとなっている。

さて、IDPのHSQCスペクトルは、狭い^{1}H化学シフトの分散が特徴である。これはIDPが複数の準安定構造の間で速い化学交換状態にあり、化学シフトが平均化されるためである（図１）。そのため、IDPに結合する化合物をNMRを指標に探索する際には注意を要する。なぜならば、鍵と鍵穴様の相互作用を仮定して、「大きな化学シフト変化が見られた残基＝相互作用に直接関わっている残基」との解釈ができないからである。

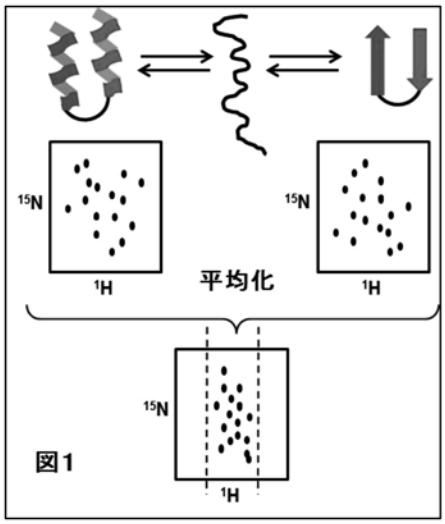


図1

今回演者らは、典型的な IDPの一つアミロイドベータペプチド（Aβ42）を用いて、化合物によるNMR滴定実験を行った。Aβ42に、既報の凝集阻害薬（カテコール系（EGCgやロスマリン酸）、 オスモライト（スクロース等））を加えると、7割以上のシグナルに変化が見られた。これは添加した分子のサイズを考えると、化学シフトが変化した残基がすべて添加化合物と接触している、とは考えにくい。更に、山口らは関連するペプチドであるAβ40が、温度変化のみでそのHSQCスペクトルを変化させるが、それはAβ40の局所コンフォメーションの平衡が温度により変化するためである、と報告している[1]。筆者らはAβ42で同様の現象の再現性を確認した。そこで、筆者らは、NMRのシグナル変化から特異的な相互作用部位の特定を目指さず、化学シフトのパターンそのものの分類から、化合物とAβ42との相互作用機構の違いが明らかになるのではないか、と考え、主成分分析（PCA）を導入した。PCAは、例えばタンパク質巻き戻し中間体のNMR解析などに応用され、定評ある手法である[2]。しかし、予備的なPCA解析の結果では、オスモライト系（Aβ42の局所構造を安定化する）とカテコール系阻害剤系（Aβ42に直接結合する）が混じったクラスターに分類された（図２）。このことはむしろ、カテコール系阻害剤系の効果もオスモライト同様、Aβ42の局所構造の安定化を通じて凝集阻害活性を発揮していることを意味する。

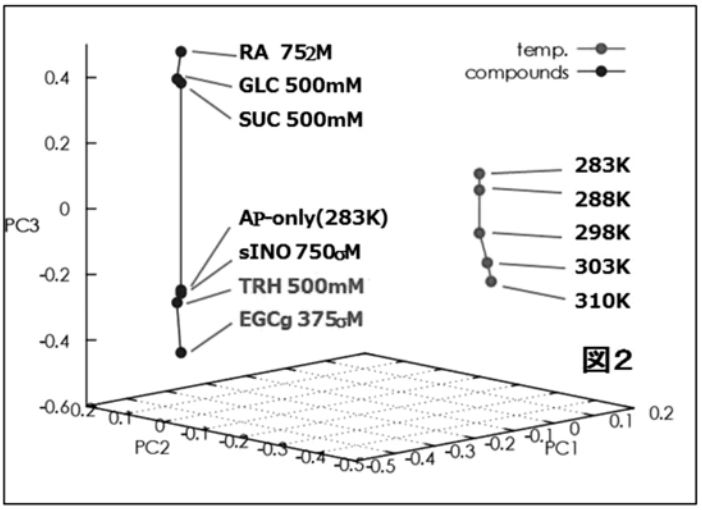


図2

Referemces

1. Yamaguchi T, Matsuzaki K, Hoshino M. *FEBS Lett.* (2011) **585**(7):1097-1102.
2. Sakurai K, Goto Y. *Proc Natl Acad Sci* U S A. (2007) **104**(39):15346-15351.

P22

HCVゲノムRNAにおけるNS5Bタンパク質コード領域のSL3.2とその200残基上流の一本鎖領域との相互作用の解析

○大友 裕貴[1]，Pratima Chaudhuri[2]，河合 剛太[1]
[1]千葉工業大学・工学部
[2]Amity Institute of Biotechnology, Amity University, India

Analysis of interaction between SL3.2 and a single stranded region in the NS5B coding region of HCV genome RNA

○Yuki Otomo[1], Pratima Chaudhuri[2], and Gota Kawai[1]
[1]Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan.
[2]Amity Institute of Biotechnology, Amity University, India.

Intramolecular interactions in the hepatitis C virus (HCV) genome RNA are thought to be important to regulate the replication and translation. In the present study, the interaction between a stem-loop, 5B-SL3.2, and a single stranded region, 5B-SS, located 200nt upstream in the coding region of NS5B was analyzed by PAGE, UV-melting and NMR methods. PAGE and UV-melting analyses indicated that 5B-SL3.2 and 5B-SS interact to each other and Mg^{2+} stabilizes the interaction. NMR analysis in the absence of Mg^{2+} indicated that intermolecular base pairs are formed between 5B-SL3.2 and 5B-SS. 5B-SS, in the absence of 5B-SL3.2, forms unexpected base pairs and it was suggested that these base pairs of 5B-SS are not formed in the complex.

序論

C 型肝炎ウイルス（hepatitis C virus: HCV）の複製や翻訳の制御において，ゲノムRNA分子内のさまざまな相互作用が重要であることが示されている[1)]．本研究では，これらの相互作用についてNMR法による解析を行い，相互作用のメカニズムを明らかにすることを目的としている．これまでに，RNA依存性RNAポリメラーゼであるNS5Bタンパク質のコード領域に存在するSL3.2（5B-SL3.2）とゲノムRNAの3′末端のX-tailに存在するSL2との複合体について，NMR法による構造解析を行い，複合体の立体構造をほぼ決定した[2)]．

今回は，5B-SL3.2と，その200残基上流に位置する一本鎖領域（5B-SS）との相互作用[3)]（Fig. 1）に着目し，ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）によるゲルシフト法やUV吸収による融解温度の測定，およびNMR法によって，その相互作用解析を進めている．

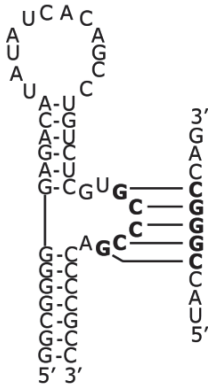


Fig. 1 Proposed interaction between 5B-SL3.2 and 5B-SS[3)]

RNA, HCV, interaction

○おおともゆうき，ぷらてぃまちゃうどり，かわいごうた

方法

5B-SL3.2試料は試験管内転写法で調製した．ただし，残基特異的に$^{13}C/^{15}N$標識した5B-SL3.2試料は，安定同位体標識アミダイトユニット（大陽日酸社）を用いた化学合成法によって調製した．5B-SSは化学合成法によって調製した．ゲルシフト法では各RNA試料を4.3 nmol使用した．また，融解温度の測定は1.3 μMのRNA試料を用いて行った．溶液条件は50 mM NaClを含む20 mMリン酸緩衝液であり，ゲルシフト法では試料とゲル中に5 mM $MgCl_2$を加えた．NMRスペクトルの測定では，5B-SL3.2，5B-SSおよび複合体のRNA濃度はそれぞれ0.3 mM，0.7 mMおよび0.2 mM（各断片）とした．NMRスペクトルの測定にはAVANCE600（BRUKER社）を用いた．

結果

室温でのゲルシフト法による解析では，5 mM Mg^{2+}存在下において，複合体形成によるバンドのシフトが確認できた（Fig. 2）．一方，UV吸収による融解温度解析によって，Mg^{2+}非存在下において，分子間相互作用に由来するT_m値がおよそ313 Kであることが分かった．そこで，T_m値よりも低い288 Kにおいて，Mg^{2+}非存在下で，両単体および複合体のNMRスペクトルの測定を行った．Fig. 3は，それぞれのイミノプロトン領域を示している．5B-SS単体において，2つの明確なイミノプロトンシグナルが観測されたことから，単体において塩基対を形成していることが分かった．5B-SSを加えることによって，5B-SL3.2のNMRスペクトルが変化することから，これらのRNA断片が相互作用していることが確認できた．

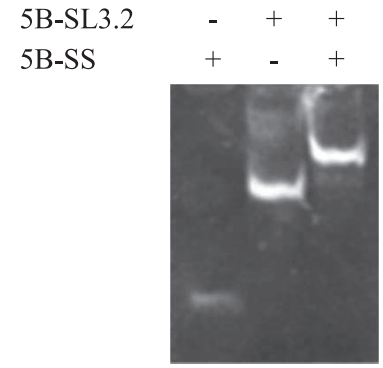


Fig. 2　Result of gel shift assay

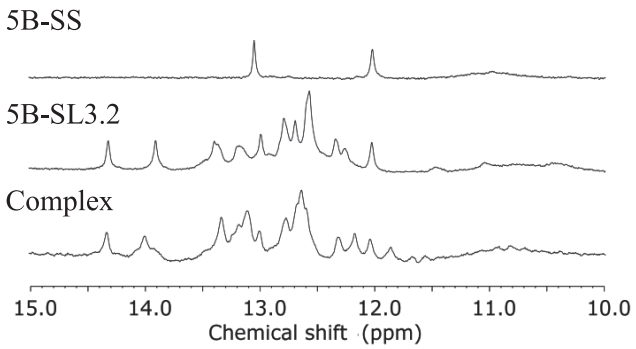


Fig. 3　^{1}H-NMR spectra measured at 288

考察

5B-SL3.2と5B-SSが相互作用することが確かめられ，また，イミノプロトンシグナルの変化から，相互作用によって新しい塩基対が形成されていることが分かった．5B-SS単体において塩基対の形成が確認されたが，複合体形成時にはその塩基対は開裂していると考えられる．また，5B-SL3.2と5B-SSの相互作用は，Mg^{2+}非存在下においても存在し，Mg^{2+}によって安定化されることが示された．現在，部位特異的安定同位体標識を行った試料を利用することにより，複合体のNMRスペクトルの解析を進めている．

引用文献

1) Shetty, S. et al., *Nucleic Acids Res.* **41**, 2526-2540, 2013.
2) 大友ほか，第36回日本分子生物学会年会，2013年12月，神戸．
3) Diviney, S. et al., *J. Virol.* **82**, 9008-9022, 2008.

P23

溶液 NMR 法を用いた大腸菌由来 Aβ(1-42)の品質管理

○重光佳基[1]，岩谷奈央子[1]，天野剛志[1]，合田名都子[1]，松崎瑞季[2]，成田哲博[2]，星美奈子[3]，廣明秀一[1]
[1]名古屋大学　大学院　創薬科学研究科
[2]名古屋大学　大学院　理学研究科
[3]京都大学　大学院　医学研究科

The quality control of Aβ(1-42) from bacteria by solution NMR

○Yoshiki Shigemitsu[1], Naoko Iwaya[1], Takeshi Tenno[1], Natsuko Goda[1], Mizuki Matsuzaki[2], Akihiro Narita[2], Minako Hoshi[3] and Hidekazu Hiroaki[1]
[1] Graduate School of Pharmaceutical Science, Nagoya University, Nagoya, Japan
[2] Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan
[3] Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

The Aβ peptides are consist of 39 to 43 amino acid residues, and the peptides constitute a major component of senile plaque often observed in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients. Regardless of the chemical synthesis and the bacterial system for the preparation of Aβ(1-42), one of the major problem is low reproducibility of experiments of Aβ(1-42) due to "seed", that enhances the peptide aggregation in vitro. This problem, combined with the difficulty of the sample preparation, affects the experimental reproducibility, thus this problem makes research of Aβ difficult. Therefore, the preparation of "seed free" Aβ peptide is important for reproducible experiments. We would like to present the results about quality control of Aβ(1-42) by measuring HSQC and DOSY spectra because the quality control of Aβ(1-42) is not enough, and we also present that the solution NMR is a useful tool for the quality control of Aβ(1-42).

【緒言】これまでの研究から，アミロイドβ(Aβ)はアルツハイマー型認知症(AD)の主要因である事が強く示唆されている．Aβペプチドは39-43アミノ酸残基からなり，AD病変部に頻繁に観察されている老人班の主成分であるアミロイド線維を形成する．Aβペプチドの主な分子種としてAβ(1-40)とAβ(1-42)が知られている．このうちAβ(1-42)はin vitroにおける高い凝集性が示されている [1]．Aβペプチドを調製する方法は，化学合成による方法と大腸菌発現系を用いる方法とに大別される．いずれの方法を用いるにせよ，Aβ(1-42)の単量体を調製する際に，凝集の核(シード)の混入が，in vitroにおける高い凝集性を示す要因となっている．この高い凝集性は種々の実験の再現性に大きな影響を与え，AD発症のメカニズム解明や創薬開発といった研究の遂行を困難している．Aβの研究を行う上で重要な事は，シードフリーのAβ(1-42)単量体の

amyloid β(1-42), solution NMR

○しげみつよしき，いわやなおこ，てんのたけし，ごうだなつこ，まつざきみずき，なりたあきひろ，ほしみなこ，ひろあきひでかず

調製とその品質管理である．生化学的あるいは分光学的にAβ(1-42)品質管理を行っている報告は多くあるが，それらは必ずしも十分とは言い難い．今回，我々は，^{15}N標識したAβ(1-42)を用いて，既存の溶液NMR法が有用な品質管理ツールである事を示す．

【方法】大腸菌*E. coli* BL21(DE3)を用いて^{15}N標識したAβ(1-42)を6×His-酵母ユビキチン融合タンパク質として発現させ封入体として得た．精製はアフィニティカラム精製・タグ切断・HPLCの順で行った．得られた目的物を凍結乾燥した後，0.1 mMとなるように1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-propanol(HFIP)を加えて分注し，再度凍結乾燥を行い最終精製物とした．目的物の確認はウェスタンブロット及びMALDI TOF-MSを用いて行った．上記^{15}N-Aβ(1-42)を95% HFIP / 5% d6-DMSOにペプチド濃度が20 μM～1 mMとなるように溶解させ，^{1}H-^{15}N SOAST-HMQC測定を行った．また，上記溶媒に0.1 mMとなるようにAβ(1-42)ペプチドを調製しDOSY測定を行った．

【結果と考察】
ペプチド濃度を変化させて2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQCを測定した結果，濃度に依存してシグナルの化学シフト変化が観察された(Figure)．この化学シフトの変化量を用いてHillの式より会合数を大まかに算出したところ，2量体を形成している事を示唆する値が得られた．HFIPへの溶解は単量体を誘導するとしてAβペプチドの調製に広く用いられてきたが[2]，濃度依存的にシグナル変化が起こる事を踏まえると，HFIPは必ず単量体を誘導するわけではない事が示唆された．また，予備実験の段階ではあるが，DOSY測定を行ったところ，ごく僅かではあるものの多量体を示唆するスペクトルが得られた．以上の結果は，HFIP処理を行ったAβ(1-42)をモニターする事で，将来的にAβ(1-42)単量体の品質管理を行う上で溶液NMR法が有用なツールとなりうる事を示唆している．

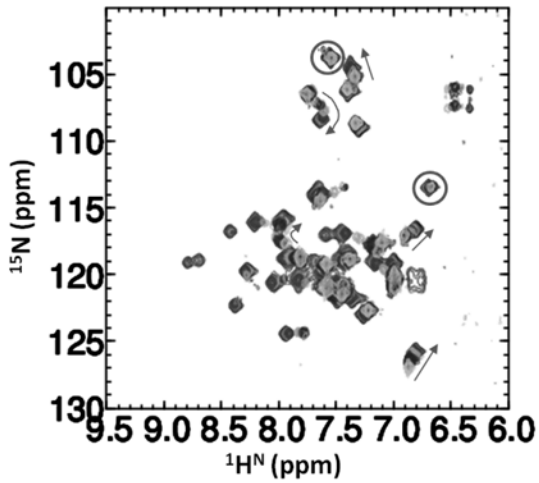


Figure. 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectra in HFIP at various concentration of ^{15}N-Aβ(1-42).

参考文献
1. Jarrett et al., *Biochemistry*, **32**, 4693-7 (1993)
2. Stine et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 11612-22 (2003)

P24

^{19}F含有化合物ライブラリを用いた創薬NMRスクリーニング技術の開発

○片平律子[1]、古板恭子[1]、杉木俊彦[1]、李映昊[1]、服部良一[1]、木川隆則[2]、上村みどり[1,3]、藤原敏道[1]、児嶋長次郎[1]
[1]大阪大・蛋白研
[2]理研・生命システム研究センター
[3]帝人ファーマ株式会社

Development of NMR-based screening technique in drug discovery using fluorine-containing library

○Ritsuko Katahira[1], Kyoko Furuita[1], Toshihiko Sugiki[1], Young-Ho Lee[1], Yoshikazu Hattori[1], Takanori Kigawa[2], Midori Kamimura[3], Toshimichi Fujiwara[1] and Chojiro Kojima[1]
[1]Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.
[2]RIKEN Quantitative Biology Center, Kanagawa Japan.
[3]TEIJIN PHARMA LIMITED, Tokyo, Japan

It is advantageous to use ^{19}F nucleus for NMR screening: (i) NMR sensitivity of ^{19}F nucleus is high, which is 0.83 times the ^{1}H's; (ii) Protonated solvents, buffers, or target proteins do not interfere with NMR measurements; (iii) Signals rarely overlap each other due to their large variation in chemical shift values. Recently, several fluorinated fragment libraries are commercially available. Here we performed the screening of the fluorinated fragment library by ^{19}F R_2 filter for a model protein, FKBP12. As a result, three hit fragments were found. The competitive binding experiments with FK506 revealed that hit fragments bound to the same site as FK506. Chemical shift perturbation experiments of ^{15}N HSQC spectra of FKBP12 supported these results. We compare this method with the others such as ^{19}F DOSY experiment and discuss the effectiveness of this technique.

^{19}F 核を NMR スクリーニングに用いると、(i)感度がプロトンの 0.83 倍とよい、(ii)重水素化していない溶媒やバッファー、それにターゲットタンパク質が測定の妨げにならない、(iii)ケミカルシフトの観測範囲が広いために、信号のオーバーラップが殆どない、というような利点がある。また、近年 ^{19}F を含んだ化合物ライフラリが市販されている。そこで我々は、モデルタンパク質 FKBP12 に対して ^{19}F 化合物ライブラリのスクリーニングを R_2 フィルターにより行うこととした。スクリーニングを行った結果、3 個のヒット化合物を得た。FK506 との競合実験の結果、結合部位が FK506 と同じであることが示唆された。FKBP12 の ^{15}N HSQC スペクトルのケミカルシフトマッピングもこの結果を支持した。本発表では、このスクリーニング法を DOSY などの他法と比較し、本法の有効性を議論する。

Fluorine NMR, screening

○かたひらりつこ，ふるいたきょうこ，すぎきとしひこ，りよんほ，はっとりよしかず，きがわたかのり，かみむらみどり，ふじわらとしみち，こじまちょうじろう

【実験】^{19}F含有化合物ライブラリは、キシダ化学より購入した。ライブラリ化合物は、DMSOに溶解し、其々40mMのストック溶液を作成した。これらを10～11化合物ずつ混合（10-Mix）し、終DMSO濃度が1%、其々の化合物濃度36～40 μMになるように、バッファー（50 mM リン酸Na、50 mM NaCl、pH 6.8）に溶解させた。

^{19}F NMR の測定は、ブルカーバイオスピン社製AVANCEIIIHD-400を用いた。^{19}F核観測のスクリーニングは、待ち時間140msのR_2フィルター法[1]で行い、タンパク質の添加時と無添加時の信号強度比を測定した。内部標準として、40μMのトリフルオロ酢酸Naを用いた。タンパク質は、^{15}N標識したhuman FKBP12を11μMの濃度で用いた。^{19}F DOSY及び^{15}N HSQCの測定は、ブルカーバイオスピン社製AVANCEIIIHD-600で行った。^{19}F DOSYは、拡散時間80msで行った。

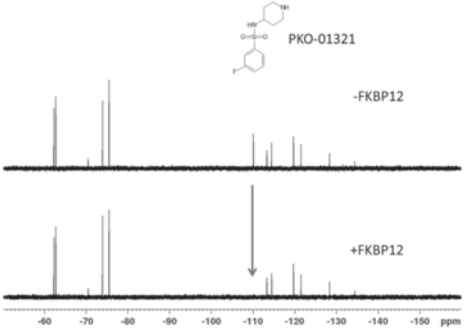


Figure 1. ^{19}F R_2 filter spectra of a fragment mixture in the absence (upper) and in the presence (lower) of FKBP12.

【結果】10－Mixの化合物について、R_2フィルター法でスクリーニングを行った結果の一例を図1に示した。FKBP12の添加により、ピークの消失が観測される信号があり（図1、矢印）、ケミカルシフトより、PKO-01321であると同定された。結合部位を確認するため、FK506をFKBP12とPKO-01321の混合溶液について添加したところ、消失したPKO-01321のピークが再び現れた（図2）。これによりPKO-01321は、FK506と同じ結合部位であることが示唆された。さらに、PKO-01321を添加し、FKBP12の^{15}N HSQCスペクトルを測定したところ、クロスピークのシフトが確認された。ケミカルシフトマッピングを行ったところ、FK506との競合実験から示唆された結合部位を支持した。また、化合物濃度依存的に変化する^{15}N HSQCのクロスピークより解離定数を見積もったところ、560μM程度であることがわかった。このように、^{19}F観測のR_2フィルター法はフラグメントヒットの検出に大変優れていることが分かった。

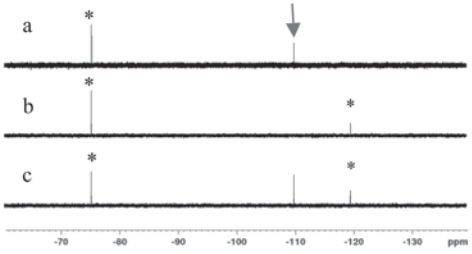


Figure 2. ^{19}F R_2 filter spectra of PK0-01321 in the absence of FKBP12 (a), in the presence of FKBP12 (b), and in the presence of FKBP12 and FK506 (c). The peak of PK0-01321 was pointed out by an arrow.

次に^{19}F観測の他法と本手法を比較するために、^{19}F観測のDOSYを測定した。DOSY法では、タンパク質添加の有無で、化合物の拡散速度に有意な差が認められなかった。DOSY法は、R_2フィルター法を利用した相互作用検出法に比べて検出感度が低いことが報告されているが[1]、本研究により、^{19}F観測のDOSY法もフラグメントヒットの検出に適していないことが分かった。

【参考文献】1. Vulpetti, A. and Dalvit, C. ChemMedChem, 2013, 8, 2057-2069.

【謝辞】 本研究は文部科学省「先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業」の補助により実施された。

P25

Sf9細胞のin-cell NMRを用いた3D NOESYスペクトルの測定

○田中　孝[1,2], 浜津　順平[1], 池谷　鉄兵[1,2], 三島　正規[1,2], 伊藤　隆[1,2]
[1]首都大院・理工・化, [2]CREST/JST

Observation of 3D NOESY spectra of proteins in living insect cells using a baculovirus protein expression system

○Takashi Tanaka[1,2], Jumpei Hamatsu[1], Teppei Ikeya[1,2], Masaki Mishima[1,2], and Yutaka Ito[1,2]
[1]*Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.*
[2]*CREST/JST*

Abstract

We have introduced a novel approach for observing in-cell NMR spectra using the sf9 cell/baculovirus system, and approximately 80 % of the expected backbone NMR resonances of *Streptococcus* protein G B1 domain could be assigned exclusively from the in-cell NMR spectra. However, short life time of sf9 cells in NMR tubes has prevented us from obtaining good 3D ^{15}N-separated NOESY spectra.

In order to extend the life time of sf9 cells, we applied the BIOREACTOR system[1] so as to provide fresh media continuously into the NMR tube during the measurements. The effect was remarkable, and the viability of cells was confirmed to be almost identical to that in the suspension culture. The extension of measurement time to ~24 hours enables us observing well resolved NOE cross peaks in the 3D ^{15}N-separated NOESY spectra, suggesting that structural analysis of this size of protein will be feasible in sf9 cells.

【序】

真核細胞のin-cell NMRは, 最初にカエル卵母細胞[2,3]で行われたのち, ヒト培養細胞[1,4,5]を用いた測定の報告がなされ, 現在では様々な生命現象に適用されるに至っている. 一方で, これらの手法では標的蛋白質を外部から細胞内へ導入するために, 高濃度に濃縮可能で安定な蛋白質に限られるという制約があった. これをうけて, in-cell NMR解析が可能な蛋白質の範疇を広げるために, 真核細胞発現系を用いた手法の開発が行われた.

真核細胞発現系を用いたin-cell NMRは, 2012年にBartrandら[6]によってメタノール資化性酵母*Pichia pastoris*を用いた2D ^{1}H-^{15}N HSQC測定が報告されたのとほぼ同時期に, 我々のsf9/baculovirusの系[7]及びHEK293細胞の系[8]が報告された. 我々はnon-linear samplingとQMEを用いることで, sf9内で発現させた連鎖球菌protein G B1ドメイン(GB1)の良好な3D triple-resonance NMRスペクトルの測定に成功し, in-cell NMRスペクトルのみを用いて主鎖^{1}H^{N}シグナルの約 80% の帰属を行った. 一方で, 主として細胞試料の寿命による測定時間の制約のために, 立体構造解析に使用可能なクオリティーの3D ^{15}N-separated NOESYスペクトルの測定には至っていなかった.

本研究では, 上記のsf9中で発現させたGB1の系について, BIOREACTORシステム[1]を用いた細胞試料の寿命の延長を試み, 次いで良好な3D ^{15}N-separated NOESY測

in-cell NMR, sf9/baculovirus system, 3D NOESY

○たなかたかし, はまつじゅんぺい, いけやてっぺい, みしままさき, いとうゆたか

定を行った．その結果，大幅な測定時間の伸長が可能となり，より高感度で高分解能なNOESYスペクトルの取得にも成功したので報告する．

【実験・結果及び今後の展望】

試料調製は以下のとおりである．まず，GB1遺伝子をポリヘドリンプロモーター下に組み込んだbaculovirusを，3.0×10^7個のsf9 細胞に接種し振盪培養した．25時間後に安定同位体標識培地に交換し，更に25時間培養した．得られたsf9細胞は，遠心分離によって標識培地を取り除いた後，非標識培地で洗浄した．次いで，200μLのMebiol gelに懸濁し，NMR管に封入した後，BIOREACTORシステムにセットした．

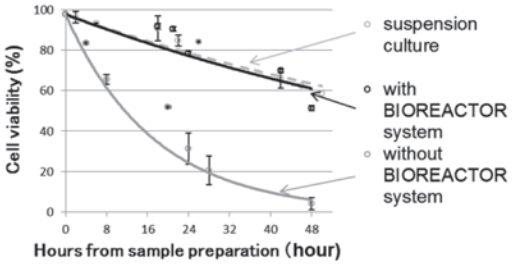


Figure 1. The viabilities of GB1-expressing sf9 cells in the NMR tube with (black) and without (grey) the BIOREACTOR system. The viability of suspension cultured cells (grey, dashed line) is also shown.

測定に関しては，以下のとおりである．2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQCについては，1つの2D NMR測定の所要時間が約2時間となるように各種パラメータを設定した．測定は測定開始後24時間の間繰り返し行った．3D ^{15}N-separated NOESY測定に関しては，non-linear samplingを用いて，64 (^{1}H) × 22 (^{15}N)複素ポイントのうち352ポイントを選択し，積算回数は64回で測定した．

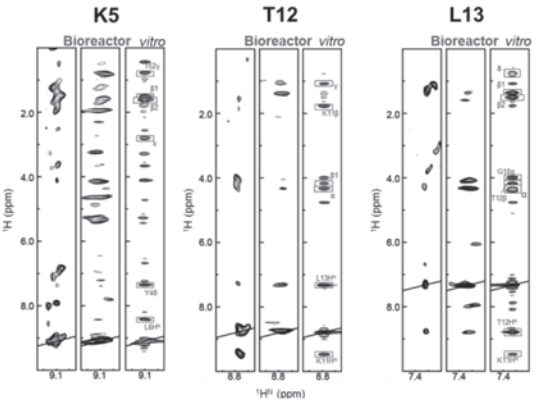


Figure 2. 3D ^{15}N-separated NOESY spectra of GB1 in sf9 cells. ^{1}H^{N}-^{1}H cross sections were extracted corresponding to the ^{15}N frequencies of the K5, T12 and L13 residues from in-cell NMR spectra measured without (left) and with (middle) the BIOREACTOR system, with comparing to the counterpart cross sections measured *in vitro* (right).

2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQCスペクトルに大きな経時的変化がなかったこと，またトリパンブルー染色によって測定した細胞試料の生存率が，24時間の測定後も約80%と良好であったこと(Figure 1)から，この条件で24時間程度の測定が可能と判断した．また3D ^{15}N-separated NOESYスペクトルについては，高分解能なNOEのピークが多数得られた(Figure 2)．

以上の結果から，長時間の測定が可能となったことで，良好な側鎖のスペクトルや他のNOESYスペクトルの測定が可能となることが考えられる．側鎖やNOEの解析に成功し，立体構造解析手法が確立したならば，細胞内環境による構造変化が期待される蛋白質試料への応用も考えていきたい．

References: [1] Kubo, S. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 1208-1211 (2013); [2] Selenko, P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11904-11909 (2006); [3] Sakai, T. et al. *J. Biomol. NMR* **36**, 179-188 (2006); [4] Inomata, K. et al. *Nature* **458**, 106-10(2009); [5] Ogino, S. et al. *J. Am. Chem.Soc.* **131**, 10834-10825 (2009); [6] Bertrand, K. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12798-12806 (2012); [7] Hamatsu, J. et al. *J.Am. Chem. Soc.* **135**, 1688-1691 (2013); [8] Banci, L. et al. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297-299 (2013).

P26

膜タンパク質ASRとの相互作用解析に向けたASRTのNMR解析

○比嘉一葉[1]，神谷昌克[1,2]，菊川峰志[1,2]，熊木康裕[3]，出村誠[1,2]，相沢智康[1,2]
[1]北海道大学大学院・生命科学院
[2]北海道大学大学院・先端生命科学研究院
[3]北海道大学大学院・理学研究院

NMR analysis of ASRT toward elucidation of the interaction between ASR and ASRT

○Kazuha Higa[1], Masakatsu Kamiya[1,2], Takashi Kikukawa[1,2], Yasuhiro Kumaki[3], Makoto Demura[1,2], and Tomoyasu Aizawa[1,2]
[1]Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
[2]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan
[3]Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

Anabaena sensory rhodopsin (ASR) and *Anabaena* sensory rhodopsin transducer (ASRT) were isolated from the freshwater cyanobacterium *Anabaena* PCC7120 in 2003. ASR is a photoactive membrane protein and ASRT is a soluble protein. It had supposed that ASRT mediates between the external photosignal from ASR and regulated genes in *Anabaena*. However, recent study was suggested that ASR regulate the gene expression by itself, therefore it is interesting to reveal the role of ASRT in the regulatory mechanism.

In this study, as a first step toward elucidating structural basis for the regulatory mechanism of gene expression by ASRT, we investigeted the structure and dynamics of ASRT by the solution NMR.

【緒言】

2003年、淡水に生息するシアノバクテリア*Anabaena*のゲノム上から261 kDaの光感受性膜タンパク質*Anabaena* sensory rhodopsin (ASR)と14 kDaの水溶性タンパク質*Anabaena* sensory rhodopsin transducer (ASRT)が発見された。その後の研究によって、ASRTはASRと相互作用することでASRの明暗順応やフォトサイクルの速度に影響を及ぼすこと、さらには色素タンパク質プロモーター領域(*cpc, pec*)や概日リズ

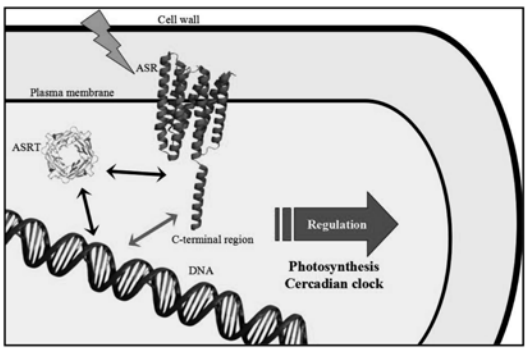


Fig. 1 Hypothetical model of the transcriptional regulation of the chromatic adaptive genes by ASR and ASRT

溶液NMR、タンパク質、分子動態

○ひが かずは、かみや まさかつ、きくかわ たかし、くまき やすひろ、でむら まこと、あいざわ ともやす

ム遺伝子(*kaiABC*)とも相互作用する事実が明らかになり、ASRTはASRから受け取った光シグナルを細胞内へ仲介することで、*Anabaena*の光合成や概日リズムの制御に関与していると考えられてきた。しかし、近年の研究でASRは細胞質側に伸びるC末端領域単独でゲノムDNAと相互作用し、転写制御を行うことが示唆されたため、膜タンパク質が関与する特殊な光転写制御機構におけるASRTの役割が注目されている(Fig. 1)。

本研究では、未だに不明瞭な点の多いASR-ASRT相互作用解明の前段階として、測定系やコンストラクトによるASRTの構造・分子動態変化について調べた。

【実験】

中でも特にタンパク質の発現・精製で広く用いられる His-tag がタンパク質の構造・分子動態に与える影響について調べるため、全長 ASRT の N 末端側に His 残基を 6 つ挿入したコンストラクト(Fig. 2 : N-His ASRT)、同じく C 末端側に挿入したコンストラクト(Fig. 2 : C-His ASRT)、さらに精製後に His-tag を切除できるように TEV protease 認識配列を挿入したコンストラクト(Fig. 2 : TEV-ASRT)を選択した。これらのコンストラクトのラベル体を作製し、TROSY スペクトルの比較検証を行った。

Fig. 2 ASRT constructs used in this study

【結果と考察】

N-His ASRT と C-His ASRT の TROSY スペクトルの比較を行った結果、大部分のピークに大きなシフトが見られ、C-His ASRT のスペクトルには N-His ASRT のスペクトルには見られないマイナーピークがいくつも見られた(Fig. 3)。さらに、より生理条件

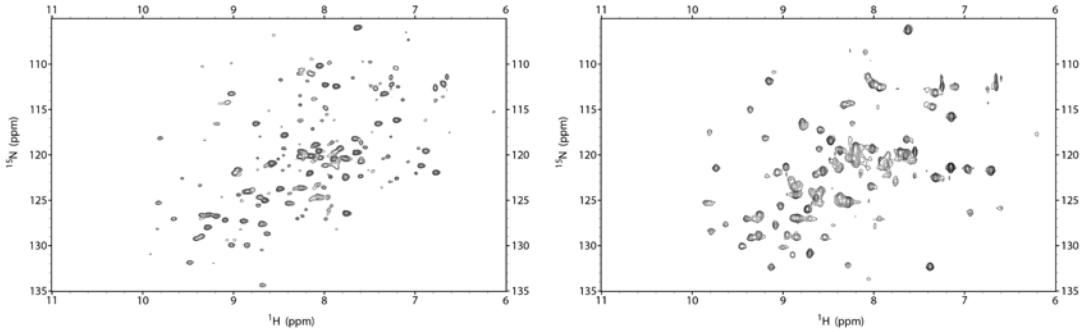


Fig. 3 ^{1}H-^{15}N TROSY spectra of C-His ASRT (left) and N-His ASRT (right)

に近い状態の TEV-ASRT の TROSY スペクトルにおいて、N-His ASRT とも C-His ASRT とも異なるピークがいくつか観測された。これらの違いは、His-tag を導入したことによる多量体構造の変化に起因するものと考えられる。結晶構造解析により、ASRT は対称性の高い四量体構造であることが明らかになっている。N-His ASRT は His-tag の影響を受けず対称性の高い安定した四量体構造を形成しているため、マイナーピークはほとんど観測されなかったが、C-His ASRT では、C 末端側に導入された His-tag が多量体界面に干渉し、多量体構造の揺らぎが生じた結果、対称性が損なわれたためにマイナーピークが現れたと考えられる。今後はさらに検証を進め、溶液中における ASRT の構造や動態について詳細を明らかにしていく。

P27

In-cell NMRを志向したDOTA-M8リガンドの合成研究

○彦根佑哉[1,2], 平井 剛[2], 袖岡幹子[2], 三島正規[1,3], 伊藤 隆[1,3]
[1]首都大学東京・大学院理工学研究科
[2]理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室
[3]CREST/JST

Synthetic study of DOTA-M8 lanthanide ligands for in-cell NMR

○Yuya Hikone[1,2], Go Hirai[2], Mikiko Sodeoka[2], Masaki Mishima[1,3], and Yutaka Ito[1,3]
[1]*Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University*
[2]*Synthetic Organic Chemistry Laboratory, RIKEN*
[3]*CREST/JST*

Paramagnetic effects such as pseudocontact shifts (PCSs) induced by lanthanide complexes conjugated with target proteins have been proven to be useful for structural analysis of proteins by solution NMR. Häussinger, D. *et al*. have reported that DOTA-M8 tags, which have an extremely rigid structure and very high-affinity to lanthanide, provide large PCSs. Despite of their advantages in PCS-NMR spectroscopy, the DOTA-M8 tags would dissociate from target proteins under reductive environments such as in cytosol, since they were designed to be conjugated with proteins by disulfide bonds.

In order to make DOTA-M8 tags applicable to in-cell NMR experiments, we designed new DOTA-M8 complexes. The details of synthesis and application to in-cell NMR experiments will be disclosed.

【序論】

蛋白質の溶液 NMR において, 目的蛋白質に常磁性ランタノイド錯体を連結することで, pseudocontact shifts (PCS) 等の常磁性効果を観測することができ, これを解析することで高精度な立体構造の決定が可能である. 常磁性プローブとしては, 蛋白質とジスルフィド結合を介して連結し, 大きな PCS を誘導する DOTA-M8 ランタノイド錯体 **1** が報告されている[(1)]. しかし, ジスルフィド結合は還元的環境で容易に切断されるため, 生細胞内で蛋白質の動態を観測する in-cell NMR への適用は困難と考えられた.

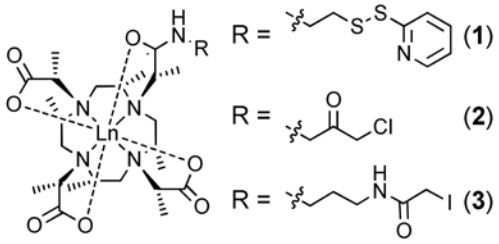


Fig 1. DOTA-M8 lanthanide complexes

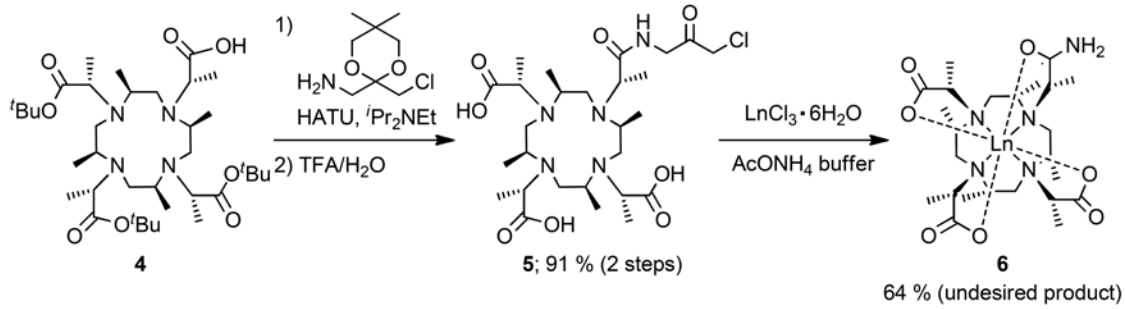
そこで本研究では, DOTA-M8 ランタノイド錯体 **1** を基盤として in-cell NMR に適用できる新規 DOTA-M8 錯体の創製を目的とした. 今回我々は, 還元条件下安定で, さらに蛋白質上のシステイン残基を介して連結できるクロロケトン体 **2**, ヨードアセトアミド体 **3** を設計し, これらの錯体の合成を検討した.

in-cell NMR, 常磁性効果, pseudocontact shift, DOTA-M8

○ひこねゆうや, ひらいごう, そでおかみきこ, みしままさき, いとうゆたか

【クロロケトン側鎖を有するリガンドへの錯形成反応】

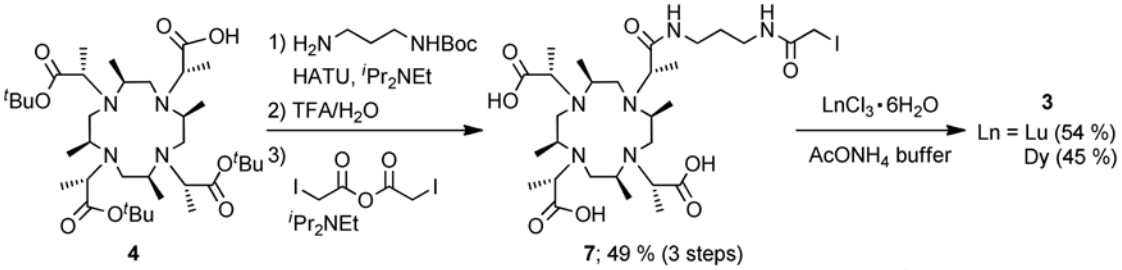
まず報告(1), (2)に従い，メチル基を導入したサイクレン誘導体 **4** を合成した（Scheme 1）．リンカーとなるアミンを縮合した後，酸性条件下 tert-ブチルエステルを加水分解し，クロロケトン側鎖を有するリガンド **5** へと導いた．これを酢酸アンモニウムバッファー中，ランタノイド塩と処理したところ，予想に反し目的のクロロケトン体 **2** を全く与えず，リンカーが切断されたアミド型錯体 **6** を得るのみであった．リンカーに α-ハロケトンを有するリガンドは錯体調製には適さないことが示唆されたため，このことから錯体 **2** の合成は困難であると判断した．



Scheme 1. Complex forming reaction of the chloroketone-type of DOTA-M8 ligand (5)

【ヨードアセトアミド体 **3** の合成】

そこでヨードアセトアミド基を有する錯体 **3** の合成を検討した（Scheme 2）．サイクレン誘導体 **4** のカルボン酸とリンカー部位となるジアミンを縮合した後，ヨードアセトアミド基を有するリガンド **7** へと導いた．これを先程同様に，バッファー溶液中過剰のランタノイド塩と処理した．反応時間を長くすると，一部ヨードアセトアミドの加水分解が見られたが，反応を短時間で終了し，HPLC で精製することで，目的とするヨードアセトアミド体 **3** を中程度の収率で得ることに成功した．



Scheme 2. Synthesis of the iodoacetamide-type of DOTA-M8 complexes (3)

【結論】

以上のように我々は，システイン残基と安定な共有結合を形成する，新規ヨードアセトアミド型 DOTA-M8 錯体の合成に成功した．本錯体によって生じる PCS を解析することで，高精度な蛋白質の立体構造解析が可能になると考えている．本討論会では，合成の詳細と，in-cell NMR への適用について報告したい．

【参考文献】

(1) Häussinger, D. *et al*. *J*. *Am*. *Chem*. *Soc*. **131**, 14761-14767 (2009).

(2) Ranganathan, R. S. *et al*. *Inorg*. *Chem*. **41**, 6846-6855 (2002).

P28

NMR structural analysis of ω-agatoxin IVA in lipid membranes

○Jae Ha Ryu, Ji Young Sim, Jae Ho Lee, Bonggyu Park, Jae Hyun Kim, Sang Hyun Kim, Hyun Jung Lim and Jae Il Kim

School of Life Sciences, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju, Republic of KOREA

Gating modifier toxins inhibit voltage-gated ion channels by binding to the voltage sensing domain of ion channels. ω-Agatoxin IVA, a peptide neurotoxin from spider venom, is a selective blocker of voltage gated P-type calcium channel(Cav2.1). Previously, we reported that gating modifier toxins partition into a lipid membrane by utilizing their surface hydrophobic patch. Although ω-agatoxin IVA acts as a gating modifier, however, the Cys-rich central region of the toxin does not show any surface hydrophobic profile. To further analyze structural features of ω-agatoxin IVA acting as a gating modifier, we here investigated the NMR solution structure of ω-agatoxin IVA in DPC micelles. Compared with the NMR structure in water, it is likely that the Cys-rich central region of ω-agatoxin IVA in micelles still retains the inhibitor cysteine knot motif with three short antiparallel β-strands. However, ^{15}N HSQC spectra of ω-agatoxin IVA in micelles revealed that toxin's C-terminal tail, together with several loops, radically changes upon binding with micelles. Interestingly, it is likely that the C-terminal tail of ω-agatoxin IVA takes the β-turn conformation in micelles, but not a disordered structure in water. Together, our results suggest that the membrane environment induces more stable structure in a flexible region of peptide toxin, correlating with its biological activity.

ω-Agatoxin IVA, NMR

P29 擬コンタクトシフト情報収集のための、種々のランタノイド結合タグの検討

○飯沼純弥[1], 金場哲平 [1], 小林彩保[1], 伊藤隆[1], 三島正規[1]
[1] 首都大・理工

Examination of various lanthanoid binding tag to collect information of Pseudo Contact Shift

○Junya Iinuma[1], Teppei Kanaba[1], Ayaho Kobayashi[1], Yutaka Ito[1], Masaki Mishima[1]
[1] Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo Japan.

Pseudo Contact Shift (PCS) caused by specifically attached lanthanoid tags provides useful structural information on NMR studies. Although a varieties of methods has been reported, there are advantages and drawbacks in each method. In this study, we evaluated the LBT, IDA, NTA, and DOTA-M8. So far, we successfully measured PCS using these methods. Especially, DOTA-M8, that causes large PCS, is a very attractive tag among them. However, minor peaks were observed in DOTA-M8 samples. We will discuss usability of lanthanoid tags such as DOTA-M8.

［序論］

NMR測定の際、ランタノイドを導入した化合物をタンパク質に結合させることで、ランタノイドによる擬コンタクトシフト(PCS)を観測し、そのシフト値から得られる立体構造情報を用いて構造解析を行う手法が知られている(1)(2)(3)(4)。タンパク質に結合させる化合物としては、ランタノイド結合ペプチドやDOTA-M8、NTA-SH tag、あるいはIDA-SH tagなどがあり、それぞれ固定化法やランタノイドとの親和性などに様々な特徴をもつ。NTA-SH tagやIDA-SH tagはランタノイドを特異的にキレートする化合物で、配位子が正しい配置をとる距離関係に注意する必要がある(1)(2)。また、DOTA-M8(Fig.1)は近年報告された化合物で、タンパク質とジスルフィド結合を介して結合し、大きなPCS値を与えることが知られている(3)。本研究では、これらの化合物とタンパク質の結合方法や測定条件の検討を行い、それぞれの化合物を用いた際の特徴や有効性を検証することを目的としている。

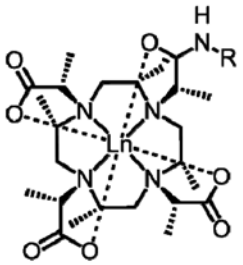


Fig.1 Structure of DOTA-M8
(*J. Am. Chem. Soc.*,2009, 131,14761-14767)

[参考文献]
(1) Yagi, H. et al. *J Biomol NMR* (2013) 55:157–166
(2) James D. Swarbrick et al. *Chem. Commun*, (2011),47,7368–7370
(3) Daniel.H et al. *J. Am. Chem. Soc*, (2009), 131, 14761–14767
(4) Saio T, et al. *J Biomol NMR*. (2010) 46:271-280

PCS, DOTA-M8,NTA-SH tag

○いいぬまじゅんや、かなばてっぺい、こばやしあやほ、いとうゆたか、みしままさき

［実験］

測定対象とする試料としてSPOCドメインとCHドメインを用いた。まずSPOCドメインにLBTタグを融合させ、HSQC測定を行った。CHドメインは内在のシステインをPCR法により変え、CHドメインのαヘリックス上表面に存在する残基をシステインに変えた変異体を数種類作製した。大腸菌の大量発現系を用いて培養・精製を行い、^{15}N同位体標識試料を調製した。ジスルフィド型DOTA-M8や、NTA-tagと反応させHSQC測定を行った。

[結果]

LBTタグを導入することによってPCSを観測することに成功した(Fig.2)。CHドメインにDOTA-M8を結合させた測定でもピークシフトが観測された(Fig.3)。

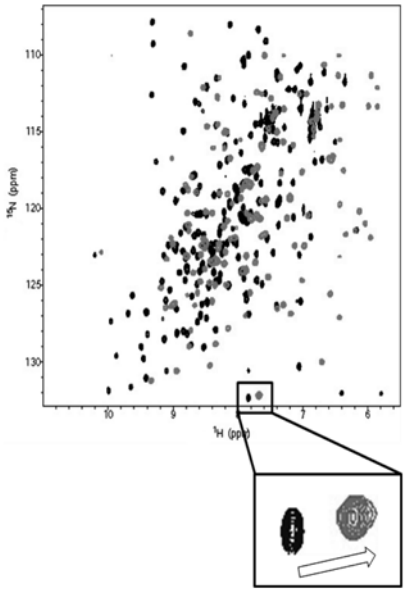


Fig.2
Overlay of SPOC mutant reacted with LBT-tag(La) and reacted with LBT-tag(Tb). Observed PCS by LBT-tag.

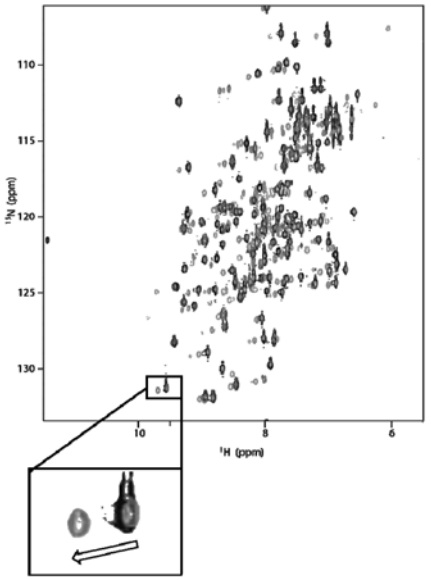


Fig.3
Overlay of NMR spectra of CH domain reacted with DOTA-M8(Lu) and reacted with DOTA-M8(Dy).

しかしながらDOTA-M8ではシフトしていない元のピークも観測された(Fig.3)。このことから、CH mutantとDOTA-M8の反応が完全に進行していないということ、あるいは反応後の立体構造が複数存在しているという可能性が推測された。そこで、陽イオン交換カラム(Mono-Sカラム)を用い2つのピークの分離、反応条件の検討、疎水面の周りを狙った変異体の導入等を現在行っている。

[謝辞]

DOTA-M8の合成は、彦根佑哉氏（首都大）、理化学研究所・平井剛博士、袖岡幹子博士によるものです。ここに感謝いたします。

P30

芳香族アミノ酸側鎖のダイナミクスによる蛋白質と蛋白質及び蛋白質とリガンド相互作用の観測

○楊 淳竣[1], 武田 光広[1], 宮ノ入 洋平[1], 寺内 勉[2], 甲斐荘 正恒[3]
[1]名大院・理 [2]SAILテクノロジーズ（株） [3]首都大院・理工

Protein-protein and Protein-ligand Interactions Revealed by the Side-chain Dynamics of Interfacial Aromatic Residues

○Chun-Jiun Yang[1], Mitsuhiro Takeda[1], Yohei Miyanoiri[1], Tsutomu Terauchi[2], and Masatsune Kainosho[3]
[1]*Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya*
[2]*SAIL Technologies Inc., Sagamihara*
[3]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Hachioji*

Aromatic amino acid residues located at the binding surfaces of proteins are often considered to play important roles in stabilizing specific protein-protein and protein-ligand interactions. However, it has been difficult to study the side-chain dynamics of the interfacial aromatic rings in protein complexes in detail by NMR, mainly due to the limited chemical shift dispersion and tight spin couplings of uniformly labeled aromatic rings. By virtue of the stereo-array isotope labeling (SAIL) approach, we have successfully obtained extremely simplified aromatic ring NMR signals even for large protein complexes, thus facilitating various data analyses. Here, we will report some of our recent results obtained using this strategy, including an antibody complex with a molecular weight as large as 40 kDa.

INTRODUCTION Proteins perform their biological functions *in vivo* by interacting with various other components through the side-chains of amino acid residues, which are essential for specific interactions. Aromatic amino acids, namely Phe, Tyr, and Trp, have bulky rings and frequently exist in the hydrophobic cores or binding pockets of proteins. Although the structural details of various interactions involving aromatic rings have been revealed by crystallographic analyses of protein-protein and protein-ligand complexes, the dynamic aspects of these interactions are not fully understood. One of the most remarkable findings obtained in early NMR studies of proteins in solution is that the aromatic rings of Phe and Tyr can rapidly flip around the two-fold axis, even though they are fully embedded in tightly packed hydrophobic protein cores. We have been interested in studying the ring flipping phenomena since they are related to the large-amplitude breathing motions of proteins, which can only be investigated by NMR spectroscopy. Although conventional NMR methods could not afford precise information for the aromatic ring flipping motions, due to the limited chemical shift dispersion and tight spin couplings for uniformly labeled aromatic rings, the stereo-array isotope labeling (SAIL) method provides unprecedented opportunities to investigate the ring flipping motions in protein-ligand and protein-protein complexes.

Relaxation-optimized SAIL method, protein-ligand interaction, aromatic side-chain dynamics

○やんちゅんじん，たけだみつひろ，みやのいりようへい，てらうちつとむ，かいのしょうまさつね

Antibodies are the main components of the mammalian immune system, in which they function to identify and neutralize non-self objects, and thus they are widely used in disease diagnosis and therapeutic applications. Antibodies recognize specific regions of their respective antigens, through their complementarity determining regions (CDR), which contain antigen binding loops at each tip of the Y-shaped antibodies. Although the full length antibodies are too large for an NMR investigation, the Fv fragment of an antibody, which is composed of one heavy chain (V_H) and one light chain (V_L), and is known to maintain the CDR loop with antigen binding ability, is suitable for NMR studies.

In this presentation, the Fv of antibody D1.3, which specifically binds to *hen* egg-white lysozyme (HEL), was used as a model to investigate the behavioral dynamics of the interfacial aromatic rings at the antigen binding site.

MATERIAL AND METHODS V_H and V_L were individually expressed as inclusion bodies, using an *E. coli* cellular expression system. The functional Fv was prepared by refolding the mixture of denatured V_H and V_L. This protocol allowed us to prepare Fv fragments composed of a V_H or V_L component selectively labeled with SAIL Phe or Tyr (Figure 1). Using the auxotrophic mutant of *E. coli*, we could prepare approximately 0.2 mM NMR sample solutions, by culturing the cells in 300 mL M9 medium supplemented with only 1 mg of SAIL Phe or Tyr. Therefore, the experiments were not expensive to perform. HEL was purchased from Wako and purified by gel-filtration chromatography.

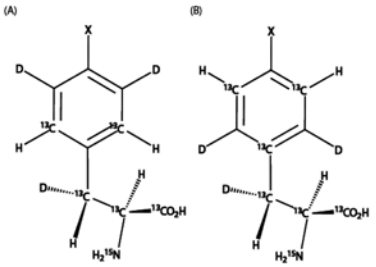


Fig. 1 δ-SAIL (A) and ε-SAIL (B) Phe/Tyr. X = H, Phe; X = OH, Tyr

RESULTS AND DISCUSSION The aromatic rings of the Phe or Tyr residues flip about the C_β-C_γ axis at various rates, which depend on the micro environment for each residue. Since the magnetic environments for two δ or ε ^1H-^{13}C pairs are, in principle, substantially different from each other, they might appear as two discrete pairs with different chemical shifts for each pair, if the flipping rates are slower than the inverse of the chemical shift differences. Therefore, the line-shapes of the NMR signals for the δ and ε signals afford information about the ring flipping rates. We successfully measured the ^1H-^{13}C HSQC spectra for the aromatic region at various temperatures for the Fv fragments, composed of a V_H or V_L chain selectively labeled with either δ- or ε-SAIL Phe/Tyr, for the free and HEL-bound states. Upon HEL binding, significant line broadenings were observed for a few residues located in the antigen binding interface of the V_L and V_H chains. Although the assignment of these residues has not been completed yet, the preliminary data clearly prove that the SAIL method will allow us to obtain detailed information for the large-amplitude motions in the protein-protein interfaces of protein-protein complexes as large as 40 kDa.

Acknowledgement
This work is supported by the grant Plateform for Drug Discovery, Informatics, and Structural Life Science from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT).

P31

常磁性緩和促進を利用したDNA結合ドメインSTPRの分子ダイナミクスの解析

○柚原光佑[1]，神谷昌克[2]，熊木康裕[3]，滝谷重治[3]，菊川峰志[2]，河野敬一[2,4]，出村誠[2]，相沢智康[2]
[1]北海道大学・生命科学院
[2]北海道大学・先端生命科学研究院
[3]北海道大学・理学研究院
[4]千歳科学技術大学

Molecular dynamics of DNA binding domain STPR proved by paramagnetic relaxation enhancement.

○Kosuke Yuhara[1], Masakatsu Kamiya[2] Yasuhiro Kumaki[3], Shigeharu Takiya[3], Takashi Kikukawa[2], Keiichi Kawano[2,4], Makoto Demura[2], and Tomoyasu Aizawa[2]
[1]Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
[2]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University
[3]Faculty of Science, Hokkaido University
[4]Chitose Institute of Science and Technology

STPR domain is a novel DNA binding motif originally identified as a DNA binding domain of FMBP-1, which is a transcription factor of silk protein fibroin. This motif has a characteristic repeat structure and found in wide spectrum of eucaryotes. CD and other spectroscopic experiments showed that STPR domain is intrinsically disordered in DNA-free state and DNA binding induces a conformational change into a more rigid structure. However, the detail of its binding process remains almost unknown due to the lack of information at the atomic level about structure and dynamics of STPR domain. Here, we used paramagnetic relaxation enhancement (PRE). We measured the intramolecular contacts from PRE experiments and constructed a structural model.

■背景

STPRドメインは、カイコの転写因子FMBP-1のDNA結合ドメインとして近年見出された新規のDNA結合モチーフであり、真核生物に広く存在することが知られている。また、STPRドメインのアミノ酸配列は非常に相同性の高いリピート構造であり、このように特徴的な構造は、他のDNA結合モチーフには例がない(Fig. 1)。円偏光二色性(CD)やX線小角散乱(SAXS)等を用いた先行研究により、STPRドメインはDNA非結合状態ではフレキシブルな構造であるが、DNAとの結合に伴ってαヘリックス構造が誘起され、リジッドな複合体を形成することが明らかになった。

Fig. 1 Amino acid sequence of STPR domain

PRE，転写因子，タンパク質

○ゆはらこうすけ，かみやまさかつ，くまきやすひろ，たきやしげはる，きくかわたかし，かわのけいいち，でむらまこと，あいざわともやす

しかし、原子分解能での構造やダイナミクスに関する情報はほとんど存在せず、STPRドメインの構造およびDNAとの相互作用機構の詳細は不明である。そこで私たちは、常磁性緩和促進（PRE）を用いてSTPRドメインの分子内相互作用を調べることにより、STPRドメインの構造やダイナミクスの推定を行った。

■実験

STPRドメインの各リピートにシステインを導入した変異体をそれぞれ作成し、システイン側鎖に常磁性タグ（MTSL）を導入した。つづいて^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定し、その信号強度を調べた。また試料にアスコルビン酸ナトリウムを加えてMTSLを還元したものを、反磁性タグが導入されたコントロールとして用いた。常磁性タグ、反磁性タグが導入されたSTPRドメインのNMR信号強度の比から、常磁性タグとアミドプロトンの距離を計算することで、構造を推測した。

■結果・考察

常磁性タグを導入してPREを観測した結果、常磁性タグを導入したリピートとは別のリピートでもNMR信号強度の低下が見られた(Fig. 2,3)。この結果は、DNAと結合していないSTPRドメインが、フレキシブルな構造でありながらも分子内相互作用によって何らかの三次構造をとっている可能性を示している。このような構造の揺らぎが、DNAとの結合において重要な役割を果たしているのかもしれない。詳細な構造やDNA認識機構については、今後さらに定量的なデータ解析を行うことで明らかにしたいと考えている。

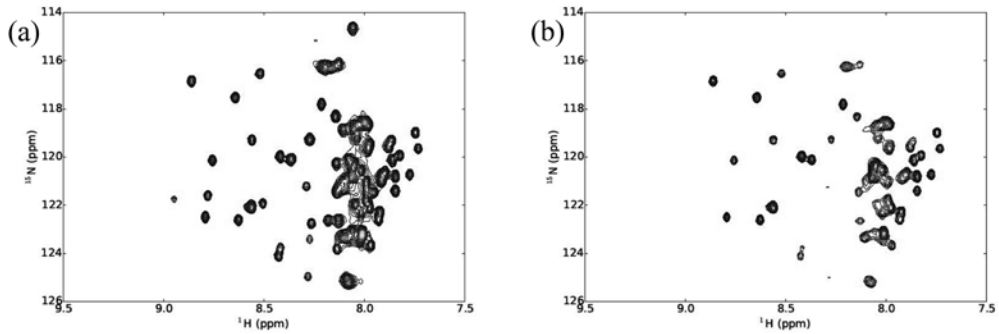


Fig. 2 ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of MTSL-tagged R31C mutant in DNA free state without (a) and with (b) sodium ascorbate at 293K and pH 7.

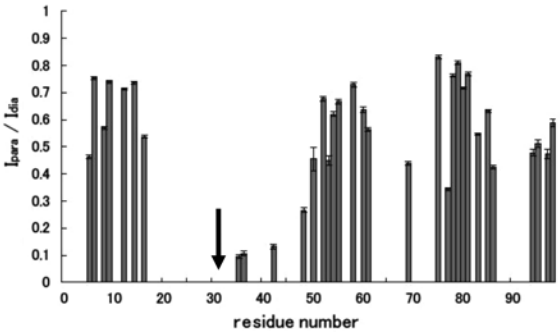


Fig. 3 Relative peak intensity of amide cross-peaks of R31C mutant. Arrow shows spin label position.

P32

ガリウム置換フェレドキシンの結晶構造とPSIおよびFNRとの相互作用解析

○武藤　梨沙[1], 村木　則文[1], 河合（久保田）　寿子[1], 長谷　俊治[1], 池上　貴久[1], 栗栖　源嗣[1]
[1]阪大・蛋白研

NMR analysis of Ga-substituted Ferredoxin and its interaction sites with Photosystem I and Ferredoxin-NADP$^+$ reductase

○Risa Mutoh[1], Norifumi Muraki[1], Hisako Kawai-Kubota[1], Toshiharu Hase[1], Takahisa Ikegami[1], Genji Kurisu[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

Plant-type ferredoxin (Fd) is an electron transfer protein with a [2Fe-2S] cluster, mediating one-electron from photosystem I (PSI) to several Fd-dependent enzymes such as Ferredoxin-NADP$^+$ reductase (FNR). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has also been applied to the study of Fd and Fd-dependent enzyme complexes. In NMR analyses of the interaction between Fd and Fd-dependent enzymes, Gallium-substituted Fd (Ga-Fd) has been used due to the paramagnetic properties of [2Fe-2S] cluster. To know whether Ga-Fd can be used as a replacement of native Fd, we solved the crystal structure of Ga-Fd at 1.6-Å resolution. We confirmed the comparable binding affinities of native-Fd and Ga-Fd using an FNR immobilized column. We measured and assigned NMR spectra of both Fds, and observed the chemical shift perturbation between Fd and PSI, and Fd and FNR.

酸素発生型の光合成を行う植物とシアノバクテリアには、光エネルギーを化学エネルギーへと変換する膜蛋白質複合体、光化学系 II と光化学系 I が存在する。この 2 つの光化学系内部では光励起による電荷分離反応が起こっており、2 つの光化学系が直列に繋がり 2 段階で光励起されることにより、非常に高い還元力を獲得している。チラコイド膜上で起こるこの一連の電荷移動反応は、光合成電子伝達とよばれる。光化学系 II（PSII）において水を分解して得られた電子は、光還元されプラストキノン（PQ）を還元する。還元状態の PQ は電子とプロトンをシトクロム（Cyt）b_6f 複合体へと伝達し、葉緑体チラコイド膜内のプロトンの濃度勾配を形成する。ここで形成されたプロトン濃度勾配をつかって ATP 合成酵素により ATP が合成される。チラコイド膜上の電子

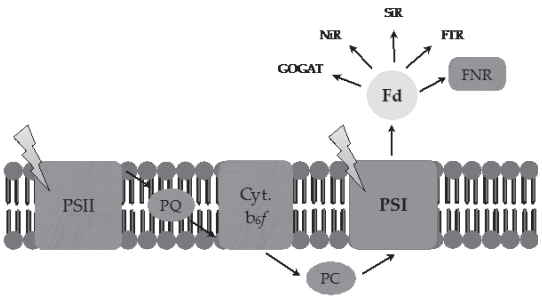


Fig. 1 光合成電子伝達系

Ga-substituted Fd, Photosynthesis

○むとう　りさ、むらき　のりふみ、かわい（くぼた）　ひさこ、はせ　としはる、いけがみ　たかひさ、くりす　げんじ

は、Cyt b_6f複合体から光化学系I（PSI）へと伝達され、光により再励起されて最終的に電子伝達蛋白質フェレドキシン（Fd）へと伝えられる（Fig. 1）。Fdへと伝わった還元力は多くのフェレドキシン依存性酵素へと分配され、有機物の合成に必須な還元同化反応を駆動している。

Fdは約10 kDaと小さく、蛋白質間相互作用をNMRで解析するのに向いている。しかし、Fdは鉄硫黄クラスターを保持しているため、鉄周辺のNMRシグナルを観測することはできないので、最も重要な活性中心付近の情報が何も得られない。そこで、この常磁性の鉄を非常磁性の金属に変えることでFdの完璧な情報を得ることを目的にアナログのFdとしてガリウムFd（Ga-Fd）を作製した。まず、Ga-Fdとnative Fdの構造比較のために、Ga-Fdの結晶化を行った。その結果、native Fdの[2Fe-2S]クラスターは、[2Ga-2S]クラスターになっており、両者の構造はほぼ同じであった（Fig. 2）。native Fdはクラスターといくつかの主鎖の間で水素結合を形成している。この水素結合ネットワークはGa-Fdでも維持されており、Ga-Fdが他の蛋白質と相互作用するのに大きな構造変化の影響がないと示唆された。

Fig. 2 Ga-Fd (黒)とNative Fd（灰色）のC^{α}主鎖骨格

次に、native FdとGa-Fdの結合能の差を確認するために、FNR-affinity クロマトグラフィーカラムを作製した。塩濃度を50から500 mMまで徐々に上げていくと、native FdとGa-Fdはほぼ同じ塩濃度で溶出され、物理的活性は同じであった。また、^{15}N標識したGa-FdをPSIまたはFNRと反応させて、HSQCを測定した。[^{15}N] native FdおよびGa-Fdの帰属を行い、Fd上のPSIまたはFNR相互作用部位を同定した。相互作用部位はクラスター周辺に集まっており、Ga-Fdを用いることで相互作用に重要なアミノ酸残基を同定することができた。以上の結果より、Ga-Fdは物理的活性および生理的活性ともにnative Fdと同じ活性を示した。従って、Ga-Fdは分子認識能を維持しており、native Fdの代替として相互作用解析に有用であると言える。

P33 電気穿孔法を用いた in-cell NMR 法の検討

○榎園能章[1]、猪股晃介[2]、白川昌宏[3]、杤尾豪人[1]
[1]京都大院・理、[2]理化学研究所、[3]京都大院・工

Electroporation of protein transduction to human cells for in-cell NMR

○Yoshiaki Enokizono[1], Kohsuke Inomata[2], Masahiro Shirakawa[3], Hidehito Tochio[1]
[1] *Graduate School of Science, Kyoto University, Japan.*
[2]*RIKEN,* [3]*Graduate School of Engineering, Kyoto University, Japan.*

In-cell NMR spectroscopy is an approach to observe the functions, conformations, dynamics and interactions of target proteins in living mammalian cells. The effective introduction of isotopically enriched proteins into mammalian cells has been an issue in recent development of in-cell NMR experiments.

Electroporation is widely used to achieve plasmid transfection and drug delivery into mammalian cells. In this study, a mutated ubiquitin, as a model protein, was introduced to check the performance of protein transduction with the capillary electroporation system in human cells. The cell viability were higher than 70% in HeLa cells. Finally, the obtained NMR spectra from in-cell NMR experiments on the electroporated cells exhibited sufficient quality worth investigating the conformations and dynamics of target proteins in HeLa cells.

【緒言】

In-cell NMR 法は、細胞内環境を保ったまま、その中の特定のタンパク質を非侵襲的に NMR 測定し､その相互作用や構造･ダイナミクスを詳細に解析する手法である。真核細胞の in-cell NMR では、細胞内への安定同位体標識タンパク質の導入には、マイクロインジェクションや膜透過性ペプチド、SLO 処理などが用いられてきた。しかしながら安定同位体標識されたタンパク質を細胞内に導入するために多量のタンパク質を必要とし、煩雑な工程を含む非効率な点がまだ課題として挙げられる。ところで、電気穿孔法は、接着細胞や浮遊細胞などの区別なくまとまった数の細胞に対して同時に核酸や薬剤を細胞内に導入する手法として広く活用されており、スケールアップも容易である。そのため、多くのタンパク質にとって簡便な細胞内導入手法となる可能性がある。今回、電気穿孔法を用いて観測タンパク質の生細胞内への直接導入法を検討したので報告する。

【実験・結果】

In-cell NMR実験に適した細胞として取り扱いが容易で接着性の良いHeLa細胞株を用いた。そして、電気穿孔法に各メーカーのエレクトロポレーター―を試した。最適化プロトコールの検討は、細胞の高生存率を維持しながらタンパク質導入量が最大とな

in-cell NMR, electroporation, protein transduction

○えのきぞのよしあき、いのまたこうすけ、しらかわまさひろ、とちおひでひと

る条件を目指し、エレクトロポレータの電気パルスの強度(V)、時間(msec)およびパルスの回数の最適化を行った。懸濁した2.0 x 10^6のHeLa細胞（100 μL）に^{15}N安定同位体標識ユビキチン変異体(終濃度1 mM)を加えて電気パルス（パルス条件：1200-1900 V, 10-30 msec, 1-2回）を与え、電気パルスのダメージから細胞を回復させるために3時間接着培養を行った。この操作を繰り返すことで、総細胞数2.4 x 10^7 からうち42-74% (1.0 – 1.71 x 10^7 cells)の生細胞を回収することに成功した。

この時回収された細胞の1D-[^{1}H,^{15}N]-SOFAST-HMQCスペクトルを測定したところ、解析に十分な質（0.7時間で、S/N比61.4 – 69.5）のスペクトルが得られた。また、細胞内におけるユビキチン変異体の2D-[^{1}H,^{15}N]-SOFAST-HMQCスペクトル（Figure 1, in right）を、細胞破砕液中で測定したユビキチン変異体のスペクトル（Figure 1, in left）と比較したところ、シグナル全体の顕著な広幅化が見られた。加えて、数は少ないながらも幾つかのシグナルにおいて化学シフトの差異が観測された。

【結論・展望】

ユビキチン変異体で細胞内導入条件を検討したところ、電気穿孔法を用いて短時間で簡便にタンパク質を生細胞内に導入できることが確認された。また、1 時間程度の in-cell NMR 測定によって、詳細な解析を行うのに十分な S/N 比の NMR シグナルを得ることに成功した。さらに、ユビキチン変異体の in-cell NMR 測定において生細胞内という特異な環境の影響を受けて幾つかのシグナルに化学シフト摂動変化があることも明らかとなった。

本手法の拡張性であるが、分子量や電荷の差異など個々のタンパク質の性質に応じて導入パラメータの調整が求められるかもしれない。現在、上記に示した最適化プロトコールを参考にして、種々のタンパク質、細胞で検討を進めている。発表時には、ユビキチン変異体以外の複数のタンパク質についても電気穿孔法を用いた in-cell NMR の詳細を報告する予定である。

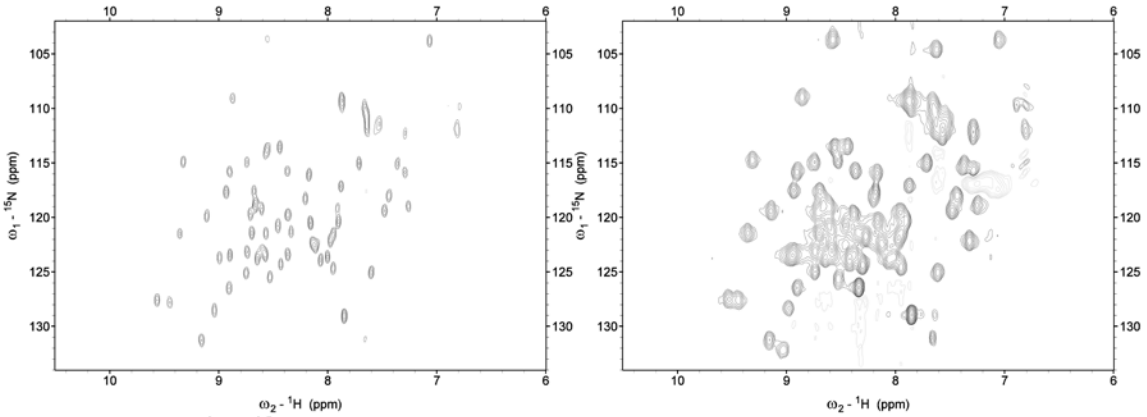


Figure 1. 2D-[^{1}H, ^{15}N]-SOFAST-HMQC spectra of a mutated Ubiquitin in cell lysate(left) and in HeLa cells(right).

P34

Poly(*β-n*-propyl L-aspartate)のヘリックスセンスと側鎖構造の相関

○小林哲雄[1], 古屋秀峰[2], 大川浩作[3], 平沖敏文[1]
[1]北大院工
[2]東工大院理工
[3]信州大繊維

The correlation between the helix-sense and the side-chain conformation of poly(*β-n*- propyl L-aspartate)

○Kobayashi Tetsuo[1], Furuya Hidemine[2], Ohkawa Kousaku[3] and Hiraoki Toshifumi[1]
[1]Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, Japan
[2]Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Meguro, Japan.
[3]Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Japan.

The correlation between the helix-sense inversion and the side-chain conformation of poly(*β-n*-propyl L-[3R-$^2H_1$] aspartate) in both solution- and solid-states was investigated by NMR spectroscopy. In both states, several signals were distinctly observed as corresponding to the right- and the left-handed helices. In the solution state, the side-chain conformations (χ_1, χ_4) are suggested to be (T and G^-, G^+) for the right-handed helix and (G^-, G^+) for the left-handed one from the results of ROESY spectra. In the solid state, internal rotational angle χ_1 along the side-chain are deduced to be G^+ for the right-handed helix and T for the left-handed one from the results of the ^{1}H DQ MAS spectra.

〈緒言〉 Poly(*β-n*- propyl L-aspartate)(PnPLA) は溶液中および固体中でαヘリックス構造を取り、温度に依存してそのヘリックスセンスが変化する[1)]。ラセン反転による ^{1}H-、^{13}C-NMR スペクトルへの影響は主鎖シグナルだけでなく側鎖シグナルにも及ぶ。特にβ位メチレン水素シグナルは立体的に非等価なため、右巻きと左巻きのシグナルが重なり帰属が困難である。本研究ではPnPLA の側鎖β_R位を選択的に重水素化し溶液および固体状態におけるヘリックスセンスと側鎖構造との相関を調べた。

〈実験〉 Poly(*β*-benzyl L-[3R-$^2H_1$] aspartate) と*n*-PrOH のエステル交換反応により目的の試料(PnPLA-d1)を得た。測定は主に21.6T NMR 装置で行った。溶液状態のラセン反転についてはPnPLA-d1/$CDCl_3$ 溶液の^{1}H NMR スペクトルの温度依存性を測定した。固体については、合成した

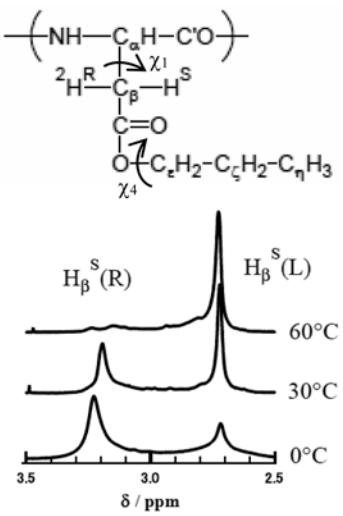


Fig.1 Temperature dependent ^{1}H NMR spectra of a $H_\beta{}^S$ resonance of PnPLA-d1.

poly(*β-n*- propyl L-aspartate), helix-sense inversion, side-chain conformation

○こばやし てつお，ふるや ひでみね，おおかわ こうさく，ひらおき としふみ

PnPLA-d1 を真空ドライオーブンにより130°C で1時間アニールした後、^{1}H MAS 測定を行った。

〈結果と考察〉

1. 溶液状態におけるヘリックスセンスと側鎖

側鎖$H\beta^R$ の重水素化によって$H\beta^S$ の右巻きと左巻きのシグナルは明瞭に分離し、NHシグナルの強度の温度依存性との対応からFig.1のように帰属できた。また、超高磁場によるきわめて高い分解能から、ラセン反転によって全てのシグナルの線形が変化した。特に主鎖Hαと側鎖Hεについては左巻きと右巻きのシグナルが分離して観測された（Fig.2）。そこで ROESY 測定を行い相関シグナルの強度から各水素間距離情報を得て、それぞれのヘリックスセンスにおける側鎖コンフォメーションを考察した。その結果χ_1周りについて右巻きではT とG$^-$ が混在しており、左巻きではほぼG$^-$ であることが示唆された。またχ_4 周りについてはどちらのヘリックスもG$^-$ であることがわかった。

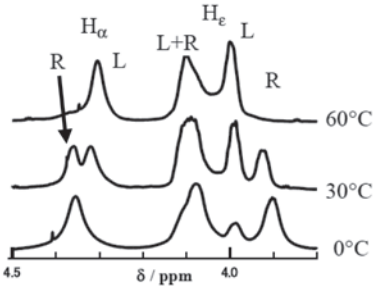


Fig.2 Temperature dependent 920MHz ^{1}H NMR spectra of Hα and Hε resonances of PnPLA-d1.

2. 固体状態におけるヘリックスセンスと側鎖

固体 PnPLA-d1 の ^{13}C CP/MAS スペクトルを Fig.3 に示す。熱処理によって一部らせん反転が進み、主鎖 Cα と C′ および側鎖 Cγ については右巻きシグナルと左巻きシグナルが分離して観測された。また、Cα の左巻きシグナルと Cη はダブレットになっており、系に複数の左巻き構造が存在することを示している。

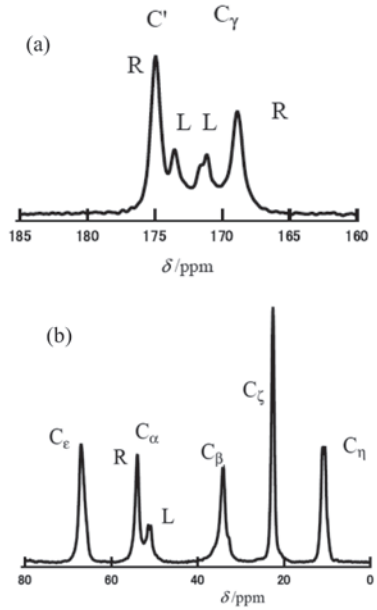


Fig.3 ^{13}C CP/MAS spectra of the solid state PnPLA-d1. (a) Cγ and C′ resonances (b) other resonances.

側鎖のコンフォメーションを調べるために^{1}H-^{1}H 間距離情報が得られる^{1}H DQ MAS スペクトルを測定し、Fig.4 に示す。Hα とHζ、Hα とHη の間に相関が観測された。DQ MASスペクトルにおいて4 Å 以内に存在する核間に相関が現れるため、これらの相関の存在から、ある特定のコンフォメーションをとっていることが示唆された。また$H\beta^S$ とHα、$H\beta^S$ とNHの間にも相関が観測された。それらの相関強度を用いてχ_1周りのコンフォメーションを考察したところ、右巻きでG$^-$、左巻きでT であることが予想された。

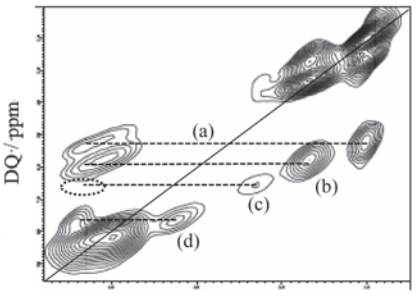


Fig.4 ^{1}H DQ MAS spectrum of the solid state PnPLA-d1. The correlations between (a) Hα - Hη (b) Hα - Hζ (c) Hα - $H\beta^S$(L) (d) Hα - $H\beta^S$(R) were observed.

〈謝辞〉 21.6T でのNMR 測定は文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業(分子・物質合成）の支援により分子科学研究所で実施された。

1) Bradbury, E.M., *et al.*; Biopolymers, **6**, 1579-1603(1968)

P35 ポリプロピレン溶液の対流速度の測定

○松原康史[1,2]
[1]日本ポリケム株式会社　研究開発部
[2]三菱化学株式会社　開発研究所

Measurement of Convection Rate in Polypropylene Solution

○Koshi Matsubara[1,2]
[1]*Research and Development Division, Japan Polychem Corporation*
[2]*R&D Center, Mitsubishi Chemical Corporation*

The rate of convection flow in an NMR tube was measured for an *o*-dichlorobenzene/bromobenzene=4/1(v/v) mixed solvent and its 13% polypropylene solution under a variety of experimental conditions. A pulsed field gradient double-stimulated-echo sequence was used to separate the effects of convection from those of diffusion and relaxation. Dissolution of polypropylene in the mixed solvent significantly reduced the convection rate, however, the maximum velocity for 13% polypropylene solution in a standard 10-mm tube at 110 °C and higher temperature was more than 1 mm/s even though the gas flow rate through the temperature regulator was 1070 L/h.

構造材料として幅広く使用されるポリプロピレンを溶解するには100℃以上を必要とする場合が多い。そして高温ではNMR試料管中で生じる上下方向の温度勾配により溶液が対流する。温度勾配によってスペクトルの分解能がそれほど影響されなくても、誘起される対流はコヒーレンス選択に磁場勾配パルスを用いる実験のシグナルを減少させる。同じ理由で、磁場勾配パルスを使ったイメージングによる分解能調整法が意図どおりに動作しない場合がある。さらに、拡散係数を測定する実験では対流の影響が直接付加され、誤差となる。

典型的な実験条件でどの程度の対流が起きているのか？

LoeningとKeelerの方法[1]によりNMR試料管中での対流速度を測定した。この方法では磁場勾配パルスを使うdouble-stimulated-echoで2つの混合時間の和を一定とし、2つの混合時間の差を逐次変えることにより、拡散および緩和によるシグナル減少効果とは分離して対流によるシグナル減少効果のみを観測する。対流が層流で、$-V_{max}$からV_{max}の範囲で速度分布が一定と仮定すれば、2つの混合時間の差に対するシグナル強度変化はsinc関数となり、実験データをフィッティングすることにより最大速度V_{max}を得ることができる。

10mmφプローブを装着したBruker BioSpin製AVANCE III NMR分光計を用いて対流速度を測定した。試料は*o*-ジクロロベンゼン/ブロモベンゼン-d_5＝4/1（v/v）混合溶媒あるいはその13%ポリプロピレン溶液、NMR試料管は標準5mmφ、標準10mmφあるいはシゲミ製10mmφ対称形ミクロ試料管とした。混合溶媒の液の高さは20あるいは42mm、

対流，ポリプロピレン

○ まつばらこうし

13%ポリプロピレン溶液の高さは50㎜であった。温度は30から130℃、温度制御用のガス流量は400から1070L/hの範囲で変えた。

Fig. 1(a)に示すように10㎜φ試料管に入れた13%ポリプロピレン溶液では120℃で温度制御用のガス流量を上げるほど対流速度が減少し、流量1070L/hで速度1.4㎜/sであった。ガス流量が大きいほど試料の上下方向の温度差が小さくなり、対流速度が減少したと推定できる。Fig. 1(b)に示すようにすべての試料に対して対流速度は温度とともに増加した。混合溶媒の高さを半分にすると対流速度は半分になった（◇と△）。試料管を10㎜φから5㎜φにすると対流速度は1.5㎜/s程度減少した（◇と○）。110から130℃の範囲で13%ポリプロピレン溶液の対流速度は混合溶媒の半分であった（◇と◆）。

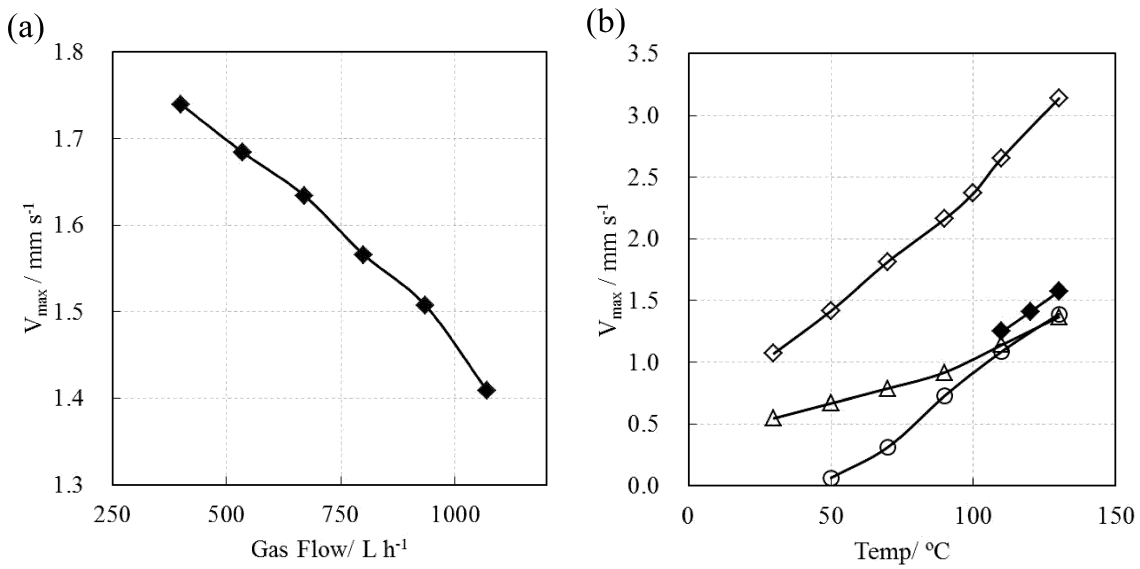


Fig. 1. (a) Relationship between maximum convection velocity and gas flow rate through the temperature regulator for a 13% polypropylene solution in a standard 10-mm tube with a solution depth of 50 mm at 120 °C. (b) Relationships between maximum convection velocities and temperature for different combinations of NMR tube and solution. The open diamonds are for an *o*-dichlorobenzene/bromobenzene-d_5=4/1(v/v) mixed solvent in a standard 10-mm tube with a liquid depth of 42 mm, the open triangles are for the solvent in a 10-mm Shigemi symmetrical microtube with a liquid depth of 20 mm, the open circles are for the solvent in a standard 5-mm tube with a liquid depth of 42 mm, and the filled diamonds are for the 13% polypropylene solution in the standard 10-mm tube. Gas flow rate was 1070 L/h.

参考文献

[1] N. M. Loening and J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1999**, *139*, 334－341.

P36

Nafionの水アルコール混合溶媒中の分散状態解析への^{19}F-NMRスペクトルおよび高速磁場サイクリングNMR測定の適用

○山口真[1],松永拓郎[2],雨宮一樹[3],大平昭博[1,4],長谷川直樹[2],
篠原和彦[1,5],安藤雅樹[3],吉田利彦[3]
[1]技術研究組合FC-Cubic,[2]豊田中研,[3]トヨタ自動車,[4]産総研,
[5]日産自動車

Application of ^{19}F-NMR spectroscopy and fast field cycling NMR for Nafion dispersion in water-alcohol mixtures

○Makoto Yamaguchi[1], Takuro Matsunaga[2], Kazuki Amemiya[3], Akihiro Ohira[1,4],
Naoki Hasegawa[2], Kazuhiko Shinohara[1,5], Masaki Ando[3], and Toshihiko Yoshida[3]
[1]Fuel Cell Cutting-edge Research Center, Tokyo, Japan.
[2]Toyota Central R&D Labs, Inc., Aichi, Japan.
[3]Higashifuji Technical Center, Toyota Motor Corporation, Shizuoka, Japan.
[4]Research Institute for Ubiquitous Energy Devices, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Osaka, Japan.
[5]Nissan Research Center, Nissan Motor Company, Kanagawa, Japan.

^{19}F-NMR of Nafion dispersed in water/1-propanol and water/ethanol were measured to study structural changes and molecular motions with solvent composition. ^{19}F-NMR spectra of Nafion® showed motional narrowing of the side chain peaks facilitated by hydrophobic interaction of alkyl groups and perfluorinated backbones. Frequency dependence of spin-lattice relaxation rate obeyed power law which is explained by the defect diffusion model of rigid polymer chains, which is consistent with the dispersion of cylindrical particles of Nafion® derived from fitting of the SAXS profiles.

【背景と目的】固体高分子形燃料電池の膜電極複合体（Membrane Electrode Assembly : MEA）の電極となる触媒層は、炭素微粒子上に担持された白金触媒とアイオノマーから構成され、材料の選択や成膜方法によって発電特性が大きく変化することから、燃料電池の発電性能向上の鍵となると考えられ、各企業が精力的に研究開発を進めている。しかし、複雑な内部構造の解析や諸特性の評価に適用可能な手法が限られており、電解質膜や触媒と比較しても研究開発が試行錯誤的とならざるを得ない状況であることから、我々は現在、触媒層の構造や特性の解析に有効な手法の検討に取り組んでいる。

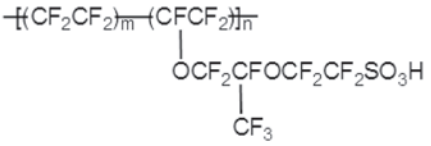


Fig. 1 Structural formula of Nafion®

Nafion, ^{19}F-NMR, 高速磁場サイクリングNMR

○やまぐちまこと，まつながたくろう，あめみやかずき，おおひらあきひろ，はせがわなおき，しのはらかずひこ，あんどうまさき，よしだとしひこ

触媒層は触媒粒子とアイオノマーを極性溶媒に分散した触媒インクを用いて作製され、インク中でのアイオノマーの分散状態および触媒粒子との相互作用が触媒層の性能に影響を与えると考えられる。Nafion®などのフッ素系アイオノマーは、極性溶媒中では半径が約2nm、長さ数十nmの棒状の凝集体として分散していることが小角散乱から示唆されていたが、最近の小角中性子散乱やTEM観察からは、溶媒の種類や組成によってはサブμmの凝集構造が形成される可能性が指摘されている。また、動的光散乱（DLS）で観測される遅い成分から換算された流体力学的半径はμmに達しており、棒状の凝集体のサイズと対応しないなど、実験結果の相互関係が自明でない。

これまでの研究では、特定の長さのスケールに対応した分析手法のみが用いられる場合が大半であったことから、我々は小角X線散乱（SAXS）とDLSによる構造情報に加えて、^{19}F-NMRのスペクトルおよびスピン格子緩和速度（$R_1=1/T_1$）周波数依存性を測定し、高分子鎖の溶媒和に伴う運動性の変化に関する情報を得ることで、触媒インクの調製に用いられる水アルコール混合溶媒中でのNafion®の分散状態に対する溶媒組成の影響を多面的に検討した。

【実験方法】試料はNafion®（DuPont D2020, EW1100）の水/1-プロパノールおよび水/エタノール分散液（濃度30g/L）である。^{19}F-NMRスペクトル測定は日本電子ECA-500で行った。FFC-NMR測定はStelar社SpinMaster2000を用いた。分極磁場（Larmor周波数27.5MHz、1s）を印加して縦磁化を生成し、磁場強度を下げて縦緩和を起こした後、再び磁場を上げて（17.3MHz）90度RFパルスを印加してFIDを検出する。これを緩和磁場の印加時間を変えて繰り返すことでR_1を求め、さらに緩和磁場強度を変えて測定を行った。

【結果と考察】SAXSプロファイルは従来の極性溶媒溶液の結果と同様に棒状の散乱体を仮定した形状因子でフィッティング可能で、その半径はアルコール分率の増加に伴い減少したが、同じ影響をもたらす分率は1-プロパノールの方が小さい。Fig.2に示すR_1の周波数プロファイルはいずれもべき乗則に従い、溶液中で剛直な主鎖構造が維持されていることを示唆し、SAXSからの描像と整合的である。また、両対数プロットの傾きはアルコール分率の増加に伴い減少しており、アルコールによる選択的溶媒和に伴う側鎖の運動性の変化を反映したものと推測されるが、これは^{19}F- NMRスペクトルで側鎖のピークが先鋭化していることと対応している。

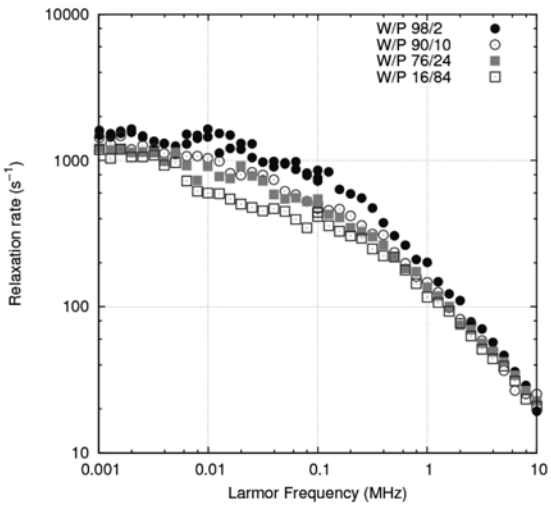


Fig. 2 ^{19}F Spin-Lattice Relaxation Rate of Nafion® dispersed in water/1-propanol with different molar ratio

【謝辞】本発表の一部は、経済産業省資源エネルギー庁及び独立行政法人新エネルギー・産業技術相合開発機構の技術開発委託事業「固体高分子形燃料電池実用化推進技術開発/MEA材料の構造・反応・物質移動解析」により実施したものである。

P37 STD-NMRを用いたα-シクロデキストリンと水分子の相互作用解析

○児玉　尚士[1]，中野　隆行[1]，木村　一雄[1]，川口　謙[1]
[1]株式会社　東レリサーチセンター

The analysis of interaction between α-Cyclodextrin and water molecules using STD-NMR

○Hisashi Kodama[1] , Takayuki Nakano[1], Kazuo Kimura[1], and Ken Kawaguchi[1]
[1]*Toray Research Center, Inc.*

In order to confirm whether STD-NMR (Saturation Transfer Difference – NMR) technique is useful for the study of an interaction between polymer material and water molecule, we analyze the interaction between α-Cyclodextrin and water molecules using STD-NMR. The present results suggest that water interacts to the one side of α-Cyclodextrin. Some α-Cyclodextrins included a compound will be also analyzed and discussed.

我々は、医薬品のスクリーニングに用いられている STD-NMR（Saturation Transfer Difference - NMR）を用いて、親水性ポリマーと水の相互作用解析を行っている（Figure 1）。医薬品のスクリーニングでは、事前飽和パルスをタンパク質由来シグナルに照射し飽和させる。低分子がタンパク質と相互作用すると飽和した磁化が移動し、低分子のシグナル強度が減衰することから、タンパク質-低分子間の相互作用を解析することができる。親水性ポリマーでは、事前飽和パルスを水に照射し、親水性ポリマーのシグナル強度の減衰の度合いを解析することで、親水性ポリマーと水の相互作用解析を行った。

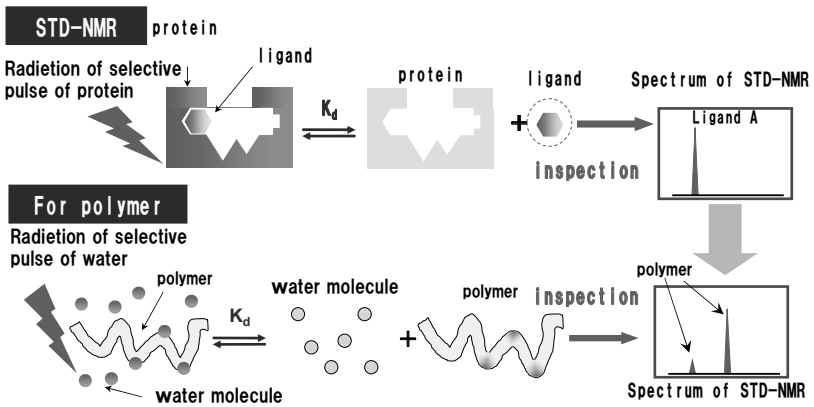


Figure 1 Schematic representation of STD-NMR experiments. Upper: the STD-NMR diagram for ligand screening. Lower: the experiment to detect the interaction between polymer material and water molecules.

相互作用解析，ポリマー，STD-NMR

○こだま　ひさし，なかの　たかゆき，きむら　かずお，かわぐち　けん

本ポスターでは、医薬品のスクリーニングで用いられている STD-NMR を用いて親水性ポリマーと水の相互作用解析を行うに当たり、以下の点についてパルスシークエンスを変更した（Figure 2）。

(1) 親水性ポリマーのシグナルを消去、もしくは減衰させる恐れのある $T_{1\rho}$ filter を使用しない。

(2) 親水性ポリマーは、医薬品の候補化合物と比べて Spin Diffusion が早いと予測されることから、選択励起時間を長くしない。

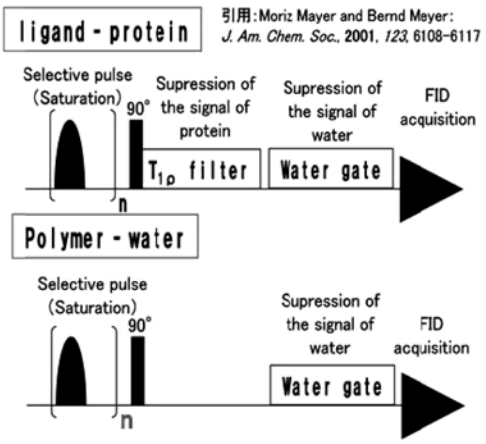


Figure 2 Pulse sequences using STD-NMR experiments. Upper: the pulse sequence for ligand screening. Lower: the pulse sequence using in this study. $T_{1\rho}$ filter is eliminated from ordinary one. Short selective saturation pulse is applied to avoid spin diffusion effect.

このようにして作られたパルスシーケンスにより得られた STD-NMR スペクトルが親水性ポリマーと水分子の相互作用によるものかを確かめるために、シクロデキストリンの一種である α-シクロデキストリンと水について、STD-NMR を測定し(Figure 3)、相互作用解析を行った。現在の解析結果からは、α-シクロデキストリンの片側に水分子と相互作用していると考えている。

シクロデキストリンは、環状オリゴ糖であり、包接能を有する化合物の一種であり、外部は親水性で、内部は疎水性であるという特異的な構造をとっている。

また、内部に化合物を包接した X 結晶構造なども多数報告されている。α-シクロデキストリンは、親水性ポリマーとしては低分子であるが、既に構造及び親水性、疎水性について多くの知見があることから、STD-NMR による親水性ポリマーと水分子の相互作用解析結果の妥当性を検証できると考えた。

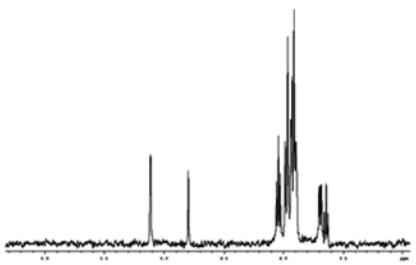


Figure 3 Water saturated STD-NMR spectrum of α-Cyclodextrin

本ポスターでは、α-シクロデキストリンで化合物を包接したものとしていないものについて、水シグナルを照射した STD-NMR スペクトルを比較し、STD-NMR による α-シクロデキストリンと水分子の相互作用解析結果の妥当性について議論したい。

P38 多核NMR法による高分子電解質の対イオン結合平衡における疎水性相互作用の観測

○ 牧 秀志・吉田将喜・成相裕之・水畑 穣
神戸大学大学院・工学研究科

Multinuclear NMR Studies on the Counterion Binding to Weakly Acidic and Basic Polyelectrolytes by Hydrophobic Interaction

○Hideshi Maki, Katsuyoshi Yoshida, Hiroyuki Nariai, Minoru Mizuhata
Graduate School of Engineering, Kobe University, Hyogo, Japan

^{23}Na, ^{35}Cl, ^{81}Br and ^{87}Rb NMR techniques have been applied in order to clarify the counterion bindings equilibria to negatively charged and positively charged polyions. Na^+ and Rb^+ ion bindings to weakly acidic polymers (polyacrylate acid) and Cl^- and Br^- ion bindings to weakly basic polymers (poly(N-vinylimidazole) and polyallyamine) were used as examples. It has been revealed that 1) Even though slight interaction has been detected between Rb^+ ion to polyacrylic acid which the degree of dissociation of the polyacids(α) is 0, and Na^+ ion start to bind to polyacrylate acid at a certain point of α = 0.35, whose linear charge density corresponds to the Bjerrum length. 2) Both NMR chemical shifts and relaxation rates of ^{35}Cl and ^{81}Br nuclei changed gradually with α showing no discontinuous change. 3) Hydrophobic interactions have been observed in the Cl^- and Br^- ion bindings to poly(N-vinylimidazole) and Rb^+ ion binding to polyacrylate acid.

【緒言】

弱塩基性高分子電解質、および弱酸性高分子電解質の水溶液内相互作用の本質を理解することはタンパク質などの生体高分子の機能を研究する上で大変重要であり、これまで様々な分野において研究がなされてきた。水溶液中の高分子電解質は、多数のイオン基が高分子骨格上に固定された構造を有しており、高分子骨格近傍に強大な静電場を形成する。このため対イオンは引きつけられ、共通イオンは排除される。これは単純電解質とは大きく異なる性質である[1)]。ハロゲン核やアルカリ金属核等の四極子核の緩和は核近傍の電場環境の変化に非常に敏感であるため、高分子電解質－対イオン間の相互作用について有用な情報を与える。本研究では高分子電解質の対イオン結合平衡における相互作用の本質を明らかにするため、代表的な弱塩基性および弱酸性高分子電解質であるポリアリルアミン (PAAm)とポリアクリル酸（PAA）の対イオン間相互作用を^{23}Na, ^{35}Cl, ^{81}Br, ^{87}Rb NMR法を用いて観測した。またPAAmと比較して高い疎水性を持つポリビニルイミダゾール (PVIm)においても同様の実験を行い、高分子電解質の対イオン間相互作用に与える高分子電解質の疎水性の影響を観測した。

【実験方法】

弱塩基性高分子電解質の場合、0.10 equiv·L^{-1} NaPAAm又はNaPVIm＋0.10 mol·L^{-1} NaCl又はNaBr水溶液を調整し、さらに式(1)に基づき、NaOH水溶液を添加して高分子電解質の解離度αを調整した。

$$\alpha = \frac{\left\{C_{\mathrm{MOH}} \cdot V_{\mathrm{MOH}} + ([\mathrm{H}^+] - K_{\mathrm{W}}/[\mathrm{H}^+]) \cdot (V_0 + V_{\mathrm{MOH}})\right\}}{C_{\mathrm{P}} \cdot V_0} \qquad (1)$$

多核NMR, 疎水性相互作用, 高分子電解質

○まき ひでし, よしだ かつよし, なりあい ひろゆき, みずはた みのる

ここでC_{MOH}およびV_{MOH}はそれぞれ添加したアルカリの濃度および体積を表し、またC_pは高分子電解質のイオン基の総濃度を表す。弱酸性高分子電解質の場合、0.10 equiv·L^{-1} NaPAA＋0.10 mol·L^{-1} NaCl又はRbCl水溶液を調整後、1.0 mol·L^{-1} NaOH又はRbOH水溶液にて中和後、式(2)に基づき、HCl水溶液を添加してαを調整した。

$$\alpha = \frac{\left\{C_{HCl}\cdot V_{HCl} + ([H^+] - K_W/[H^+])\cdot(V_0 + V_{HCl})\right\}}{C_P \cdot V_0} \qquad (2)$$

C_{HCl}およびV_{HCl}はそれぞれ添加した酸の濃度および体積を表す。α = 0～1の範囲の11ポイントで^{23}Na, ^{35}Cl, ^{81}Br, ^{87}Rb NMRの化学シフトおよびR_1, R_2緩和測定を行った。

【結果と考察】

弱酸性高分子電解質である PAAm と PVIm 水溶液の ^{35}Cl および ^{81}Br NMR における R_1, R_2 の高分子電解質解離度α依存性を Fig. 1 に示した。いずれの溶液系においても、αが 0 に近づくにつれて R_1, R_2 が共に増加している。これは、高分子電解質のもつ電場が強大になるに従って、高分子電解質-対イオン間の静電的相互作用が強くなり、その結果分子の自由な運動が束縛されることで回転相関時間が増加し、緩和速度が速くなるためである。またαが 0 に近づくにつれて、低磁場シフトが観測される（Fig.2）。これは、対イオンー高分子電解質間の相互作用の増大に従って、対イオンの負電荷が高分子電解質近傍の正電場に引きつけられ、電荷中和が発生し、核近傍の電荷密度が減少して遮蔽が弱くなるためであると考えられる。一方、α=1 においては、高分子電解質はほぼ完全にプロトネーションしており対イオンとの間に静電的相互作用が存在しないため、対イオンは全て遊離であると考えられる。しかし実際にはα=1 における R_1, R_2 は基準物質である NaCl および KBr 水溶液の値よりも大きく、ケミカルシフトがほぼ低磁場することが分かった。このことは高分子電解質と対イオン間の相互作用において、静電的相互作用以外の相互作用が存在していることを示唆している。以上の傾向は Cl^-<Br^-かつ PAAm<PVIm であり、対イオンと高分子電解質の疎水性の序列と一致していることから、この相互作用は疎水性相互作用であると考えられる。

従来、高分子電解質と対イオン間の相互作用は、高分子電解質の持つ強大な静電場による静電的相互作用が主要因であるとされてきたが、本研究により、高分子電解質と対イオン間の相互作用における疎水性相互作用の重要性が明らかとなった。

【引用文献】

1) J. A. Marinsky, *Cood. Chemi. Rev.*, 1976, **19**, 125.

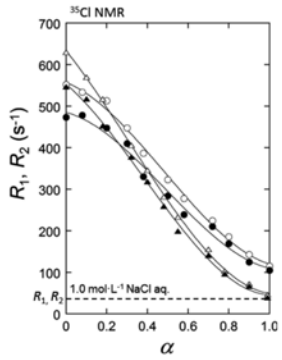


Fig. 1 Degree of neutralization dependence of ^{35}Cl (left) and ^{81}Br (right) longitudinal and transverse NMR relaxation rates of PAAm and PVIm aqueous solutions. Filled; R_1; open; R_2. (△,▲) PAAm; (○,●) PVIm.

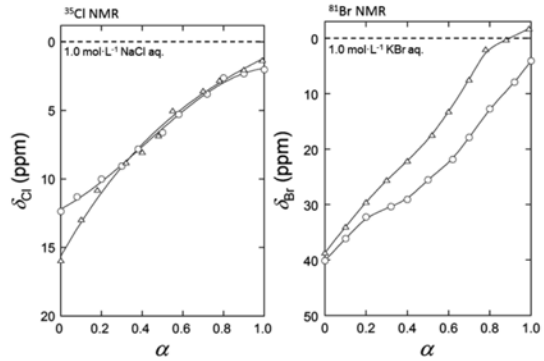


Fig. 2 Degree of neutralization dependence of ^{35}Cl (left) and ^{81}Br (right) NMR chemical shifts of PAAm and PVIm aqueous solutions. (△) PAAm; (○) PVIm.

P39

同種核 REDOR NMR 法の新展開

○鄭 智海[1]，櫻木 隆弘[1]，桑原 大介[2]
1: 電通大 情報理工学研究科，2: 電通大 研究設備センター

Advanced study for homonuclear REDOR NMR experiments

Chikai Tei[1], Takahiro Sakuragi[1], Daisuke Kuwahara[2]
1: Faculty of Informatics and Engineering, UEC (The University of Electro-Communications)
2: Coordinated Center for UEC Research Facilities, UEC

We have used a simple rotational-echo double resonance technique for homonuclear spins (HN-REDOR) as a means of determining the location of C_{60} molecules included in graphite sheets. In this study, we calculated the average Hamiltonians for the HN-REDOR technique by dividing the evolution period, t_e, into four periods. On the basis of the average Hamiltonians and exact numerical calculations for the REDOR echo reductions, it was found that the REDOR echo reductions were independent of the chemical-shift difference, δ, under a simple condition of $\kappa = \delta / \omega_r \geq 6$ and $t_e < 10 \cdot (1/d)$, where ω_r is the sample spinning frequency and d is the dipolar coupling constant (the simple condition is called the master condition in this study). In addition, we found that multiple-quantum filtered HN-REDOR experiments were feasible with an adequate phase cycling for the receiver and the Gaussian pulses other than the last Gaussian pulse.

1. 緒言

最近，三浦らは膨潤化したグラファイトの層間にC_{60}を封入した試料と グラファイトの層間にC_{70}を封入した試料（C_{60}-Gs，C_{70}-Gs）の合成に成功し，C_{60}-Gsについて，超低摩擦となることを明らかにした [1]．我々は C_{60}-Gsに関してフラーレンのグラファイト層間封入を確認するため，シンプルな同種核REDOR NMR法（HN-REDOR）を考案し（Fig.1），その性能についての検証を行ってきた．昨年度は，観測スピン横磁化の発展期間t_eが一般的な形$(n+1)T_r$となる場合の，REDOR減衰の理論式を導出することを目標として研究を行った．そのために，発展期間t_eを4つの期間に分けて，各期間の平均ハミルトニアンの導出を行った．

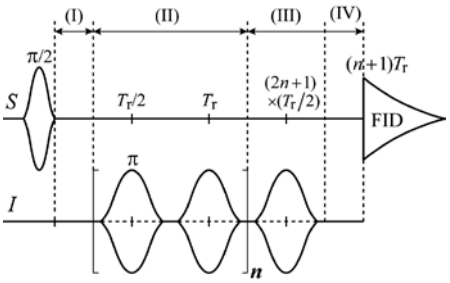


Figure 1.
Homonuclear REDOR (HN-REDOR) pulse sequence.

本研究では，同種核REDOR法の“正確な理論的記述”を完成させる過程において明らかとなった，REDOR減衰が化学シフト差δに依存しない条件，即ち『同種核REDOR法に対するmaster condition』を発表する．

キーワード：同種核，REDOR，二量子遷移

○てい ちかい，さくらぎ たかひろ，くわはら だいすけ

さらに，レシーバとGaussian pulsesについて簡単な位相回しを行うことにより，「multiple-quantum filtered HN-REDOR」の実験が実現できることについても紹介する．また非観測核の選択的反転にDANTEパルス系列を使用した同種核REDOR NMR法については，会場にて検証結果の発表を行う．

2. 同種核REDOR法の master condition

昨年度の研究の中で，Fig.1 の 4 つの区間(I)～(IV)における平均ハミルトニアンを計算し，ハミルトニアン各項の係数値を数値計算した結果，“$\kappa = \delta / \omega_r \geq 6$”（$\delta$ ：I, S の化学シフト差，ω_r ：試料回転周波数）の条件において

$$\overline{\mathcal{H}_d^{(\mathrm{X})}} \cong \Omega_{zz}^{(\mathrm{X})} 2I_z S_z \ \ (\mathrm{X=I, or\ IV})$$

$$\overline{\mathcal{H}_d^{(\mathrm{X})}} \cong \Omega_{zz}^{(\mathrm{X})} 2I_z S_z + \Omega_{yz}^{(\mathrm{X})} 2I_y S_z \ \ (\mathrm{X=II, or\ III})$$

という形に書けることがわかった．今年度は様々な双極子結合定数 d に対して，κ と t_e を変化させて，REDOR 減衰量の計算を行った．Fig.2(a) は d=2,000Hz を使って計算した REDOR 減衰量を，2(b)は d=1,200Hz を使って計算した REDOR 減衰量を示している．計算には $\kappa \geq 6$ の 4 種類の異なる κ を用いた（マーカの違いは κ の違いを表す）．Fig.2(a)では t_e =5ms (=10×1/2,000Hz)を境にして，また Fig.2(b)では t_e ≈8ms (=10×1/1,200Hz)を境にして，REDOR 減衰曲線が κ の違いによってばらついていることがわかる．これらの結果とその他の d に対する結果から，HN-REDOR の REDOR 減衰は『$\kappa \geq 6$，$t_e < 10 \cdot (1/d)$ の条件下で δ に依存しない（異種核 REDOR のエコー減衰のような振る舞いを示す）』ということが明らかになった．本研究では上記の条件を **master condition** と名付けた．

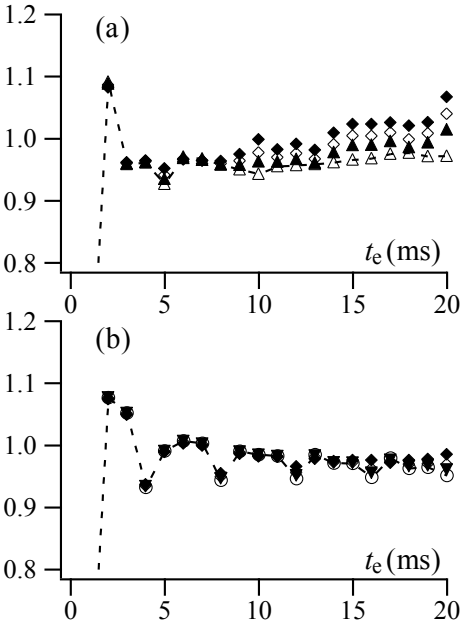


Figure 2.
Calculated plot of the echo reductions for the HN-REDOR experiments as a function of the ratio κ.

3. multiple-quantum filtered HN-REDOR

本研究では，Fig.1の4つの区間に対する平均ハミルトニアンを使って HN-REDORのエコー減衰を表す解析式を導いた．エコー減衰の解析式を検証した結果，Fig.1パスル系列最後のGaussian pulseの位相を固定し，その他のpulsesとreceiverに適切な位相回しを施すことのより，MQ coherence由来のREDOR信号を検出できることが明らかになった．

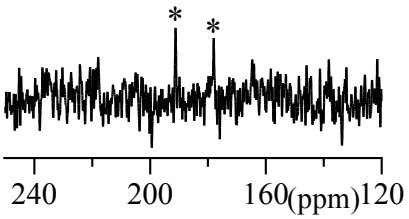


Figure 3. Experimental NMR spectrum for fully 13C-labeled *L*-alanine measured by zero-quantum filtered HN- REDOR technique. The asterisks show the COOH resonance.

[1] N. Sasaki and K. Miura, Jpn. J. Appl. Phys. 43, 4486 (2004).

P40

磁場配向微結晶粉末を用いた単結晶NMR測定

○木全美香子，久住亮介，木村史子，木村恒久
京大院農

Single-crystal NMR measurement by using magnetically oriented microcrystal array

○Mikako Kimata, Ryosuke Kusumi, Fumiko Kimura, and Tsunehisa Kimura
Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan.

The single-crystal NMR measurement is a powerful method for determination of chemical shift tensor. However, this method requires a large single crystal. We use a MOMA (magnetically oriented microcrystal array) instead of a large single crystal to obtain single-crystal NMR data from a microcrystalline powder. A MOMA is a single-crystal-like composite in which microcrystals are three-dimensionally aligned by using a frequency-modulated rotating magnetic field. To achieve a high orientation of microcrystals, a frequency-modulated rotating magnetic field should be well tuned. In addition, a matrix resin should be appropriately chosen so that peaks due the resin do not overlap the microcrystal peaks under investigation. In this study, we report the improved MOMA NMR measurement and the usefulness of this method for determination of chemical shift tensors.

1. 諸言

化学シフトテンソルは原子の電子分布を反映するため，化学シフトテンソルの評価を通じて核の周囲の局所構造に関する知見を得ることができる．化学シフトテンソルの主値と主軸の両者を完全に決定することができる手法として単結晶NMR法が挙げられるが[1-2]，この手法を利用するにはある程度の大きさの単結晶が必要である．このため，大きな単結晶を得ることが困難な生体高分子・有機物・無機物において単結晶NMR法の適用は困難となる．

そこで，当研究室ではこれまでに単結晶の代わりになり得る試料として擬単結晶を作製し，単結晶NMR法への適用を試みてきた[3]．擬単結晶とは，特殊磁場を用いて微結晶を媒体中で3次元配向させた上で，媒体を固化して得られる複合材料である[4]．二軸性結晶においては，磁化率テンソルの主値が3つとも異なる（$0>\chi_1>\chi_2>\chi_3$）．このため，静磁場下では磁化容易軸（χ_1軸）が静磁場方向に一軸配向し（Fig. 1(a)），回転磁場下では磁化困難軸（χ_3軸）が回転面と垂直な方向に一軸配向する（Fig. 1(b)）．これら静磁場と回転磁場の概念を組み合わせた周波数変調型の回転磁場を印加すると，χ_1軸とχ_3軸の同時配向（3次元配向）が可能となる（Fig. 1(c)）[5]．UV硬化樹脂プレカーサー中にて微結晶粉末を3次元配向させた後，UVを照射して媒体を固化させることで擬単結晶が得られる．これまでに，L-アラニン擬単結晶においてカルボキシル炭素とメチル炭素の化学シフトテンソルの決定に成功している[3]．

磁場配向，単結晶NMR法，化学シフトテンソル

○きまた みかこ，くすみ りょうすけ，きむら ふみこ，きむら つねひさ

本研究では磁場の印加条件の最適化や配向固定用の媒体の再検討を行い，擬単結晶を用いた化学シフトテンソル決定手法のさらなる高精度化を試みた．

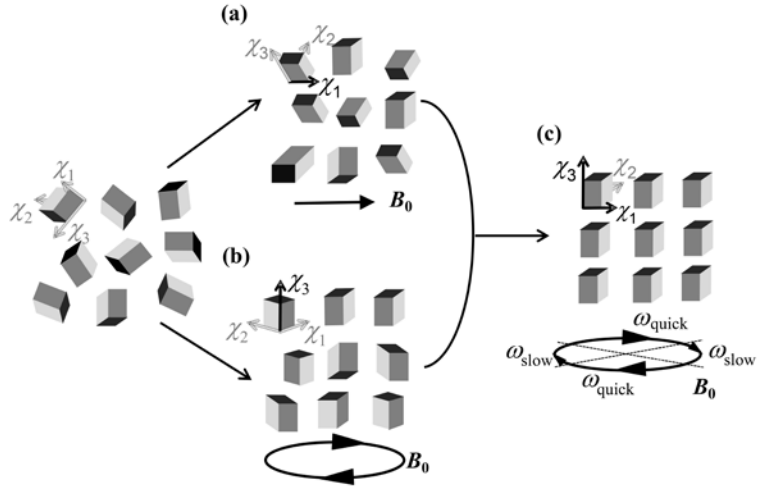


Fig. 1 Scheme of magnetic alignment of biaxial microcrystals under (a) static, (b) rotating, and (c) frequency-modulated rotating magnetic fields.

2. 実験

メノウ乳鉢ですりつぶしたL-トレオニンの微結晶粉末をUV硬化樹脂プレカーサーに分散させ，約30 wt%のL-トレオニン/ UV硬化樹脂プレカーサー懸濁液を調製した．この際，^{13}C固体NMRの測定時に媒体由来の共鳴ピークがL-トレオニン由来の共鳴ピークと重複しないよう，シリコーン系のUV硬化樹脂プレカーサーを選択した．得られた懸濁液に周波数変調型の回転磁場(8 T)を印加して微結晶を3次元配向させた後，UV照射により配向を固定した．なお，磁場の印加条件は微結晶の配向ゆらぎを考慮したシミュレーションにより最適化を行った．最適化された磁場の印加条件をFig. 2に示す．得られた擬単結晶をX線回折測定に供し，L-トレオニン微結晶の擬単結晶化の成否を確認した．測定にはリガク(株)製 R-AXIS RAPID IIを使用し，線源にはCuKαを用いた．

擬単結晶の^{13}C固体NMRスペクトル解析には，日本電子(株)製 JNM CMX-300 Infinityを使用した．擬単結晶をMASの回転軸とχ_1軸が平行となるようMASプローブに挿入した．$B_0\chi_1$面と$\chi_3\chi_1$面のなす角をψとして(Fig. 3)，MASなしの条件下で10°毎に測定を行い，ψ=0°–180°までψの異なる^{13}C固体NMRスペクトルを集積した．

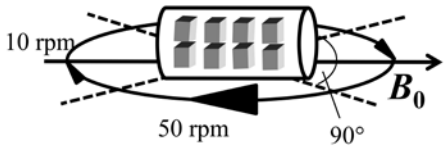


Fig. 2 Scheme of frequency-modulated rotating magnetic field.

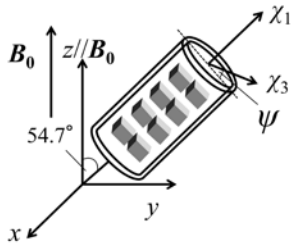


Fig. 3 Experimental set up for the MOMA NMR measurement.

3. 結果と考察

得られたL-トレオニン擬単結晶のX線回折図をFig. 4に示す．いずれの回折図においてもスポットが見られ，微結晶の3次元配向が確認できた．配向の程度を表す方位角方向の半価幅はいずれの面においても約1.0°であったことから，微結晶が精密に3次元配向した擬単結晶の作製に成功したといえる．

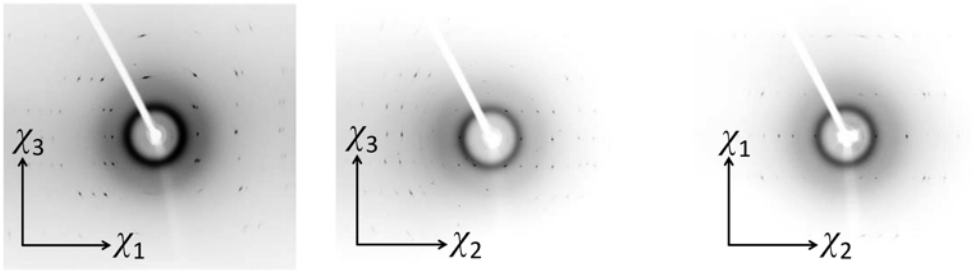


Fig. 4 X-ray diffraction patterns of L-threonine MOMA measured from three different directions.

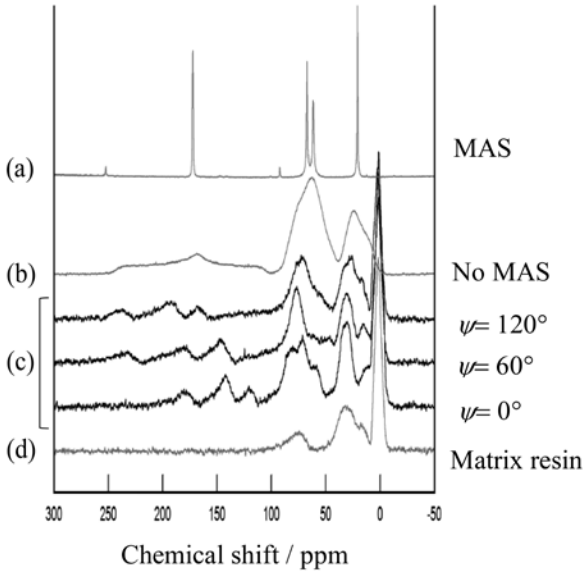


Fig. 5 ^{13}C NMR spectra of L-threonine obtained from (a) a powder sample with MAS at 6.0 kHz, (b) a powder sample without MAS, (c) the MOMA sample without MAS, and (d) the matrix resin

得られたL-トレオニン擬単結晶の^{13}CNMRスペクトルをFig. 5(c)に示す．MASなしの粉末スペクトル（Fig. 5(b)）に比べ，鋭いピークが見られた．また，角度ψの変化に伴うピーク位置の変動も見られた．このことから，擬単結晶からでも単結晶と同様に結晶内における分子の配向を反映したスペクトルが得られることを確認できた．また，シリコーン系のUV硬化樹脂（Fig. 5(d)）ではカルボキシル炭素の化学シフト値が変動する領域（120 ppm–240 ppm）に共鳴ピークが発現しないため，カルボキシル炭素由来のピークの発現位置を正確に読み取れることが確認できた．

以下ではカルボキシル炭素に関して解析を行い，化学シフトテンソルを決定した．角度ψ 毎に得られた化学シフト値に対して，以下の理論式$\delta_{\mathrm{lab}}(\psi)$を用いてフィッティングを行った．

$$\delta_{\mathrm{lab}}(\psi) = \mathbf{R}_3\mathbf{R}_2\mathbf{R}_1\delta_{\mathrm{p}}\mathbf{R}_1^{-1}\mathbf{R}_2^{-1}\mathbf{R}_3^{-1} \qquad (1)$$

$\delta_{\mathrm{lab}}(\psi)$は主軸座標系における化学シフトテンソル$\delta_{\mathrm{p}}$を座標変換することで得られる． $\mathbf{R}_i(\phi_i, \theta_i, \psi_i)$ $(i=1, 2, 3)$はオイラー角で表された座標変換行列であり，$\mathbf{R}_1$は主軸座標系から結晶座標系，$\mathbf{R}_2$は結晶座標系からサンプル管の座標系，$\mathbf{R}_3$はサンプル管の座標系から実験座標系への変換をそれぞれ表している．$\delta_{\mathrm{lab}}(\psi)$は$\psi(=\psi_3)$の関数であり，以下の9つのパラメーターで表される：結晶軸座標系における主軸の方向を表す角

（θ_1, ϕ_1, ψ_1），サンプル管と擬単結晶のずれ角（θ_2, ϕ_2, ψ_2），化学シフトテンソルの主値（δ_{11}, δ_{22}, δ_{33}）．これらのパラメーターのうち，主値については粉末スペクトル(Fig. 5(b))より得た値を採用した．Fig. 6に実験値に対してフィッティングした結果を示す．フィッティング結果より得られた(θ_1, ϕ_1, ψ_1)を用い，結晶座標系における方向余弦を決定した．Table 1およびFig. 7に擬単結晶より得られた化学シフトテンソルと単結晶より得られた文献値[6]をまとめて示す．

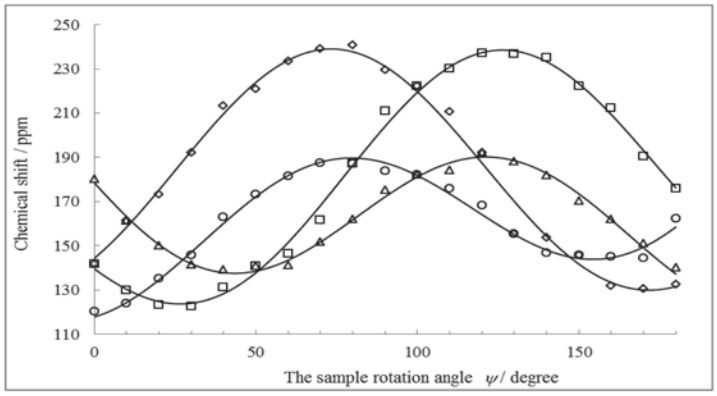


Fig. 6 Angular dependence of the chemical shifts of the carboxyl carbon of the L-threonine MOMA. Symbols are experimental results and solid lines are simulation curves.

Table 1 Comparison of chemical shift tensors determined from the MOMA and a single crystal

		Principal values	Direction cosines		
			a	*b*	*c*
MOMA	δ_{11}	243	–0.828	–0.419	0.374
	δ_{22}	169	–0.384	–0.0628	–0.918
	δ_{33}	107	0.409	–0.903	–0.109
single crystal[6]	δ_{11}	240.2	–0.8442	–0.4047	0.3513
	δ_{22}	164.7	–0.3627	–0.0511	–0.9305
	δ_{33}	105.0	0.3946	–0.9129	–0.1037

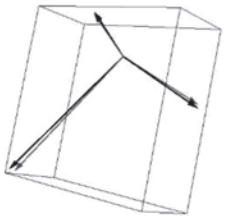


Fig. 7 Comparison of chemical shift tensors determined from the MOMA and a single crystal.
Thick and thin lines are the result from the MOMA and a single crystal, respectively.

擬単結晶より得た化学シフトテンソルは単結晶のそれとよく一致している．この結果は，擬単結晶化法を適用することで，化学シフトテンソルを精度良く決定できることを示している．現在，メチル炭素についても他の樹脂を用いて検討中であり，当日はこちらの結果も併せて報告する予定である．

参考文献

[1] K. Takegoshi, A. Naito, and C. A. McDowell: *J. Magn. Reson*, **65**, 34-42 (1985)
[2] A. Naito, S. Ganapathy, K. Akasaka, and C. A. McDowell: *J. Chem. Phys*, **74**, 3190-3197 (1981).
[3] R. Kusumi, F. Kimura, G.Song, and T. Kimura: *J. Magn. Reson*, **223**, 68-72 (2012).
[4] T. Kimura, F. Kimura, and M.Yoshino: *Langmuir*, **22** 3464-3466 (2006).
[5] T. Kimura and M. Yoshino: *Langmuir*, **21** 4805-4808 (2005).
[6] N. Janes, S. Ganapathy, and E. Oldfield: *J. Magn. Reson*, **54**, 111-121 (1983).

P41

化学シフト異方性測定に基づくバクテリオロドプシン－周辺脂質の親和性評価

○梅川雄一[1, 2], 川竹悟史[1, 2], 松岡茂[1, 2], 村田道雄[1, 2]
[1]JST-ERATO脂質活性構造プロジェクト
[2]大阪大学大学院　理学研究科

Evaluation of affinity between bacteriorhodopsin and boundary lipid based on chemical shift anisotropy measurement

○Yuichi Umegawa[1, 2], Satoshi Kawatake[1, 2], Shigeru Matsuoka[1, 2], and Michio Murata[1, 2]
[1]JST-ERATO Lipid Active Structure Project
[2]Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University

To examine the essential structural factors of boundary lipids surrounding bacteriorhodopsin (bR), the protein was reconstituted in various phospholipids and bR-lipid interactions were evaluated. By using centerband only analysis of rotor-unsynchronized spin echo (COARSE), the CSA value of each phospholipid was obtained from high resolution MAS spectra, indicating that the bivalent negative charges at head group and branched methyl groups at alkyl chains are important for higher affinity to bR.

バクテリオロドプシン(bR)は高度好塩菌が生産する7回膜貫通タンパク質であり、光駆動型プロトンポンプとして働く。また、bRは紫膜(PM)と呼ばれる二次元結晶を形成することが知られている。紫膜由来の脂質分子(PML)は2価の負電荷、エーテル結合、枝分かれした側鎖といった特異な化学構造を持ち、bRの周辺脂質としてその構造や機能の制御と密接に関連していると考えれらている。そこで我々はbRの周辺脂質として必須となる構造要因を明らかにするため、bRを様々なリン脂質(PL)で再構成し、^{31}P原子の化学シフト異方性(CSA)の変化に基づくbR-PL親和性評価を行うことにした。リン脂質にはDMPCを基本構造とし、PGP-Meの部分構造を模したDMPA, DPhPC, diether PCを用いた(Fig. 1)。

我々は昨年度の本討論会においてマジック角回転とスピンエコーを組み合わせることで高分解能スペクトルの信号強度変化から数値解析的に化学シフト異方性の値を算出する手法(centerband only analysis of rotor-unsynchronized spin echo(COARSE)法)が混合脂質試料において有用であること、およびこの手法をPMに適応した場合、PGP-Meの2つのリン酸エステル**a**, **b**についてCSAの値が算出可能であることを報告した。[1)] そこで、本再構成試料においてもCOARSE法によるCSA取得を試みた。

まず、PMLと再構成PL間の脂質交換を見積もるため、PMとPLの混合試料の^{31}P NMR測定を行った(Fig 2i 下段)。DMPA混合試料ではPGP-Me(a)とDMPAの化学シフトが重複したが、その他の混合試料についてはPGP-Meと再構成PLとの化学シフトが分離し、COARSE法によるCSA算出に成功した(DMPA混合試料は静止状態のスペクトルから求めた)。得られた混合試料中のPGP-Me(a)のCSAの大きさをPM中のものと比較すると(Fig. 2ii)、DMPAおよびDPhPC混合試料において顕著な減少が観測された。

Bacteriorhodopsin, Chemical shift anisotropy, Boundary lipid

○うめがわゆういち，かわたけさとし，まつおかしげる，むらたみちお

この結果は、PM中ではbRの周辺脂質として分子運動が抑制されていたPGP-Meが、DMPAもしくはDPhPCが添加されることで脂質交換を起こし運動性が上昇したことを示している。次に各PLに注目しbRとの親和性を評価するため、PM/PL混合、およびPMの部分脱脂質物（dbR）をPLで再構成した二重膜のリン脂質の^{31}P CSAを測定した(Fig. 2i)。この値を各々の純脂質膜の^{31}P CSAと比較すると(Fig. 2iii)、DMPAおよびdiether PCでは過剰なリン脂質やPMLが存在してもCSAは流動相脂質膜に比べ大きな値を保持していた。一方でDMPCでは脂質量の増加に伴い流動相とほぼ同じCSAの値にまで顕著に減少し、DPhPCではどの試料においても流動相と近いCSAを示した。これらのCSA測定の結果から、本実験で用いたリン脂質はPMもしくはbRに対して各々異なる様式で相互作用しいていることが示唆された。

現在、固体NMR以外の手法も用いて、多面的にbR-リン脂質の親和性評価やリン脂質がbRの高次構造、機能に与える影響の評価を行っており、合わせて報告する予定である。

Fig. 1 Chemical structures of phospholipids

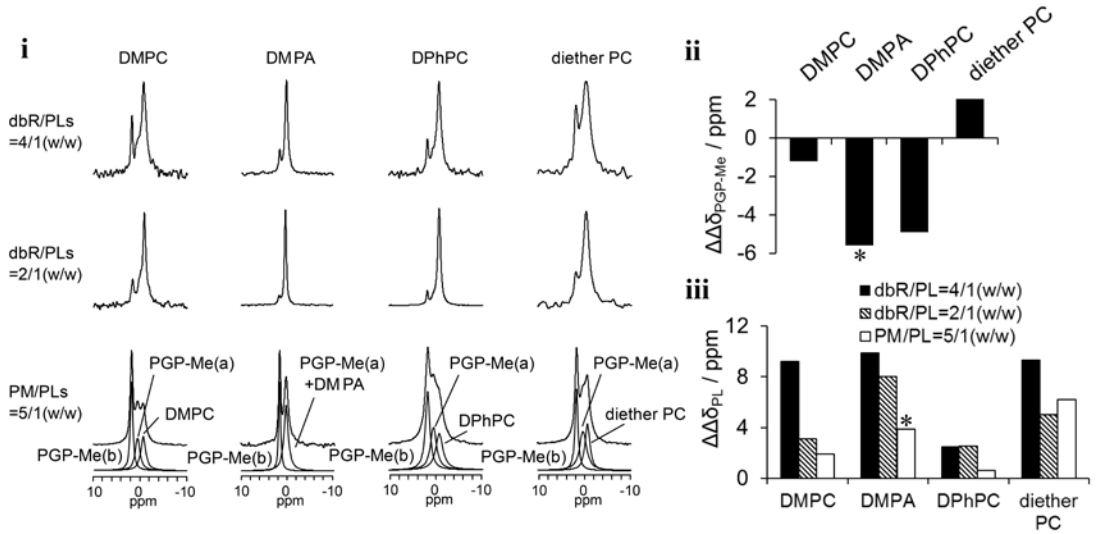


Fig. 2 (i) ^{31}P MAS spectra (30 °C, 7 kHz) of mixed samples. Bottom: 5:1(w/w) mixture of PM/PL with the deconvolution of overlapping ^{31}P signals (dashed line); middled 2/1(w/w) mixture of dbR/PL; top: 4/1(w/w) mixture of dbR/PL, and relative intensities of each ^{31}P signals. (ii) difference in the ^{31}P CSA values of PGP-Me(a) between PM/PL (5/1) mixture and PM. (iii) difference in the ^{31}P CSA values of PLs between dbR(PM)/PL mixture and fluid phase. * CSA values were calculated form static ^{31}P NMR experiments.

[1] 第 52 回 NMR 討論会講演要旨集 P65, 石川, **2013**.

P42

磁場配向微結晶試料を用いたセロビオースの単結晶NMR解析

○宋广杰[1]，久住亮介[1]，木村史子[1]，木村恒久[1]，出口健三[2]，大木忍[2]，藤戸輝昭[2]，清水禎[2]
[1]京大・院農
[2]物材機構

Single-crystal NMR study of ^{13}C chemical shift tensor of cellobiose via magnetically oriented microcrystal array

○Guangjie Song[1], Ryosuke Kusumi[1], Fumiko Kimura[1], Tsunehisa Kimura[1], Kenzo Deguchi[2], Shinobu Ohki[2], Teruaki Fujito[2], and Tadashi Simizu[2]
[1]*Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan.*
[2]*National Institute of Materials Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan*

The chemical shift tensor is a useful parameter reflecting the information of local electrons around resonance nuclei under consideration. Single-crystal NMR is a powerful means to determine full information of a chemical shift tensor, but its use is limited because it requires a large single crystal. We have proposed a use of magnetically oriented microcrystal array (MOMA: a composite in which microcrystals are aligned three-dimensionally in a matrix resin), in place of a large single crystal. In this report, we applied single-crystal NMR to a MOMA of cellobiose, a model compound of cellulose, to determine full information of its chemical shift tensors of C1 and C1' carbons. To solve the overlapping problem in single-crystal NMR spectra, 2D pulse sequence SUPER was used to obtain principal values of these chemical shift tensors. Discussions were made on the local symmetry of these tensors.

Introduction: Chemical shift tensor reflects the local electric information around the resonance nuclei. A chemical shift tensor is expressed by three principal values and directions of the principal axes with respect to the crystal coordinate system. Currently, single-crystal NMR is the most effective method to determine the full information of chemical shift tensor, but it requires a large single crystal (sizes in mm scale). Moreover, the resolution of single-crystal NMR spectra is poor in general for many substances including carbohydrates due to serious peak overlaps. We recently reported that a magnetically oriented microcrystal array (MOMA), which is a resin composite in which microcrystals are aligned three-dimensionally, behaves like a single crystal in single crystal NMR [1] and X-ray diffraction measurements [2]. In this study, three principal values are determined firstly using SUPER, and then, the single crystal NMR method is applied to a MOMA sample to determine the orientation of principal axes of C1 and C1' carbons of cellobiose. Cellobiose has been frequently used as a model molecule for cellulose to elucidate the conformation and hydrogen bonding in crystalline cellulose.

---

single crystal NMR, chemical shift tensor, MOMA
○そん ぐあんじぇ，くすみ りょうすけ，きむら ふみこ，きむら つねひさ，でぐち けんぞう，おおき しのぶ，ふじと てるあき，しみず ただし

Method: Pulverized cellobiose microcrystals were dispersed in UV-curable monomer to prepare a 20 wt% suspension. The suspension was subjected to a frequency modulated rotating magnetic field for 70 min, followed by UV-irradiation to fix alignment. The strength of magnetic field was 8 T. The frequency of rotation was switched between 10 rpm and 80 rpm at every 90°. ^{13}C solid-state NMR measurement was performed on the obtained MOMA under a gonioprobe. Additionally, the 2D CP/MAS NMR measurement with SUPER pulse sequence is performed on cellobiose powder.

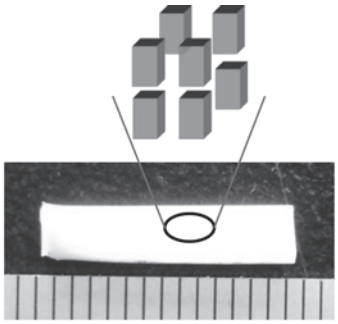


Fig.1 Cellobiose MOMA
Division: 1mm

Results and Discussion: A MOMA of cellobiose is shown in Fig. 1. The three dimensional orientation of cellobiose crystals is confirmed by X-ray diffraction measurement (Fig. 2). Three principal values are determined by SUPER sequence of solid-state NMR. Fig. 3 shows the 1D static powder pattern of C1 carbon fitted by a theoretical curve, from which three principal values are determined. Fig. 4 shows an example of the ^{13}C solid-state CP NMR spectra of the cellobiose MOMA measured with gonioprobe at a sample setting where magnetic axis χ_2 is parallel to the applied magnetic field direction $\mathbf{B}_0$.

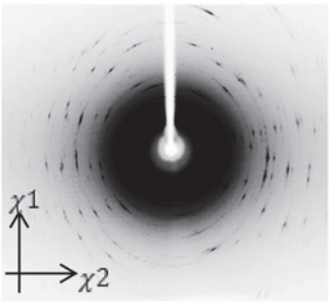


Fig. 2 X-ray diffraction pattern of MOMA. χ_1 and χ_2 are magnetic susceptibility axes.

Cellobiose belongs to the monoclinic system (space group $P2_1$; Z=2). A MOMA prepared from a crystal belonging to the monoclinic system has a twin structure [3]. So there are four magnetically nonequivalent sites for one carbon. Under the gonioprobe where one magnetic axis is perpendicular to $\mathbf{B}_0$, magnetically nonequivalent sites are reduced to two. Furthermore, the magnetically nonequivalent sites are further reduced to only one (Fig. 4) when one magnetic axis is parallel to magnetic field direction under the condition that another one is perpendicular to $\mathbf{B}_0$. As a result, the spectrum is simplified greatly. Because the three principal values are obtained using SUPER, the three orientation angles can be determined correctly by using the four spectra. Next, the chemical shift tensor obtained was related to local symmetry of the molecular structure. C1 and C1' carbons are bonding to two oxygen atoms. The C-O bond is dominant direction of the shielding. So the least shielding direction is close to the direction perpendicular to the O-C-O plane. The chemical shift tensor of C1 and C1' were determined correctly.

Fig. 3 1D static powder pattern of C1 carbon fitted by a theoretical curve.

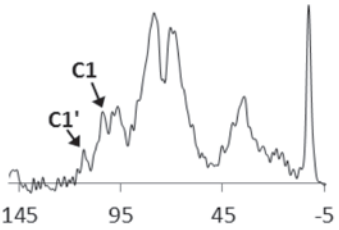


Fig. 4 Spectrum of the cellobiose MOMA at a sample setting $\chi_2 \| \mathbf{B}_0$.

Reference

[1] R. Kusumi, F. Kimura, G. Song, and T. Kimura; *J. Magn. Reson*., **223**, 68 (2012).
[2] F. Kimura, W. Oshima, H. Matsumoto, H. Uekusa, *et al*.; *CrystEngComm*, **16**, 6630 (2014).
[3] F. Kimura, T. Kimura, W. Oshima, *et al*. *J. Appl. Crystallogr.*, **43**, 151 (2010).

P43

常磁性金属錯体を用いた固体^{13}C NMR 測定における サンプル温度の測定

○田中佑弥[1], 梅川雄一[2, 1], 松森信明[1, §], 村田道雄[1, 2]
[1]大阪大学大学院　理学研究科
[2]JST-ERATO脂質活性構造プロジェクト

Temperature measurements in solid state ^{13}C NMR by using paramagnetic metal complex

○Yuya Tanaka[1], Yuichi Umegawa[2, 1], Nobuaki Matsumori[1, §], and Michio Murata[1, 2]
[1] Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University
[2]JST-ERATO lipid active structure Project

In the solid state NMR study of biological systems, a considerable amount of heat is often generated by MAS and high power decoupling, hampering the measurement and control of sample temperature. In this study, we synthesized a ^{13}C-labeled paramagnetic lanthanide complex that shows δ_{13C} dependence on temperature. Using this complex, sample temperature of hydrated membrane was successfully monitored.

脂質二重膜は温度依存的に相状態やドメインサイズを変化させるため、解析する際には正確な試料温度を把握する必要がある。近年、水和脂質二重膜の分子・原子レベルの解析に固体NMRが広く用いられているが、通常の^{13}C核観測では高出力パルスの照射やマジック角回転などによってサンプル温度が顕著に上昇することがしばしば問題となる。そこで本研究では温度依存的に化学シフトが変化する常磁性金属Tmの水溶性錯体(TmDOTA)[1)]に着目し、錯体の^{13}C標識体（温度測定プローブ）を合成し、水和された脂質二重膜サンプルに共存させることで^{13}C固体NMR測定におけるサンプルの温度の正確な測定を目的とした。

この種の常磁性金属をリン酸エステル系の配位子で錯化した化合物については、^{31}Pの化学シフトの温度依存性が報告されており[2)]、Tmを用いることが妥当と考えられたが、実用的なプローブ分子を合成するためには^{13}C化学シフトによる温度測定が不可欠である。そこで、Fig. 1に示す化合物を設計した。^{13}C標識ブロモ酢酸より合成[3)]した^{13}C標識TmDOTAを60 mM含む水溶液中に、代表的なリン脂質であるDMPCの二重膜を分散させ、リポソーム試料を調製した。これを用いて吹付空気の温度と試料温度がなるべく一致するような条件、即ちマジック角回転および^{1}H デカップリングパルスの照射を行わない、シングルパルス測定において、合成した金属錯体の^{13}C 固体NMRスペクトルの温度依存性を確認した。

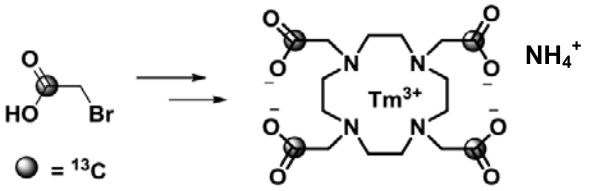


Fig.1 ^{13}C labeled TmDOTA

Temperature regulation, Tm complex
○たなかゆうや, うめがわゆういち, まつもりのぶあき, むらたみちお
§現所属は九州大学大学院理学研究院化学部門

得られたスペクトルから、金属錯体の ^{13}C 化学シフトが吹付空気の温度に依存してほぼ直線的に変化することを確認した(Fig. 2)。続いて同じ試料を用いて、マジック角回転や ^{1}H デカップリングパルス照射が試料温度に与える影響を調べた。吹付空気の温度を 30 ℃とし、マジック角回転(5 kHz)および ^{1}H デカップリングパルス照射条件下(rf 磁場強度: 40 kHz)においてそれぞれ測定を行った(Fig. 3)。^{13}C 標識 TmDOTA の化学シフト値と Fig. 2 の検量線の結果と合わせて判断すると、マジック角回転および、^{1}H デカップリングパルスの照射に伴い、測定中の NMR サンプルの温度は吹付空気の温度からそれぞれ 7 ℃および 20 ℃上昇することが確認された。

現在、^{13}C標識TmDOTAを用いてREDOR測定のようにパルスシークエンス中に長時間のデカップリングを含む測定手法を水和試料に適用した場合のデカップリング時間依存的な温度上昇、および温度制御の検討を行っており、合わせて発表する。

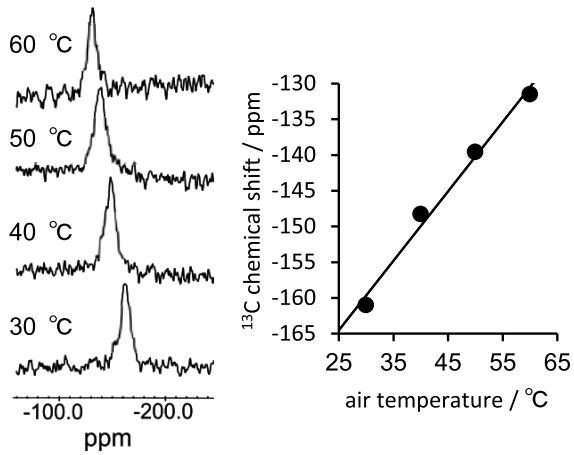


Fig.2 Temperature dependency of paramagnetic complex ^{13}C-TmDOTA. Left: ^{13}C spectra of ^{13}C-TmDOTA at labeled position obtained by single pulse experiments. Right: temperature dependence of ^{13}C chemical shift change of the complex.

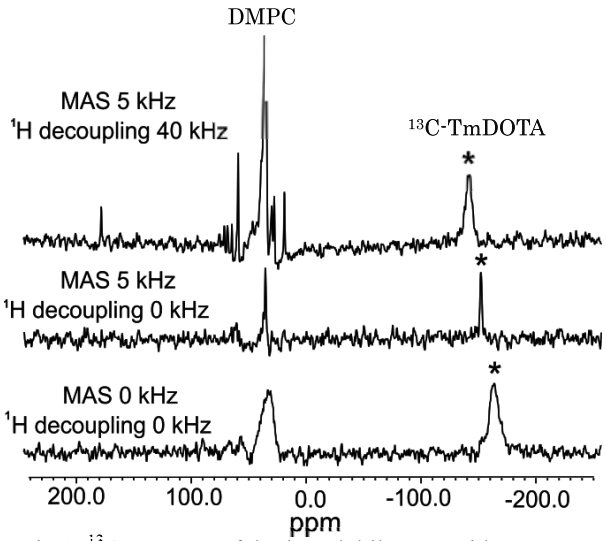


Fig.3 ^{13}C spectra of hydrated bilayers with 60 mM ^{13}C-labeled TmDOTA in water at various conditions.

参考文献

[1] Zuo, C. S. *et al*., *J. Magn. Reson.* **2001**, *151*, 101.

[2] Zuo, C. S. *et al*., *J. Magn. Reson.* **1998**, *133*, 53.

[3] (a)Stasiuk, G. J. *et al*., *Chem. Commun*., **2013**, *49*, 564. (b)Zhao, J. M. *et al*., *J. Am Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5178.

P44

マイクロ波照射NMRによる液晶分子のマイクロ波高温および高速加熱現象の解明

○田制 侑悟[1], 谷川 文一[1], 川村 出[1], 佐藤 元泰[2], 内藤 晶[1]
[1]横国大院工
[2]中部大工

Analysis of high temperature and fast heating processes of liquid crystalline molecules by microwave irradiation NMR spectroscopy.

○Yugo Tasei[1], Fumiichi Tanigawa[1], Izuru Kawamura[1], Motoyasu Sato[2] and Akira Naito[1]
[1] *Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan*
[2] *Graduate School of Engineering, University of Chubu, Japan*

Microwave heating is widely used in the acceleration of organic reaction as well as activity enhancement of enzymes. However, detailed molecular mechanism of microwave heating effect on the chemical reaction has not well understood yet. We newly developed microwave irradiation NMR spectroscopy for investigating the microwave heating effect. ^{1}H NMR spectra of liquid crystalline samples were observed under microwave irradiation. Chemical shift and line widths of NMR spectra under microwave irradiation indicated that large temperature distribution existed at high temperature range. Moreover, we successfully observed NMR spectra of liquid crystalline samples raised 200 degree in a very short time.

＜序論＞

マイクロ波は1 mmから1 mの周波数による電磁波であり、多くの物質はマイクロ波を照射することで加熱される。マイクロ波による加熱の大きな特徴は低エネルギーでかつ、短時間で高温にすることが挙げられる。また、様々な反応系にマイクロ波加熱を用いることで既存の加熱方法に比べて、収率や反応速度が劇的に向上することが数多く報告されており、グリーンケミストリーに対する新たな加熱方法として大きく注目されている。今後、マイクロ波加熱を用いた応用例の増加が予想されるので、マイクロ波加熱現象の理解が非常に重要になってくる。しかし、加熱機構の詳細が不明である上にマイクロ波加熱現象を分子レベルで観測する実験方法がないことが現状である。そこで、本研究では既存のプローブにマイクロ波回路を組み込んだマイクロ波照射NMRを開発し、マイクロ波加熱中の分子をNMR測定することでマイクロ波加熱現象を分子論的に理解することを目指した。今回の測定対象である液晶分子は大きな双極子モーメントを有しており、誘電損失による加熱効率が高い物質である。その液晶分子を用いてマイクロ波加熱による高温および高速加熱現象を明らかにすることを目的とした。また同時にこの装置でマイクロ波加熱を利用した高温および高速加熱測定が可能か検証した。

マイクロ波加熱，マイクロ波照射NMR，液晶分子

○たせいゆうご，たにがわふみいち，かわむらいずる，さとうもとやす，ないとうあきら

＜実験＞

○マイクロ波照射固体NMR分光器

マイクロ波照射NMR分光器の模式図をFigure 1に示す。既存の固体NMR分光器 (Chemmagnetics CMX－400 infinity)にマグネトロン(東京電子 1.3 kW, 2.45 GHz)とマイクロ波共振回路が備えてあるプローブを組み込んでいる。このプローブではラジオ波共振回路の内側にマイクロ波共振回路を組み込み、両方の周波数を同調させた。マイクロ波は分光器の外部にあるマグネトロンから発生させ、導波管を通して、同軸ケーブルに変換しNMRプローブ内に伝送して測定試料に照射される。測定試料を挿入する電極セルは石英管のコンダクターとしてラジオ波コイルの内側に位置しており、同調回路とは銅泊を用いて接続している。このようなマイクロ波とラジオ波の分離をよくした二重同調回路の開発によってマイクロ波照射NMRはマイクロ波照射中の物質を分子レベルに解析できる実験方法として利用できるようになった。

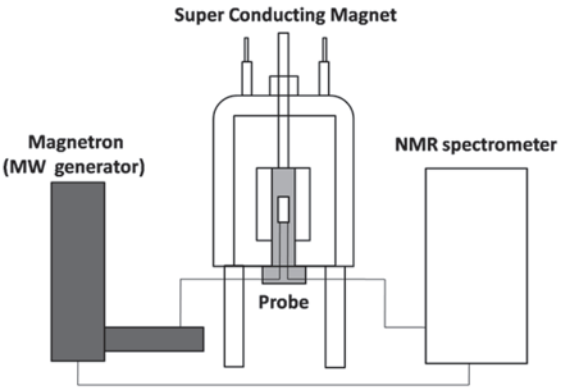


Figure 1 Apparatus of microwave irradiation NMR

○NMR測定

相転移温度が40°Cの液晶分子である1-cyano-4-(trans-4-propylcyclohexyl) benzeneを測定試料としマイクロ波照射NMR測定を行った。NMR装置に付属している温度可変システムを用いて50°Cの空気を流し続けて、試料を完全に等方相にした後に、30分放置したものを初期条件とした。そこから任意の外部出力(65 W, 130 W, 195 W)のマイクロ波を連続波として照射しながら1分ごとに繰り返し時間を1.0秒で4回の積算で^{1}H NMR測定を行い、マイクロ波加熱過程を追った。また、50 °C から95 °Cの間 を5 °C おきに^{1}H NMR測定を行い、それぞれのプロトンに対応する化学シフト値のプロットを行った。^{1}H NMR測定は400 MHzの共鳴周波数で90°パルスは2.0 μ秒で行った。また、試料管はマイクロ波を透過するガラス管を用い、本来の使用する径である5φの試料管ではなく、外径3φの試料管を用いて電極セルと接触しないようにすることで断熱効果が得られ、試料のみが加熱されるように工夫した。

＜結果と考察＞

初期条件である50 °Cならびに10分間のマイクロ波照射を行った^{1}H NMRスペクトルをFig.2（次ページ）に示す。マイクロ波照射を行ったスペクトルでは初期条件（Figure 2 A）よりも最大0.3 ppm高磁場シフトしていた。さらにマイクロ波の外部出力が上がる程、シフト値の変化は大きくなり、ブロードな信号が得られた。一般に^{1}H NMR化学シフトは温度上昇によるリニアに高磁場することから、マイクロ波照射による高磁場シフトは温度上昇、ブロードな信号については大きな温度分布を示していると考え

られる。次に50 °C から95 °Cの間でそれぞれのプロトンに対応する初期条件(50 °C)からの化学シフト変化をFigure 3に示す。この結果から、各々のプロトンはマイクロ波加熱によりリニアに高磁場シフトし、各基のプロトンにおいて温度上昇による化学シフト変化値は異なることがわかった。これを利用してマイクロ波による化学シフト変化を温度に換算し、温度の経時変化をマイクロ波の外部出力別にプロットしたものをFigure 4に示す。各プロトンの温度差が外部出力65 Wでは7 °C程度に対して、外部出力195 Wでは60 °Cと温度差が顕著になっていることからマイクロ波加熱によって分子内での温度分布が存在していることを示唆している。またマイクロ波加熱を利用することで、数分で200 °Cを超えるNMR測定が可能であることも示された。

発表ではマイクロ波による高速加熱を利用した測定についても議論する予定である。

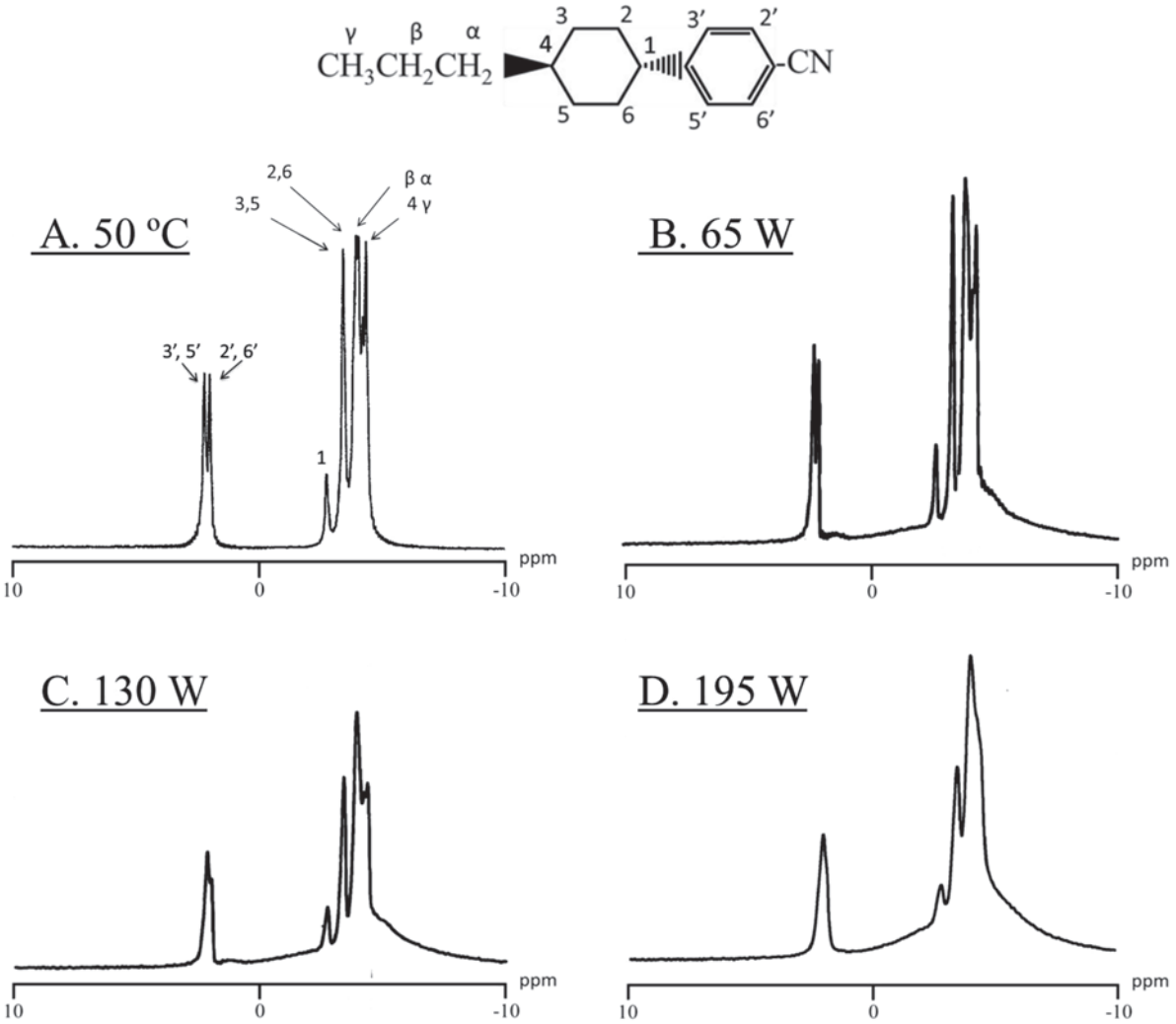


Figure 2 ^{1}H NMR spectra under initial condition (A. 50 °C) and microwave irradiation conditions for 10 minutes (B. 65 W, C. 130 W and 195 W).

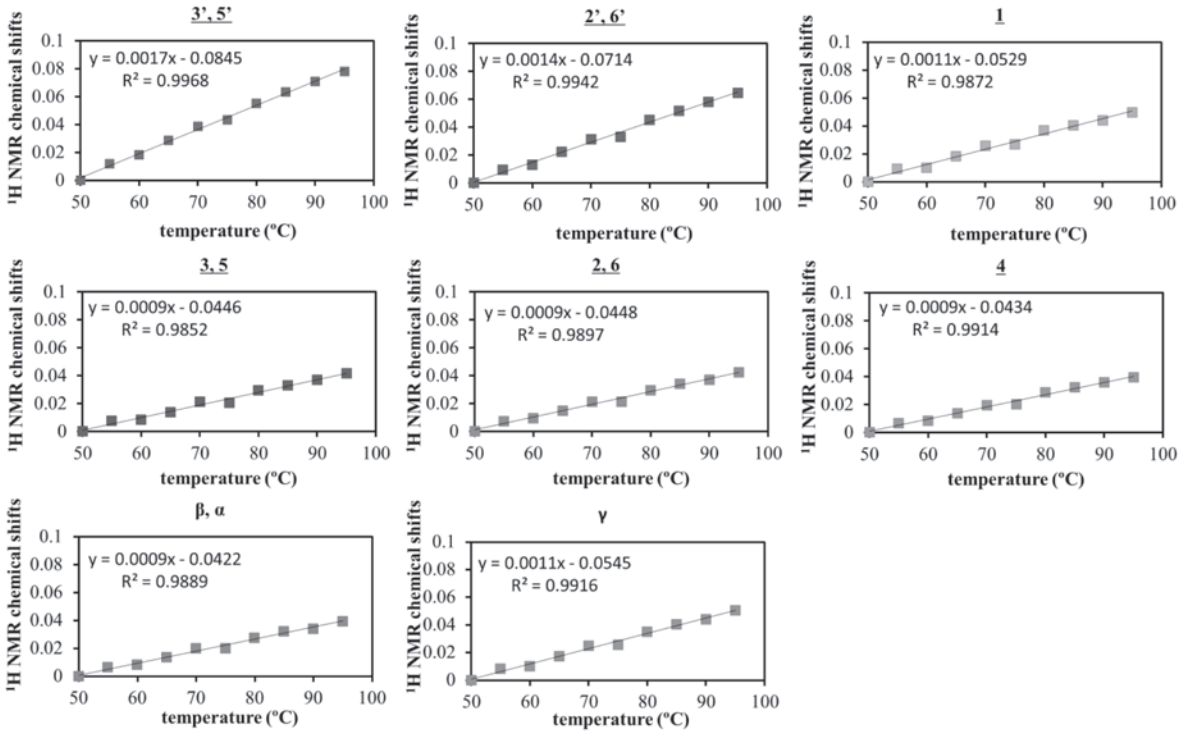


Figure 3 Plot of ^{1}H NMR chemical shift (ppm) vs temperature (°C).

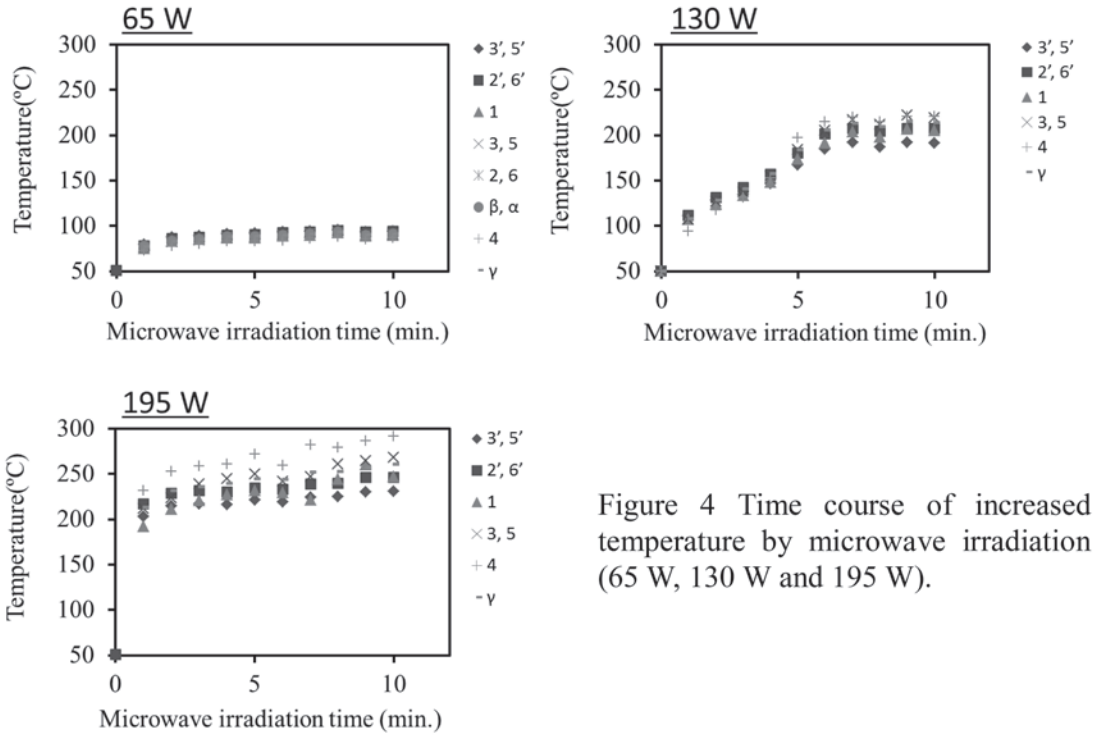


Figure 4 Time course of increased temperature by microwave irradiation (65 W, 130 W and 195 W).

P45

光励起三重項電子スピンを用いたDNPによる室温下での偏極率40%の達成

○立石 健一郎[1]，月花 智博[2]，浦田 佳治[2]，西田 辰介[3]，森田 靖[3]，
和田 智之[2]，上坂 友洋[1]
[1]理研・仁科センター [2]理研・光量子工学研究領域 [3]愛知工大・工

Realization of ^{1}H spin polarization of 40% at room temperature with DNP using photo-excited triplet electron spin

○Kenichiro Tateishi[1], Tomohiro Tsukihana[2], Yoshiharu Urata[2], Shinsuke Nishida[3], Yasushi Morita[3], Satoshi Wada[2], and Tomohiro Uesaka[1]
[1] RIKEN, Nishina center, Saitama, Japan.
[2] RIKEN, Center for Advanced Photonics, Saitama, Japan.
[3]Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Aichi Institute of Technology, Aichi, Japan.

Dynamic nuclear polarization (DNP) is a means of enhancing bulk nuclear spin polarization, i.e. signal intensity, using electron spins. By utilizing non-equilibrated electron as a polarizing agent, DNP can achieve enhancement beyond the conventional limit of 660, independent of the temperature and magnetic field strength. We realized a ^{1}H spin polarization of 40% in 0.66 T at 300 K with DNP using photo-excited triplet electron spin of pentacene. The key in this work is to develop new laser system for efficient excitation of pentacene, which is constructed two Nd doped YAG lasers with the wavelength of 1064 nm and 1319 nm and LiB_3O_5 crystal for sum-frequency generation.

動的核偏極(Dynamic Nuclear Polarization: DNP)は、電子スピンを用いて核スピン系を高偏極化（高感度化）する手法である。ラジカル中の熱平衡電子スピンを用いる従来法では、偏極率を10%以上に高めるには極低温設備が必須であった。一方で、光励起三重項電子スピンのような非平衡電子スピンを偏極源に使用すれば、この電子スピンの偏極率は環境に依存しないので、極低温装置は必ずしも必要ではなくなる。我々はこのようなDNPをtriplet-DNPと呼び[1]、室温でも70%以上に偏極するペンタセンの励起電子スピンを用いた研究を行ってきた。

DNPによる最大到達偏極率は、電子スピンからの高偏極状態の供給速度と核スピン系のスピン格子緩和時間とのバランスで決まる。昨年度は、試料の部分重水素化で後者を改善できることを報告した[2]。今回は、前者のボトルネックになっていたペンタセン励起用のレーザを構築し、triplet-DNPを行った結果について発表する。

キーワード：動的核偏極、光励起三重項電子スピン

○たていし けんいちろう、つきはな ともひろ、うらた よしはる、にしだ しんすけ、
もりた やすし、わだ さとし、うえさか ともひろ

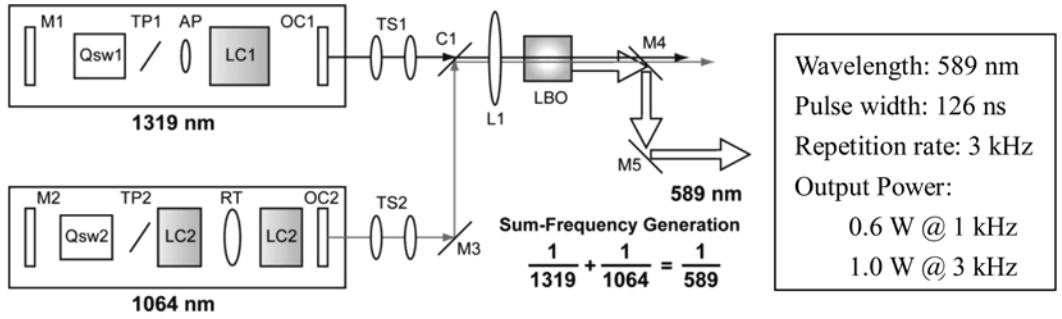


Fig. 1: Schematic diagram of 589-nm laser system, which is constructed two Nd doped YAG lasers with the wavelength of 1064 nm and 1319 nm and LiB_3O_5 crystal for sum-frequency generation. M1,2 : Cavity Mirror, Qsw1,2: A/O Q-switch, TP1,2: Thin Plate, LC1,2: Laser Chamber, AP: Aperture, OC1,2: Output coupler, TS1,2: Telescope, C1: Coupler, M3,4,5: Mirror, L1:Lens, LBO: LiB_3O_5 crystal.

Figure 1に今回構築した、ペンタセン励起に特化したレーザの構成を示す。波長、パルス幅、繰返周波数、出力はそれぞれ589 nm, 126 ns, 3 kHz, 1 Wである。 試料は、中央のベンゼン環を重水素置換した部分重水素化*p*-ターフェニルに重水素化ペンタセンを0.05 mol%ドープした単結晶を使用した[2]。実験は、自作のtriplet-DNP装置を用いて0.66 T, 300 K下で行った。

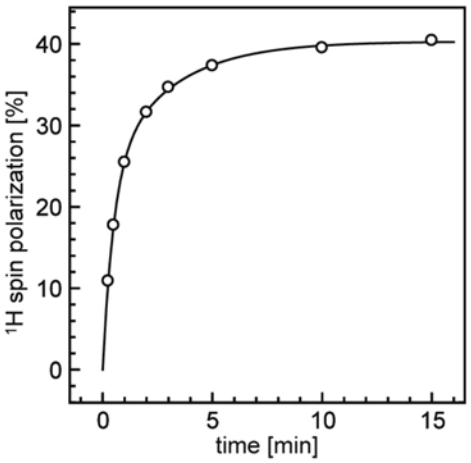


Fig. 2: Buildup curve of ^{1}H spin polarization with triplet-DNP in 0.66 T and at 300 K.

高偏極電子スピン生成のためのレーザ照射と、その直後に偏極移行を行うための20 μsのマイクロ波(~ 18 GHz)照射を1 kHzで繰り返し、最大到達偏極率40%を得た(Fig. 2)。これは、約18万倍の信号強度増大に相当する。これまで使用していた色素レーザ[2]（波長594 nm, パルス幅 1 μs）と比較すると、繰返周波数50 Hzでの^{1}Hスピンの初期ビルドアップ傾きの大きさは約50%であった。これはパルス幅が十分ではなく、ペンタセン励起効率が半分程度であることを意味する。この実験では、^{1}Hスピンの偏極率が30%を超えた当たりから偏極移行効率の低下がみられた。その原因は、高偏極化に伴うスペクトル変化であると考えており、詳細は発表で述べる。

室温下での高偏極化は、NMRやMRIで極低温装置を用いずに大幅な感度向上を得ることができるだけでなく、偏極標的として不安定原子核との散乱実験など基礎物理実験にも応用されている[3]。

文献

[1] K. Takeda, *Triplet State Dynamic Nuclear Polarization*, (VDM Verlag, 2009)
[2] K. Tateishi *et. al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111 (2014) 7527.
[3] S. Sakaguchi, *et. al*., Phys. Rev. C, 84 (2011) 024604.

P46

Measurement of Proton Chemical Shift Anisotropy Tensors Using Symmetry-Based Radio-Frequency Pulse Sequences and Ultrafast MAS Solid-State NMR Spectroscopy

Manoj Kumar Pandey[1], Michal Malon[1,2] and Yusuke Nishiyama[1,2]
[1]*CLST NMR Facility, RIKEN, Yokohama, Japan.*
[2]*JEOL RESONANCE Inc., Musashino, Akishima, Japan.*

It is well known that H-bonding interactions play a central role in providing structural stability to numerous chemical and biological compounds. Therefore it becomes important to get atomistic view of these interactions to obtain piercing insights using the state-of-the-art solid-state NMR technique. To accomplish this nothing can be better than the very basic NMR interaction parameter "chemical shift" which provides information about the local electronic environment and motions surrounding a nucleus. Furthermore, the distribution of charges inside the nucleus is mostly unsymmetrical which gives rise to orientation dependence to chemical shift and is known as chemical shift anisotropy (CSA) tensor. While the isotropic chemical shift values provide information about the magnetically inequivalent nuclear spins in the system, various anisotropic interactions such as chemical shift and dipolar couplings contain rich information about its structure and dynamics. Therefore, there is considerable interest in the development of methods based on recoupling techniques for the measurement of anisotropic interactions with a better accuracy. Over the past several years, ^{13}C and ^{15}N CSA values have been routinely measured for structural and dynamics studies in solids due to their large spread of chemical shift frequency. On the other hand, the extraction of small size ^{1}H CSAs from the homogeneously broadened NMR spectra in the presence of strong $^{1}H/^{1}H$ dipolar interactions due to their high abundance and sensitivity is a difficult process and methods for accurate measurement of ^{1}H CSA are still emerging. In the present work we have carried out a systematic study to find more efficient γ-encoded radio frequency (RF) pulse sequences based on R-symmetries in comparison to the earlier reported symmetry-based sequences to recouple ^{1}H CSA in the indirect dimension of a 2D $^{1}H/^{1}H$ anisotropic/isotropic chemical shift correlation experiment at ultrafast magic angle spinning (MAS) frequencies. Herein, without any application of $^{1}H/^{1}H$ dipolar decoupling the spectral resolution could be significantly improved in both frequency dimensions of a 2D $^{1}H/^{1}H$ correlation spectrum by the use of ultrahigh MAS rates (up to 70 kHz) which largely removes strong $^{1}H/^{1}H$ dipolar interactions, and at high B_0 field strength (16.4 Tesla) used to amplify rather small ^{1}H CSAs. The existing symmetry-based ^{1}H CSA recoupling sequences are sensitive to RF field (B_1) inhomogeneity, resulting in lineshape distortion, poor signal-to-noise ratio (SNR) due to a

Ultrafast magic angle spinning, ^{1}H Chemical shift anisotropy, Symmetry-based pulse sequence

○まのじ　くまーる　ぱんでぃ、みはる　まろにゅ、にしやま　ゆうすけ

strong central peak arising from non-oscillating components, and poor resolution and sensitivity. To overcome these difficulties, we have systematically carried out a study to find a set of more efficient symmetry-based CSA recoupling sequences as compared to earlier reported sequences based on *R*-symmetries through extensive numerical simulations in combination with experiments. We demonstrate that with a reasonable RF field requirement a set of symmetry-based recoupling sequences with a series of phase-alternating composite-180° (namely $270°_0$-$90°_{180}$) pulses are more robust towards B_1 inhomogeneity and show improved ^{1}H CSA recoupling efficiency and undistorted powder lineshapes in comparison to the earlier reported symmetry-based sequences with a series of phase-alternating 180° pulses at ultrafast MAS condition.

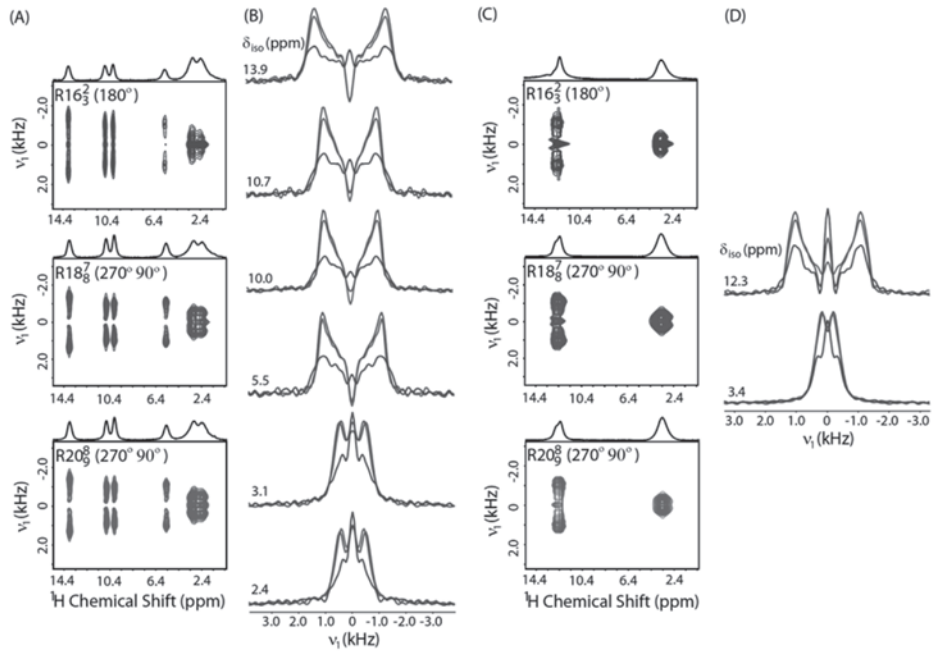


Figure 1: Two dimensional ^{1}H/^{1}H anisotropic/isotropic chemical shift correlation spectra of citric acid (A) and malonic acid (C) at MAS rates 70 kHz and 60 kHz, respectively, recorded using symmetry-based $R16_3^2$ (180°) (blue), $R18_8^7$ (270°90°) (brown) and $R20_9^8$ (270°90°) (green) pulse sequences from 700 MHz spectrometer. Recoupled ^{1}H CSA powder lineshapes obtained from spectral slices parallel to the anisotropic dimension (ν_1) extracted at isotropic ^{1}H chemical shift values in the direct dimension for citric acid (B) and malonic acid (D).

P47

中性膜に結合したラクトフェランピンの膜結合構造と膜親和性に基づく抗菌活性の解明

○井町昌義[1], 堤　敦史[1], 吉良　敦史[2], 川村　出[1], 内藤　晶[1]
[1]横浜国立大学大学院工学府
[2]株式会社アルバック

Structure and affinity analysis of bovine lactoferrampin bound to neutral model membranes as studied by solid state NMR and QCM

○Masayoshi Imachi[1], Atsushi Tutsumi[1], Atsushi Kira[2], Izuru Kawamura[1], and Akira Naito[1]
[1] Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan.
[2]Reasearch and Development Division, ULVAC Inc, Japan.

Bovine lactoferrampin(LFampinB) is an antimicrobial peptide found in the N1-domain of bovine lactoferrin(268-284). The structure of LFampinB bound to the neutral membrane(DMPC:DMPG=5:1) was determined by analyzing the chemical shift anisotropies of carbonyl carbons of 6 kinds of amino acid residues. These results indicated that LFampinB formed α-helix in the N-terminal region and the α-helical axis rotated rapidly about the bilayer normal with the tilt angle of 40° to the axis. The association constant (Ka) of LFampinB with the neutral lipids was 300 times smaller than that with the acidic membrane determined by QCM. The difference of the Ka value explains that LFampinB selectively interacts with the acidic bacterial membrane.

【序論】

Bovine Lactoferrampin (LFampinB)は、乳汁中のタンパク質 Bovine Lactoferrin(bLF)の N1 ドメインの 268-284 アミノ酸残基に相当する 17 残基からなるペプチドであり、bLF の N1 ドメインから胃中のペプシンによる消化で切り出されるペプチド Bovine Lactoferricin(LFcinB)近傍に発見された。[1)] LFampinB は全体として+5 の電荷をもった塩基性ペプチドであるため、酸性リン脂質を多く含む細菌膜に特異的に結合する。[2)] また、現在提唱されている抗菌活性のメカニズムには脂質膜中でのペプチドの構造や配向に依存することが知られているので、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は重要である。細菌膜を模した酸性膜との相互作用については、LFampinB は 1-11 残基が α-helix 構造を形成し、その helix 軸を脂質膜面法線に対して 45°傾けて膜法線周りを回転運動していることが先行研究で報告されている。[3)] そこで本研究では中性リン脂質に LFampinB を再構成した系で固体 NMR 測定をすることにより、哺乳動物の脂質膜への結合構造や相互作用を明らかにすることを目的とした。

固体NMR，抗菌ペプチド，LFampin

○いまちまさよし，つつみあつし，きらあつし, かわむらいづる, ないとうあきら

【実験】

^{13}C標識LFampinBは、Leu^{3}, Leu^{4}, Ala^{7}, Gln^{8}, Phe^{11}, Gly^{12}のカルボニル炭素が^{13}C同位体標識されたアミノ酸残基にFmoc基を導入し、固相合成法を用いて合成した。哺乳動物模倣膜として中性脂質のDMPCと酸性脂質のDMPGを5:1の割合で混合したものを使用し、これにペプチドを組み込み多重膜小胞(MLV)を調製した。ペプチド:脂質=1:20(モル比)として、各膜試料を作成し、水和試料は40℃でDD法、粉末試料は20℃でCP法により^{13}C-NMR測定を行い、LFampinBの動的構造を、^{31}P-NMR測定からペプチドとリン脂質の相互作用を観測した。NMR測定にはChemagnetics CMX infinity-400 FT-NMR分光器を使用した。

【結果及び考察】

(1)膜結合時のリン脂質の状態

^{31}P-NMR測定によりリン脂質の相の状態を見ることができ、MLVが正しくできているかどうかを見ることができる。MLVは液晶相を表す軸対象テンソル$\delta_{\perp}$,$\delta_{//}$が現れるが、膜が分断し小分子化されると0ppmに等方相δ_{iso}のみが現れるようになる。中性膜にLFampinBを添加した場合、濃度が高くなるほど大きく膜分断を起こすことが示された。

(2)脂質膜中でのLFampinBの挙動

helixを形成したペプチドが脂質に分子膜中の膜面法線周りで一軸回転運動をするとき、各アミノ酸残基の異方性の理論値$\Delta\delta_{cal}$は、回転軸から膜法線への角度ζ、カルボニル平面の面角γを用いて以下のように表せる

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

また、各アミノ酸残基の異方性は^{13}C DD-static測定により異方性の実験値$\Delta\delta_{obs}$を、^{13}C DD-MAS測定により等方値、低速^{13}C CP-MAS測定により各カルボニル炭素のテンソルの主値δ_{11},δ_{22},δ_{33}を求めた。測定結果の例をFig.1に示す。

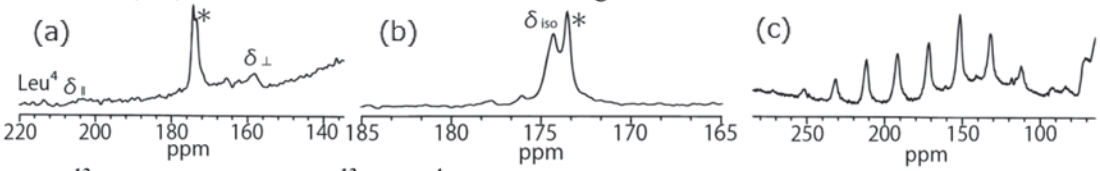


Fig.1 ^{13}C NMR spectra for [1-^{13}C] Leu^{4} LFampinB (a) DD-Static (b) DD-MAS 4kHz (c)CP-MAS 2KHz ＊peak of lipid

$\Delta\delta_{cal}$と$\Delta\delta_{obs}$の一致を示すRMSD値より、このhelixの膜法線からの傾きを40° と決定した。この角度を用いて$\Delta\delta_{cal}$の曲線と$\Delta\delta_{obs}$のプロット(化学シフトオシレーション)からhelixの種類や境界を判断し、Leu^{3}からAla^{7}まではα-helixを形成し、Phe^{11}からはα-helixが崩れていることが確認できた。膜結合構造はFig.2のようにN端から中性膜に挿入し、膜法線から40°傾いて一軸回転運動をしているということが判明した。

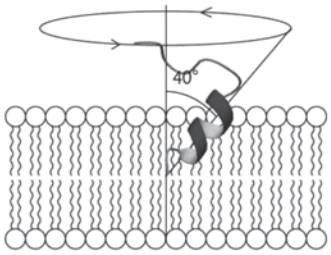


Fig.2 Structure of LFampinB bound to neutral lipid bilayer

【参考文献】

1) Marieke, I. A. van der Kraan et al: Peptides (2004) 25, 177-183.
2) Evan, F. et al: Biochim. et Biophys. Acta (2007) 1768, 2355-2364.
3) Tsutsumi,A. et al: Biophys.J (2012) 103,1735-1743.

P48 単一細胞あたりの特定タンパク質の分子数計測のための定量固体NMR法の開発

○山田和哉[1]，江川文子[1]，藤原敏道[1]
[1]大阪大学・蛋白質研究所

Quantitative solid-state NMR method for counting the number of a protein molecule in a cell

○Kazuya Yamada[1], Ayako Egawa[1], and Toshimichi Fujiwara[1]
[1]Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

The structural biology, which clarifies the functions of proteins from their atomic resolution structures, is the essential method for understanding life phenomena. In order to analyze proteins, a lot amount of the proteins need to be prepared mainly by a recombinant system of *Escherichia coli*. However, the quantitative analysis of the protein synthesis ability of *E. coli* has not been reported yet. Here, we report the measurement of the number of recombinant protein molecules (Ubiquitin) in living *E. coli* cells by using quantitative solid-state NMR. First, the relation between the integral value of ^{31}P 1D NMR spectra, and the number of cells was obtained by using cell counting. Next, the number of the protein molecule was evaluated from the integral value of the high-resolution ^{13}C NMR. From these results, we calculated the number of the protein molecules in an *E. coli* cell.

【序論】

タンパク質の立体構造や機能を原子分解能で解明する構造生物学は、生命現象の理解に必須である。その標的タンパク質の大量調製には大腸菌による発現系が多く用いられる。そのためにタンパク質合成能力を最大化する手法が探索されてきた。しかし、その能力を評価するために必要な、大腸菌一細胞のタンパク質合成能力を定量的かつ簡単に評価する方法はこれまで存在しなかった。また、一細胞のタンパク質合成能力を評価できれば、発現誘導時の大腸菌細胞の定量的な代謝解析、細胞の大きさの変化、細胞中のタンパク質構造を理解するシステム生物学における知見も得られる。

そこで筆者らは、in-cell固体NMRを用いて大腸菌一細胞が合成する組み換えタン

定量NMR、in-cell 固体NMR、ユビキチン

○やまだかずや、えがわあやこ、ふじわらとしみち

パク質を直接定量できると考えた。NMR は、化学物質の純度を測定する qNMR[1] として用いられる様に定量性があり、生細胞内のタンパク質を測定する in-cell NMR[2] として用いられる様に非侵襲的で高分解能な測定方法である。さらに、固体 NMR は分子量が大きく分子の運動性が低い DNA なども含めて、大腸菌内の全分子の観測が可能である。本発表では、NMR サンプル中の大腸菌細胞数、組み換えタンパク質分子数の定量法、及びそれらの結果から得られた発現誘導時の大腸菌細胞の状態に関して報告する。

【実験方法】

測定試料には、^{13}C、^{15}N 均一標識した M9 最少培地で培養し、モデル蛋白質としてユビキチンを発現誘導した大腸菌を用いた。組み換えタンパク質分子数の定量の際は、ユビキチンを発現誘導した菌体、発現誘導しない菌体の 2 種類の試料を調製した。

全ての測定で MAS ローターは外形 4.0 mm、容量 60 μL のものを使用した。大腸菌は集菌後に生理食塩水で洗浄した後、直接 MAS ローターに詰め、測定を行った。また、装置は 500 MHz の固体 NMR 装置を使用し、測定中の試料回転は 1D ^{13}C NMR 及び 1D ^{31}P NMR 測定では 10 kHz、2D ^{13}C-^{13}C DARR 測定では 12 kHz、プローブ設定温度は－60 ºC に設定した。

【結果と考察】

最初にNMRの定量測定を行うため、大腸菌サンプルと外部標準サンプル(リン酸二水素アンモニウム、^{13}C, ^{15}Nアラニン)の^{31}Pと^{13}Cの縦緩和時間をそれぞれ測定した。結果、^{31}Pの縦緩和時間は大腸菌サンプルで28.3秒、外部標準サンプルで25.0秒、^{13}Cの縦緩和時間は大腸菌サンプルで1.44秒、外部標準サンプルで1.24秒であった。以下の実験では、パルス間に縦緩和時間の6倍の待ち時間を設けることで、定量性を確保した測定を用いた。

次に、NMRサンプル中に存在する大腸菌細胞を計数するため、菌体試料の^{31}P NMR積分値と菌体数の関係を得ることを試みた。そのために、大腸菌サンプルの^{31}P NMR　(Figure 1)を測定し積分値を求め、試料中に存在する菌体数を位相差顕微鏡と細胞計数盤で計数した。その結果、ユビキチンを発現誘導した菌体サンプルでは1.29×10^{10}個、発現誘導しない菌体サンプルでは1.26×10^{10}個の大腸菌細胞が存在した。その後、外部標準であるリン酸二水素アンモニウムを用いてNMR積分値と試料中のリンの量の換算を行い、大腸菌1細胞当りのリン原子数を見積もった。その結果、興味深いことにユビキチンを発現誘導した菌体サンプルでは3.61×10^{8}個、発現誘導しない菌体サンプルでは2.67×10^{8}個となり、発現誘導したサンプルの方が1細胞当りのリン原子数が約1.35倍多いことが分かった。これは、発現誘導によるmRNAやペプチドグリカンの合成に由来するものであると考えられる。

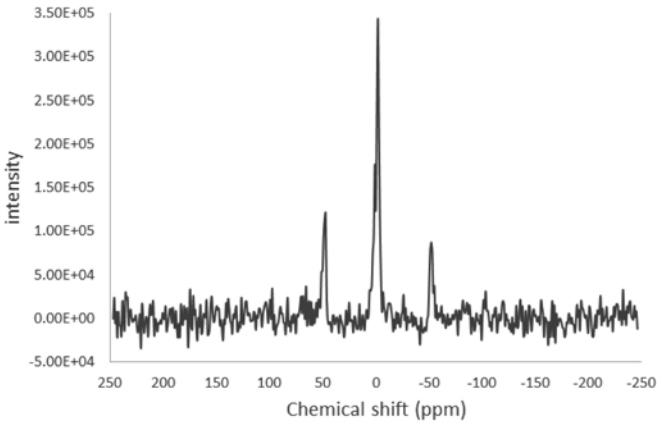


Figure 1. 1D ^{31}P NMR spectrum of *E. coli*

同様に、^{13}C NMR積分値を用いてNMRサンプル中に存在する組み換えタンパク質の定量を試みた。その際、大腸菌固有の分子由来の信号がバックグラウンドとして現れるため、ユビキチンを発現誘導した大腸菌とバックグラウンド測定に用いる発現誘導をしない大腸菌を調製し、それらを大腸菌細胞数で割ったものの差スペクトル(Figure 2)を解析に用いた。その後、外部標準である^{13}C標識アラニンを用いて^{13}C NMR積分値と試料中の炭素の量を換算した。また、本実験で得られた差スペクトルと既知の微結晶ユビキチンのス

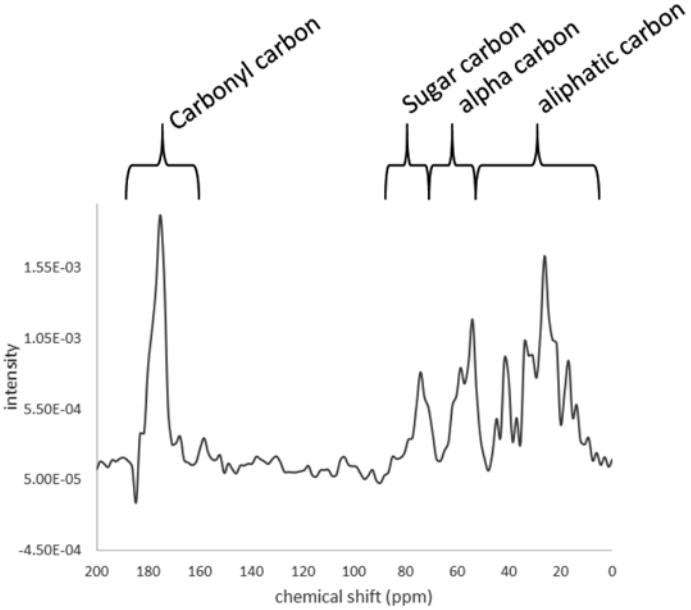


Figure 2. 1D ^{13}C NMR different spectrum between *E. coli* of induction and that of non-induction

$$\frac{\text{The amount of } {}^{13}\text{C (induction)}}{\text{Number of cells}} - \frac{\text{The amount of } {}^{13}\text{C (non-induction)}}{\text{Number of cells}} = \frac{\text{The amount of Ubiquitin } {}^{13}\text{C}}{\text{Number of cells}}$$

$$\frac{\text{The amount of Ubiquitin } {}^{13}\text{C}}{\text{Number of cells}} \div (\text{The residue number of Ubiquitin}) = \frac{\text{The amount of Ubiquitin}}{\text{Number of cells}}$$

Figure 3. The equations for calculation of the amount of Ubiquitin in a cell

ペクトル[3]を比較したところ、糖由来の炭素が多く脂肪族炭素が少なかった。これは、発現誘導によるペプチドグリカンの合成に由来するものであると考えられる。脂肪族炭素が少ないことは、ペプチドグリカンの合成によりカルボニル炭素とアルファ炭素が増えたため、ユビキチン由来の脂肪族炭素が相対的に少なく観測されたと考えられる。

最後に、以上の結果を用いて大腸菌1細胞が合成したユビキチン分子数を、Figure 3の計算式に従って見積もった。カルボニル炭素、アルファ炭素の原子数から見積もった細胞当りのユビキチン分子数は、4.41×10^7個、4.57×10^7個となり、ほぼ一致した。一方、脂肪族炭素の原子数から見積もった場合、2.97×10^7個となった。この相違は、デカップリング効率の違いと、ペプチドグリカン由来の信号が除ききれていないことによると考えられる。

今回のＮＭＲ実験で定量的に得られたリン原子数やユビキチン分子数は、大腸菌細胞の培地からのリンや炭素の取り込み率、ユビキチンの細胞体積に占める割合、ユビキチン合成に関与するリボソームの個数などに関して情報をあたえる。これらについて、発現誘導時の大腸菌の状態について議論をポスターでは行う。また今後、討論会までに2D ^{13}C-^{13}C DARRスペクトルを解析することで、差スペクトルがユビキチン由来の信号であるかどうかを確認し、発現誘導時に合成されるペプチドグリカンの量を考慮した議論も行う予定である。

【参考文献】

(1) Pauli, G. F. *et al*., *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 133.

(2) Serber, Z. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 2446.

(3) Igumenova, T. I. *et al*. *J. Am. Chem. Soc*., **2004**, *126*, 6720.

P49

^{13}C固体MAS NMRによるフォボロドプシンの信号伝達機能に重要なTyr残基側鎖の構造変化の解析

○西川亮汰[1]、川村出[1]、沖津貴志[2]、和田昭盛[2]、須藤雄気[3]、加茂直樹[4]、内藤晶[1]
[1]横浜国大・院工、[2]神戸薬大、[3]岡山大・院医歯薬、[4]北大・院生命理

Conformational changes of Tyr residues which are important for signal transduction in phoborhodopsin as studied by solid-state ^{13}C MAS NMR

○Ryota Nishikawa[1], Izuru Kawamura[1], Takashi Okitsu[2], Akimori Wada[2], Yuki Sudo[3], Naoki Kamo[4], and Akira Naito[1]
[1]*Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ.*
[2] *Kobe Pharm. Univ.*
[3] *Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.*
[4] *Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.*

Pharaonis phoborhodopsin (*p*pR) is a 7 transmembrane α-helical photo-receptor with a retinal. Tyr174 and Tyr199 residues in *p*pR play important roles of the signal transduction from *p*pR to *p*HtrII [1]. Here we present a solid-state ^{13}C NMR spectra of [15,20-^{13}C]retinal, $^{13}C_{\zeta}$-Tyr and $^{13}C_{\varepsilon}$-Lys in *p*pR, T204A, D75N and Y199F reconstituted in the EggPC lipid bilayers. We measured these proteins by CP-MAS 1D NMR experiments. Moreover, we observed each of the correlated peaks of C_{ζ}-Tyr174 with retinal by proton-driven spin diffusion (PDSD) 2D NMR. We successfully assigned ^{13}C chemical shifts of C_{ζ}-Tyr174 and C_{ζ}-Tyr199. It is indicated that these site-specific chemical shifts are coupled with the expression of the function through retinal-protein and protein-protein interaction. We would like to discuss these interactions by comparing the structure with its mutants.

【緒言】高度好塩好アルカリ性菌 *Natronomonas pharaonis* 由来の、ファラオニスフォボロドプシン(*p*pR)は、発色団としてレチナールが結合した７本膜貫通型光センサー膜タンパク質である。レチナールの光異性化による構造変化がタンパク質サイドに伝わり、固有の信号伝達タンパク質であるトランスデューサータンパク質(*p*HtrII)に信号が伝達されることで、細菌の青色光に対する忌避応答、負の走光性機能を発現する。*p*pR の活性発現メカニズムを理解する上で、細胞膜や温度などを生理条件に近い状態とした解析は極めて重要である。T204A, Y174F 変異体では走光性機能が失活することが分かっており[2]、本研究では Proton-Driven Spin-Diffusion (PDSD) 2D NMR 等の手法を用いて生理条件下で測定を行い、機能に重要と考えられるアミノ酸残基側鎖の ^{13}C 化学シフト値を帰属し、変異体との比較で活性発現に関連する構造変化の解析を行うことを目的とした。

固体NMR, 膜タンパク質, PDSD

○にしかわりょうた, かわむらいずる, おきつたかし, わだあきもり, すどうゆうき, かもなおき, ないとうあきら

【実験】本研究ではwild-type *pp*Rとその変異体であるT204A, D75N, Y199Fを調製した。目的タンパク質のプラスミドを導入した大腸菌BL21(DE3)株を、[15,20-^{13}C]レチナール, [ζ-^{13}C]Tyr, [ε-^{13}C]Lysを含むM9培地により培養し、各タンパク質を大量発現させ、精製することで^{13}C標識タンパク質試料を得た。これをEgg PC脂質膜（ゲル－液晶相転移温度：4℃）にタンパク質：脂質＝1：30（モル比）で再構成した。^{13}C 固体NMR測定は、この試料を4 mmのMASローターに詰め、Bruker 600 MHz Avance III 分光器を用いて、Glycine粉末のカルボキシル炭素の信号176.03 ppm（TMS 0 ppm）を基準とし、MAS回転周波数11.6 kHz、測定温度27℃で行った。

【結果と考察】^{13}C CP-MAS 1D NMRにより、*pp*Rとその変異体の[15,20-^{13}C]レチナール, [ζ-^{13}C]Tyr, [ε-^{13}C]Lysの信号を観測することに成功した。*pp*R中にはTyrが11残基存在するため、155～158 ppm付近にTyr由来の信号が重なって現れた。[ζ-^{13}C]Tyrの化学シフト値には水素結合や側鎖の構造変化が反映される。Y199FはTyr199がPheに変異しているため、Tyr199由来の信号のみが消えた。*pp*Rとの差スペクトルをとることで、155.5 ppmの信号をTyr199に帰属した(Fig.1)。Tyr199は*pp*Rと*p*HtrIIが複合体を形成する上で非常に重要なアミノ酸残基である。本実験は*pp*R単体で観測したものなので、*pp*R/*p*HtrII複合体形成時のTyr199の信号はAsn74$^{p\mathrm{HtrII}}$との水素結合による影響を受け、大きく変化すると考えられる。討論会までに複合体における信号変化を解析する予定である。

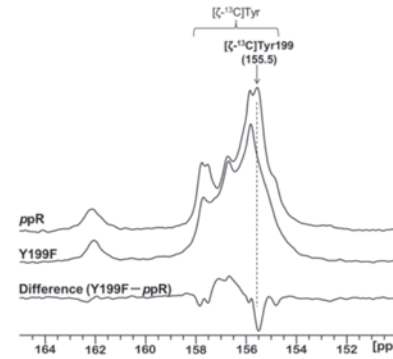


Fig.1 ^{13}C CP-MAS 1D NMR spectra of *pp*R and Y199F

次に、プロトン駆動スピン拡散(PDSD) 2D NMRによってレチナールとTyr174、及びLys205の^{13}C-^{13}C相関ピークを観測することに成功した。Lys205はレチナールとシッフ塩基結合をしており、Tyr174はレチナール近傍に存在するため、選択的にこれらアミノ酸残基のみとの交差ピークを観測できる。この結果から、*pp*Rの157.6 ppmの信号をTyr174に帰属した。同様の手法で帰属したT204AのTyr174の化学シフト値は158.5 ppmであり、*pp*Rと比較して約1 ppm低磁場シフトしていることが分かった(Fig.2)。これはレチナール近傍に位置するThr204がAlaに変異したことにより、Thr204とTyr174との間の水素結合が失われ、Tyr174の構造に変化が生じたことを示している。これにより*pp*Rの活性発現に不可欠である、Tyr174とレチナールとの相互作用が活性状態から変化するため、T204Aの機能が失活するという結論に至った。

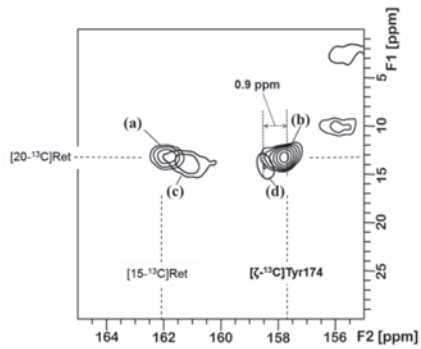


Fig.2 Comparison of PDSD 2D ^{13}C-^{13}C correlation peaks ;
(a) correlated peak of [15-^{13}C]Retinal with [20-^{13}C]Retinal in *pp*R
(b) correlated peak of [ζ-^{13}C]Tyr174 with [20-^{13}C]Retinal in *pp*R
(c) correlated peak of [15-^{13}C]Retinal with [20-^{13}C]Retinal in T204A
(d) correlated peak of [ζ-^{13}C]Tyr174 with [20-^{13}C]Retinal in T204A

4. 参考文献

[1] Y. Sudo & J.L. Spudich (2006) *PNAS.* **103**, 16129-16134
[2] Y. Sudo, Y. Furutani, H. Kandori, J.L. Spudich (2006) *J. Biol. Chem.* **281** 34239-34245

P50

カルシウムイオンを介したPradimicin Aのマンノース結合機構の固体NMR解析

○土井 崇嗣[1], 中川 優[2,3], 橋爪 大輔[4], 伊藤 幸成[3,5],
五十嵐 康弘[6], 竹腰 清乃理[1]
[1]京大院・理学研究科 [2]名大院・生命農学研究科 [3]理化学研究所
[4]理化学研究所 CEMS [5]JST ERATO [6]富山県立大・生物工学科

Solid-state NMR analysis of the Mannose binding structure of Pradimicin A through Ca^{2+} ion

○Takashi Doi[1], Yu Nakagawa[2,3], Daisuke Hashizume[4], Yukishige Ito[3,5], Yasuhiro Igarashi[6], K. Takegoshi[1]
[1] *Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.*
[2] *Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Aichi, Japan.*
[3] *Synthetic Cellular Chemistry Laboratory, RIKEN, Saitama, Japan.*
[4] *Center for Emergent Matter Science, RIKEN, Saitama, Japan.*
[5] *Japan Science and Technology, ERATO, Ito Glycotrilogy Project*
[6] *Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural University, Toyama, Japan*

Pradimicin A (PRM-A) is a natural antibiotic derived from actinomycete. PRM-A forms a dimer structure with Ca^{2+} ion, which binds D-mannopyranoside (Man) to form aggregate. We successfully determined the crystal structure of the dimeric Ca^{2+} complex of BMY-28864, a water-soluble analogue of PRM-A. Solid-state NMR analysis of the aggregate of PRM-A/Ca^{2+}/Man complex revealed that the crystal structure reflects the dimeric form of PRM-A in the ternary complex. Binding mode of PRM-A with Man was also analyzed by solid-state NMR.

Pradimicin A (PRM-A; Fig. 1) は放線菌から単離された抗生物質であり、非ペプチド性の低分子化合物であるにもかかわらず、Ca^{2+} 存在下でマンノース (Man) と特異的に結合する [1, 2]。PRM-A は現時点で Man 結合能を有する唯一の低分子化合物である上、Man 結合に由来するユニークな抗 HIV 活性および抗菌活性 [3] を示すことから、天然物化学、創薬化学、糖鎖科学など多くの研究分野で注目されている化合物である。

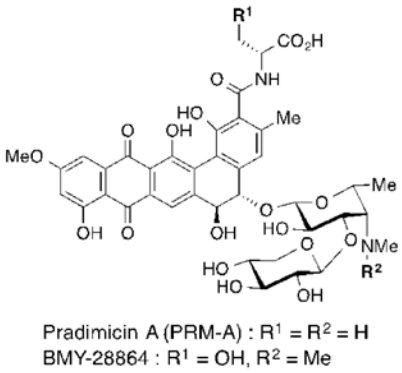
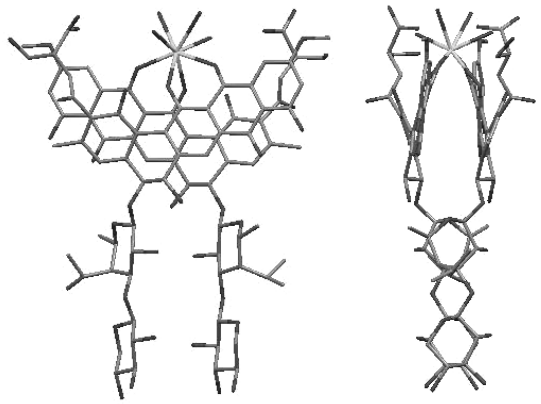


Fig. 1 PRM-A and BMY-28864

キーワード：固体 NMR、Pradimicin A、分子間相互作用

○どい たかし、なかがわ ゆう、はしづめ だいすけ、いとう ゆきしげ、
いがらし やすひろ、たけごし きよのり

(A) (B)



Front View Side View

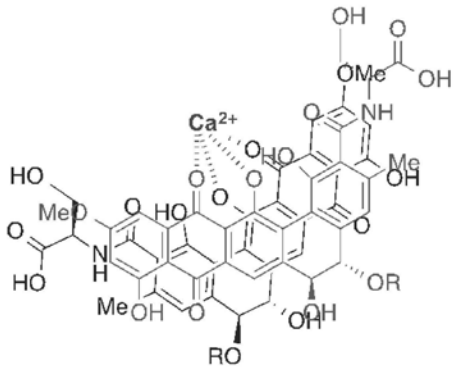


Fig. 2 (A) Crystal structure of the Ca^{2+} complex of BMY-28864. (B) Schematic representation of the dimeric structure of BMY-28864.

しかし、PRM-A は Ca^{2+} および Man 存在下で高い凝集性を示す上、溶液中では Ca^{2+} および Man と複数の複合体を形成することから、PRM-A がどのように Man を認識しているのかの解明は困難であった。

これまでに我々は PRM-A の凝集性を逆に利用して、様々な部位を ^{13}C 標識した PRM-A および Man を用いて単一の複合体を凝集体として調製し、固体 NMR による解析を行ってきた。その結果、PRM-A が Ca^{2+} を介して Man と結合すること、また Ala 部分から芳香族環に渡る領域が Man 結合部位であることを明らかにしてきた [4]。

今回我々は新たに、PRM-A の水溶性アナログ・BMY-28864 (Fig. 1) [5] の Ca^{2+} 複合体の結晶を得る事に成功した (Fig. 2)。この結晶構造に基づき、PRM-A/Ca^{2+}/Man 複合体の構造を固体 NMR で解析したところ、PRM-A は BMY-28864 の結晶構造に対応する二量体構造を形成していることが明らかになった。さらに、PRM-A と Man の結合様式に関しても固体 NMR 解析を進めたので、その結果についても報告する。

今後は X 線結晶構造解析と固体 NMR 解析の結果を基に、PRM-A/Ca^{2+}/Man 複合体の構造を明らかにしていく予定である。また単糖だけでなく多糖を用いた複合体を調製し、その構造を解析することで PRM-A の持つ抗 HIV 活性および抗菌活性のメカニズムを解明することができるのではないかと考えている。

References

[1] T. Oki, M. Konishi, K. Tomatsu, K. Tomita, K. Saitoh, M. Tsunakawa, M. Nishio, T. Miyaki, H. Kawaguchi, *J. Antibiot.* 1988, **41**, 1701-1704.

[2] a) Y. Sawada, K. Numata, T. Murakami, H. Tanimachi, S. Yamamoto, T. Oki, *J. Antibiot.* 1990, **43**, 715-721; b) Y. Fukagawa, T. Ueki, K. Numata, T. Oki, *Actinomycetol.* 1993, **7**, 1-22.

[3] J. Balzalini, *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, **5**, 583-597.

[4] a) Y. Nakagawa, Y. Masuda, K. Yamada, T. Doi, K. Takegoshi, Y. Igarashi, Y. Ito, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, **50**, 6084-6088; b) Y. Nakagawa, T. Doi, Y. Masuda, K. Takegoshi, Y. Igarashi, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 17485-17493.

[5] Y. Nakagawa, T. Doi, K. Takegoshi, Y. Igarashi, Y. Ito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, **22**, 1040-1043.

P51

*In-situ*光照射-固体NMRによるバクテリオロドプシンY185F変異体の光サイクルとO-中間体の解析

○大島恭介[1], 重田安里寿[1], 槙野義輝[1], 川村出[1], 沖津貴志[2], 和田昭盛[2], 辻暁[3], 内藤晶[1]
[1]横浜国立大学大学院・工学府
[2]神戸薬科大学
[3]兵庫県立大学大学院・生命理学研究科

Analysis of O-intermediate in the photocycle of Y185F mutant in Bacteriorhodopsin by *in-situ* photo-irradiation solid-state NMR

○Kyosuke Oshima[1], Arisu Shigeta[1], Yoshiteru Makino[1], Izuru Kawamura[1], Takashi Okitsu[2], Akimori Wada[2], Satoru Tuzi[3], Akira Naito[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan*
[2]*Kobe Pharmaceutical University, Japan*
[3]*Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Japan.*

Bacteriorhodopsin (bR) is seven-transmembrane protein containing 248 amino acid residues and chromophore retinal in a purple membrane of *H. salinarum.* When bR absorbs photo, retinal in bR is photoisoimerized and bR transfer a proton from cytoplasmic side to extracellular side during the photocycle starting from ground state though K, L, M, N and O-intermediates. In this photocycle, it is difficult to trap O-intermediate because of its short half life, and hence its detailed structure has not revealed yet. Here, we using *in-situ* photo-irradiation solid-state NMR because the half life is very long characterize the O-intermediate of [15, 20-^{13}C]Ret-[1-^{13}C]Tyr-Y185F-bR. As a result, we could successfully trap the O-intermediate by irradiating green light (520 nm), and could determine the chemical shift value of [15, 20-^{13}C]Retinal.

【序論】

バクテリオロドプシン(bR)は高度好塩菌の紫膜中に存在する7回膜貫通タンパク質であり、248アミノ酸残基と発色団レチナールからなる。bRはレチナールの光励起により異性化し、K, L, M, N, O-中間体を経て基底状態に戻るフォトサイクル反応を示し、プロトンを細胞質側から細胞外側へ能動的に輸送する。しかし、フォトサイクル中のO-中間体は不安定であるため捕捉することが困難である。そのため詳細な構造情報が明らかになっていない。そこで、本研究ではO-中間体を長寿命化させた変異体であるバクテリオロドプシンY185Fについて当研究室で開発した*in-situ*光照射-固体NMRシステムを用いることによって、O-中間体を安定に捕捉しレチナールおよびタンパク質の局所構造変化の解析を行うことを目的とした。

バクテリオロドプシン, 固体NMR,

○おおしまきょうすけ, しげたありす, まきのよしてる, かわむらいずる, おきつたかし, わだあきもり, つじさとる, ないとうあきら

【実験】

高度好塩菌を[1-^{13}C]Tyr, [^{15}N]Trpを含む安定同位体標識した培地で培養し、Y185F変異体bRを大量発現させ、精製した。[15,20-^{13}C]レチナールの再構成を行うことにより、[15,20-^{13}C]Ret-[1-^{13}C]Tyr-[^{15}N]Trp-Y185F-bR試料を調製した。それを5 mM Tris, 300 mM NaCl, pH9のバッファーに置換し、十分に水和したペレットを調製した後、ジルコニアローターに入れ、ガラスキャップで封じ、連続光照射下で固体NMR測定を同時に行った。測定条件として、MAS周波数を4.0 kHz、測定温度を-40℃とし、CP-MAS法を用いた。また、光源として緑色LED光（520±5 nm）を用いた。まず暗順応状態でNMR測定を行い、次に緑色LED光の連続照射を行い、基底状態を励起し中間体を生じさせた。その後、LED光の照射を止め、再び暗条件でNMR測定を行い、NMR信号の変化を観測した。

【結果・考察】

[15,20-^{13}C]Ret-[1-^{13}C]Tyr-[^{15}N]Trp-Y185F-bR試料を暗条件、-40℃においてNMR測定を行うことで、暗順応(DA)スペクトル (Fig.1(a)) を得た。次に、緑色LED光を連続照射してNMR測定を行い、光励起状態(Green light)スペクトル(Fig.1(b))を得た。その後、LED照射を切断し暗条件で測定することにより、明順応(LA)スペクトル (Fig.2(b)) を得た。

Fig.1(a)より、暗順応状態において21.7 ppmと13.2 ppmの信号がおよそ4:1で観測された。ここで、21.7 ppmは13-*cis*, 15-*syn*、13.2 ppmはall-*trans*の信号であると帰属している。また、Fig.1(c)は光照射を行った際の暗順応から光励起状態への変化を示す差スペクトルであるが、ここから光照射中において13-*cis*型のものがall-*trans*型と光中間体であるN-中間体の両方へ変化していることが示された。

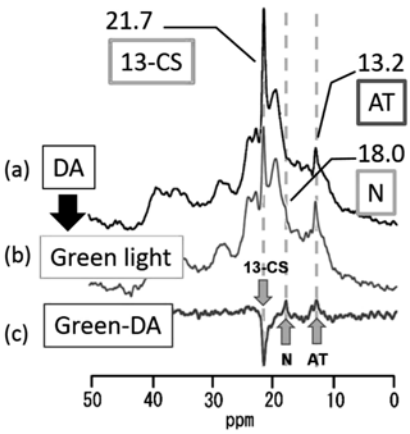


Fig.1 [20-^{13}C]Ret NMR spectrum
DA → Green light

Fig.2では光励起状態から明順応への変化を示すスペクトルを得た。ここでは、光照射により生成されたN-中間体がO-中間体へと変化したことが示された。

また、[15-^{13}C]Retの信号においてもO-中間体に由来する信号の変化が得られた。これにより、Y185F-bR中のO-中間体における15,20-^{13}Cレチナールの NMR信号の帰属に初めて成功した。

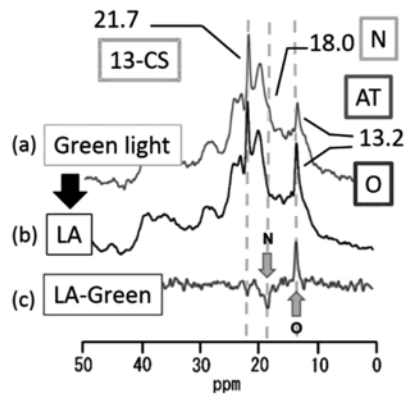


Fig.2 [20-^{13}C]Ret NMR spectrum
Green light → LA

【結論】

*In-situ*光照射-固体NMRを用いることによって、通常では測定できない光活性中間体を安定に捕捉し構造決定が可能になったことが示された。現在は更に詳細なO-中間体のレチナールに関する情報とタンパク質の局所構造変化の解明に取り組んでいる。

P52

*In situ*光照射固体NMRによる光受容センサー膜タンパク質sensory rhodopsin Iの波長依存的な光反応過程の解析

○槙野　義輝[1]、四方田　洋樹[1]、友永　雄也[1]、日高　徹朗[1]、
川村　出[1]、沖津　貴志[2]、和田　昭盛[2]、須藤　雄気[3]、
内藤　晶[1]
[1]横浜国大・院工, [2]神戸薬大, [3]岡山大・院医歯薬

Color-discriminating photocycle of sensory rhodopsin I as revealed by *in situ* photo irradiation solid-state NMR

○Yoshiteru Makino[1], Hiroki Yomoda[1],Yuya Tomonaga[1], Tetsurou Hidaka[1],
Izuru Kawamura[1], Takashi Okitsu[2], Akimori Wada[2],Yuki Sudo[3], and Akira Naito[1]
[1]*Grad. Sch. Emg, Yokohama Natl Univ.*
[2]*Kobe Pharm Univ.*
[3]*Grad, Sch, Med, Debt, Pharm, Okayama Univ..*

Sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber* (*Sr*SRI) is a photo receptor membrane protein with a retinal as a chromophore. *Sr*SRI transfers signal to the cytoplasmic side and express multiple functions for negative and positive phototaxis during photocycle. To reveal the photoreaction pathway, we measured ^{13}C NMR signal under the photo irradiation condition using *in situ* photo irradiation CP-MAS NMR. We have also implemented the photo irradiation system to apply color-selective photo-irradiation system. We demonstrated that the conformational change of retinal occurred under the photo illumination. Under the green light illumination, the retinal configuration changed from all-trans (13.8 ppm) of ground state to 13-cis (19.8 ppm) of M-intermediates. After the accumulation of M-intermediates, under the UV light illumination, 13-cis (19.8 ppm) transferred to 24.8 ppm of P-intermediate. Interstingly, NMR-signal of ground state directly changed to that of P-intermediate, under UV light illumination. These results showed color-discriminating pathways of *sr*SRI such as G→M (green light), M→P (UV light), G→P (UV light).

［序論］

Sensory rhodopsin Iは微生物の膜中に存在するセンサー型膜タンパク質であり、フォトサイクルと呼ばれる特有の光反応経路を経て、正および負の光走性を示す多機能性をもつタンパク質である。SRIの信号伝達機構はシッフ塩基結合したレチナールの光異性化により引き起こされるが、膜タンパク質であるSRIの光刺激に対応した構造変化は、SRIが不安定であり、膜中のタンパク質の構造解析が困難であるため、その光反応経路の詳細は解明されていない。そこで、安定な*Salinibacter ruber* 由来の*Sr*SRIのレチナールについて、*in situ*光照射固体NMR装置を用いて光照射下でNMR測定を行った。

in situ　光照射固体NMR, 膜タンパク質, レチナール

○まきのよしてる，よもだひろき，ともながゆうや，　ひだかてつろう，
かわむらいずる，おきつたかし，わだあきもり，すどうゆうき，ないとうあきら

[実験方法]

*Sr*SRIは*E. coli* (BL21)を用いて発現し、[20-^{13}C] retinal標識*Sr*SRIを脂質二重膜であるPG膜に*Sr*SRI : PG膜＝1 : 30のモル比で再構成し測定用試料とした。

再構成後の試料を*in situ*光照射固体NMR法[1]によって光照射下で^{13}C NMRスペクトルを測定した。光源はLED光を使用し、光ファイバーを用いて試料管に直接光を導入した。光ファイバーをNMR試料管に非接触とすることで、マジック角回転数4 kHzで試料を高速回転しながら光照射下で、^{13}C CP MAS NMR測定を行った。本実験では、さらに複数のLED光源(520 nm、595 nm,365 nm)をインストールして多波長での光照射実験を可能にした[2]。

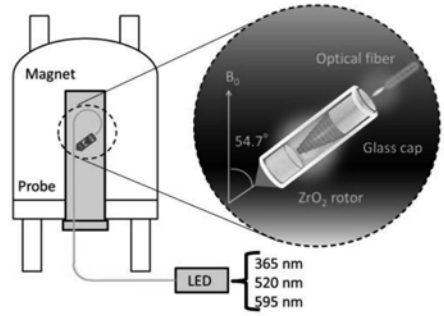


Fig. 1 Photo irradiation solid state NMR system [2]. The three wavelength (520 (green), 595(orange), 365(blue) nm) can be easily switched during measurements.

[結果と考察]

*Sr*SRIの中間体への異性化は吸収光の波長に依存するため、*Sr*SRIの光反応過程を解明するために、選択的に3つの波長を使用することで、光照射下でのレチナールの化学シフト値の変化を測定した。

基底状態(G-state)の*sr*SRIに－40℃で520 nmの光照射条件で^{13}C NMR測定をしたところ、G状態(13.8 ppm)の信号の減少とそれに伴うM中間体(19.8 ppm)の信号の増加が観測できた(Fig.2 A)。測定は光照射下で行っているため、520 nmの光照射下で定常的にM中間体を捕捉できたことが確かめられた。十分にM中間体を溜めた状態で、光源を365 nmに切り替えたところ、M中間体は減少し、24.8 ppmの信号が増加した(Fig. 2 B)。この信号は*Sr*SRIの負の光走性に関わるP中間体であると同定でき、また化学シフト値からP中間体のレチナールの構造は13-cis型であることが決定できた。この実験により、G→(520 nm)→M→(365 nm)→Pの光反応経路が確かめられた。さらに、G状態に365 nmを直接照射したところG状態(13.5 ppm)の信号はP中間体を表す25 ppm付近に移動した。これは、1光子過程(G→P)によるP中間体の捕捉を示唆している。以上より、光照射固体NMRを用いることによって、*Sr*SRIの波長依存的なフォトサイクルを決定し(Fig.3)、複数の波長の光を用いた新たな光照射システムの有用性を示す結果が得られた。

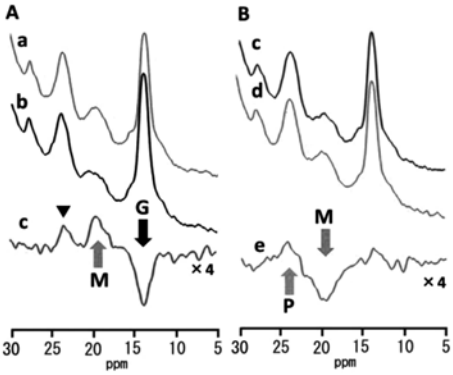


Fig. 2 ^{13}C NMR spectra of retinal in *Sr*SRI, (A) in green light illumination(a), the dark(b) and green minus dark(c). (B) in blue(c), green(d) light illumination and blue minus green(e).

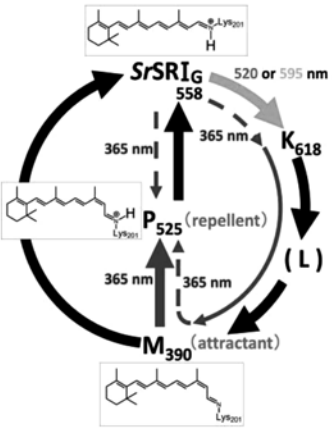


Fig. 3 Photo cycle of *Sr*SRI [2]

[1]Y. Tomonaga. et al. (2011) *Biophys. J.* **101,** L50-L52.

[2]H. Yomoda, Y. Makino et al. (2014) *Angew. Chem. Int. Ed.* 53(27) 6960-6964.

P53

固体NMR REDOR法によるヒトカルシトニンのアミロイド線維構造解析

○豊田修平[1]、Lkhamsuren Ganchimeg[1,2]、Namsrai Javkhlantugs[2]、渡邉(伊藤)ひかり[1]、川村出[1]、上田一義[1]、内藤晶[1]
[1]横浜国立大・院工
[2]モンゴル国立大

Fibril structure of human calcitonin as studied by solid-state NMR

○Shuhei Toyoda[1], Lkhamsuren Ganchimeg[2], Namsrai Javkhlantugs[1,2] Hikari Itoh-Watanabe[1], Izuru Kawamura[1], Kazuyoshi Ueda[1], Akira Naito[1]
1.Grad.Sch.Eng., Yokohama Natl. Univ. 2 Mongolia Natl. Univ.

Human calcitonin (hCT) is a peptide hormone consisting of 32 residues which is secreted by thyroid gland. However, it easily forms amyloid fibril which lose the same function as hCT and is suspected neurotoxicity. In this study, we determined the structure of full –lengh hCT fibril grown in phosphate buffer at pH7.5 by meaturing ^{13}C-^{15}N internuclear distance of [1-^{13}C]Phe^{16}, [^{15}N]Phe^{19}-hCT using REDOR method in solid-state NMR. REDOR results indicated that Phe^{16} and Phe^{19} located one residue away registry in the antiparallel β-sheet strand. MD simulation was performed in the determinated structure and results indicate that the fibril structure is stabilized by π-π, π-anion and π-cation interactions of aromatic sidechain between inter-strand.

【序論】hCTは人体の甲状腺より分泌されるホルモンであり、骨にある破骨細胞に作用し、骨からのCaの放出を防ぐ。しかし水溶液中でミスフォールディングを起こし、クロスβ-シート構造からなる「アミロイド線維」を形成することが知られている。これが蓄積することで細胞死が起こり、アミロイド病を引き起こすと考えられている。例えばアルツハイマー病はアミロイドβ、狂牛病はプリオンタンパクが原因物質であるとされる。また近年では、アミロイド線維中間体に神経毒性があることも疑われている。

hCTにおいてもその線維が、「破骨細胞に対する不活性化」、「線維中間体による細胞破壊」、「甲状腺髄様癌の誘発」など生体に対して悪影響を与える可能性がある。そのため線維形成のメカニズムを知るために、線維のより詳細な構造を明らかにすることは非常に重要である。また構造を調べることでそれを安定化させている要因が分かれば、線維形成を抑制する手がかりとなり、骨粗鬆症に対する治療薬の開発にもつながると考えている。

本研究では、固体 NMR の REDOR 法を用いることで特定の異種核間の距離を測定し、hCT アミロイド線維のより詳細な構造を解析した。

REDOR、アミロイド、ヒトカルシトニン

○とよだしゅうへい、るくはむすれんがんちめぐ、なむすらいじゃぶからんたぐす、わたなべ（いとう)ひかり、かわむらいずる、うえだかずよし、ないとうあきら

【実験方法】固相合成法により[1-^{13}C]Phe^{16}、[^{15}N]Phe^{19}-hCT を合成し、脱保護、液体クロマトグラフィー、空気酸化、液体クロマトグラフィーの順で試料を精製した。この試料を中性条件の溶媒で 1 日撹拌することでアミロイド線維を作成した。その後集めた線維の ^{13}C-^{15}N 核間の距離を観測核[^{15}N]として固体 NMR の REDOR 法により測定した。REDOR 法は MAS が 1 回転する間にπパルスを与えることで原子間の双極子相互作用を復活させ、これによるスペクトルのピークの減少から原子間の距離を決定できる手法である (Fig.1)。

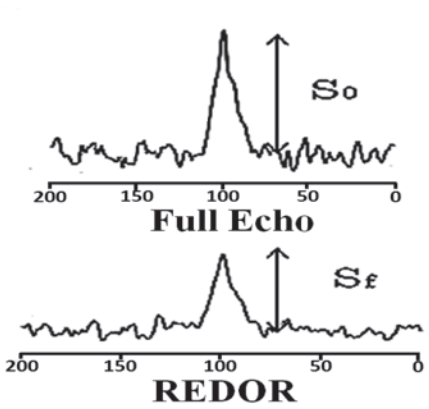


Fig.1 ^{15}N REDOR experiments of hCT

今回、ストランド A の[1-^{13}C]Phe^{16}、ストランド B の[^{15}N]Phe^{19}、ストランド C の[1-^{13}C]Phe^{16} の 3 スピン系であるため、REDOR の解析には A-B,B-C 間の距離に加えて A-B-C 角の情報が必要である。そこで HGS 分子模型による角度と距離の情報をもとに Phe^{16}、Phe^{19} がどれだけずれた位置にあるかを解析した。また PC の MD による計算シミュレーションを用いて、中性条件下の線維内におけるペプチド側鎖間の相互作用の有無を調べた。

【結果・考察】先行研究において hCT の線維形成中心 5 残基 ^{15}DFNK^{19}F での REDOR 実験を行った際、ピークの減少が見られた[1]。N 端と C 端のそろった平行βシート構造では C-N 間の距離が遠く NMR ピークの減少が起こらないため、逆平行βシート構造をとっていると考えられた。その場合ストランド間で Phe^{16} と Phe^{19} が 1 残基ずれた位置にあることが明らかになっていた。今回線維全長において同様の REDOR の実験を行ったが、同じく Phe^{16} と Phe^{19} が 1 残基ずれた位置に存在する逆平行βシート構造をとっている結果が得られた (Fig.2)。

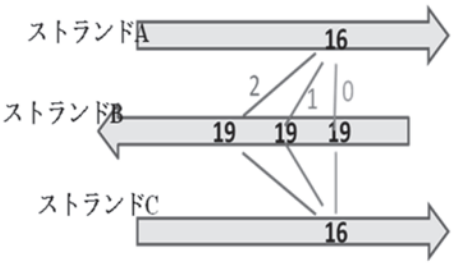


Fig.2 Distance of β-strands

また MD のシミュレーションを行った結果、側鎖間における芳香環同士を利用したπ-π 相互作用、芳香環とプラス電荷を利用したπ-カチオン相互作用、芳香環とマイナス電荷を利用したπ-アニオン相互作用などが存在している事が判明し、線維の構造を安定化させている事が分かった。また逆平行βシート構造であるとき、側鎖を利用した相互作用がより多く存在することが明らかになった。

以上の結果を考慮し、中性条件における線維では Phe^{16} と Phe^{19} がストランド間で 1 残基離れた逆平行βシート構造をとっている事が明らかになった。

これらの結果は hCT やその他のアミロイド線維形成のメカニズムを知るために有用な線維の構造情報である。

[1] A. Naito, et al. *(2004) Magn. Reson. Chem. 42: 247–257*

P54

家蚕絹の繊維化後構造と再生医療材料の開発に関するＮＭＲ研究

○新井裕喜[1], 大畑卓也[1], 奥下慶子[1], 青木昭宏[1], Anne S Ulrich[2], 朝倉哲郎 [1]

[1]農工大院工 [2]カールスルーエ大学理

NMR studies on structure of *Bombyx mori* silk fibroin after spinning and development of silk for biomaterial.

○Hiroki Arai [1],Takuya Ohata[1], Keiko Okushita[1], Akihiro Aoki[1], Anne S Ulrich[2], and Tetsuo Asakura [1]

[1] *Department of Biotechnology, Tokyo University of Agri and Tech, Tokyo, Japan.*

[2] *Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany.*

On the basis of our NMR studies on Silk II structure (The structure of *B. mori* silk fibroin after spinning), conclusive structure was proposed. The structure is very heterogeneous; Ala methyl peak of the ^{13}C CP/MAS NMR spectrum consists of five peaks. Especially, two peaks in the crystalline fraction correspond to two kinds of anti parallel β-sheet structure with different inter-molecular arrangements proposed here. During the process for structural determination, we clearly denied previous Silk II structural models including Marsh-Pauling model from the NMR data of *B. mori* silk fibroin and model compounds. Thus, ^{13}C solid state NMR spectra of *B. mori* silk fibroin after several processing treatment for development of biomaterials can be used for monitoring the structure and structural change through the determination of the fraction of these peaks. The biomaterials have been usually used *in vivo*. Therefore the effect of water to the silk structure was studied from change in the ^{13}C CP/MAS NMR spectrum together with study on interaction between silk fibroin and water molecules.

［緒言］

家蚕絹フィブロインは、長年にわたり、外科用の縫合糸として体内に埋め込まれて用いられており、優れた再生医療材料としての可能性を有している。実際、現在、様々な再生医療材料への応用研究が盛んにおこなわれるようになってきた。絹フィブロインは、高い強度と適度な弾性や柔軟性を持つとともに高い生体親和性を有する、様々な形状に容易に加工できる、含水状態では高い酸素や水蒸気の透過性を有する等、多くの再生医療材料としての優れた特性を有している。その開発に当たっては、加工後の構造や各種プロセッシングに伴う構造転移を詳細に把握することが重要となる。

本研究は、固体NMRを用いて行った家蚕絹フィブロインの繊維化後の不均一構造の解析、特にその中で、結晶部分の詳細な構造について述べる。その解析の過程で、従来のMarsh-Paulingの提案構造は明確に否定された。さらに、固体NMR解析法を用いて、含水状態ならびに再生医療材料への応用に向けて各種処理を施した家蚕絹フィブロインの構造解析を行ったので報告する。

Solid state NMR, *Bombyx mori* silk fibroin, β-sheet Structure

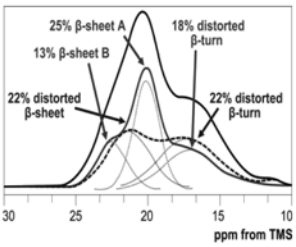
○あらいひろき，おおはたたくや，おくしたけいこ，あおきあきひろ，Anne S Ulrich，あさくらてつお

［実験］

家蚕絹結晶部モデルペプチドとしてF-moc固相合成法により(AG)$_{15}$を合成した。その際、各種安定同位体ラベル化を行った。得られたモデルペプチドを9MLiBrに溶解・透析後、得られた沈殿をギ酸に溶解させ、乾燥させたものを繊維化後のSilkⅡ型結晶部とした。各種^{13}C CP/MAS NMR, DD/MAS NMR, 固体^{1}H MQMAS NMR等を測定した。更に、再生医療材料への応用を念頭に、家蚕絹フィブロイン繊維や絹スポンジについて、含水状態あるいはグリセリン存在下で、固体NMRの測定を行った。その際、必要に応じて試料の^{13}C選択的ラベル化を行った。

［結果・考察］

家蚕絹フィブロイン繊維（SilkⅡ型構造）の^{13}C CP/MAS NMRスペクトルにおいて、アラニンのメチル領域のスペクトルを示した(Fig.1)。５本のピークから成り、Fig中に示したように帰属されてきた。そこで、本研究では、キモトリプシン処理後の沈殿部である結晶部中の結晶構造、ＡとＢの構造(Fig.1中)を、各種安定同位体ラベルモデル化合物および各種固体NMRを用いて決定した。



Fig,1 ^{13}C CP/MAS NMR spectrum of *B.mori* silk fibroin (Silk II) (Ala Cβ expanded)

Fig.2には、(a) Marsh-Paulingモデル　(b) Fig.１の結晶A構造、(c)) Fig.１の結晶B構造モデルをまとめた。結晶構造、ＡとＢの分率は、絹繊維では、おおよそ２：１であるが、家蚕絹フィブロインの処理条件によって変化する。これらの構造モデルの詳細な構造および構造の違い、ならびにMarsh-Paulingモデルの否定については、ポスター発表で述べる。

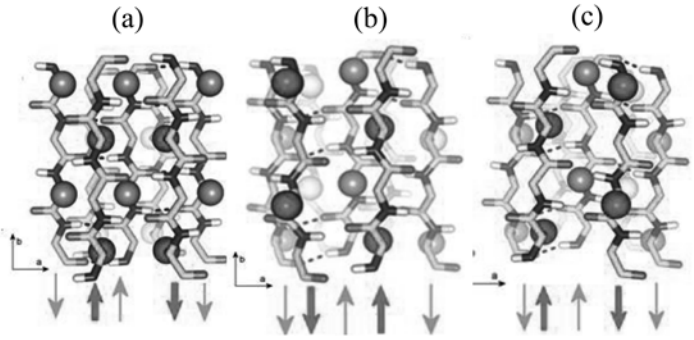


Fig.2 Crystal structures of *B.mori* silk fibroin (Silk II). (a) Marsh-Pauling model, (b) Our model (A) and (c) Our model (B)

このように、アラニンのメチル領域に着目し、その各ピーク強度の変化から、家蚕絹フィブロインの構造および構造変化を追跡できる。

そこで、さらに、家蚕絹フィブロインについて、プロセッシング処理に伴う構造変化の例について検討した（Fig.3）。含水状態あるいはグリセリン存在下でのメチル領域の変化を示した。例えば、含水に伴い、ランダム構造の分率が増加するとともに、際立って、シャープなランダムコイルピークが出現する。詳細な解析は、ポスター発表にて述べる。

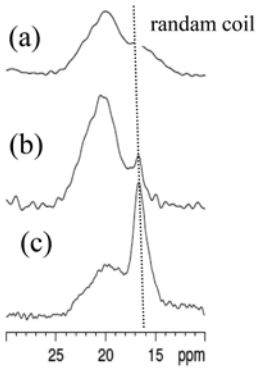


Fig.3 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of *B.mori* silk fibroin (Silk II) (Ala Cβ expanded).
(a) Dry state (b) Wet state and (c) Dry state with glycerin

【謝辞】本研究は一部、農林水産省「アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト」ならびに、科学研究費基盤研究A(23245045, 26248050)および挑戦的萌芽研究(2562169)により、実施された。

P55

固体NMRにおける常磁性緩和促進を用いたタンパク質立体構造解析

○田巻初[1]，江川文子[2]，木戸浩貴[1]，亀田倫史[3]，神谷昌克[1]，
菊川峰志[1]，相沢智康[1]，藤原敏道[2]，出村誠[1]
[1]北海道大学・大学院生命科学院
[2]大阪大学・蛋白質研究所
[3]産業技術総合研究所・ゲノム情報研究センター

Application of paramagnetic relaxation enhancement for protein structure analysis by solid-state NMR

○Hajime Tamaki[1], Ayako Egawa[2], Kouki Kido[1], Tomoshi Kameda[3], Masakatsu Kamiya[1], Takashi Kikukawa[1], Tomoyasu Aizawa[1], Toshimichi Fujiwara[2] and Makoto Demura[1]
[1] Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
[2] Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.
[3] Computational Biology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo, Japan.

To determine the protein fold, the collection of long distance restraints is crucially important. However, detection of the ^{13}C signals from which those restraints in uniformly ^{13}C labeled proteins are derived is difficult, because the magnetization transfer across a long distance (through space) dipolar coupling is quenched by dipolar truncation. In addition, peak line broadening impedes accurate side-chain chemical shift assignment.

Paramagnetic relaxation enhancement (PRE) provides long-range distance restraints up to ~20-25 Å. Also, PRE distance restraints can be readily obtained from peak intensity. On the other hand, they are less quantitative than conventional restraints. We successfully overcome this problem using CS-Rosetta fragment assembly method based on knowledge of local structure from chemical shifts and physical chemistry of protein folding.

タンパク質の立体構造をNMR法で決定する際、遠位の距離情報はそのフォールドを決定するために重要である。固体NMR法では、距離情報はスピン拡散から得ることが主流である。しかし、双極子トランケーションや信号の重なりによる帰属の困難さから、構造決定に必要な距離情報の収集は非常に難しい。

この問題を解決するために、常磁性緩和促進(PRE)が注目されている。PREは不対電子によって核の緩和が促進される現象で、その効果は電子-核間距離に依存する。スペクトルには信号強度の減衰や線幅の増大として現われるため、信号強度を解析することで容易に距離情報を得ることができる。主鎖相関測定のようなシンプルな相関測定から情報を得られることもメリットである。PREのデメリットは定量性に乏しいことである。これはPREの影響は電子-核間距離のマイナス6乗に比例することに起因す

立体構造解析，常磁性緩和促進

○ たまきはじめ，えがわあやこ，きどこうき，かめだともし，かみやまさかつ，きくかわたかし，あいざわともやす，ふじわらとしみち，でむらまこと

る。PREのメリットを最大限に活用し立体構造解析するには、定量性に乏しい距離情報を効率的に利用できる計算手法が必要となる。

そこで我々はタンパク質立体構造予測プログラムRosettaに着目した。Rosettaは構造既知のタンパク質の部分構造(フラグメント)を組み合わせることで立体構造を予測する。近年、Rosettaを用いることで、溶液NMR法の化学シフトやメチル-メチルNOE等の限られた構造情報から立体構造が決定可能であることが実証された(Lange *et al.*, 2012)。我々はRosettaと固体NMR法の化学シフト、PRE構造制限を組み合わせることで立体構造を決定できるか、Protein G B1-domain(GB1)を用いて検討を行なった。

実験方法 [U-^{13}C, ^{15}N]GB1-N8C, E19C, T53C変異体それぞれのチオール基にMn^{2+}またはZn^{2+}を付加した[S-(2-pyridylthio)cysteaminyl]EDTAを結合させた(以下、GB1-N8, E19, T53EDTA-M, M = Mn^{2+}, Zn^{2+}と表記)。分子間PREを抑制するために、3モル当量の非標識GB1を加えた後、バッチ法で微結晶を調製した。これらを3.2 mmローターに詰め、GB1-N8, E19EDTA-MはVarian Infinity plus 600 MHz, GB1-T53EDTA-MはJEOL RESONANCE ECA600IIで測定した。測定中のプローブ温度は-10 ℃、MAS速度は12.5 kHzとした。パルスシーケンスは2D 13C-13C DARRを用い、混合時間は20 msとした。

PRE構造制限は、Mn^{2+}体とZn^{2+}体のCα-C’相関ピークの強度比を計算し、0.2以下のものはEDTA導入残基のCβとCαの距離が15 Å以内、それ以上のものは10 Å以上とした。

Rosettaの計算で用いたフラグメントライブラリはCS-Rosetta Toolboxを用い、微結晶GB1の化学シフト(BMRB 15156)を入力して構築した。103個のPREの構造制限を用い、フラグメントアセンブリー計算を行い、5000個の構造を発生させた。

結果・考察 PRE構造制限を加えたことで、最小スコア構造と結晶構造(PDB ID: 2GI9)のCα-RMSDが1.5 Åから1.3 Åに向上した。また、結晶構造に近い構造が効率的にサンプリングされたこと、低RMSD構造と高RMSD構造のスコア差が増加したことも明らかとなった(Fig. 1)。特にスコア差の増加はサンプリング効率の向上や正しい構造の選択に重要となる。そこでその原因を明らかにするためにRosettaスコアを分析した。その結果、PRE構造制限を加えた際に生成される高RMSDの構造は、二次構造のパッキングに関するスコアが構造制限ない場合に比べて高いことが判明した。つまりPRE制限を満たし、且つタンパク質として妥当な構造は結晶構造付近に限られることを示している。また、立体構造計算ソフトXPLOR-NIHによって、Rosettaに用いたものと同じPRE構造制限とTALOS+によって得られた二面角制限を用いて立体構造計算を行なったが、正しい構造は得られなかった。

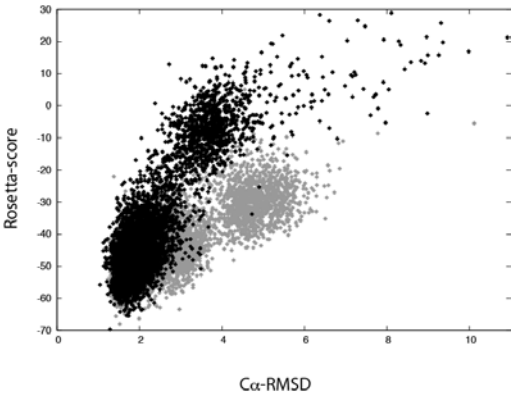


Fig. 1 Energy landscapes of the structures generated with (black) and without (gray) PRE restraints

以上より、Rosettaのスコア関数に含まれるタンパク質フォールディングの物理化学的な知見を援用することで、固体NMR法の化学シフトとPRE構造制限のみの限られた構造情報から効率的に構造決定できることが明らかとなった。

P56

化石由来生薬「竜骨」の固体NMRによる分析

○宮久保圭祐[1,2]，小栗一輝[3]，高橋京子[1,3]，上田貴洋[1,2]
[1]大阪大学総合学術博物館
[2]大阪大学大学院理学研究科
[3]大阪大学大学院薬学研究科

Analysis of a crude drug “Longgu” originated from animal fossil by solid-state NMR

○Keisuke Miyakubo[1,2], Kazuki Oguri[3], Kyoko Takahashi[1,3], and Takahiro Ueda[1,2]
[1]*The Museum of Osaka University.*
[2]*Graduate School of Science, Osaka University.*
[2]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University.*

Longgu is a crude drug originated from animal fossil, and has been used for a long time in oriental medicine. Because of rareness of resources, scarcity of longgu becomes serious problem, and we require exploration of substitute candidates immediately. Solid-state NMR will help us to understand the microscopic information such as the local structure, the intermolecular interaction, dynamic features of adsorbed species and so on. ^{1}H static and MAS NMR spectra show existence of several types of proton, of which ratios vary according to drying or heating treatment with hot water and other herbal drugs.

「竜骨」は動物の骨化石に由来する生薬で、その資源が稀少化しているため代替品の開発が緊急な課題となっている[1)]。また古くから使用されている生薬であり、医療文化財とみるべき資料も保管されている。竜骨を医薬品として用いる場合には、漢方薬を構成する他の生薬とともに煎じた湯液(煎薬やエキス剤)が服用される。しかしながら竜骨の基原や薬理作用機構は未だに明らかになっているとはいえない。「竜骨」の代替品の開発研究を進める上で、竜骨の構成成分や組成、吸着分子の動態や状態、生薬として使用されるときの化学的及び物理的変化などを、総合的に調べることが不可欠である。本研究では竜骨試料が、乾燥や熱水抽出などの処理を加えることによりどのように変化するかに着目して研究を実施した。

竜骨の測定試料には日本市場品(日本薬局方適合品「リュウコツ」３ロット)を用いた。外観は図1に示すように数mm大の白色の破片として提供されている。骨の中での部位の違いにより外観にはかなり多様性がみられ、この資料には本質的に性質の分布があることを考慮する必要がある。固体NMRの測定のために、試料を無作為に取り出して粉砕し粉末にした。竜骨が配合された漢方薬・桂枝加竜骨牡蠣湯(他の漢方生薬を組み合わせて熱水抽出処理をした試料)、竜骨のみを熱水抽出処理した試料の測定も行った。（前者では試料表面に他の生薬の影響による着色が見られた）

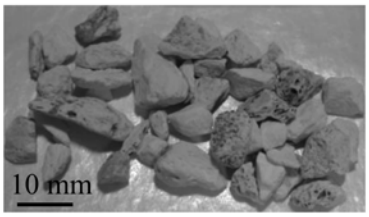


Fig. 1 Typical market samples of longgu.

Solid-state NMR, Longgu, Crude drug

○みやくぼけいすけ，おぐりかずき，たかはしきょうこ，うえだたかひろ

NMR の測定は^{1}H 周波数 200 MHz（^{13}C 50 MHz）で、Bruker 製 ASX, DSX分光器を用いて行った。化学シフト値には^{13}Cではグリシン粉末(C=0 176 ppm)、^{1}Hは水（$^{1}H_2O$ 4.9 ppm）を外部二次標準に用いた。

^{13}C CP/MASスペクトルでは、通常の有機化合物のピークが現れる領域に信号は見いだされなかった。強い^{1}H信号が観測されるにもかかわらず、CP による^{13}C信号がでなかったことは、水素と炭素との間にCPに有効な相互作用が存在していないことを示唆している。このことは有機成分が少量しか検出されないというこれまでの竜骨に関する報告と一致している。一方、単純なMASスペクトルでは 170 ppm に炭酸アニオン由来のピークが観測された。同時に、100 ppmより低い領域にベースラインの歪みが見られ、MASで先鋭化されない幅の広い炭素由来の信号がある可能性を残している。

竜骨の静止試料とマジック角回転試料（8 kHz）の^{1}H NMRスペクトルを図2に示す。静止試料は単一のローレンツ型やガウス型線形でフィットすることが出来ず、複数の成分が重なっていることを示唆している。MAS 試料では無機成分の水酸基に由来する[2]先鋭化したピーク(0.0 ppm)が現れると共に、MASのサイドバンドの形状から、先鋭化しているピークが水酸基のピーク以外にも存在していることがわかる。さらにMASの影響をほとんど受けない成分(5.2 ppm)も存在していることを示していて、試料の磁化率の分布を反映していると考えられる。

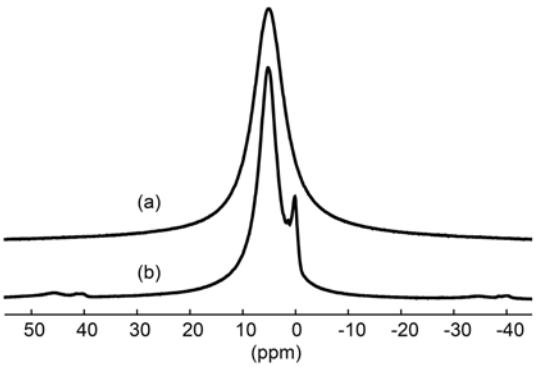


Fig. 2 ^{1}H NMR spectra of longgu, (a) static and (b) MAS (8 kHz) sample.

300℃で真空乾燥した試料、竜骨単独で熱水抽出処理をした試料、他の漢方薬と混ぜて熱水抽出処理をした試料のMASスペクトルを図3に示す。これらの処理によって各ピークの現れ方に変化が生じていることがわかる。まず加熱乾燥したサンプルでは、MASによって平均化されない成分が減少していて、それが揮発性の成分、すなわち水によるものであることを示している。一方先鋭化したピークには、複数の成分が観測され それらは300 ℃に温度を上げても揮発しないことが分かった。熱水抽出処理をした試料では、他の漢方薬で同時に煎じた試料の方が 0 ppm 付近のピークがより強く現れたが、0 ppm 以外の細かいピーク構造がつぶれる傾向が見られた。

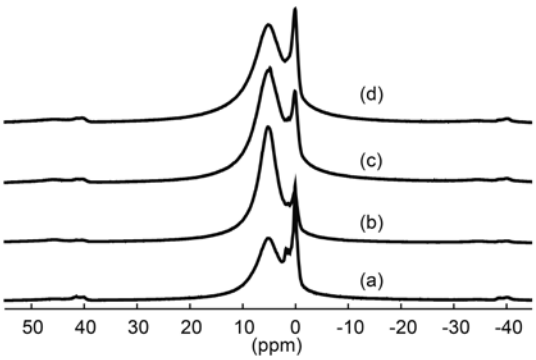


Fig. 3 ^{1}H MAS spectra of (a) degassed sample at 300 °C, (b) raw longgu, (c) longgu after extraction by boiled water, (d) longgu after extraction by boiled water with other crude drugs,

討論会ではこれらのスペクトル変化の試料ロット、処理ロット依存性や、これらのピークを構成する水素の運動性についても、スペクトルの温度変化を用いて議論する。

1）小栗, 生物工学 **92**, 350 (2014).
2）D. Alfano, *et al.*, *J. Cult. Heritage*, **10**, 509 (2009), and references therein.

P57 超高速^{1}H MAS NMRによる置換ポリアセチレンの固体構造の研究

○平沖敏文[1]、 小林哲雄[1]、矢澤宏次[2]、西山裕介[2]、朝倉哲朗[3]、
西村勝之[4]、吉田嘉晃[5]、馬渡康輝[5]、田畑昌祥[5]
[1]北大院工、[2]JEOL RESONANCE、[3]農工大院工、[4]分子研、
[5]室工大院工

Ultra fast ^{1}H MAS NMR studies on polyacetylene derivatives

○Toshifumi HIRAOKI[1], Tetsuo KOBAYASHI[1], Koji YAZAWA, Yusuke NISHIYAMA, Tetsuo ASAKURA, Katsuyuki NISHIMURA[4], Yoshiaki YOSHIDA[5], Yasuteru MAWATARI[5], Masayoshi TABATA[5]
[1]Grad. Sch. of Eng., Hokkaido University, Sapporo, [2] Grad. Sch. of Eng., Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, [3]JEOL RESONANCE Inc., Tokyo, [4]Institute for Molecular Science, Okazaki, [5] Grad. Sch. of Eng., Muroran Institute of Technology, Muroran, Japan.

^{1}H high-resolution NMR spectra of helical polyacetylene derivatives in solid state were measured with an ultra fast ^{1}H MAS NMR spectroscopy. Well resolved high-resolution ^{1}H resonances of homo- and co-polymers were observed in their spectra at MAS rate of 70 kHz. Their ^{1}H DQ MAS spectra clearly shows inter-residue connections both of the main chain and the side chain, as well as the neighboring ^{1}H pairs in a residue, showing the presence of regular order structures of polymers. This technique is shown to provide unique structural insight for polymer systems.

高分子固体の ^{1}H NMR スペクトルは、強い ^{1}H-^{1}H 双極子相互作用のため個々のシグナルの線巾が 50 kHz まで広がり互いに重なり、構造情報を得ることが困難である。^{1}H CRAMPS により高分解能化が達成されているが、定量性や設定の煩雑さ等の問題点がある。近年、^{1}H-^{1}H 双極子デカップルなしで高速 MAS のみで高分解能 ^{1}H スペクトルを得ることができるようになった。

本研究では超高磁場（21.6T）において超高速 MAS プローブを用いて一置換ポリアセチレン誘導体の固体高分解能 ^{1}H MAS NMR スペクトルを測定し、構造情報に関する知見を得た．二次元 ^{1}H DQ MAS 測定を行い、シグナルの帰属並びに残基内・残基間相互作用を調べた。

NMR 分光計は分子科学研究所の ECA920（21.6T、920MHz）を用い、1mm 超高速MAS プローブを使用した。試料は poly(*n*-propyl propiolate)(PnPP)、poly((s)2butyl propiolate)(Ps2BP) 、 copoly （ methyl propiolate$_1$, (s)2butyl propiolate$_1$ ）(copoly(MeP$_1$,s2BP$_1$))を用いた。

超高速^{1}HMAS法、置換ポリアセチレン、固体構造

○ ひらおきとしふみ、こばやしてつお、やざわこうじ、にしやまゆうすけ、あさくらてつお、にしむらかつゆき、よしだよしあき、まわたりやすてる、たばたまさよし

Fig.1 に PnPP の ^{1}H MAS スペクトルの MAS 速度依存性を示す。MAS 速度の増加に伴い線巾が減少し、70kHz では各 ^{1}H は化学種ごとに分離して、その化学シフト値が得られた：Hα(7.0 ppm), Hε(3.9 ppm), Hζ(1.7 ppm), Hη(1.1 ppm)。主鎖 Hα の線巾は MAS 速度の増加に伴い 620 Hz（20kHz）から 340 Hz（70kHz）まで約 50％減少した。この結果は化学シフトの分布に加えて、MAS70kHz でも Hα 近傍に存在する ^{1}H との双極子相互作用が依然として寄与していることを示唆している。他の ^{1}H シグナルも同様であった。MAS70kHz における各シグナルの面積は ^{1}H 数に一致した。

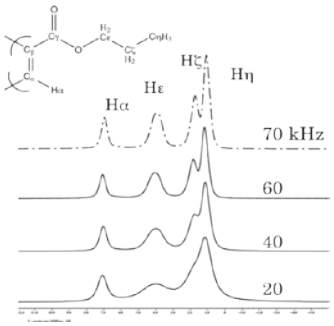


Fig.1 Mas-rate dependent ^{1}H MAS NMR spectra of PnPP.

Fig.2 に MAS 70 kHz における BABA16 系列を用いた Ps2BP の ^{1}H DQ MAS NMR スペクトルを示す。点線で示した 3 組の対は、近接して双極子相互作用する ^{1}H 対を示している。磁気的に等価な ^{1}H を有する εCH_3、$C\zeta H_2$、$C\eta H_3$ 基は対角線上の δ_{SQ}=~1ppm に重なって現れ、DQ 軸上では分離して観測され、それぞれの化学シフト値を得た。対角線上にメチン基の Hα と Hεシグナルが現れた(丸点線)。これは高分子鎖上で隣接残基間同士の化学シフト値が同じである Hα-Hα 対と Hε-Hε対の距離が 4Å以内にあり、主鎖のラセン構造に加えて側鎖も規則構造を形成することを示している。

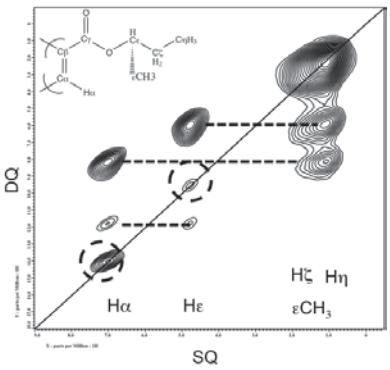


Fig.2 ^{1}H DQ spectrum of Ps2buP with BABA16.

Fig.3 に copoly(MeP_1, $s2BP_1$)の ^{1}H DQ MAS スペクトルを示す。同一残基内の相関に加えて（一点鎖線）、MeP と s2BP との残基間相関が観測された（点線）。主鎖 Hα は共重合体ではあるが 7.1ppm に 1 本のシグナルのみが観測され、対角線上に相関シグナルが現れた。Hα-Hε, Hα-$C\varepsilon H_3$, Hα-εCH_3 の残基間相関も観測された（二点鎖線）。一次元スペクトルでは分離しない δ_{SQ}=1~2 ppm のシグナルは、DQ 軸上に展開して s2BP 残基の CH_2 と二つの CH_3 に分離出来た。これらの結果は、本共重合体も規則的なラセン構造を形成しており、しかも側鎖も規則構造を形成していることを示している。

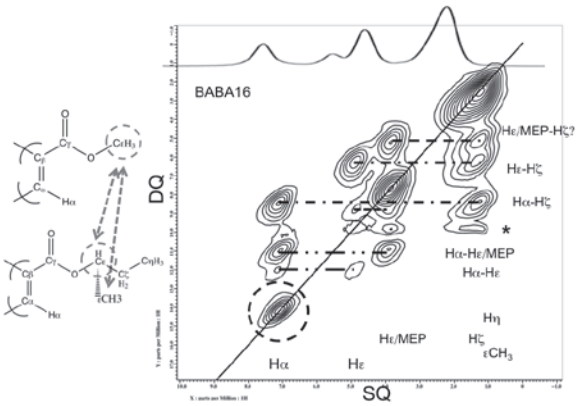


Fig. 3 ^{1}H DQ MAS spectrum of copoly(Mep_1, $s2BP_1$).

以上の結果は、高分子の微細構造解析のために超高速 MAS 法が極めて有用な情報を与えることを示している。

[謝辞] 本研究の一部は文科省ナノテクノロジープラットフォーム事業の支援を得て分子科学研究所超高磁場ＮＭＲ装置により行われた。

P58

水分子のNMRダイナミクス解析を用いた高分子と水の相互作用に関する研究

○亀谷俊輔[1]，岩本脩成[2]，関根素馨[1]，グレゴリーボウティス[3]，
大窪貴洋[4]，朝倉哲郎[2]
[1]三井化学分析センター・[2]農工大院工・[3]ニューヨーク市立大物理
[4]千葉大院工

NMR dynamics analysis of water molecules for studying interaction between Polymer and water molecule

○Shunsuke Kametani[1], Shusei Iwamoto[2], Sokei Sekine[1], Gregory Boutis[3], Takahiro Ohkubo[4], and Tetsuo Asakura[2]
[1]Mitsui Chem. Analysis & consulting Service [2]Dept. Biotech., Tokyo Univ. of Agri. & Tech. [3]Dept. Phys., the City Univ. of New York. [4]Grad. Sch. Of Eng., Chiba Univ.

Remarkable Change in dynamics of poly(N-isopropylacrylamide)(PNIPAM) and water molecules in the solution with increasing temperature was studied using some NMR methods. Pulsed-NMR showed dynamics (T_2) of PNIPAM molecules changes largely at the gelation temperature. Corresponding to this behavior, dramatic change was observed in the 2D T_1-T_2 plot of ^2H_2O based on an inverse Laplace transform. At 20°C and 30°C, only one peak was observed, indicating fast exchange in free water and bound water molecules. Above gelation temperature, 40°C, broad peaks were appeared and then, at 60°C, four separated peaks were observed. Thus aspect of interaction between PNIPAM and water molecules was clearly monitored by the 2D T_1-T_2 plot of ^2H_2O of PNIPAM gel.

【緒言】

近年、高齢化社会を迎え、QOLの向上を担う再生医療の材料開発が、益々重要となってきている。例えば、細胞シートやドラッグデリバリーシステムは、再生医療への応用研究が急速に進んでいるが、それを担う材料の一つは、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）(PNIPAM)ゲルである。すなわち、その水溶液は低温ではゾル状態であるが、加熱に伴いゲル化を示す刺激応答性高分子として知られており、その現象を巧みに利用して再生医療に用いている。そのようなゾルーゲル転移を利用して新たな再生医療用材料の開発を系統的に進める上で、用いられる高分子の物性発現に関わる構造やダイナミクスの情報を蓄積するとともに、新たな観点から、その系を検討できる方法を開発することも必要である。

本研究では、PNIPAM－重水系のゲル化挙動を取り上げ、PNIPAM分子のダイナミクス挙動をパルスNMRを用いてモニターした後、重水の ^2H T_1-T_2NMR測定と逆ラプラス変換処理を行い、水分子の多様なダイナミクス挙動について解析を行った。

NMR dynamics analysis, poly(N-isopropylacrylamide), sol-gel transition

○かめたにしゅんすけ, いわもとしゅうせい, せきねそけい, ぐれごりーぼうてぃす, おおくぼたかひろ，　あさくらてつお

【実験】Aldrich 社のPNIPAMの市販品を重水に溶解後、PNIPAMのゲル化温度の前後でNMR緩和挙動を測定した。パルスNMR測定はJNM-MU25 (JEOL) を、^{2}H T_1-T_2NMR測定はUnity200 (Varian)を用いた。

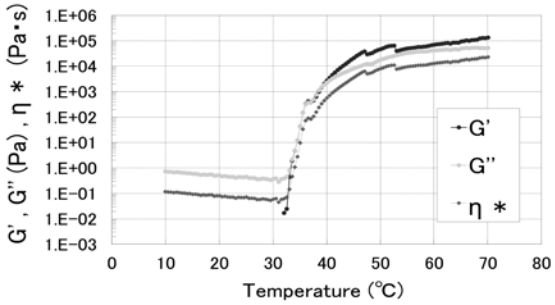


Figure 1. Temperature sweep data of storage modulus(G'), loss modulus(G") and complex viscosity(η*) of PNIPAM in ^2H_2O (15wt%) from 10°C to 70°C.

	CPMG測定 T2値(μ s)	Solid Echo測定 T2値(μ s)
10℃	13600	—
20℃	17000	—
30℃	19100	—
40℃	—	32.4
50℃	—	34.3
60℃	—	45.3
70℃	—	66.4

Table 1. The spin-spin relaxation time, T_2 of PNIPAM in ^2H_2O (15wt%) observed with Pulsed-NMR CPMG and Solid Echo methods.

【結果と考察】Fig. 1に、15wt%のPNIPMA重水溶液の粘弾性の温度依存データを示した。30℃から40℃の間でG'とG"が交差しており、ゲル化を確認した。同試料の各温度におけるパルスNMR測定を行い、波形分離後の主成分のT_2値をTab. 1にまとめた。30℃と40℃の間でPNIPMAのT_2値が大きく変化、40℃より高温では固体の運動に対応する値を示しており、パルスNMRからもPNIPMAのゲル化挙動が追跡された。

さらに重水分子のダイナミクス挙動から、このゲル化を検討する為に、各温度での^{2}H T_1-T_2 NMRを 測定、逆ラプラス変換処理を行った(Fig. 2)。ゲル化前のゾル状態(20℃及び30℃)では1 個の重水分子のピークが観測され、自由水と結合水の間で早い交換を示していることがわかる。

ゲル化温度以上の40℃では、相互作用した重水分子のT_1、T_2 値は、より早い運動を示す自由水と分離して観測され、逆に運動は低下するとともに広く分布するようになる。これはPNIPAM 分子が凝集してゲル化を引き起こすことにより、強く相互作用した重水分子が、凝集したPNIPAM 分子中で束縛されたことに由来する。50℃では、束縛された状態の重水分子の分布は更に広がり、さらに、60℃では、PNIPAM 分子と相互作用する重水分子は、4 つの成分に分離することが明確に観察された。

このように、PNIPAM 分子は水溶液中において、加熱に伴ってコイル状からグロビュール(小球体)状に変化することが知られているが、この時、PNIPAM分子自身が凝集して運動性が低下するとともに、水のダイナミクスの観点からみると、水分子と多様な束縛状態を示す複雑な相互作用を引き起こすことが明らかとなった。

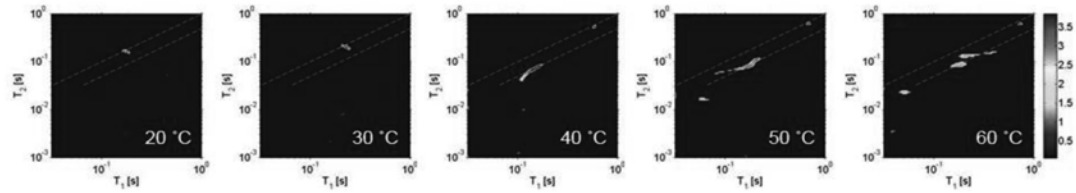


Figure 2. ^{2}H T_1–T_2 inverse Laplace transform maps of ^2H_2O molecules in PNIPAM -^2H_2O (15 wt%) system as a function of temperature. The dashed lines in the images are intended to guide the eye for the region of the 2D map where T_1 is approximately equal to T_2. The signal intensity indicated by the color bar is on a logarithmic scale.

P59 カルバメート化ポリアリルアミン／ポリアニオン複合体の分子構造解析

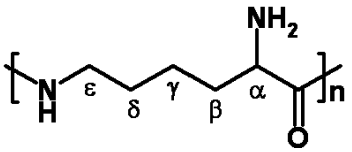
○両角悠作[1]、柿下拓史[1]、前田史郎[1]
[1]福井大院工

Molecular structure determination of polymer complex of carbamated poly(allyl amine) and poly(anion)

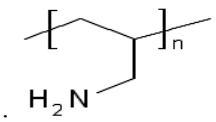
○Yusaku Morozumi[1], Takafumi Kakishita[1], and Shiro Maeda[1]
[1]Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Fukui, Japan.

Molecular structure analysis of hydrogel formed with mixing carbamated poly(allyl amine) (PAA) aqueous solution and poly(γ-glutamic acid) (PGA) or carboxy methyl cellulose sodium salt (CMC) aqueous solution was done by IR and ^{13}C and ^{15}N NMR. Formation of carbamated PAA, which is an amphoteric polyelectrolyte, was done by bubbling carbon dioxide gas through aqueous solution of PAA which have amino groups as a side chain. Some amino groups of PAA react with gaseous carbon dioxide to make carbamates, and others form ammonium groups. Self-assembly of ionic pairs of ammonium groups of PAA and carboxyl anions of PGA or CMC leads to cross-linking of the polymers and makes hydrogels.

[はじめに]　微生物産生高分子ポリ(ε-リジン) (ε-PL) (Scheme 1)は水溶液中で，側鎖アミノ基α-NH_2が空気中の二酸化炭素と反応してカルバメート(-$NHCOO^-$)を形成すること, また空気中に数日放置した水溶液のキャストフィルムにおいて, 同時に生成するプロトン化したε-PLの側鎖α-NH_3^+とのイオンコンプレックス形成による自己組織化架橋が生じていることを^{13}Cおよび^{15}N固体NMRを用いて明らかにした[1]。また，ε-PLとカルボキシメチルセルロースナトリウム塩(CMC/Na)の混合水溶液に二酸化炭素をバブリングすることによって, カルバメート化したε-PLの側鎖アミノ基α-NH_2とCMCのカルボキシアニオンがポリイオンコンプレックスを形成してゲルを生成することを見出した[2]。ε-PLと同様に側鎖アミノ基α-NH_2を持つポリ（アリルアミン）(PAA) (Scheme 2) においても，DBUを含む水溶液中[3]，あるいは有機溶媒中[4]で二酸化炭素をバブリングさせることによってカルバメートが形成され(Figure 1)、ゲルが生成することが知られている。本研究では、カルバメート化したPAA水溶液とポリ（γ-グルタミン酸）(PGA)あるいはカルボキシメチルセルロース(CMC)ナトリウム塩水溶液を混合することによって生じたゲルの分子構造解析を行った。



Scheme 1. poly(ε-L-lysine) (ε-PL).



Scheme 2. poly(allyl amine) (PAA).

Carbon dioxide, Solid NMR, Poly(allyl amine)

○もろずみ ゆうさく、かきした たかふみ、まえだ しろう

[実験]　PAAは平均分子量5,000(ニットーボーメディカル、20%水溶液)を用いた。PAA水溶液にCO_2をバブリング(200mL/min)することによってカルバメート化PAA水溶液を作成した。PGAは平均分子量1500,000～2500,000, D：L＝7:3（和光純薬）を、CMCは平均分子量500（東京化成）を用いた。カルバメート化PAA水溶液あるいはPAA水溶液と、PGAまたはCMC水溶液を所定のモルユニット比で混合し､テフロンシャーレにキャストして複合体試料を作成した。NMR測定にはChemagnetics CMX Infinity 300、JEOL-LA500およびJEOL-ECA600IIを用いた。

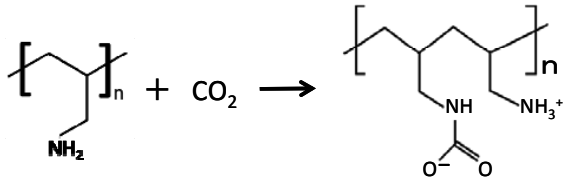


Figure 1. Schematic diagram of formation of carbamate with

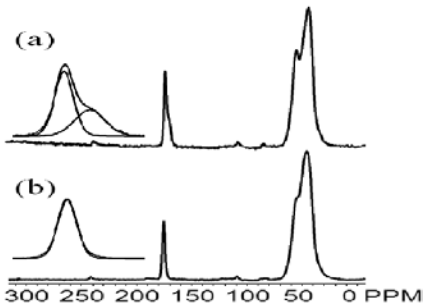


Figure 2. ^{13}C CPMAS NMR spectra of PAA films cast from PAA aqueous solution with (a) 75 sec and (b) 35 sec CO_2 bubbling (200mL/min), respectively.
Curve-fittings for C=O peaks of carbamate are shown in the insets.

[結果・考察]　Figure 2に、(a)75秒間、(b)35秒間PAA水溶液にCO_2バブリングしてキャストしたフィルム試料の^{13}Cスペクトルを示す．カルバメートのカルボニル炭素のピークは164 ppm[1]に現れている。Figure 2(a)では、164ppmの他に161ppmにもピークが現れた．おそらくこれは炭酸水素イオン(HCO_3^-)のピークであると考えられる．PGAとPAA水溶液をモルユニット比(b)1/2、(c)1/1、(d)2/1で混合しキャストして作成したフィルムのIRスペクトルには大きな変化はないが、1630cm^{-1}付近のピークの強度比が違っている。PGAとPAA混合水溶液は、どの比率でも無色透明でありゲルは生じなかった。一方、PGAとカルバメート化PAA水溶液の場合は、混合するとすぐに白濁し、攪拌するとゲルが生じた。CMCとPAAの場合も同様な結果が得られた。 カルバメート化PAAとPGAあるいはCMCの場合にゲルが生じたのは､カルバメート化によって生成したNH_3^+基とカルボキシアニオンの間に強い静電相互作用が働き、ポリイオンコンプレックスを形成したためであると考えられる。PAAとPGAまたはCMCの場合は､PAAの側鎖アミノ基と弱い水素結合しか生じないため､PAAとそれぞれのアニオン性ポリマー水溶液を混合してもゲルを形成しないと考えられる。ポリイオンコンプレックスを形成しているかどうかは^{13}Cおよび^{15}N固体NMRを測定することによって明らかとなる。固体NMR測定結果もあわせて、これらのカルバメート化PAA／ポリアニオン複合体の分子構造解析結果を報告する。

REFERENCES

[1] S. Maeda, S. Oumae, S. Kaneko, K.-K. Kunimoto, *Polym. Bull*., **68**, 745-754 (2012).

[2] S. Maeda, K. Kato, K. Takagi, M. Kobayashi, K.-K. Kunimoto, *Int. J. Mod. Phys. B*, **25**, 4315-4318 (2011).

[3] D. Nagai, A. Suzuki, T. Kuribayashi, *Macromol. Rapid Commun*., **32**, 404-410 (2011).

[4] E.Carretti, L. Dei, P. Baglioni, R. G.Weiss, *J. Am. Chem. Soc*., **125**, 5121-5129 (2003).

P60

逆ラプラス変換法によるゴム材料のT_2緩和時間分布解析

○角村将希[1]，奥下慶子[2]，大窪貴洋[3]，浅野敦志[1]
[1] 防衛大学校 応用化学科
[2] 東京農工大学大学院 工学研究科
[3] 千葉大学大学院 工学研究科

The T_2 Relaxation Distribution of Rubber Materials Estimated by the inverse Laplace Transform

○Masaki Tsunomura[1], Keiko Okushita[2], Takahiro Ohkubo[3], and Atsushi Asano[1]
[1] *Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Kanagawa, Japan*
[2] *Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan*
[3] *Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Chiba University, Chiba, Japan*

In this study, we studied the dependencies of intervals of the inverse Laplace transform and the accumulation time for measuring T_2 relaxation decay curve of carbon black filled poly(isoprene) (PI/CB). We used the CONTIN program to obtain the T_2 distribution by the inverse Laplace transform. The inverse Laplace transform of the T_2 decay curve observed with the short accumulation time, which is not enough for a FID to decay completely, gave a wrong T_2 value and distribution. On the other hand, the transform of the fully decayed FID showed a correct T_2 value and distribution. Furthermore, the inverse Laplace transform estimation was severely influenced by choosing of interval of integral. Consequently, the inverse Laplace transform requires a good signal-to-noise ratio (S/N), an enough long accumulation time to detect a FID, and adequate selection of interval of integral.

＜緒言＞　ゴム材料、特にカーボンブラック（CB）などの無機物を混入して物性を改良している素材では、CB近傍のゴム鎖とCBから離れたゴム鎖では大きく運動の束縛度が異なると考えられている[1)]。CBと混練したゴム鎖では（Fig. 1）、CB近傍の領域A内のゴム鎖がCBと相互作用することで束縛され、数10 ~ 100 μs程度のT_2緩和時間を持ち、ガウス型の緩和曲線で減衰する。また領域Bに存在するゴム鎖は、バルクのゴム鎖と同等であり指数関数型の緩和減衰曲線となる。したがって、観測される^{1}Hの自由誘導減衰（FID, $f(t)$）曲線は、(1)式で表される。ただし、$f_A + f_B = 1$である。

$$f(t) = f_A \cdot \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{t}{T_{2A}}\right)^2\right) + f_B \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2B}}\right) \qquad (1)$$

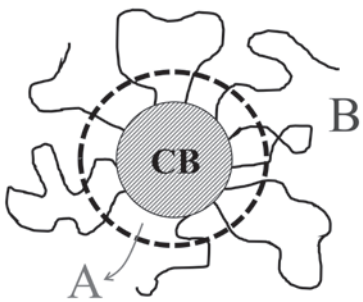


Fig. 1. A schematic illustration of a model for a carbon black (CB) filled rubber system: A; tightly bound rubber chain region and B; bulk rubber chain region.

逆ラプラス変換　ゴム　T_2緩和

○つのむらまさき，おくしたけいこ，おおくぼたかひろ，あさのあつし

しかし、このような解析法は、T_{2A}という均一な緩和時間を持つゴム鎖と、T_{2B}という値を持つバルクのゴム成分が均一に存在していることを前提としている。実際の系では、領域A内のゴム鎖にも、CBと直接相互作用している、より短いT_2値を持つゴム鎖と、CBから離れるにしたがって、徐々に長いT_2値となるゴム鎖が存在する、と考える方が自然である。つまり、T_2値はある値を中心として様々な値で分布する。あるゴム鎖成分iのT_2値の成分比を表す関数を$\alpha(T_{2i})$とすると、観測されるFID（$f(t)$）は、次式(2)のように再現される。

$$f(t)=\sum_i \alpha(T_{2i})\cdot\exp\left(-\frac{t}{T_{2i}}\right)=\int_0^\infty \alpha(T_2)\cdot\exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)dT_2=\mathcal{L}\,\alpha(T_2) \qquad (2)$$

(2)式は、$\alpha(T_2)$のラプラス変換（$\mathcal{L}$）の形となっている。したがって、T_2の分布を知るためには(2)式の$f(t)$を逆ラプラス変換すれば良い。

数値解析による逆ラプラス変換は、1982年にStephen W. Provencherによって提唱されたCONTIN法を用いた[2]。逆ラプラス変換は、用いる測定データのS/Nや数値解析の時の積分範囲に依存して解が曖昧となる。そこで本研究では、CB充填ポリイソプレンゴムの実測T_2緩和減衰曲線を用いて、(1)式による従来法とCONTIN法による逆ラプラス変換解析について比較検討した。さらに、T_2緩和減衰曲線の測定範囲や逆ラプラス変換時の積分範囲を幅広く変化させ、求めた解（T_2分布）について評価した。

＜実験・解析＞　T_2緩和減衰曲線は、JEOL社製JNM-MU25AパルスNMR装置を用いて測定した。^{1}H観測周波数は25 MHzである。用いたパルスシーケンスはSolid Echo法およびHahn Echo法である。測定は全て30ºCで行った。Solid Echo法によるT_2測定は、積算16回、繰り返し2.0 sで行った。また、観測時間を1 msから10 msの間で10通りに分けて行った。Hahn Echo法によるT_2測定は、積算4回、繰り返し1.0 s、観測時間4 msとして行った。用いた試料は東海ゴム工業株式会社より提供されたCB充填量の異なる架橋および未架橋のポリイソプレンゴム（PI/CB）である。

＜結果・考察＞　Fig. 2は、CB充填量33.2 %の架橋PI/CBのSolid Echo法で得られたT_2緩和減衰曲線である。取り込み時間が約3.5 ms以上経過すると、信号は観測されずノイズのみ観測されている。このT_2緩和減衰曲線を単一の指数関数で最小2乗フィットした結果を緑色の短い波線で示した。また、ガウス型関数でフィットした結果を青色の破線で示した。両者とも実測のT_2緩和曲線を再現できていない。そこで、(1)式に示したガウス関数型と指数関数型の和で最小2乗フィットしたところ、赤の実線で示したように実測を良く再現できた。ここで得られたパラメータは、f_A =

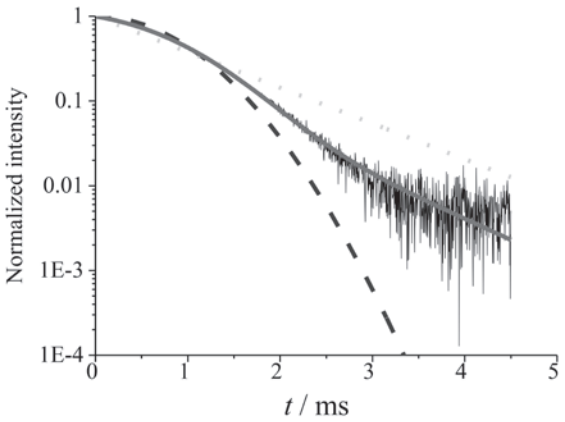


Fig. 2. A T_2 relaxation decay curve obtained by the solid echo pulse sequence. The T_2 decay curve were least square fit by a single exponential decay (dashed-green line), a single Gaussian decay (broken-blue curve), and the sum of those functions (eq. 1, solid-red curve).

0.60 ± 0.001, T_{2A} = 0.85 ± 0.001 ms, T_{2B} = 0.87 ± 0.003 msである。T_{2A}が0.85 msと求まったが、ガウス型の緩和曲線を示す硬い成分は、通常100 μs以下であるので、0.85 msのT_2値はガウス型の減衰曲線にしては長い。また、T_{2A}とT_{2B}の値はほとんど同じ値である。したがって、Fig. 2の実測のT_2緩和減衰曲線は、ガウス型と指数関数型の和というよりは、それらの中間の関数型を示すWeibull係数を取り入れた数式を用いた方が良いと思われる。ただし、Weibull係数の値については、単に緩和曲線の形に合わせているだけであり、その数値の意味については議論の余地がある。

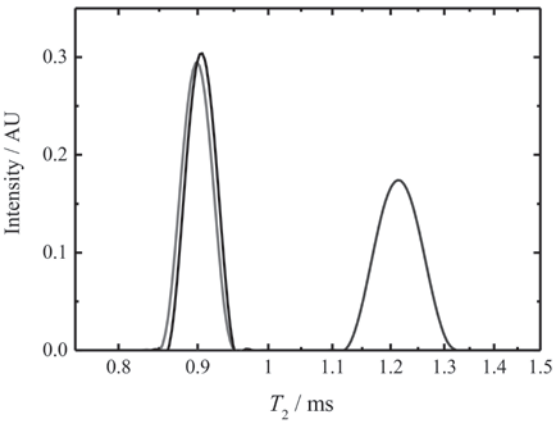


Fig. 3. T_2 distributions estimated by the inverse Laplace transform (iLt, CONTIN method) for three kinds of T_2 decays (accumulation time of 1 ms,4.5 ms,10 ms). The blue color represents the iLt analysis for the 1ms accumulation, red color is for the 4.5 ms accumulation, and the black color is for the 10 ms accumulation. The iLt was performed from 0.01 ms to 10 ms.

Fig. 3に、Fig. 2のT_2緩和減衰曲線（取り込み時間4.5 ms）をCONTINを用いて逆ラプラス変換した結果を示した（赤い実線）。T_2の値が、0.9 msを中心に約±0.05 msの範囲に分布していることがわかる。(1)式を用いて求められたT_2値と逆ラプラス変換で求められた中心値は一致した。したがって、逆ラプラス変換法は実際のT_2緩和減衰曲線を解析できていることが示された。さらに分布範囲の情報についても得られるため、材料の運動性解析に有用であることがわかる。

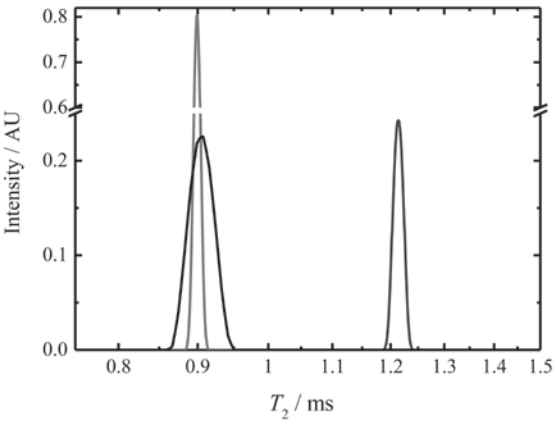


Fig. 4. T_2 distributions estimated by the inverse Laplace transform. The descriptions are the same as those in Fig. 3. The interval for the iLt is 0.1 ms to 10 ms.

Fig. 3の解析では、積分範囲を0.01 msから10 msと指定し、数値解析のポイント数を最大の500ポイントとしている。逆ラプラス変換の積分範囲依存性を検討するため、まず積分開始の値を0.01 msから0.1 msに変更してみた。その結果をFig. 4に示す。Fig. 4から、T_2分布の中心値は変化しないが、分布幅が極端に狭くなった。Fig. 3とFig. 4のT_2分布の面積は理論上同じなので、Fig. 4では分布幅が狭くなるかわりに強度が3倍弱大きくなったと言える。この変化は、積分範囲の選択に解析結果が大きく依存していることを示し、逆ラプラス変換法により求めたT_2分布の解釈に注意が必要であることを示した。

これらの結果を詳細に検討するため、T_2緩和減衰曲線の取り込み時間を変えて測定し、逆ラプラス変換法の積分範囲依存性について調べた。Fig. 5には、取り込み時間を変えた時の3種類のT_2緩和減衰曲線を示した。Fig. 2のT_2緩和減衰曲線は取り込み時間4.5 msであるので、Fig. 5(b)と同じである。取り込み時間を1 ms（Fig. 5a）と10 ms

（Fig. 5c）のT_2緩和減衰曲線を逆ラプラス変換し、求めたT_2分布をFig. 3と4にあわせてプロットした。

Fig. 5aのT_2緩和減衰曲線は明らかに信号の減衰が不完全である。この場合、Fig. 5bやFig. 5cのT_2緩和減衰曲線から得られたT_2分布に比べて、分布の中心値が異なっている（Fig. 3中、青い実線）。T_2分布の中心値は、(1)式より得られたT_2値より0.3 ms程度長い。つまり、T_2緩和減衰曲線の取り込みが不完全だと、T_2の逆ラプラス変換による解析は正しい値を全く与えないことが示された。また、積分範囲を0.01 ~ 10 msから0.1 ~ 10 msに変えた場合の傾向は、4.5 msの取り込みと同じだった（Fig. 4）。

一方、Fig. 5cのように、ノイズとなってもさらに取り込み時間を長くした場合では、4.5 msまで取り込んだ場合と異なる積分範囲依存性を示した。取り込み時間が4.5 msと10 msのT_2緩和減衰曲線を用いて、積分範囲を0.01 ~ 10 msとした場合には、両者の逆ラプラス変換の結果はほぼ一致していた（Fig. 3）が、積分範囲を0.1 ~ 10 msと狭くした場合、4.5 msの取り込み時間ではT_2分布が狭くなったのに比べ、10 msまで取り込んだ場合では、積分範囲の依存性は非常に小さかった。このことから、CONTIN法を用いた逆ラプラス変換によるT_2分布の解析は、通常より長く取り込み時間を設定し、積分範囲を広めにする必要があると言える。

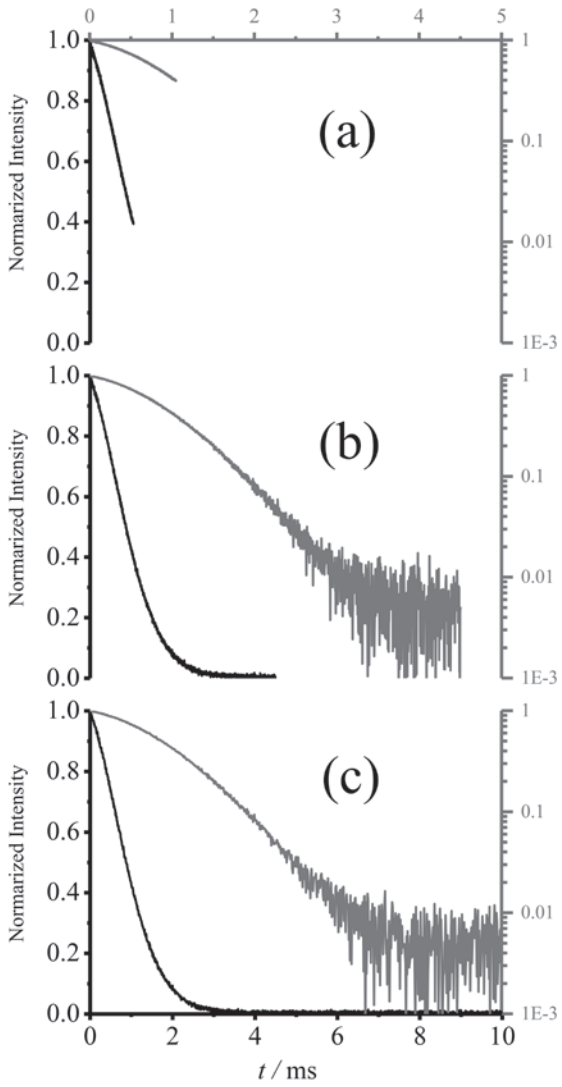


Fig. 5. Observed T_2 relaxation decay curves for these different accumulation times; (a) 1 ms, (b) 4.5 ms, and (c) 10 ms. Red curves are semi-logarithmic scale and the abscissa range is changed to 0 to 5 ms.

当日は、積分範囲やT_2緩和減衰曲線の取り込み時間をより細かく設定した場合の解析結果と、CBの種類（表面積の違い）を変えて解析した結果を報告する。さらに、求めたT_2分布を用いて実測のT_2緩和減衰曲線を再現した場合の誤差についても検討する。

＜参考文献＞

1) O'Brien, J., Cashell, E., Wardell, G. E., and McBrierty, V. J., *Macromolecules*, **9**, 653–660, (1976).
2) Provencher, S. W., *Comput. Phys. Commun.*, **27**, 213–227 & 229–242, (1982).

P61 グアガムを用いた非イオン性ゲルの合成と包摂水のダイナミクス

○甲野裕之[1]，原英之[2]，尾崎雅人[1]
[1]苫小牧高専・物質工，[2]ブルカーバイオスピン株式会社

Nonionic gelation agents prepared from guar gum and the water mobility in the swollen hydrogels

○Hiroyuki Kono[1], Hideyuki Hara2, and Masato Ozaki[1]
[1] Department of Science and Engineering for Materials, Tomakomai National College of Technology, Hokkaido, Japan.
[2]Bruker BioSpin K.K., Kanagawa, Japan.

Nonionic gels were prepared from hydroxypropyl guar gum (HPG) with different molar substitution degrees by crosslinking with ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE). Solid-state NMR spectroscopy revealed that the crosslinking degree of HPG gels increased with the amount of EGDE used during the reaction; this result was also confirmed by the water mobility in the swollen gels. Rheological characterization revealed behaviors typical of true gels, and their viscoelastic behaviors strongly depended on the crosslinking degree. The HPG gels absorbed buffers, aqueous saline, and water, and the absorption was not affected by the ionic strength or pH of the solution. In addition, HPG gels with high crosslinking degrees and molar substitution degrees exhibited gelation ability toward protic organic solvents such as methanol, ethanol, and 1-propanol. These HPG gels may find application as gelation agents for many industrial uses.

【緒言】

近年、ソフトマターとしてのゲルが、医療、製剤などへの応用も進展しつつある。ゲル材料の多くは、アクリル酸によるハイドロゲルであるが、その機能には制限がある。そこで吸液対象の酸性度やイオン強度に影響を受けず、さらには有機溶媒やイオン液体をゲル化可能な新規高分子ゲルの合成を非イオン性ヒドロキシプロピルグアガム(HPG)の架橋化により検討した。

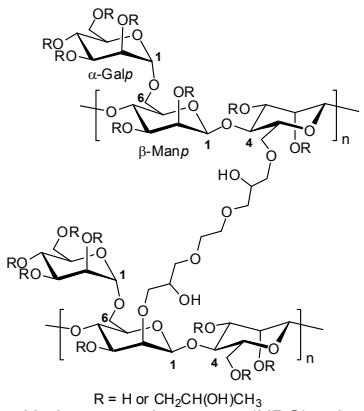


Fig. 1. HPG gel structure

【実験方法】

Gal/Man比1:1.62のGGをヒドロキシプロピル化し、モル置換度1.2, 2.1, 4.4のHPGゲル（Fig. 1, 順にHPG1, HPG2, HPG3）を得た。アルカリ溶液中でエチレングリコールジグリシジルエーテル(EGDE)を作用させ架橋密度の異なる９種類のHPGゲルを合成した。固体NMRから架橋密度を決定し、遠心法により純水、緩衝液、食塩水、イオン液体、有機溶媒に対するゲル化能を評価した[1]。また一定量の水を吸水した各水和ゲルについてCPMG法にて^{1}H T_2測定により水の動的挙動を求め、架橋密度との相関について検討した。

Gel structure, Solid-state ^{13}C NMR, Relaxation analysis
○こうの　ひろゆき，はら　ひでゆき，おざき　まさと

【結果と考察】

三種類のHPGより架橋剤量をパラメータとして、それぞれ架橋密度の異なる３種類のHPGゲルを得た。固体^{13}C DDMAS測定により、C1、メチル、その他炭素領域に対して積分を行い、面積強度から架橋密度を算出した[2]。この結果、架橋密度がEGDE量に応じて制御可能なことが明らかになった。

得られたゲルは水や各種溶媒との接触により、吸液し、無色透明なゲルへ変化した。また架橋密度の増加はゲル強度の向上が見られたが、吸水力は低下する傾向を見せた。緩衝溶液や食塩水に対しては、HPGGゲルの吸水力はpHや塩濃度に依存せず、一定の値を示したことから、非イオン性ゲルとしての優位性が確認できた。また有機溶媒に対する膨潤率を遠心法で求めた結果、高MSのHPGGゲルを用いた場合のみ、極性有機溶媒に対してゲル化した。極性の低下に伴ってゲル化は進行せず、プロパノール程度までがゲル化可能なことが明らかとなった。

自重の５０倍量の水で吸水させたゲルの^{1}H T_2 と架橋度（CR）をプロットした結果、CRとT_2には相関性があり、一方モル置換度（MS）とT_2値には相関が見られなかった。すなわち、水和ゲル中の水の分子運動は架橋密度の向上に伴い拘束され、緩和時間の低下として現れること、またヒドロキシプロピル基自体は鎖長が短いため、水の分子運動には影響を与えないことが確認できた。

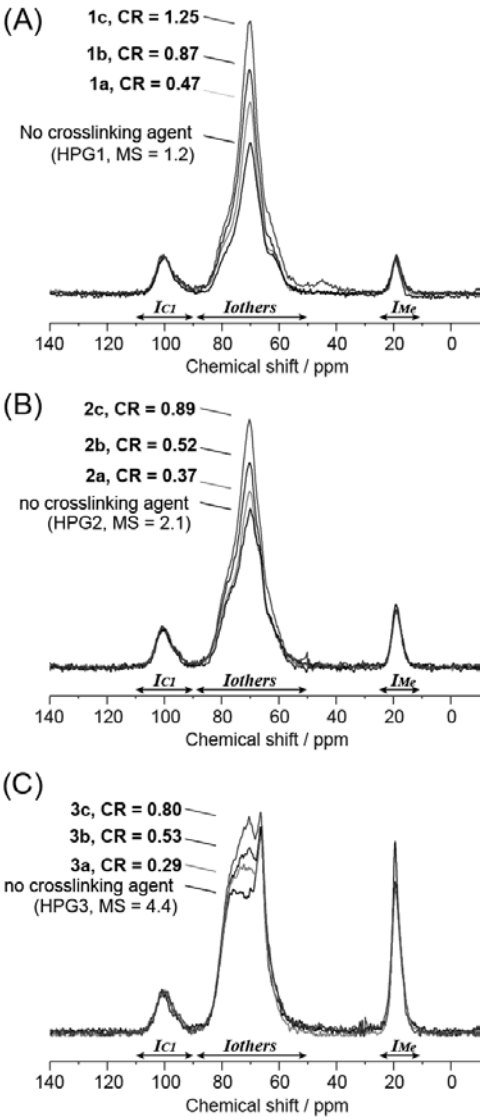


Fig. 2. Solid-state DDMAS ^{13}C NMR spectra of a series of HPGs and HPG gels.

水和ゲルの動的粘弾性評価の結果、架橋密度の低下に伴い、G’、G”ともに周波数依存が現れ、ゲル強度の低下が認められた。また架橋密度の低下は動的粘度の周波数に対する傾きが１より小さな値となっており、ゲル強度が架橋密度に依存していることが明らかになった。より詳細な機能性、分子構造については当日報告する。

【参考文献】

[1] H. Kono, F. Otaka, *Carbohydr. Polym.* **111,** 830-840 (2014).
[2] H. Kono, *Carbohydr. Polym.* **106,** 84-93 (2014).

P62 固体 ^{17}O NMR を用いたアルミノシリケートガラス中の酸素構造解析～架橋酸素と非架橋酸素～

○金橋康二
新日鐵住金・先端研

Solid-state ^{17}O NMR for aluminosilicate glasses ~ bridging and non-bridging oxygen ~

○Koji Kanehashi
Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation

Oxygen structure in alkaline and/or alkaline-earth aluminosilicate glasses has been investigated by solid-state ^{17}O NMR spectroscopy. An ^{17}O MAS spectrum for the $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-30CaO glass shows well resolved bridging oxygen (BO) and non-bridging oxygen (Ca-NBO) peaks, whereas BO and Mg-NBO peaks in the $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-30MgO glass are highly overlapped. In the mixed alkaline-earth system ($15Al_2O_3$-$55SiO_2$-15MgO-15CaO), a broad signal is observed near the BO peak position. No signal is detected in the range of Ca-NBO position, indicating Mg^{2+} preferentially modifies SiO_4 tetrahedral network and then creates Mg-NBO. In contrast, Ca^{2+} plays a role of charge compensator of $(AlO_4)^-$ tetrahedral units and hardly contributes to modifying network. These preference might be explained by the cation field strength (Mg^{2+}＞Ca^{2+}).

はじめに

アルミノシリケート融体に添加されたアルカリ金属イオンあるいはアルカリ土類金属イオン（カチオン）は、SiO_4 あるいは$(AlO_4)^-$の四面体のネットワーク構造を切断する network modifier としての働きと、$(AlO_4)^-$四面体の負電荷を補償する charge compensator としての働きを持つと考えられている。これらの添加されたカチオンは、イオン半径や価数が異なることから、その種類や濃度によってガラス融体の物性（粘度や熱伝導性）に影響を与えることが知られている。

分子レベルでのミクロな視点に立てば、ガラスの粘性の変化は架橋（Bridging Oxygen; BO）／非架橋酸素（Non-Bridging Oxygen; NBO）の比率に依存するため、ガラス中の BO／NBO 比率を求めることができれば、粘性と構造を結び付ける一助となると考えられる。今回、固体 ^{17}O NMR を用いて、BO および NBO の分離を試みるとともに、どのアルカリあるいはアルカリ土類金属種が優先的に network modifier として作用し、NBO 形成に関与するのかについて検討した。

実験

今回対象としたガラス組成は $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-$30R_2O$ (R=Li, Na, K, Rb, Cs)および $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-30R'O (R'=Be, Mg, Ca, Sr, Ba) （mol 比）であり、添加したカチオンの

固体 ^{17}O NMR、ガラス、架橋・非架橋酸素

○かねはしこうじ

うち半分が network modifier として、残りの半分が charge compensator として作用する組成を選んだ。Al_2O_3、アルカリ炭酸塩、アルカリ土類酸化物、アルカリ土類炭酸塩は事前に高温で仮焼して脱水させた。^{17}O をラベルした $Si^{17}O_2$ は、既報に従って合成した [1)]。これらの原料を所定比に混合し、900℃にて脱炭酸した後、密閉した白金チューブ内にて 1600℃にて溶融後、クエンチすることによってガラス試料を得た。

固体 ^{17}O NMR スペクトルの測定は INOVA-500（11.7 T）および ECA-700（16.4 T）を用いて、試料回転周波数は 18～20 kHz とした。パルスシーケンスはシングルパルス法および MQMAS 法を用いた。^{17}O の化学シフト基準は、蒸留水のピークを 0 ppm とした。

結果・考察

カチオン種として①Mg^{2+}のみ、②Ca^{2+}のみ、③Mg^{2+}と Ca^{2+}を同量添加したアルミノシリケートガラスの ^{17}O MAS スペクトルの結果を Fig. 1 に示す。Ca のみ添加したガラスにおいては、BO と NBO が明瞭に区別された。さらに MQMAS スペクトルによって、Fig. 1 上では重なり合っている 2 種類の BO（Si-O-Al, Si-O-Si）を分離することができた。一方、Mg 添加ガラスにおいては、Mg-NBO のピークは先の Ca-NBO のピーク位置から大幅に高磁場側にシフトし、BO のピークとほぼ重なり合うことが確認され、MQMAS スペクトルによって、Mg-NBO、Si-O-Al、Si-O-Si の 3 種類のピークが区別されることを確認した。

次に、Mg^{2+}と Ca^{2+}を同濃度（15mol% ずつ）添加した場合、Ca-NBO 由来のピークは観測されず、BO 領域に広幅なシグナルのみが観測された。以上のことから、Mg^{2+}と Ca^{2+}が共存する場合には Mg^{2+}が優先的に network modifier として作用して Mg-NBO を形成するのに対し、Ca^{2+}は$(AlO_4)^-$の charge compensator として作用し、NBO の形成にはほとんど関与していないことが示唆された。この結果は cation field strength（=価数/(M-O 距離)^2）の大小（Mg^{2+}：0.46＞Ca^{2+}：0.36）で推定された傾向と矛盾しておらず、Ca^{2+}と比較して CFS が大きい Mg^{2+}は、酸素との親和力（結合力）が強く、優先的に NBO と結びついて network modifier として作用しやすいと考えることができる。

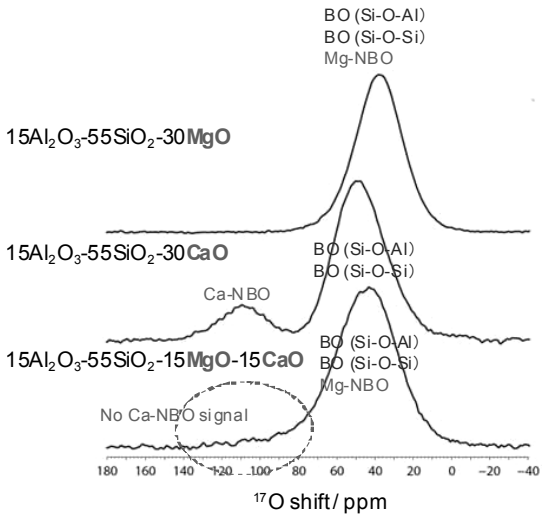


Fig.1 ^{17}O MAS spectra for Al_2O_3-SiO_2-R'O (R'=Mg and/or Ca) glasses collected at 16.4 T.

当日は他のカチオン種の結果についても報告する。

文献

1). A. E. Geissberger, P. J. Bray, *J. Non-Cryst. Solids*, **54** (1983) 121.

P63 高分子の合成，架橋反応のパルスNMRによる観測

○原　英之
ブルカー・バイオスピン株式会社

Observation of synthetic process and cross-link reaction of Polymer by pulse NMR

○Hideyuki HARA
Application Division, Bruker BioSpin K.K.

The synthetic process of Polystyrene and PMMA(Poly(methyl methacrylate)) were observed by 20MHz pulse-NMR at various temperature. The ratio of a monomer and a polymer component was determined from the relaxation time by pulse NMR, furthermore, the change of relaxation time of the cross-linking reaction of the polymer using the crosslinking agent DCP(dicumyl peroxide) was observed.

.

【序論】

ポリスチレンおよびPMMAの合成過程を温度を変えて20MHzのパルスNMRで観測した。パルスNMRで観測される緩和時間からモノマーおよびポリマー成分の比率を決定し、時間変化からそれぞれのポリマーの合成過程について議論する。また、架橋剤DCP(ジクリルパーオキサイド)を用いてポリマーを架橋反応させたときの緩和時間の変化についても議論する。

【実験】

スチレンモノマーおよびメタクリル酸1mlにトルエン100ulを加え開始剤としてAIBN(アゾビスイソブチロニトリル)用いて，60℃および80℃で硬化させた。硬化の様子をsolid echo法およびCPMG法で観測した。またそれぞれに架橋剤DCPを加えた試料も作成し，180℃で0, ,10, 20分架橋反応させたのち，solid echo法で緩和時間観測を行った。装置はブルカー・バイオスピン社製パルスNMR(minispec mq20)を用いた。

【結果および考察】

Fig.1に60℃でポリスチレンおよびPMMAの硬化状態をsolid echoで観測したときのt=0.4msの時の信号強度を示す。信号強度1のとき溶液状態で，硬化するにしたがって緩和時間が速くなるためt=0.4msの時の信号強度が減少する。Fig.1の結果よりポリスチレンは9時間後，PMMAでは1.5時間後くらいに急激に硬化することが観測された。しかしながらsolid echo およびCPMG法で緩和時間解析を行うと両者の緩和時間の振る舞いには違いが見られた。

パルスNMR，高分子

○はら　ひでゆき

モノマー部分の緩和時間に注目するとポリスチレンでは，硬化とともに緩和時間が断続的に変化するのに対して、PMMAでは緩和時間自体の変化はあまり観測されなかった。このことはポリマー化のプロセスの違いを表していると考えられる。

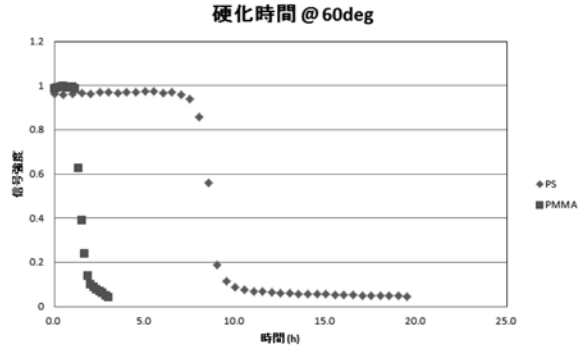


Fig. 1 T2 relaxation time of Polystyrene and PMMA at 60 degree.

Fig.2にポリスチレンおよびPMMAに架橋剤DCPを入れ、180℃で架橋反応させて0, 10, 20分後に測定したsolid echoの結果を示す。Solid echoで得られた結果は3成分フィッティングを行った。一番速い成分はワイブル係数2を用いてフィッティングさせ、残りの2成分はワイブル係数1でフィッティングを行った。架橋することによってポリマーは硬化度が増すと思われるので、架橋の評価は一番速い信号成分の比率を用いて行った。その結果、ポリスチレンに関しては架橋による樹脂の硬化が観測され、硬化した成分は架橋剤の量，および架橋時間におおむね比例する値となった。しかしながらPMMAではわずかの差しか見られなかった。当日は緩和時間解析の詳細も含めて議論する。

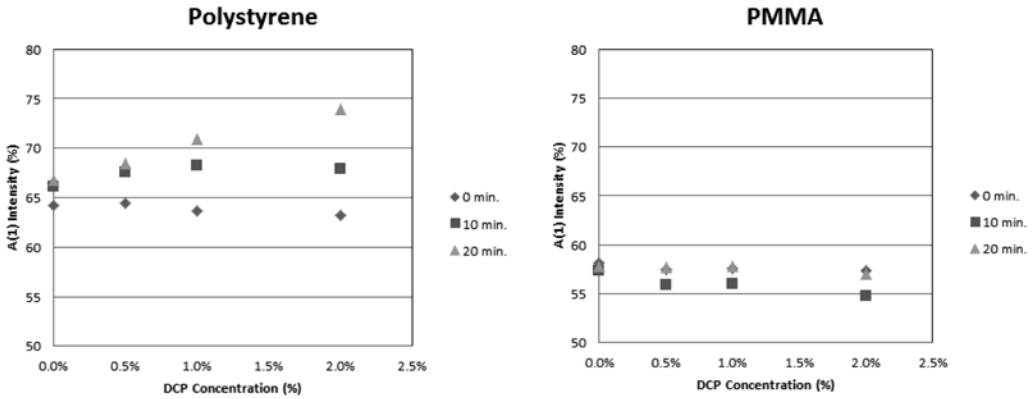


Fig. 2 Ratio of fast element of T2 signal amplitude of Polystyrene and PMMA with DCP at 180 degree.

P64

天然存在比下での^{33}S STMASによるエトリンガイトの研究

○佐々木彬子，Stephen Wimperis
英国グラスゴー大学大学院

A natural abundance ^{33}S STMAS NMR study of ettringite

○Akiko Sasaki, Stephen Wimperis
School of Chemistry and WestCHEM, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, UK

There have been very few ^{33}S (spin I = 3/2) solid-state NMR studies in the literature, owing to the low natural abundance (0.76%), low gyromagnetic ratio (ν_0 = 30.7 MHz at 9.4 T) and the high expense of ^{33}S isotopic enrichment. Owing to the recent advances in the development of high-field spectrometers, solid-state NMR studies of NMR insensitive nuclei are now accessible. Here we demonstrate the feasibility of high-resolution natural abundance ^{33}S NMR at B_0 = 20.0 T and 9.4 T for our compound of interest, ettringite. Our first-principle DFT calculations of ^{33}S NMR parameters using CASTEP code, upon comparison with experimental results, suggest the presence of fast dynamics in the vicinity of S nuclei in ettringite.

Introduction

Quadrupolar nuclei account for more than 70% of NMR-active nuclides. For quadrupolar nuclei with half-integer spin quantum numbers, the inverse dependence of the second-order quadrupolar interaction upon magnetic field strength makes the use of high-field spectrometers highly advantageous. The sensitivity limitations associated with low-γ nuclei can also be overcome by high-field NMR. Recently, following the development of high-field spectrometers, ^{33}S solid-state NMR studies have begun to attract interest owing to the prevalence of sulfur in nature and materials science. Natural abundance ^{33}S solid-state NMR, therefore, has great potential for future applications.

The MQMAS and STMAS NMR experiments both yield high-resolution NMR spectra of half-integer spin nuclei. STMAS is known for its increased sensitivity[1] owing to effective excitation of the single-quantum satellite transitions, making it advantageous for the study of NMR insensitive nuclei such as ^{33}S.

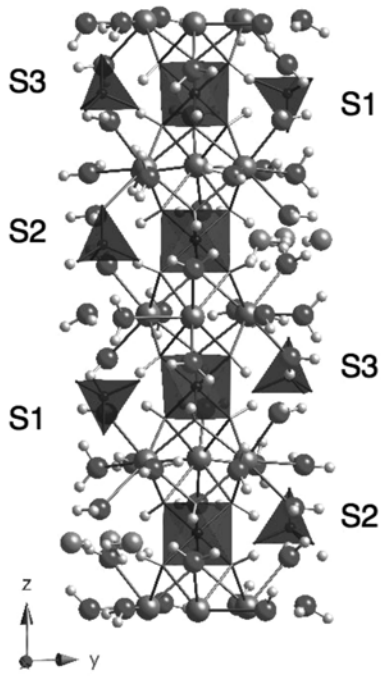


Figure 1. Crystal structure of ettringite (tetrahedron = SO_4^{2-}).

^{33}S NMR, quadrupolar nuclei, solid-state NMR

○ささきあきこ，スティーブン・ウインペリス

Ettringite

Ettringite ($Ca_6Al_2(SO_4)_3(OH)_{12}\cdot 26H_2O$) is a cementitious mineral that is central to the chemistry of concrete and cement. The crystal structure is known[2] (Figure 1) and there has been an early ^{27}Al MAS NMR study.[3] There have been two ^{33}S MAS NMR studies of ettringite at high field.[4,5] These two studies disagree, with one simulating the ^{33}S MAS NMR spectrum with a single S site[4] and the other simulating it with three S sites[5] (in accordance with the diffraction study), leaving uncertainty in the number of crystallographically different S sites observed by ^{33}S NMR. Here, we aim to characterise the distinct S sites in ettringite using ^{33}S STMAS at natural abundance and resolve the ambiguity present in the current literature.

Implementing ^{33}S STMAS

Despite its sensitivity advantage, STMAS is known to be more technically demanding compared to the MQMAS technique. Here, for successful implementation of natural abundance ^{33}S STMAS, we thoroughly considered (i) the choice of diameters and effective ST excitation, (ii) STMAS pulse length optimisation using ^{33}S MAS of $AlNH_4(SO_4)_2\cdot 12H_2O$, (iii) spinning axis calibration using $^{85/87}Rb$ STMAS of $RbNO_3$ and (iv) sensitivity check at B_0 = 20.0 T using a model system (1:1 molar mixture of Na_2SO_4 and K_2SO_4).

^{33}S STMAS and CASTEP NMR calculations of ettringite

Natural abundance ^{33}S STMAS spectra of ettringite were successfully recorded at B_0 = 20.0 T and 9.4 T. The resulting two-dimensional STMAS spectra were analysed by centre-of-gravity method, and the quadrupolar parameters were refined by fitting to the one-dimensional MAS spectra. A set of quadrupolar parameters for three crystallographically distinct S sites was obtained to achieve consistency over the one- and two-dimensional ^{33}S spectra at different B_0 fields. Our isotropic (F_1) projection analysis reveals that our fitting parameters are in better agreement with the experimental results than the set of fitting parameters previously suggested in the literature.

CASTEP calculations of ^{33}S NMR parameters were performed, including chemical shift reference establishment and evaluation of geometry optimisation schemes. Notably, the calculated C_Q values of ettringite were significantly larger than the experimental parameters, implying the presence of motional narrowing of the central transition MAS lineshape, potentially arising from the dynamics of SO_4^{2-} ions or the surrounding H_2O molecules. The presence of dynamics could not have been proposed solely on the basis of either CASTEP calculations or experimental NMR spectra.

References

1. N. G. Dowell, S. E. Ashbrook, and S. Wimperis, *J. Phys. Chem. B* **108**, 13292 (2004).
2. F. Goetz-Neunhoeffer and J. Neubauer, *Powder Diffraction* **21**, 4 (2006).
3. J. Skibsted, E. Henderson and H. J. Jakobsen, *Inorg. Chem.* **32**, 1013-1027 (1993).
4. J.-B. d'Espinose de Lacaillerie, F. Barberon, B. Bresson, P. Fonollosa, H. Zanni, V. E. Fedorov, N. G. Naumov, and Z. Gan, *Cem. Concr. Res.* **36**, 1781 (2006).
5. M. R. Hansen, M. Brorson, H. Bildsøe, J. Skibsted, and H. J. Jakobsen, *J. Magn. Reson.* **190**, 316 (2008).

P65 ゼオライトの^{29}Si MAS NMR測定に対するニトロキシラジカルの常磁性緩和効果

○稲垣怜史[1], 川村 出[1], 窪田好浩[1], 内藤 晶[1]
[1]横浜国大・大学院工学研究院

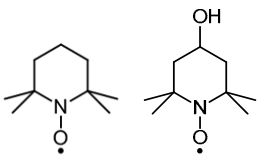
Paramagnetic effect of nitroxide radicals on the sensitivity of ^{29}Si MAS NMR measurements of zeolites

○Satoshi Inagaki[1], Izuru Kawamura[1], Yoshihiro Kubota[1] and Akira Naito[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Kanagawa, Japan.*

The paramagnetic doping of nitroxide radical (TEMPO or TEMPOL) in zeolite can effectively enhance the signal intensity of ^{29}Si solid state magic angle spinning NMR. This technique can be applied to both the hydrophilic/hydrophobic zeolite materials, while Cu^{2+} doping is limited to hydrophilic zeolite.

1. 緒言

ゼオライトは結晶性アルミノケイ酸塩であり，その結晶構造に由来して規則的に配列したマイクロ孔をもつ。この多孔質シリカ材料では粒子内の silanol（SiOH）の定性・定量がその機能制御に重要であるため，高分解固体 NMR 測定が強力なツールとして用いられている。しかし ^{29}Si 核の固体 NMR 測定では，天然存在比が低い，緩和時間が長い，などの問題がある。そこで本研究グループではこれまでに，Cu^{2+}などの常磁性金属イオンが ^{29}Si 核の緩和速度を促進する効果を利用してゼオライトおよび規則性メソポーラスシリカの高分解固体 NMR の迅速測定が可能であることを報告した [1,2]。本研究では TEMPO，TEMPOL といった常磁性ニトロキシラジカルがゼオライトの ^{29}Si 核の緩和に与える影響について検討した。



TEMPO　　TEMPOL

2. 実験方法

本検討で用いるゼオライトは酸素 12 員環ミクロ孔をもつゼオライトベータとし，Al を含まず，SiO_2 からなる試料を調製した。疎水的なゼオライトベータ（beta_HF）は水熱合成時に原料混合物にフッ酸を添加することで調製し [1]，親水的なゼオライトベータ（beta_OH）はフッ酸を加えずに水熱合成により得た [3]。所定量の TEMPO（または TEMPOL）のエーテル溶液にゼオライトベータを浸漬し数分間撹拌した後にエバポレーターでエーテルを留去することでニトロキシラジカル (0.1 mmol/g-zeolite) をミクロ孔に内包したゼオライトベータを得た。また既報 [1]に従い，1.0 mmol -Cu/g-zeolite となるように Cu^{2+}を担持したゼオライトベータも調製した。^{29}Si dipolar-decoupling (DD) MAS NMR 測定には AVANCE III（Bruker，600 MHz）を用い，MAS 速度 10 kHz にて 3, 5, 10, 15, 20, 30 s の繰り返し時間で各々1024 回積算した。

3. 結果・考察

2 種のゼオライトベータの水蒸気吸着等温線（25℃）で相対圧 0.9 での水蒸気吸着量を比べる

^{29}Si 核の緩和時間短縮，規則性多孔質シリカ材料，常磁性ラジカル

○いながきさとし，かわむらいずる，くぼたよしひろ，ないとうあきら

ことで，beta_HF (1.3 mmol/g)が beta_OH (15 mmol/g)に比べて非常に疎水的であることが確かめられた。

未修飾の beta_HF (Fig.1a)では，Q_4 [= $(SiO)_4\underline{Si}$] に由来するピークが–110～–117 ppm の間に観測された。ゼオライトベータでは，Si が入りうる，結晶学的に対称性の異なる 9 種の四面体サイト（T サイト）があり，これら複数のピークはそれぞれ，9 種の T サイトに帰属できる [4]。この試料では繰り返し時間 3 s のスペクトルは，30 s のスペクトルに比べてピーク強度が大幅に減少していた。親水的なゼオライトベータでは 1.0 mmol-Cu/g-zeolite の Cu^{2+}修飾を行うことで，^{29}Si 核の spin-lattice relaxation rate（縦緩和速度）を飛躍的に促進できることを見出している [1,2]。しかし Cu^{2+}/beta_HF (Fig.1b)では，縦緩和速度の促進効果はほとんど見られなかった。これは，beta_HF では疎水性が高く，修飾処理時に Cu^{2+}がゼオライトのミクロ孔内に入り込まず，粒子内の ^{29}Si 核と近接することができなかったためと考えられる。そこで常磁性を有するニトロキシラジカルである TEMPO または TEMPOL の修飾を beta_HF に行った。TEMPO/beta_HF では ^{29}Si 核の縦緩和速度を顕著に促進できたものの，ピークのブロード化が顕著に起きていた。これは TEMPO が ^{29}Si 核の spin-spin relaxation rate（横緩和速度）も促進したためと推測できる。一方，TEMPOL/beta_HF (Fig.1c)では，わずかにピークのブロード化が見られるものの選択的に縦緩和速度を促進できることが明らかとなった。また TEMPOL による縦緩和速度の促進効果は親水的な beta_OH でも得られており，ニトロキシラジカルは Cu^{2+}に比べてゼオライトの ^{29}Si 核の緩和速度を促進する試薬として汎用性が高いことがわかった。

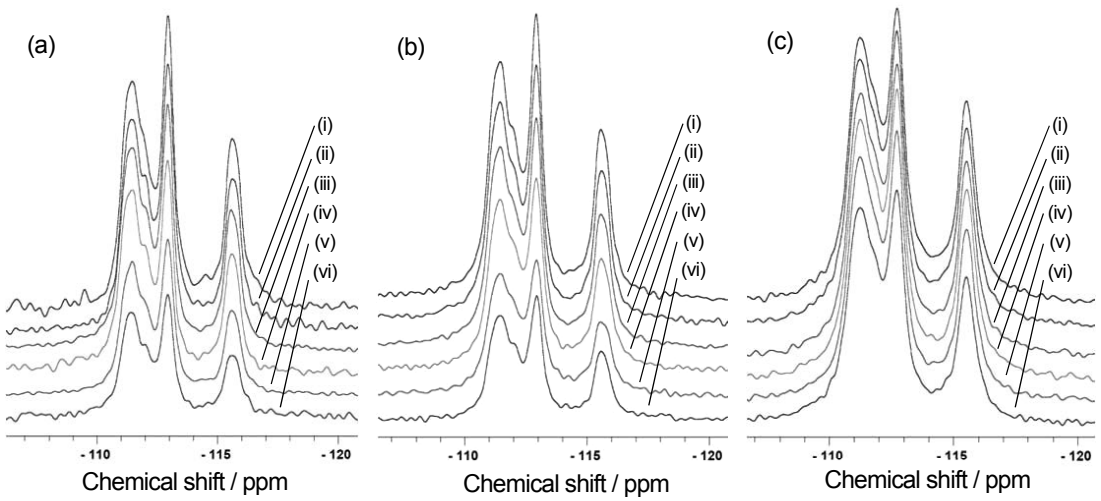


Figure 1. ^{29}Si DD MAS NMR spectra of (a) unmodified beta_HF, (b) 1.0-CuEDTA/beta_HF and (c) 0.1-TEMPOL/beta_HF by various recycle times of (i) 30 s, (ii) 20 s, (iii) 15 s, (iv) 10 s, (v) 5 s and (vi) 3 s. Accumulation, 1024 times; magic angle spinning rate, 10 kHz.

4.文献

1) S. Inagaki, I. Kawamura, Y. Sasaki, K. Yoshida, Y. Kubota, A. Naito, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, 15, pp.13523–13531.
2) 稲垣怜史，川村 出，佐々木優吉，吉田 要，窪田好浩，内藤 晶，第 52 回NMR 討論会講演要旨集, 2013, pp.356–259 (P105).
3) R.J. Saxton, US Patent 545351, 1995.
4) J. Pérez-Pariente, J. Sanz, V. Fornés, A. Corma, *J. Catal.*, 1990, 124, pp.217–223.

P66 固体NMRによるキンヒドロン合成時の固相反応過程の研究

○伊澤研一郎，野田泰斗，竹腰清乃理
京都大学大学院理学研究科

Solid-State NMR on Solid-State Reaction Process of Quinhydrone

○Kenichiro Izawa, Yasuto Noda, and K.Takegoshi
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

Solid-state reaction is important in, for instance, drug development. However, its detailed mechanism has not been explained yet. It is known that quinhydrone (QH) can be synthesized by grinding solid benzoquinone (BQ) and hydroquinone (HQ) together. In this work, in purpose of unraveling QH solid-state reaction mechanism, XRD, ^{13}C CP/MAS NMR and ex-situ measurements were carried out. We found that, in the solid-state reaction, the diffusion process relies on BQ molecular diffusion, and the growing process proceeds via QH microcrystallines, not via particular intermediates.

【1. 序論】

溶媒を用いない固相反応による分子結晶の合成は、液相反応では得られない物質の提供と低環境負荷を兼ね備えた有用な合成法として特に創薬分野において重要な位置を占める。固相反応過程は、固体中で原材料となる原子や分子が拡散して化学反応を起こす拡散過程と、その後中間体やアモルファス相を経由して最終的な生成物にいたる成長過程の、2 つに大きく分けられる[1]。

キンヒドロン(QH)は原料であるハイドロキノン(HQ)粉末とベンゾキノン(BQ)粉末を 1:1 で混合するだけで合成される最も古く最も単純な分子結晶である(Fig. 1)が、その固相反応過程は未だ解明されていない。固相における拡散過程では、HQ の水酸基の水素が拡散しても、BQ(あるいは HQ)分子が拡散しても QH は生成し得る(Fig. 2)。電荷移動錯体である QH で水素の移動は考えにくいが、その一方で、1 原子より大きな BQ 分子が室温で HQ 結晶内部へ浸透することも考えにくく、どのような拡散過程を経由しているのかは不明である。また、QH には単斜晶(mono-QH)と三斜晶(tri-QH)の 2 つの多形体が存在する[2,3]。これまでに、未加熱および加熱温度が低い条件下で固相反応させると mono-QH と tri-QH の混合物が得られ、この混合物を 85℃で熱処理すると、最終的に mono-QH が成長することが判明している[4]。この転移は液相反応により合成した tri-QH では起こらず固相反応特有の現象である[4]が、そのメカニズムは不明である。

本研究ではキンヒドロンの固相反応過程を明らかにすることを目指し、固体 NMR を用いてミクロな視点から解析を行った。具体的には、拡散過程では次に提案する原理に基づき、重水素化原料を用いて合成した QH の ^{13}C CP/MAS 測定から原子と分子のどちらが拡散しているか判別した。成長過程では異なる温度で焼きなましたキンヒドロンの ex-situ NMR と XRD を組み合わせることで、核形成と結晶多形の変遷を焼きなまし温度を変えて追跡した。

キンヒドロン，固相反応，ex-situ

○いざわけんいちろう，のだやすと，たけごしきよのり

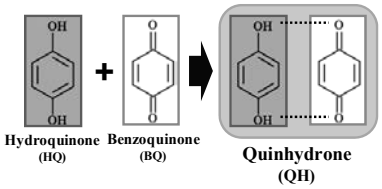


Fig. 1 Reaction formula of QH solid-state synthesis.

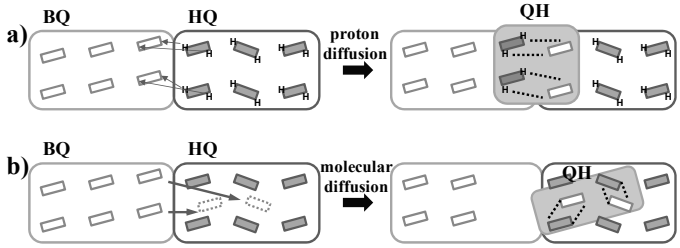
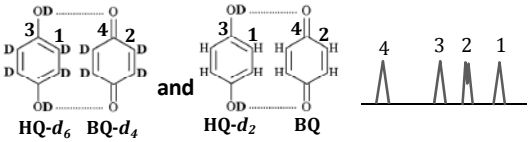


Fig. 2 Reaction and diffusion model of QH solid-state synthesis. (a) Proton diffusion model. (b) Molecular diffusion model.

【2. 原理】

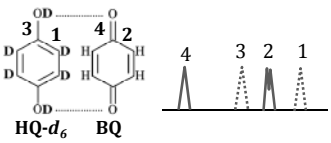
原料拡散過程は以下に述べる「A.プロトン拡散モデル(Fig. 2a)」と、「B.分子拡散モデル(Fig. 2b)」の 2 種が考えられる。拡散プロセスの解明は重水素化 HQ ($C_6D_4(OD)_2$) (= HQ-d_6) を原料として作製した QH の ^{13}C CP/MAS 測定及び、QH 各原子のコンタクトタイム(CT)依存性を解析することで可能となる。

A. プロトン拡散 ：HQ分子のOH基の水素がBQ結晶内へ浸透してBQ分子と結合することでHQ分子へと変化し(拡散元のHQ分子はBQ分子に変化し)、このHQ分子(BQ分子)が周囲のBQ分子(HQ分子)と組を形成してQHが生成するというモデルである。化学的性質上、ベンゼン環上のプロトンは拡散しないと考えられるため、原料HQ-d_6とBQからプロトン拡散過程を経て生成するQHは、HQ-d_6とBQ-d_4からなるQHと、HQ-d_2とBQからなるQHの2つに限定される(Fig. 2a)。HQ-d_6とBQ-d_4からなるQHは全ての水素が重水素化されているため^{1}H-^{13}C CP/MASでは観測されない。HQ-d_2とBQからなるQHは^{1}H-^{13}C CP/MASで観測され、サイト1, 3のピークのCT依存性と、サイト2, 4のピークのCT依存性はそれぞれ同じようになると予想される(Scheme 1)。



Scheme 1 Expected QH molecules (left) and the ^{13}C CP/MAS NMR spectrum (right) according to the reaction of proton diffusion model.

B. 分子拡散 ：BQ分子そのものがHQ結晶内部へ浸透し、HQ分子と結合してQHが生成するというモデルである。QH分子内におけるproton hopping が生じる場合を除き、BQとHQが後天的にそれぞれHQとBQへと変化することはない。このためHQ-d_6とBQから分子拡散過程を経て生成するQHは、HQ-d_6とBQから成るQHのみとなる(Fig. 2b)。この場合^{13}C CP/MAS測定において、CTが短いとpeak1, 3の強度はpeak2, 4の強度よりも相対的に小さく、CTが長くなるにつれBQのプロトンから磁化が移動し、相対的に同等の大きさになると予想される(Scheme 2)。



Scheme 2 Expected QH molecules (left) and the ^{13}C CP/MAS NMR spectrum (right) according to the reaction of molecular diffusion model.

【3. 実験】

試料調製 : [拡散過程用] 通常のHQ、完全重水素化HQ-d_6をそれぞれBQと混合し、乳鉢で十分に粉砕混合した。混合比率はBQの昇華性を考慮し、HQ : BQ = 1 : 1.05とした。これらの試料を80℃にて焼きなましした。

[成長過程用] 室温で通常のHQとBQを乳鉢中で粉砕混合した後、小瓶にとりわけてそれぞれ所定の温度で焼きなましした。焼きなまし温度は室温(未加熱)、55℃、90℃の3種類である。一定時間経過後小瓶から試料を取り出し、試料管に詰め室温で測定した。

測定 : [固体NMR] 7 T 磁場とChemagnetics社製5 mm MAS probeを用いて行った。^{1}Hと^{13}Cの照射周波数はそれぞれ301.37 MHz、75.788 MHz、MAS速度は8 kHz とした。測定法は^{1}H-^{13}C CP/MASを用いた。

[XRD] 線源としてCu-Kαを備えたRigaku社製 Mini Flex 600 を用いて測定を行った。

【4. 結果・考察】

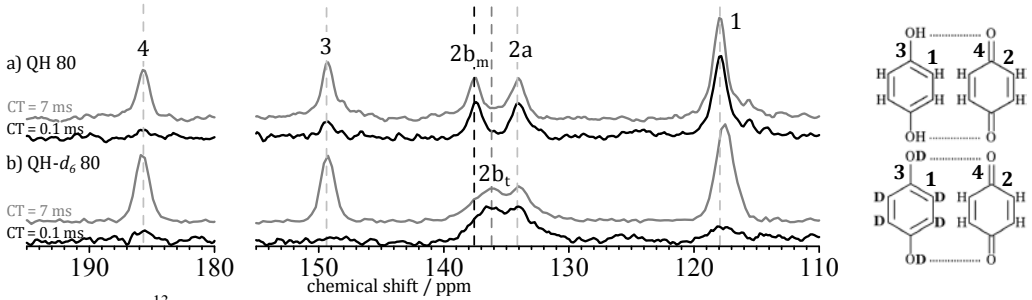


Fig. 3 ^{13}C NMR spectra of (a) QH and (b) QH deuteride on different contact time.

[4-1.拡散過程] Fig. 3に (a)通常のHQから合成したQHと (b)HQ-d_6から合成したQHの^{1}H-^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを示す。黒線がCT 0.1 ms、灰色線が7 msで測定したスペクトルである。ピークは図中の番号に対応したサイトで帰属される[5]。スペクトル(a) とスペクトル(b) でpeak2の形状が異なるのは、合成した試料がそれぞれ単斜晶と三斜晶であるためである。CTが7 ms ではQH分子の全ての^{13}Cに^{1}H磁化が移動しており、a, b両試料のピーク強度に違いは見られなかった。一方で、CTが0.1 ms では、試料aはpeak1, 3に^{1}Hの磁化が移動していたが、試料bについてはpeak2以外にほとんど磁化は移動していない。この結果は試料bのQH-d_6分子がHQ-d_6とBQの組で構成されることを示している。この結果から*[2-A,B 原料拡散]*の議論に従って、固相反応過程における原料拡散プロセスはBQの分子拡散が担うと結論できる。

[4-2.成長過程] QHのpeak2b部分の化学シフトはtri-、mono-QHの結晶相によって異なり、それぞれpeak2b$_t$、peak2b$_m$に対応する。Ex-situ NMR測定により得られたスペクトルについてピーク分離による解析を行い、焼きなまし温度と加熱時間によるQH全体に対するmono-QH の割合の変化をプロットしたものが(Fig. 4)である。mono-QHの割合は*{(peak2b$_m$面積) / (peak2b$_m$面積+peak2b$_t$面積)}*で表した。この結果、室温で焼きなますとmono-QHの割合は

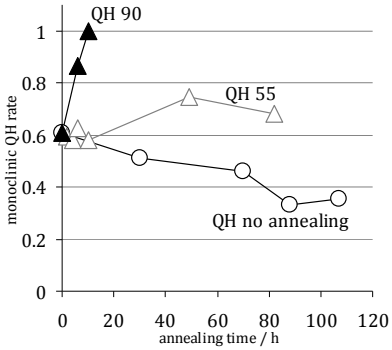


Fig. 4 Ex-situ experiment of QH on different annealing process.

時間とともに減少したが、80 hを過ぎるとほとんど変わらなくなった。55℃ではmono-QHの割合は時間が経過してもほとんど変化しなかった。90℃ではmono-QHの割合が時間とともに増加し、10 h後には全てのtri-QHがmono-QH単相に変化した。

この結果を踏まえると、焼きなまし温度に対応して反応速度が増加し得られるmono-QHの割合が増加することが分かった。特に90℃焼きなましに関しては、粉砕混合により得られたmono-QH、tri-QH が短時間でmono-QH単相へと変化しており、転移が起きていることは明らかである。一方で、55℃以下の焼きなましでは相転移は完全には進行せず、ある割合で停止する。これは粉砕混合によって生成したmono-、tri-QH の双方が、反応の進行により並行して増加し、一部のtri-QHのみがmono-QHへと変化するためと考えられる。

結晶子の成長との相関を解析するために、55℃で焼きなましたQHについてex-situ XRDも測定した。XRD測定では4 h→82 hにおいて連続してmono-QHのピークが増加した(Fig. 5)。一方でNMRによる測定の結果では、4 h→49 hではXRD測定結果と同様にmono-QHのピーク増加が確認できたが、49 h→82 hではピークの変化は起こらず、tri-→mono-QHの転移あるいはmono-QHの新規生成が完全に停止したことが分かる。この結果は49 h時点で55℃におけるQHの転移を含む固相反応は停止し、その後はmono-QHの粒径が成長していくことでXRDでも観測ができる粒子が増加したことを示している。これは、固相反応では分子拡散後アモルファスのような中間構造をとることなく、直接QHの微結晶が生成することを示唆している。

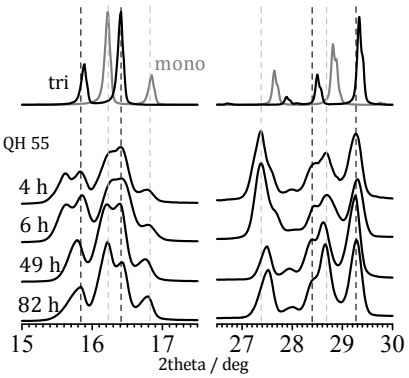


Fig. 5 Ex-situ XRD experiment of QH.

この結果を踏まえると、固相反応で生成したtri-QHと、液相反応で合成したtri-QHの間に存在する相違は、結晶子の大きさであると推察される。微結晶状態では自由度の高い表面の占める割合が大きいためtri-QHからmono-QHへの転移は容易に進行するが、溶液から合成したtri-QHは粒径が大きく転移は起こりづらいと考察されるためであり、これら転移機構の解明が今後の課題である。

【5. 結論】

^{1}H-^{13}C CP/MAS 測定によるQH拡散過程の解析と、ex-situ NMR, XRD 測定によるQH成長過程の追跡を行った。拡散過程は原料BQ分子の分子拡散が担い、HQ結晶内部へBQ分子が浸透していくことで反応が進行する。成長過程は中間体を経由せず、拡散と同時にQHの微結晶が生成・成長する。tri-QHからmono-QHへの転移しやすさは温度に依存し、低温時には転移しづらい。

【6. 参考文献】

[1] T. Frisščić and W. Jones, *Crystal Growth & Design*, 2009, **9**, 1621-1637.
[2] T. Sakurai, *Acta Cryst*., 1965, **19**, 320-330.
[3] T. Sakurai, *Acta Cryst*., 1968, **B24**, 403-412.
[4] 伊澤ら, 第52回NMR討論会要旨集, 2013, P87, pp.318-319.
[5] J. R. Scheffer et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 4898-4904.

P67

pHを変えて固体化したシステイン保護CdSeナノ粒子の表面状態の固体NMR

○栗原拓也, 野田泰斗, 竹腰清乃理
京都大院・理学研究科

Solid-State NMR Study of the Surface States of Cysteine-Capped CdSe Nanoparticles Solidified at Various pH Values

○Takuya Kurihara, Yasuto Noda, and K. Takegoshi
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Powder cysteine-capped CdSe nanoparticles (CdSe-Cys), which were solidified from CdSe-Cys aq. at various pH values, showed different redispersibilities depending on pH values. CdSe-Cys solidified at pH = 11 redispesed very well, while solidified at lower pHs than 11 showed worse redispersibilities as the pH became lower. We analyzed the surface states of CdSe-Cys by using solid state NMR, and concluded that the ligand-cysteine changed the states by pH values in solidifying affected the redispersibility of CdSe-Cys.

1. 序論

溶媒中で合成されたナノ粒子を、その物性を保ったまま固体化することは、ナノ粒子の研究や応用において非常に重要である。固体化後に物性が保たれているかどうかを判断する指標の一つとして、溶媒への再分散性が挙げられる。Fig. 1に中～塩基性の様々なpHで固体化を行った、システインに保護されたCdSeナノ粒子(以下、CdSe-Cys)の吸光スペクトルを示す。pH＝11で固体化されたものは最もよく水中に再分散し、422 nmに鋭い吸光ピークを示している。しかし、固体化を行うpHが下がるにつれて、粒子の再分散性が低下しているのがわかる。リガンドとして用いられているL-システインは COOH、SH、NH_2と3つの官能基を持ち、それぞれの酸解離定数の値は1.8、8.3、10.3前後である。粒子の分散性はリガンドに左右される部分が大きいことから、固体化を行うpHに依存した粒子表面のシステインの状態の変化が、粒子の再分散性に影響を与えている可能性が高いと言える。本研究では、様々なpHで溶液中から固体化を行ったCdSe-Cysについて、固体NMRを用いた粒子表面の状態の解析を行い、再分散性を決定する要因を明らかにする。

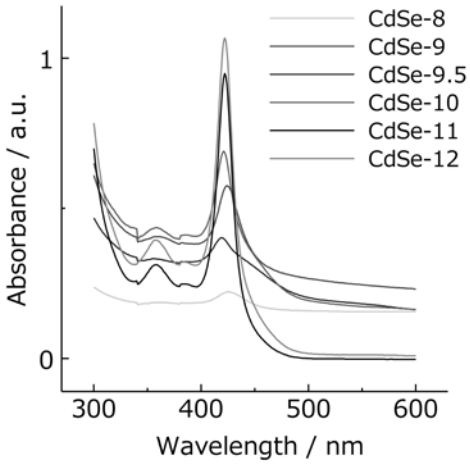


Fig. 1　UV-vis spectra of CdSe-X_{pH}. X_{pH} is a pH value in solidifying.

半導体ナノ粒子、システイン、表面状態

○くりはらたくや、のだやすと、たけごしきよのり

2. 実験

CdSe-Cysは、NaOHによって強塩基性にされたCd^{2+}-Cys錯体水溶液と、Na_2SeSO_3水溶液を、Cd : Se : Cys = 1 : 0.5 : 4となるように混合することで合成される。溶液中の粒子は、NH_4Cl水溶液によりCdSe-Cys水溶液のpHを11に調整した後、アセトン添加による貧溶媒法によって沈殿させ、これを遠心分離、真空乾燥を行うことで固体として得る。合成されたCdSe-Cysは422 nmに鋭い吸光ピークを示すことから$(CdSe)_{34}$マジックサイズクラスター[1]であると考えられており、リガンドであるシステインはSがCdと結合、NH_2が粒子表面と相互作用していること、またカルボキシル基にNa^+が結合してCOONaとなっていることが報告されている[2]。

本研究では、上記のようにして得られたCdSe-Cys固体を再度水中に分散し、そこへ様々なpHに調整された(Cys + NaOH)水溶液を加えることで、pH = 8, 9, 9.5, 10, 11, 12のCdSe-Cys水溶液を作製、先と同様の手順により固体化を行い6種類の試料を得た。なお、システインはどの試料に対してもCd^{2+}-Cys錯体水溶液の調整に用いた量と同量を用いており、そのためpH値の調整はNaOHの量を変えることで行った。以下、試料は$CdSe\text{-}X_{pH}$ (X_{pH} = 8, 9, 9.5, 10, 11, 12)と表記する。これらの吸光スペクトルはFig. 1に示した通りである。

固体NMRを磁場9.4 Tで行い、^1H (400.24 MHz)、^{13}C (100.65 MHz)、^{23}Na (106.07 MHz)を測定した。また、FT-IR測定も行った。

3. 結果と考察

Fig. 2に$CdSe\text{-}X_{pH}$およびシステインの$^{13}C\{^1H\}$ CP/MAS NMRの結果を、システインの構造式とともに示す。各ピークの帰属は図中に示したとおりである。

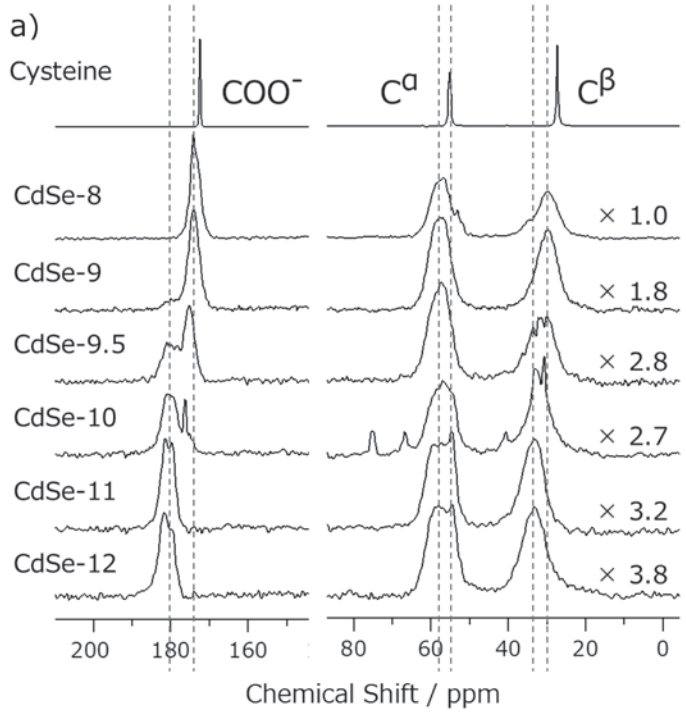


Fig. 2 (a) $^{13}C\{^1H\}$ CP/MAS NMR spectra of cysteine and $CdSe\text{-}X_{pH}$, measured with a MAS speed of 20 kHz, a contact time of 1 ms, and 100,000 scans. The scales are shown at the right of each spectrum. (b) The structural formula of cysteine.

全体の傾向として、CdSe-9.5とCdSe-10の間で各ピーク位置に変化が起きており、特にカルボキシル基のピークの181 ppm前後から174 ppmへの変化が顕著である。また、各ピークの強度が、固体化時のpHが低くなるにつれて増大している。

次に、Fig. 3に^{1}H MAS NMRの結果を示す。CdSe-11, 12のスペクトルは線幅が細く、システインが高い運動性を持っていることがわかる。しかし、固体化時のpHが低くなるにつれて線幅は増大し、運動性の低下がうかがえる。同時に7.6 ppm付近にNH_3^+によるものと帰属される新たなピークが生じており、システインの運動性の低下にNH_3^+が関わっている可能性があると考えられる。

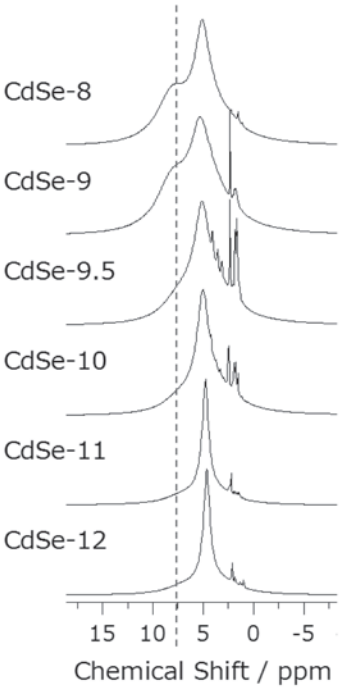


Fig. 3 ^{1}H MAS NMR spectra of CdSe-X_{pH}, measured with a MAS speed of 20 kHz, and 64 scans.

Fig. 4の^{23}Na static NMRの結果からは、固体化時のpHが低くなるにつれてNaの量が減っていることがわかる。Naは固体化の際にカルボキシル基に結合したものが観測されることから、固体化時のpHの低下に従ってNa^+以外のものがCOO^-に結合している可能性が高い。^{1}H NMRの結果を合わせて考えると、COO^-にはNH_3^+が結合していると推察され、このイオン結合の影響によりカルボキシル基の^{13}Cピークの化学シフトに変化が起きたと考えられる。

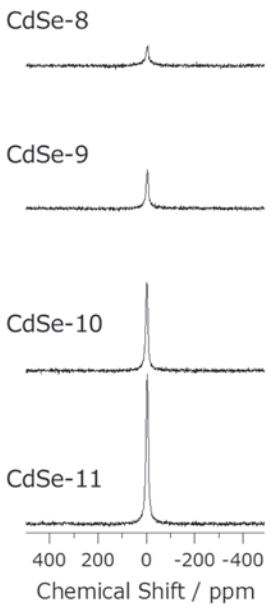


Fig. 4 ^{23}Na static NMR spectra of CdSe-X_{pH}, measured with 256 scans.

Abrahamらは、システインに保護された金ナノ粒子のCOO^-がNH_3^+とイオン結合を形成することを報告しており、そのカルボキシル基の^{13}C NMRピークは173 ppmに観測されている[3,4]。このことからも、本実験において174 ppmに観測された^{13}CピークはNH_3^+と結合したカルボキシル基のものであると考えるのが妥当であると判断した。この結合によってリガンドのシステインは運動の自由度が低下し、それが^{1}H NMRの線幅増大として観測されたと思われる。また、システインの官能基どうしが結合してしまったことにより水和が妨げられ、その結果再分散性の低下が生じたと考えられる。

^{13}Cピークの強度の変化より、このイオン結合はリガンドのシステインと、水中にある単体のシステインとの間で多く生じ、粒子表面のシステインが2層になっていると考えられる。この場合、リガンドに結合した単体のシステインのSHのピークが^{1}H NMRにより観測されると期待されるが、今回の実験では分解能が足りず、観測は難し

かった。しかし、FT-IR測定ではCdSe-8, 9, 9.5のスペクトルの2536 cm^{-1}にSHの伸縮によるピークが確認され、単体のシステインがリガンドとイオン結合していることを示唆している。さらに、IRスペクトルからは固体化時のpHが下がるにつれてNH_2およびNaと結合したCOO^-によるピークが消え、逆にNH_3^+によるピークが現れてくる様子も観測されており、NMRによる解析の結果と整合している。

CdSe-9.5とCdSe-10の間で^{13}C NMRスペクトルに大きな変化が起きたことから、リガンドのシステインのNH_2の酸解離定数は9.5～10の間にあると考えられる。システイン単体のNH_2の酸解離定数は10.3前後であるが、リガンドのシステインの場合、SがCdと結合しているために値が変化したものと思われる。

4. 結論

CdSe-Cysは固体化を行う際の溶液のpHによって、粒子表面のシステインが水中のシステインとイオン結合を生じ、これが再分散性の低下を引き起こすことをNMRにより解明した。リガンドのシステインのNH_2の酸解離定数は9.5～10の間の値であり、CdSe-Cysを溶液中から固体として得る際はこれより十分高いpHで固体化することが、粒子の物性を保持したまま固体化を行う上での重要な要素の一つとなりうる。このように、水中で合成されたナノ粒子の固体化を行う際はpHを適切に調整することが重要となるであろう。

5. 参考文献

[1] A. Kasuya et al., Nat. Mater. 3 (2004) 99.
[2] 澤上勲ら、第51回NMR討論会 (2012)、P89
[3] A. Abraham et al., J. Phys. Chem. C, 114 (2010) 18109.
[4] A. Abraham et al., J. Phys. Chem. B, 116 (2012) 7771.

6. 謝辞

本研究はJSPS科研費25888009研究活動スタート支援の助成を受けて実施されました。

P68 核磁気共鳴法によるCsの粘土シートへの吸着挙動解析

○茨城萌[1]，大窪貴洋[1]，岩舘泰彦[1]，出口健三[2]，大木忍[2]，清水禎[2]
[1] 千葉大学大学院工学研究科
[2] 物質・材料研究機構

Solid-state Analysis on behavior of adsorption of Cs in clays

○Moe Ibaraki[1], Takahiro Ohkubo[1], Yasuhiko Iwadate[1], Kenzo Deguchi[2], Shinobu Ohki[2], Tadashi Shimizu[2]
[1]*Graduate School of Engineering, Chiba University, Chiba, Japan.*
[2] *National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan.*

In this study, we studied Cs absorbed structure on clay minerals (Montmorillonite and Saponite) by ^{133}Cs solid-state NMR and molecular dynamics simulation. ^{133}Cs MAS NMR at temperature ranging from 173 to 306 K showed the same line shape as that at room temperature. ^{133}Cs 3QMAS NMR spectra elucidated existence of Cs sites with different quadrupole coupling constant, which of Montmorillonite was less than that of Saponite. The molecular dynamics simulation indicated that layer structure of Montmorillonite was a zigzag sandwich structure. On the other hand, Saponite had more symmetric layer structure. Such different layer stacking structure may explain cross peaks in ^{133}Cs 3QMAS NMR spectra.

【緒言】

東日本大震災を原因とする東京電力福島第一原子力発電所事故によって，大量の放射性セシウムが土壌に放出された。放射性核種である^{137}Csは，半減期が30年と長いことから環境への長期的影響が懸念されている。Csの拡散を精密に予測するために，土壌中でのCsの挙動を理解することが必要である。粘土には，陽電荷をもつ分子やイオンを層間に吸着する性質があり，粘土へのCsの吸着挙動が土壌中でのCsの拡散に大きな影響を与える[1]。そこで本研究では，^{133}Cs固体核磁気共鳴法(NMR)によりCsの粘土への吸着状態を解析し，分子動力学(MD)計算を併用してピークの帰属を行ったので報告する。

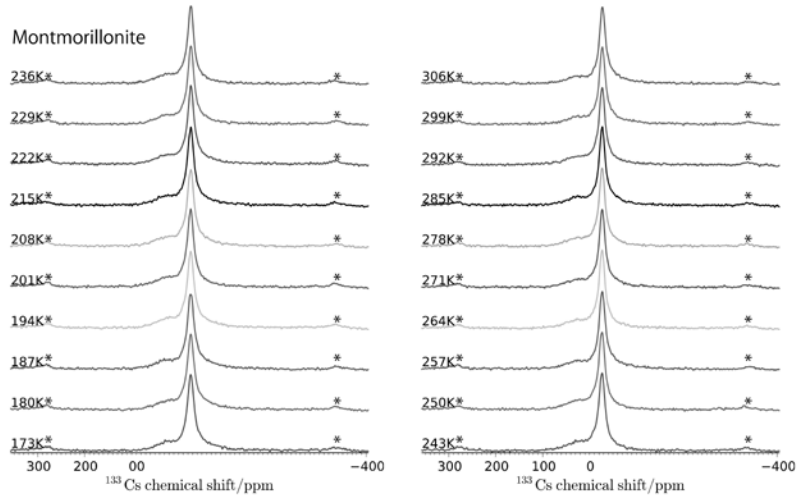


Fig. 1 ^{133}Cs MAS NMR spectra of Montmorillonite (Mikawa) at each temperature ranging from 173 to 306 K.

133Cs NMR，粘土鉱物，分子動力学-GIPAW計算

○いばらきもえ，おおくぼたかひろ，いわだてやすひこ，でぐちけんぞう，おおきしのぶ，しみずただし

【実験】

測定に使用した粘土は，月布産モンモリロナイトと合成サポナイトの２種類である。全ての粘土は，１ M CsCl水溶液中で撹拌することにより，層間の陽イオンをNaからCsに置換した。層間陽イオンを置換した粘土試料は，^{133}Cs MAS NMRおよび^{133}Cs 3QMAS NMRによって測定を行った。また，MD計算は既存のポテンシャルパラメータを用いて約10,000原子で形成される分子モデルでシミュレーションを行った。

【結果と考察】

Figure 1は，三川産モンモリロナイトの^{133}Cs MAS NMRスペクトルの温度変化を示す。ピークトップは，温度が上昇するに従ってわずかに高磁場側へとシフトした。また，各温度におけるピークを見ると，いずれの温度においてもピークの形がほとんど変化しないことが確認された。これより，粘土層間のCsは，低温においても室温時と同様の水和状態をとることが分かった。

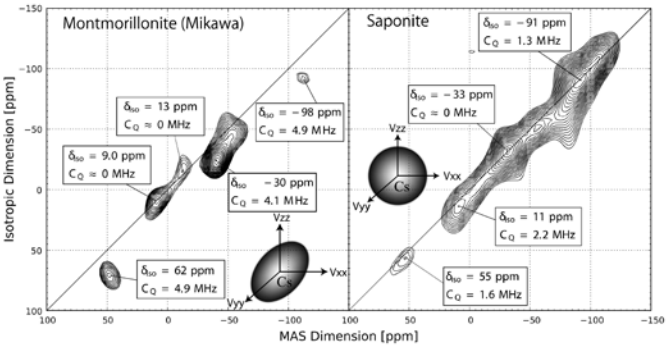


Fig. 2 ^{133}Cs 3Q MAS NMR spectra of Montmorillonite (Mikawa) and Saponite.

Figure 2は，乾燥処理を行った三川産モンモリロナイトおよび合成サポナイトの^{133}Cs 3Q MAS NMRスペクトルを示す。合成サポナイトの全てのクロスピークは，図中に実線で示す対角線上に現れた。一方で三川産モンモリロナイトのクロスピークは，対角線より下側に現れる。この結果はCsの四極子結合定数が大きいことを意味し，三川産モンモリロナイトは，合成サポナイトよりもCs周りの配位構造の対称性に歪みを持っているといえる。

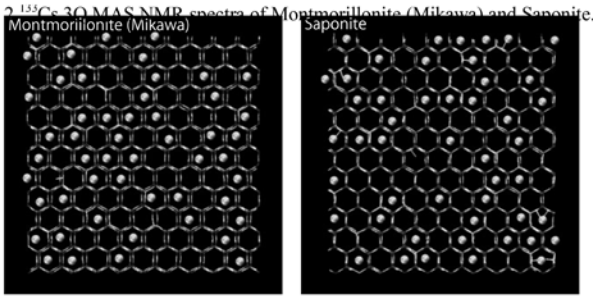


Fig. 3 Snapshots of Montmorillonite(Mikawa) and Saponite.

Figure 3は，三川産モンモリロナイトおよび合成サポナイトのMD計算により得たスナップショットを示す。図中の球はCs^+で，バーは層を形成する結合を示す。モンモリロナイトおよびサポナイトは，四面体シート上に６つの底面酸素で形成した六員環状のくぼみをもつ。MD計算の結果から，Csは乾燥状態で四面体シートの六員環に嵌まり込む形で吸着していることが明らかになった。MDのスナップショットから層の積み重なりを評価したところ，サポナイトは対称に積層しているのに対して，モンモリロナイトはジグザクに積層していることが明らかになった。この結果より，サポナイトの粘土層間に吸着したCsは対称性の高い12配位になると考えられる。一方でモンモリロナイトでは積層構造のずれに由来する，サポナイトと比較して対称性の悪い12配位をとると考えられる。

【参考文献】

[1] Yukio Tachi *et al.*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **75**, 6742-6759 (2011)

P69

in situ Li NMRによるリチウムイオン電池の過充電状態の解析

○伊塚美里[1]・後藤和馬[1]・杉山照泰[2]・中東里英[2]・新井寿一[2]・武田和行[3]・石田祐之[1]
[1]岡山大院・自然科学
[2]ヤマハ発動機
[3]京大院・理

In situ solid NMR study for real component lithium ion batteries in overcharge state

○Misato Izuka[1], Kazuma Gotoh[1], Sugiyama Teruyasu[2], Nakahigashi Rie[2], Arai Jyuichi[2], Kazuyuki Takeda[3], Hiroyuki Ishida[1]
[1]*Graduate School of Natural Science & Technology, Okayama University, Okayama, Japan.*
[2]*Yamaha Motor Co., Shizuoka, Japan.*
[3]*Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

Lithium ion batteries (LIBs) play an important role for power source of electrical devices and electric vehicles. We assembled practical cells for *in situ* ^{7}Li NMR using $LiCoO_2$, $LiNi_xCo_yAl_z$, or $LiMn_2O_4$ as the materials of positive electrode, and graphite or hard carbon as the materials of negative electrode. Each cell was overcharged to 170% of state of charge (SOC), and then measured ^{7}Li NMR in every 17 minute to observe the state of deposited Li metal. The ^{7}Li NMR measurements revealed a decrease of the signal assigned to Li metal deposited on the negative electrode surface by overcharging. The hard carbon electrode has a greater effect on the Li metal relaxation than the graphite electrode.

［緒言］

リチウムイオン二次電池は携帯電話や電気自動車などのバッテリーとして重要な役割を果たしている。近年では、リチウムイオン二次電池の充放電に伴う電池内部の状態変化をリアルタイムで観測するために、サンプルセルをNMRプローブ中に置き充放電しながら測定を行う*in situ* NMRを用いた研究が行われるようになってきている[1)2)]。我々は昨年のNMR討論会において、正極にコバルト酸リチウムやマンガン酸リチウム等の金属酸化物、負極に黒鉛を用いた実電池について、*in situ* NMRによる解析を行った結果を報告した。本研究では、電池を過充電した際に負極上に析出するデンドライト状リチウムの状態変化を明らかにするために、正極に金属酸化物、負極に黒鉛もしくはハードカーボンを用いた実電池サンプルを作製し、過充電後の時間変化をNMRで観測した[3)]。

［実験］

アルミ箔上に$LiCoO_2$ (LCO)、$LiNi_xCo_yAl_z$ (x:y:z = 8:2:<0.1) (NCA)、

リチウムイオン電池，in situ NMR,

○いづかみさと，ごとうかずま，すぎやまてるやす，なかひがしりえ，あらいじゅいち，たけだかずゆき，いしだひろゆき

$LiMn_2O_4$(LMO)を塗工・プレスした正極、および銅箔上に黒鉛またはハードカーボンを塗工・プレスした負極でセパレーターを挟み、外装にはアルミ蒸着ラミネートを用いた*in situ*測定用セルを作製した。*in situ* ^{7}Li NMRは上記セルに合うように扁平に巻いた検出用コイル、およびNMR磁石外の充放電電源とセルの共振を取り除く高インピーダンストラップを備えた専用プローブを用い、7.0 Tの磁場で測定した。また、飽和LiCl水溶液を0 ppm標準とし、シングルパルス系列を用いた。負極が黒鉛のセルの容量は4.5 mAh、ハードカーボンのセルの容量は3.5 mAhで、これらをSOC 0%から170%(満充電の1.7倍量)まで、LCO/graphite、NCA/graphite、LMO/graphiteは2 Cで、LCO/hard carbonは3 Cで過充電し、直後から観測を行い^{7}Li NMRスペクトルの時間経過による変化を追った。

[結果と考察]

SOC 170%まで過充電した各サンプルセルを*in situ* NMRで観測したところ、LCO/graphite、LCO/hard carbon、NCA/graphiteではサンプルセル内の負極上に析出したと考えられるLi金属の信号(260 ppm付近)を確認したが、LMO/graphiteでは、Li金属の信号は観測されなかった。これはSOC 100%のとき、LMO中のリチウムの残存量がLCOに比べて約半分であることに起因すると考えられる。Fig. 1 にLCO/graphiteとLCO/hard carbonのNMRスペクトルの時間変化を示す。過充電した直後のLi金属の信号強度から、Li金属の析出はLCO/graphiteの方がLCO/hard carbonよりも多いことがわかった。このLi金属の信号強度は時間の経過とともに減少し、一方で負極黒鉛内にリチウムが挿入されてできる層間化合物のリチウムの信号強度(38 ppm付近)は増加した。このことから、析出したリチウム金属は黒鉛層間内に吸収されることがわかった。また、本研究ではLCO/hard carbonの方がLCO/graphiteよりもより多くの析出したLi金属を吸収した。この結果は、黒鉛が多数の炭素六角網面が密に積層した層状構造をしているのに対し、ハードカーボンは数層程度の炭素薄膜がランダムに配置され、内部細孔を多く持つ構造であることに由来していると考えられる。NCA/graphiteでは、LCO/graphiteよりもLi金属の析出が少なく、また吸収量も少ないことがわかった。これは、正極の持つリチウムの容量の違いが原因と考えられる。本研究により、過充電で析出したLi金属が時間の経過とともに負極の黒鉛またはハードカーボン層間内に吸収される現象をはじめて明らかにすることができた。

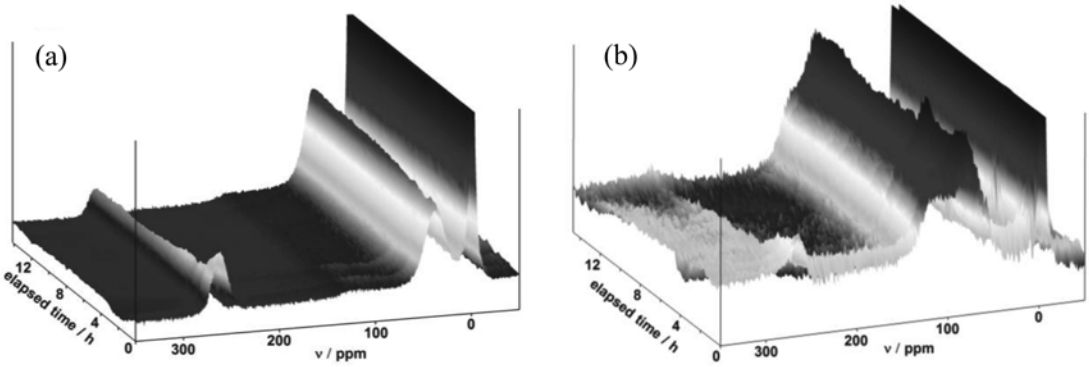


Fig. 1 Temporal variations of ^{7}Li NMR specra of a LCO/graphite cell (a), and a LCO/hardcarbon cell (b) after overcharging.

[参考文献]

1) C.P.Grey et al., *Solid. State. Nucl. Magn. Reson*, **42** (2012) 62–70.

2) K. Shimoda et al., *Electrochim. Soc*, **161(6)** (2014) A1012-A1018.　3) K.Gotoh et al., *Carbon*, (2014) in press.

P70

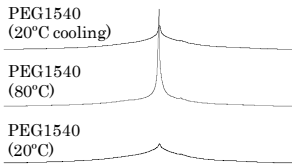
温度可変固体NMR測定によるポリエチレングリコール含浸木材の解析

○西田雅一[1], 田中智子[1], 兼松渉[1], 三木恒久[2], 金山公三[2]
[1]産総研・計測フロンティア（中部）
[2]産総研・サステナブルマテリアル

Analysis of impregnating wood with polyethylene glycol by variable temperature solid state NMR

○Masakazu Nishida[1], Tomoko Tanaka[1], Wataru Kanematsu[1], Tsunehisa Miki[2], Kozo Kanayama[2]
[1] Research Institute of Instrumental Fortier, AIST, Nagoya, Japan.
[2]Material Research Institute for Sustainable Development, AIST, Nagoya, Japan.

To investigate an effect of interaction of polyethylene glycol (PEG) and components of wood on thermal expansion characteristics of PEG-impregnating woods, variable temperature (VT) solid state NMR spectra were measured around 20-80ºC. Signal intensities in ^{1}H and ^{13}C PST-MAS NMR spectra were changed depending on the temperature and a molecular weight of PEG. In ^{13}C CP-MAS NMR spectra, although intensities of wood signals changed in small, intensities of PEG signals increased in increasing temperature. The rate of increase also depended on the molecular weight and it correlated to linear expansion coefficients of the PEG-impregnating woods.



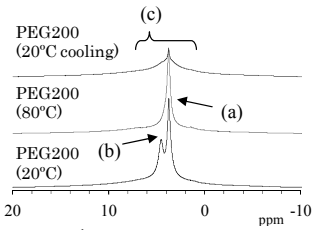
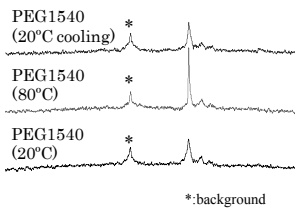


Fig.1 ^{1}H MAS NMR of PEG-impregnating woods



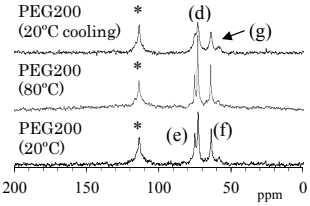


Fig.2 ^{13}C PST-MAS NMR of PEG-impregnating woods

木質材料の強度や寸法安定性を改善する方法の一つとして、薬液含浸技術が知られている。我々のグループでは、ポリエチレングリコール（PEG）の添加の有無やその分子量がヒノキの熱膨張性挙動に大きく影響し、特に、分子量が600～1540のPEGを含浸することで、極めて小さい線膨張係数値を示すことを見出している。特に、50℃付近の熱膨張挙動がPEGの分子量に大きく依存している。そこで、20℃から80℃の温度領域での固体NMRスペクトルを測定することで、ヒノキとPEGの分子レベルでの相互作用がPEG含浸ヒノキの熱膨張挙動に対して与える影響を調べた。

分子量200のPEG（PEG200）と分子量1540のPEG（PEG1540）を含浸したヒノキの温度可変（VT）^{1}H MAS NMRスペクトルでは（図１）、PEGのシグナルは(a)として現れるが、PEG200では同時に水のシグナルが(b)に現れていた。いずれの場合も、温度に依存して強度が変化していた。一方、バルク

昇温降温NMR測定，交差分極，^{13}C PST-MAS NMR

○にしだまさかず，たなかともこ，かねまつわたる，みきつねひさ，かなやまこうぞう

（セルロース、ヘミセルロース、リグニン）の^{1}Hシグナルはブロードな(c)として（a)と重複していたが、温度による変化はほとんどなかった。PEG200及びPEG1540含浸ヒノキの^{13}C PST-MAS NMRスペクトルにおいては(図２）、PEGのシグナルは(d)にOCH_2CH_2Oが、(e),(f)に末端のOCH_2CH_2OHが現れ、^{1}Hのシグナルと同様、温度に依存して増減していた。また、バルクのシグナルについては(g)にごく小さなシグナルが現れていたが、一部は(d)-(f)のPEGのシグナルに重複していた。

次に、PEG含浸ヒノキのピーク強度の温度変化の分子量による依存性を調べた。^{1}Hのシグナル強度の変化については（図３）、未処理とPEG200含浸ヒノキでは水のシグナルが現れ、いずれの場合も60℃付近でほとんど消失していた。また、PEGのシグナルについては、PEGの分子量が小さい場合、温度増加に伴いシグナルが減少、あるいは、ほとんど変化していなかった。一方、分子量が大きい場合、温度増減とともにシグナルも増減していた。この分子量によるPEGのシグナル強度の温度依存性の違いは、^{13}C PST-MAS NMRでも同様で(図４)、^{1}Hと^{13}C PSTのいずれの場合についても、PEGの運動性の増加と水とPEGの間のNOE効果の両方がPEGのシグナル強度を増大させると考えられた。

続いて、^{13}C CP-MAS NMR（図５）では、バルクのシグナルを効率良く検出することができたが、温度によるスペクトルの変化は限定的であった。一方、PEGのシグナルはこれと比較してごく弱く、高温で71ppm付近に糖鎖の肩ピークとして検出できるのみであった。このPEGの^{13}C CPシグナル強度の温度変化については（図６）、PEG600では比較的低温域でもシグナルが検出できていたのに対して、PEG200やPEG6000では80℃でのみ検出が可能で、その強度も小さかった。PEG600そのものは室温以上では液体であり、非常に小さな^{13}C CPシグナルしか与えないことから、バルクとPEGが相互作用により交差分極が可能となり、PEGの^{13}C CPシグナルが検出できるようになると考えられた。以上の結果から判断して、PEGの^{13}C CPシグナル強度はバルクとPEGの相互作用をよく反映すると考えられた。一方、PEG含浸ヒノキの線膨張係数がPEG600～1540で最も小さくなり、これが40～60℃付近での^{13}C CPシグナル強度と相関性があることから、PEGがヒノキ中に効率よく浸透することで相互作用が大きくなり、バルクの熱振動エネルギーを緩和することが、線膨張係数が小さくなる一つの要因であると推測された。

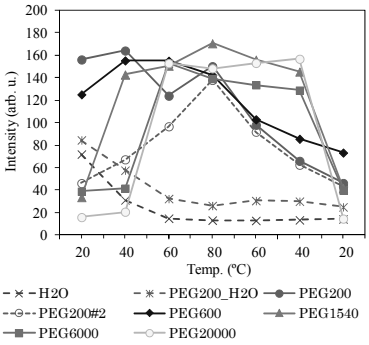


Fig.3 Changes of ^{1}H signals in VT ^{1}H MAS NMR spectra

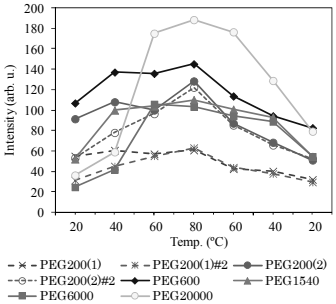


Fig.4 Changes of PEG signals in VT ^{13}C PST-MAS NMR

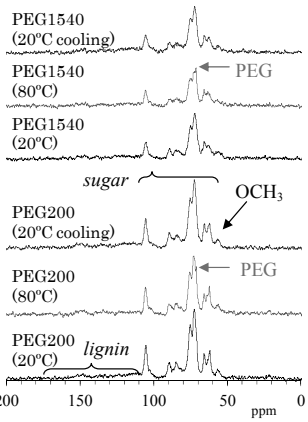


Fig.5 ^{13}C CP-MAS NMR of PEG-impregnating woods

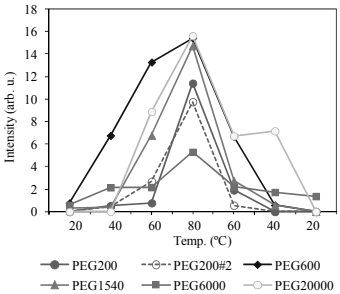


Fig.6 Changes of PEG signals in VT ^{13}C CP-MAS NMR

P71

固体NMRによる鉄鋼関連材料中のフッ素のキャラクタリゼーション

○高橋貴文[1], 金橋康二[1], 長坂徹也[2]
[1]新日鐵住金株式会社　先端技術研究所
[2]東北大学大学院　工学研究科　金属フロンティア工学専攻

Solid state NMR characterization of fluorine in steel industry-related materials

○Takafumi Takahashi[1, 2], Koji Kanehashi and Tetsuya Nagasaka[1]
[1]Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation
[2]Department of Metallurgy, Materials Science and Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University

Behavior of fluorine (F) in steel making byproducts as slag and dust is substantially important in promoting their recycle. Strong magnetism in the byproducts has often prevented us from acquiring F NMR spectra capable of clarifying its chemical structure.In this study, high resolution ^{19}F NMR spectra obtained under ultrafast MAS has shown that F in dust has main chemical bonding with Ca, and may have some bonding with Al.

$^{31}P\{^{19}F\}$ CPMAS NMR enabled us to obtain ^{31}P NMR spectra of fluorapatite ($Ca_5(PO_4)_3F$, FAP), which are free from obstruction of cuspidine($3CaO \cdot 2SiO_2 \cdot CaF_2$), CaF_2, and $Ca_3(PO_4)_2$. As a result of dependency of spectrum integral of $^{31}P\{^{19}F\}$ CPMAS NMR spectra, a calibration curve was obtained. Using the calibration curve, we have quantified the amount of FAP in model slag, and estimated the ratio of fluorine immobilized to FAP.

１．緒言

フッ素（F）は、環境規制物質の一つであり、土壌・水質ともに厳しい管理基準が設けられている。スラグ・ダスト等製鉄副生成物の再利用を進めるうえでは、Fの不用意な溶出等を減らし、環境負荷を抑える必要がある。環境中でのFの挙動は、濃度のみならず、化学的な存在状態（化学構造）がより重要な因子と考えられる。

これまでに、スラグ・ダストと言ったフッ素の化学的存在状態は、主に、XRD、EPMA, SEM-EDSなどが用いられてきた。しかしながら、F濃度が数mass%以下ということもあり、試料全体の構造に関する知見が得られているとは言えない。

固体NMRは、F等軽元素の化学構造解析に有効であるが、スラグ、ダスト解析で活用するためには、常磁性金属の影響低減、F化学構造の定量が課題となる。例えば、電炉ダストでは、ジンクフェライト($ZnFe_2O_4$)の存在により、固体ＮＭＲ測定が非常に困難である。今回、超高速MAS法を用いて、ダスト中Fの化学構造を調査した。本研究では、電炉ダスト中のフッ素に対して、超高速MAS法を適用してフッ素のキャラクタリゼーションを試みた。また、フッ素を固定する物質として、フルオロアパタイト($Ca_5(PO_4)_3F$, FAP)が注目されている[1]。そこで、$^{31}P\{^{19}F\}$CPMAS法によるFAP定量方法を検討し、モデルスラグの解析に応用した。

２．実験方法

固体 NMR 測定は、分光計 JEOL-ECA700, または Agilent-Inova500 を用いて行った。ダストの測定には、 Agilent Inova500(ω_F=470.6MHz), 1.2mmφ プローブ、試料回転速度 60kHz、^{19}F-MAS 法を用いた。$Ca_5(PO_4)_3F$ の定量には、JEOL-ECA700 (ω_F=658.8MHz,

Fluorine, UltrafastMAS, Dust & Slag
○たかはし　たかふみ、かねはし　こうじ、ながさか　てつや

ω_P=283.4MHz), 3.2mmφ プローブ、試料回転速度 20kHz, $^{31}P\{^{19}F\}$CPMAS 法を用いた。

３．結果および考察

３－１．ダスト試料中のFの化学構造

Figure 1に、低速および高速回転時の^{19}F MASスペクトルの比較を示す。60kHzの回転によってssbが低減され、-100ppm付近のメインピークが容易に識別されている。

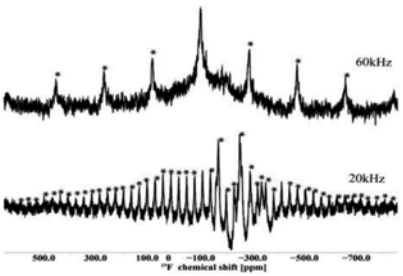


Fig. 1. ^{19}F MAS NMR spectra of dust A sample acquired at different spinning rates. *: spinning side bands (ssb)

^{19}Fの化学シフトは、経験的そして計算科学的にも結合元素によってほぼ一定領域に収まる値を示すことが知られている[2]。これに基づくと、ダストAの^{19}F-MASスペクトルは、Ca-F結合を示している。また、他のダストについては、一部Al-F結合も示唆する結果が得られた。ダスト試料は球状粒子の集合体である事から、Fは鉱物相ではなく、アモルファス状と推定される。

３－２．モデルスラグ中のFAPの定量

FAPの定量には、^{19}F MAS, ^{31}P MASを使う方法が考えられる。ただし、 ^{19}F MAS法では、Cuspidine($3CaO \cdot 2SiO_2 \cdot CaF_2$), CaF_2とのピーク重複を分離できない。また、^{31}P MAS法では、^{31}P MAS法では、FAP以外のPO_4も同位置に観測されるため、過剰な定量値を与える可能性が高い。そこで、本研究では、$^{31}P\{^{19}F\}$CPMAS法で、FAP由来の^{31}P信号を観測した。また、コンタクトタイム(t)依存性を測定してビルドアップカーブ (Fig. 2) を作成し、この曲線を以下の式(１)[3]によって解析し、 tに依存しないピーク強度M_0を求め、検量線を作成した。

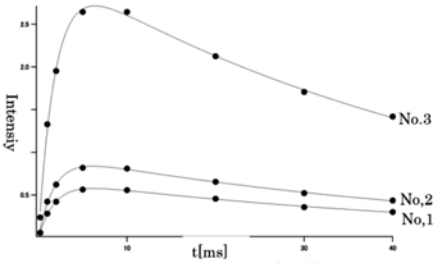


Fig. 2. Build up curves for $^{31}P\{^{19}F\}$ NMR peak of FAP-bearing reference samples.

$$M_{cp}(t) = M_0\left\{\left(\exp\left(-\frac{t}{T_{1\rho}^F}\right) - \exp\left(-\frac{t}{T_{P-F}}\right)\right) \Big/ \left(1 - \frac{T_{P-F}}{T_{1\rho}^F}\right)\right\} \quad (1)$$

そのうえで、別途、作製したモデルスラグに関して、^{31}P MAS スペクトル (Fig. 3) を測定した。ビルドアップカーブよりM_0を求め、上記検量線からFAPの含有量を求めた。FAP中のFの割合を定量した結果、カスピディンが重なる^{19}F MASスペクトルから定量した場合に比べて低い値となり、元素組成を考慮しても妥当な値が得られた。よって、$^{31}P\{^{19}F\}$CPMAS法は、複数のFの化学構造が混在する中で、FAP定量に有効な方法であると考えられる。

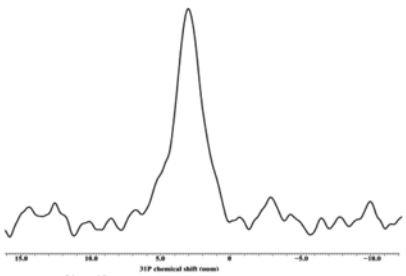


Fig. 3. $^{31}P\{^{19}F\}$ NMR spectra of model slag No.1. Contact time=0.8ms

４．結論

✓超高速MASの恩恵により、従来解析困難であったダスト等製鉄副生成物中のFの化学結合に関する知見が得られた。

✓$^{31}P\{^{19}F\}$CPMAS法によりFAPの定量法を検討した結果、モデルスラグで妥当な結果を得ることができた。複数のCa-F化合物を含む系に対し、有効な解析手法と考えられる。

参考文献 [1]M. Tafu and T. Chohji, *J. Eur. Ceram. Soc.***26**,767 (2006) [2] Mo. Body et al. *J. Phys. Chem. B*, 109,10270 (2005)
[3]Mehring, M. "High Resolution NMR spectroscopy in solids " Springer-Verlag, Berlin, 1976, chapter 4

P72 炭素系導電性サンプルのMASによる温度上昇の検討

秦 弘一郎[1], ○出田 圭子[2], 戸田 繁美[3], 原田 竜介[3], 持田 勲[4],
尹 聖昊[1,2], 宮脇 仁[1,2]
[1] 九州大学 総合理工学府 量子プロセス理工学専攻
[2] 九州大学 先導物質化学研究所
[3] 東海カーボン株式会社
[4] 九州環境管理協会

Temperature elevation due to MAS of carbon-based conductive materials

Koichiro Hata[1], ○Keiko Ideta[2], Shigemi Toda[3], Ryusuke Harada[3], Isao Mochida[4],
Seong-Ho Yoon[1,2], Jin Miyawaki[1,2]
[1] *Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan*
[2] *Institute for Material Chemistry and Engineering, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan.*
[3] *Tokai Carbon Co., Ltd., Aichi, Japan.*
[4] *Kyushu Environmental Evaluation Association, Fukuoka, Japan.*

Solid state NMR is now actively applied to analyses of ion behaviors in carbon electrodes for batteries and capacitors due to an increase of magnetic field strength and a progress of measurement techniques. For conductive materials such as graphitic carbons, however, MAS generates eddy current, which gives rise to the temperature elevation. In this study, we tried to develop an estimation method of the temperature elevation during MAS of the conductive carbon materials, that is, the electrical resistivity evaluation, and investigated factors of the carbon materials that affect the electrical resistivity, such as oxygen content, functional groups, graphitization degree and grain structure.

【序論】

固体NMR法はその測定手法の進歩や磁場強度の増大に伴い近年材料の分野への適用範囲が広がっており、電池やキャパシタ等の炭素電極中のイオン挙動解析においてもNMRの有用性が示されている。Magic angle spinning（MAS）は固体NMRでは一般に用いられるが、試料管の空気摩擦により試料温度が上昇する。これに加えて、炭素材料のように導電性を有する試料においては、強い磁場中でのMASが渦電流による発熱を引き起こす。これらを原因とする急激な温度上昇は、試料に変化をもたらし、また装置に深刻なダメージを与える可能性がある。例えば、試料の変質、吸着イオンや分子の脱着、試料の液化によるMASの不安定化、さらにはガス発生・内圧上昇を伴う試料の熱分解による試料管やプローブの破損などの危険性がある。このようなリスクを低減するためには、NMR測定前に温度上昇程度を予め把握することが求められる。

本研究では、簡便な温度上昇程度の見積法（電気抵抗率測定）の開発を行い、さらに電気抵抗値に影響する因子を解明するために、酸素含有量や官能基の種類、黒鉛の

導電性炭素材料, MAS, 温度上昇, ^{207}Pb
はた こういちろう, ○いでた けいこ, とだ しげみ, はらだ りゅうすけ,
もちだ いさお, ゆん そんほ, みやわき じん

発達度合い、粒子構造の影響について検討した。

【実験】

試料は、導電性炭素材料であるカーボンブラック（CB）、アセチレンブラック（AB）、ケッチェンブラック（KB）および人造黒鉛（MAG）を用いた。CBおよびABについては、表面官能基量を変化させた試料も用いた。MAS測定は、温度を評価するため試料に硝酸鉛を10 wt%の割合で混合し、固体^{207}Pb測定を行った。電気抵抗率 ρ は、試料を充填した固体試料管の両端をテスターに接続して測定するという簡便な方法によって評価した（Fig. 1）。

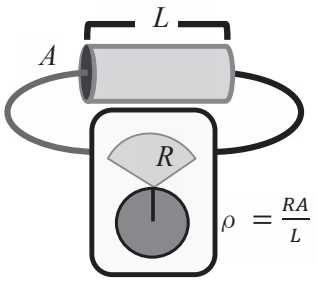


Fig. 1. Schematic diagram of electrical resistivity evaluation

【結果および考察】

Fig. 2 に、MAS速度5 kHzまたは10 kHzにおける温度上昇程度の平均値を示す。いずれのMAS速度においても、 ρ の値が小さいほど（導電性が高いほど）温度上昇程度が大きい傾向にあることが分かった。このことから、簡易的な電気抵抗率測定値から試料の温度上昇程度を見積もることが可能であり、導電性炭素材料のMAS測定を安全に行う指標となりうることが分かった。なお、 ρ の値が極めて小さいMAGについては、その非常に高い導電性のためにMASを行う自体が不可能であった。

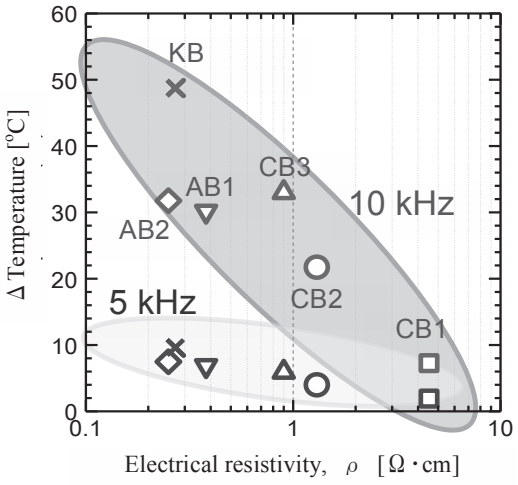


Fig. 2. Relationship of temperature rise and electrical resistivity of carbon materials

炭素材料の ρ の値は元素組成や黒鉛化度などによって変化すると考えられる。Table 1に各試料の元素分析の結果を示す。酸素含有量O(diff.)が増加するに連れて ρ の値が大きくなるという傾向が見られ、このことは電子吸引性の官能基が炭素六角網面内の π 電子密度を減少させたことによると解釈した。一方、AB2はO(diff.)が3.93 wt%という比較的高い値にも関わらず、0.25 Ω・cmという小さな ρ 値を示した。これは酸素含有表面官能の種類の違いに起因すると考えている。含まれる官能基の種類や黒鉛の発達度合い、粒子構造の影響について詳細に調べることで、さらに温度上昇の予測精度があがると考えられるため、現在検討中である。

Table 1. Electric resistivity and elemental composition of carbon materials

Sample	ρ [Ω・cm]	C [wt%]	H [wt%]	N [wt%]	O(diff.) [wt%]
CB1	4.52	93.47	0.53	0.21	5.79
CB2	1.31	95.33	0.61	0.25	3.81
CB3	0.90	97.96	0.42	0.33	1.29
AB1	0.38	98.21	0.32	0.13	1.34
AB2	0.25	96.03	0.00	0.04	3.93
KB	0.27	98.45	0.23	0.05	1.27
MAG	0.042	99.87	0.00	0.05	0.08

【謝辞】

本研究の一部は、「附置研究所間アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト」特別経費（文部科学省）および（独）新エネルギー・産業総合開発機構の助成を受けて行われた。

P73

メソポーラスシリカSBA-16に取り込まれたNaCl水溶液中の水分子のダイナミクスの解析

○宮東達也[1]，大橋竜太郎[1]，井田朋智[1]，水野元博[1]，橘高茂治[2]
[1]金沢大院・自然
[2]岡山理大・理

Analysis of water dynamics near sodium ion in NaCl aqueous solution confined to mesoporous silica SBA-16.

○Tatsuya Miyatou[1], Ryutaro Ohashi[1], Tomonori Ida[1], Motohiro Mizuno[1], Shigeharu Kittaka[2]
[1]*Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Japan.*
[2]*Faculty of Science, Okayama University of Science, Japan.*

The concentration-temperature phase diagram of NaCl-water mixture is well-known. Mobility of water molecule in NaCl-water mixture increase at low temperature than that of pure water because of Na^+ ion-water and Cl^- ion-water interaction. Freeze point of Water in Mesoporous silica SBA-16 is very low because of confinement effect. In this work, hydration environment and water dynamics near Na^+ ion in NaCl aqueous solution in SBA-16 was investigated by ^{23}Na NMR line shape and spin-lattice relaxation time(T_1).

【序】

過冷却状態で水は高密度液体(HDL)-低密度液体(LDL)の 2 相に相分離し、また 220 K、100 MPa 付近に液-液臨界点が存在することが示唆されている[1]。しかし Bulk 状態の水では結晶化が起きるために液-液転移についての実験的な検証は困難である。そのために HDL や LDL の存在や HDL-LDL 転移について明らかにするためにメソポーラスシリカ細孔内の水のダイナミクスや構造がこれまでに広く研究されてきた。近年、過冷却状態の NaCl 水溶液の水和構造やダイナミクスの変化が調べられ、塩の添加により水分子の LDL 構造の不安定化が起こることが示された[2]。このようにメソポーラスシリカ内に取り込まれた電解質水溶液の低温での構造やダイナミクスは水の液-液転移の観点から興味深い。

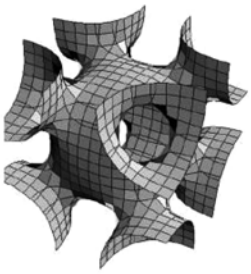


Fig. 1 Structure of SBA-16[3].

本研究では NaCl 水溶液をメソポーラスシリカ SBA-16 細孔内に導入することで結晶化を抑制し、Na^+イオン周辺の水和構造や水分子のダイナミクスについて明らかにすることを目的とした。Fig.1 に SBA-16 の構造を示す[3]。SBA-16 は直径数 nm 程度の球形のメソ細孔が 3 次元的に架橋した構造を持つ。またそれに加えて球の表面にかなりの低温まで凍結しない[4]。本研究では低温での ^{23}Na NMR スペクトルの線形解析

メソポーラスシリカ，分子運動，^{23}Na NMR

○みやとうたつや，おおはしりゅうたろう，いだとものり，みずのもとひろ，きったかしげはる

より Na^+イオン周辺の水和構造について解析した。また ^{23}Na NMR スピン-格子緩和時間(T_1)の温度変化測定より Na^+イオンに水和した水分子のダイナミクスについて調べた。

【実験】

SBA-16 の合成条件は文献[4]に示された。球形の細孔の直径が 7.8 nm である SBA-16 を測定試料とした。濃度 0.0-4.0 M の NaCl 重水溶液を SBA-16 と共存させ、脱気し細孔内へ水溶液を導入したものを測定試料とした。^{23}Na NMR の測定は JEOL ECA-300 と Bruker AVANCE 200 を用い、2 種類の異なる磁場強度で測定を行った。共鳴周波数はそれぞれ 78.030 MHz と 52.938 MHz である。T_1 の測定は高温側の測定では反転回復法を用い、低温側の測定は飽和回復法を用いた。

【結果と考察】

Fig. 2 に SBA-16 に取り込まれた 4.0 M NaCl 水溶液の ^{23}Na NMR T_1 の温度変化を示す。温度変化は降温方向で行った。図中に破線で DSC 測定から求められた SBA-16 細孔内の NaCl 水溶液の凍結温度を示す。^{23}Na NMR の緩和は Na^+ 周辺の水分子の回転運動によって支配されていると考えられる。Fig. 2 中の白丸は共鳴周波数 52.938 MHz で測定した T_1 であり、黒丸は 78.030 MHz での測定から求めた T_1 である。実線と破線でそれぞれについての BPP の理論式によるフィッティングを示した。190 K 以上での T_1 の違いは共鳴周波数の違いのみによってよく説明された。一方 190 K 以下では 2 種類の共鳴周波数で測定した T_1 の値がほぼ一致することが分かった。^{23}Na NMR T_1 より求められた水分子の運動の活性化エネルギーの値は 26 kJ/mol となった。これは Bulk の氷の値[5](57 kJ/mol)と比較してかなり小さく Na^+イオン周辺で水分子の運動性が大きくなっていることがわかる。これは Na^+イオンにより水分子間の水素結合が切断されるためと考えられる。

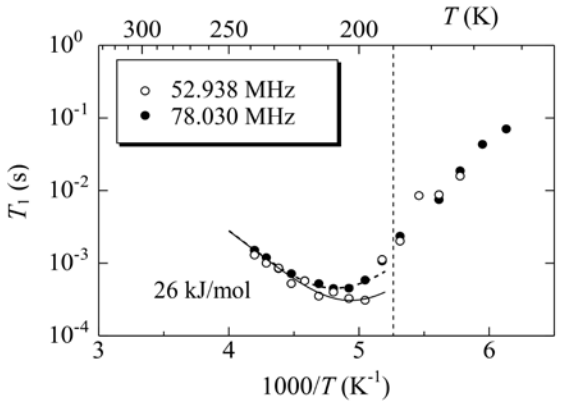


Fig. 2 Temperature dependence of ^{23}Na NMR T_1 of 4.0 M NaCl aqueous solution in SBA-16. The measurements was carried out at two different magnetic field. The both measurements was carried out at decreasing temperature.

【参考文献】

[1] P. H. Poole, F. Sciortino, U. Essmann, and H. E. Stanley, *Nature* **360**, 324(1992).

[2] D. Corradini, M. Rovere, and P. Gallo, *J. Phys. Chem. B* **115**, 1461(2011).

[3] Y. Sakamoto, M. Kaneda, O. Terasaki, D. Y. Zhao, J. M. Kim, G. Stucky, H. J. Shin, and R. Ryoo, *Nature* **408**, 449(2000).

[4] S. Kittaka, Y. Ueda, F. Fujisaki, T. Iiyama, and T. Yamaguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 17222(2011).

[5] R. J. Wittebort, M.G. Usha, D. J Ruben, D. E. Wemmer, and A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5668(1988).

P74 アルギン酸–イミダゾール複合体の局所構造とプロトン伝導性

○近井琢磨，大橋竜太郎，井田朋智，水野元博
金沢大学大学院・自然科学研究科

Local Structure and Proton Conductivity in Alginic Acid-Imidazole Composite

○Takuma Chikai, Ryutaro Ohashi, Tomonori Ida, Motohiro Mizuno
Graduate School of Natural Science and Technology, Knazawa Univ.

The composite materials consisting of the biopolymers of alginic acid (AA) and imidazole (Im) become a high anhydrous proton conducting membrane. The reorientational motion of Im is considered to involve in the proton conduction mechanism of this AA-Im composite material. However, detailed information about molecular motion has yet to be obtained. Therefore, we have investigated the mobility of Im in AA-Im using solid-state deuterium NMR. Additionally, the relation between molecular motion of Im and proton conductivity is discussed.

【序】　無水の高プロトン伝導性膜として、生体高分子のアルギン酸 (AA) とイミダゾール (Im) 分子から成る複合体がある。AA-Im 複合体 (AA-*x*Im) のうち、AA が有する一つのカルボキシ基と Im のモル比が 1：2 となる複合体 (*x*=2；Fig.1) では、400 K 付近で~10^{-3} S/cmの高いプロトン伝導性を示すことが報告されている[1]。AA-Im 複合体のプロトン伝導には、Im の再配向運動が関与していると思われ、その伝導機構は、水素結合を通してプロトンが隣接する分子に移っていく Grotthuss 機構であると考えられている。しかし、プロトン移動に関する AA-Im 複合体の分子運動の詳細な情報は得られていない。

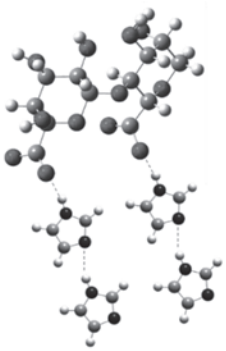


Fig.1. Proposed molecular structure of AA-2Im.

そこで、本研究では固体 ^{2}H NMR を用いて、AA-Im 複合体における Im の運動性を調べ、Im 分子の運動とプロトン伝導との関係を明らかにすることを目的とした。

【実験】　AA-*x*Im において *x*=2 となるように混合した試料 (AA-2Im) について、電気伝導度を測定した。また、Im の炭素部分に結合した水素を重水素化した Imd_3 について上記と同様に *x*=2 で混合した試料 (AA-2Imd_3) について、固体 ^{2}H NMR の測定を行った。^{2}H NMR の測定は分光器 JEOL ECA-300 を用いて、共鳴周波数 45.282 MHz

プロトン伝導体，イミダゾール，固体^{2}H NMR

○ちかいたくま，おおはしりゅうたろう，いだとものり，みずのもとひろ

で行った。スペクトルは四極子エコー (QE) 法で測定した。スピン-格子緩和時間 (T_1) の測定は反転回復法を用いた。

【結果・考察】 Fig.2 に AA-2Im における電気伝導度の温度変化を示す。およそ 320 K 前後で温度変化の傾きが変化した。電気伝導度の温度変化から活性化エネルギーを見積もると、320 K より低温側と高温側で、それぞれ 55 kJ/mol と 17 kJ/mol であった。

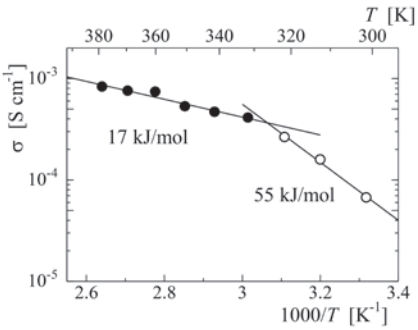


Fig.2. Arrhenius plot of the electric conductivity of AA-2Im.

AA-2Imd_3 の ^{2}H NMR 測定から得られたスペクトルの温度変化に対して、252 K 以上で 0 kHz 付近にシャープな成分が観測された。温度上昇に伴いそのシャープな成分の強度は増大し、276 K でシャープな成分のみとなった。このようなスペクトルの線形変化は Im の等方回転運動によるものと考えられる。276 K 以上では温度上昇に伴ってスペクトルの線幅が減少した。線幅から見積もった T_2^*の温度変化を Fig.3 に示す。およそ 320 K 前後で T_2^*の温度変化の傾きが変化した。これは、電気伝導度の結果とよく一致しており、320 K 前後で Im の運動性が変化したことがわかる。

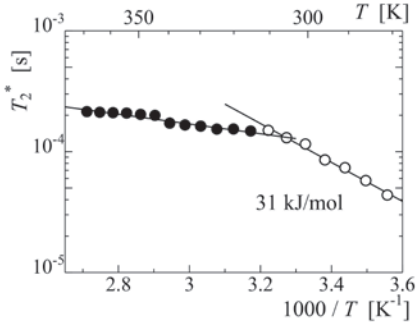


Fig.3. Experimental of ^{2}H NMR T_2 of AA-2Imd_3.

Fig.4 に AA-2Imd_3 における T_1 の温度変化を示す。320 K 付近で T_1 の温度変化の傾きが異なっていることがわかる。320 K より高温側の傾きは、低温側の傾きよりも緩やかになっており、320 K より高温では Im 分子の運動がより起こりやすくなっていることがわかる。T_1 の温度変化のフィッティングより、活性化エネルギーは 320 K より低温側と高温側で、それぞれ 32 kJ/mol と 14 kJ/mol と見積もられた。低温側の値は、T_2^*の温度変化より見積もった活性化エネルギーの値とよく一致しており、T_1 測定では Im の等方回転運動による緩和過程を観測していると考えられる。さらに、高温側の活性化エネルギーが、320 K より高温での電気伝導度の活性化エネルギーの値に非常に近い値を示していることから、Im 分子の等方回転運動が高プロトン伝導に関与していると予想される。低温の T_1 より見積もられた活性化エネルギーが電気伝導度による活性化エネルギーよりも低い値を示しているのは、NMR 測定では Im の局所的な運動を観測しているのに対して、電気伝導度測定では長距離な範囲の運動を観測しているためと考えられる。また、320 K 以上で活性化エネルギーが低い値になっているのは、高温では高分子の柔軟性が増し、Im の運動における障害が減少するためと考えられる。

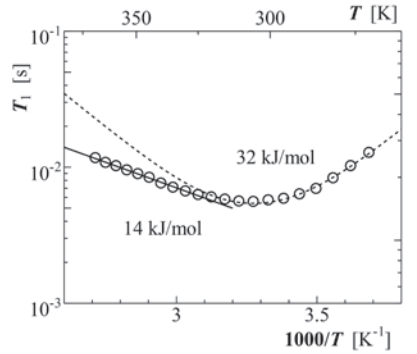


Fig.4. Experimental(○) and fitting of ^{2}H NMR T_1 of AA-2Imd_3.

【参考文献】 [1] M. Yamada, I. Honma, *Polymer* **45**, 8349 (2004).

P75

固体インジウムＮＭＲと量子化学計算による In-doped ZnO の局所構造解析

○大橋 竜太郎[1]、川村 祐史[1]、宮下 智史[1]，井田 朋智[1]，佐藤 渉[1]，
水野 元博[1]，丹所 正孝[2]，清水 禎[2]
[1]金沢大学・院・自然，[2]物質・材料研究機構

Local Structural Analysis of Indium-Doped Zinc Oxide using Solid-State Indium Nuclear Magnetic Resonance and Quantum Chemical Calculation

○Ryutaro Ohashi[1], Yuuji Kawamura[1], Satoshi Miyashita[1], Tomonori Ida[1], Wataru Sato[1], Motohiro Mizuno[1], Masataka Tansho[2], Tadashi Shimizu[2].
[1]Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa University
[2]National Institute for Materials Science

In-doped zinc oxide was investigated by solid-state ^{115}In and ^{113}In NMR spectroscopy with the two magnetic fields of 21.8 and 18.8 T. The line-shapes of the ^{115}In and ^{113}In NMR spectra were analyzed to obtain parameters of quadrupole interaction and chemical shift anisotropy in two chemical sites of indium nuclei in zinc oxide. The obtained parameters of quadrupole interaction were consistent with results of TDPAC methods. Next, density functional theory (DFT) calculation was applied for ^{115}In nuclei doped in zinc oxide crystal to estimate parameters of quadrupole interaction of the ^{115}In nuclei. By comparing parameters of quadrupole interaction by the spectral analysis of solid-state NMR with the ones by DFT calculation, we supposed that most of indium nuclei are substituted for zinc nuclei, while other indium nuclei exist at vacant spaces in zinc oxide.

【序】酸化亜鉛(ZnO)は、透明伝導性をもつ内因性の n 型半導体であり、液晶ディスプレイ等の様々な分野での応用が期待されている。ZnO は不純物の存在で電気伝導性が大きく変わるため、不純物の種類・量・導入条件を検討することで、物性を制御することが可能となる。ZnO 結晶は Fig. 1 に示すようなウルツ鉱型の構造を持つことが知られている [1]。また、固体での ^{67}Zn NMR 測定により、Zn 原子核の持つ四極子相互作用定数（e^2qQ/h）は 2.40 MHz. 非対称パラメータ（η）は 0.0 であることが報告されている [2]。ZnO に不純物をドープした半導体のうち、ZnO 中に In を添加した物質（In-doped ZnO）

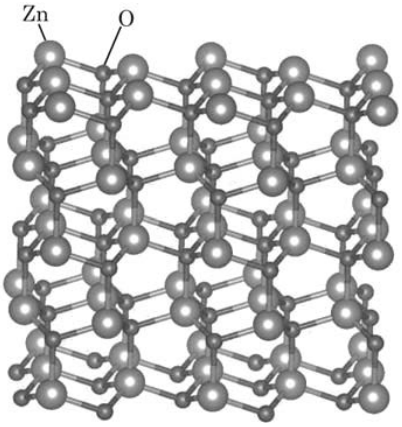


Fig. 1: Crystal structure of zinc oxide

インジウム、酸化亜鉛、四極子相互作用

○おおはし　りゅうたろう、かわむら　ゆうじ、みやした　さとし、いだ　とものり、さとう　わたる、みずの　もとひろ、たんしょ　まさたか、しみず　ただし

について、佐藤らにより、^{111}Cd(←^{111}In)をプローブとする摂動角相関法(PAC 法)を用いた研究が報告されている [3]。この研究では、In の濃度が 0.5 at.%以上の In-doped ZnO では、粉末X線回折による測定では 0 at.% の ZnO と差が見られないにも関わらず、 PAC 法では ZnO 中の In 周辺が ZnO とは異なる特異的な局所構造を持つと考えられる信号が観測された。そこで本研究では、In-doped ZnO の In 原子周辺の局所構造を解析するため、固体NMRによる解析を行った。

【実験】 1 at.% In-doped ZnO (1%-IZO) の粉末試料を 21.8 T (^{1}H 929 MHz, ^{115}In 204 MHz), 18.8T (^{1}H 801 MHz, ^{115}In 175 MHz)の磁場中で JNM-ECA NMR分光器を用いて測定した。^{115}In は半整数スピン(I=9/2)であるため、半整数スピンのための四極子エコー法を用いた [4]。量子化学計算には Quantum ESPRESSO [5] を用いた。

【結果と考察】佐藤らの PAC 法を用いた先行研究により、試料中のインジウムのうち、約 87% が V_{ZZ} = eq = 6.1×10^{21} V/m^2 (e^2qQ/h = 119 MHz), η = 0.1 の電場勾配テンソルを持つことが報告されている [3]。また、残り約 13 % については、電場勾配テンソルを決められなかった。これらの結果に基づき、21.8, 18.8 T の２つの磁場による 1%-IZO のNMRスペクトルの線形解析を行ったところ、e^2qQ/h = 119 MHz, η = 0.1 のサイト（以下、主成分） 87%、e^2qQ/h = 140 MHz, η = 0.05 のサイト（以下、副成分）13 % の２つのサイトで実測と計算スペクトルが良い一致を示した。酸化インジウム (In_2O_3) の四極子相互作用 [6] と比較すると、副成分の四極子相互作用は In_2O_3 の site d に近く、副成分には酸素原子が６配位していることが考えられる。６配位構造の候補としては、Fig. 2 の四角で示したような、酸化亜鉛中の空隙に入った構造が考えられる。また、ADF 2012 による計算から、酸素が４配位している構造は６配位よりも四極子相互作用が小さくなる、という結果が得られているため、主成分のインジウム原子には、酸素原子が４配位していることが考えられる。４配位構造の候補としては、Fig. 2 の丸で示したように ZnO 中の亜鉛原子と置換した構造が考えられる。空隙に入った６配位構造については、 空隙の ^{115}In の代わりに同族元素の ^{69}Ga を置きドープ率を 3 at.% とした構造を用いて Quantum ESPRESSO による電場勾配テンソルの計算を行った。得られた電場勾配テンソルと ^{115}In の四極子モーメントから計算された四極子相互作用は e^2qQ/h = 160 MHz, η = 0.00 となり、副成分の固体NMR測定の線形解析結果（e^2qQ/h = 140 MHz, η = 0.05）と良い一致を示した。

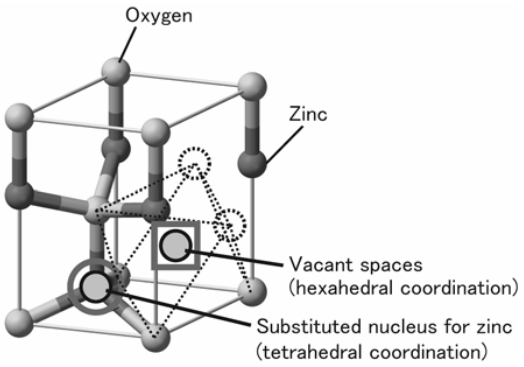


Fig. 2: Indium nucleus tetrahedrally (circle) and hexahedrally (square) coordinated to oxygen nuclei.

【参考文献】

[1] K. Kihara, et al., Canadian Mineralogist, 1985, **23**, 647.

[2] G. Wu, Chem. Phys. Lett., 1998, **298**, 375.

[3] W. Sato, et al., Phys. Rev. B, 2008, **78**, 045319.

[4] P. R. Bodart, et al., Mol. Phys., 2000, **98**, 1545.

[5] P. Giannozzi, et al., J. Phys. Condens. Matter 2009, **21**, 395592;

See also http://www.quantum-espresso.org/, https://sites.google.com/site/dceresoli/pseudopotentials

[6] S. Habenicht, et al., Z. Phys. B, 1996, **101**, 187.

P76

グリーンレーザーを用いたアロディニア特異的な痛み応答に関するfMRI研究

○杠　直哉[1], 吉永　壮佐[1], 平金　真[1], 木村　一成[1], 岩本　成人[1], 佐藤　博司[1], 寺沢　宏明[1]
[1]熊本大学大学院 生命科学研究部 構造生命イメージング分野
[2]ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部

An fMRI study of allodynic pain evoked by green laser stimuli

○Naoya Yuzuriha[1], Sosuke Yoshinaga[1], Makoto Hirakane[1], Kazunari Kimura[1], Shigeto Iwamoto[1], Hiroshi Sato[2], Hiroaki Terasawa[1]
[1]*Department of Structural BioImaging, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University*
[2]*Division of Pre-Clinical Imaging Application, Bruker Biospin K.K.*

Fibromyalgia and neuropathic disorders characterized by chronic pain induce the pathological condition “allodynia”, in which a stimulus that is normally not painful causes pain sensations. The aim of this study is to detect the brain activities responding to allodynic pain evoked by green laser stimuli, using blood oxygenation level dependent (BOLD) and cerebral blood volume (CBV) techniques. T2*-weighted MRI images for reserpine-induced myalgia (RIM) rats, which show symptoms of allodynia, and normal rats were acquired with a 4-shot GRE-EPI sequence. In the middle of the scanning, the left hind paw was irradiated with the green laser. In both the BOLD and CBV experiments, MRI signal changes were observed in the RIM rat brains upon laser irradiation, but not in the normal rat brains. Therefore, we succeeded in detecting the allodynia-specific responses evoked by the laser stimulation.

【背景・目的】線維筋痛症や神経因性疼痛などの慢性疼痛をともなう疾患において、通常では痛みを感じないような刺激を強い痛みとして感じられる症状（アロディニア）が生じ、患者の生活の質を著しく低下させている。小動物の前臨床試験に用いる実験系を開発することは、疼痛の発症メカニズムの解明、および、鎮痛薬の開発に重要な役割を果たすことが期待される。

脳機能を MRI で測定する方法として、脳内活性化領域における、反磁性体の酸素結合型ヘモグロビン量の変化を利用した Blood oxygenation level dependent (BOLD) 法や、陰性造影剤の微小超常磁性体酸化鉄（USPIO）を予め投与し、脳内活性化領域における血管拡張の変化を利用した cerebral blood volume (CBV) 法が挙げられる[1]。異なる原理に基づく測定法を組み合わせることで、より詳細かつ正確な脳機能解析が可能となる。

痛みの研究において、電気刺激、ホルマリンやカプサイシンによる化学刺激、物理的に圧迫する機械刺激などが用いられているが、痛み刺激の大きさを微調整し、かつ、

BOLD、CBV、アロディニア

○ゆずりはなおや、よしながそうすけ、ひらかねまこと、きむらかずなり、いわもとしげと、さとうひろし、てらさわひろあき

非接触で局所的に刺激を与えることは難しい。一方、レーザー照射を用いた刺激は、非接触かつ局所的に刺激することが可能であるが、従来用いられている CO_2 レーザー等は、水分子を励起するため火傷等の外傷が現れやすい。532 nm の波長をもつグリーンレーザーは、水分子を励起しないため火傷のリスクが低い。また、侵害受容器が分布する真皮まで到達することや、侵害受容器の 1 つである Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) を刺激することがそれぞれ報告されているため、アロディニアの痛み刺激として理想的であると考える [2, 3] 。

本研究は、線維筋痛症モデルである reserpine-induced myalgia (RIM)モデルラット[4]に対し、グリーンレーザーの照射による痛み刺激を与え、アロディニア特異的な痛み応答の機序を CBV 法と BOLD 法を用いて明らかにすることを目的とする。

【方法】レーザー刺激に対する反応を確認するため、RIM ラットと健常ラットの行動実験を行った。 200 mW から 600 mW まで出力を 50 mW ずつ上げたレーザーを 2 秒間ラットの左後ろ足に照射し、逃避行動の有無を観察した。

次に 7 テスラ小動物用 MRI 装置(Bruker Biospin)を用い、RIM ラットと健常ラットの fMRI 実験を行った。実験中に筋弛緩剤ガラミンの持続投与と人工呼吸を行い、体温、血圧、pO_2、pCO_2 を測定した。BOLD 法の実験では、GRE-EPI 法による T_2^*強調画像の連続撮像を行い、ラット左後ろ足へのレーザー照射に応答した信号変化を観測した。CBV 法の実験では、USPIO 投与後に GRE-EPI 法による T_2^*強調画像の連続撮像を行い、レーザー照射に応答した信号変化を観測した。信号強度解析には SPM8 を用いた。

【結果・考察】行動実験の結果、RIM モデルラットでは 400 mW 以上のレーザー出力において逃避行動が見られ、健常ラットでは 450 mW 以上のレーザー出力において逃避行動が見られた。アロディニア発症に伴った痛み閾値の低下により、反応が見られたレーザー出力に差が生じたと考えられる。RIM ラットにおいて逃避行動が現れた 400 mW の一段階弱い出力である 350 mW の出力を用いて fMRI 実験を行った。

BOLD 法を用いた結果、RIM ラットにおいて、一次体性感覚野等の信号強度の増大が見られたが、健常ラットにおいては見られなかった。CBV 法を用いた結果、RIM ラットにおいて、一次体性感覚野等の信号強度の減弱が見られたが、健常ラットでは変化が見られなかった。レーザー照射に応じた MRI 信号変化が RIM ラットにのみ見られたことと、原理の異なる BOLD 法と CBV 法を用いた結果に共通性が見られたことから、アロディニア特異的な痛み応答であることが強く示唆された。

本研究により、グリーンレーザーの照射による痛み刺激を与えることで、アロディニア特異的な痛み応答を CBV 法と BOLD 法を用いて評価できた。本実験系は、外傷が生じないレーザー刺激を用いるため、鎮痛薬評価系として前臨床試験、さらには臨床試験として応用することができ、新薬創出に貢献することが期待される。

【参考文献】

[1] Kim, S.G. *et al*., Open Neuroimag. J., **5**, 136-145 (2011)
[2] Avci, P. *et al*., Semin. Cuten. Med. Surg., **32**, 41-52 (2013)
[3] Gu, Q. *et al*., Evid. Based Complement. Alternat. Med., doi:10. 1155/2012/857123 (2012)
[4] Nagakura, Y. *et al*., PAIN, **146**, 26-33 (2009)

P77 固体配向PBLGの構造解析とNMR法による気体拡散性評価

○岩本純, 吉水広明
名工大院工

Structural analysis and gas diffusion properties of the solid oriented PBLG

○Jun Iwamoto, and Hiroaki Yoshimizu
Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan.

The magnetically oriented PBLG was prepared by solution cast method from a 35 wt% of PBLG chloroform solution in a superconducting magnet of 9.4 T. A cylindrical PBLG solid sample was obtained by using teflon tube. The uniaxially oriented PBLG helix rods along to direction of applying magnetic field was confirmed by WAXD measurement. Self-diffusion coefficients of CH_4 and C_3H_8 in this uniaxially oriented PBLG solid sample were measured by pulsed field gradient ^1H NMR spectroscopy. The coefficients of the magnetically oriented PBLG were larger than those of the random oriented sample. In addition, the selectivity of CH_4 / C_3H_8 was also enhanced by magnetically orientation.

【緒言】

液晶性ポリマーであるポリγ-ベンジル-L-グルタメート，PBLGは良溶媒中で安定にαヘリックスを形成し，濃厚溶液時には流動性を持った状態でも自発的に配向する．そのため，一方向に配向した状態を保持した固体膜に調製できる可能性を有しており，この配向膜には気体輸送特性に大きな異方性が生じると予想されるため，気体分離膜としての応用が期待される．通常，PBLGはコレステリック型の液晶性を示すため，溶液キャスト法で得られた高分子膜はFigure 1(a)に模式的に示すようにαヘリックス鎖の束で形成された無数の一軸配向ドメインがランダムに凝集した固体高次構造となり，気体分子の拡散経路が長く，気体輸送特性の低下が懸念される．しかし，PBLGの液晶溶液は磁場を印加すると，ヘリックス軸方向に示す巨大な永久双極子モーメントが磁場方向に一軸配向し，ネマチック相へ転移する．この状態で配向構造を固定できれば全てのドメインが一方向に配向した固体膜となり，気体拡散経路を最短にすることができる．本研究では外部磁場を利用することで，Figure 1(b)のような高度に秩序構造を制御させた固体配向試料を調製し，収着気体の拡散特性を観察・評価し，PBLGの気体輸送特性を明らかにすることを目的とした．

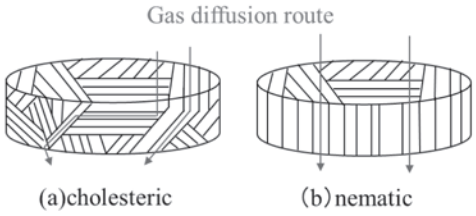


Figure 1 Schematic representations of the solution-cast PBLG films form (a) cholesteric and (b) nematic states.

PBLG, Magnetic orientation, Gas diffusion properties

○いわもとじゅん，よしみずひろあき

【結果と考察】

濃度35 wt%のPBLG/クロロホルム溶液をNMRによる強磁場中でキャストして固体配向試料を調製した．また磁場を印加せずに調製した固体ランダム配向試料も用意した．得られた配向試料とランダム配向試料の二次元X線画像をFigure 2に示す．ランダム配向試料ではヘリックス鎖間隙に対応した回折リングが現れるのに対し，配向試料では明らかに方位角依存の回折データとなった．解析の結果，磁場を印加した状態で調製した固体PBLGは高度に一軸円筒配向していることがわかった．

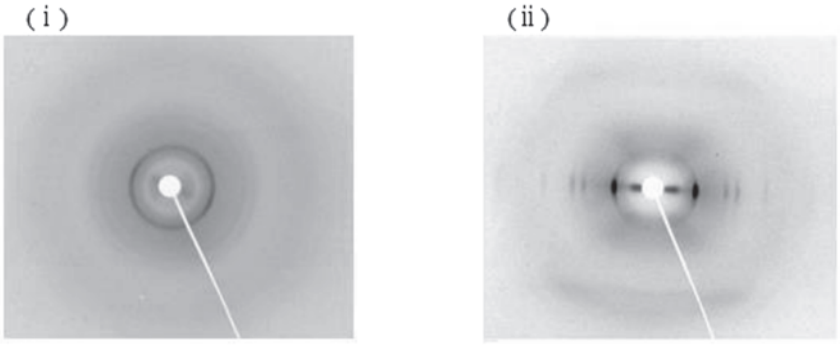


Figure 2　X-ray diffraction photograph of (ⅰ) non-oriented PBLG and (ⅱ) magnetic oriented PBLG samples measured at edge view.

配向・ランダム配向 PBLG に 20 ℃，7 atm の条件下で CH_4，C_3H_8 をそれぞれ収着させた後，PFG-STE ^{1}H NMR 測定を行い，収着した気体分子の自己拡散係数から気体拡散性について評価した．得られた結果を Table 1 に示す．配向試料に収着した気体分子はランダム配向試料に収着した場合よりも高い自己拡散係数が得られた．また，ランダム配向試料では気体分子の相違による自己拡散係数の大きな変化はないが，配向試料では大きく異なる．これは PBLG 固体に形成された空孔に分子サイズの大きな C_3H_8 よりも分子サイズの小さな CH_4 を選択的に拡散させられる能力があり，この効果が配向によって顕著になったことを示唆している．PBLG を配向させることで気体分子の拡散性の向上，そして，分子サイズに基づく選択的な分離能が確認された．

Table 1　Self-diffusion coefficient of CH_4 and C_3H_8 in PBLG samples at 7 atm and 20 ℃

sample	Self-diffusion coefficient ($D \times 10^8$ cm^2/s)	
	D_{CH_4}	$D_{C_3H_8}$
oriented	3.7	2.2
random	1.8	1.7

P78

7CB/*n*-heptane二成分液晶における*n*-heptaneの配向性とダイナミクス

○熊谷翼秀，大橋竜太郎，井田朋智，水野元博
金沢大院・自然科学研究科

Orientation and dynamics of *n*-heptane in 7CB/*n*-heptane system

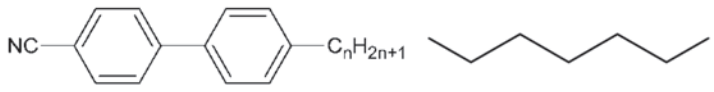
○Yoshihide Kumagai, Ryutaro Ohashi, Tomonori Ida, Motohiro Mizuno
Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Ishikawa, Japan.

4-Cyano-4'-heptylbiphenyl (abbreviated as 7CB) exhibits only the nematic phase as liquid crystal phase. By adding *n*-heptane as solvent, the smetic A phase was induced in 7CB/*n*-heptane system. The order parameter S_{CD} was estimated from the quadrupole splitting of the ^{2}H NMR spectrum. In the smectic A phase, *n*-heptane's orientation is low compared with *n*-heptane's orientation in the nematic phase. This result shows that *n*-heptane centers around the side chain of 7CB in the smectic A phase, although *n*-heptane distributes randomly in the nematic phase,

【序】　液晶状態を示す化合物には、比較的固いコア部分とフレキシブルな側鎖から構成されているものが数多くある。そのような構造を持つ分子の一つとして、4-alkyl-4'-cyanobiphenyl（nCB、n はアルキル鎖中の炭素数）がある(Fig. 1)。n が 7 以下ではネマチック(N)相のみが液晶相として現れるのに対し、10 以上ではスメクチック A(Sm A)相のみが現れ、8 と 9 では低温側で Sm A 相が、高温側で N 相が現れる。Sm A 相の発現には、側鎖のフレキシビリティが大きく寄与することが知られている。これは、比較的固いコア部分とフレキシブルな側鎖の分離のために分子が層状構造をとるためである。その一方で、N 相のみを発現する 7CB に *n*-heptane を混合すると Sm A 相が発現することから、側鎖を近似的に溶媒として考えることができる（擬二成分描像）[1,2]。また逆に、*n*-ヘプタンを加えることは 7CB のアルキル鎖を見かけ上長くすることに対応する。アルキル鎖の見かけの長さ n^*は、次の式であらわされる。

$$n^* = 7 + \frac{7x}{1-x} \qquad (1)$$

ここでxは、*n*-ヘプタンのモル分率である。7CB/*n*-heptane二成分系の液晶性を更に詳細に理解するためには、分子の配向性など、微視的な視点からの考察が必要である。本研究では、7CBと重水素化した*n*-ヘプタンを混合した試料の^{2}H NMR測定を行ない、*n*-ヘプタンの配向性と液晶性との関連を調べた。



nCB　　*n*-heptane

Fig. 1　Molecular structures of nCB and *n*-haptane.

Liquid crystal, Phase transition, ^{2}H NMR

○くまがいよしひで，おおはしりゅうたろう，いだとものり，みずのもとひろ

【実験】　測定試料は、n^* = 7.2, 7.7, 8.4, 9.0,10 となるように *n*-heptane-*d*16 と 7CB を混ぜ合わせて調製した。^{2}H NMR 測定は、JEOL ECA-300 分光器を使い、45.28 MHz の共鳴周波数で行なった。スペクトルの測定には四極子エコー法、スピン-格子緩和時間 T_1 の測定には反転回復法を用いた。温度変化測定は降温過程で行なった。

【結果と考察】　^{2}H NMR の分裂幅$\Delta\nu$から、*n*-heptane のオーダーパラメターS_{CD}を求めた。核四極子相互作用の非対称定数ηが 0 のとき、S_{CD}は次の式であらわされる。

$$S_{CD} = \frac{2}{3}\frac{\Delta\nu}{(e^2Qq/h)} \qquad (2)$$

ここで、e^2Qq/h は核四極子結合定数である。低温での測定から、メチレン基では e^2Qq/h = 167 KHz、η = 0、メチル基では e^2Qq/h = 53 kHz、η = 0 と求められた。

n^* = 7.2 では N 相のみが液晶相として現れ、n^* = 7.7 では低温側で Sm A 相が、高温側で N 相が現れる[1]。メチル基について、n^* = 7.2 と 7.7 の S_{CD} を、換算温度$\tau = (T - T_{IL})/T_{IL}$ に対してプロットしたものが Fig. 2 である。ここで、T_{IL} は等方性液体から N 相への相転移温度で、ここでは分裂したピークが観測された温度を使った。T_{IL} は、n^* = 7.2 と 7.7 でそれぞれ 310 K と 302 K である。S_{CD}は次の式であらわされる。

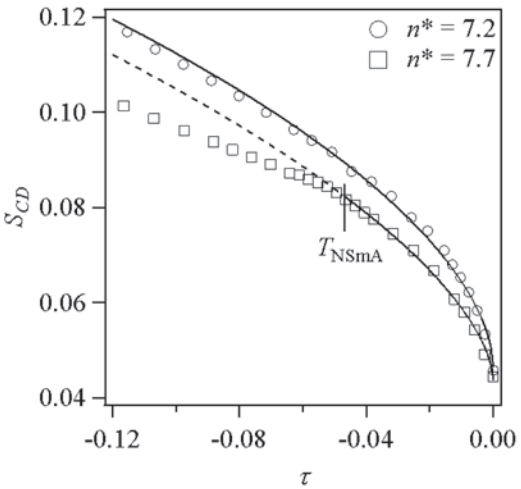


Fig. 2　Temperature dependence of S_{CD} of methyl group.

$$S_{CD} = c\left(S_0 + (1 - S_0)|\tau|^{\beta}\right) \qquad (3)$$

ここで、*c* は分子内運動による寄与で、括弧内の式は N 相での配向性による寄与である。cS_0 は T_{IL} でのオーダーパラメーターで、βは臨界指数である。n^* = 7.2 の試料は、液晶相の全温度範囲を式(3)でうまくフィッティングすることができた。フィッティングパラメーターは、c = 0.29、S_0 = 0.16、β = 0.56 である。n^* = 7.7 の試料は、T_{NSmA} = 288 K で N 相から Sm A 相へ相転移する[1]。T_{NSmA} よりも高温での S_{CD} の温度変化は式(3)でうまくフィッティングすることができた。フィッティングパラメーターは、c = 0.29、S_0 = 0.15、β = 0.61 である。このフィッティング曲線を Sm A 相へ外挿すると、実験値はフィッティング曲線よりも小さかった。この結果は、N 相で液晶中にランダムに存在していた *n*-heptane が、Sm A 相では配向性が低いフレキシブルな側鎖部分に集まり、N 相に比べて配向性が小さくなることを示している。

ポスターでは、n^* = 8.4, 9.0,10 における *n*-heptane の結果についても発表する。

References

[1] Y. Yamaoka, Y. Taniguchi, S. Yasuzuka, Y. Yamamura, and K. Saito, J. Chem. Phys. **135**, 044705 (2011).

[2] K. Saito and M. Sorai, Chem. Phys. Lett. **366**, 56(2002).

P79

気体の収着による液晶性ポリエステルの局所分子運動性変化のNMR法による観察

○山内雅弘[1], 吉水広明[1]
[1]名工大・吉水研

NMR observations of the local molecular mobility change of liquid crystalline polyester by gas sorption

○Masahiro Yamauchi[1], and Hiroaki Yoshimizu[1]
[1]Graduate School of Engineering, Nagoya Institute Technology, Nagoya, Japan.

The liquid crystalline polyester, B-C14 is one of the thermotropic liquid crystal polymers. It is formed the layered structure and filled layer space with the alkyl side chain. In this study, the effects of gas in B-C14 on local molecular motions of it were investigated by NMR. The motions of side-chain layer of B-C14 were remarkably changed by gas sorption.

【緒言】

液晶性高分子は流動性を持った状態でも自発的に配向し, 温度を下げてもその配向性が保たれることから, 構造に高い規則性を持った分離膜が得られると期待される. B-C14 (Fig.1) は,側鎖に柔軟なアルキル鎖を有する全芳香族液晶性ポリエステルである. この物質はサーモトロピック液晶性を呈し, アルキル側鎖層と芳香族主鎖層がそれぞれ板状に凝集し交互に配列した層状構造を形成する. 主鎖層は硬く, 側鎖層は軟らかいので, 気体分子は側鎖層にのみ収着すると考えられている. 本研究では収着気体が B-C14 の局所分子運動性に及ぼす影響について主に NMR 法を用いて検討した.

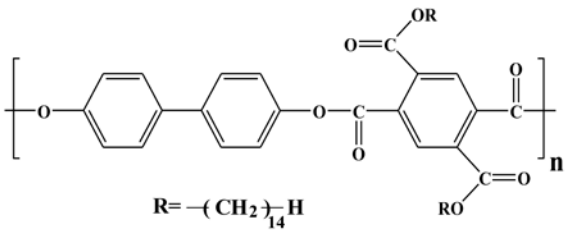


Fig.1 Chemical structure of B-C14.

liquid crystalline polyester, layered structure, gas sorption properties

○やまうちまさひろ, よしみずひろあき

【実験】

示差走査熱量測定を行い結晶–液晶相転移ピークを確認した．試料はキャスト法で製膜した B-C14 を液晶が存在し層状構造を形成する 145℃でアニーリングしたものを使用した．その試料の X 線回折測定を行い層状構造の形成を確認した．そして 25℃における気体収着測定を重量法により CH_4 , C_3H_8 , i-C_4H_{10} , CO_2 についてそれぞれ行った. 収着した際の分子運動性変化を評価するため ^1H,^{13}C NMR 測定, ^1H スピン–スピン緩和時間 (T_2)測定を行った.

【結果・考察】

X 線回折測定を行ったところ非晶成分はほとんどないが，層状構造がランダムに配向して形成されていることを確認した. CH_4, CO_2 の収着等温線は原点を通る直線でヘンリー型であり，膜のゴム状領域に気体が収着していると考えられる. C_3H_8 , i-C_4H_{10} の収着等温線は圧力を上げると，ある一定の圧力を超えたら収着量が急激に増大する溶解型を示し，C_3H_8 , i-C_4H_{10} と親和性が高いアルキル側鎖層に集中的に気体が収着しているといえる.

CH_4 ,C_3H_8, i-C_4H_{10}, CO_2 を圧力範囲 0 ~ 9 atm で収着させ，^1H の T_2 測定，及び ^1H, ^{13}C NMR 測定を行った. Fig. 2 に一例として C_3H_8 を 7 atm 下で収着させた場合の ^1H NMR スペクトルを示す．B-C14 の側鎖領域由来の巾広なピークと気体 C_3H_8 のシャープなピークが観測されている．NMR スペクトルにおけるピークの線幅は T_2 の逆数と対応しており，シャープになるほど分子運動性は向上しているといえる．B-C14 由来のピークについてその線幅(FMHW)の圧力依存性を Fig. 3 にまとめた．圧力上昇，即ち収着量の増大に伴い，先鋭化する結果である．以上から，気体の収着量増大に伴い分子運動性が向上し，それは主に側鎖領域において顕著であるということが確認された.

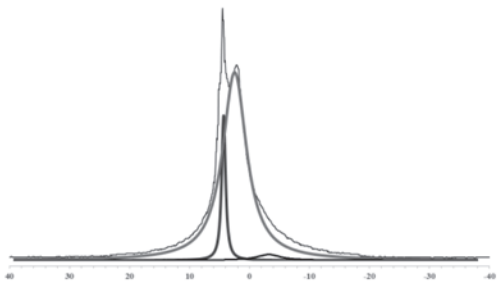


Fig. 2 ^1H NMR spectrum of B-C14 at 7 atm of C_3H_8 and 25 ℃.

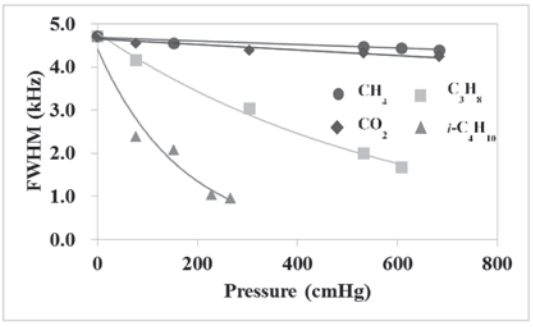


Fig. 3 ^1H NMR peak width of B-C14 at 25 ℃.

P80

Fast Field Cycling NMR Relaxometry: Moving from Research towards Industrial Applications

Salvatore Bubici[1], Rebecca Steele[1], Gianni Ferrante[1], Tomoyuki Haishi[2]
[1] *Stelar S.r.l., Mede (PV), Italy.*
[2] *MRTechnology Inc., Tsukuba, Ibaraki, Japan.*

Fast Field Cycling (FFC) NMR relaxometry is the only low-field NMR technique which measures the longitudinal spin relaxation time, T_1, as a function of the magnetic field strength, over a wide range of frequencies (from 10 kHz to 42 MHz), by using a single instrument with a magnet capable of fast electrical switching of the field.[1,2] The dependency of the relaxation time T_1 on the magnetic field strength can be used to gain important molecular dynamics information on a variety materials and complex mixtures, ranging from polymers, electrolytes, rocks and other porous materials to paramagnetic nanoparticles (MRI contrast agents), pharmaceutical formulations, proteins and foodstuffs. The data is displayed in the form of a nuclear magnetic resonance dispersion (NMRD) profile, $R_1(\omega) = 1/T(\omega)$ versus the Larmor frequency ω ($\omega = \gamma B_0$, γ is the gyromagnetic ratio). This approach, scanning over a large range of applied magnetic fields, directly probes the dynamical surface affinity of water in complex materials and yields unique information on the water dynamically correlated with solid surfaces. In the case of aqueous solutions, the relaxation characteristics of the single water absorption provide a wealth of information about the solute molecules that is highly relevant in the characterization of a given specimen.

Furthermore, the benefit of exploring the range of low Larmor frequencies is to detect typical relaxation features associated with molecular processes characterized by very long correlation times, such as molecular surface dynamics and collective effects. The FFCR technique shows greatest potential where the characteristics of a sample depend intimately on the molecular dynamics and / or the state of aggregation.

Herein, we will describe how FFC NMR relaxometry can be applied to the analysis of various complex materials and mixtures, with a particular focus on foodstuffs (see representative examples shown in Figures 1 to 3: Figure 1 shows ^{1}H NMRD profiles of counterfeit and true 12-year old balsamic vinegars; Figure 2, shows the effects of spoilage on a refrigerated milk-based drink product; Figure 3, shows the effects of oxidation and ageing on fruit – blueberries). [3] Indeed these findings show the potential of this technique for industrial use as a quality control tool and for off-line process monitoring as well as for anti-fraud controls. FFC NMR relaxometry is a technique which has remained as a research tool and practically unexploited in industry, and thus an important challenge is the transfer of this important technique towards more industrial applications.

Field Cycling, NMRD, Relaxometry

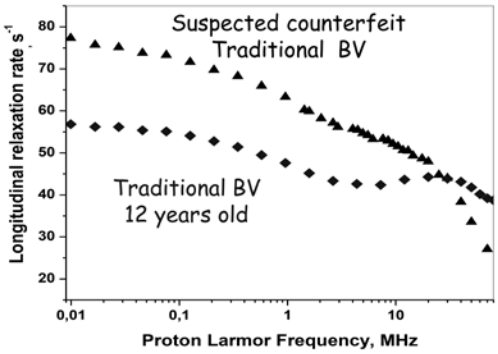


Figure 1. ^{1}H NMRD profiles of 12-year old and counterfeit balsamic vinegars.

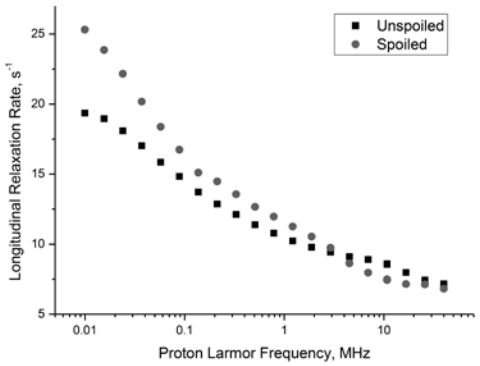


Figure 2. ^{1}H NMRD profiles of a refrigerated milk-based drink product before and after spoilage.

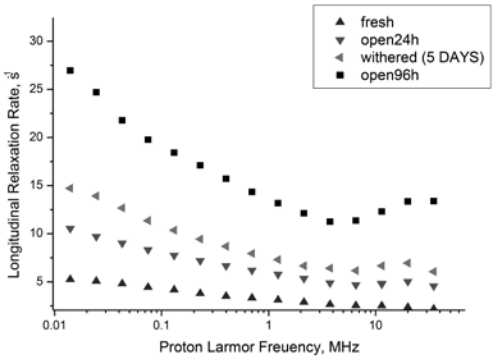


Figure 3. ^{1}H NMRD profiles of blueberries from the fresh to withered states.

[1] Ferrante and Sykora Adv. *Inorg. Chem*. Vol. 57, p. 405.
[2] R. Kimmich and E. Anoardo *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy,* 44 (2004) 257-320.
[3] S. Baroni, S. Bubici, G. Ferrante and S. Aime. *Magnetic Resonance in Food Science. Challenges in a Changing World*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2009.

P81

安定同位体標識および多次元NMRメタボロミクスによる植物代謝産物の同定

○小松功典[1,2]，大石梨紗[1]，篠阿弥宇[2]，菊地淳[1,2,3]
[1]横市大院・生命医，[2]理研CSRS，[3]名大院・生命農

Identification of Plant-specific Metabolites by Multi-dimensional NMR Metabolomics with a Stable Isotope Labeling Technique

○Takanori Komatsu[1,2], Risa Ohishi[1], Amiu Shino[2], Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]Grad. Sch. Medbio. Sci., Yokohama City Univ., Yokohama, Japan. [2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Japan. [4]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., Nagoya, Japan.

The multi-dimensional NMR metabolomics approach was applied for ^{13}C and ^{15}N labeled tree, *Rhododendron japonicum*. At first, a stable isotope labeling technique using ^{13}C-labled CO_2 and ^{15}N-labled nitrate was applied for seedlings of *R. japonicum*. As a result highly-labeled tissues of *R. japonicum* (^{13}C = 59.5%, ^{15}N > 99%) were obtained. ^{13}C-turnover was evaluated on the zero-quantum filtered TOCSY spectra of the metabolites mixture. Then multi-dimensional NMR experiments including (H)CCH-TOCSY were employed toward of D_2O and MeOD extract from *R. japonicum*. In the spectra of MeOD extract, Plant-specific metabolites including flavonol, flavan, terpene, iridoid were detected and identified.

【緒言】　NMR法は，質量分析法と並んでメタボローム解析における主要な分析プラットフォームのひとつである。メタボローム研究において，シグナルの帰属は，未だに困難を伴う問題である。シグナル帰属における最も強力な手段は，標準物質の計測スペクトルを充実させることである。このアプローチとして，我々の研究チームで開発しているSpinAssign (http://prime.psc.riken.jp/), The Metabolomics Innovation Centreが公開しているHMDB (http://www.hmdb.ca/)，ウィスコンシン大学が公開しているBMRB (http://www.bmrb.wisc.edu/) などの公開データベースや有償データベースが存在している。しかしながら，すべての代謝産物（特に天然物など）を網羅することは困難であり帰属できないシグナルが多数存在するのが現状である。特に，植物は，多様な二次代謝系を有するため，その傾向は顕著である。

NMR法は，低分子の構造決定において強力な手段であることは周知の事実である。天然物化学では，植物などから未知化合物を単離し，NMR法などの分光法を使って構造決定をおこなう。本研究のコンセプトは，この構造決定のアプローチをメタボローム解析に導入することで，標準化合物データベースに依存しないシグナルの帰属を可能にすることである。代謝産物混合物のスペクトルでは，シグナルのオーバーラップが顕著であり，^{1}H-^{1}H COSYおよびTOCSY，またHMBCスペクトルの解析は困難である。そこで，化学シフトの分布が大きい^{13}Cに注目した。我々は樹木への^{13}Cによる安定同位体標識を試み，代謝産物の同定にINADEQUATE, ^{13}C-^{13}C-TOCSY, HCCH-TOCSYなどの炭素骨格に沿ったシグナル帰属を適用した。

Metabolomics, Stable-isotope labeling, Secondary metabolite

○こまつたかのり，おおいしりさ，しのあみう，きくちじゅん

【実験】ツツジ(*Rhododendron japonicum*)の種子を播種し，チャンバーに移した。チャンバーに450ppm-$^{13}CO_2$の人工空気を供給し，安定同位体標識化した。植物を地上部および根に分離し，同位体標識率を同位体比計 (IR-MS) によって計測した。植物試料を，凍結乾燥および微粉化し，D_2OおよびMeOD（KPiおよびHEPES緩衝液）によって代謝産物を抽出した。

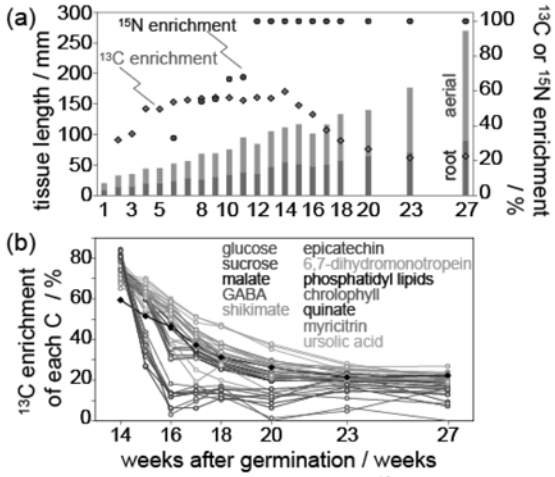


Figure 1 Isotopic analyses of the ^{13}C-labled plant. (a) Total ^{13}C-enrichments measured by IR-MS and (b) each ^{13}C-enrichments estimated by ZQF-TOCSY.

【結果および考察】<u>$^{13}CO_2$による安定同位体標識およびターンオーバー解析</u> 作製した植物試料の安定同位体標識率を**Figure 1(a)** に示す。播種から14週までは，$^{13}CO_2$の人工空気雰囲気で育成し，以降は大気に戻した。^{13}C標識率は，最大値の59.5%になり，以降，経時的に減少した。14週以降の試料では，Zero-quantum-filtered-(ZQF-) TOCSYスペクトルから，各代謝産物の各炭素のC標識率を推定し，ターンオーバー過程を観察した（**Figure 1(b)**）。同位体比計から得られた全^{13}C標識率の変動と同様にいずれの代謝産物も経時的に^{13}C標識率は減少した。また，二次代謝産物のターンオーバー速度は，中心代謝近傍に位置する代謝産物と比較し遅い傾向が確認できた。

<u>多次元NMRメタボロミクスによる二次代謝産物の同定</u> (H)CCH-TOCSYによる二次代謝産物の同定を**Figure 2**に示す。1結合の^{13}C-^{13}Cおよび^{1}H-^{13}C相関からursolic acid, myricitrin, epicatechin, β-sitosterol, 6,7-dihydromonotropeinが同定された。二次代謝産物には4級炭素を多く有するものも存在するため^{1}H-^{1}H COSYやTOCSYでは，十分な相関が得られないが^{13}C-^{13}C相関を検出することで4級炭素を含めた相関が取得できる。また，INADEQUATEや^{13}C-^{13}C-TOCSYは，積算効率が悪く，また，感度が限られるが，HCCH-TOCSYは，積算効率および感度において優れる。また，(H)CCH型では，4級炭素を含めた相関が解析可能であり，代謝産物の同定において強力である。問題点としては，3次元に展開するため計測時間が多くかかる点であるが，non-uniform samplingなどによって解決されることが期待される。

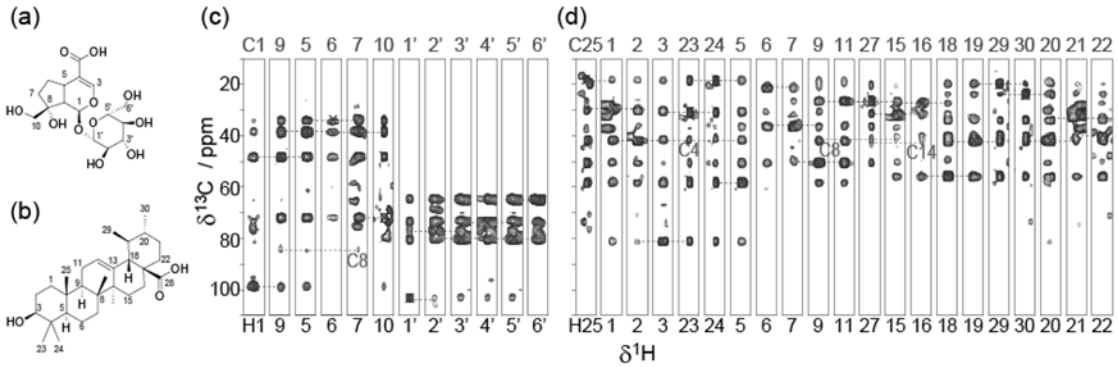


Figure 2 Signal assignments of secondary metabolites on (H)CCH-TOCSY spectra. (a) Chemical structures of 6,7-dihydromonotropein (iridoid) and (b) ursolic acid (triterpene). (H)CCH-TOCSY spectra of metabolites mixture. Stripe plots of (H)CCH-TOCSY; (c) 6,7-dihydromonotropein and (d) ursolic acid.

P82

データ駆動型アプローチによる日本近海の多様な水産資源評価

○福地 実[1]，朝倉 大河[1, 2]，伊達 康博[1, 2]，菊地 淳[1, 2, 3, 4]
[1]横市院・生命医、[2]理研・環境資源、[3]理研・バイオマス、[4]名大院・生命農

Evaluation of diverse marine resources in Japanese coastal waters by data driven approach

○Minoru Fukuchi[1], Taiga Asakura[1, 2], Yasuhiro Date[1, 2], Jun Kikuchi[1, 2, 3, 4]
[1] Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City. Univ. Jpn, [2]RIKEN CSRS, Jpn,[3]RIKEN BMEP, Jpn,[4]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., Jpn.

Japan has abundant marine products and resources. In delivery process of marine resources (especially fish) from production area to consumers, we paid our attention to the metabolic changes depended on preservation condition. We performed NMR-based metabolomic approach with diffusion-edited method for muscles of fishes to evaluate the metabolic changes. The muscles were collected from fishes that captured from Japanese shore and these samples were freeze-dried and extracted by KPi buffer. As a result, it was observed the difference of a metabolic profile and the variability by the fish species which changed every time. These results reflected to the state of preservation, and had been to clarify the differences in more detail by various measurement techniques such as diffusion-edited NMR.

【背景・目的】 日本の排他的経済水域は世界第6位を有し、南北からの豊かな潮流と急峻な河川から流入する栄養で生物多様性のホットスポットとなっている。この多様性豊かな水圏資源に対し､我々はNMR法を基軸とした環境資源評価法の構築を始動している[1-3]。本研究では水圏資源の中でも豊かな呈味を有する魚類多様性に着目し、根魚や回遊魚、白身や赤身といった筋肉物性の異なる試料を評価した。これまでの研究では、魚類筋肉中に含まれる水溶性代謝物は、データマイニングの際に存在量の低い多様な代謝物シグナルが埋もれてしまい、十分な評価が出来ているとは言い難かった。そこで本研究では、緩和編集法によりNMR計測法を工夫するとともに、データ駆動型アプローチを採用することにより、魚種の棲息形態で異なる筋肉物性と代謝プロファイルの関係性評価を試みた。

【方法】 本研究では魚類筋肉の代謝物多様性を評価するために、スズキ目キス科シロギス（*Sillago japonica*）・カサゴ目フサカサゴ科カサゴ（*Sebastiscus marmoratus*）などの多種多様な魚類8種を対象とした。これらの冷凍魚体を解剖したのち凍結乾燥し、シェイクミキサーによって破砕し、得られた粉末30 mgを1000 µl のKPi/D_2O溶媒を用いて抽出し、700MHzのNMR装置を用いて1D-^{1}H (CPMG, Watergate, Diffusion edited)、2D J-RES、HSQCによる計測を行った。1D NMRによって得られたスペクトルデータをbin化処理により数値化したのち、フリーソフトウェアRによる主成分分析

前処理、緩和編集法、データマイニング

○ふくちみのる、あさくらたいが、だてやすひろ、きくちじゅん

(PCA)や判別分析(OPLS-DA)などの多変量解析により特性評価を行い、特徴的なシグナルはHSQCによる物質確認も遂行した。

【結果・考察】 得られたスペクトルから、水産物の代謝物多様性をPCAにより評価した(Figure 1 a, b)。Diffusion-editedスペクトルを同様に多変量解析することで、緩和時間の短いシグナルの量比が反映された。根魚や回遊魚といった魚類の泳法の違いにより筋肉物性が異なるが、抽出される蛋白質に比較的強く影響される傾向を示すことがわかった。一方でJ-RESスペクトルを用いた場合はブロードな蛋白質シグナルが除去され分解能が向上することから、赤身魚類に豊富な旨味物質等の低分子代謝物の特徴を捉えることができた。以上のことから、筋肉代謝物プロファイルは魚類生活形態を反映した種多様性を捉えることができ、特にJ-RES、Diffusion-editedによる緩和編集法とデータマイニングを活用することでこれらの違いに関わる物質を明確にすることが可能であった。今回の結果では、各水産物の生息地や大きさによる個体差がより大きく表れたため、今後はさらにデータ駆動型アプローチによりこれらの代謝プロファイルへの影響をより詳細に評価していくとともに、多様な水産物を標的として解析を試みた最新の知見についても本会で議論したい。

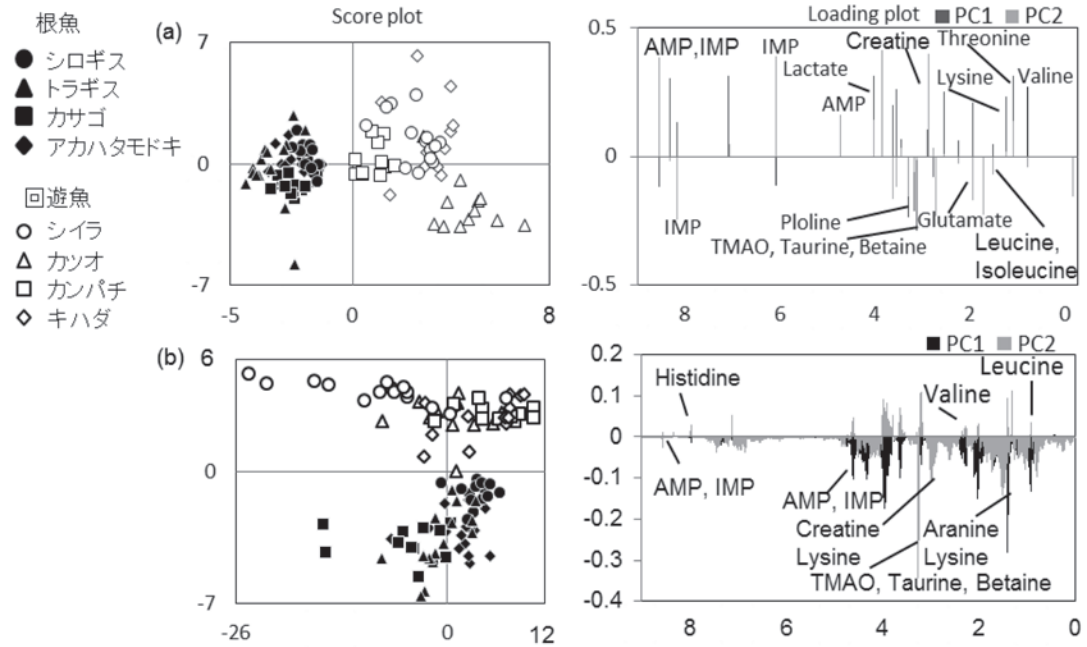


Figure 1. Metabolic profiles of fish muscle. (a) PCA score plot and loading plot based on 2D JRES spectra. (b) PCA score plot and loading plot based on Diffusion-edited NMR spectra.

＜文献＞ [1] Asakura, T., Date, Y. and Kikuchi, J. (2014) *Anal. Chem.* **86**, 5425-5432. [2] Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J. (2014) *Anal. Chem*. **86**, 1098-1105. [3] Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y. and Kikuchi, J. *PeerJ.*(in press)

P83

生活環境の変動を特徴づける非線形解析手法の検討

○塩川由佳[1], 三澤拓真[1], 伊達康博[1, 2], 菊地淳[1, 2, 3, 4]
[1]横市院生命医，[2]理研CSRS，[3]理研BMEP，[4]名大院生命農

Nonlinear analysis for characterizing fluctuation caused by living environments

○Yuka Shiokawa[1], Takuma Misawa[1], Yasuhiro Date[1, 2], and Jun Kikuchi[1, 2, 3, 4]
[1]Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan, [2]RIKEN CSRS, Kanagawa, Japan., [3]RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan., [4]Nagoya Univ., Aichi, Japan.

Phenotype of living things is appeared as mixture of the constitutive changes and the non-constitutive changes. Because of this, it seems difficult to analyze metabolic response accurately. We aimed to build the methodology to be able to get correct metabolic response by removing background such as constitutive changes like biorhythms. In this study, we calculated NMR spectral data of human saliva by PCA, but no distinctive information could be obtained. Then we considered bringing in the nonlinear way. With using kernel PCA which is a kind of nonlinear analyses, could succeed to provide distinctive information. According to these results, nonlinear analysis will provide new insight to human metabolomics.

【背景】あらゆる生物の表現型は，バイオリズムなど恒常的な変動に環境や病気による恒常的でない変動が合わさって表れている．このことから，代謝物の網羅的な解析を行うメタボロミクスにおいては，恒常的な変動に埋もれた異常な代謝反応が隠れている可能性や，与えた摂動に対する代謝レスポンスを正確に捉えられていないことが考えられる．そこで我々は，恒常的な変動である個体内の周期的変動を捉え，バックグラウンドの影響を除去し，より正確な代謝レスポンスの解析が可能となるような方法論の確立を目指して研究を遂行している．ここで，一般に用いられる線形的な多変量解析では多様な代謝反応の影響を受けて特徴的な情報抽出が難しいことが問題であり，特徴抽出のための解析法を検討する必要があった．そこで本研究では非線形な解析手法の導入を検討することにより，従来の解析方法では発掘できない重要な情報を抽出するための解析法の確立を試みた．

【方法】解析対象は，ヒト由来試料の非侵襲的サンプルである尿検体と唾液検体を用いた．サンプルは複数名のボランティアから採取した．各サンプルはKpi/D_2O溶媒を10分の1量添加し調製後，^{1}H-NMRで計測した．得られた計測データは数値化およびマトリックス化し，ベースラインを合わせ，内部標準であるDSSでノーマライズを行い，フリーソフトウェアのRを用いて多変量解析を行った．

非侵襲的サンプリング，メタボロミクス，パターン認識

○しおかわ　ゆか，みさわ　たくま，だて　やすひろ，きくち　じゅん

【結果・考察】NMR計測を行ったところ，ヒト唾液検体では水のピークが強く出ていたため，水由来のピークを除いて解析を行った．ノーマライズしたヒト唾液検体のNMR計測データに対する主成分分析 (PCA) において，ボランティア20名のデータを通常用いられる分散共分散行列に基づいた解析を行ったところ，個体でマークしたプロットが全体的に1か所に集中しており，個体差さえ観測されなかった (Fig.1A) ．更に，データを1個体に絞り同様に通常のPCAを行ったところ、1日の時間帯を3分割し色分けしたが，どの時間帯からも特徴的な傾向を読み取ることができなかった (Fig.1B) ．PCAは高次元のデータから互いに無相関の成分を取り出し，観測値をそれらの成分の線形結合で説明しており，複雑な現象や非線形の現象を分類できない．そこで，非線形の関係性を見出すためにカーネルPCAを行った．これはカーネル関数を組みこんだPCAであり，入力データ次元より高次元でPCAを行う．カーネル関数は，非線形関数によって非常に高次元である特徴空間に射影されたベクトルの内積計算を表すことができる．カーネル関数を組み込むことで計算が複雑な特徴空間での計算が可能になり，非線形な関係を考慮することができる．このカーネルPCAを先のデータセットでそれぞれ行うと，通常のPCAでは1か所に集中していたプロットがどちらのデータでも分散した．20個体のデータセットにおけるカーネルPCAの結果から，個体1, 13, 15のプロットがそれぞれ別の方向に分かれる傾向が見られ，20人の中から特徴的な代謝プロファイルを示す個人の特徴を抽出することが可能であった (Fig.1C) ．また，1個体のデータからは，全体に分散している午前と午後のサンプルに対し，夜のサンプルのプロットが分散せず1か所に固まっている特徴を捉えることに成功した (Fig.1D) ．有意差検定を行ったところ，夜のサンプルに特徴的な物質としてスクロースやグリシンが挙げられた (Fig.2) ．これらは通常のPCAやPLS-DAですら見出せなかった特徴であり，線形手法では見えなかった傾向を非線形手法で見出すことができたと言える．今後は捉えた特徴がどのような変数に起因しているかを調べるとともに，他の解析手法も併用し，ヒトに普遍的な傾向を詳細に解析していきたいと考えている．また，別な非線形解析手法によって，生活環境により変動する因子や，その変動の特徴を明らかにすることができる方法論の確立を目指したい．

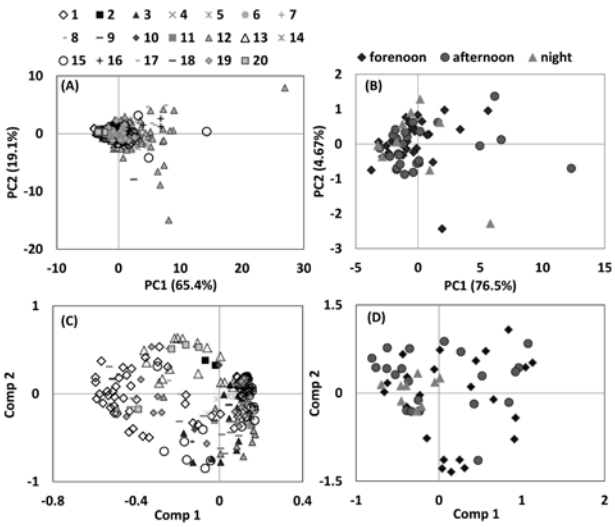


Fig.1. PCA score plots of ^{1}H-NMR spectra of human saliva. The PCA was characterized as individual differences based on 20 volunteers (A, C) and as the time of day in a person. The PCA was calculated by variance-covariance matrix (A, B), with kernel function (C, D).

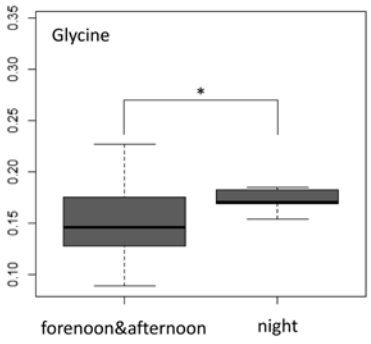


Fig.2. Statistical significant difference of relative strength of glycine.*$P \leq 0.05$

P84

環境変動の特徴を底泥や魚類試料から捉えるデータマイニング法の検討

○朝倉 大河[1,2], 小倉 立己[1,2]、伊達 康博[1,2],菊地 淳[1,2,3,4,]
[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科、[2]独立行政法人理化学研究所 環境資源科学研究センター、[3]独立行政法人理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム、[4]名古屋大学大学院 生命農学研究科

Data mining for characterizations of environmental changes from fishes and sediments

○Taiga Asakura[1,2], Tatsuki Ogura[1,2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]*Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*
[2]*RIKEN Center for Sustainable Resource Science*
[3]*Biomass Engineering Program, RIKEN Research Cluster for Innovation*
[4]*Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University*

Estuarine environments accumulate large quantities of organic matter from land masses adjoining sea. The environments are rich in biodiversity and their ecosystem services greatly benefit humans. In this study, we attempted to advance a data mining method for characterizing and visualizing the interactions and relationships among the microorganisms and chemicals in fish intestinal and sedimentary ecosystems in estuarine and coastal environments by a combination of organic matter and microbial profiling. This data mining method and analysis were able to visualize and summarize the different relationships among the microbial communities and sediment organic matter profiles based on species and geographical differences.

【背景・目的】河口・沿岸環境は、河川から流入する有機・無機物複合粒子と潮流からの塩が混じり、沈殿・堆積することで魚類などの豊富な生物多様性を支えている[1]。また卵生魚類の場合は共生細菌叢を周辺環境から取り入れていると考えられ、魚類の生態・生理の地域特異性は環境微生物群が大きく関わることが予想される。こういった共生細菌叢は宿主である魚類の生態・生理に多大な影響を与え、魚類の成長速度や代謝能力、免疫力の向上等と密接に関わっており、日本の豊富な水産資源を支える環境要因として重要な役割を持つと考えられる[2]。そこで著者らは日本沿岸生態系の細菌叢共生メカニズムの解明や、新たな機能性を持つ微生物種の発掘に資する環境技術の開発を目指して研究を行っており、その一端として本研究では、底泥・魚類試料の ^{1}H、^{13}C 検出による脂肪族の代謝プロファイリング技術の構築とそれによる鳥瞰的なデータマイニング法の開発を試みた。
【方法】本研究では関東及び東北地方の河口・沿岸を対象に底泥や魚類の採集を行った。各地点から採取した底泥サンプルはDNA抽出を行い環境微生物叢の解析に供試するとともに、NaOHによる有機画分の抽出を行い、2次元NMRによるDMSO可溶化有機物の計測を行った。魚類は解剖後、腸内容物を採取し、底泥と同様に微生物叢解析を行うとともに、

環境分析、脂溶性代謝物、^{13}C 検出型解析

○あさくら たいが，おぐら たつき，だて やすひろ，きくち じゅん

MeOD可溶化成分の^{1}H、^{13}C計測をそれぞれ行った。抽出された各DNAサンプルは次世代シーケンサーにより16S rRNA遺伝子に基づいて解析した。得られた多検体データは数値・マトリックス化した後、フリーソフトRを用いて主成分分析（PCA）等の多変量解析によって評価した。

【結果・考察】　底泥の有機画分はHSQCにおけるシグナルの座標と強度に基づきPCAを用いて解析した(Fig. 1)。底泥の有機画分においては関東においてペプチド成分が増加傾向にあり、8～11月に糖や脂質成分が増加するなど、落葉などの季節による影響が考えられた。16S rRNA遺伝子を標的とした次世代シーケンサーによる微生物叢の解析でも同様に季節応答性が見られた。これらの相関解析を行った結果、底泥の微生物の多くは脂質領域のシグナルと比較的高い相関があった。このことから、底泥の微生物叢は河口・沿岸域に堆積する有機物の変化に関係していることが示唆された。

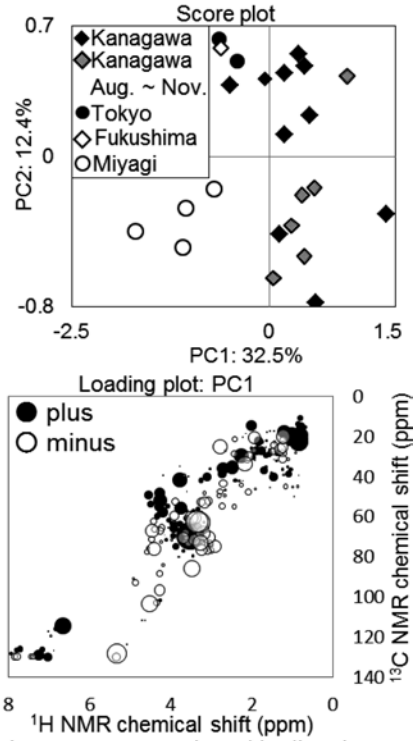


Figure 1. PCA score plot and loading plot were based on the organic fraction of HSQC in Tohoku Kanto sediment. In loading plot, bubble size indicates the loading factor, position indicates the HSQC signal.

次に、魚類腸内容物の ^{1}H NMR スペクトルに基づく代謝プロファイルおよび腸内細菌叢プロファイルを PCA により解析した(Fig. 2)。腸内容物は有機成分・微生物プロファイル両方において、地域特異性の他に種や食性、生態に特徴がある傾向が見られた。さらに、魚類腸内環境とその魚類の生息環境に存在する底泥との関係性を調べるため、相関解析を行ったところ、河口・沿岸環境中の微生物叢は魚類腸内細菌叢と明確な相関が見られた。河口・沿岸に堆積する有機物組成は繁茂する微生物叢に影響を与え、魚類腸内細菌叢は生息する環境から微生物叢を取り入れ、さらに種や食性などによって選択圧がかかっている可能性が示唆された。本会では上記のデータに加え ^{13}C NMR による脂溶性代謝成分に着目した環境変動性についても議論したい。

[1] Asakura, T., Date, Y., Kikuchi, J. *Anal. Chem.* (2014)

[2] Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y., Kikuchi, J. *PeerJ* (in press)

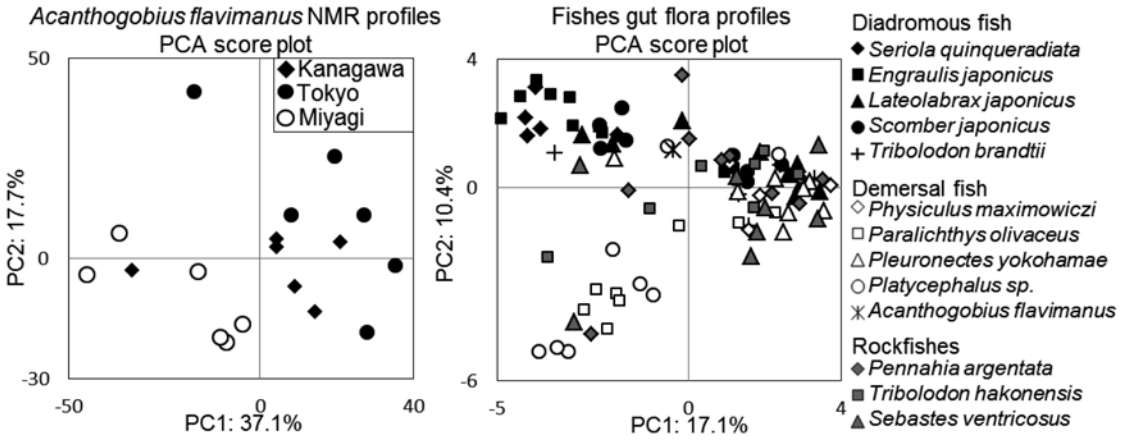


Figure 2. PCA score plot based on ^{1}H NMR of the gut contents of *Acanthogobius flavimanus*, and PCA score plot of the gut flora of various fishes.

P85

MagRO-NMRView、FLYAによる高度に自動化されたＮＭＲデータ解析

○小林直宏[1]、Bikash Ranjan Sahoo[1]、永田崇[2]、服部良一[1]、Elena Schmidt[3]、Peter Güntert[3,4]、児嶋長次郎[1]、藤原敏道[1]
[1]大阪大学蛋白質研究所、[2]京都大学エネルギー理工学研究所、
[3]Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Germany、[4]首都大学東京・理工学部

Highly automated analysis of NMR data using MagRO-NMRView and FLYA

○Naohiro Kobayashi[1], Bikash Ranjan Sahoo[1], Takashi Nagata[2], Yoshikazu Hattori[1], Elena Schmidt[3], Peter Güntert[3,4], Chojiro Kojima[1], Toshimichi Fujiwara[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan*
[2]*Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Kyoto, Japan*
[3]*Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Germany*
[4]*Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Japan*

For the NMR analysis of protein samples, usually more than 10 different types of spectra are used, including 2D or 3D hetero-nuclear NMR spectra for backbone, aliphatic and aromatic signals. We have developed a program suite, MagRO-NMRView, to systematically integrate a series of NMR spectral data, allowing users to visually inspect the consistency between NMR signals and assignments. A GUI module was designed for users to set up the program for fully automated signal assignments, FLYA. The module has a function to generate the files required for the FLYA calculation as well as to import the assignment data performed by FLYA. In the poster presentation, the details of the system will be shown with several case studies of automated NMR analysis.

【緒言】ＮＭＲシグナルの解析には主鎖シグナル帰属、脂肪族側鎖、芳香環側鎖のシグナル帰属を目的とした多核多次元のスペクトルが使用され、十分な精度でシグナル帰属および立体構造決定を行うためには２次元、３次元スペクトルを含め１０種類以上ものスペクトル群を必要とする。我々はこれまでに解析に必要となるスペクトル群を統合的に管理するシステムを開発し、ＮＭＲデータ解析環境であるMagRO-NMRViewに搭載した。FLYAは解析に用いられるNMRスペクトルのピークデータと解析対象のアミノ酸配列を与えて計算させることで観測可能な全シグナルの帰属と立体構造解析を完全自動的に実現するプログラムである。FLYAによる自動帰属の解析精度はスペクトルの質に強く依存しており、分子量が大きいあるいは化学交換などの理由でシグナルがブロードであるサンプルなどでは十分な解析精度を得ることは難しい。本研究ではMagRO-NMRViewとFLYAを連携させる機能を開発し、難度の高いタンパク質データ解析の自動化を目的とした。

Keywords: データ解析、自動化、シグナル帰属

○こばやしなおひろ、らんじゃんさふーびかしゅ、ながたたかし、はっとりよしかず、しゅみっとえれな、ぎゅんたーとぺーたー、こじまちょうじろう、ふじわらとしみち

【方法】FLYA計算を実行するために必要となるスペクトル群を管理するGUIの開発、FLYA計算で求められるスペクトルのピークの自動検出機能、2D ^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルあるいは2D ^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルデータをマスクデータとする３次元スペクトルピークリストのノイズフィルター機能、3D ^{13}C-edited NOESYあるいは 3D HCCH-TOCSYスペクトルのピークリストにおける^{13}C軸折り返しを折り返さないシグナル位置に復元させる機能を開発し実装した。またFLYA計算終了後に計算結果のインポート機能、帰属されたデータの視覚的確認機能も開発し、MagRO-NMRView上で利用できるよう実装した。データの解析にはMagRO-NMRView ver. 1.18.30 およびCyana ver. 3.96を用い、Core i7 (4Core)を搭載したワークステーション上で動作するCentOS 5.4上で計算を行った。

【結果と考察】
全長155残基のタンパク質(C-type lectin)について全自動的なピーク検出、ノイズフィルター処理、FLYAによるシグナル帰属、立体構造計算を実行した。このサンプルのスペクトルは全て非常に分離の良いシグナルであったため帰属可能なシグナルの90.6%を帰属し、その正確さは97.6%であった。FLYAで計算された化学シフトテーブルとNOEピークリストを元にCYANA計算を実行し、得られた構造は正解構造との主鎖RMSDが0.43Åと極めて良好な結果を得ることができた(図１左)。
またシグナルがブロードであり重なり合いが著しいタンパク質であるMDM2-MIPについても同様の解析を行ったところ、精度の高い立体構造計算を実行できるシグナル帰属の正確さと完全性を達成できなかった。しかしながら既に決定されている溶液構造を参照情報としてFLYA計算を行った場合、帰属可能なシグナルの80.1%を帰属し、その正確さは95.9%であった。またFLYAで計算された化学シフトテーブルを用い、NOEピークリストによるCYANA計算を実行し、正解構造との比較をおこなったところ主鎖RMSDが0.61Åと極めて良好な結果であることが示された(図１右)。
本研究により開発されたシステムはスペクトルの質が良好な場合、ほぼ全自動的にピーク検出からシグナル帰属、構造決定までが高精度に実行できることが示された。一方、スペクトルの質が悪いデータに関しても信頼できるモデル構造をFLYA計算に用いることで十分高精度なシグナル帰属が実行可能なことが示された。

図１．C-type lectin (左)および MDM2-MIP(右)の正解構造とFLYA/CYANA 計算により得られた構造との重ね合わせリボン図。それぞれ主鎖 RMSD は 0.43Å および 0.61Å

P86 高速高磁場DNP効率シミュレーション計算

○深澤隼[1], 藤原敏道[1], 松木陽[1]
[1]大阪大学蛋白質研究所

Fast calculation of solid-state DNP effectiveness under magic-angle spinning

○Jun Fukazawa[1], Toshimichi Fujiwara[1], and Yoh Matsuki[1]
[1]Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

It is time-consuming to simulate the build-up of the nuclear magnetization by exact numerical calculation of spin states in high-field DNP under magic-angle spinning. This process consists of cross-effect DNP followed by nuclear spin diffusion. We have developed an efficient method for numerical calculation of the cross effect. In this calculation, spin dynamics faster than sub-μs are approximated as phenomena in spin subspaces. We calculated the DNP effectiveness for biradical molecule TOTAPOL in several situations such as irradiation frequency dependence of submillimeter-wave double-resonance at 16.4 T. This fast calculation can be used for optimization of DNP experimental parameters.

【序】

動的核分極（Dynamic Nuclear Polarization，DNP）は、電子スピンの分極を核スピンに移すことによりNMRの感度を向上させる技術である。理論的には^{1}Hについて最大660倍の核磁化の増大が期待でき，NMRの解析能力を大幅に向上させる。しかし実験的には，特に高磁場のマジック角試料回転（MAS）条件において，そのように大きな核磁化増大を得るのは困難である。DNP効率向上させるための実験技術としては，スピンハミルトニアンを決める常磁性分子系の最適化，スピン状態の時間依存性を制御する電子スピン共鳴サブミリ波および核スピン共鳴ラジオ波の最適化，分子運動性や磁気緩和に影響する試料温度の最適化などが考えられる。高分解能固体NMRのための高磁場DNPは，高出力サブミリ波や極低温での高速試料回転を用いるなど実験上の難しさなどのために，DNP効率向上のための最適化は十分行われていない。そこで，実験上の制約を受けないで，それら実験パラメータや条件を最適化するために，効率的な数値シミュレーション法を開発した。

MAS条件の高磁場DNPシミュレーションでは，GHzからHzにわたる広大な周波数領域のスピン相互作用を扱うため，高磁場近似を用いても時間領域での厳密な積分は膨大な計算時間になる[1]。これを克服するために，およそMHz級以上のスピン相互作用の効果の一部を近似するなど，時間領域で粗視化することによって計算効率を向上させた。今回我々はその考えに基づいたプログラムを組み、様々な条件下でDNP効率がどのように変わるかというシミュレーションを行った。分子にはTOTAPOL等のビラジカルを想定し、高磁場での交差分極が主要効果となる条件でシミュレーションを行った。さらにこの高速シミュレーションが実用レベルで問題ないか確認した。

Dynamic Nuclear Polarization，DNP効率，シミュレーション

○ふかざわじゅん，ふじわらとしみち，まつきよう

【方法】

DNPにおける核の分極効果にはオーバーハウザー効果、固体効果、交差効果があるが、高磁場固体DNPでは交差効果が主要になる[2]。この交差効果とは2電子のスピンのエネルギーの差が核スピンのエネルギーに等しくなった際に電子のフリップフロップとともに核スピン励起が起こる効果である。これは3スピン系の現象であるため、正確な計算を行うためには8 × 8行列のハミルトニアンを解く必要があるが、これには多くの時間（行列次数の3乗に比例）を要する。そこで、計算の単純化のために、考慮する相互作用を電子のg因子の異方性H_{g_i}、核スピンのゼーマン効果H_Zの他、各H_{EM}(電子-マイクロ波)、H_{triple}(電子2-電子1-核)、H_{EE} (電子1-電子2)の3種に絞り、またH_{triple}では電子2と核の間には直接相互作用はないとした。また、電子スピンを共鳴させるサブミリ波は2周波数を同時あるいは経時的に照射することを考慮した。エネルギー差を求めるに当たっての時間の刻みはマジック角試料回転角度2°相当とし、その刻みの間を線形近似し0.01°相当まで求めた。またパウダーパターンの計算のための空間配座のためのオイラー角格子点にはEdénらのZCW3[3]を用いた。磁場強度は16.45T (700MHz for ^{1}H)とし、励磁対象核は^{1}H、MAS速度は10kHz、使用するビラジカルはTOTAPOL (Fig.1)、gテンソルはニトロキシルラジカルの典型値(2.0089, 2.0061, 2.0027)を用いた。ラジカル電子間距離は19 Å、電子1-^{1}H核(Fig.1下線)間距離は2.7 Åとした。

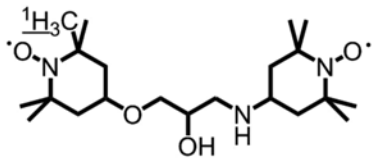


Fig.1. TOTAPOL with electron and ^{1}H spins.

【結果・考察】

これを用いて計算したDNP効率を等高線プロットした図をFig.2に示す。このシミュレーションは照射するマイクロ波の2周波数を少しずつ変えながらDNP効率をプロットする実験に相当する。ここから、電子の広域パウダーパターン線形に相当する周波数のうち、中心より少し離れた部分に、少し周波数の異なる2種のマイクロ波を照射すると効率良く励起を行うことが出来る一方、^{1}H周波数に近い周波数差の照射では効率が低下するとわかった。この図はMAS2000回転に相当する時間、つまり0.2s間行ったときのDNP効率であり、またZCW3格子点の数は50点という低い近似で、この計算にかかる時間は5分程度である。掛かる時間は8 × 8行列計算時の6分の一以下と概算される。この結果は^{1}H周波数差の2電子スピンを共に飽和させるとDNP効率が悪くなるという予想通りの結果であり、この程度の時間でも本質的なシミュレーションは十分行うことが出来る。ただし格子点の刻みが荒いため、重要なオイラー角データや突出したエネルギー変化データが欠落する恐れがある。この欠点は、計算の条件は要求する精度と掛けられる時間との兼ね合いで自由に選ぶことが出来るため、計算条件の適宜選択で解消できる。

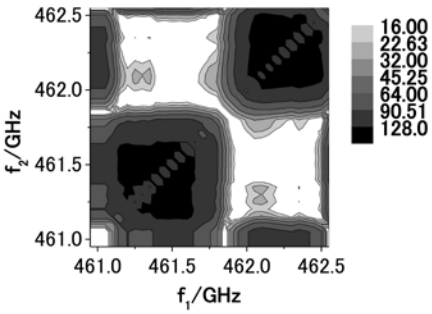


Fig.2. DNP enhancement for TOTAPOL under two-frequency microwave irradiation, after a build-up time of 2000 times the MAS period. Darker areas indicate stronger DNP effect.

Reference

[1] K. R. Thurber, R. Tycko, *J. Chem. Phys.*, **137**, 084508 (2012)

[2] T. Mary, et. al., *J. Chem. Phys.* **128**, 052211 (2008)

[3] M. Edén, M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.*, **132**, 220-239 (1998)

P87

BMRB/XML and BMRB/RDF：common open representations of BMRB NMR-STAR data

○横地政志[1], 小林直宏[1], 岩田武史[1], 高橋あみ[1], Eldon L. Ulrich[2], Yannis E. Ioannidis[3], Miron Livny[4], John L. Markley[2], 金城玲[1], 中村春木[1], 児嶋長次郎[1], 藤原敏道[1]
[1]大阪大・蛋白質研究所
[2]University of Wisconsin-Madison・Biochemistry
[3]University of Athens・Informatics & Telecommunications
[4]University of Wisconsin-Madison・Computer Sciences

BMRB/XML and BMRB/RDF: common open representations of BMRB NMR-STAR data

○Masashi Yokochi[1], Naohiro Kobayashi[1], Takeshi Iwata[1], Ami Takahashi[1], Eldon L. Ulrich[2], Yannis E. Ioannidis[3], Miron Livny[4], John L. Markley[2], Akira R. Kinjo[1], Haruki Nakamura[1], Chojiro Kojima[1] and Toshimichi Fujiwara[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Japan.*
[2]*Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison, USA.*
[3]*Department of Informatics & Telecommunications, University of Athens, Greece.*
[4]*Department of Computer Sciences, University of Wisconsin-Madison, USA.*

NMR spectroscopic data for biological macromolecules archived at the BioMagResBank (BMRB) provide a rich biophysical information resource at atomic resolution. The archived NMR data in the NMR-STAR ASCII format have been well implemented in a relational database. However, retrieving data from the NMR-STAR files or the relational database in association with data from other biological databases is not trivial for users. To enhance the interoperability of the BMRB database, we present here BMRB/XML and BMRB/RDF as common open representations of the NMR-STAR data. Moreover, a web interface for querying the BMRB/RDF, SPARQL endpoint, has been provided.

The BMRB extension based on web standard technologies facilitated data exchange and knowledge discovery across diverse information resources, and several feasibility studies demonstrated how the BMRB can now be linked to other databases via SPARQL endpoints in a straightforward manner.

BioMagResBank (BMRB、ウィスコンシン大学)は生体高分子のNMR実験データのデータベースであり、日本においてはPDBj-BMRB (大阪大学) がNMR実験データの登録、データの公開、データベースに関連する開発を行っている。従来、NMRデータは独自のテキスト形式(NMR-STARフォーマット)を用いて記述していたが、データの相互運用性を向上させるため、新たにXML及びRDFフォーマットに変換したデータセットを公開した。それぞれ、BMRB/XML、BMRB/RDFと呼ぶ。

BioMagResBank, Semantic Web

○よこちまさし，こばやしなおひろ，いわたたけし，たかはしあみ，きんじょうあきら，なかむらはるき，こじまちょうじろう，ふじわらとしみち

BMRB/XMLとして、*complete*版と*noatom*版の２つを用意した。*noatom*版は、従来のNMR-STARデータに相当する情報量を有している。一方、*complete*版は、NMR-STARデータに加えて、PDBに登録された原子座標、その構造決定に利用されたNMR束縛条件、ピークリスト等を包括する。BMRB/RDFは、*noatom*版のBMRB/XMLを元に作成した。各フォーマットの明示的な仕様（オントロジー）は、NMR-STARフォーマットのオントロジーであるNMR-STAR v3.1 Dictionaryと完全な互換性があり、基本的に各データセットの情報量は等価である。(Table.1)

Table. 1 Overview of the NMR-STAR data formats

Representation	Ontology	Information content
NMR-STAR	NMR-STAR v3.1 Dictionary	*conventional*, BMRB+PDB*
BMRB/XML	BMRB/XML Schema	*complete, noatom*
BMRB/RDF	BMRB/OWL	*noatom*

*The BMRB+PDB represents NMR-STAR files including atomic coordinates and NMR restraints of the associated PDB entries.

今回、NMRデータをウェブ標準技術で記述したことで、データの読み取り、変換、検索に必要とされる標準ライブラリ(DOM, XSLT, XQuery, SPARQL)が利用可能になり、登録されたNMRデータの再利用の促進が期待される。特に、BMRB/RDFを検索するための標準言語であるSPARQLを利用することにより、利用者がBMRBに登録されたデータと興味のある生命科学データベースの情報とを関連づけ、新たな知識発見へと至るといったことも期待される。

本発表では、複数のデータベースを連携させるSPARQL検索によって求めた２つの検索結果についても報告する。(1) BMRBから引用された文献情報を基にして、NMR法を用いた研究の生物学的興味の変遷を検索。(2) BMRBに登録された全タンパク質について、表現系が判明している一塩基多系によるアミノ酸変異情報を関連づけた検索。いずれの例においても、僅か十数行のSPARQLコードにより検索が成り立っている。

現在、BMRB/RDFと直接連携可能な情報源をFig.1に表した。このようにウェブ標準技術で拡張されたBMRBは、SPARQLに代表されるSemantic Web技術によって、これらの情報源と相互検索・接続が可能になったばかりでなく、これらを経由して、さらに多様な生命科学データベース群を繋げ、有用な情報を引き出すことが可能になった。今後、PDBj-BMRBはNMRデータ検索の利便性の向上のために、今回の成果を活用していく予定である。

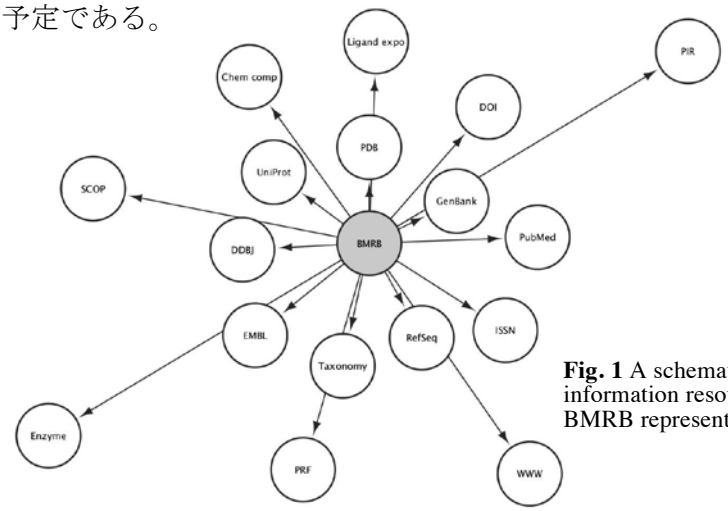


Fig. 1 A schematic representation of linked external information resources, where shorter distances from BMRB represent closer relationships with BMRB.

私たちは、BMRB/XML、BMRB/RDFの配信、データ検索のための専用ポータルサイトをhttp://bmrbpub.protein.osaka-u.ac.jp/に開設しました。（毎週木曜日に更新）

P88

指数窓によるCS法のNMRスペクトル復元精度の改善

○田中勇帆[1], 中尾朋喜[1], 濱津順平[2], 泉顕也[2], 古川利博[1]
[1]東京理科大学・工学研究科
[2]株式会社 JEOL RESONANCE

To Improve Accuracy Reconstructed the NMR Spectrum with the Compressed Sensing Using the Exponential Window

○Yuho Tanaka[1], Tomoki Nakao[1], Jumpei Hamatu[2], Kenya Izumi[2],and Furukawa Tosihiro[1]
[1]*Department of Industrial Engineering,Tokyo University of Science.*
[2]*JEOL RESONANCE Inc.*

The Non-Uniform Sampling (NUS) method is one reducing the measurement time in multi-dimension NMR. The NUS method consists of two processing as follows: (i) the first step is to observe signal on non-equal interval points. (ii) the second step is to reconstruct spectrum form observed signal. The compressed sensing (CS) method is known as the method that can reconstruct the spectrum. It is possible for the CS method to approximate the ideal spectrum, if the spectrum distribution is fully sparse, from observed signal with few data points. But, reconstructing performance of the CS method is affected by sparseness of the subject spectrum.

Now, suppose that the observed signal multiplied by the exponential window produces the modified observed signal $\hat{s}(n)$.Well, we would like to propose the reconstruction method with which the signal $\hat{s}(n)$ is applied to CS.

【はじめに】

生体高分子の構造情報を入手する手法として多次元NMRの測定という方法があるが，測定が数日から数週間にも及んでしまうため，その測定時間の短縮が求められている．これに対して測定時間を短縮するための方法としてNon-Uniform Sampling(NUS)法が提案されている．これは，FFTに必要な測定点からいくつかの点での測定を間引くことで測定時間を短縮し，間引いた信号から間引きを行わなかった場合のスペクトルを推定する必要がある．以降，このスペクトル推定をスペクトルの復元と称する．スペクトルを復元する手法はいくつかあるが，その中でも圧縮センシング（Compressed Sensing:CS）法と呼ばれる手法が注目されている．この手法では，スペクトルのスパース性を利用している．スペクトルのスパース性とは，スペクトル値が０となる周波数帯が多く含まれていることを意味する．よって，ピークが十分に鋭いスペクトルに対しては少ない観測点数からサンプリング定理を満たした理想測定スペクトルの復元が可能である．しかし，その復元性能はスペクトルのスパース性に大きく依存するため，スパース性の低下とともに復元精度は悪化してしまう．

NUS, compressed sensing, sparse

○たなかゆうほ，なかおともき，はまつじゅんぺい，いずみけんや，ふるかわとしひろ

そこで，本報告では信号のスパース性によって精度が悪化してしまう問題に対し，CS法の前に窓関数乗算処理を行うことで精度を改善する方法を提案する．

本報告では，CS法とその問題点について述べたあと，提案法について述べる．続いて，スパース性が異なるシミュレーションデータに対して提案法のスペクトル復元精度の評価を行い，有効性を示した．

【Compressed Sensing 法】

現在，NMRの解析法として主流の手法はFFTを用いたFT-NMRである．FT-NMRでは，測定したFID信号をFFTして得られるNMRスペクトルから分子構造を特定する．このとき，サンプリング定理を満たしたN点の測定を行ったFID信号とNMRスペクトルの関係は

$$\mathbf{DS} = \mathbf{s} \tag{1}$$

と表わされる．ここで，$\mathbf{s}$は測定したFID信号を表わす$\mathrm{N}\times 1$ベクトル，$\mathbf{S}$は$\mathbf{s}$に対応するNMRスペクトル$\mathrm{N}\times 1$ベクトル，$\mathbf{D}$はIFFT行列を表わしている．NUS法では測定時間を抑える為に，必要な測定点よりも少ないランダムな点でのみ測定を行う．以下，この測定点をランダム測定点と呼ぶ．このとき，測定した点数をKとすると，式(1)は

$$\bar{\mathbf{D}}\mathbf{S} = \bar{\boldsymbol{s}} \tag{2}$$

と表わすことが出来る．ここで，$\bar{\boldsymbol{s}}$は$\mathbf{s}$からランダム測定点に対応する要素のみを取り出した$\mathrm{K}\times 1$ベクトル，$\bar{\mathbf{D}}$は$\mathbf{D}$からランダム測定点に対応する行ベクトルのみを取り出した$\mathrm{K}\times \mathrm{N}$行列である．但し，$\mathrm{K} < \mathrm{N}$とする．$\bar{\boldsymbol{s}}$よりも$\mathbf{S}$のサイズが大きいため，式(2)を満たす解は無限に存在し，一意に決定することは出来ない．CS法は解のスパース性に着目して式(2)から式(1)の解である理想的なスペクトル$\mathbf{S}$を得る手法である．なお，本報告で用いるCS法のアルゴリズムである，反復再加重最小二乗(Iteratively Reweighted Least Squares ：IRLS)において，復元スペクトル$\tilde{\mathbf{S}}$は最適化問題

$$\tilde{\mathbf{S}} = \min_{\mathbf{S}} \|\mathbf{S}\|_1 \ , \mathrm{s.t}\ \bar{\mathbf{D}}\mathbf{S} = \bar{\boldsymbol{s}} \tag{3}$$

を解くことで得ることが出来る．ここで，$\|\cdot\|_1$はベクトルのL_1ノルムを表わしている．

【CS法の問題点】

CS法によるスペクトル復元では，スペクトル分布が十分にスパースであるという仮定のもとで復元を行っている．そのため，スペクトルのスパース性が低いと，十分な精度でスペクトル$\mathbf{S}$を得ることが出来ない．

スペクトル分布のスパース性が低下する要因としては，以下の3種類が考えられる．一つの要因は信号のピークが大きな半値幅を持つ場合である．半値幅の大きいピークを持つスペクトルは広い帯域で値を持つため，スパース性が低下する．残り2つの要因は，ピークの重なり合いとSN比である．

本報告では，ピークの半値幅によるスパース性の低下に着目し，スパース性の低いスペクトル分布を持つ信号に対しても高い復元精度を持つ手法を提案する．

【提案法】

CS法の問題に対し，提案法では測定したFID信号に対し指数増加関数との積をとることで，NMRスペクトルのピークを鋭くさせ，スパース性を高めたのち復元を行う．以下，提案法の説明を行う．

NUS法によって測定された信号は

$$\bar{s}(n) = T(n)\sum_{k=1}^{P} A_k e^{(-\sigma_k + i2\pi f_k)n} + E(n) \tag{4}$$

と表わされる．ここで，Pはピーク数，A_k，σ_k，f_kはそれぞれピークの強度，半値幅，共振周波数，nはサンプル点を表している．また，E(n)はガウス性雑音を表し，T(n)は非測定点で0，測定点で1となる間引き関数を表している．この測定信号$\bar{s}(n)$に対して指数増加関数の乗算を行うと

$$\begin{aligned}\tilde{s}(n) &= e^{\sigma_w n}T(n)\sum_{k=1}^{P} A_p e^{(-\sigma_p + i2\pi f_p)n} + e^{\sigma_w n}E(n) \\ &= T(n)\sum_{k=1}^{P} A_p e^{(-(\sigma_p - \sigma_w) + i2\pi f_p)n} + e^{\sigma_w n}E(n)\end{aligned} \tag{5}$$

となる．ここで，$\tilde{s}(n)$は窓乗算処理後の信号，σ_wは指数増加関数の半値幅を表しており，$\sigma_w > 0$である．式(5)から，指数増加関数を乗算することで信号の半値幅を小さくすることが出来ることが分かる．提案法は，$\tilde{s}(n)$に対して従来のCS法によるスペクトル復元を行う方法である．

Fig. 1に提案法の処理の流れを示す．Fig. 1の$\bar{s}(n)$は間引きを行ったFID信号，w(n)は指数増加関数，$w^{-1}(n)$はw(n)の逆関数，S(f)はスペクトルを表している．

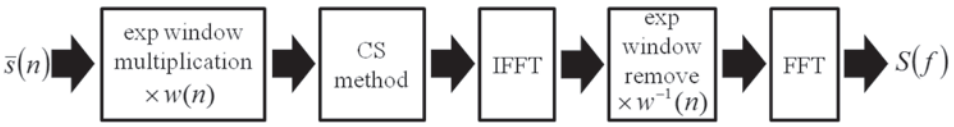


Fig.1 Processing of proposed method

【数値例とその考察】

提案法の有効性を示すために，信号の半値全幅の変化に対するスペクトル復元の精度評価を行った．シミュレーションでは，半値全幅以外の条件をTable 2とした信号から，試行ごとにランダムに間引いた信号を用いて，提案法と従来法によるスペクトル復元を行い理想測定スペクトルとの残差スペクトルのエネルギーの平均を求めた．提案法に用いた指数関数の半値幅σ_wは，乗算処理後の信号の半値全幅が0.01Hzとなるように設定した．その他シミュレーション条件をTable 1とし，信号の半値全幅を0.01Hzから0.05Hzまで0.005Hz刻みで変化させた場合の残差エネルギー平均値をFig. 2に示す．またFig. 3に，提案法によって復元したスペクトルの一例として，半値全幅0.03Hz，SN比100dBの信号から復元した絶対値スペクトルを示す．

シミュレーション結果より，SN比が十分高い場合には，復元精度の改善がみられる．しかし，SN比が低くなるにつれ，半値全幅の増加に伴い，誤差が指数関数的に増加してしまっている．これは指数増加関数乗算によって雑音が増幅されてしまい，SN比が悪化したためであると考えられる．

以上のことから，スパース性の低いスペクトルに対しても，提案法を用いることで従来よりも高い精度でスペクトルを復元することが示された．しかし，SN比が悪い場合では，精度が従来法よりも劣化してしまうことが判明した．今後の課題としては，復元精度を定量的に求めること，適切な半値幅σ_wの決定法を構築することが挙げられる．

Table 1 The simulation parameters

復元アルゴリズム	IRLS
SN比[dB]	60, 80, 100
データ数 N	128
間引き率	60%
試行回数	100
サンプリング周波数[Hz]	1

Table 2 The signal parameters

ピーク数	5
強度比	1, 0.5, 0.7, 0.85, 0.65
共振周波数[Hz]	0.1, 0.3, 0.68, 0.75, 0.82

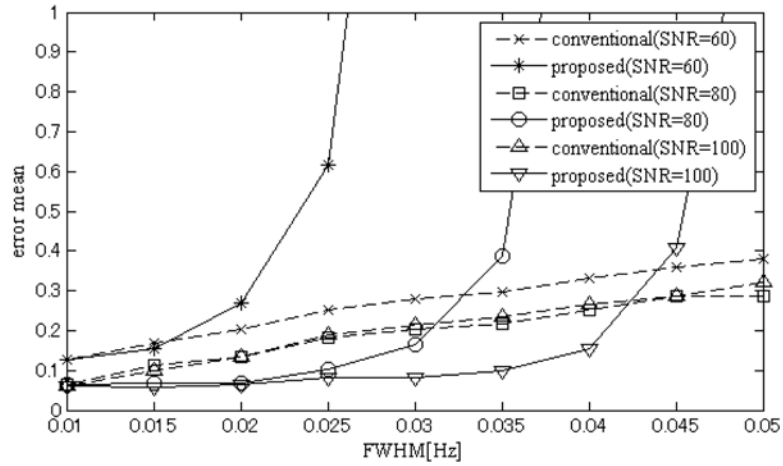


Fig.2 The results of reconstructing accuracy come from FWHM of signal

The horizontal axis is FWHM of the observed signal; The vertical axis is the mean of error energy; A broken line of (×), (□) and (△) is the mean of error energy used conventional method; A solid line of (∗), (○) and (▽) if the mean of error energy used proposed method.

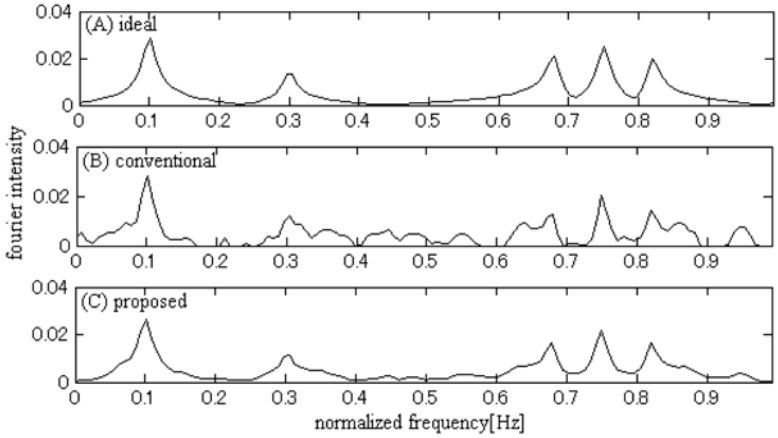


Fig.3 The reconstructing absolute spectrum

The horizontal axis is normalized frequency; The vertical axis is the fourier spectrum; (A) is ideal spectrum that fully sampling signal; (B) is reconstructing spectrum used conventional method; (C) is reconstructing spectrum used proposed method.

P89 ベイズ推定を利用したNMR蛋白質構造最適化法の開発

○池谷鉄兵[1, 2], 伊藤隆[1], Peter Güntert[1, 2]
[1]首都大学東京・大学院理工学研究科
[2]Goethe University Frankfurt・Institute of Biophysical Chemistry

A refinement method for NMR protein structure determination based on Bayesian inference

○Teppei Ikeya[1], Yutaka Ito[1] and Peter Güntert[1,2]
[1] Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.
[2] Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany.

Conventional NMR structure determination requires to determine a weight factor for balancing experimental data and a physical forcefield, and to estimate calibration constants that convert NOE data into three-dimensional structure information. Rieping et al. proposed an innovative method based on Bayes' theorem to solve these problems, so-called Inferential Structure Determination. We implemented a similar approach into the program CYANA with some modifications. It allows us to handle automatic NOE assignments as well as ambiguous ones. The new structure calculation method shows that it can provide sufficiently accurate structures even with less NOE peaks, especially compared with the conventional method. Moreover, it dramatically improves protein structures of TTHA1718 and GB1 in living cells.

従来のNMR立体構造計算は，NOEピークの強度が２原子間距離の-6乗に比例する関係式をもとに距離を算出し，この距離条件を満たす原子座標を探索することで立体構造を決定していた．一方で，NOE強度は，原子間距離だけでなく，回転相関時間，局所運動，スピン拡散等，その他様々な物理的要因や実験条件にも影響されるため，単純な強度-距離の関係式からは正確な距離情報を見積もることはできない．多くの物理因子を考慮した計算手法は，一方で，演算コストが大きく，実験データに含まれる不確定因子までは加味できないため，計算量増大に見合う精度の向上は限定的であった．さらに，従来法では構造計算に利用される目的関数の定義も簡易ではない．通常これは，実験値とモデルとの二乗誤差項に，分子ポテンシャルエネルギーを事前情報とした正則化項を加えた形で表現されるが，正則化項と二乗誤差項の重みの決定には客観的指標がなく，解析者個々の判断を必要とする．

これらの問題を解決する新しい立体構造計算手法として，Nilgesらは，Inferential Structure Determination (ISD)法[1,2]と呼ばれる，ベイズ推定をもとにした新たなアルゴリズムを提案している．この方法では，従来の立体構造計算で正則化項として用いられてきたポテンシャルエネルギー関数を事前確率分布として表現し，二乗誤差項は尤度関数で表すことで，事後確率を計算することができる．構造の評価は，この

Bayesian inference, structure refinement, CYANA

○いけやてっぺい，いとうゆたか，ぺーたーぎゅんたーと

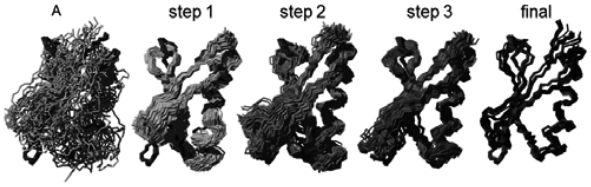
事後確率分布で行うことで，従来の目的関数に含まれていた重み因子を考慮することなく実験データから得られる最も取り得る構造を推定することができる．さらに，実験データから座標情報への変換に用いられる補正因子も確率分布で表現することで，原子間距離以外の因子を一括りした，データの不均一性に柔軟な解を求めることができる．我々は，最近，この手法をCYANAプログラムに導入し，さらにNOE自動帰属と組み合わせて再帰的に実行することで構造と帰属を同時に最適化する計算手法を開発した．ここではいくつかの蛋白質データを本手法に適用させ，この有用性について議論する．

【方法】

NOEデータの距離情報への変換補正項は，平均値μ，標準偏差σの対数正規分布でモデル化し，シグマは無情報ガンマ分布で定義した．説明変数μ，σは，ギブスサンプリングによるマルコフ連鎖モンテカルロ(MCMC)法を用いてサンプリングを行い，構造探索はAmber03力場を用いてMDとMC法を組み合わせて行うことで，それぞれの事前確率分布を作成した．全体のプロセスは，レプリカ交換MC法によって広域探索を行い，十分な変数の収束が確認された時点で事後確率分布を評価した．本手法の性能は，1. 既知構造をもとにしたシミュレーションスペクトル，2. 実データの一部を加工したもの，3. in-cell NMRの実験データ，の３種類データセットを複数蛋白質について用意し，結果を解析することで包括的に評価した．

【結果・考察】

Fig. 1は，NOEピーク数を極端に減らしたデータ（^{13}C-NOEピーク数：126，^{15}N-NOEピーク数：67）を用いて，従来法とベイズ推定を利用した新規手法により立体構造計算を行ったGB1蛋白質の構造である．極端に少ないNOEピークを用いているため，従来法(A)では正確にフォールドした構造を得ることができていない．一方，ベイズ推定による構造最適化計算とNOE自動帰属を再帰的に行う新規手法では，繰り返し計算毎(step 1-3 and final)に立体構造が修正され，参照構造に次第に近づいている．最終的には，参照構造に対して，主鎖RMSDで2.4Å程度の構造を得ることができた．



RMSD	A	step1	step2	step3	final
Backbone RMSD to the ref.	4.32 Å	2.73 Å	2.61 Å	1.94 Å	2.39 Å
All heavy atom's RMSD to the ref.	4.96 Å	3.73 Å	3.06 Å	2.48 Å	2.95 Å

Fig.1 G B1 structures obtained by the conventional simulated annealing (A) and the iterative process of automatic NOE assignment and structure refinement based on Bayesian inference. While 20 bundle conformations are selected from 100 that computed by independent different runs in the conventional structure calculation (A), all conformations within one standard deviation in the posterior are shown in the Bayesian method (step 1-3 and final).

今後は，本手法をNOE以外のNMRデータにも拡張し，より高精度の構造決定が可能な堅牢な手法へと改良を進めていく．

【参考文献】

1) Habeck, M., Nilges, M. & Rieping, W., Bayesian inference applied to macromolecular structure determination (2005) *Phys. Rev. E* 72, 031912.

2) Rieping,W., Habeck,M. & Nilges,M., Inferential Structure Determination (2005) *Science* 309, 303–306.

P90

グラフ・ネットワーク理論による代謝混合物の未知シグナル帰属支援

○伊藤研悟[1,2]，小松功典[1,2]，伊達康博[1,2]，菊地淳[1,2,3,4]
[1]横市院生命医　[2]理研CSRS　[3]理研BMEP　[4]名大院生命農

Supporting for assignment of unknown metabolites signals by graph and network theory

○Kengo Ito[1,2], Takanori Komatsu[1,2], Yasuhiro Date[1,2] and Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan., [2]RIKEN CSRS, Kanagawa, Japan.,
[3]RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan., [4]Nagoya Univ., Aichi, Japan.

Advanced NMR measurement technology and new assignment methodology are expected for evaluation of unknown metabolites in complex biological systems such as seaweed components. We developed a new assignment methodology based on theoretical calculation for unknown signals. The new assignment method is constructed by using network analysis, empirical structure estimation and quantum chemical calculation. ^{13}C-labeled standard mixture and seaweed extract were measured by multidimensional NMR with NUS method. The utility of network analysis of the correlation signal was examined by the results of network analysis using ^{13}C standard mixture. The results of assignment by theoretical chemical shift approximated to experimental chemical shift of Glutamic acid suggested the possibility of assignment to unknown signals in ^{13}C-labeled seaweed extract.

【背景・目的】

海藻類の構成成分は食品、工業製品や医薬品等に幅広く利用されており、産業的価値は極めて高いと考えられる。しかし、海藻類に含まれている成分の効能について評価されていないものは多数存在し、海藻類の構成成分を網羅的かつ高感度に検出可能な計測技術高度化が望まれている[1,2]。このような計測技術高度化において、安定同位体標識技術を用いたNMR計測により代謝混合物群の網羅的な検出が可能である。また、不均一サンプリング（NUS; Non-Uniform Sampling）法が近年注目を浴びており、この技術を新規・既存のパルスシーケンスで設定することにより計測時間の大幅な短縮が可能となる。この様に、計測技術高度化により従来の手法では見られない代謝混合物群中の微量成分やマイナー構造のピークを検出することが可能になりつつあるが、データベースや既往論文に報告の無い海藻類の未知成分を帰属することは容易ではなく、従来の帰属手法に頼らない理論計算に基づく帰属方法の発展が期待されている[3,4]。そこで我々は、既知成分である^{13}C標準試料の混合物を作製し、NUS法を適用した多様なNMR計測法により代謝混合物群の網羅的な計測を行うと共に、それらの官能基結合情報に対してグラフ同型理論に基づいた解析、および各ピークに対して経験的構造予測を行い、混合物ピークの分離および帰属の可能性を検討した。さらに、海藻類の^{13}C標識サンプルを用いて同様のNMR計測・解析を行うと共に、量子化学計算により推定構造の妥当性を検証し、既知および未知成分の帰属を試みた。

不均一サンプリング、安定同位体標識、量子化学計算

○いとうけんご、こまつたかのり、だてやすひろ、きくちじゅん

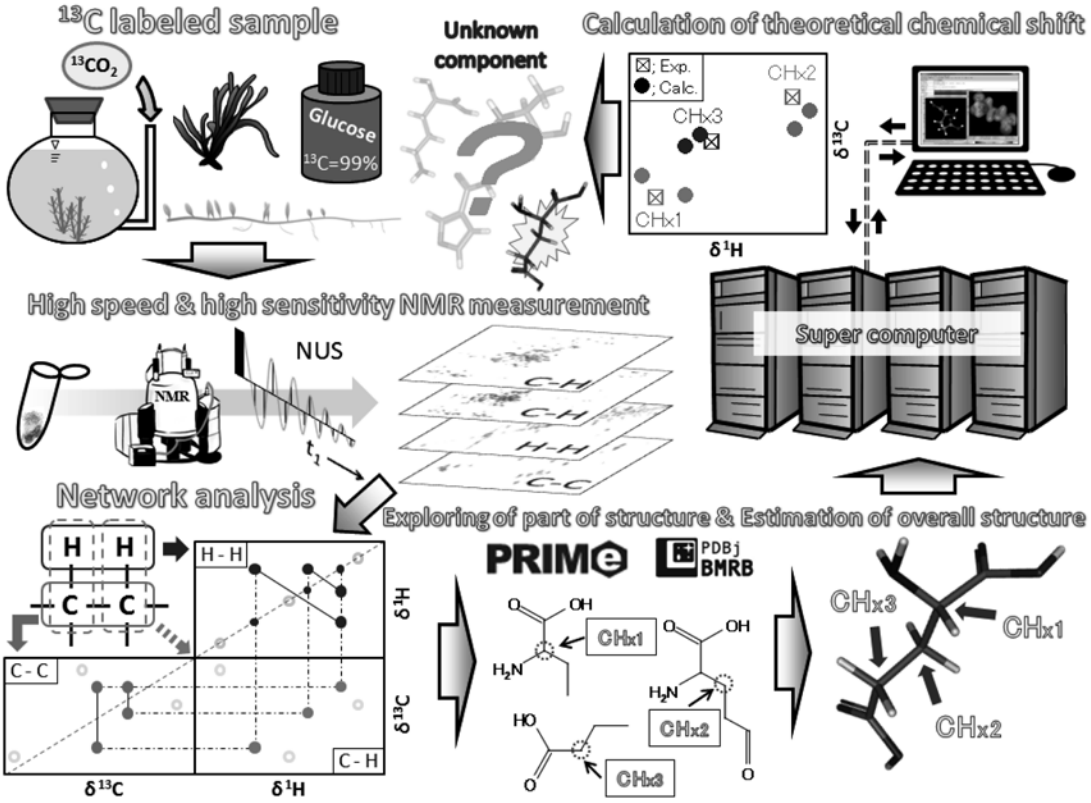


Fig.1 Analytical strategy for assignment of unknown NMR signals. High speed and high sensitivity NMR measurement is possible by using ^{13}C labeled sample with non-uniform sampling method. Bonding information of one metabolite is clustered by network analysis using H-H, C-H and C-C correlation peaks. Estimation of part of structure is possible from database searching, and overall structure is generated by combining parts of structures. Theoretical chemical shift is calculated base on quantum chemistry, and unknown signals are assigned by compare with experimental shift.

【実験方法】

1. ^{13}C標準試料混合物および^{13}C標識海藻サンプルの作製

^{13}C標準試料混合物は、97～99%標識された12個の化合物をKPi/D_2O溶媒中で終濃度1mMとなるように調製した。また^{13}C標識海藻サンプルについては、緑藻類のヘライワズタ(*C. brachypus*)を対象に、$^{13}CO_2$を1Lマリンフラスコ及び60L水槽の海水に常時流入させ、光合成により$^{13}CO_2$を取り込ませることで作製した。^{13}C標識海藻サンプルは凍結乾燥後に粉末化し、メタノールで洗浄後、KPi/D_2O溶媒に溶け込ませ、NMR計測に供試した。また、同位体比計測の結果、NMR計測に使用した海藻の^{13}C標識率は約40%であった。

2. NUS法を適用したNMR計測およびデータ処理

NMR計測は、Bruker社の600MHz（TCIプローブ）にてH-H相関およびC-H相関、500MHz（DCHプローブ）にてC-C相関を検出するパルスプログラムを用いた。各パルスプログラムでは25%不均一サンプリングするように計測した。また、Topspin3.2上でCS法を用いて不連続データの再構築を行い、各計測の相関シグナルをピークピックし、グラフ同型理論に基づくネットワーク解析に供試した。^{13}C標識海藻成分の解析にはBruker社製の700MHz（TCIプローブ）で計測したデータも用いた。

3. ネットワーク解析、構造推定および理論的化学シフトの算出

本研究ではR言語を用いてネットワーク化アルゴリズムの関数化を行った。作成したアルゴリズムを用いて、HSQCのC-H相関シグナルを基準とし、H-H相関およびC-C相関シグナルとのネットワーク理論に基づく解析を行い、化合物の骨格を決定した。また、多次元相関シグナルのネットワーク化により、混合物中における純成分をクラスタ化した。クラスタ化したネットワークの各シグナルに対して当研究室で開発したSpinAssignツール（http://prime.psc.riken.jp/）[5]およびBMRBのデータベース検索を行った。得られた化合物の部分構造をHOSEコード化し、レーベンシュタイン距離によるクラスタ解析およびJavaのCDKライブラリを用いて最大共通部分構造を導くことにより部分構造を予測した。さらに、部分構造を組み合わせることにより全体構造を推定した。推定構造の妥当性を検証するため、MD計算により配座探索を行い、エネルギー的に安定である上位の構造に対して量子化学に基づく化学シフトの理論値を算出した。これらのMD計算では、理研のスーパーコンピュータ RICCに実装されているGaussian09を用い、B3LYP/6-311G^{++**}レベルによって最適化し、化学シフトの理論値はGIAO法を用いて計算し、実験値と比較した。一連の解析スキームをFig.1に示す。

【結果・考察】

1. ^{13}C標準試料混合物のネットワーク解析

^{13}C標準試料混合物を用いて相関シグナルに基づくネットワーク解析の有用性を検証した。NUS法を適用した^{13}C COSYにより4級炭素を含む隣接した炭素、および^{1}H-^{13}C HSQCと^{1}H-^{13}C HSQC-TOCSYにより炭素に直接結合した水素と同一スピン系の水素が検出でき、これらのピークをネットワーク化することにより混合物シグナルの分離と各成分の骨格を知ることが可能である。主要なピークデータに対して、COSYはクロスピーク、COSYとHSQCは閾値内のピーク、HSQC-TOCSYは閾値内のシフト値で帰結するピーク、HSQCとHSQC-TOCSYは閾値内のピークでネットワークを形成させた（Fig.2）。低磁場および高磁場でピークが混在していない領域では容易にネットワークを形成することができ、帰属を行うことが可能であった。δ ^{13}C=50～110ppmのシグナルもネットワークを形成しているが、糖のピークが混在しているため、COSY、HSQCおよびHSQC-TOCSYのみのデータだけでは分離が容易ではない。この問題を解決するため、改良したアルゴリズムと^{1}H-^{1}H相関やDOSY法等のデータも加えた解析を行ったところ、標準混合溶液中に存在する全ての^{13}C標準試料の分離・帰属が可能であった。

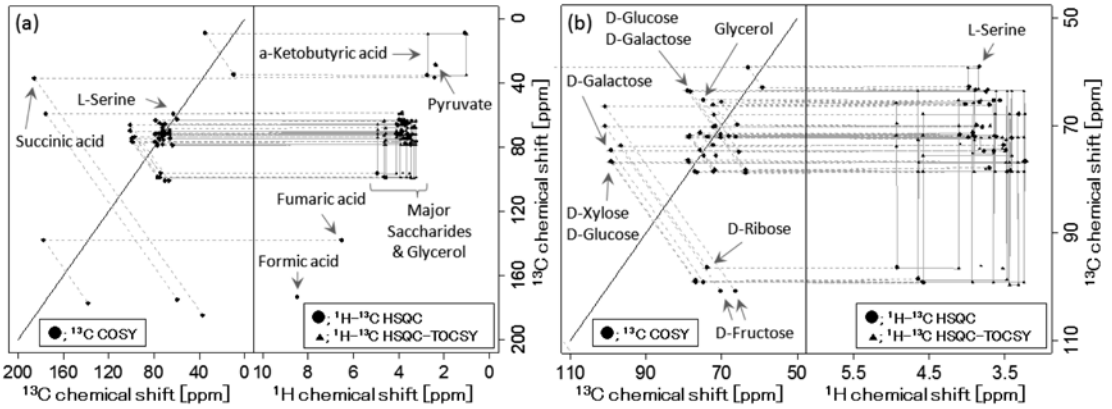


Fig.2 Automatic network algorism of assignments for ^{13}C standard mixture. Entire region (a), and focused region of saccharides peaks (b).

2. ^{13}C標識海藻のシグナル帰属

標識海藻サンプルを用いた多様なNMR計測により、未標識サンプルに比べて高感度に多数の交差シグナルを検出することが可能であった。しかし、3D-HCCH-COSYやINADEQUATEまで計測したにも関わらず、データベース検索による多くの交差シグナルの帰属が困難であったため新規解析手法を適用した。まず、化合物の骨格を知るため、HSQCおよびHSQC-TOCSYのネットワーク解析を行った。帰結する閾値を^{1}H=0.02ppm、^{13}C=0.2ppmとした結果、約70のネットワークがグループ化された（Fig.3a）。その内の1つのネットワークに着目し、3つのHSQCピークの部分構造の予測を行った。各ピークの予測部分構造をSMILESで記述すると、CHx1はO=C(O)C(N)CC、CHx2はO=C(O)C(N)CCC=O、CHx3はO=C(O)CCCとなり、ここから全体構造を予測するとOC(=O)CCC(N)C(=O)Oとなった。さらに、Amber力場でMD計算を行い、約7000構造の全二面角とポテンシャルエネルギーを算出し、自己組織化マップによる解析を行うことで推定された構造の安定配座を探索した（Fig.3b）。上位10個の構造を量子化学計算により理論化学シフト値を予測した結果、配座の違いによりバラつきが見られたが、実測値に近似する値が得られた（Fig.3c）。また、この構造および実測値は、データベース上のグルタミン酸と一致し、理論的な裏付けを行うことが可能であった。

以上のことから、各種計測データを統合的に評価する本手法を用いることで、混合物中の既知物質の網羅的検出と、未知物質の構造推定および未知シグナルの帰属への可能性が示唆された。

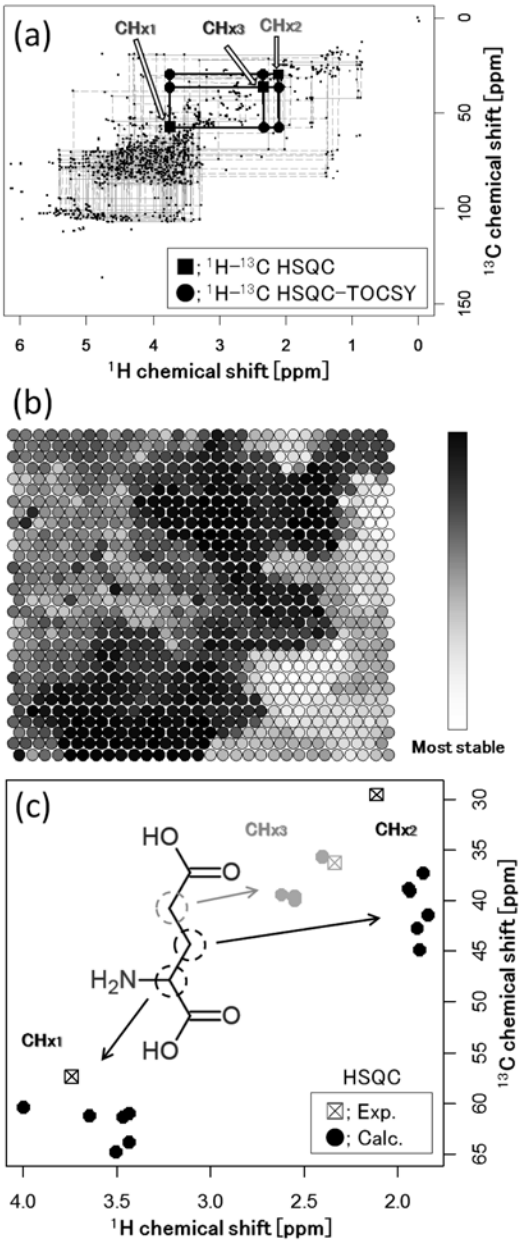


Fig.3 Network analysis for NMR peaks of ^{13}C labeled *C. brachypus* (a). Potential energy map by self-organized map of MD-calculated value (b). Theoretical chemical shift compared with experimental chemical shift (c).

【参考文献】

1. Ito, K., Sakata, K., Date, Y., Kikuchi, J., *Anal. Chem*. **2014**, *86*, 1098–1105.
2. Date, Y., Sakata, K., Kikuchi, J., *Polymer J*. **2012**, *44*, 888–894.
3. 三澤拓真, 伊藤研悟, 菊地淳, *生物工学会誌*. **2014**, *92*, 1–7.
4. Mori, T., Chikayama, E., Tsuboi, Y. *et al*., *Carbohydr. Polym*. **2012**, *90*, 1197–1203.
5. Chikayama, E., Sekiyama, Y., Okamoto, M. *et al*., *Anal. Chem*. **2010**, *82*, 1653–1658.

P91

多核対応型クライオコイル MAS プローブによる NMR 感度向上

水野　敬[1]、戸田　充[1]、藤岡　耕治[2]、竹腰清乃理[3]
[1](株)JEOL RESONANCE, [2](株)クライオウェア,
[3]京都大学大学院理学研究科,

Sensitivity Enhancement of a tunable single-tuned Cryocoil MAS-NMR probe

Takashi Mizuno[1], Mitsuru Toda[1], K. Takegoshi[2], Koji Fujioka[3]
[1] JEOL RESONANCE Inc., [2] Depatrment of Chemistry, Kyoto University, [3] Cryoware Inc.

To realize the effective observation of low-gamma nuclei included in a variety of inorganic solids, we have developed a “Tunable single-tuned Cryocoil MAS probe” which enhances the S/N by 3 to 4-fold compared with the conventional method and enables to switch broadband tuning-range for NMR observation even under refrigerating the detection system. The attained specification, a detailed illustration of tunable system, and the application are discussed.

NMRの感度向上は、根源的な研究開発テーマであり続けている。感度向上に対する装置開発の課題を推進してきたのは、とりもなおさず外場であるNMR用超伝導磁場の強磁場化であり、その効果は、近年、様々なパルスシーケンスの開発と相俟って、無機物の様々な核種に対するNMRの適用可能性を拡大している。外部磁場の強磁場化に加えて感度向上におけるもう一つの重要な課題は検出系にある。NMRを電気回路の視点から見ると、その信号源は試料に由来するインダクタに発生する誘導起電力とみなすことができる一方、主要な雑音源もまた同じインダクタ導体に由来する熱雑音とみなすことができる。したがって、検出系（検出コイル、プリアンプ）を室温からずっと低い温度に冷却することによって、熱雑音を減らし、インダクタ導体の高周波抵抗を低下することができれば、金属3-5倍程度の感度向上ができることは古くから提案・検討され、研究開発が進み、溶液NMRにおいてはいわゆる「クライオプローブ」として確立されるに至っている[1,2,3]。

一方、室温下におけるMAS（マジック角試料回転）を必要とする固体高分解能NMRにおいては、複雑な機械構成と、高い電力照射と送受信切替回路などの技術課題があり、検出系の極低温化に対する研究開発は遅れてきたが、我々は、これらの課題を解決する手段を開発し、「検出コイル（検出系全体）だけを冷却する」という意味を込めて「クライオコイル」MASプローブと名付けた[4,5,6,7]。

今回、我々が紹介するのは、特に無機物固体へのNMRの応用を拡大することを念頭に、低周波多核種や微量試料等に対応した、単核共鳴ながら低温運転下でも広帯域に観測周波数レンジの切替を可能とする「チューナブル機構[8]」を搭載した「多核対応型クライオコイルMASプローブ」試作機である。本試作機と同じ試料量を測定できる市販機（Doty社HXY三重共鳴プローブ）との同一実験条件下における比較試験により、^{6}Liで4.40倍(Figure 1)、^{29}Siで4.45倍(Figure 2)の感度向上率を確認することができた。

当日は、特にチューナブル機構について詳細に論じたい。

Keywords: プローブ、固体NMR、感度向上

○みずのたかし、とだみつる、たけごしきよのり、ふじおかこうじ

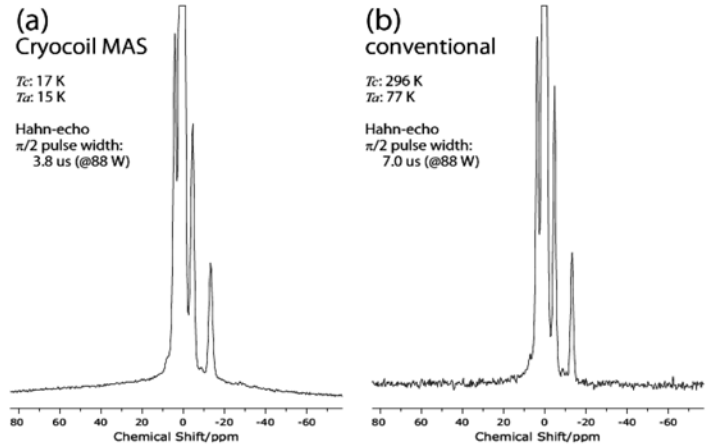


Figure 1. For demonstration of sensitivity enhancement, ^{6}Li MAS-NMR spectra with the same experimental condition obtained by the prototype of tunable single-tuned Cryocoil MAS probe (a), and obtained by the conventional probe (b). The sample is 100%labeled $^{6}LiCoO_2$ with its weight of 170 mg. 16 FIDs are accumulated with the repetition time of 32s and MAS speed of 17.35 kHz. Magnet:14T WB-SCM (JASTEC), Spectrometer: JNM-ECA600. Carrier Freq. (^{6}Li): 88.30 MHz. Each of the coil temperature (T_C), the noise temperature of the pre-amplifier (T_a) and pulse width is shown in each of the spectra.

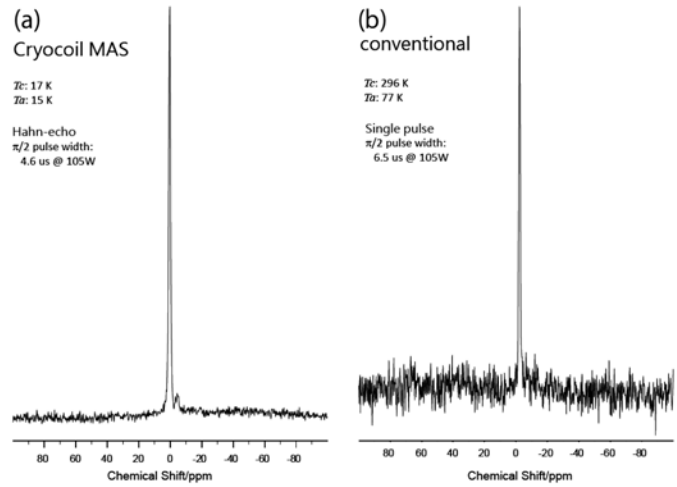


Figure 2. For demonstration of sensitivity enhancement, ^{29}Si MAS-NMR spectra with the same experimental condition obtained by the prototype of tunable single-tuned Cryocoil MAS probe (a), and obtained by the conventional probe (b). The sample is LTA zeolite $|Na_{12}(H_2O)_{27}|_8\ [Al_{12}Si_{12}O_{48}]_8$ with its weight of 50.6 mg. 100 FIDs are accumulated with the repetition time of 22.5s and MAS speed of 16.58 kHz. Magnet:14T WB-SCM (JASTEC), Spectrometer: JNM-ECA600. Carrier Freq. (^{6}Si): 118.30 MHz. Each of the coil temperature (T_C), the noise temperature of the pre-amplifier (T_a) and pulse width is shown in each of the spectra.

References [1]D.I. Hoult et al., JMR 24,71 (1976), [2]J. Lepaisant et al., RSI 55,521 (1984), [3]P. Styles et al., JMR 60,397 (1984), [4]T. Mizuno et al., RSI 79, 044706 (2008) ; JP4933323 B4, US8013608 A1, [5]T. Mizuno et al., RSI 80, 124702 (2009); WO2010-041712 A1 , JP5464445 T2, US13121763 B1, EP09819246.1 A1, [6] JP2012-184530 B1, EP13181388.3 A1, [7] JP2012-184541 B1, EP13181383.4 A1, [8]特許出願準備中

P92

汎用デジタル機器とArduino Dueを用いたデジタルMRIシステムの開発

○津田真人[1] ，玉田大輝[1] , 寺田康彦[1] ， 巨瀬勝美[1]
[1]筑波大学大学院数理物質科学研究科

Development of a Digital MRI System using General Purpose Digital Units and Board Computers “Arduino Due”

○Makoto Tsuda[1], Daiki Tamada[1] ,Yasuhiko Terada[1] ,Katsumi Kose[1]
[1]Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Japan.

Recent developments of digital electronics have achieved high performance and low cost for digital units at the same time. In addition, board computers such as Arduino have enabled developments of digital systems very quick and easy because they have high flexibility and many API functions for programming. In this study we have constructed a digital MRI system using a digital oscilloscope, an arbitrary waveform generator, and 32-bit board computers “Arduino Due” and confirmed its performance using MR imaging experiments at 1.0 T.

【背景・目的】
近年，ハードウェアの高速化に伴い，アナログからデジタルMRIへの移行が進められているが，デジタルMRIシステムの開発には，莫大な開発時間と開発費用を要する．一方，技術の進歩に伴い，デジタルオシロスコープや任意波形発生器などの高性能で低価格な汎用デジタル機器が容易に手に入るようになった．また，高い自由度と多数のAPI関数を兼ねそろえたArduinoの登場により，短時間でシステム構築が可能になった．これらを組み合わせることで開発費用と開発時間を抑えたデジタルMRIシステムが開発できるという発想に至った．

本研究では，汎用デジタル機器であるデジタルオシロスコープと任意波形発生器，Arduinoシリーズの上位機種であるArduino Dueを用いて開発費用と開発時間を抑えたデジタルMRIシステムの開発を行った.ここに，その開発と実験結果について報告する．

【システムの全体構成】
本研究で開発したシステムのハードウェア構成図をFig.1に示す.本システムは, USBポートをもつノートパソコン(Intel Core i5,CPU 2.40GHz)とこれに接続されたデジタルオシロスコープ(PicoTechnology PicoScope 3205B)，任意波形発生器(Elmos AWG-100), Arduino Due(32bit Atmel SAM3X8E(Cortex-M3,84MHz),SRAM 96KB)などからなる.Arduino DueにはDA変換出力端子があり，3台のArduino Dueを同期運転させることで3つの勾配磁場波形出力を行う．

デジタルMRI

○つだまこと，たまだだいき，てらだやすひこ，こせかつみ

また，Arduino Dueのデジタル出力端子からのトリガー信号により，オシロスコープと任意波形発生器を制御する.NMR信号はプリアンプで増幅されたのち，高周波ノイズのエリアジングを防ぐためのバンドパスフィルタを通して，トリガー信号のタイミングごとにサンプリングを行う．パルスプログラマと任意波形発生器とオシロスコープの周波数源の違いによりTRごとに，サンプリングするNMR信号に予測不能の位相シフトが発生する．そのため，NMR信号と任意波形発生器から出力したRFパルスを2ch同時サンプリングし，NMR信号の位相シフトを補正することで位相の再現性を確保した.

本システムでは，勾配磁場波形とRFパルス波形の生成，オシロスコープの制御はWindows7上のQt5.3.0(C/C++)を用いて開発した.Arduino Dueの制御プログラムはArduino IDE 1.5.7 BETA，位相検波と画像再構成はMatlab2011aを用いて開発した.

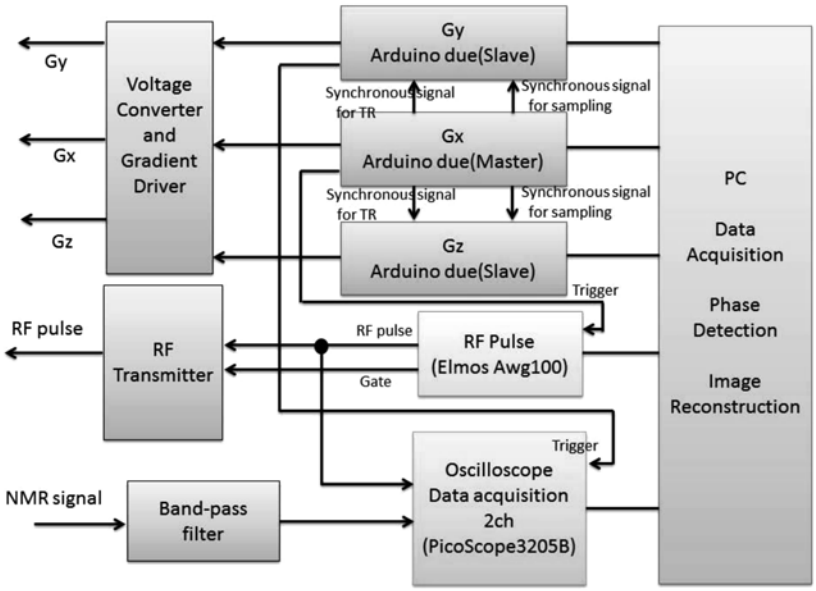


Fig. 1 System block diagram of the MRI pulse programmer and RF pulse, data acquisition system

【送信系の構成】

本システムの送信系はRFパルスを発生する任意波形発生器AWG100と勾配磁場波形を制御する3台のArduino Dueからなる.任意波形発生器をFig.2, Arduino DueをFig.3に示す．AWG100の最大サンプリング周波数は100MHzである．したがって，ナイキストサンプリングを行う場合には，約1.17T以下の磁石に対応している．勾配磁場波形を制御するArduino Dueは3台を同期運転させることで3つの勾配磁場波形を制御した．それぞれのArduino Dueはマスターとスレーブに分かれており，マスターはタイマー割り込みによってTRを制御する．また，TRの割込みごとにサンプリングのタイマー割り込み（多重割り込み）させることで，サンプリングのタイミングを正確に制御する．マスターのTRとサンプリングの割込みが発生するタイミングで同期信号を出力し，スレーブに外部同期信号として入力することで，同様にTRとサンプリングのタイミングを正確に制御する．

Fig. 2 AWG-100
Reprinted from [3]

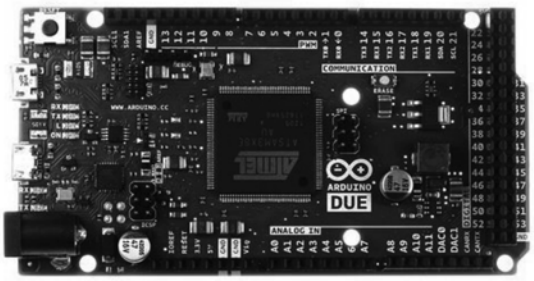


Fig. 3 Arduino Due
Reprinted from[4]

【受信系の構成】プローブによって検出され，増幅された NMR 信号は Fig.1 のように，バンドパスフィルタを通してオシロスコープでダイレクトサンプリングされる．サンプリング時に混入する高周波ノイズは画像の SN 比を下げるため，バンドパスフィルタで高周波ノイズのエリアジングを防ぐ．Fig.4 に使用したオシロスコープである PicoScope3205B を示す．2ch サンプリング時の最大サンプリング周波数は 500MHz で，分解能は 8bit である．高周波ノイズがカットされた NMR 信号と位相補正のための RF パルスを送信系からのトリガー信号のタイミングでサンプリングを行う．

NMR 信号の周波数は磁石の磁場強度に依存するため高磁場 MRI ではサンプリング定理を満たすサンプリングはしばしば困難になる．また，サンプリング定理を満たすサンプリングが可能であっても，それに伴う，サンプル数の増大は AD 変換後の信号処理の速度を著しく低下させる．したがって，本システムは，ナイキスト周波数以下のサンプリングするアンダーサンプリングを用いることで，高周波の NMR 信号のサンプリングと AD 変換後の処理を高速化している．

Fig. 4 PicoScope3205B
Reprinted from[5]

【撮像実験】

本実験では，静磁場強度 1.0T の永久磁石を用いた．撮像ファントムは Fig.5.に示すようなガラス試料管（内径 28.8mm，外形 30.0mm）内にガラスキャピラリ(内径 2.0mm，外形 2.5mm)を入れて硫酸銅水溶液を満たしたファントムである．TE=11.9msec のスピンエコー法でスライス撮像を行った．スライス厚 5mm，FOV=35mm，TR=400msec，Matrix size=256×256 である．サンプリング周波数は 6.9MHz のアンダーサンプリングで画像再構成を行った．

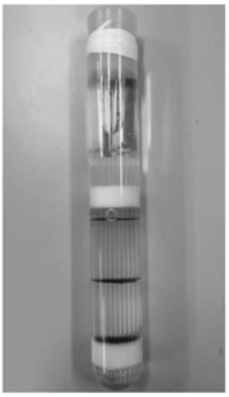


Fig. 5 Water phantom

【撮像結果】

得られた再構成画像を Fig.6 に示す. また, 位相補正しない場合の再構成画像を Fig.7 に示す．Fig.7 は位相エンコード方向にゴースト状のアーチファクトを形成し，画像が大きく劣化している．しかし，Fig.6 ではゴースト状のアーチファクトが改善していることがわかる．

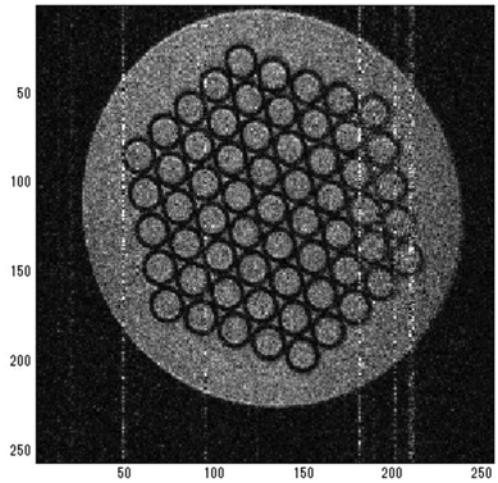


Fig.6. With phase correction

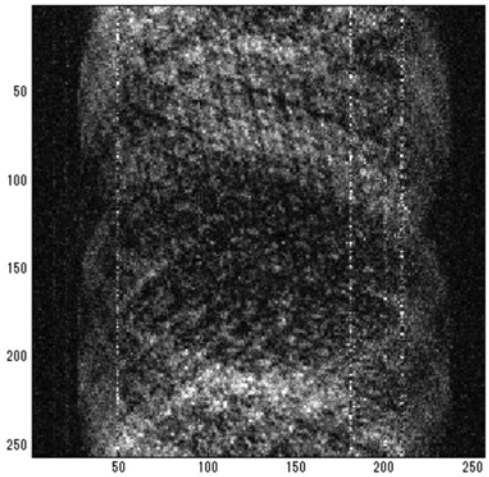


Fig.7 Without phase correction

【むすび】

本研究において，汎用デジタル機器であるデジタルオシロスコープと任意波形発生器，ボードコンピュータ Arduino Due を用いて，開発費用と開発時間を抑えたデジタル MRI システムを開発した．また，撮像実験を行うことで明瞭な画像の取得が可能であることを確認した．

Arduino Due はエンジニア以外にも扱える手軽さと従来の PIC マイコンのような高い自由度を兼ね揃えているため，一部の機能を Arduino Due で開発することで，開発時間を犠牲にすることなく，開発を行うことができた．

今後は，ユーザーインターフェースを改良して，シーケンスの開発を容易し，16bit 分解能をもつデジタルオシロスコープで撮像を行い，量子化ノイズの改善などを行う予定である．

【参考文献】

[1] Pablo Pe’rez.,Andre’s Santos.
Undersampling to acquire nuclear magnetic resonance images
Medical Engineering & Physics 26(2004) 523

[2] Pascal P. Stang, Steven M. Conolly, Juan M. Santos, John M. Pauly, and Greig C. Scott
Medusa: A Scalable MR Console Using USB
IEEE Trans Med Imaging. Feb 2012; 31(2): 370–379.

[3] http://elmos.jp/manual/AWG100Manual.pdf

[4] http://arduino.cc/en/Main/arduinoBoardDue

[5] http://www.picotech.com/computer-oscilloscope.html

P93 水素吸蔵コバルトにおけるゼロ磁場^{1}H NMR信号の探索

○佐竹晋太朗，竹腰清乃理，野田泰斗，武田和行
京都大学大学院理学研究科

A Search for Zero-Field ^{1}H NMR Signals in Hydrogen Absorbed Cobalt

○Shintaro Satake, K. Takegoshi, Yasuto Noda, and Kazuyuki Takeda
Graduate School of Science, Kyoto University

The nucleus of cobalt (^{59}Co) possesses spin (I = 7/2), and is NMR-active. In cobalt metals, which is known to be ferromagnetic, the ^{59}Co nuclei experience considerable internal magnetic field, so that NMR signals can be observed even in the absence of an externally applied magnetic field. In this work, we study on the internal field that proton spins feel in hydrogen absorbed cobalt. To cover a wide range of frequencies without changing the circuit configuration, an untuned coil is employed.

【序論】

^{59}Co はスピン I = 7/2 で NMR 活性な核である。金属コバルトは強磁性体であるため、核の位置に強力な内部磁場を生じ、外部から磁場を加えることなしに NMR 信号を観測できることが知られている[1]。本研究では、水素が吸蔵されたコバルト中でプロトンが内部磁場を感じているのかどうかを調べることを目的とする。サンプルとして、アルミニウムとコバルトの合金であるラネーコバルトを、水酸化ナトリウムによってアルミニウムを選択的に溶解除去し、水素吸蔵コバルトを作成した。共鳴周波数が未知であるプロトン信号をできるだけ広い周波数帯域で探索するために、超広帯域プローブを作製してゼロ磁場 NMR 実験を行った。

【広帯域プローブ作製】

本研究で用いた広帯域プローブは、先行研究において Webber が考案したもの[2]を模範としており、伝送線路の原理を利用している。以下にその具体的な作製方法を示し、Fig.1に完成後のプローブを示す。

1. 内径/外径が4.2/5.0 mmのガラス管に導線を10回巻き、ソレノイドコイルを作った。
2. コイル表面が滑らかになるように巻き線間のスペースをエポキシ接着剤で埋め固めた。
3. ソレノイドコイルの両端を、アルミ製の円盤に取り付けた二つのSMAレセプタクルにそれぞれはんだ付けし、一方の端には50Ωターミネーターを装着した。
4. ソレノイドコイル表面の中央部分に銅箔リボンを接着し、他端を接地した。
5. 回路の通過状態をモニターしながら所望の周波数領域での吸収の応答がおおよそフラットになるまで、コイル表面に導電性塗料を塗り広げた。

ゼロ磁場NMR，水素吸蔵コバルト，超広帯域NMR

○さたけしんたろう，たけごしきよのり，のだやすと，たけだかずゆき

【実験】

Fig. 2に測定に用いた非共振回路のブロック図を示す。スピンエコー法を用い、20-500MHzの周波数範囲で測定した。

Fig. 1. A transmission line probe assembly with a 5.0 mm diameter coil.

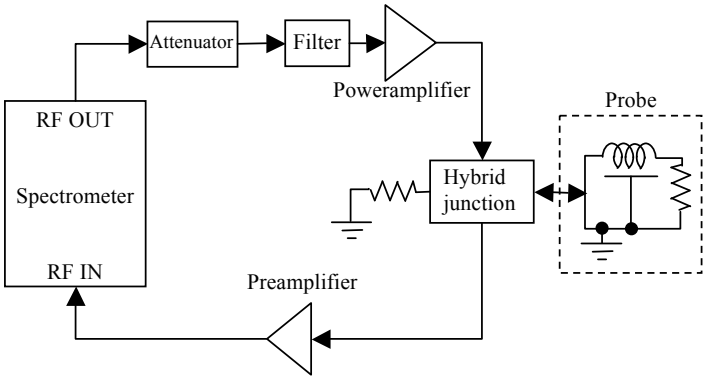


Fig. 2. A block diagram of the experimental setup for wideband zero-field NMR measurements.

【結果と考察】

Fig.3に測定結果のスペクトルを示す。試料はそれぞれ、(a)単体コバルト、(b)ラネーコバルトを2 M水酸化ナトリウム水溶液でアルカリ処理した水素吸蔵コバルトであり、(a)、(b)の測定は同条件で行った。(a)では、先行研究[1]で示されている通り、213 MHzにfcc Coの強い信号がみられ、また、217-219 MHzには層欠陥をもつfcc Coに帰属されるピーク[3]も見られた。一方(b)でも、fcc Coのピークが見られたもののその強度は1/10程度と小さく、またこの周波数帯域でのプロトンの信号と思われるものは観察できなかった。可能性として考えられるのは、①この周波数帯域内では共鳴していない。②プロトンがコバルトの内部磁場を感じる位置に存在していない。③シグナル小さく、ノイズに隠れている。④最適なパルス幅が違う。の４点である。改善点として、500MHz以上の周波数帯域での測定、ラネーコバルトのアルカリ処理の条件を改良することが考えられる。

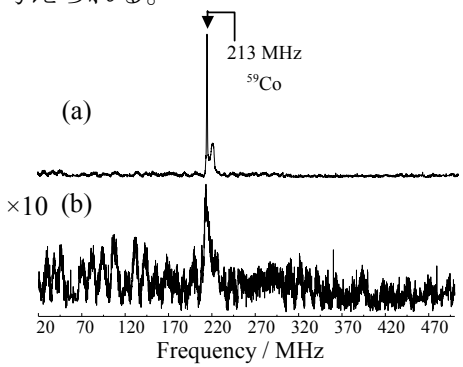


Fig. 3. ^{59}Co zero-field NMR spectra of (a) cobalt powder and (b) hydrogen absorbed cobalt. The intensity of spin echoes is plotted as a function of the carrier frequency.

【参考文献】

[1] A.C. Gossard and A.M. Portis, Phys. Rev. Lett. 3, 164 (1959).
[2] I.J. Lowe and M. Engelsberg, Rev. Sci. Instrum., 14, 1159 (1981).
[3] J. Sort, et al., Phys. Rev. B 68, 014421 (2003).

P94

ダイヤモンドスピンを用いた生体内ジャイロセンシング技術の開発

○久美屋　雄太[1]，五十嵐　龍治[1]，杉　拓磨[2,3]，外間　進悟[1]，杤尾　豪人[1]，吉成　洋祐[2]，原田　慶恵[2]，白川　昌宏[1,2]
[1]京大院・工，[2]京大・iCeMs，[3] JST，さきがけ

Nanoscale gyroscope for measurements of cellular dynamics *in vivo* using diamond spins

Yuta Kumiya[1], Ryuji Igarashi[1], Takuma Sugi[2,3], Shingo Sotoma[1],
Hidehito Tochio[1], Yohsuke Yoshinari[2], Yoshie Harada[2], Masahiro Shirakawa[1,2]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University, Japan*
[2]*Institute for Integrated Cell-Material Sciences(WPI-iCeMS), Kyoto University, Japan,*
[3]*JST, PRESTO, Japan*

Nitrogen-vacancy centers (NVCs), lattice defects in fluorescent nanodiamond (FND), are known to have an electron spin-triplet ground state, and exhibit extraordinary photostable fluorescence signals even in ambient conditions. Because the fluorescence intensity depends on the spin state, electron spin resonance measurements of NVC can be performed with significant sensitivity by monitoring the fluorescence signals. In this work, we focused on this property of NVC and established a method of “nanoscale gyroscope”. Our method enables quantitative measurements of rotational dynamics of FNDs by measuring the Zeeman effect, which depends on the relative orientation of NVCs to external magnetic fields. Here we show that the nanoscale gyroscope can be used for the determination of attitude of 200-nm FNDs with an angular precision of ±3°and the measurements of the dynamics of nanodiamond *in vivo* and in cell.

【緒言】

蛍光性ダイヤモンドナノ粒子(Fluorescent Nanodiamond: FND)が生体計測プローブとして注目されている。FND内に存在する格子欠陥である窒素－空孔中心(NVC: Nitrogen-Vacancy Center)は三重項電子スピンをもち、室温で安定な蛍光を呈する。またNVCの蛍光には、蛍光遷移とスピン状態との間に特有のカップリングが存在し、この性質を利用することで蛍光を通してNVCのスピン状態を計測することが可能である。この計測は光検出磁気共鳴(Optically

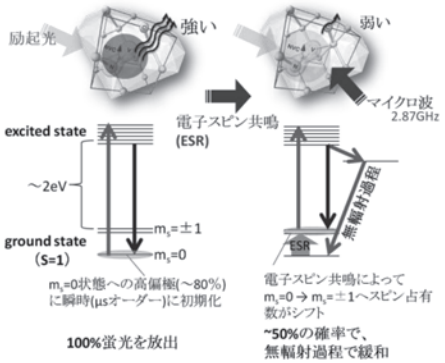


Fig 1. NVC の 2 つの遷移過程

キーワード:光検出磁気共鳴，ダイヤモンド，*in vivo*イメージング

○くみやゆうた，いがらしりゅうじ，すぎたくま，そとましんご，とちおひでひと，よしなりようすけ，はらだよしえ，しらかわまさひろ

Detected Magnetic Resonance: ODMR)と呼ばれ、超高感度の電子スピン共鳴計測が可能となる。FNDのODMR計測を生体イメージングに応用することで、生体分子の構造・動態変化をナノ～サブミクロンのスケールでその場観察できると期待できる。本研究では、生体内における一分子の回転運動やねじれなどの構造変化をリアルタイムで計測する技術の実現を目指し、FNDの回転運動の定量計測手法「ナノジャイロセンシング技術」を開発した。発表では、開発したナノジャイロセンシング技術と、本技術を*in vivo*およびin cellにおける動態計測に応用した実験について報告を行う。

【実験と結果】

(1) ナノジャイロセンシングの検証

カバースリップ上のFND(～200nm)について異なる四方位の外部磁場中でODMRスペクトルを取得し、FNDの姿勢決定を行った。その結果、8秒(34 秒)の露光時間で、それぞれ±5°(±3°)の角度精度が得られることを確認した。

(2) *in vivo*ジャイロセンシング

*C. elegans*の腸管内に摂食によりFND(～200nm)を導入し、FNDの姿勢を5分おきに決定した。2時間計測を続けた結果、腸管内においてFNDが一軸性の回転運動をしていることが観察された(Fig 2)。また、セロトニン(5-HT)投与によって腸周囲の筋肉活動を抑制した個体と、筋肉の周期運動が抑制された遺伝子変異体(*itr-1(sa73)*)を用いた測定でも一軸性の運動が保存された。

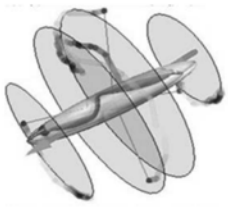


Fig 2. *C. elegans* 腸管内の FND の運動観察

(3) in cellナノジャイロセンシング

A431細胞膜上の上皮成長因子受容体を抗体修飾FNDで標識し、25秒おきにFNDの姿勢を決定することで細胞膜の運動性を計測した。更に、同様の計測を、アクチンフィラメントの重合を促進するEGF、またはアクチンフィラメントを破壊するLatrunculin Aで処理したA431細胞についても行った。その結果、細胞膜の運動性が細胞辺縁の細胞骨格の状態と負の相関があることが観測された(Fig 3)。

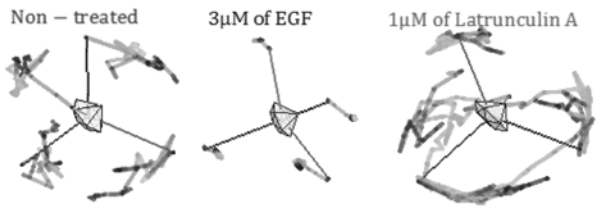


Fig 3. 細胞骨格の状態と FND の運動性

【結論と今後の展望】

開発したナノジャイロセンシング技術によって*in vivo*、in cellの系において回転運動を高精度（±3°）に計測できることが示せた。実験で用いたFNDは粒径～200nmのFNDであるが、5-50nmのFNDでも同様の精度で計測できることを確認している。本手法を用いることにより、既存の蛍光観察では計測が困難であるナノメートル～サブミクロンスケールの構造・動態変化を計測することが可能になると考えられる。課題は、数秒以上を要する計測時間である。分子構造の変化をリアルタイムで追跡するには秒を切る時間分解能が必要となる。今後は、装置や解析方法の検討により計測の高速化を行っていく。

P95

Thermal Stability of Acyl Carrier Protein from *Escherichia coli* And Its Metal Binding Sites

Min-cheol Jeong, YoungGeun Park, Hee-sang Song, Ki-woong Jeong and Yangmee Kim*

Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Acyl carrier protein (ACP) is a highly conserved carrier of acyl intermediates for type II fatty acid synthesis (FAS II). ACP is a small acidic protein with a molecular mass of ~9 kDa. The overall structure of *E. coli* ACP consists of four α-helices connected by three loops. In the presence of divalent cation, apo-ACP shows only one conformation, while holo-ACP shows two sets of resonances, suggesting that two conformers are in dynamic equilibrium. Since ACP is highly acidic, binding of divalent metal ion can stabilize the folding of ACP. However, there are no differences of secondary structures of *Ec*ACP with or without metal ions, whereas *Ec*ACP without metal ion has lower melting temperature compared to ACP with metal ion. In order to determine metal binding sites and investigate the thermal stability of *Ec*ACP and its mutants, we measured melting temperatures using circular dichroism (CD) spectroscopy. We performed multidimensional heteronuclear NMR experiments and completed the resonance assignments of ACP and its mutants. Two metal binding sites were deteremined, one near Asp31 and Asp35, the other near Glu47 and Asp56.

Acyl Carrier Protein, Resonance Assignment, Metal Binding Sites

P96

エリ蚕絹を用いた再生医療材料開発のための NMR構造解析

○河西秀和[1]・鈴木悠[2]・山崎俊正[3]・齊藤準[4]・朝倉哲郎[1]
[1]農工大院工、[2]福井大テニュアトラック推進本部、[3]生物研
[4]京都工繊大工芸科学

NMR structure analysis of *S.c.ricini* silk fibroin for tissue engineering

○Shuto Kawanishi[1], Yu Suzuki[2], Toshimasa Yamazaki[3], Hitoshi Saito[4], Tetsuo Asakura[1]
[1]Dept. Biotech., Tokyo Univ. of Agri. & Tech., [2]Tenure-Track Promotion Headquarters, Fukui Univ., [3]Nati. Inst. Agrobio. Sci., [4]Dept. Appl. Bio., Kyoto Inst. of Tech.

Recently, *S.c.ricini* silk fibroin has been used as excellent biomaterials as well as *B.mori* silk fibroin and therefore it is important to characterize the structure and structural transition in detail. In this study, both solution and solid state NMR was used for the purpose. At first, the structure of *S.c.ricini* liquid silk extracted from the silk gland was determined. The primary structure is block of polyalanine and glycine-rich region. The sequence …YGGDGG $(A)_{12}$GGAG… is one of the most frequently appeared sequences. Therefore, the solution structure was determined from ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N chemical shift data and TALOS-N program together with temperature coefficients of HN chemical shift. Then, the structural transition of *S.c.ricini* silk fibroin was monitored by solid state NMR. Several approaches to use the silk fibroin for tissue engineering were tried on the basis of merit of NMR spectroscopy.

【緒言】縫合糸として用いられてきた絹フィブロインは、現在、再生医療材料として注目を集めており、多くの応用研究がなされてきている。主に用いられるのは、よく知られている家蚕絹フィブロインであるが、自然界には、他に多様性に富んだ野生の蚕が存在する。それらの絹フィブロインは、家蚕絹フィブロインとは異なる物性や機能性を有しており、新たな再生医療用素材として注目される。

その中で、インド原産のエリ蚕(*S.c.ricini*)の絹フィブロインは、Ala連鎖部分(平均12残基)とGly rich部分が交互に繰り返された配列である。家蚕絹フィブロインとはGlyとAlaが多い点では類似しているが、Ala含量がより多く、蚕体内ではAla連鎖部分がα-helix構造を形成している[1]。そして、吐糸過程では脱水とともにずり応力や延伸力が作用し、Ala連鎖部分はβ-sheet構造を形成、繊維化が起こる。家蚕絹フィブロインは、繭から容易に水溶液とすることができるが、エリ蚕絹フィブロインの場合は、Ala連鎖部分が強固なβ-sheet構造となり、水溶液の作成は容易ではない。

本研究では、まずエリ蚕体内から直接摘出した液状絹を用いて、典型的な連鎖部分、…YGGDGG$(A)_{12}$GGAG…について構造を決定した。続いて固体NMRを用いて、その構造転移に関する研究を行った。さらに含水状態でのNMR研究を行い、それらの知見を合わせて、再生医療材料としてのエリ蚕絹フィブロインの構造情報を集積した。

S.c.ricini silk fibroin, NMR structure analysis, Tissue engineering

○ かわにししゅうと、すずきゆう、やまざきとしまさ、さいとうひとし、
あさくらてつお

【実験】5齢5日目以降のエリ蚕幼虫を開腹して絹糸腺を摘出し、蒸留水中に静置、絹糸腺から漏出した液状絹を回収した。NMRはBruker Avance 750MHzを使用した。H_2Oシグナルの除去はwater gate法を用いた。一次元^{1}H NMR測定は5~40°C で5°C刻みの8点、二次元^{1}H-^{1}H TOCSY、NOESY測定は10~40°Cで10°C刻みの4点で行った。その他に10°Cで二次元^{1}H-^{13}C HSQC、^{1}H-^{15}N HSQCを測定、帰属と化学シフト値を決定した。着目した残基と前後の残基の^{1}H,^{13}C,^{15}N化学シフトからNIHのTALOS-Nプログラム[2]を用いて、Ala連鎖部分と近傍残基の内部回転角を決定、構造モデルを作成した。構造転移に関する試料調整や固体NMR測定等に関しては、ポスター発表時に述べる。

【結果・考察】典型的な連鎖部分…YGGDGG(A)$_{12}$GGAG…について、Hα/HNならびにHN/HN領域のTOCSYおよびNOESYを用い、Ala連鎖部分のN末端近傍YGGDGGAおよびC末端近傍AGGAGについて、^{1}HNMRの連鎖帰属を行うことができた。

次に、HN化学シフトの温度依存性を測定した(Fig.1)。エリ蚕絹フィブロイン中で孤立したAla残基(Ala(coil))は温度上昇に伴って水素結合が切れ、高磁場シフトする。そのシフト量は、室温で概ねrandom coil構造をとる家蚕絹フィブロインの場合と同等である。一方、Ala連鎖部分のN端側は、温度上昇に伴い、わずかに高磁場シフト、C端側に至っては、低磁場シフトする。これは、Ala連鎖部分が形成しているα-helix構造において、前の残基のアミド平面の磁気異方性効果[3]によって、着目したHNピークがもともと高磁場にシフトしているため、α-helix構造が壊れ、その高磁場シフトの要因がなくなることによる低磁場シフトと温度上昇に伴う高磁場シフトが打ち消し合うためである。これらの解析を基に、Ala連鎖部分近傍の水素結合形成について議論を進めた。

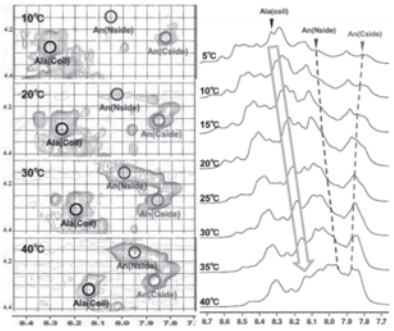


Fig.1 (a) Ala HN/Hα regions of TOCSY spectra at 10, 20, 30, 40°C and (b) NH regions of ^{1}H NMR spectra at 5-40°C in 5°C increments of *S.c.ricini* liquid silk.

また、各アミノ酸残基の化学シフトからTALOS-Nプログラムを用いて、各残基の内部回転角(ϕ,ψ)を、典型的な連鎖部分…YGGDGG(A)$_{12}$GGAG…について求め、構造モデルを作成した(Fig.2)。

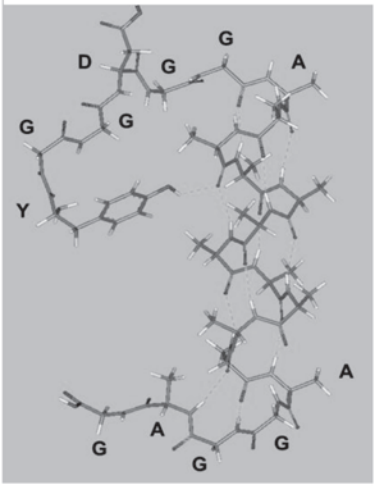


Fig.2 The structure of one of the most frequently appeared sequences …YGG DGG (A)$_{12}$GGAG… in *S.c.ricini* silk fibroin determined by solution NMR.

エリ蚕絹フィブロインの構造転移や含水状態でのNMR研究については、ポスター発表時に述べる。

【謝辞】本研究は一部、農林水産省「アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト」ならびに、科学研究費基盤研究A(23245045,26248050)および挑戦的萌芽研究(2562169)により、実施された。

【参考文献】

1) Asakura, T.; Murakami, T. *Macromolecules* **1985**, *18*, 2614-2619.
2) Shen, Y.; Bax, A. *J. Biomol. NMR* **2013**, *56*, 227-241.
3) Asakura, T.; Taoka, K.; Demura, M.; Williamson, MP. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 227-236.

P97

Solution Structure and Backbone Dynamics of the Cold Shock Protein from Thermophilic Bacterium, *Thermus aquaticus*

Bonghwan Jin, Ki-Woong Jeong, and Yangmee Kim*
Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk university, Seoul 143-701, Korea

The thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* is a well-known source of Taq polymerase. Here, we studied the structure and dynamics of the *T. aquaticus* cold-shock protein (*Ta*-Csp) to better understand its thermostability using NMR spectroscopy. We found that *Ta*-Csp has a five-stranded β-barrel structure with five salt bridges and a higher melting temperature of 76°C compared to mesophilic Csps. *Ta*-Csp has a more rigid structure with slow motions mainly on the nucleic acid-binding residues. Upon binding heptathymidine (dT_7), heteronuclear NOE values and order parameters of residues in surface loop regions dT_7 binding sites increased dramatically. Moreover, Carr-Purcell-Meiboom-Gill experiments showed that slow motions observed for the dT_7 binding residues K7, W8, Y15 and F17 disappeared in *Ta*-Csp-dT_7. Microsecond to millisecond time scale exchange processes occur only at the β1-β2 surface region of the nucleic acid binding site with an average conformational exchange rate constant of 674 s^{-1}. The structural rigidity due to intensive hydrophobic core packing, five salt bridges, and relatively shorter surface loops are likely the key factors in the thermostability of *Ta*-Csp. The results imply that thermophilic *Ta*-Csp has a more rigid structure and may not need high structural flexibility to accommodate nucleic acids upon cold shock compared to its mesophile and psychrophile counterparts.

Thermus aquaticus cold shock protein, structure, backbone dynamics

P98

Structure and Dynamics of *Enterococcus faecalis* Acyl Carrier Protein

Young-Guen Park, Mincheol Jeong, Ki-Woong Jeong, Yangmee Kim*
Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk university, Seoul 143-701, Korea

Fatty acid synthesis is essential for cell growth and viability. The Acyl Carrier Protein (ACP) is a key element in the biosynthesis of fatty acids being responsible for the acyl group shuttling and delivery within a series of related enzymes.*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) is a Gram-positive, commensal bacterium inhabiting the gastrointestinal tracts of humans and other mammals. *E. faecalis* can cause life-threatening infections in humans, especially in the hospital environment. *E. faecalis* can withstand oxidative stress, dry condition, and extremes of temperature and pH. In this study, structures of *Ef*-ACP as well as thermal stabilities of *Ef*-ACP were investigated. CD experiments showed that melting temperature of *Ef*-ACP is 78°C, which is much higher than that of *E.coli* ACP (68°C). We determined the solution structure of *Ef*-ACP. The overall structure consists of four α-helices (helix I (3-17), helix II (39-53), helix III (59-64), helix IV (68-78)) connected by three loops. Phe45 in *Ef*-ACP has stacking interactions with His17 and Phe18, which are essential for the thermal stability of *Ef*-ACP. Stacking interactions between Phe45and and Phe18 contribute to the thermal stability of *Ef*-ACP by stacking interactions and they block the path into the alternate binding cavity of *Ef*-ACP which accommodate the growing acyl chain. Spin relaxation experiments werer performed and the dynamics of *Ef*-ACP will be discussed. This study will be helpful to understand the specific recognition mechanisms between *Ef*-ACP and functionally different enzyme partners in fatty acid synthesis pathway.

Enterococcus faecalis Acyl carrier protein, Structure, Dynamics

P99

Backbone Resonance Assignment and Thermal Stabilities of Angiogenin and its Mutnats

Hyun-Sung Park, Young-Guen, Yangmee Kim*
Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk university, Seoul 143-701, Korea

Angiogenin is a potent inducer of blood vessel formation and is overexpressed in many cancer cells. It is a member of the pancreatic RNase superfamily. Angiogenin has 33% sequence identity with RNase A. All RNases family proteins except angiogenin and turtle RNase have four disulfide bonds.BovineAngiogenin (bAng) has three disulfide bonds, [C27-C82], [C40-C93], and [C58-C108], respectively. Angiogenin has a weak ribonucleolytic activity that is essential for angiogenicity. Although the structure of angiogenin is very similar to that of RNase A, angiogenin contains unique functional features that account for its angiogenesis while RNase A does not have angiogenic activity.To compare properties between wild type bAng and mutants without disulfide bond, recombinant des mutants by replacement of cysteines with serines was cloned, expressed, and purified. Three-dimensional heteronuclear NMR experiments for ^{15}N and/or ^{13}C-isotope labeled angiogenin and its mutants were performed and the backbone resonance assignment was done. From NMR and CD experiments, we confirmed that deletion of [C40-C93] disulfide bond does not affect the overall folding of angiogenin while local structural stability of bovine angiogenin near the nuclear localization site and ribonucleolytic active site was affected. Based on this assignment, dynamics of angiogenin and its mutants will be investigated.

Angiogenin, Des mutant, Backbone assignment

P100 The Characteristic Hinge Region in a Hybrid Antimicrobial Peptide, PapMA-P2, and Its Peptoid Analogs

Areum Shin, Eunjung Lee, and Yangmee Kim*
Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk university, Seoul 143-701, Korea

Antimicrobial peptides are essential components of the innate immune systems in their host. Papiliocin isolated from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*, is a 37-residue antimicrobial peptide. Magainin 2 isolated from the skin of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, is a 23-residue antimicrobial peptide. We tested a 18-residue hybrid peptide, PapMA-P2, incorporating 1-8 residues of papiliocin and 4-12 residues of magainin 2 in a variety biological and biophysical assays. We found that PapMA-P2 had a broad spectrum of antimicrobial activities and anti-inflammatory activities in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. To develop a peptide with lower toxicity against mammalian cells, we designed peptoid residue-substituted peptides, PapMA-P2-a, PapMA-P2-k, and PapMA-P2-l, in which Pro^9 of PapMA-P2 was replaced with Ala, Lys, and Leu peptoid residue. PapMA-P2-k with $Nlys^9$ has lower cytotoxicity against mammalian cells than PapMA-P2 and the other peptoid analogs. The tertiary structures of PapMA-P2 and PapMA-P2-k in DPC micelles were determined by NMR spectroscopy. PapMA-P2 has a rigid bent structure at Pro^9 whereas PapMA-P2-k shows two sets of resonances and exists in a dynamic equilibrium of cis and trans conformers with a flexible hinge structure at $Nlys^9$. Depolarization of the membrane potential and confocal laser-scanning microscopy study revealed that PapMA-P2-k effectively penetrated the bacterial cell membrane and accumulated in the cytoplasm, whereas the bactericidal mechanism of PapMA-P2 is to permeate the bacterial cell membrane. Relationship between structure and activity of these peptides will give insights to understand its mechanism of actions and help to develop more potent peptide antibiotics as useful therapeutic agents.

Hybrid Antimicrobial peptide, Peptoid residue, NMR, Structure

キーワード検索
著者検索

Keyword Index
Author Index

キーワード検索

数字・記号

^{133}Cs NMR ····· P68
^{13}C NMR ····· SL3-8
^{13}C PST-MAS NMR ····· P70
^{13}C selective HMBC ····· L3-10
^{13}C 検出型解析 ····· P84
^{13}C 磁化移動 ····· SL1-8
^{19}F-NMR ····· P36
^{1}H chemical shift anisotropy ····· P46
1粒子イメージング ····· L1-2
^{207}Pb ····· P72
^{23}Na NMR ····· P73
^{29}Si核の緩和時間短縮 ····· P65
^{2}H NMR ····· P78
2次元同種核相関法 ····· L1-5
^{33}S NMR ····· P64
3D NOESY ····· P25
$^{3}J_{C'C'}$-coupling ····· SL3-4
ω-Agatoxin IVA ····· P28

アルファベット

A

Acyl Carrier Protein ····· P95
amyloid beta ····· P23
amyloid fibrils ····· P12, P16
Angiogenin ····· P99
aromatic side-chain dynamics ····· P30

B

Backbone assignment ····· P99
backbone dynamics ····· P97
Bacteriorhodopsin ····· P41
Bayesian inference ····· P89
BioMagResBank ····· P87
BIOREACTORシステム ····· P5
BOLD ····· P76
Bombyx mori silk fibroin ····· L1-7, P54
Boundary lipid ····· P41
Broad Band(BB)-WET ····· P2
β-sheet structure ····· L1-7, P54

C

calbindin D_{9k} ····· P5
Carbon dioxide ····· P59
CBV ····· P76
CCR2/CCR5 ····· L3-4
Chemical Shift ····· L3-9
Chemical shift anisotropy ····· P41
chemical shift degeneracy ····· SL3-4
chemical shift tensor ····· P42
compressed sensing ····· P88
Conformational Entropy ····· L3-3
Crude drug ····· P56
Curie law ····· L2-6
CYANA ····· P89

D

Des mutant ····· P99
diamond ····· SL2-3
DNP効率 ····· P86
DOTA-M8 ····· P27, P29
double nutation ····· L2-2
Dust & Slag ····· P71
Dynamic Nuclear Polarization ····· P86
Dynamic nuclear polarization ····· L1-1
Dynamics ····· L3-3, P98

E

Electroporation ····· SL1-9, P33
Enterococcus faecalis Acyl carrier protein ····· P98
Enzymology ····· HL2
exchange ····· L3-1
ex-situ ····· P66

F

Field Cycling ····· P80
fluorescence ····· SL2-3
Fluorine ····· P71
Fluorine NMR ····· P24
functional dynamics ····· SL1-2

G

Gas diffusion properties ····· P77
gas sorption properties ····· P79

Ga-substituted Fd ····· P32
Gel structure ····· P61
GIPAW ····· L3-13
GPCR ····· L3-4

H

H/D同位体シフト効果 ····· L3-6
HCV ····· P22
helix-sense inversion ····· P34
Heme electronic structure ····· L2-6
high-energy state ····· SL3-6
high-pressure NMR ····· SL3-6
HMQC-MRI ····· SL1-9
HR-HMBC ····· L3-10
Human calcitonin ····· SL3-5
Hybrid Antimicrobial peptide ····· P100

I

in situ NMR ····· P69
in situ 光照射固体NMR ····· P52
in vivo イメージング ····· P94
in-cell NMR ····· SL1-9, SL2-5, SL3-9, P5, P25, P27, P33
in-cell 固体NMR ····· P48
interaction ····· P22
isotope labeling ····· SL3-7
isotropic mixing sequence ····· SL3-4

K

KcsA ····· SL1-2

L

layered structure ····· P79
Lectin ····· P7
LFampin ····· P47
LINE ····· P20
Liquid crystal ····· P78
liquid crystalline polyester ····· P79
Longgu ····· P56

M

Macromolecular Crowding ····· SL2-1
Magnetic orientation ····· P77
Magnetic resonance force microscopy ····· L1-1
MAS ····· P72
Metabolomics ····· P81
Metal Binding Sites ····· P95
misfolding ····· SL3-6
model-free解析 ····· L3-7
MOMA ····· P42
MRI ····· L1-4
Multidrug Resistance ····· L3-3

N

Nafion ····· P36
natural abundance ····· L2-3
Natural evolution-mimicry ····· P7
NMR ····· L3-1, P100, P28
NMR dynamics analysis ····· P58
NMRD ····· P80
NMR structure analysis ····· P96
NMR滴定実験 ····· P21
NTA-SH tag ····· P29
NUS ····· P88

O

ODMR ····· SL2-3

P

Paramagnetic shift ····· L2-6
PBLG ····· P77
pCold-GST ····· P6
PCS ····· P11, P29
PDSD ····· P49
Peptoid residue ····· P100
Phase transition ····· P78
Photosynthesis ····· P32
Plant cell expression system ····· P9
Plant hormone ····· P9
Poly(allyl amine) ····· P59
poly(N-isopropylacrylamide) ····· P58
poly(β-*n*-propyl L-aspartate) ····· P34
Pradimicin A ····· P50
PRE ····· P31
protein ····· L3-1
Protein dynamics ····· SL2-1
protein kinase ····· P8

protein-ligand interaction ····· P30
protein transduction ····· P33
protein-ligand interaction ····· P30
proton decoupling ····· L2-2
pseudocontact shift ····· P27
Q
Quadrupolar nuclei ····· P64
R
Reaction intermediate ····· P16
REDOR ····· P39, P53
Relaxation analysis ····· P61
Relaxation time ····· L1-7
relaxation-optimized SAIL method ····· P30
Relaxometry ····· P80
Resonance Assignment ····· P95
RNA ····· P10, P15, P20, P22
RNA-タンパク質相互作用 ····· P15
RRM ····· P17
S
SAIL ····· SL3-8
SAIL法 ····· P3
Salt Bridge ····· L3-9
SAXS ····· L3-5
screening ····· P24
S.c.ricini silk fibroin ····· P96
Secondary metabolite ····· P81
Semantic Web ····· P87
sf9/baculovirus system ····· P25
Sialic acid ····· P7
side-chain conformation ····· P34
signal transduction ····· P8
single crystal NMR ····· P42
sol-gel transition ····· P58
Solid-state ^{13}C NMR ····· P61
Solid-state NMR ····· L1-1, L2-1, SL3-5, P54, P56, P59, P64
solution NMR ····· P23
sparse ····· P88
Spherical intermediates ····· SL3-5
Stable-isotope labeling ····· SL2-1, P81
STD-NMR ····· P37
stress response ····· P8
structural analysis ····· P9
Structure ····· P97, P98, P100
structure refinement ····· P89
Sulfur ····· L2-1
Symmetry-based pulse sequence ····· P46
T
T_2緩和 ····· P60
Temperature regulation ····· P43
Theoretical Calculation ····· L3-9
Thermus aquaticus cold shock protein ····· P97
Tissue engineering ····· P96
Tm complex ····· P43
transphosphorylation ····· SL3-7
TROSY ····· L3-8
tyrosine kinase ····· SL3-7
U
ubiquitin ····· P11, P12, P16
Ultrafast magic angle spinning ····· L2-3, P46
Ultrafast MAS ····· P71
V
volume limited samples ····· L2-3
W
WET ····· P2

五十音順

あ行
アゾベンゼン ····· P1
アミドプロトンの交換 ····· L3-2
アミノ酸選択的安定同位体標識法 ····· SL1-6
アミロイド ····· SL3-3, P53
アロディニア ····· P76
安定同位体 ····· SL1-4
安定同位体標識 ····· SL1-1, SL1-3, P6, P90
イミダゾール ····· P74
インジウム ····· P75
液晶分子 ····· P44
温度上昇 ····· P72
か行
回転共鳴法 ····· L1-5

化学シフト異方性 …… L1-6
化学シフト摂動 ……P21
化学シフトテンソル ……P40
化学交換 …… P1, P4
化学修飾 …… SL1-7, P14
架橋・非架橋酸素 ……P62
かたちの進化 …… SL3-1
過渡的複合体 …… SL3-7
ガラス ……P62
ガリウムフェレドキシン ……P32
環境分析 ……P84
感度向上 ……P91
緩和解析 …… L3-7
緩和編集 …… SL1-8
緩和編集法 ……P82
規則性多孔質シリカ材料 ……P65
キネティックNMR …… SL3-1
逆転写酵素 ……P20
逆ラプラス変換 ……P60
金属イオン ……P10
金属錯体 …… L3-11
キンヒドロン ……P66
高温超伝導 …… L1-4
抗菌ペプチド …… P47
交差分極 ……P70
構造解析 ……P13
高速磁場サイクリングNMR……P36
抗体 …… SL1-5
高濃度アルコール酒…… P4
勾配磁場コイル …… L2-4
高分子……P63
高分子電解質 ……P38
高分子量 …… SL1-5
高分子量蛋白質…… P3
酵母発現系 …… SL1-3
固液界面 …… L3-12
固相反応 ……P66
固体^{17}O NMR……P62
固体^{2}H NMR ……P74
固体NMR…… L1-8, P47, P49, P50, P51, P91
固体構造 ……P57
コバルト酸リチウム …… L1-5
ゴム ……P60

さ行

再生医療 ……P96
細胞膜…… L1-8
酸化亜鉛 ……P75
磁気緩和 …… L3-12
四極子相互作用 ……P75
シグナル帰属 ……P85
脂質膜…… L1-6
システイン ……P67
自動化……P85
シトクロムc ……P19
磁場配向 ……P40
シミュレーション……P86
主成分分析 ……P21
昇温降温NMR測定 ……P70
常磁性…… L3-5
常磁性NMR ……P14
常磁性緩和促進……P55
常磁性効果 ……P27
常磁性ラジカル ……P65
脂溶性代謝物 ……P84
生薬 ……P56
植物培養細胞 ……SL1-1
水素吸蔵コバルト ……P93
水流 …… L2-5
スピンエコー…… L1-6
生体模倣型エレクトロニクスデバイス …… L1-3
ゼロ磁場NMR ……P93
前処理……P82
線毛運動 …… L2-5
相互作用解析 ……P37
創薬 …… SL1-5
疎水性相互作用……P38

た行

大腸菌蛋白質発現系 …… P3
ダイナミクス …… SL3-8
ダイヤモンド ……P94

対流 ……P35
多核NMR……P38
多核NMR分光法…… L3-11
多孔質微粒子 …… L1-2
縦型NMR…… L2-4
単結晶NMR法 ……P40
タンパク質 …… P26, P31
タンパク質-RNA相互作用 ……P15
タンパク質-RNAの複合体 ……P18
タンパク質−脂質間相互作用 ……P19
蛋白質性状解析……P13
蛋白質のNMR ……SL1-7
置換ポリアセチレン ……P57
超高速^{1}H MAS法 ……P57
超広帯域NMR ……P93
超偏極^{129}Xe …… L1-2
ディフェンシン様ペプチド ……SL1-1
定量NMR……L3-12, P48
デジタルMRI ……P92
データ解析 ……P85
データマイニング ……P82
転移交差飽和法…… SL3-9
転写因子 ……P31
天然変性蛋白質…… L3-2, SL3-3, P21
糖鎖構造 …… L3-10
同種核……P39
動的核偏極 ……P45
導電性炭素材料……P72

な行

二枚貝…… L2-5
二量子遷移 ……P39
粘土鉱物 ……P68

は行

バイオマス…… L3-8
バイオリアクター…… SL3-9
パイ共役系高分子…… L1-3
バイセル ……P19
バクテリオロドプシン ……P51
パターン認識 ……P83
速い化学交換 ……P21
パルスNMR……P63
半導体ナノ粒子 ……P67
光検出磁気共鳴……P94
光励起三重項電子スピン ……P45
非侵襲サンプリング ……P83
ヒトカルシトニン……P53
標識導入技術 ……SL1-7
表面状態 ……P67
フォールディング…… P1
不均一サンプリング ……P90
符号理論 …… SL1-6
物質定量法 …… L3-8
プリオン …… SL3-2, SL3-3
プローブ……P91
プロトン伝導体 ……P74
プロリン異性化酵素…… L3-6
分子運動 ……P73
分子間相互作用……P50
分子混雑環境 …… L3-7
分子ダイナミクス …… L1-3
分子動態 ……P26
分子動力学-GIPAW計算 ……P68
分子認識 …… L3-4
ホウ酸ガラス …… L3-13
ポリプロピレン ……P35
ポリマー……P37

ま行

マイクロ波加熱 ……P44
マイクロ波照射NMR ……P44
マウス用MRI …… L2-4
膜タンパク質……L1-8, P49, P52
マルチドメインタンパク質 …… L3-5, P17
ミスフォールディング …… SL3-2
無細胞タンパク質合成系 …… SL1-4, SL1-6
メソポーラスシリカ ……P73
メタボノミクス……P83
メタロ塩基対 …… L3-11
メチルTROSY …… SL1-2
モルテングロビュール …… SL3-2

や行
ユビキチン……P48
溶液NMR……P6, P26
ら行
ランタニド……P14
リグノセルロース……SL1-8
リチウムイオン電池……P69
立体構造解析……P55
リボザイム……P10
リボヌクレアーゼ……P15
量子化学計算……P90
リン酸化……P17
レチナール……P52
ロックシグナル……P4

著者検索

アルファベット

A

Abe Yoshito ····· P21
Adachi Wakana ····· P15
Aizawa Tomoyasu ····· P26, P31, P55
Akira Shizuo ····· P15
Amemiya Kazuki ····· P36
Ando Masaki ····· P36
Aoki Akihiro ····· P54
Aoki Daisuke ····· L2-1
Arai Hajime ····· L1-5
Arai Hiroki ····· P54
Arai Jyuichi ····· P69
Arita Kyohei ····· P12
Ariyoshi Mariko ····· P12, P16
Asakawa Naoki ····· L1-3
Asakura Taiga ····· P82, P84
Asakura Tetsuo ··· L1-7, P54, P57, P58, P96
Asano Atsushi ····· L1-7, P60

B

Bardel Michel ····· L1-1
Bayro Marvin ····· IL6
Berardi Marcelo J. ····· IL3
Boutis Gregory S. ····· P58
Brueschweiler Sven ····· IL3
Bubici Salvatore ····· P80

C

Chaudhuri Pratima ····· P22
Chikai Takuma ····· P74
Chou James J. ····· IL3
Corbeski Ivan ····· SL2-5

D

Dairaku Takenori ····· L3-11
Danielsson Jens ····· SL2-4
Date Yasuhiro ····· P82, P83, P84, P90
Degani Hadassa ····· IL5
Degen Christian ····· L1-1, IL1
Deguchi Kenzo ····· P42, P68
Demura Makoto ····· P26, P31, P55
De Paëpe Gaël ····· L1-1
Doi Takashi ····· P50
Dötsch Volker ····· SL2-5
Dumez Jean-Nicolas ····· IL5

E

Egawa Ayako ····· P48, P55
Enokizono Yoshiaki ····· SL1-9, P15, P33
Esaki Kaori ····· L3-4

F

Feig Michael ····· L3-7
Feng Zhenhao ····· SL3-10
Ferrante Gianni ····· P80
Frahm Jens ····· IL4
Frydman Lucio ····· IL5
Fujii Takashi ····· P12
Fujioka Koji ····· P91
Fujise Shinya ····· L1-3
Fujito Teruaki ····· P42
Fujiwara Hideaki ····· L1-2
Fujiwara Toshimichi ····· P6, P14, P24, P48, P55, P85, P86, P87
Fujiwara Toshinobu ····· P17
Fukada Harumi ····· P12
Fukazawa Jun ····· P86
Fukuchi Minoru ····· P82
Fukuda Kunito ····· L1-3
Furihata Kazuo ····· P2
Furuita Kyoko ····· L3-11, P6, P13, P24
Furukawa Toshihiro ····· P88
Furuya Hidemine ····· P34

G

Ganchimeg Lkhamsuren ····· P53
Goda Natsuko ····· P21, P23
Gotoh Kazuma ····· P69
Grant Samuel C. ····· IL5
Güntert Peter ····· P85, P89

H

Haishi Tomoyuki ····· L2-4, P80
Hamatsu Jumpei ····· P25, P88
Hanashima Shinya ····· SL3-3

Hänsel Robert ····· SL2-5
Hara Hideyuki ····· P61, P63
Harada Ryusuke ····· P72
Harada Yoshie ····· SL2-3, P94
Hase Toshiharu ····· P32
Hasegawa Naoki ····· P36
Hashizume Daisuke ····· P50
Hata Koichiro ····· P72
Hattori Yoshikazu ····· L3-9, P14, P24, P85
Hediger Sabine ····· L1-1
Hemmi Hikaru ····· P7
Hidaka Tetsurou ····· P52
Higa Kazuha ····· P26
Higuchi Kae ····· SL1-4
Hikone Yuya ····· P27
Hirabayashi Jun ····· P7
Hirai Go ····· P27
Hirakane Makoto ····· P76
Hiraoki Toshifumi ····· P34, P57
Hiroaki Hidekazu ····· P21, P23
Hirota Shun ····· P19
Honda Ryo ····· SL3-2
Hong Mei ····· IL2
Hoshi Minako ····· P21, P23
Hoshino Keiji ····· P10
Hoshino Masaru ····· P12

I

Ibaraki Moe ····· P68
Ida Tomonori ····· P73, P74, P75, P78
Ideta Keiko ····· P72
Igarashi Ryuji ····· SL2-3, P94
Igarashi Yasuhiro ····· P50
Iinuma Junya ····· P29
Ikawa Yoshiya ····· P10
Ikeda Kazuhiro ····· SL2-3
Ikegami Takahisa ····· P32
Ikeya Teppei ····· P5, P25, P89
Ikura Mitsuhiko ····· SL3-10
Imachi Masayoshi ····· P47
Imai Hirohiko ····· L1-2, SL1-9
Imai Shunsuke ····· SL1-2
Imai Takao ····· P18
Inagaki Fuyuhiko ····· SL3-7, P15
Inagaki Satoshi ····· P65
Inomata Kohsuke ····· SL1-9, P11, P33
Inoue Jin ····· P5
Inouye Masayori ····· P3
Ioannidis Yannis E. ····· P87
Ishida Hiroyuki ····· P69
Ishida Yojiro ····· P3
Ishikawa Maho ····· P5
Ishima Rieko ····· L3-1
Isseki Yu ····· L3-7
Ito Kengo ····· P90
Ito Yukishige ····· P50
Ito Yutaka ····· SL2-2, L3-5, P5, P17, P25, P27, P29, P89
Itoh Yoshitaka ····· L1-4
Itoh-Watanabe Hikari ····· SL3-5, P53
Iwadate Yasuhiko ····· L3-13, P68
Iwai Kazuhiro ····· P12
Iwamoto Jun ····· P77
Iwamoto Shigeto ····· P76
Iwamoto Shusei ····· P58
Iwaoka Ryo ····· P18
Iwashita Takashi ····· P4
Iwata Takeshi ····· P87
Iwaya Naoko ····· P21, P23
Izawa Kenichiro ····· P66
Izuka Misato ····· P69
Izumi Kenya ····· P88

J

Javkhlantugs Namsrai ····· SL3-5, P53
Jeong Ki-Woong ····· P95, P97, P98
Jeong Mincheol ····· P95, P98
Jin Bonghwan ····· P97

K

Kageyama Shun ····· P12
Kainosho Masatsune ····· SL3-8, P3, P30
Kajikawa Masaki ····· P20

Kakishita Takafumi ····· P59
Kamatari Yuji ····· SL3-3
Kameda Tomoshi ····· P14, P55
Kametani Shunsuke ····· P58
Kamihira-Ishijima Miya ····· SL3-5
Kamimura Midori ····· P24
Kamiya Masakatsu ····· P26, P31, P55
Kamo Naoki ····· L1-8, P49
Kamoshida hajime ····· P5
Kanaba Teppei ····· L3-5, P29
Kanayama Kozo ····· P70
Kanehashi Koji ····· P62, P71
Kanematsu Wataru ····· P70
Kanki Teruo ····· L1-3
Kasai Takuma ····· SL1-6
Katahira Masato ····· L3-8, P18
Katahira Ritsuko ····· P24
Kataoka Saori ····· P6
Kato Koichi ····· P14
Kato Masaki ····· L3-10
Kawaguchi Ken ····· P37
Kawahara Ikumi ····· P13
Kawai Gota ····· P20, P22
Kawai-Kubota Hisako ····· P32
Kawamura Izuru ····· L1-8, SL3-5, P44, P47, P49, P51, P52, P53, P65
Kawamura Yuuji ····· P75
Kawanishi Shuto ····· P96
Kawano Keiichi ····· P31
Kawatake Satoshi ····· P41
Kido Kouki ····· P55
Kigawa Takanori ····· SL1-4, SL1-6, SL2-1, L3-7, L3-8, P24
Kikuchi Jun ····· SL1-8, P81, P82, P83, P84, P90
Kikukawa Takashi ····· P26, P31, P55
Kim Jae Hyun ····· P28
Kim Jae Il ····· P28
Kim Sang Hyun ····· P28
Kim Yangmee ····· P95, P97, P98, P99, P100
Kimata Mikako ····· P40
Kimura Atsuomi ····· L1-2
Kimura Fumiko ····· P40, P42
Kimura Kazunari ····· P76
Kimura Kazuo ····· P37
Kimura Shunsaku ····· SL1-9
Kimura Tsunehisa ····· P40, P42
Kinjo Akira R. ····· P87
Kira Atsushi ····· P47
Kitagawa Kentaro ····· L2-1
Kitahara Ryo ····· SL3-6
Kitazawa Soichiro ····· SL3-6
Kittaka Shigeharu ····· P73
Kobashigawa Yoshihiro ····· SL3-7
Kobayashi Ayaho ····· L3-5, P17, P29
Kobayashi Hisashi ····· P19
Kobayashi Naohiro ····· P18, P85, P87
Kobayashi Takeshi ····· L2-3
Kobayashi Tetsuo ····· P34, P57
Kodama Hisashi ····· P37
Kohda Daisuke ····· L3-4
Kohno Toshiyuki ····· L3-4
Kojima Chojiro ····· SL1-7, L3-9, L3-11, P6, P13, P14, P24, P85, P87
Komatsu Masaaki ····· P12
Komatsu Takanori ····· P81, P90
Kondo Teruyuki ····· SL1-9
Kondo Yoshinori ····· P13
Kondoh Masashi ····· SL3-5
Kono Hiroyuki ····· P61
Kose Katsumi ····· L1-4, P92
Koshiba Seizo ····· SL1-6
Koyama Yukinori ····· L1-5
Kubota Yoshihiro ····· P65
Kulminskaya Natalia ····· SL3-4
Kumagai Yoshihide ····· P78
Kumaki Yasuhiro ····· P26, P31
Kumeta Hiroyuki ····· P15
Kumiya Yuta ····· SL2-3, P94
Kuno Atsushi ····· P7

Kurihara Takuya ····· P67
Kurisu Genji ····· P32
Kusumi Ryosuke ····· P40, P42
Kuwahara Daisuke ····· P39
Kuwata Kazuo ····· SL3-1, SL3-2, SL3-3
Kwon Byungsu ····· IL2

L

Lee Daniel ····· L1-1
Lee Eunjung ····· P100
Lee Jae Ho ····· P28
Lee Masakazu ····· SL1-9
Lee Young-Ho ····· P24
Leftin Avigdor ····· IL5
Lim Hyun Jung ····· P28
Livny Miron ····· P87
Löhr Frank ····· SL2-5
Luh Laura M. ····· SL2-5
Lu Jun-Xia ····· IL6

M

Maeda Shiro ····· P59
Maki Hideshi ····· L3-12, P38
Makino Akira ····· SL1-9
Makino Yoshiteru ····· L1-8, P51, P52
Malon Michal ····· P46
Manon Michal ····· L2-3
Markley John L. ····· P87
Marshall Christopher B. ····· SL3-10
Maruyama Tadashi ····· L2-5
Masu Hyuma ····· L3-10
Matsubara Koshi ····· P35
Matsuda Natsuko ····· SL1-4
Matsuda Tetsuya ····· SL1-9
Matsuki Yoh ····· P86
Matsumori Nobuaki ····· P43
Matsunaga Takuro ····· P36
Matsuoka Shigeru ····· L1-6, P41
Matsushima Kouji ····· L3-4
Matsuzaki Mizuki ····· P21, P23
Mawatari Yasuteru ····· P57
Mazhab-Jafari Mohammad ····· SL3-10
Meya Hirotatsu ····· P10
Miki Tsunehisa ····· P70
Misawa Takuma ····· P83
Mishima Masaki ····· L3-5, P5, P17, P25, P27, P29
Miyakubo Keisuke ····· P56
Miyanoiri Yohei ····· P3, P30
Miyashita Manami ····· L3-2
Miyashita Satoshi ····· P75
Miyatou Tatsuya ····· P73
Miyawaki Jin ····· P72
Mizuhata Minoru ····· L3-12, P38
Mizuno Motohiro ····· P73, P74, P75, P78
Mizuno Takashi ····· P91
Mochida Isao ····· P72
Moore Eric ····· IL6
Moores Brad ····· L1-1
Mori Masashi ····· P9
Mori Shoko ····· P4
Morimoto Daichi ····· P11, P12, P16
Morita Yasushi ····· P45
Morozumi Yusaku ····· P59
Mulder Frans ····· SL3-4
Murakami Masataka ····· L2-5
Murakami Miwa ····· L1-5
Murakami Ryo ····· L3-12
Muraki Norifumi ····· P32
Murata Michio ····· L1-6, P41, P43
Murray Dylan ····· IL6
Mutoh Risa ····· P32

N

Nagao Satoshi ····· P19
Nagasaka Tetsuya ····· P71
Nagashima Toshio ····· P1
Nagata Takashi ····· L3-8, P18, P85
Naito Akira ····· L1-8, SL3-5, P44, P47, P49, P51, P52, P53, P65
Nakagawa Yu ····· P50
Nakahigashi Rie ····· P69
Nakakoshi Masamichi ····· SL3-5

Nakamura Haruki ····· P87
Nakamura Noriko ····· P4
Nakamura Takashi ····· L1-4
Nakanishi Ayako ····· P17
Nakano Takayuki ····· P37
Nakao Tomoki ····· P88
Nakatani Satoshi ····· L1-8
Namba Keiichi ····· P12
Nariai Hiroyuki ····· P38
Narita Akihiro ····· P21, P23
Neya Saburo ····· L2-6
Nishida Masakazu ····· P70
Nishida Noritaka ····· SL3-9
Nishida Shinsuke ····· P45
Nishikawa Ryota ····· P49
Nishimura Chiaki ····· L3-2, P1
Nishimura Hiroshi ····· L3-8
Nishimura Katsuyuki ····· P57
Nishimura Ryu ····· L2-6
Nishimura Yoshifumi ····· HL1
Nishiyama Yusuke ····· L2-3, P46, P57
Nishizawa Mayu ····· P11
Noda Nobuo N. ····· P15
Noda Yasuto ····· L1-5, P66, P67, P93

O

Ogumi Zempachi ····· L1-5
Ogura Tatsuki ····· P84
Oguri Kazuki ····· P56
Ohashi Ryutaro ····· P73, P74, P75, P78
Ohata Takuya ····· P54
Ohhashi Yumiko ····· SL3-3
Ohira Akihiro ····· P36
Ohishi Kazue ····· L2-5
Ohishi Risa ····· P81
Ohkawa Kousaku ····· P34
Ohki Shinobu ····· P42, P68
Ohki Shinya ····· SL1-1, P9
Ohkubo Takahiro ····· L3-13, P58, P60, P68
Ohno Yuta ····· L1-3
Okamoto Itaru ····· L3-11
Okamura Hideyasu ····· L3-7, L3-8
Okano Hideyuki ····· P18
Okazaki Honoka ····· L3-2
Okitsu Takashi ····· P49, P51, P52
Okushita Keiko ····· L1-7, P54, P60
Onami Mayumi ····· SL1-3
Ono Akira ····· L3-11
Ono Yu-ichi ····· L3-2
Ono Yumi ····· L3-2
Osawa Masanori ····· SL1-2, L3-4
Oshima Kyosuke ····· P51
Otomo Yuki ····· P22
Otsu Maina ····· P20
Ozaki Masato ····· P61

P

Pandey Manoj Kumar ····· P46
Park Bonggyu ····· P28
Park Hyun-Sung ····· P99
Park Young-Guen ····· P95, P98, P99
Potapov Alexey ····· IL6
Pruski Marek ····· L2-3

R

Reckel Sina ····· SL2-5
Rosenberg Jens T. ····· IL5
Roussel Tangi ····· IL5
Ryu Jae Ha ····· P28

S

Saeki Yasushi ····· P12
Sahoo Bikash Ranjan ····· P85
Saitô Hazime ····· SL3-5
Saito Hitoshi ····· P96
Saitoh Takashi ····· L3-4
Sakakura Masayoshi ····· SL1-3
Sakamoto Taiichi ····· P10
Sakuma Chiseko ····· P2
Sakuragi Takahiro ····· P39
Sasaki Akiko ····· P64
Satake Shintaro ····· P93
Sato Daichi ····· P13
Sato Hiroshi ····· P76

Sato Motoyasu ····· P44
Sato Wataru ····· P75
Satoh Ryosuke ····· P17
Schirhagl Romana ····· L1-1
Schmidt Elena ····· P85
Schmidt Rita ····· IL5
Šebera Jakub ····· L3-9
Seki Hiroko ····· L3-10
Sekine Sokei ····· P58
Seo Eriko ····· L2-5
Seo Yoshiteru ····· L2-5
Shemesh Noam ····· IL5
Shibata Tomokazu ····· L2-6
Shigemitsu Yoshiki ····· P21, P23
Shigeta Arisu ····· P51
Shimada Ichio ····· SL1-2, SL1-3, L3-3, L3-4, SL3-9, P8
Shimizu Tadashi ····· L1-3, P42, P68, P75
Shin Areum ····· P100
Shinke Mayo ····· P16
Shino Amiu ····· P81
Shinohara Kazuhiko ····· P36
Shiokawa Yuka ····· P83
Shirakawa Masahiro ····· SL1-9, SL2-3, P5, P11, P12, P16, P33, P94
Sim Ji Young ····· P28
Simorre Jean-Pierre ····· L1-1
Slowing Igor I. ····· L2-3
Smith Mathew J. ····· SL3-10
Sodeoka Mikiko ····· P27
Sogawa Hiromitsu ····· L2-1
Sogawa Ren ····· L3-12
Song Guangjie ····· P42
Song Hee-sang ····· P95
Sotoma Shingo ····· SL2-3, P11, P94
Sou Yu-shin ····· P12
Standley Daron M. ····· P15
Steele Rebecca ····· P80
Sudo Yuki ····· P49, P52
Sugase Kenji ····· P4, P12
Sugi Takuma ····· SL2-3, P94
Sugiki Toshihiko ····· SL1-3, P6, P24
Sugita Yuji ····· L3-7
Sugiura Reiko ····· P17
Sugiyama Syusei ····· L3-7
Sugiyama Teruyasu ····· P69
Sumiya Hitoshi ····· SL2-3
Suzuki Akihiro ····· L2-6
Suzuki Ei-ichiro ····· HL2
Suzuki Yu ····· P96
Sychrovský Vladimír ····· L3-9, L3-11

T

Tabata Masayoshi ····· P57
Takahashi Ami ····· P87
Takahashi Hideo ····· SL1-3, P8
Takahashi Hiroki ····· L1-1
Takahashi Kyoko ····· P56
Takahashi Masato ····· L2-1
Takahashi Takafumi ····· P71
Takata Toshikazu ····· L2-1
Takeda Kazuyuki ····· L1-2, L2-2, P69, P93
Takeda Mitsuhiro ····· SL3-8, P3, P30
Takegoshi Kiyonori ····· L1-5, L2-2, P50, P66, P67, P91, P93
Takeuchi Koh ····· SL1-2, SL1-3, L3-3, P8
Takeuchi Osamu ····· P15
Takiya Shigeharu ····· P31
Tamada Daiki ····· L1-4, P92
Tamaki Hajime ····· P55
Tamari Yu ····· L3-6
Tanaka Hidekazu ····· L1-3
Tanaka Keiji ····· P12
Tanaka Motomasa ····· SL3-3
Tanaka Takashi ····· P5, P25
Tanaka Tomoko ····· P70
Tanaka Yoshiyuki ····· L3-9, L3-11, P13
Tanaka Yuho ····· P88
Tanaka Yuuya ····· P43
Tanigawa Fumiichi ····· P44
Tansho Masataka ····· L1-3, P75

Tasei Yugo ····· P44
Tashiro Mitsuru ····· P2
Tate Shin-ichi ····· L3-6
Tateishi Kenichiro ····· P45
Tei Chikai ····· P39
Tenno Takeshi ····· P21, P23
Terada Yasuhiko ····· P92
Terasawa Hiroaki ····· P76, L3-4
Terashima Yuya ····· L3-4
Terauchi Tsutomu ····· P3, P30
Thurber Kent ····· IL6
Tochio Hidehito ····· SL1-9, SL2-3, P11, P12, P16, P33, P94
Tochio Naoya ····· L3-2, L3-6, L3-7
Toda Etsuko ····· L3-4
Toda Mitsuru ····· P91
Toda Shigemi ····· P72
Tokunaga Yuji ····· P8
Tomonaga Yuya ····· P52
Torigoe Hidetaka ····· L3-11
Torizawa Takuya ····· SL1-5
Toyoda Shuuhei ····· P53
Trantirek Lukas ····· SL2-5
Tsuchida Eiji ····· L3-13
Tsuchiya Hikaru ····· P12
Tsuda Kengo ····· P18
Tsuda Makoto ····· P92
Tsuda Ryosuke ····· L3-6
Tsuji Tatsuichiro ····· L3-4
Tsukihana Tomohiro ····· P45
Tsunomura Masaki ····· P60
Tsushima Takashi ····· P15
Tsutsumi Atsushi ····· P47
Tuzi Satoru ····· SL3-5, P51
Tycko Robert ····· IL6

U

Uchimoto Yoshiharu ····· L1-5
Ueda Kazuyoshi ····· SL3-5, P53
Ueda Keisuke ····· P1
Ueda Takahiro ····· P56
Ueda Takumi ····· L3-4
Uesaka Tomohiro ····· P45
Ulrich Eldon L. ····· P87
Umegawa Yuichi ····· L1-6, P41, P43
Umemura Koichiro ····· L1-3
Umetsu Yoshitaka ····· P9
Unno Sachiko ····· P7
Urata Yoshiharu ····· P45
Ulrich Anne S. ····· P54
Uzawa Jun ····· L3-10

W

Wada Akimori ····· P49, P51, P52
Wada Satoshi ····· P45
Wakisaka Asato ····· L2-2
Walinda Erik ····· P12
Wang Tuo ····· IL2
Watanabe Satoru ····· L3-2, L3-7
Watanabe Takashi ····· L3-8
Williamson Michael ····· L1-7
Wimperis Stephen ····· P64

X

Xu Ning ····· L3-6
Xue Liyang ····· L2-6

Y

Yamada Hisatsugu ····· SL1-9
Yamada Kazuhiko ····· L2-1
Yamada Kazuya ····· P48
Yamaguchi Makoto ····· P36
Yamaguchi Kei-ichi ····· SL3-1, SL3-2
Yamaguchi Takumi ····· P14
Yamaguchi Yoshiki ····· SL3-3, L3-10
Yamamoto Masahiro ····· L3-12
Yamamoto Yasuhiko ····· L2-6
Yamashita Kazuo ····· P15
Yamauchi Masahiro ····· P79
Yamazaki Toshimasa ····· P96
Yamazaki Toshio ····· P1
Yanagi Yosuke ····· L1-4
Yang Chun-Jiun ····· P30
Yang Qin ····· IL3

Yao Hongwei …… IL2
Yau Wai-Ming …… IL6
Yazawa Koji …… L1-3, P57
Yokochi Masashi …… P87
Yokogawa Mariko …… P15
Yokoyama Jun …… SL1-4, SL1-6
Yomoda Hiroki …… P52
Yoneyama Momoko …… P13
Yoon Seong-Ho …… P72
Yoshida Katsuyoshi …… P38
Yoshida Toshihiko …… P36
Yoshida Yoshiaki …… P57
Yoshikazu Hattori …… L3-9
Yoshiki Shigemitsu …… P23
Yoshimizu Hiroaki …… P77, P79
Yoshimura Yuichi …… SL3-4
Yoshinaga Sosuke …… L3-4, P76
Yoshinari Yohsuke …… SL2-3, P94
Yuhara Kosuke …… P31
Yuzuriha Naoya …… P76

Z

Zhang Ying …… P14

五十音順

あ

相沢　智康 …… P26, P31, P55
青木　昭宏 …… P54
青木　大輔 …… L2-1
審良　静男 …… P15
浅川　直紀 …… L1-3
朝倉　大河 …… P82, P84
朝倉　哲郎 …… L1-7, P54, P57, P58, P96
浅野　敦志 …… L1-7, P60
足立　わかな …… P15
阿部　義人 …… P21
雨宮　一樹 …… P36
新井　寿一 …… P69
荒井　創 …… L1-5
新井　裕喜 …… P54
有田　恭平 …… P12
有吉　眞理子 …… P12, P16
安藤　雅樹 …… P36

い

飯沼　純弥 …… P29
五十嵐　康弘 …… P50
五十嵐　龍治 …… SL2-3, P94
井川　善也 …… P10
池上　貴久 …… P32
池谷　鉄兵 …… P5, P25, P89
伊澤　研一郎 …… P66
石川　真帆 …… P5
石田　祐之 …… P69
石田　洋二郎 …… P3
泉　顕也 …… P88
井田　朋智 …… P73, P74, P75, P78
伊塚　美里 …… P69
出田　圭子 …… P72
伊藤　研悟 …… P90
伊藤　幸成 …… P50
伊藤　隆 …… SL2-2, L3-5, P5, P17, P25, P27, P29, P89
伊藤　佳孝 …… L1-4
伊藤－渡邉　ひかり …… SL3-5
稲垣　怜史 …… P65
稲垣　冬彦 …… SL3-7, P15
井上　仁 …… P5
井上　正順 …… P3
猪股　晃介 …… SL1-9, P11, P33
茨城　萌 …… P68
今井　駿輔 …… SL1-2
今井　貴雄 …… P18
今井　宏彦 …… L1-2, SL1-9
井町　昌義 …… P47
岩井　一宏 …… P12
岩岡　諒 …… P18
岩下　孝 …… P4
岩田　武史 …… P87
岩舘　泰彦 …… L3-13, P68
岩本　成人 …… P76
岩本　脩成 …… P58
岩本　純 …… P77

岩谷　奈央子 …… P21, P23
う
ヴァリンダ　エリック …… P12
ウィリアムソン　マイク …… L1-7
上坂　友洋 …… P45
上田　一義 …… SL3-5, P53
植田　啓介 …… P1
上田　貴洋 …… P56
上田　卓見 …… L3-4
鵜澤　洵 …… L3-10
内本　喜晴 …… L1-5
梅川　雄一 …… L1-6, P41, P43
梅津　喜崇 …… P9
梅村　香一郎 …… L1-3
浦田　佳治 …… P45
海野　幸子 …… P7
え
江川　文子 …… P48, P55
江崎　芳 …… L3-4
榎園　能章 …… SL1-9, P15, P33
お
大石　和恵 …… L2-5
大石　梨沙 …… P81
大川　浩作 …… P34
大木　忍 …… P42, P68
大木　進野 …… SL1-1, P9
大窪　貴洋 …… L3-13, P58, P60, P68
大澤　匡範 …… SL1-2, L3-4
大島　恭介 …… P51
大津　舞菜 …… P20
大友　裕貴 …… P22
大浪　真由美 …… SL1-3
大野　悠一 …… L3-2
大野　雄太 …… L1-3
大野　優美 …… L3-2
大橋　祐美子 …… SL3-3
大橋　竜太郎 …… P73, P74, P75, P78
大畑　卓也 …… P54
大平　昭博 …… P36
岡崎　萌花 …… L3-2
岡野　栄之 …… P18
岡村　英保 …… L3-7, L3-8
岡本　到 …… L3-11
沖津　貴志 …… P49, P51, P52
奥下　慶子 …… L1-7, P54, P60
小久見　善八 …… L1-5
小倉　立己 …… P84
小栗　一輝 …… P56
尾崎　雅人 …… P61
小野　晶 …… L3-11
か
甲斐荘　正恒 …… SL3-8, P3, P30
柿下　拓史 …… P59
蔭山　俊 …… P12
葛西　卓磨 …… SL1-6
梶川　正樹 …… P20
片岡　沙織 …… P6
片平　正人 …… L3-8, P18
片平　律子 …… P24
加藤　晃一 …… P14
加藤　雅樹 …… L3-10
金場　哲平 …… L3-5, P29
金山　公三 …… P70
金橋　康二 …… P62, P71
兼松　渉 …… P70
鎌足　雄司 …… SL3-3
上平－石島　美弥 …… SL3-5
上村　みどり …… P24
神谷　昌克 …… P26, P31, P55
亀田　倫史 …… P14, P55
亀谷　俊輔 …… P58
加茂　直樹 …… L1-8, P49
鴨志田　一 …… P5
河合　剛太 …… P20, P22
河合（久保田）　寿子 …… P32
川口　謙 …… P37
川竹　悟史 …… P41
河西　秀和 …… P96
河野　敬一 …… P31
河原　郁美 …… P13

川村　出 …… L1-8, SL3-5, P44, P47, P49, P51, P52, P53, P65
川村　祐史 ……P75
神吉　輝夫 …… L1-3

き

木川　隆則 …… SL1-4, SL1-6, SL2-1, L3-7, L3-8, P24
菊川　峰志 …… P26, P31, P55
菊地　淳 … SL1-8, P81, P82, P83, P84, P90
北川　健太郎 …… L2-1
北沢　創一郎 …… SL3-6
北原　亮 …… SL3-6
橘髙　茂治 ……P73
木戸　浩貴 ……P55
木全　美香子 ……P40
木村　恒久 …… P40, P42
木村　史子 …… P40, P42
木村　敦臣 …… L1-2
木村　一雄 ……P37
木村　一成 ……P76
木村　俊作 …… SL1-9
吉良　敦史 ……P47
金城　玲 ……P87

く

久住　亮介 …… P40, P42
久野　敦 …… P7
窪田　好浩 ……P65
熊谷　翼秀 ……P78
熊木　康裕 …… P26, P31
久美屋　雄太 …… SL2-3, P94
久米田　博之 ……P15
栗栖　源嗣 ……P32
栗原　拓也 ……P67
グレゴリー　ボウティス……P58
桑田　一夫 …… SL3-1, SL3-2, SL3-3
桑原　大介 ……P39

こ

神田　大輔 …… L3-4
合田　名都子 …… P21, P23
河野　俊之 …… L3-4
甲野　裕之 ……P61
小柴　生造 …… SL1-6
児嶋　長次郎 …… SL1-7, L3-9, L3-11, P6, P13, P14, P24, P85, P87
巨瀬　勝美 …… L1-4, P92
児玉　尚士 ……P37
後藤　和馬 ……P69
小橋川　敬博 …… SL3-7
小林　彩保 …… L3-5, P17, P29
小林　武史 …… L2-3
小林　哲雄 …… P34, P57
小林　直宏 …… P18, P85, P87
小林　紀 ……P19
小松　功典 …… P81, P90
小松　雅明 ……P12
小山　幸典 …… L1-5
近藤　輝幸 …… SL1-9
近藤　正志 …… SL3-5
根東　義則 ……P13

さ

齊藤　貴士 …… L3-4
斉藤　肇 …… SL3-5
齊藤　準 ……P96
佐伯　泰 ……P12
坂倉　正義 …… SL1-3
坂本　泰一 ……P10
佐久間　千勢子…… P2
櫻木　隆弘 ……P39
佐々木　彬子 ……P64
佐竹　晋太朗 ……P93
佐藤　大地 ……P13
佐藤　博司 ……P76
佐藤　元泰 ……P44
佐藤　亮介 ……P17
佐藤　渉 ……P75

し

塩川　由佳 ……P83
重田　安里寿 ……P51
重光　佳基 …… P21, P23
篠　阿弥宇 ……P81

篠原　和彦 ……P36
柴田　友和 …… L2-6
嶋田　一夫 ……SL1-2, SL1-3, L3-3, L3-4, SL3-9, P8
清水　禎 ……L1-3, P42, P68, P75
許　力揚 …… L2-6
徐　宁 …… L3-6
白川　昌宏 …… SL1-9, SL2-3, P5, P11, P12, P16, P33, P94
新家　万葉 ……P16

す

菅瀬　謙治 ……P4, P12
杉　拓磨 …… SL2-3, P94
杉浦　麗子 ……P17
杉木　俊彦 …… SL1-3, P6, P24
杉田　有治 …… L3-7
杉山　修世 …… L3-7
杉山　照泰 ……P69
鈴木　秋弘 …… L2-6
鈴木　榮一郎 …… HL2
鈴木　悠 ……P96
須藤　雄気 …… P49, P52

せ

瀬尾　絵理子 …… L2-5
瀬尾　芳輝 …… L2-5
関　宏子 …… L3-10
関根　素馨 ……P58
曽　友深 ……P12
曽川　洋光 …… L2-1
十川　廉 …… L3-12
袖岡　幹子 ……P27
外間　進悟 ……SL2-3, P11, P94
宋　广杰 ……P42

た

大樂　武範 …… L3-11
高田　十志和 …… L2-1
高橋　あみ ……P87
高橋　京子 ……P56
高橋　貴文 ……P71
高橋　栄夫 …… SL1-3, P8
高橋　大樹 …… L1-1
高橋　雅人 …… L2-1
滝谷　重治 ……P31
竹内　理 ……P15
竹内　恒 …… SL1-2, SL1-3, L3-3, P8
竹腰　清乃理 …… L1-5, L2-2, P50, P66, P67, P91, P93
武田　和行 …… L1-2, L2-2, P69, P93
武田　光広 …… SL3-8, P3, P30
田代　充 …… P2
田制　侑悟 ……P44
楯　真一 …… L3-6
伊達　康博 …… P82, P83, P84, P90
立石　健一郎 ……P45
田中　啓二 ……P12
田中　孝 …… P5, P25
田中　智子 ……P70
田中　秀和 …… L1-3
田中　元雅 …… SL3-3
田中　勇帆 ……P88
田中　佑弥 ……P43
田中　好幸 …… L3-9, L3-11, P13
谷川　文一 ……P44
田畑　昌祥 ……P57
田巻　初 ……P55
玉田　大輝 …… L1-4, P92
玉利　佑 …… L3-6
丹所　正孝 …… L1-3, P75

ち

近井　琢磨 ……P74

つ

月花　智博 ……P45
辻　暁 ……SL3-5, P51
辻　辰一朗 …… L3-4
津嶋　崇 ……P15
津田　健吾 ……P18
津田　真人 ……P92
津田　亮祐 …… L3-6
土田　英二 …… L3-13
土屋　光 ……P12

堤　敦史 …… P47
角村　将希 …… P60

て

鄭　智海 …… P39
出口　健三 …… P42, P68
出村　誠 …… P26, P31, P55
寺内　勉 …… P3, P30
寺沢　宏明 …… L3-4, P76
寺島　裕也 …… L3-4
寺田　康彦 …… P92
天野　剛志 …… P21, P23

と

土井　崇嗣 …… P50
遠田　悦子 …… L3-4
徳永　裕二 …… P8
戸田　繁美 …… P72
戸田　充 …… P91
栃尾　尚哉 …… L3-2, L3-6, L3-7
栃尾　豪人 …… SL1-9, SL2-3, P11, P12, P16, P33, P94
友永　雄也 …… P52
豊田　修平 …… P53
鳥越　秀峰 …… L3-11
鳥澤　拓也 …… SL1-5

な

内藤　晶 …… L1-8, SL3-5, P44, P47, P49, P51, P52, P53, P65
長尾　聡 …… P19
中尾　朋喜 …… P88
中川　優 …… P50
中越　雅道 …… SL3-5
長坂　徹也 …… P71
長島　敏雄 …… P1
永田　崇 …… L3-8, P18, P85
中谷　聡志 …… L1-8
中西　絢子 …… P17
中野　隆行 …… P37
中東　里英 …… P69
仲村　高志 …… L1-4
中村　典子 …… P4
中村　春木 …… P87
成相　裕之 …… P38
成田　哲博 …… P21, P23
難波　啓一 …… P12

に

西川　亮汰 …… P49
西澤　茉由 …… P11
西田　辰介 …… P45
西田　紀貴 …… SL3-9
西田　雅一 …… P70
西村　勝之 …… P57
西村　千秋 …… L3-2, P1
西村　裕志 …… L3-8
西村　善文 …… HL1
西村　龍 …… L2-6
西山　裕介 …… L2-3, P46, P57

ね

根矢　三郎 …… L2-6

の

野田　展生 …… P15
野田　泰斗 …… L1-5, P66, P67, P93

は

拝師　智之 …… L2-4, P80
橋爪　大輔 …… P50
長谷　俊治 …… P32
長谷川　直樹 …… P36
秦　弘一郎 …… P72
服部　良一 …… L3-9, P14, P24, P85
花島　慎弥 …… SL3-3
濱津　順平 …… P25, P88
原　英之 …… P61, P63
原田　慶恵 …… SL2-3, P94
原田　竜介 …… P72

ひ

比嘉　一葉 …… P26
樋口　佳恵 …… SL1-4
彦根　佑哉 …… P27
日高　徹朗 …… P52
平井　剛 …… P27
平沖　敏文 …… P34, P57

平金　真 ……P76
平林　淳 …… P7
廣明　秀一 …… P21, P23
廣田　俊 ……P19

ふ

フェイグ　マイケル …… L3-7
深澤　隼 ……P86
深田　はるみ ……P12
福田　國統 …… L1-3
福地　実 ……P82
藤井　高志 ……P12
藤岡　耕治 ……P91
藤瀬　晋也 …… L1-3
藤戸　輝昭 ……P42
藤原　俊伸 ……P17
藤原　敏道 …… P6, P14, P24, P48, P55, P85, P86, P87
藤原　英明 …… L1-2
降旗　一夫 …… P2
古板　恭子 ……L3-11, P6, P13, P24
古川　利博 ……P88
古屋　秀峰 ……P34

へ

逸見　光 …… P7

ほ

星　美奈子 …… P21, P23
星野　啓治 ……P10
星野　大 ……P12
本田　諒 …… SL3-2

ま

前田　史郎 ……P59
牧　秀志 ……L3-12, P38
牧野　顕 …… SL1-9
槙野　義輝 ……L1-8, P51, P52
桝　飛雄真 …… L3-10
松岡　茂 …… L1-6, P41
松木　陽 ……P86
松崎　瑞季 …… P21, P23
松島　綱治 …… L3-4
松田　哲也 …… SL1-9
松田　夏子 …… SL1-4
松永　拓郎 ……P36
松原　康史 ……P35
松森　信明 ……P43
丸山　正 …… L2-5
馬渡　康輝 ……P57

み

三木　恒久 ……P70
三澤　拓真 ……P83
三島　正規 ……L3-5, P5, P17, P25, P27, P29
水野　敬 ……P91
水野　元博 …… P73, P74, P75, P78
水畑　穣 ……L3-12, P38
宮久保　圭祐 ……P56
宮下　智史 ……P75
宮下　真奈美 …… L3-2
宮東　達也 ……P73
宮ノ入　洋平 …… P3, P30
宮脇　仁 ……P72

む

武藤　梨沙 ……P32
村上　政隆 …… L2-5
村上　美和 …… L1-5
村上　良 …… L3-12
村木　則文 ……P32
村田　道雄 ……L1-6, P41, P43

め

目谷　太樹 ……P10

も

持田　勲 ……P72
森　祥子 …… P4
森　正之 …… P9
森田　靖 ……P45
森本　大智 …… P11, P12, P16
両角　悠作 ……P59

や

矢澤　宏次 …… L1-3, P57
柳　陽介 …… L1-4
山内　雅弘 ……P79
山口　圭一 …… SL3-1, SL3-2

山口　拓実 …… P14
山口　真 …… P36
山口　芳樹 …… SL3-3, L3-10
山崎　俊夫 …… P1
山崎　俊正 …… P96
山下　和男 …… P15
山田　和彦 …… L2-1
山田　和哉 …… P48
山田　久嗣 …… SL1-9
山本　泰彦 …… L2-6
山本　雅博 …… L3-12
楊　淳竣 …… P30

ゆ

優　乙石 …… L3-7
杠　直哉 …… P76
柚原　光佑 …… P31
尹　聖昊 …… P72

よ

横川　真梨子 …… P15
横地　政志 …… P87
横山　順 …… SL1-4, SL1-6
吉田　将喜 …… P38
吉田　利彦 …… P36
吉田　嘉晃 …… P57
吉永　壮佐 …… L3-4, P76
吉成　洋祐 …… SL2-3, P94
吉水　広明 …… P77, P79
吉村　優一 …… SL3-4
米山　桃子 …… P13
四方田　洋樹 …… P52

り

李　真和 …… SL1-9
李　映昊 …… P24

わ

脇坂　朝人 …… L2-2
和田　昭盛 …… P49, P51, P52
和田　智之 …… P45
渡部　暁 …… L3-2, L3-7
渡辺　隆司 …… L3-8
渡邉(伊藤)　ひかり …… P53

（無断で複製・転載を禁じます）
Copyright© 2014 The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

2014年11月4日発行
Published on November 4, 2014

第53回NMR討論会（2014）

会　期：2014年11月4日（火），5日（水），6日（木）
November 4（Tue）-6（Thu）, 2014
会　場：大阪大学コンベンションセンター＆体育館
Osaka University Convention Center & Gymnasium
〒565-0871　大阪府吹田市山田丘1-1
TEL：06-6879-7171

編集・発行：53rd NMR討論会事務局
〒102-0072　東京都千代田区飯田橋3-11-15
UEDAビル6階 株式会社クバプロ内
TEL：03-3238-1689　FAX：03-3238-1837
E-mail：nmr53@kuba.jp

ランチョンセミナー

Luncheon Seminars

［会場：MOホール／ MO Hall］

11月4日（火）

12:50 ～ 13:40

株式会社JEOL RESONANCE

11月5日（水）

12:30 ～ 13:20

アジレント・テクノロジー株式会社

11月6日（木）

12:20 ～ 13:10

NMR共用プラットフォーム

JEOL RESONANCE
ランチョンセミナー

新技術紹介

新型NMR 装置 NMR spectrometer ZETA

日時：2014年 11月 4日（火）

回路の高集積化により信頼性の向上と大幅な筐体の小型化を実現、最新デジタル技術と高周波技術を駆使して開発された FT-NMR システム「NMR spectrometer ZETA（JNM-ECZR/ECZS シリーズ）」をはじめ、低価格、低ランニングコストを実現した極低温プローブ「SuperCOOL プローブ」、世界最高回転速度 110 kHz 以上を実現した 0.75 mm HXMAS プローブ、世界最高試料容量（616 μl）を誇る 8 mm HXMAS プローブなどの周辺機器や定量 NMR 機能等を強化した弊社 NMR ソフトウェア「Delta」をご紹介いたします。

NMR spectrometer ZETA
JNM-ECZR/JNM-ECZS series

JNM-ECZ500R

JNM-ECZ400S

第 53 回 NMR 討論会

アジレント・テクノロジー ランチョンセミナー

共催：第 53 回 NMR 討論会 / アジレント・テクノロジー株式会社

アジレントの蛋白質解析トータルソリューションの紹介

NMR 分光学の主要なテーマの一つである蛋白質の構造解析や相互作用解析は、 専門的かつ多角的な観測を必要とするテーマです。 アジレントでは、この領域に MS、NMR、X 線結晶解析装置を通して取り組んでおり、本セミナーでは、 機能構造解析のためのハイスループット変異体作成や LC も含めたアジレントのトータルソリューションとして紹介します。

Session 1

質量分析による蛋白質解析　ー高感度分析への挑戦と汎用システムの開発ー

福田宏之（アジレント・テクノロジー株式会社　ライフサイエンス部門　アプリケーション部）

質量分析法は蛋白質解析において必須の分析手法となっており、 測定の高感度化に伴いその有用性が増しています。これに伴い、蛋白質の試料調整方法および溶媒等の基本的実験条件に関して再検討の必要性が認識されています。
また、 微量蛋白質の同定 あるいは翻訳後修飾解析において、 NanoLC-ESI-MSMS は有効な手段ですが、 安定的な測定系の構築が必要です。 本セミナーでは、これらの課題に対する種々のソリューション技術をご紹介いたします。

Session 2

多次元 NMR 支援ソフトウェア　ーVnmrJ-nmrPipe 統合環境ー

栗田順一（アジレント・テクノロジー株式会社　ライフサイエンス部門　リサーチプロダクト営業部）

NMR 法は生体高分子の立体構造解析や相互作用解析、 運動解析などに必須の分析法となっております。しかしながら、未だ蛋白質 NMR の測定は細かい条件設定が必要としております。 また、 近年のコンピュータの高速化に伴い NUS 法による高速測定法も十分に実用的な時間で処理できるようになり、 これを取り込むことで多次元処理フローが増々複雑化してきております。 本セミナーではこれらを簡便に行えるアジレントの VnmrJ-nmrPipe 統合環境をご紹介いたします。

Session 3

X 線結晶構造解析　ー最適結晶の迅速判定法および単結晶用 X 線回折装置ー

佐藤孝（アジレント・テクノロジー株式会社　ライフサイエンス部門　エル・エス・スクエア　LS2 ）

X 線結晶構造解析の律速段階の一つは最適結晶の判別ですが、 アジレントは母液中の個々の結晶回折像を直接取得することによる最適結晶の迅速判定を可能とするシステム（PX Scanner）を開発いたしました。 また、蛋白質結晶および有機・無機結晶構造解析のために、コンパクトでエントリーモデルの操作性でハイエンドの性能を実現した単結晶用 X 線回折装置（SuperNova）を開発いたしました。 本セミナーでは、 蛋白質および低分子アプリケーションに関するアジレントの最新ソリューションをご紹介いたします。

アジレント・テクノロジー株式会社
Tel. 0120-477-111
email_japan@agilent.com

Agilent Technologies

NMR共用プラットフォーム・ランチョンセミナー

場所：第53回NMR討論会 MOホール

日時：2014年11月6日 12:20-13:10

NMR共用プラットフォームの施設と利用法の紹介

講師 ：木川 隆則（理研），西村善文（横浜市大），児嶋長次郎（大阪大）

NMR共用プラットフォームについて（http://nmrpf.jp/）

核磁気共鳴（NMR）法は，原子分解能の構造や相互作用情報を，溶液や固体状態の試料について与える解析法であり，化学，材料・素材，食品・環境，生命科学等の広範な分野で必須の計測法です。このNMRについて超高磁場など先端的な施設と関連技術を有する理化学研究所，横浜市立大学，大阪大学の3機関は，文部科学省「先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業」の補助を受けて，共用プラットフォームを形成して共用事業を推進しています。

共用プラットフォームでは，産業界やアカデミアの多様な研究者への先端NMR装置の共用を通じて，個別解析や技術開発の課題に取り組み，もって「科学技術イノベーションによる重要課題の達成」，「日本企業の産業競争力の強化」，「研究開発投資効果の向上」に貢献することを目的としています。